

Biogenesis of Lysosome-related Organelle Mutant Silkworms by Direct Injection of a Cas9 Protein-guided RNA Complex into *Bombyx mori* Embryos

Kee Young Kim, Jeong Hee Yu, Su-Bae Kim, Seong-Wan Kim, Seong-Ryul Kim, Kwang-Ho Choi, Jong Gil Kim and Jong Woo Park*

Sericultural and Apicultural Materials Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Jeollabuk-do 55365, Korea

Received March 26, 2019 / Revised April 15, 2019 / Accepted April 16, 2019

Genome editing technology employing gene scissors has generated interest in molecular breeding in various fields, and the development of the third-generation gene scissors of the clustered, regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) system has accelerated the field of molecular breeding through genome editing. In this study, we analyzed the possibility of silkworm molecular breeding using gene scissors by genomic and phenotypic analysis after editing the biogenesis of lysosome-related organelles (BmBLOS) gene of Bakokjam using the CRISPR/Cas9 system. Three types of guide RNAs (gRNA) were synthesized based on the BmBLOS gene sequence of Bakokjam. Complexes of the prepared gRNA and Cas9 protein were formed and introduced into *Bombyx mori* BM-N cells by electroporation. Analysis of the gene editing efficiency by T7 endonuclease I analysis revealed that the B4N gRNA showed the best efficiency. The silkworm genome was edited by microinjecting the Cas9/B4N gRNA complex into silkworm early embryos and raising the silkworms after hatching. The hatching rate was as low as 18%, but the incidence of mutation was over 40%. In addition, phenotypic changes were observed in about 70% of the G0 generation silkworms. Sequence analysis showed that the BmBLOS gene appeared to be a heterozygote carrying the wild-type and mutation in most individuals, and the genotype of the BmBLOS gene was also different in all individuals. These results suggest that although the possibility of silkworm molecular breeding using the CRISPR/Cas9 system would be very high, continued research on breeding and screening methods will be necessary to improve gene editing efficiency and to obtain homozygotes.

Key words : BmBLOS, *Bombyx mori*, CRISPR/Cas9, gene editing, guide RNA

서 론

산업곤충으로서 누에(*Bombyx mori*)는 오랜 기간 동안 섬유 생산 및 식용으로 이용되어 오면서 잠상산업의 발달과 함께 나비목의 표본 곤충으로서 생태 및 유전학적 연구가 지속적으로 이루어져왔으나, 근래에 들어 인공섬유의 생산 및 이용이 증가함에 따라 천연실크의 수요가 감소하며 잠상산업은 점차 쇠퇴하고 있는 실정이다[11, 24]. 현재 누에의 기능성에 대한 조명이 이루어지며 새로운 기능성 식품시장에 진입하게 됨으로써 그 명맥을 유지하고 있으나 향후 잠상산업의 재도약을 위해서는 새로운 소재개발이 반드시 필요하다[1, 11]. 이에 따라 수많은 연구자들이 물질생산을 위한 생체공장으로서 누에의 이용방안에 대해 모색하게 되었고, *Trichopusia ni* 유래의

전이인자(piggyBac)를 이용한 형질전환누에 개발에 이르렀다[14, 24]. 하지만 이와 같은 형질전환누에는 효용성과는 별개로 GMO에 대한 규제에 부딪쳐 상용화 되지 못하고 있는 실정이다. 다행히도 최근 기존의 형질전환기술을 대신하여 분자유종 기술로서 활용 가능한 유전자편집기술이 등장함으로써 이를 이용한 누에를 포함한 곤충의 유전자편집에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 7, 18, 23]. 하지만 국내에서는 이와 같은 연구가 전무한 실정으로 미래 기술선점을 위해서 유전자편집을 이용한 곤충 분자유종기술 확보를 위한 노력이 시급한 상황이다.

유전자 편집기술은 2002년도 1세대 유전자가위인 Zinc Finger Nuclease (ZFN)가 등장함으로써 주목 받기 시작하여 [4], 2010년에 개발된 2세대 유전자가위인 Transcriptor Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)가 등장한 이후 게놈 편집을 위한 현실적인 기술로서 인정받게 되었다[6, 12]. 이러한 유전자 편집기술은 2012년 이후 Clustered, regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated protein (Cas) 시스템이 등장함으로써 급격한 기술적 진보가 이루어지게 되었으며[5, 7, 10], 최근에는 임상 적용에 대한 논의가 이루어지는 수준까지 발전하였다[21]. 3세대 유전

*Corresponding author

*Tel : +82-63-238-2913, Fax : +82-63-238-3832

*E-mail : jwpark0824@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

자 가위인 CRISPR/Cas 시스템은 박테리아에서 바이러스의 감염과 같은 외부 침입에 대응하기 위한 적응면역시스템으로서, 감염된 바이러스에 대응하기 위하여 박테리아 내부에서 바이러스의 유전자 서열에 대한 상보적인 저분자 RNA를 생성하고, 이를 통해 인지된 바이러스 유전자를 박테리아의 Cas 단백질이 제거한다[2]. 박테리아에는 3가지 유형의 CRISPR/Cas 시스템이 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 유형 1과 3은 서열인지 및 절단에 필요한 구성요소가 복잡하기 때문에 이용에 제약이 따른다[7]. 하지만 *Streptococcus pyogenes*에서 발견된 유형 2의 CRISPR/Cas 시스템은 NGG 서열(Protospacer Adjacent Motif; PAM)을 포함하는 23개의 뉴클레오타이드를 인지하는 guide RNA (gRNA)와 Cas9 단백질로만 구성되어 있어 조작 및 시스템구성이 간단하기에 유형 2의 CRISPR/Cas 시스템이 3세대 유전자 가위로써 이용되고 있다[7]. 뿐만 아니라 이와 같이 간단한 구성은 CRISPR/Cas 시스템을 세포 또는 배아로 도입하는데 있어서도 벡터, mRNA, 또는 단백질-RNA 복합체 등 다양한 형태로 도입이 가능하기 때문에 목적에 따른 적용이 가능하다는 장점을 가진다[15].

