



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0121051  
(43) 공개일자 2017년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 15/63** (2006.01) **C12N 15/113** (2010.01)  
**C12N 9/22** (2006.01) **C12R 1/89** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**C12N 15/63** (2013.01)  
**C12N 15/113** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0041761  
 (22) 출원일자 2017년03월31일  
 심사청구일자 2017년03월31일
- (30) 우선권주장  
 1020160049439 2016년04월22일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
**한양대학교 산학협력단**  
 서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
- (72) 발명자  
**진연선**  
 서울특별시 중구 퇴계로90길 74, 103동 802호(신당동, 래미안신당하이베르)
- 배상수**  
 서울특별시 서초구 사평대로 240, 502동 103호 (반포동, 미도2차아파트)  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**특허법인다나**

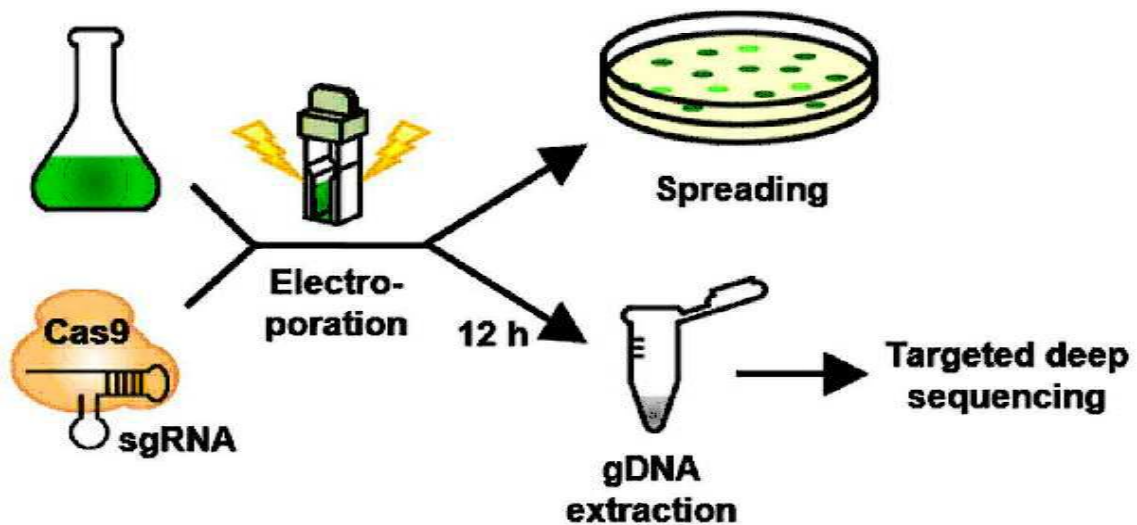
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **RG EN RNP를 이용한 미세조류의 교정 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 RGNE (RNA-guided engineered nuclease) RNP의 복합체를 이용하여 DNA 도입 없이 미세조류의 유전자를 교정하는 방법, 및 유전자가 교정된 미세조류 변이체를 제공한다. 본 발명에 따른 유전자 교정 방법은 DNA 도입 없이 원하는 유전자를 정확하게 선택적으로 교정할 수 있다는 이점을 갖는다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*C12N 9/22* (2013.01)

*C12R 1/89* (2013.01)

(72) 발명자

**백광열**

경기도 고양시 일산동구 경의로 33, 현대밀라트1차  
B동 811호(백석동)

**김덕형**

경기도 부천시 소사구 소삼로 47, 105동 201호 (소  
사본동, 부천소사역 푸르지오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110031999

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 고려대학교산학협력단

연구사업명 거대과학기술개발사업 / 기후변화대응기술개발사업 / KCCS2020사업

연구과제명 분자생물학적 개량을 통한 고효율 이산화탄소고정 미세조류 개발

기여율 50/100

주관기관 재단법인 한국이산화탄소포집및처리연구개발센터

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01119201

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업 / 차세대바이오그린21사업/ 식물분자육종사업단

연구과제명 벼 애기장대 토마토의 모든 유전자에 대한 RGEN 데이터베이스 구축

기여율 50/100

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

표적 유전자에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 세포벽을 변이시키거나 화학 처리하여 약화시킨 미세조류에 직접 도입하는 단계를 포함하는 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 표적 유전자는 내재적 표적 유전자인 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

가이드 RNA 20 ~ 200  $\mu\text{g}$  및 Cas 단백질 30 ~ 300  $\mu\text{g}$ 의 RGEN RNP 복합체를  $1 \times 10^4$  개 내지  $1 \times 10^7$  개의 미세조류에 도입하는 단계를 포함하는 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중 가닥 RNA 형태인 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 가이드 RNA는 단일 가닥 가이드 RNA(single-stranded guide RNA; sgRNA)인 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질인 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 도입은 전기천공법(Electroporation)으로 형질주입하는 미세조류의 유전자 교정방법.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 전기천공법의 전압(voltage)은 400 내지 800 V인 미세조류의 유전자 교정방법.

**청구항 9**

제 1 항에 있어서,

상기 미세조류는 클라미도모나스 속인 미세조류의 유전자 교정방법.

**청구항 10**

제 1 항에 있어서,

상기 RNP 복합체는 외부 DNA 형태로 도입되지 않는 교정방법.

**청구항 11**

제 10 항의 방법에 의해 제조된 미세조류 변이체.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 RGEN RNP를 이용한 미세조류의 교정 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 미세조류(microalgae)는 이산화탄소와 물을 원료로 광합성을 하는 단세포 생물로서 고등식물보다 세포분열 및 성장의 주기가 매우 짧아(약 5-8시간) 건강보조식품, 항노화 성분, DHA, 화장품 원료 등의 유용한 고부가가치 산업용 소재로 이용되는 경제적 잠재력이 높은 생물자원이다. 그 중에서 클라미도모나스(*Chlamydomonas reinhardtii*)는 미세조류 연구에서 모델종으로서 가장 많이 연구가 되어 왔으며 genome project가 완성되어 유전자 연구 및 조작에 용이하다. 학술적 연구뿐만 아니라 산업분야에서 활용하기 위한 다양한 연구가 진행 중이다.

[0004] 한편, 크리스퍼 유전자 가위(RNA-guided engineered nuclease; RGEN)는 2013년 처음 개발된 이래, 지난 2년 여간 비약적으로 발전하여 인간세포는 물론, 가축, 곤충, 벼, 밀과 같은 식물세포, 병원균 등 다양한 종에 대하여 폭넓게 이용되고 있다. 이 방법은 박테리아가 외부 DNA의 침입을 막고자 형성한 크리스퍼 면역시스템을 유전자가위로 차용한 것이다. 즉, 특정 유전자의 염기서열을 찾아가는 염기서열 조각(크리스퍼 부분)을 제작해 절단 효소인 카스9(Cas9)와 짝을 이루게 하면, 짝을 이룬 크리스퍼 시스템은 표적이 되는 DNA 염기서열에 달라붙어 절단한다. 크리스퍼 유전자 가위는 현재까지 개발된 가위 중에 가장 제작이 용이하고 저렴할 뿐 아니라 정확성과 효율성도 높은 것으로 확인되었다.

[0005] 최근 크리스퍼 유전자 가위를 세포에 도입하는데 있어 외부 DNA 삽입 없는(DNA-free) 가이드 RNA와 단백질 복합체(ribonucleoprotein, RNP)로 전달하는 방법이 개발되었다. 이를 이용한 미세조류를 형질전환 시키는 방법은 매우 획기적인 기술적 도약으로 미세조류 이용 산업 분야의 패러다임을 바꿀 수 있을 것으로 기대된다.

[0006] 기존의 징크핑거뉴클레아제 (zinc finger nuclease; ZFN), 탈렌(transcription activator-like effector nuclease; TALEN), 크리스퍼 유전자 가위(RGEN)와 같은 유전자 가위를 DNA 플라스미드를 통하여 도입하여 형질전환시키는 경우, 형질전환체를 만드는 과정에서 외부 DNA를 삽입하였기 때문에, GMO(Genetically Modified Organism)로 분류될 가능성이 높아 식품 및 기타 산업적 활용에 제약이 있으리라 예상된다. 따라서, non-GMO 미세조류의 기술적 돌파구가 요구되는 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 국제 공개 특허 제2015-086795호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명의 목적은 표적 유전자에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 외부 DNA 도입 없이 미세조류의 유전자를 교정하는 방법; 및 유전자가 교정된 미세조류 변이체를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명자들은 식품 산업에서 문제가 될 가능성이 있는 유전적 재조합 방법이 아닌 다른 변이를 이용하여 야생형 또는 종래 존재하던 미세조류의 부족한 생산성을 해결할 수 있는 조류를 개발하기 위해 노력한 결과, DNA 도입 없이 미세조류의 유전자를 교정하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다. 특히, 본 발명자들은 DNA-free RGEN RNP를 미세조류에 적용함에 있어, 많은 시행착오를 거치면서 미세조류 중에서도 세포벽이 변이 또는 화학 처리되어 약화된 미세조류에 대하여 RGEN RNP 복합체 적용 시 세포수, 가이드 RNA 농도, Cas9 단백질 농도의 최적 조건을 확립하여 적합한 미세조류의 유전자 교정방법을 개발하게 되었다.

