

Artificial Mutation for Silkworm Molecular Breeding Using Gene Scissors

Jeong Won Hong[†], Chan Young Jeong[†], Jeong Hee Yu, Su-Bae Kim, Sang Kuk Kang, Seong-Wan Kim, Nam-Suk Kim, Kee Young Kim and Jong Woo Park*

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

Received June 30, 2020 / Revised August 3, 2020 / Accepted August 4, 2020

Gene editing technology using the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and the CRISPR associated protein (Cas)9 has been highly anticipated in developing breeding techniques. In this study, we discuss gene scissors as a tool for silkworm molecular breeding through analysis of *Bombyx mori* Kynurenine 3-Monooxygenase (BmKMO) gene editing using the CRISPR/Cas9 system and analysis of generational transmission through mutagenesis and selective crossing. The nucleotide sequence of the BmKMO gene was analyzed, and three guide RNAs (gRNAs) were prepared. Each synthesized gRNA was combined with Cas9 protein and then analyzed by T7 endonuclease I after introduction into the BM-N silkworm cell line. To edit the silkworm gene, K1P gRNA and Cas9 complexes were subsequently microinjected into the silkworm embryos; the hatching rate was 18% and the incidence of mutation was 60%. The gene mutation was verified in the heterozygous G0 generation, but no phenotypic change was observed. In homozygotes generated by self-crossing, a mutant phenotype was observed. These results suggest that silkworm molecular breeding using the CRISPR/Cas9 system is possible and could be an effective way of shortening the time required.

Key words : *Bombyx mori*, BmKMO, CRISPR/cas9, gene editing, gRNA

서 론

미래 식량자원으로서 곤충에 대한 중요성이 부각되면서 곤충을 산업적으로 이용하고자 하는 노력과 함께 지속적인 자원 발굴 및 사육 기술에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 곤충을 이용한 기능성 소재 및 식품 개발에 대한 관심이 점차 증가하고 있다[10, 15].

국내에서는 곤충 자원을 활용하기 위하여 누에의 사육 특성 및 상품성 개선을 위한 육종 연구가 지속적으로 이루어져 왔으며, 그 결과 다양한 누에 품종 들이 개발되었다[8, 13]. 오랜 기간 동안 누에는 전통 육종을 통해 섬유 산업에 그 초점이 맞추어져 개발되어 왔으나, 근래에 들어 인공섬유의 생산 및 이용이 증가함에 따라 천연실크의 수요가 감소하며 잠상산업은 점차 쇠퇴하고 있는 실정이다. 이에 따라 학계에서는 누에의 부가가치 향상을 위하여, 형질전환 기술을 통해 누에를 생체 공장화 하고 이를 이용하여 고부가 단백질의 생산하고자하는 노력을 기울이고 있다. 하지만 이와 같은 형질전환은 외부 유전자의 유입이 필연적이기 때문에 안정성에 대한 논의가

지속적으로 이루어져 왔으며, GMO에 대한 규제에 막혀 상용화되지 못하고 있다[18].

최근 유전자편집 기술이 개발되면서 새로운 분자유종 도구로서 유전자 가위 기술을 이용한 육종 연구가 동 식물 분야에서 활발하게 이루어지고 있다. 유전자 편집 기술은 2002년도 1세대 유전자가위인 Zinc Finger Nuclease (ZFN)가 등장 후 [1], 2010년에 2세대 유전자가위인 Transcriptor Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)가 개발 되었다고[3, 7], 최근 Clustered, regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated protein (Cas) 시스템이 등장함으로써 급격한 기술적 진보가 이루어지며 분자유종 도구로서의 가능성을 주목받게 되었다[4, 6, 14].

3세대 유전자 가위인 CRISPR/Cas 시스템은 박테리아에서 바이러스의 침입에 대응하기 위한 적응면역시스템으로서, *Streptococcus pyogenes*에서 발견된 유형 2의 CRISPR/Cas 시스템은 유전자의 Protospacer Adjacent Motif (PAM; NGG)을 포함하는 23개의 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 저분자 RNA (guide RNA (gRNA))를 생산하고 이를 통해 표적 서열을 인지한 후 Cas9 단백질을 이용하여 핵산 내부에 double strand brake (DSB)를 생성한다. 핵산 내부에 발생된 DSB는 DNA 회복 과정 중 결실 및 삽입 돌연변이가 발생함으로써 그 유전자의 기능을 상실하게 된다[12]. 이러한 기작을 이용하여 표적 유전자에 대한 gRNA를 제작하고 Cas9 단백질과 함께 생물체 내에 도입함으로써 임의적인 유전자 편집이 가능하다.