따라서 본 연구에서는 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 누에 분자유종기술을 확보하고자 보급품종 누에인 백옥잠의 요산 미립자 축적에 관여하는 Biogenesis of Lysosome-related Organelles (BLOS) 유전자[9]를 편집함으로써 발생하는 표현형 및 유전형변화를 관찰을 통해 3세대 유전자가위를 이용한 누에 분자유종 가능성을 분석하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 누에 사육

실험에 사용한 누에는 휴면계통 보급품종인 백옥잠(잠 123*124)을 이용하였으며, 누에 사육은 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육기준(온도, 24-27℃, 습도, 70-90%) 준하여 신선한 뽕잎을 급이하고 25℃, 16L8D 조건에서 사육하였다. 누에 난소 세포주 BM-N (CRL-8910)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 27℃에서 10% fetal bovine serum (FBS; GEMIMI, USA)를 포함하는 TNM-FH배지(WELGENE, Korea)를 이용하여 배양하였다.

염기서열분석

백옥잠의 BmBLOS 유전자의 염기서열을 분석하기 위하여 NCBI에 등록된 Dazao 품종의 염기서열(NW 004582020 Region: 1971240..1983012)로부터 유전자 증폭을 위한 Primer를 제작하였다(Table 1). 백옥잠의 혈림프 세포로부터 Wizard SV genomic DNA 추출키트(Promega, USA)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하고 이를 주형으로 이용하여, Table 1의 프라이머와 Pfx DNA polymerase (Invitrogen, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 유전자는 pJET 1.2 blunt vector (Thermo Scientific, Lithuania)에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

가이드 RNA 디자인 및 합성

유전자 편집을 위한 gRNA는 온라인 분석도구(<http://crispr.dbcls.jp>)를 이용하여 백옥잠 BmBLOS 유전자의 엑손 2, 3, 및 4의 염기서열로부터 PAM서열을 포함한 23개 뉴클레오타이드(N₂₀NGG) 표적서열을 검색하고, *B. mori* 게놈 내에서의 출현 빈도를 분석하였다. PAM 서열로부터 N₂₀, N₁₂, 및 N₈의 출현 빈도를 분석하고, 가장 낮은 출현빈도를 나타내는

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Primer purpose
Blos-E1	F : CTTAACCATAGATAATACACACAC R : CTCAAATATAAGTACGGCCACCA	
Blos-E3	F : AGAGAAAATCTGTAAGAATAATA R : AAGCTAGCCACAGTGTATTATCA	Detection for targeting sites and T7 EI assay
Blos-E4	F : GTATGTACCGTTAGTTAAAA R : CAGGACAACTATGCTTTAGA	
Blos-E1 sg	F : TAATACGACTCACTATAGCTTCTGTGCTGAGACTCATC R : TTCTAGCTCTAAAACGATGAGTCTCAGCACAGAAG	
Blos-E3 sg	F : TAATACGACTCACTATAGGGAACACTACATGCTGCTTG R : TTCTAGCTCTAAAACCAAGCAGCATGTAGTGTCC	Preparation of gRNA template
Blos-E4 sg	F : TAATACGACTCACTATAGGAGTAGGGGTTGGATCTGCT R : TTCTAGCTCTAAAACAGCAGATCCAACCCCTACTC	
GAPDH	F : GCTGGAATTTCTTTGAATGAC R : CAATGACTCTGCTGGAATAACC	
BLOS RT	F : AGCAGATCCAACCCCTACTCCAGC R : GAGTTCAAGCGTGCGAGCAGACA	RT-PCR

F: Forward, R: reverse

gRNA 표적 서열을 선발하여 gRNA를 합성하기 위한 Table 1의 PCR 프라이머를 제작하였다. gRNA의 합성은 GeneArt Precision gRNA synthesis kit (Invitrogen, Lithuania)를 이용하여, 사용자 매뉴얼에 따라 PCR을 통해 주형 DNA를 제작하고 시험관 내에서 RNA 중합효소를 이용하여 gRNA를 합성 후 정제하고, -80°C 에 보관 후 실험에 사용하였다.