[0011] 이러한 측면에서 본 발명은 표적 유전자에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 세포벽을 변이시키거나 화학 처리하여 약화시킨 미세조류에 직접 도입하는 단계를 포함하는 미세조류의 유전자 교정방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 교정 방법에 의해 제조된 미세조류 변이체를 제공한다.

**발명의 효과**

[0014] 본 발명은 미세조류 클라미도모나스 레인하르트티아(Chlamydomonas reinhardtii)에서 DNA 도입이 없이 크리스퍼 유전자 가위를 이용하여 원하는 유전자를 선택적으로 녹아웃 하는 신규한 형질 전환 방법이다. 크리스퍼 유전자 가위를 세포에 도입하는데 있어 DNA 형태로 도입하여 발현시키지 않고 가이드 RNA와 단백질 복합체(ribonucleoprotein, RNP)로 전달하는 방법을 이용한다. 본 발명에 따른 유전자의 교정방법은 외부 DNA 도입 없이 원하는 유전자를 정확하게 선택적으로 교정할 수 있다는 이점을 갖는다.

[0015] 이 방법을 적용하여 클라미도모나스의 CpFTSY와 ZEP 유전자를 타겟으로 각각의 유전자가 녹아웃된 돌연변이체를 제조하였으며 두 유전자가 모두 녹아웃된  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체도 연속적인 돌연변이를 통해 제조할 수 있었다.

[0016] 기존 야생형과 개발된  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 세포적 특성 비교하였을 때 산업적으로 유용한 색소인 지아잔틴(Zeaxanthin)의 양이 크게 증가하였으며 광합성 효율과 고광도에서의 성장 또한 크게 증가하였음을 확인할 수 있었다.

[0017] 상기 교정 방법은 미세조류의 산업적 이용 측면에서 이산화탄소의 저감, 바이오 디젤이나 향산화 물질의 생산 및 효율 향상 등 다양한 산업적 응용분야에서 요구되는 클라미도모나스 균주를 개발하는데 효과적으로 적용될 수 있다.

[0018] 특히, 상기 방법은 DNA 조각이 표적 염기서열 또는 표적외 염기서열 내에 삽입될 가능성이 없기 때문에 이 방법으로 생산된 미세조류 변이체는 GMO로 규제되지 않을 것으로 예상되므로 산업적인 측면에서 큰 경제 효과를 낼 수 있을 것으로 기대된다.

**도면의 간단한 설명**

[0020]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 적용된 단계별 실험 과정을 요약하여 보여주는 개략도이다.

도 2는 클라미도모나스 레인하르티아이 CC-4349 *CpFTSY* 유전자를 표적하기 위해 디자인된 네 개의 타겟 서열을 정리한 것이다[Cas-디자이너 ([www.rgenome.net/cas-designer/](http://www.rgenome.net/cas-designer/))를 사용하여, 전체 게놈에서 3 뉴클레오타이드(nt)만큼 어떠한 다른 표적 부위들과 상이하고 66보다 더 높은 프레임-외 스코어를 가진 *CpFTSY* 유전자의 코딩 서열 영역의 절반 내에서 4개의 sgRNA를 신중하게 디자인하였다. 'CDS (코딩 서열) 위치'는 RNA 전사물에서 절단 지점의 상대적인 위치를 의미한다. Direction의 +는 타겟 서열과 동일한 방향, 즉 같은 시퀀스가 RGEN의 시퀀스이며, -는 타겟 서열과 역 방향, 즉 target sequence와 결합되어 있는 서열인 서로 reverse complement 관계의 시퀀스를 의미한다. '프레임-외 스코어'는 깨진 이중-가닥 DNA가 미세 상동성-매개된 단부 연결(MMEJ) 경로에 의해 수선될 때 발생하는 프레임쉬프트-유도 결실의 가능성을 가리킨다. '표적-오프 부위의 #'은 전체 게놈을 통틀어 미스매치된 서열의 수를 의미한다.].

도 3은 RGEN RNPs에 의해 유도된 *CpFTSY* 유전자의 돌연변이의 구체적 사항을 나타낸 것이다[a: 표적화된 심층 서열화(Targeted deep sequencing)에 의해 측정된 네 개의 sgRNA에 대한 야생형 CC-4349 및 RGEN-트랜스펙션된 세포의 돌연변이 (삽입 및 결실; indel) 빈도, 별표 기호 (\*)가 붙어 있는 타겟 서열에 대해 PCR 증폭 중에 비-특이적 생성물로 인해 표적화된 심층 서열화 분석으로부터 배제되었다. b: a에서 가장 효과적인 타겟 서열을 이용한 두 번째 시도의 결과, c: 두 번째 시도로 얻어진 돌연변이체에서 발생한 DNA 서열 돌연변이를 보여준다. 다양한 indel 패턴이 예상된 위치, PAM 서열의 3nt 상류에서 나타났다. 20-bp 표적 서열은 밑줄로 표시되고 PAM 서열은 적색으로 나타난다.].

도 4는 RGEN RNPs에 의해 발생한 *CpFTSY* 유전자 녹아웃의 돌연변이체의 사진이다.

도 5는 RGEN RNPs에 의한 *CpFTSY* 돌연변이체의 특성 분석한 결과를 나타낸 것이다[a: 저광 (50  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 최소 아가 배지 상에서 성장한 야생형 (WT) 및 RGEN-유도된  $\Delta\text{CpFTSY}$  돌연변이주의 단일-세포 콜로니의 사진이고, b: 야생형 (WT) 및  $\Delta\text{CpFTSY}$  돌연변이주의 클로로필 (Chl) a 대 Chl b 비율 및 총 Chl 함량. 세포들은 저광(50  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 광 독립영양학적으로 성장되었다. 데이터는 3 개의 생물학적 복제물로부터의 평균 및 표준편차(SE)이다, c: *CpFTSY* 유전자좌에서의 야생형 (WT) 및 돌연변이주 DNA 서열의 배열. 20-bp 표적 서열은 밑줄로 표시하고 PAM 서열은 적색으로 나타난다. 우측 열은 삽입 (+) 또는 결실된 (-) 염기의 수를 나타낸다.].

도 6은 RGEN RNPs에 의한  $\Delta\text{CpFTSY}$  돌연변이체의 *CpFTSY* 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과를 보여준다[도 5의 a에 도시된 6개의 돌연변이주의 *CpFTSY* 유전자 녹아웃은 Sanger 서열화를 수행함으로써 확인되었다. 다양한 indel 패턴이 표적 부위에서 관찰되었다.].

도 7은 클라미도모나스 레인하르티아이 CC-4349 *ZEP* 유전자를 표적하기 위해 디자인된 다섯 개의 타겟 서열을 정리한 것이다[Cas-디자이너 ([www.rgenome.net/cas-designer/](http://www.rgenome.net/cas-designer/))를 사용하여, 전체 게놈에서 3 뉴클레오타이드(nt)만큼 어떠한 다른 표적 부위들과 상이하고 66보다 더 높은 프레임-외 스코어를 가진 *ZEP* 유전자의 코딩 서열 영역의 절반 내에서 5개의 타겟 서열을 신중하게 디자인하였다. 'CDS (코딩 서열) 위치'는 RNA 전사물에서 절단 지점의 상대적인 위치를 의미한다. Direction의 +는 타겟 서열과 동일한 방향, 즉 같은 시퀀스가 RGEN의 시퀀스이며, -는 타겟 서열과 역 방향, 즉 target sequence와 결합되어 있는 서열인 서로 reverse complement 관계의 시퀀스를 의미한다. '프레임-외 스코어'는 깨진 이중-가닥 DNA가 미세 상동성-매개된 단부 연결(MMEJ) 경로에 의해 수선될 때 발생하는 프레임쉬프트-유도 결실의 가능성을 가리킨다. '표적-오프 부위의 #'은 전체 게놈을 통틀어 미스매치된 서열의 수를 의미한다.].

도 8은 RGEN RNPs에 의해 유도된 *ZEP* 유전자의 돌연변이의 구체적 사항을 나타낸 것이다[a: 표적화된 심층 서열화(Targeted deep sequencing)에 의해 측정된 다섯 개의 sgRNA에 대한 야생형 CC-4349 및 RGEN-트랜스펙션된 세포의 돌연변이 (삽입 및 결실; indel) 빈도, b: 가장 효율이 높은 세 번째 타겟(RGEN3)에 의해 돌연변이체에서 발생한 DNA 서열 돌연변이를 보여준다. 다양한 indel 패턴이 예상된 위치, PAM 서열의 3nt 상류에서 나타났다. 20-bp 표적 서열은 밑줄로 표시되고 PAM 서열은 적색으로 나타난다.].

도 9 *ZEP* 유전자 녹아웃을 연구하기 위한 수백 개의 콜로니들에 대한 클로로필(Chl) 형광을 측정 한 사진이다[a:

ZEP 특이적 녹아웃 돌연변이체를 DNA 없는 RGEN RNP를 사용하여 생성한 후에, 페트리 디쉬에서 모든 세포에 대해 Chl 형광을 측정하였고 여러 개의 추정되는 ZEP 녹아웃 세포주를 선택하였다. 적색 원형은 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 TAP 아가 배지 상에서 성장한 추정되는 ZEP 녹아웃 돌연변이체를 가리킨다. NPQ/4 영상은 방법에서 기술한 대로 측정되었다. b: 야생형 (WT) 및  $\Delta ZEP$  돌연변이주의 단일 세포 콜로니들이 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 최소 아가 배지 상에서 성장하였다. 콜로니들은 육안으로 구별하기 어려울 정도로 유사한 색을 보여줬다].