본 연구에서는, 외래 유전자의 도입에 따른 GMO 규제를 극복하기 위하여 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 누에 분자 육

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-62-238-2913, 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.

중 체계를 확립하고자 단백질-RNA 복합체 형태로 누에 세포 및 배아에 도입시켜 누에의 Kynurenine 3-Monooxygenase (KMO) 유전자를 편집하고, 인위적으로 유발된 KMO 유전자 돌연변이에 따른 표현형의 변화 및 세대간 전달 분석을 통해 문제점을 지적하고 육종기술로서 발전 가능성에 대하여 논의하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 누에 사육

실험에 사용한 누에는 휴면계통 보급 품종인 백옥잠(잠 123*124)을 이용하였으며, 누에 사육은 농촌진흥청 농업생물부의 표준 사육기준(온도, 24-27°C, 습도, 70-90%) 준하여 신선한 뽕잎을 급이하고 25°C, 16L8D 조건에서 사육하였다. 누에 난소 세포주 BM-N (CRL-8910)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 27°C에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; GEMIMI, USA)를 포함하는 TNM-FH 배지(WELGENE, Korea)를 이용하여 배양하였다.

가이드 RNA 디자인 및 합성

유전자 편집을 위한 gRNA는 온라인 분석도구(<http://crispr.dbcls.jp>)를 이용하여, NCBI에 등록된 KMO 유전자(Acc. No. AB063490) 엑손 1 및 7의 염기서열로부터 PAM서열을 포함한 23개 뉴클레오타이드(N₂₀NGG) 표적 서열을 검색하고, *B. mori* 게놈 내에서의 출현 빈도를 분석하였다. Off-target 가능성을 분석하기 위하여 PAM 서열로부터 N20, N12, 및 N8의 출현 빈도를 분석하고(Table 1), 가장 낮은 출현빈도를 나타내는 gRNA 표적 서열을 선발하여 gRNA를 합성하기 위한 Table 2의 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°C에 보관 후 실험에 사용하였다.

Transfection 및 가이드 RNA 효율분석

제작된 gRNA와 Cas9 단백질(Invitrogen, Lithuania)의 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 2×10⁶ cell/ 0.4 ml의 BM-N 세포와 혼합 후, 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 ms 동안 전기충격을 가했다. 전기충격을 가한 세포는 6 well plate로 옮긴 후 10% FBS가 포함된 신선한 2 ml의 TNM-FH 배지를 공급하여 27°C에서 5시간 동안 배양한 후 죽은 세포를 제거하고 새로운 배지로 교체하여 67시간 동안 추가 배양하였다. 이후 배양된 세포를 수집하고 Wizard SV genomic DNA 추출키트 (Promega, USA)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하고, Table 2의 프라이머를 이용하여 각각의 표적 부위를 증폭 후 T7 endonuclease 1 (T7E1) 분석을 통하여 gRNA 효율을 검정하였다.

T7E1 분석은 각 엑손 부위의 PCR 산물을 95°C에서 5분간 변성시킨 후 85°C까지 초당 2°C씩 냉각시키고, 25°C까지 초당 0.1°C씩 천천히 냉각시키면서 PCR 산물의 재결합을 유도하였다. 이후 1 U의 T7E1 (NEB, USA)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 2% 아가로스겔에 전기영동 후 Quantity One software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 밴드의 강도 감소율로

Table 1. Analysis of gRNA target sequences of the *BmKMO* 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
KMOE1	+	AACGTTCAAGAACTAGATGTGG	35	62.79	1	4	377
	+	AAACTAGATGTGGTTGTTGTCGG	35	65.62	1	5	894
	+ ^a	CTAGATGTGGTTGTTGTCGGTGG	50	70.36	1	2	248
	+	GATGTGGTTGTTGTCGGTGGAGG	55	73.03	1	3	930
KMOE7	- ^b	CCACCGAACTATCTGCATATCTG	45	67.9	1	1	211
	+	CACCGAACTATCTGCATATCTGG	45	68.1	1	3	209
	-	CCGAACTATCTGCATATCTGGCC	45	71.1	1	2	395
	+	ACTATCTGCATATCTGGCCTAGG	45	72.49	1	1	287
	-	CCAGGACTGCTCCTGGACTGTGA	60	76.98	1	2	543
	-	CCTGGACTGTGACACTTTTCATG	45	67.48	1	1	151
	+ ^c	CCAGATTCGATTCGGCTGATAGG	50	71.2	1	1	125
	-	CCGACTATTTGCCGGATCAGCT	45	71.9	1	1	1423
-	CCGGATCAGCTTCGCCTTTGATT	45	69.5	1	1	587	

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

^{abc}The names of the gRNAs indicate K1N, K7N, and K7P, respectively.