Transfection 및 가이드 RNA 효율분석

제작된 gRNA와 Cas9 단백질의 복합체는 electroporation을 통하여 BM-N 세포주에 transfection 시켰다. Electroporation을 위하여 Cas9/gRNA 복합체(2 ug Cas9, 2 ug gRNA, 272 mM Sucrose, 10 mM Hepes, pH7.3)를 상온에서 10분간 형성시키고 2×10^6 cell/ 0.4 ml의 BM-N 세포와 혼합 후 얼음에서 5분간 방치하였다. 이후 혼합액은 0.4 cm electroporation cuvette (Bio-Rad, USA)으로 옮기고, Gene Pulser X cell electroporation system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 750 V/cm 출력으로 15 ms동안 전기충격을 가하고 얼음에서 10분 동안 냉각하였다. 전기충격을 가한 세포는 6 well plate로 옮긴 후 10% FBS가 포함된 신선한 2 ml의 TNM-FH 배지를 공급하여 27°C 에서 5시간 동안 배양한 후 죽은 세포를 제거하고 새로운 배지로 교체하여 67시간 동안 추가 배양하였다. 이후 배양된 세포를 수집하여 게놈 DNA를 추출하고, Table 1의 프라이머를 이용하여 각각의 표적 부위를 증폭 후 T7 endonuclease I (T7 EI) 분석을 통하여 gRNA 효율을 검정하였다.

T7 EI 분석은 각 엑손 부위의 PCR 산물을 95°C 에서 5분간 변성시킨 후 85°C 까지 초당 2°C 씩 냉각시키고, 25°C 까지 초당 0.1°C 씩 천천히 냉각시키면서 PCR 산물의 재결합을 유도하였다. 이후 1 U의 T7 EI (NEB, USA)을 첨가하여 37°C 에서 1시간 동안 반응시키고 2% 아가로스겔에 전기영동 후 Quantity One software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 밴드의 강도 및 크기 통해 정상 밴드에 대한 실험군의 밴드 감소율로 분석하였다.

Microinjection

Microinjection을 위한 누에 알은 Kim 등[13]의 방법에 따라 준비하고 산란 후 6시간 이내에 주사를 완료하였다. 주사를 위하여 Cas9 (300 ng/ μl)와 gRNA (500 ng/ μl)를 완충용액(5 mM KCl, 0.5 mM Phosphate buffer, pH 7.0)에 혼합 후 상온에서 10분간 방치하여 복합체를 형성시켰다. 형성된 Cas9/gRNA 복합체는 micro-injector (Narishige, Japan)를 이용하여 준비된 누에 배아의 배면에 텅스텐 바늘을 이용하여 구멍을 만든 후 microcapillary를 이용하여 10-15 nL를 주입하고, 난각의 구멍은 Cyanocrylate 접착제를 이용하여 막았다. Microinjection 후 누에 알은 보습한 패트리디쉬에 넣어 25°C 에서 부화할 때까지 9-10일간 보호하였다.

유전자 편집 개체 선발

유전자 편집 개체의 선발은 부화한 유충을 5령 3일까지 사육하고, 유충의 다리로부터 100 μl 의 혈림프를 채취 후 원심분리를 통하여 혈림프 세포를 수집하였다. 이후 세포에 50 μl 의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 0.25% NP-40, 150 mM NaCl, 2 ug/ μl proteinase K, pH 7.4)를 첨가하여 65°C 에서 30분간 배양 후 95°C 에서 10분간 Proteinase K를 불활성화 시켰다. 준비된 세포 용출액 3 μl 를 주형으로 하여 BmBLOS 유전자의 4번 엑손을 증폭하고 T7 EI 분석을 통해 유전자 편집 개체를 선발하였다.

유전자 발현 분석

유전자 편집 개체의 BmBLOS 유전자의 발현 변화를 관찰하기 위하여, 5령 6일째의 정상 유충과 표현형의 변화가 확인된 G0 세대 유충 5마리에서 각각 4개의 다리를 채취하고 RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA는 500 ng의 RNA와 PrimeScript 1st strand cDNA 합성 키트(TaKaRa, Japan)를 이용하여 합성하고, RT-PCR 및 quantitative PCR (qPCR)에 이용하였다. BmBLOS 유전자의 발현분석을 위하여, B4N gRNA의 표적부위를 정방향 프라이머로 제작하여 결실 돌연변이의 검출을 용이하게 제작하였으며(Table 1), qPCR은 qTOWER3 (Analytik Jena, Germany) 장비와 TB Green Premix EX Taq (TaKaRa, Japan)을 이용하여 사용자 매뉴얼에 따라 진행 후, BmGAPDH를 이용하여 각 시료의 표적유전자 발현을 표준화하고 정상 유충을 기준으로 ddCt 방법을 이용하여 비교하였다.

통계분석

모든 실험결과는 평균값(mean value) \pm 표준편차(SD)로 나타내었으며, IBM SPSS Statistics 23 (IBM, USA)를 이용한 일원배치 분산분석(Oneway Analysis of Variance; ANOVA)을 실시하고, 각 평균값의 유의성($p < 0.05$)은 Duncan's multiple range test를 실시하여 검정하였다.