도 10은 RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP$  돌연변이체의 ZEP 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과를 보여준다[도 9에 도시된 3개의 돌연변이주의 ZEP 유전자 녹아웃은 Sanger 서열화를 수행함으로써 확인되었다. 다양한 삽입 패턴이 표적 부위에서 관찰되었다].

도 11a는 야생형 (파란색) 및  $\Delta Z1$  (적색),  $\Delta Z2$  (자홍색) 및  $\Delta Z3$  (보라색)에서 아세톤 추출물로부터의 총 색소의 HPLC 프로파일을 나타낸 것이다[야생형과 대조적으로, 지아잔틴은 저광 성장 조건 하에서도 모든  $\Delta ZEP$  돌연변이체에서 유의미하게 증가되었다. Lor, 로로잔틴(loroxanthin); Neo, 네오잔틴(neoxanthin); Vio, 비올라잔틴(violaxanthin); An, 안테라잔틴(antheraxanthin); Lut, 루테인; Zea, 지아잔틴; Chl b, 엽록소 b; Chl a, 엽록소 a;  $\alpha$ -Car,  $\alpha$ -카로틴;  $\beta$ -Car,  $\beta$ -카로틴].

도 11b는 외래 DNA 도입 없이 RGEN RNP 전달을 통한 ZEP 유전자 녹아웃을 나타낸 것이다[a: 녹조류에서의 가역적 xanthophyll cycle의 모식도, b: ZEP 유전자좌에서의 야생형(WT) 및 돌연변이주 DNA 서열의 배열. 20-bp 표적 서열은 밑줄로 표시하고 PAM 서열은 적색으로 나타낸다. 우측 열은 삽입된 (+) 수를 나타낸다, c: 야생형 (WT) 및  $\Delta ZEP$  돌연변이주의 색소 함량의 정량 및 Chl a 대 Chl b 비율. 세포들은 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 TAP 배지에서 성장되었다. Vio, 비올라잔틴; An, 안테라잔틴; Zea, 지아잔틴. 데이터는 3개의 복제물로부터의 평균  $\pm$  표준편차이다].

도 12는 RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP$  돌연변이체 1( $\Delta Z1$ )을 대상으로 RGEN RNPs에 의한 CpFTSY 유전자의 연속적인 이중 돌연변이와 관련된 사항을 보여준 것이다[a: 표적화된 심층 서열화(Targeted deep sequencing)에 의해 측정된 sgRNA에 대한 야생형 CC-4349 및 RGEN-트랜스펙션된 세포의 돌연변이 (삽입 및 결실; indel) 빈도, b: 타겟에 의해 돌연변이체에서 발생한 DNA 서열 돌연변이를 보여준다. 다양한 indel 패턴이 예상된 위치, PAM 서열의 3nt 상류에서 나타났다. 20-bp 표적 서열은 밑줄로 표시되고 PAM 서열은 적색으로 나타낸다].

도 13은  $\Delta ZEP$  돌연변이체 1( $\Delta Z1$ )에서 CpFTSY 유전자 녹아웃을 유도하기 위한 수백 개의 콜로니에 대한 육안 착색 조사한 결과를 나타낸 사진이다[a: RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP$  돌연변이체를 대상으로 RGEN RNPs에 의한 CpFTSY 유전자의 연속적인 이중 돌연변이의 사진이고, 적색 원형은 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 TAP 아가 배지상에서 성장한 추정되는  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  돌연변이체를 가리킨다. b: 야생형 (WT) 및 RGEN-유도된  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  돌연변이주( $\Delta ZF1 \sim 14$ )의 단일 세포 콜로니들은 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 최소 아가 배지 상에서 성장하였다].

도 14a 및 14b는 RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP$  돌연변이체를 대상으로 RGEN RNPs에 의한 CpFTSY 유전자의 연속적인 이중 돌연변이체의 FTSY 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과이다.

도 15는 WT, RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP$  돌연변이체,  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 HPLC 색소 분석, 전체 엽록소의 양, 엽록소 a와 b의 비율 분석 결과를 보여준다[세포는 저광( $70 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 TAP 배지에서 성장하였다. 데이터는 4개의 복제물로부터의 평균  $\pm$  표준편차이다].

도 16은 RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체에서의 표적-오프 효과(off-target effects) 분석 결과를 보여준다[ZEP 및 CpFTSY 유전자-특이적 sgRNA의 표적-온 및 잠재적인 표적-오프 부위에서의 돌연변이 빈도가 표적화된 심층 서열화에 의해 측정되었다. indel 비율을 계산하기 위해 부위당 약  $\sim 20,000$ 쌍의 단부 관독 값을 얻었다.].

도 17은 RGEN-RNP의 트랜스펙션에 의한 순차적인 CpFTSY 및 ZEP 2-유전자 녹아웃 돌연변이체를 나타낸 것이다 [a: 야생형과  $ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체에서 ZEP 및 CpFTSY 유전자에서의 RGEN RNP에 의해 유도된 표적화된 indel 돌연변이, b: 야생형,  $\Delta ZEP$ ,  $\Delta CpFTSY$  및  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  돌연변이체의 표현형. 세포들은 고휘광 ( $500 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 광 독립영양학적으로 성장되었다. 세포 밀도는  $10 \times 10^6$  세포/mL였다. 야생형

(WT) 및 RGEN-유도된 형질도입주에서 ZEP 및 FTSY 단백질의 웨스턴-블롯 분석. 샘플의 로딩 대조군으로 클라미도모나스의 ATP 합성효소의  $\beta$ -하위 유닛 (ATP $\beta$ )을 사용한 단백질의 면역-검출.].

도 18은 실시예에 사용된 프라이머를 정리하여 보여준다.

도 19는 RGEN RNPs에 의하여 유도된 ZEP 및/또는 CpFTSY 유전자의 targeted indel mutations ( $\Delta$ ZEP,  $\Delta$ CpFTSY,  $\Delta$ ZEP/ $\Delta$ CpFTSY 이중 돌연변이체) 관련 사항을 보여준다.

도 20은 야생형 (파란색),  $\Delta$ ZEP (적색),  $\Delta$ CpFTSY (녹색) 및  $\Delta$ ZEP/ $\Delta$ CpFTSY 이중 돌연변이체 (노란색)의 아세톤 추출물로부터의 총 색소의 HPLC 프로파일을 나타낸 것이다[로로잔틴(loroxanthin); Neo, 네오잔틴(neoxanthin); Vio, 비올라잔틴(violaxanthin); An, 안테라잔틴(antheraxanthin); Lut, 루테인; Zea, 지아잔틴; Chl b, 엽록소 b; Chl a, 엽록소 a;  $\alpha$ -Car,  $\alpha$ -카로틴;  $\beta$ -Car,  $\beta$ -카로틴].

도 21은 야생형 (파란색) 및  $\Delta$ ZEP (적색),  $\Delta$ CpFTSY (녹색) 및  $\Delta$ ZEP/ $\Delta$ CpFTSY (노란색)에서의 광합성의 광-포화 곡선 광포화 곡선(Light-saturation curves of photosynthesis)을 나타낸 것으로, 각각의 Chl 기준당 산소 발생 속도는 입사광 세기의 함수로서 측정되었다.

도 22는 25°C에서 고풍(700  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>s) 하에서 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 공기가 있는 HS 배지에서 배양된 야생형 및 돌연변이체의 성장 곡선을 나타낸 것이다.

도 23은 저광(50  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>s) 조건 하에서 야생형과  $\Delta$ ZEP,  $\Delta$ CpFTSY 및  $\Delta$ ZEP/ $\Delta$ CpFTSY 돌연변이체의 광합성 활성 및 색소 함량의 정량 결과를 보여준다[Vio, 비올라잔틴; An, 안테라잔틴; Zea, 지아잔틴. 데이터는 3개의 복제물로부터의 평균  $\pm$  표준편차이다].

도 24는 Cas9 단백질 및 sgRNA의 상이한 인큐베이션 시간 및 다양한 농도 조건에서의 돌연변이 빈도를 나타낸 것이다[a: RGEN RNP (200  $\mu$ g의 Cas9 및 140  $\mu$ g의 sgRNA)가 50 x 10<sup>4</sup> 세포의 클라미도모나스 안으로 트랜스펙션된 후 상이한 시간 동안 인큐베이션되고 수확되었다. 12시간과 24시간의 상이한 인큐베이션 시간 사이에 유의미한 차이를 발견하지 못하였다, b: 다양한 농도 조건의 Cas9 단백질 및 sgRNA의 타겟 서열(5'-CGATCTTCAGAGCAGTGGCGG-3')를 사용한 돌연변이 (삽입 및 결실; indel) 빈도가 12시간 동안 인큐베이션된 후 표적화된 심층 서열화에 의해 측정되었다].

도 25는 본 발명의 유전자 교정방법에 사용된 Cas9 단백질 서열을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 다만, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 가이드 표적 유전자에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 미세조류에 도입하는 단계를 포함하는 미세조류의 유전자 교정 방법 또는 유전자 녹아웃(knock out) 방법에 관한 것이다.

[0024] 본 명세서에서 유전자 교정 또는 유전자 녹아웃(knock out)은 타겟 유전자의 타겟 부위를 제거하거나 및/또는 특정 뉴클레오타이드를 삽입하여, frameshift mutation을 유도하여 유전자가 정상적 기능을 하는 단백질을 생산하지 못하도록 하는 모든 유전자 조작을 의미한다.