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Primer purpose
KMO-E1	F : TGTGTGACGTTGCGTGTAACCTCA R : GGCACCTACTTACTGGTACTTATCT	Detection for targeting sites and T7 EI assay
KMO-E1	F : TGCGCAAACACTGGTAATCTTAAATAG R : CCTCAATATAATTGTACATAGCCAG	
K1N sg	F : TAATACGACTCACTATAGCTAGATGTGGTTGTTGTC R : TTCTAGCTCTAAAACCCGACAACAACCACATCTAG	Preparation of gRNA template
K7N sg	F : TAATACGACTCACTATAGCAGATATGCAGATAGTTCCGG R : TTCTAGCTCTAAAACCCGAAGTATCTGCATATCTG	
K7P sg	F : TAATACGACTCACTATAGCCAGATTCAATTCCGCTGAT R : TTCTAGCTCTAAAACCCATCAGCGGAATTGAATCTGG	
GAPDH	F : GCTGGAATTTCTTTGAATGAC R : CAATGACTCTGCTGGAATAACC	RT-PCR
KMO RT	F : TCAAGAAACTAGATGTGGTTGTT R : TCTCGATATTCGTACAGGCCAA	

F: Forward, R: reverse

분석하였다.

Microinjection

Microinjection을 위한 누에 알은 Kim 등[9]의 방법에 따라 준비하고 산란 후 5시간 이내에 주사를 완료하였다. 주사를 위하여 Cas9 (300 ng/ul)와 선발된 K1N gRNA (500 ng/ul)를 완충용액(5 mM KCl, 0.5 mM Phosphate buffer, pH 7.0)에 혼합 후 상온에서 10분간 방치하여 복합체를 형성시키고, micro-injector (Narishige, Japan)를 이용하여 준비된 누에 배아의 배면에 텅스텐 바늘을 이용하여 천공하여 microcapillary를 통해 10-15 nl의 복합체를 주입하고, 난각의 구멍은 Cyanocrylate 접착제를 이용하여 막은 후 보습한 배양 용기에 넣어 25°C 시에서 부화할 때까지 9-10일간 보호하였다.

유전자 편집 개체 선별

유전자 편집 개체의 선별은 부화한 유충을 5령 4일까지 사육하고, 유충의 다리로부터 100 ul의 혈림프를 채취 후 10,000 ×g에서 원심분리를 통하여 혈림프 세포를 수집하였다. 이후 세포에 50 ul의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 0.25% NP-40, 150 mM NaCl, 2 ug/ul proteinase K, pH 7.4)를 첨가하여 65°C에서 30 분간 배양 후 95°C에서 10분간 Proteinase K를 불활성화 시켰다. 준비된 세포 용출액 3 ul를 주형으로 하여 BmKMO 유전자의 1번 엑손을 증폭하고 T7E1 분석을 통해 유전자 편집 개체를 선별하였다.

염기서열 분석

돌연변이가 유발된 BmKMO 유전자 염기서열을 분석하기 위하여, T7E1 분석결과에 따라 5령 4일 제 유충의 다리로부터 혈림프 100 ul를 채취하고, 10,000 ×g에서 원심분리를 통하여

혈림프 세포를 수집하였다. 수집된 세포로부터 Wizard SV genomic DNA를 이용하여 게놈 DNA를 추출하고 이를 주형으로 이용하여, Table 2의 프라이머와 Pfx DNA polymerase (Invitrogen, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 유전자는 pJET 1.2 blunt vector (Thermo Scientific, Lithuania)에 클로닝하여 각 유충의 40개 클론에 대한 염기서열을 분석하였다.

유전자 발현 분석

유전자 편집 개체의 BmKMO 유전자의 발현 변화를 관찰하기 위하여, 산란 후 정상 및 돌연변이 성충으로부터 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, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 및 quantitative real time-PCR (qPCR)에 이용하였다. BmKMO 유전자의 발현 분석을 위하여, 엑손 부위를 증폭할 수 있도록 제작된 프라이머(Table 2)와 TB Green Premix EX Taq (TaKaRa, Japan)을 이용하여 qTOWER3 (Analytik Jena, Germany)를 통해 BmKMO 유전자의 엑손을 증폭하고, BmGAPDH 유전자를 이용하여 각 시료의 표적 유전자 발현을 표준화하고 정상 나방을 기준으로 ddCt 방법을 이용하여 비교하였다.