결과 및 고찰

가이드 RNA 디자인 및 합성

NCBI에 등록된 Dazao 품종의 BmBLOS 유전자의 엑손 및 인트론의 구조를 분석한 결과, 전체유전자의 크기는 11,773 bp로서 5가지 형태로 전사가 일어나며, 이성체에 따라 4개 또는 5개의 엑손으로 구성되고, 이중 대부분의 변이가 1,800 bp 앞쪽에서 나타나는 것으로 확인되었다. 이에 따라 엑손 1번이 1,800 bp 이후에 존재하는 3번 이성체의 엑손 구조를 기초로 BmBLOS 유전자의 엑손 및 인트론의 구조를 도식화 하였다(Fig. 1). 백옥잠의 BmBLOS유전자에 대한 gRNA 표적부위를 탐색하기 위해 Dazao의 염기서열로부터 제작된 Table 1의 프

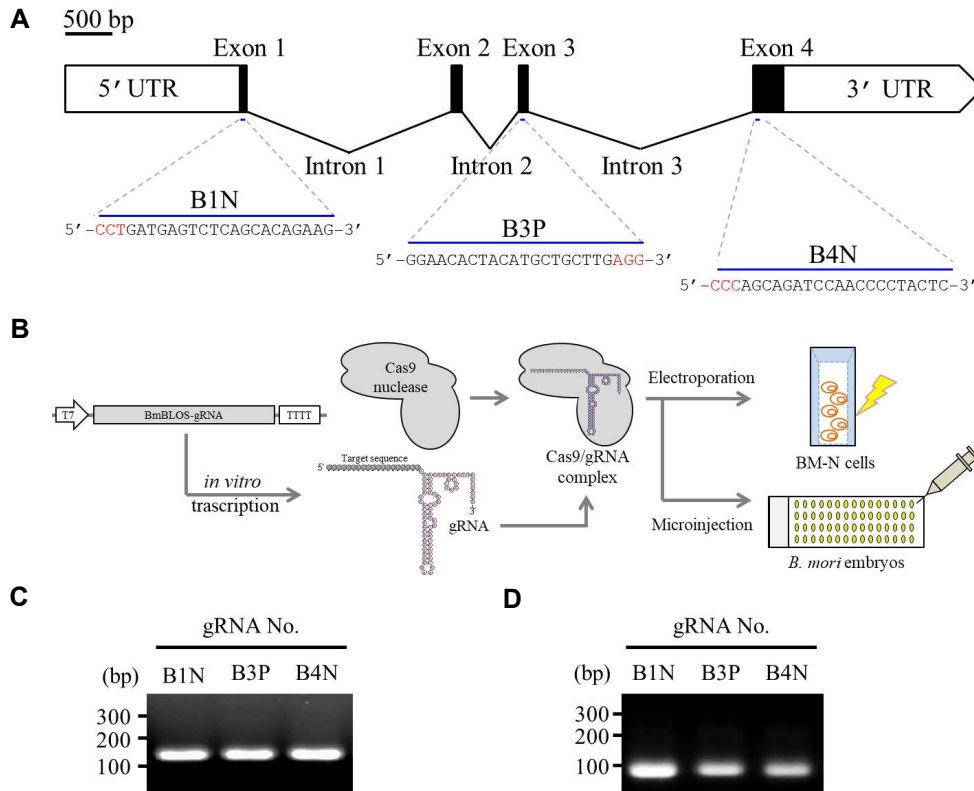


Fig. 1. Design and delivery of gRNA. (A) Schematic diagram of gRNA target sites in wild type BmBLOS gene. Three designed gRNAs are located in exon 1, 3, and 4 which are indicated by dashed lines with target sequences. The gRNA targeting sites, B1N and B4N, are located on the anti-sense strand and B3P is located on the sense strand. (B) gRNA was expressed downstream of the T7 promoter. The Cas9/gRNA complexes are transferred to BM-N cells and *B. mori* embryos by electroporation and microinjection, respectively. (C) PCR assembled gRNA DNA template and (D) *In vitro* synthesized gRNAs was analyzed by gel electrophoresis.

라이머를 이용하여 백옥잠의 게놈 DNA로부터 엑손 1, 3, 및 4를 증폭하고 염기서열을 분석한 결과 각 엑손 부위는 Dazao의 염기서열과 98% 이상 일치하였다. 얻어진 염기서열은 CRISPRdirect 툴을 이용하여 각 엑손에 존재하는 N₂₀NGG 표적서열을 탐색하고, Naito 등[17]의 방법에 따라 부정교합 (off-target) 가능성을 분석하기 위하여, 각 표적서열과 축소된 N₁₂NGG 및 N₈NGG 서열의 *B. mori* 게놈(ASM15162V1) 내 출현빈도를 분석하고 Table 2에 나타내었다. 엑손 1, 2, 및 3의 표적서열 중 출현빈도가 가장 낮은 서열을 선발하여 각각 B1N, B3P, 및 B4N으로 명명하였다(Fig. 1). 20개의 염기로 이루어진 각각의 표적 서열은 게놈 내에서 유일한 서열이며, 그 길이를 PAM 서열 인근 12개의 염기까지 축소하여도 단1회만 존재한 것으로 확인 되었다(Table 2). Fu 등[8]에 따르면 gRNA의 표적 서열이 19 또는 18개의 염기로 축소되더라도 표적을 인지하고 절단할 수 있다고 보고하고 있다[21-23]. 따라서 유사서열의 존재유무는 게놈 내에서 비 선택적 유전자 편집가능성을 최소화하기 위하여 필요하다고 판단된다.

Liang 등[16]에 따르면 CRISPR 시스템을 이용한 유전자 편집에서 Cas9 단백질과 gRNA의 복합체를 세포 내부로 도입시

킬 경우 벡터 또는 mRNA 형태로 도입한 경우보다 유전자 편집 효율은 증가하는 반면 off-target 가능성은 감소시킬 수 있다고 밝히고 있다. 이에 착안하여 본 연구 또한 누에 세포와 배아에 단백질/RNA 복합체를 도입시키기 위하여(Fig. 1B), PCR을 통해 gRNA 합성을 위한 DNA 주형을 제작하고(Fig. 1C), 4종의 NTP's와 T7 RNA 중합효소를 이용하여 전사를 유도한 결과 3종의 gRNA를 고농도로 확보할 수 있었다(Fig. 1D).