[0025] 상기 미세조류는 이산화탄소와 물을 원료로 광합성을 하는 모든 단세포 생물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 미세조류는 클라미도모나스속 미세조류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 클라미도모나스 속 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 발명에서는 세포벽을 변이시키거나 화학 처리하여 약화시킨 미세조류를 사용하는 것이 바람직하다. 또한 상기 미세조류는 1 X 10<sup>4</sup> 개 내지 1 X 10<sup>7</sup> 개 또는 1 X 10<sup>5</sup> 개 내지 1 X 10<sup>6</sup> 개를 사용

하는 것이 형질전환 효율을 높이기 위한 이유로 바람직하다.

- [0027] 본 발명의 유전자 교정 방법은 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 플라스미드 등의 DNA 운반체를 통하지 않고 직접 미세조류 세포 내에 전달하는 것을 특징으로 한다. 상기 복합체의 전달은 통상적인 단백질의 세포 내 직접 전달 수단에 의할 수 있으며, 본 발명에서 사용된 미세조류의 경우에는 전기천공법(Electroporation) 등을 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 전기천공법의 전압(voltage)은 400 내지 800 V인 것이 바람직하다. 전압이 너무 높은 경우에는 세포가 모두 죽는 문제가 있고, 전압이 너무 낮은 경우에는 형질전환 효율이 떨어지는 문제가 있다.
- [0029] 상기 RNA 가이드 엔도뉴클레아제(RGEN)는 단일가닥 RNA 또는 이중가닥 RNA와 복합체를 형성하며 RNA에 포함된 유전자 표적부위 타겟팅 서열을 절단하여 유전자 교정 작용을 하는 엔도뉴클레아제를 의미하는 것으로, 대표적으로 Cas9 단백질 (CRISPR associated protein 9) 등과 같은 타입 II의 CRISPR/Cas 시스템에 수반되는 엔도뉴클레아제일 수 있다.
- [0030] Cas9 단백질은 스트렙토코커스 sp. (*Streptococcus* sp.), 예컨대, 스트렙토코커스 피요게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래의 것(SwissProt Accession number Q99ZW2)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 Cas9 단백질은 미생물에서 분리된 것 또는 재조합적 방법 또는 합성적 방법으로 비자연적 생산된 것(non-naturally occurring)일 수 있다. 상기 Cas9 단백질은 진핵세포의 핵 내 전달을 위하여 통상적으로 사용되는 요소 (예컨대, 핵위치신호(nuclear localization signal; NLS) 등)를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 일반적으로, 가이드 서열은 표적 서열과 혼성화하고, 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열과 그의 상응하는 표적 서열 간의 상보성의 정도는 적절한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬되는 경우, 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상이다. 최적의 정렬은 서열을 정렬하기에 적절한 임의의 알고리즘의 사용으로 결정될 수 있으며, 그의 비제한적인 예는 스미스-워터만(Smith-Waterman) 알고리즘, 니들만-분쉬(Needleman-Wunsch) 알고리즘, 버로우즈-휠러 트랜스폼(Burrows-Wheeler Transform)에 기초한 알고리즘(예를 들어, 버로우즈 휠러 얼라이너(Burrows Wheeler Aligner)), ClustalW, Clustal X, BLAT, 노보얼라인(Novoalign)(노보크라프트 테크놀로지즈(Novocraft Technologies), ELAND(일루미나(Illumina), 미국 캘리포니아주 샌디에고), SOAP(soap.genomics.org.cn에서 이용 가능) 및 Maq(maq.sourceforge.net에서 이용가능)를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12개 이하의 뉴클레오티드 길이이다. 표적 서열로의 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하는 가이드 서열의 능력은 임의의 적절한 검정에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 시험되는 가이드 서열을 포함하는 CRISPR 복합체를 형성하기에 충분한 CRISPR 시스템의 성분은 예를 들어, CRISPR 서열의 성분을 인코딩하는 벡터로의 트랜스펙션 후에, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 차세대염기서열 분석 기술을 이용한 검정에 의한 표적 서열 내의 우선적인 절단의 평가에 의해서와 같이, 상응하는 표적 서열을 갖는 숙주 세포로 제공될 수 있다. 유사하게, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 절단은 표적 서열, 시험되는 가이드 서열 및 시험 가이드 서열과 상이한 대조군 가이드 서열을 포함하는 CRISPR 복합체의 성분을 제공하고, 표적 서열에서 시험 및 대조군 가이드 서열 반응 간의 결합 또는 절단 비율을 비교함으로써 시험관에서 평가될 수 있다. 다른 검정이 가능하며, 당업자에게 떠오를 것이다. 가이드 서열은 임의의 표적 서열을 표적화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 세포의 게놈 내의 서열이다. 예시적인 표적 서열은 표적 게놈에서 독특한 것들을 포함한다.
- [0033] 즉, 상기 가이드 RNA는 표적 서열에 따라 또는 복합체를 형성할 엔도뉴클레아제의 종류 및/또는 그 유래 미생물에 따라서 적절히 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 가이드 RNA는 CRISPR RNA (crRNA), *trans*-activating crRNA (tracrRNA), 및 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 엔도뉴클레오티드 종류에 따라서, CRISPR RNA (crRNA) 및 *trans*-activating crRNA (tracrRNA)의 이중가닥 복합체, 또는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있다. 상기 sgRNA는 crRNA 및 tracrRNA의 부분을 포함할 수 있다.
- [0034] 예컨대, Cas9 단백질을 포함하는 복합체 (Cas9 시스템)은 목적하는 유전자 교정을 위하여 두 개의 가이드 RNA, 즉, 유전자의 표적 부위와 혼성화 가능한 뉴클레오티드 서열을 갖는 CRISPR RNA (crRNA)와 추가적인 *trans*-

activating crRNA (tracrRNA)를 필요로 하며, 이들 crRNA와 tracrRNA는 서로 결합된 이중 가닥 crRNA:tracrRNA 복합체 형태, 또는 링커를 통하여 연결되어 단일 가닥 가이드 RNA (single-stranded guide RNA; sgRNA) 형태로 사용된다.

- [0035] 상기 가이드 RNA의 구체적 서열은 Cas9 단백질의 종류 (유래 미생물)에 따라서 적절히 선택할 수 있으며, 이는 이 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 알 수 있는 사항이다.
- [0036] 일 예에서, *Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 단백질을 포함한 Cas9 시스템에 사용되는 crRNA는 다음의 일반식 1로 표현될 수 있다:
- [0037]  $5'-(N_{\text{cas9}})_1\text{-GUUUUAGAGCUA}-(X_{\text{cas9}})_m\text{-3'}$  (일반식 1)
- [0038] 상기 일반식 1에서,
- [0039]  $N_{\text{cas9}}$ 는 유전자 표적 부위와 혼성화 가능한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 타겟팅 서열 부위로서 표적 유전자의 표적 부위에 따라서 결정되는 부위이며, 1은 상기 타겟팅 서열 부위에 포함된 뉴클레오타이드 수를 나타내는 것으로 18 내지 22의 정수, 예컨대 20일 수 있고;
- [0040] 상기 타겟팅 서열 부위의 3' 방향으로 인접하여 위치하는 연속하는 12개의 뉴클레오타이드(GUUUUAGAGCUA)를 포함하는 부위는 crRNA의 필수적 부분이다.
- [0041] 또한,  $X_{\text{cas9}}$ 는 crRNA의 3' 쪽에 위치하는 (즉, 상기 crRNA의 필수적 부분의 3' 방향으로 인접하여 위치하는) m개의 뉴클레오타이드를 포함하는 부위로, m은 0 내지 12의 정수, 예컨대 0일 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서, 유전자 표적 부위와 혼성화 가능한 뉴클레오타이드 서열은 유전자 표적 부위의 뉴클레오타이드 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 상보성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다 (이하, 특별한 언급이 없는 한 동일한 의미로 사용된다).
- [0043] 일 예에서, 상기  $X_{\text{cas9}}$ 는 UGCGUUUUUG를 포함할 수 있으며, 생략될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 또한, *Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 단백질을 포함한 Cas9 시스템에 사용되는 tracrRNA는 다음의 일반식 2로 표현될 수 있다:
- [0045]  $5'-(Y_{\text{cas9}})_p\text{-UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'}$  (일반식 2)
- [0046] 상기 일반식 2에서,
- [0047] 60개의 뉴클레오타이드 (UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC)를 포함하는 부위는 tracrRNA의 필수적 부분이고,
- [0048]  $Y_{\text{cas9}}$ 는 상기 tracrRNA의 필수적 부분의 5' 말단에 인접하여 위치하는 p개의 뉴클레오타이드를 포함하는 부위로, 생략될 수 있다. 즉, p는 0 내지 20의 정수, 예컨대 0 내지 5의 정수일 수 있으며, 상기 p개의 뉴클레오타이드들은 서로 같거나 다를 수 있고, A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0049] 또한, *Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 단백질을 포함한 Cas9 시스템에 사용되는 sgRNA는 상기 Cas9의 crRNA의 타겟팅 서열 부위와 필수적 부위를 포함하는 crRNA 부위와 상기 Cas9의 tracrRNA의 필수적 부위를 포함하는 tracrRNA 부위가 뉴클레오타이드 링커를 통하여 헤어핀 구조를 형성하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 sgRNA는 crRNA의 타겟팅 서열 부위와 필수적 부위를 포함하는 crRNA 부위와 상기 Cas9의 tracrRNA의 필수적 부위를 포함하는 tracrRNA 부위가 서로 결합된 이중 가닥 RNA 분자에서 crRNA 부위의 3' 말단과 tracrRNA 부위의 5' 말단이 뉴클레오타이드 링커를 통하여 연결된 헤어핀 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [0050] crRNA의 타겟팅 서열 부위와 필수적 부위 및 tracrRNA의 필수적 부위는 앞서 설명한 바와 같다. 상기 sgRNA에 포함되는 뉴클레오타이드 링커는 crRNA과 tracrRNA 상의 loop 부분을 의미하며, 3 내지 5개, 예컨대 4개의 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 뉴클레오타이드들은 서로 같거나 다를 수 있고, A, U, C 및 G로 이루어진 군에서 각각 독립적으로 선택될 수 있다.
- [0051] 상기 crRNA (예컨대, 일반식 1로 표현됨) 또는 sgRNA는 5' 말단 (즉, crRNA의 타겟팅 서열 부위의 5' 말단)에 1 내지 3개의 구아닌(G)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 tracrRNA 또는 sgRNA는 tracrRNA의 필수적 부분(60nt)의 3' 말단에 5개 내지 7개의 우라실 (U)을 포함하

는 종결부위를 추가로 포함할 수 있다.