통계분석

모든 실험결과는 평균값(mean value) ± 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.

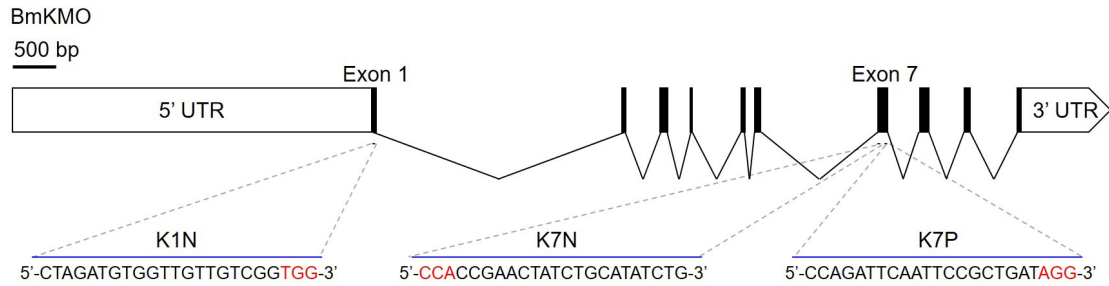


Fig. 1. Schematic diagram of gRNA target sites in the wild-type *BmKMO* gene. The three designed gRNAs are located in exons 1 and 7, indicated by dashed lines with target sequences. The gRNA targeting sites, K1N and K7N, are located in the anti-sense strand, and K7P is located in the sense strand.

결과 및 고찰

가이드 RNA 제작

BmKMO 유전자의 구조를 분석하기 위하여 NCBI에 등록된 Dazao 품종의 엑손 및 인트론의 구조를 분석한 결과, 유전자의 크기는 19,135 bp로서 10개의 엑손과 11개의 인트론으로 구성되어 있었다(Fig. 1). 상대적으로 길이가 긴 엑손 1과 7 영역의 염기서열 내에서 CRISPRdirect 도구[16]를 이용하여 각 엑손에 존재하는 N20NGG 표적서열을 탐색하고, off-target 가능성이 있는 N12NGG, and N8NGG서열에 대하여 *B. mori* 유전체 데이터베이스(ASM15162V1)를 이용하여 분석하였다(Table 1). 엑손 1 및 7의 표적서열 중 off-target 출현 빈도가 가장 낮은 서열을 선발하여 각각 K1N, K7N 및 K7P로 명명하였다(Fig. 1). 선발된 가이드 RNA 표적 서열은 20개의 염기로 이루어진 각각의 표적 서열은 게놈 내에서 유일하며, 그 길이를 PAM 서열 인근 12개의 염기까지 축소하여도 단1회만 존재한 것으로 확인 되었다(Table 1). Fu 등[5]에 따르면 gRNA의 표적 서열이 19 또는 18개의 염기로 축소되더라도 표적을 인지하고 절단할 수 있다고 보고하고 있다. 따라서 유사 서열의 존재 유무는 게놈 내에서 비 선택적 유전자 편집가능성을 최소화하기 위하여 필요하다고 판단된다[19-21].

가이드 RNA의 효율분석

가이드 RNA의 효율을 분석하기 위하여, 선발된 표적 부위에 대한 primer (Table 2)를 이용한 PCR을 통해 gRNA 합성을 위한 DNA 주형을 제작하고, 4종의 NTP's와 T7 RNA 중합효소를 이용한 전사를 통해 3종의 gRNA 합성하였다. 합성된 gRNA와 Cas9 단백질 복합체의 BM-N 세포 도입 후 T7 E1 분석을 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. T7E1 효소는 유전자 내부에 존재하는 염기쌍의 불일치영역을 절단하는 특성을 가지고 있기 때문에 wild-type 유전자와 mutant 유전자의 증폭 후 재결합과정에서 생성된 hybrid PCR 산물에 대하여 반응하게 된다. 따라서 유전자 편집에 의하여 발생된 돌연변이 산물에서는 다중 밴드의 형태를 띄게 된다[14]. *BmKMO* 유전자의 엑손 1의 길이는 441 bp이며 K1N gRNA는 엑손 1 중앙에