가이드 RNA 효율분석

합성된 gRNA의 효율을 분석하기 위하여, Cas9 단백질과 각각의 gRNA 복합체를 형성시키고 BM-N 세포에 electroporation하여 배양 후 T7 E1분석을 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. B1N, B3P, 및 B4N gRNA에서 모두 PCR 산물의 절단이 나타남을 확인할 수 있었으며, 밴드의 강도를 이용한 효율분석에서는 B3P gRNA가 40% 이상으로 가장 높은 효율을 나타내었다. 하지만 2밴드 패턴이 정확하게 나타나는 B1N 및 B4N과는 다르게 B3P에서는 끌린 형태의 밴드패턴이 나타났다. 이는 부정교합을 절단하는 T7E1의 특성상 PCR 산물의

Table 2. Analysis of gRNA target sequences of the BmBLOS gene and potential off-target in the genome

Locus	Strand	Sequence (N ₂₀ NGG)	GC (%)	Tm (°C)	Possibility of off-target recognition		
					20 mer	12 mer	8 mer
Exon 1	+	TTAGTTTATTGATGTGATT GG *	20	55.94	1	6	612
	-	CC CTGATGAGTCTCAGCACAGAA	45	69.54	1	2	342
	-	CCTGATGAGTCTCAGCACAGAA g ^a	50	69.89	1	1	230
	+	GCACAGAAAGACATAGAAAAATGG	35	63.74	1	2	1450
Exon 3	-	CC CATATGGTTATTTCAGTAAA	20	56.61	1	3	427
	-	CC ATATGGTTATTTCAGTAAAT	20	56.61	1	2	267
	+	GGAACACTACATGCTGCTT AGG ^b	50	71.6	1	1	257
	-	CCT AGCCGCGAACCTGAACAAGA	55	75.8	1	1	474
Exon 4	-	CCT CGACTCAAACGCGCATATTA	45	68.61	1	2	269
	-	CCC AGCAGATCCAACCCCTACTC ^c	55	76.05	1	1	167
	-	CCC CTACTCCAGCAGATAGATCA	45	69.5	1	2	327
	-	CC AGCAGATAGATCAAATCGAAG	40	64.43	1	3	289

*Bold letters indicate the PAM sequence in the target site.

^{abc}The names of the gRNAs indicate B1N, B3P, and B4N, respectively.

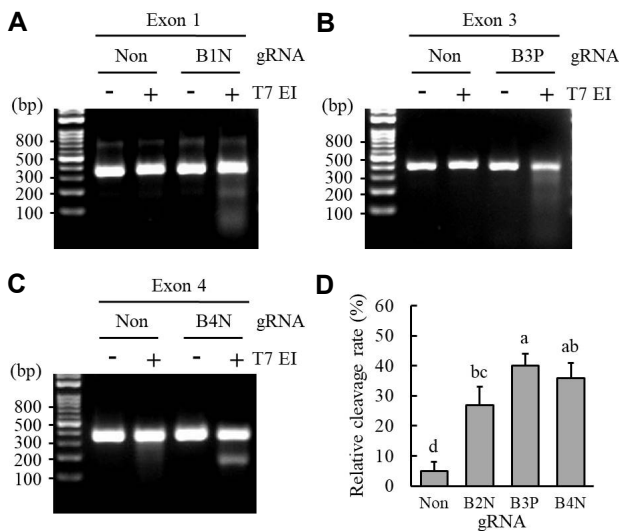


Fig. 2. Gene editing in the *B. mori* genome. BM-N cells were co-transfected with Cas9 protein and gRNA complexes targeting BmBLOS exon 1 (A), exon 3 (B), and exon 4 (C) targets. T7E1 assays were performed for each target at 72 hr post transfection and the products were separated on 2% agarose gel. (D) Relative cleavage rates were quantified using Quantity One software. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean \pm SD (n=6).

재결합과정에서 여러 부위에서 발생된 부정교합이 무작위로 절단되었기 때문에 예상된다[23]. 따라서 누에의 BmBLOS 유전자를 편집하기 위한 gRNA로서 절단패턴의 예측이 어려운 B3P보다 절단효율은 다소 낮지만 정확한 형태의 절단 패턴을 가지는 B4N이 적합할 것으로 판단된다.

유전자 편집 누에 제작

BmBLOS 유전자 편집 누에를 제작하기 위하여 Cas9 단백질

질과 선발된 B4N gRNA 복합체를 누에의 초기배아 주공과 후부사이 가운데 배면에 microinjection하고, 그 결과 Table 3에 나타내었다. Cas9/B4N gRNA를 주사한 480개의 누에 알 중 88(18.3%) 마리의 유충이 부화되었으나, 이중 25%에 해당하는 22개체만이 5령까지 생존하여, Cas9 단백질만 주사한 그룹에 비하여 부화율 및 생존율이 현저하게 낮게 나타났다. 이러한 결과는 대부분의 CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 편집연구에서 gRNA 농도증가에 따라 부화율 및 생존율이 감소하는

Table 3. Embryonic gene editing induced by Cas9/gRNA complex injection targeting BmBLOS

gRNA for injection	Number of injected embryos (n)	Hatching (n)/(%)	Survive to 5th instar (n)/(%)	Mutation (n)/(%)	Phenotypic change (n)/(%)
Cas9 only	240 ¹⁾	117/48.8	89/76.1	0/0	0/0
Cas9/B4N	480	88/18.3	22/25.0	9/40.9	7/77.5

¹⁾Results are mean of duplicate data.