- [0053] 일 예에서 상기 가이드 RNA는 "Kim, H. & Kim, J.-S. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 321-334 (2014)"에 기재된 내용을 참조하여 준비할 수 있다.
- [0054] 다른 예는 미세조류의 특정 유전자의 교정 (삽입 및/또는 제거)을 위한 가이드 RNA를 제공한다.
- [0055] 본 발명에서 표적 유전자는 내재적 유전자일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서 상기 표적 유전자는 FTSY (Chloroplast SRP receptor), ZEP (Zeaxanthin epoxidase), 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 FTSY 유전자는 *Chlamydomonas reinhardtii* 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, Phytozome v12.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>)에서 Locus Name Cre05.g241450을 암호화하는 유전자 또는 Transcript Name Cre05.g241450.t1.2의 유전자일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 ZEP 유전자는 *Chlamydomonas reinhardtii* 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, Phytozome v12.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>)에서 Cre02.g082550을 암호화하는 유전자 또는 Transcript Name Cre02.g082550.t1.2의 유전자일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 상기 가이드 RNA는 앞서 설명한 바와 같은 crRNA와 tracrRNA의 이중가닥 복합체 또는 sgRNA일 수 있으며, 상기 이중가닥 복합체 또는 sgRNA에 포함된 crRNA는 FTSY 유전자 및/또는 ZEP 유전자의 교정(제거 및/또는 삽입)하고자 하는 부위와 혼성화 가능한 타겟팅 서열부위를 포함하는 것일 수 있다. 상기 타겟팅 서열 부위는 예컨대 도 2, 도 3 (이상 FTSY 유전자 관련), 도 7, 도 8 (이상 ZEP 유전자 관련)에 예시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 또한, 본 발명은  $1 \times 10^4$  개 내지  $1 \times 10^7$  개의 미세조류에 도입 시 가이드 RNA 20 ~ 200  $\mu\text{g}$  (더욱 바람직하기로 100 ~ 180  $\mu\text{g}$ ) 및 Cas 단백질 30 ~ 300  $\mu\text{g}$  (150 ~ 250  $\mu\text{g}$ )의 RGEN RNP 복합체를 사용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0058] 또한, 본 발명은 상기 유전자 교정방법에 의해 제작된 유전자 교정 미세조류 변이체를 제공한다.
- [0059] 상기 용어 "유전자 교정"은 유전자의 전부 또는 특정 부위가 제거 및/또는 임의의 뉴클레오타이드의 삽입에 의하여 변이가 유발된 것을 의미한다.
- [0060] 일 구현예에서, 상기 미세조류 변이체는 FTSY 유전자의 특정 부위가 교정 (제거 또는 제거된 후 특정 유전자 서열이 삽입)된 것일 수 있다. 상기 교정되는 특정 부위와 변이 내용은 도 3, 도 5, 도 6에 예시되어 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 교정된 FTSY 유전자를 포함하는 미세조류 변이체는 세포 내 색소가 열어져 투명도가 높아져서 빛의 투과도가 개선되어 정해진 공간에서 대량 생산이 용이하다는 이점을 갖는다.
- [0061] 일 구현예에서, 상기 미세조류 변이체는 ZEP 유전자의 특정 부위가 교정 (제거 또는 제거된 후 특정 유전자 서열이 삽입)된 것일 수 있다. 상기 교정되는 특정 부위와 변이 내용은 도 8, 도 10에 예시되어 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 교정된 ZEP 유전자를 포함하는 미세조류 변이체는 Zeaxanthin 함량이 증가된 이점을 갖는다.
- [0062] 일 구현예에서, 미세조류 변이체는 FTSY 유전자의 특정 부위와 ZEP 유전자의 특정 부위가 모두 교정 (제거 또는 제거된 후 특정 유전자 서열이 삽입)된 것일 수 있다.
- [0063] 다른 예는 미세조류 변이체 제조 방법을 제공한다. 상기 미세조류 변이체 제조 방법은 교정하고자 하는 유전자 부위와 혼성화 가능한 타겟팅 서열 부위를 포함하는 가이드 RNA와 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 미세조류에 전달하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA와 RNA 가이드 엔도뉴클레아제의 복합체는 플라스미드 등의 DNA 운반체를 매개로 하지 않고, 전기충격 등의 방법으로 직접적으로 세포 내에 투입되는 것을 특징으로 한다.
- [0064] 상기 표적 유전자에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0065] 상기 미세조류 변이체 제조 방법에 의하여 미세조류 변이체를 제조하는 경우, DNA 운반체를 사용하지 않으므로, 유전자 변형 유기체의 위험성이 없다는 이점이 있다.
- [0066] 본 발명의 미세조류 변이체의 제조방법에 의하여 미세조류 변이체를 제조하는 경우 약 0.1% 이상, 약 0.5% 이상, 약 0.7% 이상, 또는 약 1% 이상의 성공률로 원하는 유전자 변이체를 얻을 수 있는 것으로 나타났다 (50 x

$10^4$  cells (*Chlamydomonas*)에 약 200  $\mu\text{g}$ 의 Cas9 단백질 및 약 140  $\mu\text{g}$ 의 sgRNA 사용 시). 상기 성공률은, 기존의 미세조류에서 Cas9 단백질을 이용해 성공적으로 형질전환체를 얻은 사례가 없었던 것을 고려할 때, 현저하게 개선된 수치라고 할 수 있다.

[0068] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식이 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0070] **[실시예]**

[0071] **참조예: 실험방법**

[0072] **1. 균주 확보**

[0073] 본 발명에서 사용된 클라미도모나스 레인하르티아이 야생형은 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)이며, 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)은 Chlamydomonas Resource Center([www.chlamycollection.org](http://www.chlamycollection.org))를 통해 확보하였다[<http://www.chlamycollection.org/product/cc-4349-cw15-mt-goodenough-330a/>].

[0075] **2. 세포 배양**

[0076] 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349) 및 돌연변이체 균주를 다음과 같이 배양하고 유지하였다. 간단히 설명하면, 세포들을 25°C에서 연속적인 백색 광 하에서 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ )에서 유지시켰다. 세포들을 트리스-아세트이트 포스페이트(TAP) 배지에서 광 타가영양학적으로, 또는 고염(HS) 배지에서 광 독립영양학적으로, 연속적인 저 및 고 복사조도 (각각 50 및 700  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 하에서 배양하였다. 모든 실험에서 데이터는 적어도 3개의 생물학적 복제물로부터의 평균 및 표준편차(SE)이다.

[0078] 1) Autotrophic culture media 조성

[0079] 광합성만을 이용하여 외부의 탄소원 공급이 없는 상태로 배양하는 Autotrophic culture를 하는 경우 최소 배지인 HS 배지에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하여 배양하였다. 하기 표 1과 같은 조성을 가진 배지를 만든 뒤 Autoclave하여 준비한 다음, 활발한 growth stage에 있는 cell을 이용하여 배양액에  $10^6$  cell/mL의 농도가 되도록 만들어 growth를 시작하였다. 배양용기는 도 14과 같이 유리로 된 컬럼을 사용하여 아래에서 Bubble을 공급하고 양옆에서 200uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 주었다.

표 1

HS Media 성분	배양액 내 농도 (mM or μM)
버퍼 및 다량성분 (mM)	
NH <sub>4</sub> Cl	9.345
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.08
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.07
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.265
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.29
미량성분 (μM)	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	765
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	922
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	511
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	7
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	126
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	18
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	18
EDTA disodium salt	134
기타	
탄소원	5% CO <sub>2</sub> bubble, 80cc/min
배양액내 pH	7.0
광도	200uE

[0080]

[0081]

2) Mixotrophic culture media 조성

[0082]

광합성과 탄소원을 같이 공급하여 배양하는 Mixotrophic culture를 하는 경우 TAP 배지에서 아세트산을 첨가하여 배양하였다. 하기 표 2와 같은 조성을 가진 배지를 만든 뒤 Autoclave하여 준비한 다음 활발한 growth stage에 있는 cell을 이용하여 배양액에 10<sup>6</sup> cell/mL의 농도가 되도록 만들어 growth를 시작하였다. 배양용기는 도 15와 같이 유리로 된 flask나 bottle를 사용하여 큰 volume으로 배양하였으며 magnetic bar를 이용하여 stirring 해주었다. 70uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 함께 주었다.