위치하고 있어 T7E1 효소의 처리에 의하여 반응이 일어나지 않은 441 bp와 절단이 일어난 220 bp가 나타났다(Fig. 2A). 길이가 1,200 bp인 엑손 7 영역에서는 K7N 및 K7P gRNA가 각각 71 bp 및 227 bp에 위치하고 있어 정확한 밴드 절단 패턴이 확인되지 않았다(Fig. 2A). 절단된 생성물의 강도 비교를 통한 효율분석에서 K1N gRNA의 효율은 40% 이상이었으나, K7N 및 K7P의 효율은 각각 23%와 33%로 K1N보다 낮게 나타났다(Fig. 2B). 따라서 누에의 *KMO* 유전자 편집을 위한 최적 gRNA는 K1N이라 판단된다.

유전자 편집 누에 제작

BmKMO 유전자 편집 누에를 제작하기 위하여 Cas9 단백질과 선발된 K1N gRNA 복합체를 누에의 초기배아 주공과 후부

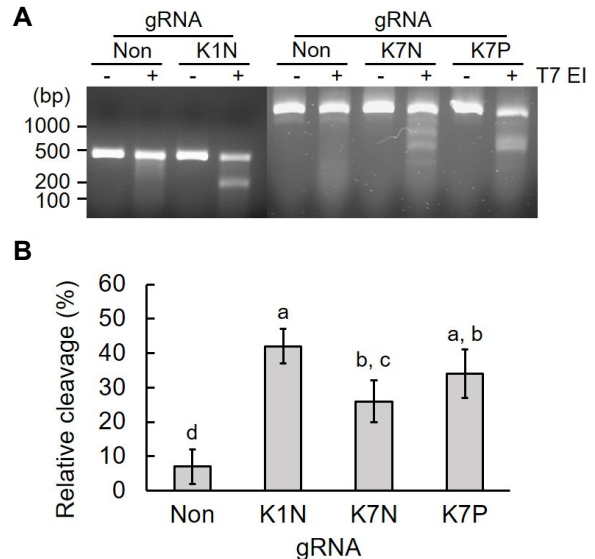


Fig. 2. Gene editing in the *B. mori* genome. BM-N cells were co-transfected with Cas9 protein and gRNA complexes targeting *BmKMO* exon 1 and 7 targets. (A) T7E1 assays were performed for each target at 72 hr post transfection and the products were separated on 2% agarose gel. (B) Relative cleavage rates were quantified using Quantity One software.

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

gRNA for injection	Number of injected embryos (n)	Hatching (n)/ (%)	Survive to 5th instar (n)/ (%)	Mutation (n)/ (%)	Phenotypic change (n)/ (%)
Cas9 only	240	117/48.8	89/76.1	0/0	0/0
Cas9/K1N	480	87/18.1	5/5.7	3/60	0/0

사이 가운데 배면에 microinjection하고, 그 결과 Table 3에 나타내었다. Cas9/K1N gRNA를 주사한 480개의 누에 알 중 87(18.1%)마리의 유충이 부화 되었으나, 이중 5.7%에 해당하는 5개체만이 5령까지 생존하여, Cas9 단백질만 주사한 그룹의 부화율(62%) 및 생존율(84.8%) 보다 현저하게 낮게 나타났다. 이러한 결과는 대부분의 CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 편집 연구에서 gRNA 농도증가에 따라 부화율 및 생존율이 감소하는 경향과 일치함에 따라 일반적인 현상으로 외부에서 유입된 gRNA가 배아의 분화에 영향을 미친 것으로 판단된다[5].

유전자 편집 누에를 선발하기 위하여 5령까지 생존한 5개체의 혈림프를 이용하여 T7E1 분석을 수행한 결과(Fig. 3A), 3개체에서 유전자 편집에 따른 2밴드 패턴이 확인되었으며, BMN 세포를 대상으로 분석한 유전자 편집 효율보다 높은 60%를 나타냈다(Table 3). 유전자편집이 이루어진 돌연변이 개체에 대한 염기서열 분석결과 3개체에서 모두 다른 유형의 삽입 및 결실 돌연변이를 가지고 있음이 확인 되었다(Fig. 3B). 이는 CRISPR/Cas9 시스템에 의하여 발생된 PAM 서열 인근의 결실 부위가 DNA 회복작 중 핵산분해효소에 의하여 무작위적으로 제거 또는 삽입이 이루어지기 때문으로 생각된다[6, 17]. 따라서 CRISPR/Cas9 시스템을 효율적으로 사용하기 위