경향과 일치함에 따라 일반적인 현상으로 외부에서 유입된 gRNA가 배아의 분화에 영향을 미친 것으로 판단된다[20].

유전자 편집체계를 선발하기 위하여 5명까지 생존한 22개체의 혈림프를 이용하여 T7E1 분석을 수행한 결과(Fig. 3A), 9개체에서 유전자 편집에 따른 2밴드 패턴이 확인되었으며, Fig. 2D에서 BM-N 세포를 대상으로 분석한 유전자 편집 효율 36%와 유사한 41%를 나타냈다(Table 3). 또한 유전자의 변이가 나타난 개체 중 7개체(77.5%)에서 표현형의 변화가 관찰되었으며, 표피 전반에 걸쳐 모자이크 무늬가 나타나는 유형과 표피 절반에서만 투명한 영역을 가지는 두 가지 유형으로 나타났다(Fig. 3B). 염기서열 분석결과 돌연변이가 확인된 9개체에서 모두 다른 유형의 삽입 및 결실 돌연변이를 가지고 있음이 확인되었다(Fig. 3C). 이는 CRISPR/Cas9 시스템이 gRNA의 표적에 존재하는 PAM 서열 부위의 인산결합을 절단하는 역할만하기 때문에 절단된 서열은 DNA 회복기작 중 핵산 분해효소에 의하여 제거 또는 삽입이 이루어지기 때문으로 생각된다[10, 19]. 따라서 CRISPR/Cas9 시스템을 효율적으로 이용하기 위해서는 유전자 편집 효율을 높이고 편집에 따른

염기서열을 예측 가능하도록 절단범위를 정형화하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

BmBLOS 돌연변이에 따른 유전자 발현

표현형에서 변이가 확인된 5 개체를 무작위로 선발하여 RNA를 추출하고 BmBLOS 유전자에 대한 발현분석 후 Fig. 4에 나타내었다. RT-PCR 결과 표현형에 변이가 나타난 유충은 정상유충보다 BmBLOS 유전자의 발현율이 감소하는 경향을 나타내었으며, qPCR을 이용한 분석에서 BmBLOS 유전자의 발현은 정상 유충의 30-70% 수준으로 개체별 차이를 나타내었다. 이는 유전자 편집 G0 세대 유충 대부분이 정상 BmBLOS 유전자 외에 대립형질로서 돌연변이를 가지는 이형 접합자(heterozygote) 상태이며[10], 돌연변이 또한 염기치환에 따른 missense 혹은 frameshift mutation에 따라 완전한 기능소실이 나타나지 않은 것으로 예상할 수 있다. 뿐만 아니라 RT-PCR을 이용한 전사체 분석은 BmBLOS 유전자의 기능 여부와 관계없이 mRNA의 발현 양만을 측정 가능하기 때문에 표현형 변화와 완전하게 일치하지 않는 것으로 판단된다.