표 2

TAP Media 성분	배양액 내 농도 (mM or μM)
버퍼 및 다량성분 (mM)	
NH <sub>4</sub> Cl	7.5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.675
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.62
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.41
미량성분 (μM)	
EDTA·2H <sub>2</sub> O	135
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	18
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	26
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5.5
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	6.5
기타	
탄소원	Glacial acetic acid, 1ml/L
Tris	2.42g/L
배양액 내 pH	7.2
광도	70uE

[0083]

[0085] **3. RNA 제조**

[0086] 정제된 재조합 Cas9 단백질을 ToolGen, Inc.로부터 구매하였다. 가이드 RNA를 시험관 내에서 Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012-1019 (2014)에 기술된 것과 같이 MEGA 쇼트스크립트 T7 키트 (Ambion)를 사용하여 전사하였다. 전사된 RNA를 페놀:클로로포름 추출, 클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 정제하였다. 정제된 RNA를 분광 분석에 의해 정량하였다.

[0088] **4. 클라미도모나스 형질전환**

[0089] 클라미도모나스 라인하르티아이 cw15 mt<sup>-</sup> 야생형 (CC-4349)에서 RNP 복합체를 사용하여 표적-특이적 녹아웃 돌연변이체를 제조하기 위하여, 50 × 10<sup>4</sup> 세포를 시험관 내에서 전사된 sgRNA (140 μg)와 사전 혼합되어 있는 Cas9 단백질 (200 μg)로 형질전환시켰다. 저장 완충액 (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTT 및 10% 글리세롤) 중의 Cas9 단백질을 뉴클레아제-없는 물에 녹인 sgRNA와 혼합하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 세포들을 Biorad Gene Pulser Xcell™ 전기충격 시스템을 사용하여, GeneArt 클라미도모나스 엔지니어링 키트로부터의 권장된 프로토콜을 따라 형질전환시켰다. 형질전환 후에, 세포들을 12시간 동안 인큐베이션하고 게놈 DNA 추출을 위해 수확하거나, 또는 2000의 세포 수로 즉시 희석하고 1.5% 아가를 함유하는 TAP 배지 상에 플

레이팅하여 나중의 연구를 위해 단일 콜로니를 얻었다 (도 24).

[0091] **5. 표적화된 심층 서열화**

[0092] 뉴클레아제 표적 부위를 포함하는 게놈 DNA 세그먼트를 Phusion 중합효소 (New England Biolabs)를 사용하여 증폭시켰다. 동일한 양의 PCR 앰플리콘을 Illumina MiSeq를 사용하여 쌍을 이룬 단부를 판독하여 서열화하였다. 단 한 번 발생하는 희귀 서열 판독을 배제하여 서열화 반응 및 증폭과 관련된 오차를 제거하였다. RGEN 절단 부위 (PAM의 3 bp 상류) 주변에 위치한 indel을 RGEN에 의해 유도된 돌연변이로 간주하였다. NCBI Sequence Read Archive ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sra](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra))에서 승인 번호 PRJNA327012 하에 심층 서열화 데이터를 활용할 수 있다.

[0094] **6. 잠재적인 표적-오프 부위의 조사**

[0095] 각 게놈 서열에서 잠재적인 수천 개의 표적-오프 부위 중 수백 개의 부위에 뉴클레아제-유도된 indel이 있었는지를 조사하기 위하여, 본 저자들은 표적-온 부위와, 길이에서 DNA 또는 RNA 별지가 있는 4개까지의 뉴클레오타이드가 상이하거나 2개까지의 뉴클레오타이드가 상이한 잠재적인 표적-오프 부위를 열거하기 위하여 Cas-OFFinder[Bae, S., Park, J. & Kim, J.-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNAguided endonucleases. *Bioinformatics* **30**, 1473.1475 (2014)]을 사용하였다. 그 결과로서, 17개의 잠재적인 표적-오프 부위를 얻었고 본 저자들은 독립적인 클론에서 표적화된 심층 서열화를 수행하였다.

[0097] **7. 유전자형 특성화**

[0098] 게놈 DNA를 표적화된 심층 서열화 및 Sanger 서열화를 위해 각각 형질전환 후에 수확한 세포들로부터, 또는 TAP 아가 플레이트로부터 선택한 개별적인 콜로니화된 돌연변이체들로부터 추출하였다. 게놈 DNA를 분리하기 위하여, 세포들을 수확하고, 2.5× 추출 완충액 (0.35 M 소르비톨, 0.1 M 트리스/HCl pH 7.5 및 5 mM EDTA), 2.5× 핵 용해 완충액 (0.2 M 트리스/HCl pH 7.5, 0.05 M EDTA, 2 M NaCl 및 2% (w/v) CTAB) 및 1× 5% N-라우로일사르코신을 함유하는 마이크로프랩 완충액에 재현탁한 후, 65°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 게놈 DNA를 24:1의 클로로포름:아이소아밀알코올(v/v)로 추출하고 아이소프로판올로 침전시켰다. Sanger 서열화를 위해, 표적 영역을 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다 (도 18). PCR 생성물을 아가로오스 겔 전기영동에 의해 확인하고, 겔로부터 용출한 후 Sanger 방법을 사용하여 서열화하였다 (Macrogen, South Korea).

[0100] **8. 돌연변이체 선택**

[0101] 표적화된 녹아웃 돌연변이체들을 세포의 착색을 기준으로 선택하고 클로로필 (Chl) 형광을 기술된 바와 같이 CCD 카메라가 장착된 Walz 이미지-PAM 시스템 M-시리즈 Chl 형광 시스템에 의해 측정하였다[Niyogi, K. K., Bjorkman, O. & Grossman, A. R. *Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. Plant Cell* **9**, 1369-1380 (1997)]. 장비를 이용하여 초기에 스크리닝한 형질전환체들의 NPQ(비광화학적 소멸) 값을 측정하여 그것들이 변화된 개체들을 선별하였다(도 9의 a).

[0103] **9. 색소 및 광합성 활성 측정**

[0104] 색소 측정을 위해 세포들을 저광 50 μmol photons/m<sup>2</sup> 조건 하에서 성장시켰다. 세포의 Chl 함량을 기술된 바와 같이 80% (v/v) 아세톤 추출물 중에서 분광측광학적으로 측정하였다[Arnon, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1 (1949); Melis, A., Spangfort, M. & Andersson, B. Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. *Photochem Photobiol* **45**, 129-136 (1987)]. HPLC 분석을 Waters Spherisorb 5.0 μm ODS1 4.6 × 250 mm 카트리지가 장착되어 있는 Shimadzu Prominence HPLC 모델 LC-20AD로 수행하였다. 색소를 90%(v/v) 아세톤에서 추출하였고 샘플의 상층액에 대해 HPLC로 분석하였다. 색소를 0.1 M 트리스-HCl pH 8.0, 아세토니트릴, 메탄올 및 에틸아세테이트의 용매 혼합물을 사용하여 분리하였다. 작

동 중에, 용매 농도는 0 내지 15분에 14% 0.1 M 트리스-HCl, 84% 아세토니트릴 및 2% 메탄올이었다. 15 내지 19 분에는 용매 혼합물은 68% 메탄올과 32% 아세토니트릴로 구성되었다. 후-작동은 6분 동안 초기 용매 혼합물로 수행하였다. 유속은 분당 1.2 mL로 일정하였다. 색소는 445 nm 및 670 nm에서 검출되었다. 개별적인 색소의 농도를 Chl 및 카로티노이드의 표준 색소로 보정된 HPLC 프로파일로부터 측정하였다 (14C Centralen; DHI, HØrsholm, Denmark). 광합성 활성을 25°C에서 할로겐램프로 조명된 Hansatech Clark-형 산소 전극으로 측정하였다. 2 μM Chl을 함유하는 1 mL의 세포 현탁액 부분표본을 산소 전극 챔버로 전달하였다. 산소 발생이 세포에 대해 활용할 수 있는 탄소 공급에 의해 제한받지 않는 것을 보장하기 위하여, 50 μl의 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4를 측정 전의 현탁액에 첨가하였다. 산소 발생을 0에서 1,200 μmol photons/m<sup>2</sup>s까지, 증가하는 광 세기에서 측정하였고, 각 단계를 2분 동안 기록하였다.

[0106] 10. SDS-PAGE 및 웨스턴-블롯 분석

[0107] 단백질 분석을 위하여, 70 μmol photons/m<sup>2</sup>s 하에서 TAP에서 성장한 세포들을 수확하고, 용해 완충액 (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-머캅토에탄올 및 1 mM PMSF) 중에 재현탁한 후 음과처리에 의해 파괴하였다. 총 단백질 샘플을 기술된 것과 같이[Arnon, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1 (1949).], SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 분리하였다. SDS-PAGE 겔을 가시화를 위해 0.1 % (w/v) 쿠마찌 브릴리언트 블루 R로 염색하거나, 또는 ATTO P PVDF 막 위에 반건조 전달 시스템을 통해 블롯팅하였다. 막을 C. 레인하르트티아로부터 ATP 합성(ATP β)의 지아잔틴 에폭시 다제(ZEP), cpFTSY 및 β 하위유닛에 대해 발생된 특이적 다중클론성 항체들로 프로브하였다. 신호들을 Abfroniter 웨스트 세이프업 ECL 시약을 사용하여 가시화하였고 신호 검출을 위해 X-선 필름에 노출시켰다.