해서는 유전자 편집 효율을 높이고 편집에 따른 염기서열을 예측 가능하도록 절단 범위를 정형화 하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Cas9/K1N gRNA에 의해 유도된 표현형의 변화

유전자 편집이 이루어진 돌연변이의 표현형을 관찰하기 위하여 현경을 이용하여 각 나방의 눈을 관찰한 결과, 성충이 된 5마리의 나방 모두 Fig. 3C와 같이 wild type과 동일한 검정색 눈을 가지고 있었다. 이결과는 돌연변이가 유발된 3마리가 모두 반수체 형태의 유전자를 가지고 있기 때문으로 생각된다 [6]. 다음 세대로의 돌연변이 전달을 분석하기 위하여, 선발된 돌연변이 수컷 나방(mM1)을 돌연변이 암컷 나방(mF3)과 정상 암컷 나방에 복수로 교미 시켜 mM1 및 mM1xF3의 돌연변이G1 세대 알을 확보하였다. 얻어진 알들의 발생을 유도하고 색 변화를 관찰한 결과, 역 교배한 G1-mM1 에서는 wild-type과 동일하게 검정색으로 변하는 반면(Fig. 3D), 돌연변이 사이에 근친교배를 수행한 G1-mM1xF3 돌연변이의 경우 일부 알이 흰색으로 남아 있었다(Fig. 4E). Kynurenine 3-Monooxygenase는 누에의 ommochrom 생합성 경로에서 kynurenine을 3-hydroxykynurenine으로 전환시키는 역할을 하며, 알 또는

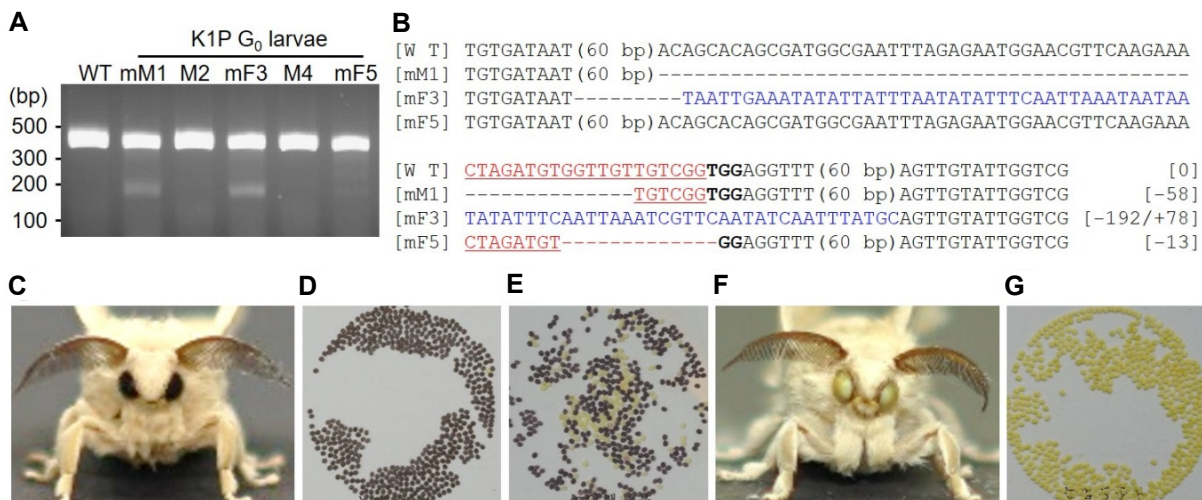


Fig. 3. Mutations of BmKMO gene induced by Cas9/B4N gRNA injection. T7E1 analysis of larvae. The panels of numbers showed PCR products amplified from WT and mutants treated with T7E1. (B) Sequence analysis of mutant G0 larvae. The number in front and backside of each sequence stand for larva name and number of nucleotides changed, respectively. (C) Eyes of wild type and back-crossing of the *BmKMO* mutant 1 male (mM1) to a wild-type female. (D) Eggs of wild-type silkworm. (E) Eggs of sib-mating of the *BmKMO* mutant 1 male (mM1) to a mutant 3 female (mF3). (F) *BmKMO* mutant adult (G1-mM1xF3). (G) Eggs from sib-mating of the white-eyed moth (G2-mM1xF3).