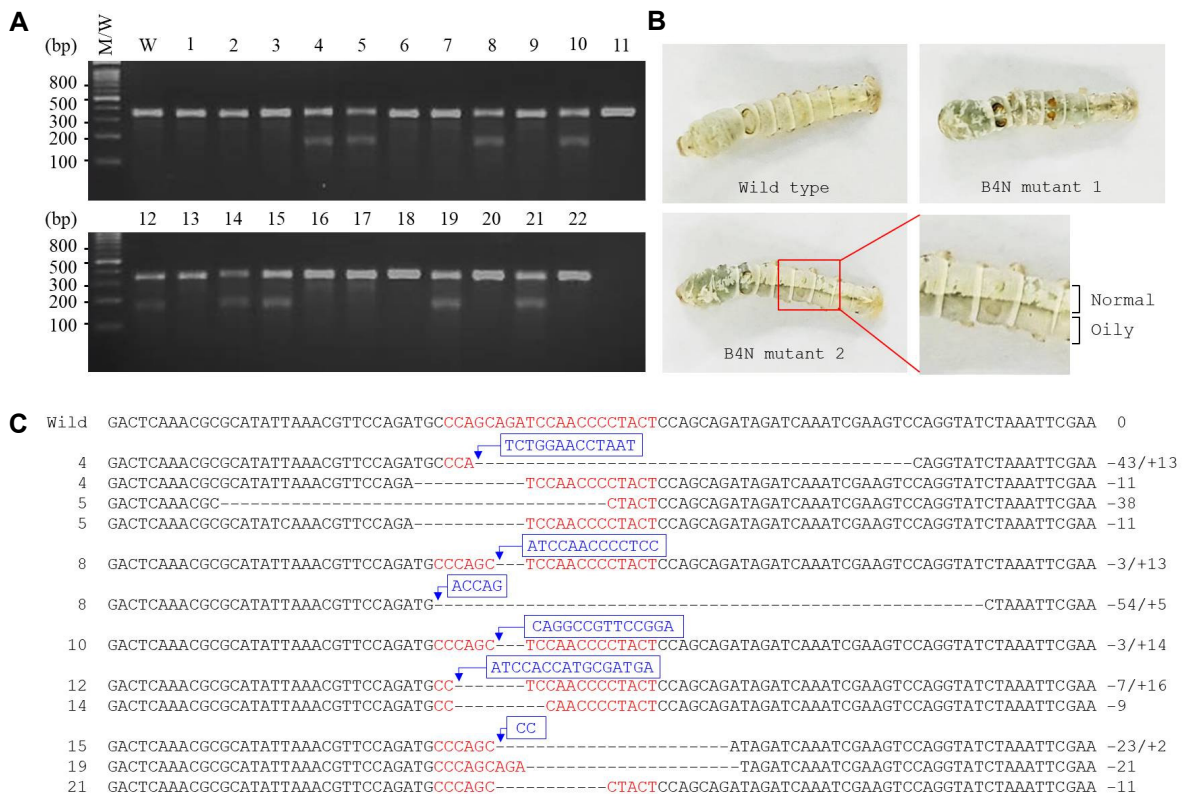


Fig. 3. Mutations of BmBLOS gene induced by Cas9/B4N gRNA injection. (A) T7E1 analysis of larvae. The panels of numbers showed PCR products amplified from WT and mutants treated with T7E1. An additional band of a smaller size was detected in mutant. (B) A representative oily mosaic larva (G0) injected with a Cas9/gRNA complex targeting BmBLOS gene. In a severe case, larva's skin exhibited the oily half and oily mosaic phenotype. (C) Sequence analysis of mutant BLOS alleles. The red sequence indicates target sequence of gRNA. The dotted lines and arrow boxes indicate the deletion and insertion nucleotides, respectively. The number in front and backside of each sequence stand for larva number and number of nucleotides changed, respectively.

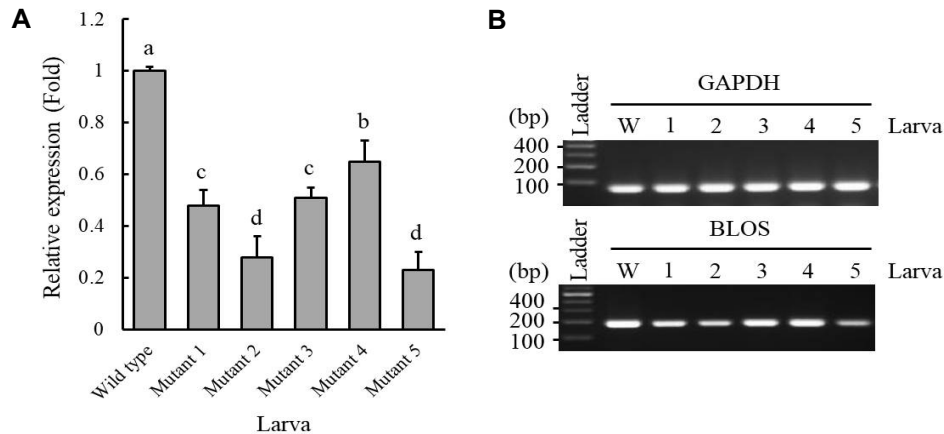


Fig. 4. Relative gene expression of in BmBLOS mutants. (A) The transcription levels of BmBLOS gene in the mutant larvae were measured using quantitative RT-PCR. The expression levels were expressed as a fold change compared to that of wild type larva and GAPDH as an endogenous control. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are mean \pm SD (n=3). (B) The transcription levels of BLOS gene in the mutant larvae were analyzed with RT-PCR. Equal amount loading of samples were ensured by the inclusion of GAPDH.

이러한 결과에 비추어 볼 때 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 편집 및 분자유종은 배아 단계에서 계놈에 대한 편집이 가능하지만 상동염색체에 대한 일괄적인 편집은 어려우며, G0세대에서는 다양한 유전 형질이 나타나기 때문에 동형접합자(homozygote)를 얻기 위해서는 여교배육종(back-cross breeding)을 통하여 G1 세대를 획득하고, 동일한 유전형질을 가지는 이형접합자간의 자가교배를 통해 G2 세대에서 순종 돌연변이의 획득이 가능할 것으로 예상된다. 따라서 유전자 편집효율을 개선하고 동형접합자를 얻기 위한 교배 및 선발방법에 대한 지속적인 연구를 통해 CRISPR/Cas9을 이용한 누에 분자유종 기술확립이 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01270901) 및 국립농업과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

References

- An, H. Y., Cha, J. Y., Park, K. R., Kim, Y. R. and Cho, Y. S. 2013. Improvement effect of fermented silkworm (*Bombyx mori* L.) powder against orptic acid-induced fatty liver in rats. *J. Life Sci.* **26**, 789-795.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712.
- Basua, S., Aryana, A., Overcash, J. M., Samuela, G. H., Andersona, M. A., Dahlemb, T. J., Mylesa, K. M. and Adelmana, Z. N. 2015. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 4038-4043.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. and Carroll, D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**, 1169-1175.
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F. and Marraffini, L. A. 2013. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR - Cas system. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7429-7437.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Boqdanovel, A. J. and Voytad, D. F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Doudna, J. A. and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1078-1086.
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. and Joung, J. K. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279-287.
- Fujii, T., Daimon, T., Uchino, K., Banno, Y., Katsuma, S., Sezutsu, H., Tamura, T. and Shimada, T. 2010. Transgenic analysis of the BmBLOS2 gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **19**, 659-667.
- Harrison, M. H., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M. and Wildonger, J. 2014. A CRISPR view of development. *Genes Dev.* **28**, 1859-1872.
- Ji, S. D., Kim, N. S., Lee, J. Y., Kim, M. J., Kweon, H. Y., Sung, G. B., Kang, P. D. and Kim, K. Y. 2015. Development of processing technology for edible mature silkworm. *J. Seric. Entomol. Sci.* **53**, 38-43.
- Joung, J. K. and Sander, J. D. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 49-55.