[0109] 11. 성장 분석

[0110] 클라미도모나스 세포들을 연속적인 고광 (700 μmol photons/m<sup>2</sup>s)으로 25°C에서 조명된 버블 칼럼 광생물반응기 (40 mm 직경 및 500 mm 높이)에서 200 mL의 HS 배지에서 광 독립영양학적으로 성장시켰다. 각 배양을 5% CO<sub>2</sub>로 40 mL/분의 공급 속도로 공기가 통하게 하였다. 각 배양에 대한 초기 세포 농도는 100×10<sup>4</sup> 세포/mL이었다.

[0112] 실시예 1: 클라미도모나스에서 RGEN RNPs를 이용한 CpFTSY 유전자 녹아웃 돌연변이체 제조

[0113] 도 1은 본 발명에 따른 클라미도모나스 레인하르트티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)에서 RGEN RNPs를 이용하여 유전자 녹아웃 돌연변이체를 제조하는 과정을 나타낸 개략도이다. CpFTSY는 광수확 복합체를 엽록체 내로 전달 하는데 역할을 하며 이전에는, 클라미도모나스 레인하르트티아이(*C. reinhardtii*)의 CpFTSY의 null 돌연변이가 야생형에서 보다 극적으로 낮은 수준의 광-수확 Chl 결합 단백질, 더 낮은 Chl 함량 및 더 높은 Chl a 대 Chl b 비율을 유발한 결과로 더 작은 안테나 크기가 햇빛의 지나치게 많은 흡수를 방지하고, 고밀도 배양 안으로 더 깊숙이 햇빛의 더 많은 양의 침투를 도와주며, 이로서 밝은 햇빛 하에서 대량 배양의 더 큰 생산성에 기여할 수 있는 장점이 알려져 있다.

[0114] CpFTSY 유전자[phytozome: Cre05.g241450 또는 NCBI: XM\_001697700.1][[Plant physiology 158.2 \(2012\): 930-945\]를 표적하기 위해 sgRNA는 Cas-Designer \(\[www.rgenome.net\]\(http://www.rgenome.net\)\)을 이용하여 microhomology-driven frameshift 돌연변이를 유도하도록 하는 가장 높은 스코어를 기록한 네 개의 target site를 디자인하였다 \(Kim, H. & Kim, J.-S. \*Nat. Rev. Genet.\* 15, 321-334 \(2014\) 참조\). 이를 바탕으로 네 개의 sgRNA를 invitro transcription을 통해 합성하였다. 도 2는 CpFTSY 유전자를 표적하기 위해 제작된 네 개의 sgRNA에 대한 서술이다. 클라미도모나스 레인하르트티아이 cw15 mt- 야생형 \(CC-4349\) 세포는 TAP 배지\[표 2 참조\]를 이용해 25도에서 50ml flask에 담아 70uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 주며 90 rpm으로 shaking하며 배양하였다. 세포의 농도는 spectrophotometer를 이용하여](https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=4614&searchText=transcriptid:30783185, chromosome 5번 중 3459480..3466791의 위치에 존재; Kirst, Henning, et al. )

측정하며 OD750에서 0.3 ~ 0.5 정도의 활발히 배양 중인 시기의 세포를 사용하였다. RNP 복합체를 만들기 위해 200  $\mu$ g의 Cas9 단백질[도 25]은 140  $\mu$ g의 sgRNA[도 2]와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 인큐베이션하였다. 결합된 RNP 복합체는  $50 \times 10^4$  개의 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)의 세포와 함께 4mm Electroporation cuvette에서 Biorad Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems을 이용하여 (Voltage 600V, Capacity 50uF) 형질전환시킨 뒤 12시간 동안 dark incubation 후에 gDNA extraction 하여 deep sequencing하여 분석하였으며 일부는 2000개의 cell로 dilution하여 TAP agar plate에 도말하여 single colony를 얻었다. 도 3은 RGEN RNPs에 의해 유도된 CpFTSY 유전자의 돌연변이를 targeted deep sequencing 분석을 통해 확인한 결과이다. 그 결과로서, 표적화된 심층 서열화에 의해 검출된, 작은 삽입 및 결실(indel)이 최대 0.56%까지의 빈도로 확인되었다(도 3의 b). 도 4는 RGEN RNPs에 의해 발생한 CpFTSY 유전자 녹아웃의 돌연변이체의 plate 사진이다. 각각의 분리된 colony로부터, pale green의 색깔을 보이는 개체들을 분리하였으며 각각은 target gene에서의 돌연변이를 확인하였다. 도 5는 RGEN RNPs에 의한  $\Delta$ CpFTSY 돌연변이체의 특성 분석한 결과이다. 도 5의 a는 야생형과  $\Delta$ CpFTSY 돌연변이체의 표현형을 보여준다. 야생형의 Chl a 대 Chl b 비율과 비교하여 더 큰 Chl a 대 Chl b 비율을 측정하고(도 5의 b) Sanger 서열화를 수행함으로써 (도 5의 c 및 도 6) 6개의  $\Delta$ CpFTSY 돌연변이체를 확인하였다. 모든  $\Delta$ CpFTSY 돌연변이체의 Total chlorophyll은 야생형의 총 양보다 3배 더 낮았지만 Chl a 대 Chl b 비율은 야생형의 Chl a 대 Chl b 비율보다 2 또는 3배 더 높았다 (도 5의 b). 도 6은 RGEN RNPs에 의한  $\Delta$ CpFTSY 돌연변이체의 CpFTSY 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과이다.

[0116] 실시예 2: 클라미도모나스 레인하르티아이에서 RGEN RNPs를 이용한 ZEP 유전자 녹아웃 돌연변이체 제조

[0117] 다음 단계로 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349) ZEP 유전자를 타겟으로 정하였다. ZEP 유전자로부터 유래된 지아잔틴 에폭시다제 효소는 지아잔틴(Zea)을 에폭시화시켜 비올라잔틴(Vio) 생성하기 때문에 이 ZEP 유전자를 RGEN RNPs 이용하여 녹아웃 돌연변이를 만든다면 지아잔틴으로부터 비올라잔틴으로의 에폭시화 단계를 차단함으로써 지아잔틴의 축적을 유발할 수 있다 (도 11b). 지아잔틴은 망막의 황반 색소로, 유해한 청색광 및 UV를 여과함으로써 노화 관련 황반 변성과 같은 만성 질환의 진행을 방지할 수 있다.

[0118] ZEP 유전자[phytozome: Cre02.g082550 또는 NCBI: AY211267.1][<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=4614&searchText=transcriptid:30785220>, Chromosome 2번 중 1244277-1250969의 위치에 존재]를 표적하기 위해 sgRNA는 Cas-Designer (www.rgenome.net)을 이용하여 microhomology-driven frameshift 돌연변이를 유도하도록 하는 가장 높은 스코어를 기록한 다섯 개의 target site를 디자인하였다 (Kim, H. & Kim, J.-S. Nat. Rev. Genet. 15, 321-334 (2014) 참조). 이를 바탕으로 다섯 개의 sgRNA를 invitro transcription을 통해 합성하였다. 도 7은 ZEP 유전자를 표적하기 위해 제작된 다섯 개의 sgRNA에 대한 서술이다. 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349) 세포는 TAP 배지[표 2 참조]를 이용해 25도에서 50ml flask에 담아 70uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 주며 90rpm으로 shaking하며 배양하였다. 세포의 농도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하며 OD750에서 0.3 ~ 0.5 정도의 활발히 배양 중인 시기의 세포를 사용하였다. RNP 복합체를 만들기 위해 200  $\mu$ g의 Cas9 단백질[도 25]은 140  $\mu$ g의 sgRNA[도 7]와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 인큐베이션하였다. 결합된 RNP 복합체는  $50 \times 10^4$  개의 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)의 세포와 함께 4mm Electroporation cuvette에서 Biorad Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems을 이용하여 (Voltage 600V, Capacity 50uF) 형질전환시킨 뒤 12시간 동안 dark incubation 후에 gDNA extraction 하여 deep sequencing하여 분석하였으며 일부는 2000개의 cell로 dilution하여 TAP agar plate에 도말하여 single colony를 얻었다. 도 8은 Targeted deep sequencing에 의해 RGEN-RNPs에 의해 유도된 ZEP 유전자의 돌연변이를 확인한 결과이다. 가장 형질전환 효율이 높은 세 번째 sgRNA (0.456%)에 의해 유도된 single colony를 분리하여 target gene의 돌연변이를 확인하였다. (도 8의 b는 targeted deep sequencing의 data로, RNP를 이용한 형질전환 실험 후 전체 세포를 모으고 gDNA를 뽑아서 분석했을 때 전체 세포를 대상으로 target 부위의 DNA 가닥에서 일어나는 모든 변이를 분석하여 그 패턴과 frequency를 알 수 있는 실험임. 즉, 도 8의 b는 targeted deep sequencing을 통해 target 부위에서 실제로 확인된 변이의 패턴들이지만, 42 bp 이상의 insertion 같은 큰 사이즈 변화는 targeted deep sequencing의 원리로는 찾아내기 어려움, 실제로 얻어진 single colony와 차이가 있을 수 있음). 이렇게 ZEP 특이적 녹아웃 돌연변이체를 DNA 없는 RGEN RNP를 사용하여 생성한 후에, 페트리디쉬에서 모든 세포에 대해 Chl 형광을 측정하였고 여러 개의 추정되는 ZEP 녹아웃 세포주를 선별하였다. 도 9의 a

의 적색 원형은 저광( $50 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 조건 하에서 TAP 아가 배지 상에서 성장한 추정되는 ZEP 녹아웃 돌연변이체를 가리킨다. NPQ/4 영상은 Imaging PAM(Walz)으로 측정되었다. 이렇게 확인된 콜로니 중 황반색소 함량이 증가된 변이주 3개( $\Delta Z1$ ,  $\Delta Z2$ ,  $\Delta Z3$ )를 선별하였으며(도 9의 b), RGEN RNPs에 의해 발생된 세 개의  $\Delta ZEP$  돌연변이체에서 실제적인 ZEP 유전자 위치의 표적 DNA 서열 변화를 Sanger sequencing을 통해 확인하였다(도 10). 도 11a는 HPLC을 이용해 야생형과 세 개의 ZEP 돌연변이체의 색소를 정성, 정량적 분석한 결과이며 이를 통해 ZEP 돌연변이체에서는 지아잔틴의 양이 10배 이상 유의미하게 증가하였음을(도 11b) 확인할 수 있었다.