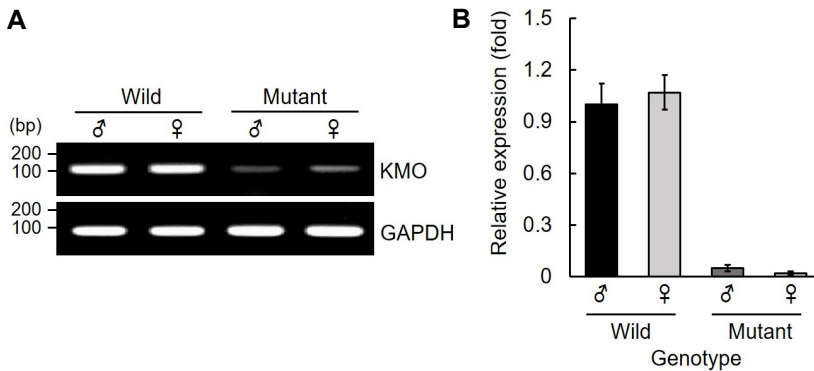


Fig. 4. Relative gene expression of in BmKMO mutants. The transcription levels of BmKMO gene in the mutant larvae were analyzed with RT-PCR (A) and quantitative RT-PCR (B). The expression levels were expressed as a fold change compared to that of wild type larva and GAPDH as an endogenous control.

눈의 pigment granule의 oxidative condensation에 의하여 3-hydroxykynurenine이 ommochrom pigment를 형성하여 색을 나타낸다고 알려져 있다[11]. 따라서 알 및 눈 색의 변화는 KMO 돌연변이로 인하여 3-Hydroxykynurenine의 생성이 저해되었기 때문으로 판단된다. 또한 흰색의 알이 나온 그룹을 성충이 될 때까지 사육한 결과 일부 나방의 눈이 흰색을 나타냈다(Fig. 3F). 뿐만 아니라 흰색의 눈을 가진 암·수(G1-mM1x F3)를 근친교배하여 얻은 돌연변이 G2세대(G2-mM1xF3)의 알은 발생과정에서 모두 흰색을 유지하였다(Fig. 3G). 본 연구에서는 빠른 표현형의 발현을 확인하고자 G0 세대의 근친 교배와 역 교배를 통하여 G1 세대를 확보하였으나, 순종 돌연변이를 얻기 위해서는 반수체 상태의 G0세대의 돌연변이를 선발하고 부모 세대와 역 교배하여 G1세대를 생산하고, 유전자 분석을 통하여 돌연변이 유전자를 가진 개체를 선발하여 근친 교배를 통해 G2세대를 생산한다면 순종돌연변이의 확보가 가능할 것으로 판단된다.

BmKMO 돌연변이에 따른 유전자 발현

BmKMO 유전자의 돌연변이가 발생된 G1 세대 성충의 KMO 유전자 발현과의 연관성을 분석하기 위하여, RT-PCR (Fig. 4A) 및 qRT-PCR (Fig. 4B)을 이용하여 산란 후 성충의 BmKMO 유전자의 발현을 분석하였다. 엑손 1과 2을 증폭하기 위한 primer를 gRNA 표적 부위를 포함하도록 제작하여 KMO 유전자를 증폭한 결과, 성충에서 BmKMO 유전자의 발현 감소가 확인되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 계놈수준에서 발생한 엑손 내 결실 돌연변이가 mRNA 전사에는 큰 영향을 미치지 못 하지만, 정상적이지 못한 mRNA의 경우 번역 과정에 단백질의 합성 및 기능 이상을 유발하기때문으로 판단된다.

결과적으로 본 연구와 같이 단백질 형태의 Cas9과 gRNA만을 사용했을 때, 유전자 편집시스템의 도입을 위해 벡터 혹은 바이러스를 사용하지 않은 만큼 돌연변이 분석을 위해서는 모든 개체에 대한 유전자 분석을 수행해야 하는 수고가 발생하는 반면 외부 유전자의 도입에 대한 부담을 줄일 수 있을 것으로 생각되어 목적에 따른 도입시스템의 선택이 필요하며, 유전자 가위의 특성상 대립유전자가 동일한 유전형으로 돌연