13. Kim, S. W., Kang, M. U., Kang, S. W., Yun, E. Y., Choi, K. H., Kim, S. R., Park, S. W., Nho, S. K. and Goo, T. W. 2013. Modification of the commercial silkworm eggs adequate for BluemoonO silkworm transgenesis. *J. Seric. Entomol. Sci.* **51**, 73-77.
14. Kim, S. W., Yun, E. Y., Choi, K. H., Kim, S. R., Park, S. W., Kang, S. W., Kwon, O. Y. and Goo, T. W. 2012. Construction of fluorescent red silk using fibroin H-chain expression system. *J. Seric. Entomol. Sci.* **50**, 87-92.
15. Kistler, K. E., Vosshall, L. B. and Matthews, B. J. 2015. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* **11**, 51-60.
16. Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N. and Chesnut, J. D. 2015. Rapid and highly efficiency mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* **208**, 44-53.
17. Naito, Y., Hino, K., Bono, H. and Ui-Tei, K. 2015. CRISPR direct: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**, 1120-1123
18. Taning, C. N. T., Eynde, B. V., Yu, N., Ma, S. and Smagghe, G. 2017. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *J. Insect Physiol.* **98**, 245-257.
19. Zeng, B., Zhan, S., Wang, Y., Huang, Y., Xu, J., Liu, Q., Li, Z., Huang, Y. and Tan, A. 2016. Expansion of CRISPR targeting site in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **72**, 31-40.
20. Zhang, Z., Aslam, A. F. M., Liu, X., Huang, Y. and Tan, A. 2015. Functional analysis of *Bombyx* Wet 1 during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. *J. Insect Physiol.* **79**, 73-79.
21. Zhang, Z., Zhang, Y., Gao, F., Cheah, K. S., Tse, H. F. and Lian, Q. 2017. CRISPR/Cas9 genome-editing system in human stem cells: current status and future prospects. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **15**, 230-240.
22. Zhao, Y., Dai, Z., Liang, Y., Yin, M., Ma, K., He, M., Ouyang, H. and Teng, C. B. 2014. Sequence-specific inhibition of microRNA via CRISPR/CRISPRi system. *Sci. Rep.* **4**, 3943.
23. Zhu, L., Mon, H., Xu, J., Lee, J. M. and Kusakabe, T. 2015. CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells. *Sci. Rep.* **5**, 18103.
24. Xu, H. and O'Brochta, D. A. 2015. Advanced technologies for genetically manipulating the silkworm *Bombyx mori*, a model Lepidopteran insect. *Proc. Biol. Sci.* **282**, 20150487.

초록 : Cas9 단백질/ 가이드 RNA 복합체를 이용한 누에 BmBLOS 유전자 편집

김기영 · 유정희 · 김수배 · 김성완 · 김성렬 · 최광호 · 김종길 · 박종우*

(국립농업과학원 잠사양봉소재과)

유전자 가위를 이용한 게놈편집 기술의 등장은 다양한 분야에서 분자유종에 대한 관심을 유발하였으며, 3세대 유전자 가위 CRISPR 기술의 개발은 게놈편집을 통한 분자유종 시대를 가속화하고 있다. 본 연구에서는 최근 개발된 3세대 유전자 가위 CRISPR/Cas9을 이용하여 국내 보급품종인 백옥잠의 BmBLOS 유전자를 편집하여 돌연변이를 유도하고 유전형 및 표현형 검사를 통하여 유전자 가위를 이용한 누에 분자유종 가능성을 분석하고 이용기술을 확보하고자 하였다. 유전자 편집을 위하여 백옥잠의 BmBLOS 유전자의 염기서열을 구명하고, 이를 바탕으로 3종의 가이드 RNA를 합성하였다. 합성된 gRNA는 Cas9 단백질과 복합체를 형성시킨 후 BM-N 누에 세포주에 도입 후 T7 endonuclease I 분석을 통하여 편집효율이 가장 높은 B4N gRNA를 선발하였다. 누에 유전자를 편집하기 위하여 Cas9/B4N gRNA를 누에 초가 배아에 미세주사하고 사육하였다. 미세주사 후 부화율은 18% 가량으로 낮게 나타났으나 생존한 개체 중 돌연변이 발생율은 40% 이상으로 비교적 높게 나타났다. 또한 유전자 편집 GO 세대누에 중 70% 가량에서 표현형의 변화가 관찰되었고, 염기서열 분석결과 대부분의 개체에서 BmBLOS 유전자가 정상과 돌연변이가 같이 존재하는 이형접합자 형태로 나타났으며, 그 유전형 또한 모든 개체에서 다르게 나타났다. 이러한 결과에 비추어 볼 때 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 누에 분자유종의 가능성은 매우 높을 것으로 예상되나, 유전자 편집효율을 개선하고 동형접합자를 얻기 위한 교배 및 선발방법에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다.