변이 유발이 이루어지지 않는 만큼 편집 부위를 정확하게 제어하는 기술이 확보된다면 육종 기간을 비약적으로 단축시킬 수 있는 곤충 육종 기술로 발전가능성이 높다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01270901) 및 국립농업과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. 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.
2. 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.
3. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
4. Doudna, J. A. and Charpentier, E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096.
5. 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**, 279-284.
6. Harrison, M. M., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M. and Wildonger, J. A. 2014. CRISPR view of development. *Genes Dev.* **28**, 1859-1872.
7. 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.
8. Kang, P. D., Lee S. U., Lee, Jung I. Y., Shon, B. H., Kim, Y. S., Kim, K. Y., Kim, M. J., Hong, I. P., Lee, K. G. and Park, K. Y. 2007. Breeding of new silkworm variety golden silk, a yellow cocoon color for spring rearing season. *Kor. J. Seric. Sci.* **49**, 14-17.
 9. Kim, S. W., Kang, M. U., Kang, S. W., Youn, E. Y., Choi, K. H., Kim, S. R., Park, S. W. Noh, S. K. and Gu, T. W. 2013. Modification of the commercial silkworm eggs adequate for Bluemoon silkworm transgenesis. *Kor. J. Seric. Sci.* **51**, 73-77.
 10. Kim, T. K., Yong, H. I., Kim, Y. B., Kim, H. W. and Choi, Y. S. 2019. Edible insects as a protein source: A review of public perception, processing technology, and research trends. *Food Sci. Anim. Resour.* **39**, 521-540.
 11. Kikkawa, H. 1941. Mechanism of pigment formation in *Bombyx* and *Drosophila*. *Genetics* **26**, 587-607.
 12. Kistler, K. E., Vossball, L. B. and Matthews, B. J. 2015. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* **11**, 51-60.
 13. Kumari, S. S., Subbarao, S. V., Misra, S. and Murty, U. S. 2011. Screening strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, for thermotolerance. *J. Insect Sci.* **11**, 116.
 14. 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 efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* **208**, 44-53.
 15. Melgar-Lalanne, G., Hernández-Álvarez, A. J., Salinas-Castro, A. 2019. Edible insects processing. *Trad. Inno. Technol.* **18**, 1166-1191.
 16. Naito, Y., Hino, K., Bono, H. and Ui-Tei, K. 2015. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**, 1120-1123.
 17. Taning, C. N. T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S. and Smagghe, G. 2017. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *J. Insect Physiol.* **98**, 245-257.
 18. 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**, 1810.
 19. Zhang, Z., Aslam, A. F., Liu, X., Li, M., Huang, Y. and Tan, A. 2015. Functional analysis of *Bombyx* Wnt1 during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. *J. Insect Physiol.* **79**, 73-79.
 20. 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.
 21. 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.

초록 : 유전자 가위의 이용과 누에 분자 육종을 위한 인위적 돌연변이 유발

홍정원[†] · 정찬영[†] · 유정희 · 김수배 · 강상국 · 김성완 · 김남숙 · 김기영 · 박종우*
(국립농업과학원 잠사양봉소재과)

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated protein (Cas)9을 이용하는 유전자 가위 기술은 미래 육종 기술로서 주목받고 있다. 본 연구에서는 3세대 유전자 가위 CRISPR/Cas9을 이용한 누에 kynurenine 3-monooxygenase (KMO) 유전자 편집을 통한 돌연변이 유발 및 선택 교배를 통하여 유전자의 세대간 전달을 분석하고자 하였다. 유전자 편집을 위하여 누에의 KMO 유전자에 대한 3종의 가이드 RNA를 제작하고, 제작된 gRNA는 Cas9 단백질과 복합체를 형성시켜 누에 세포주(BM-N)에 도입 후 T7 endonuclease I 분석을 수행하여 최적의 gRNA를 선발하였다. 선발된 K1N gRNA는 누에 유전자를 편집하기 위하여 Cas9 단백질과 복합체를 형성시킨 후 누에 초가 배아에 미세주사하고 사육하였다. 미세주사 후 부화율은 18% 가량으로 낮게 나타났으나 생존한 개체 중 돌연변이 발생율은 60% 이상으로 비교적 높게 나타났다. 돌연변이가 발생된 G0 세대의 KMO 유전자는 이형접합자 형태로 나타났으며, 표현형의 변화는 관찰되지 않았다. 하지만 이형접합자들 사이의 근친 교배에 의해 탄생한 G1세대 돌연변이에서는 일부에서 알과 눈의 색 변화가 확인되었으며, 변이가 확인된 개체들 사이의 근친교배를 통해 생산된 G2세대에서는 모든 개체에서 표현형의 변화가 나타났다. 이러한 결과에 비추어 볼 때, 유전자 가위를 이용한 돌연변이 육종에는 한계가 있으나 전통 교배 육종과 융합을 통하여 육종 기간을 비약적으로 단축시킬 수 있는 곤충 육종 기술로 발전가능성이 높다고 판단된다.