[0120] **실시예 3: 클라미도모나스에서 RGEN RNPs를 이용한 연속적인  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이 제조**

[0121] 실시예 2를 통해 얻은 ZEP 유전자 녹아웃 돌연변이체를 바탕으로 여기에 실시예 1에서 제작하였던 CpFTSY 유전자를 표적하는 RGEN RNPs를 이용하여 연속적인  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이를 제조하고자 시도하였다. 실시예 2를 통해 얻은 ZEP 유전자 녹아웃 돌연변이체 중 하나인 클라미도모나스 레인하르티아이  $\Delta Z1$  세포를 TAP 배지 [표 2 참조]를 이용해 25도에서 50ml flask에 담아 70uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 주며 90 rpm으로 shaking하며 배양하였다. 세포의 농도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하며 OD750에서 0.3 ~ 0.5 정도의 활발히 배양 중인 시기의 세포를 사용하였다. RNPs 복합체를 만들기 위해 200  $\mu\text{g}$ 의 Cas9 단백질[도 25]은 140  $\mu\text{g}$ 의 sgRNA[도 2]와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 인큐베이션하였다. 결합된 RNPs 복합체는  $50 \times 10^4$  개의 클라미도모나스 레인하르티아이  $\Delta Z1$ 의 세포와 함께 4mm Electroporation cuvette에서 Biorad Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems을 이용하여 (Voltage 600V, Capacity 50uF) 형질전환시킨 뒤 12시간 동안 dark incubation 후에 gDNA extraction하여 deep sequencing하여 분석하였으며 일부는 2000개의 cell로 dilution하여 TAP agar plate에 도말하여 single colony를 얻었다. 도 12는 RGEN RNPs에 의해 유도된 CpFTSY 유전자의 돌연변이를 targeted deep sequencing 분석을 통해 확인한 결과이다. 그 결과로서, 표적화된 심층 서열화에 의해 검출된, 작은 삽입 및 결실 (indel)이 최대 1.11%까지의 빈도로 확인되었다. 도 13의 a는 RGEN RNPs에 의해 발생한 CpFTSY 유전자 녹아웃으로 유도된  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 plate 사진이다. 각각의 분리된 콜로니로부터, pale green의 색깔을 보이는 개체들을 분리하였으며 각각은 target gene에서의 돌연변이를 확인하였다. 도 13의 b는 야생형과  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 표현형을 보여준다. 도 14는 RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 CpFTSY 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과이다. 도 15는 HPLC을 이용해 야생형과 14개의  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 색소를 정성, 정량적 분석한 결과이며 이를 통해  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체는 야생형보다 지아잔틴의 양이 10배 이상 유의미하게 증가함과 동시에 Total chlorophyll이 야생형보다 3배 더 낮고 Chl a 대 Chl b 비율은 야생형보다 2 또는 3배 더 높았음을 확인할 수 있었다.  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체 세포에서의 표현형이 표적-오프 효과에 의해 유발되지 않았음을 확인하기 위하여, CpFTSY 및 ZEP-표적화된 RGEN이 표적-오프 돌연변이를 유발하였는지의 여부를 조사하였다. Cas-OFFinder ([www.rgenome.net/cas-offinder](http://www.rgenome.net/cas-offinder))을 사용하여 벌지(bulge) 없는 네 개의 뉴클레오타이드 만큼 또는 하나의 DNA 또는 RNA 벌지가 있는 두 개의 뉴클레오타이드 만큼 표적-온 부위와 상이한 잠재적인 표적-오프 부위들을 확인하였다. 이들 부위에서 서열화 오차율을 초과하는 indel은 발견되지 않았고, 이것을 통해  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체에서 RGEN에 의한 표적-오프 효과가 없으며 표적 특이적으로 작동하였음을 확인하였다 (도 16).

[0123] **실시예 4: RGEN-RNPs에 의해 유도된 유전자 녹아웃 돌연변이체들과 야생형의 세포적 특성 비교 분석**

[0124] 도 17을 통해 야생형과 RGEN RNPs에 의한  $\Delta ZEP$ ,  $\Delta FTSY$  돌연변이,  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 표현형을 비교한 사진이다. 세포는 photoautotrophic culture 조건에서 고광도( $500 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 아래서 농도는  $10^7$  cell/ml로 맞추고 비교하였다. 또한, 야생형과 각각의 돌연변이체들로부터 ZEP와 FTSY proteins의 Western-blot 분석 통해 돌연변이체임을 다시 한번 확인하였다. ZEP와 FTSY proteins을 Immuno-detection할 수 있는 특이적 다중클론성 항체들을 프로브로 사용하여 확인한 결과 각각의  $\Delta ZEP$ ,  $\Delta CpFTSY$  돌연변이체와  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체에서는 해당하는 단백질의 밴드가 검출되지 않았다. ATP synthase의  $\beta$ -subunit(ATP $\beta$ )은 실험 샘플의 loading control로서 사용되었다. 돌연변이체들과 야생형의 세포적 특성 비교하기 위해 다양한 분석을 수행하였다. 도 20, 21, 22 및 23은 야생형과 RGEN RNPs에 의해 유도된  $\Delta ZEP$ ,  $\Delta CpFTSY$  돌연변이체,  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 광포화 곡선, 성장곡선, HPLC 프로파일 및 색소 분석의 결과이다. 도 20은 아세톤 추출법을 이용하여 색소를 추출하고 이를 HPLC를 이용하여 분석한 결과이다. 실험결과 ZEP 돌연변이에서

는 violaxanthin, antheraxanthin이 없고 zeaxanthin 증가한 결과가 확인되었으며  $\Delta CpFTSY$  돌연변이체에서는 전체 색소의 감소와 Chlorophyll b의 큰 폭의 감소가 확인되었다.  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체에서는 각각의 돌연변이체에서 보이는 특성이 모두 나타남을 확인할 수 있었다. 도 21은 Oxygraph 장비를 이용하여 돌연변이체들과 야생형에서 광도에 따른 산소발생량을 측정하여 광포화 곡선을 그려서 광합성 효율을 비교한 실험 결과이다. 광합성 시스템의 안테나 크기는 돌연변이체와 야생형의 광합성율에 영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있다. 안테나 돌연변이체의 줄어든 안테나 크기는, 고휘도(HL) 조건에서 엽록소 당 더 높은 광합성율을 보여준다. 실험 결과  $\Delta CpFTSY$  돌연변이체는 야생형과 비교할 때 엽록소 당 광합성율이 크게 증가하였으며  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체는  $\Delta ZEP$  돌연변이체와 비교할 때 광합성율이 증가하였으며 그 수준은  $\Delta CpFTSY$  돌연변이체와  $\Delta ZEP$  돌연변이체의 중간 수준을 보여주었다. 도 22는 HS 배지, 25 °C, 고휘도 조건에서(700  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ ) 5% CO<sub>2</sub> air를 공급하면서 돌연변이체는 야생형의 성장곡선을 관찰한 결과이다. 고휘도 조건하에서  $\Delta CpFTSY$  돌연변이체와  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 성장은 야생형 및  $\Delta ZEP$  돌연변이체의 성장보다 극적으로 더 좋았다(도 22). 그러므로,  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체는  $\Delta ZEP$  돌연변이체보다 더 큰 광합성 효율 및 세포 성장율을 나타냈고, 그것은 이중 돌연변이체가 고휘도 성장 조건 하에서 더 큰 바이오매스 축적을 유도할 수 있을 것임을 보여준다. 야생형,  $\Delta ZEP$ ,  $\Delta CpFTSY$  및  $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$  이중 돌연변이체의 광합성 활성을 도 23에 요약하였다.

[0125] 결론적으로, 본 발명자들은 *Chlamydomonas reinhardtii* 에서 DNA-없는 표적화된 유전자 편집을 달성하였다. 이 간단한 RGEN RNP 방법은 시간-소모적인 클로닝 단계를 필요로 하지 않으면서 다른 미세조류에도 적용될 수 있다. 더욱이, 결과적인 형질전환체들은 GMO 조절로부터 제외될 수 있을 것이고, 그것은 약학, 영양학, 식품 및 동물 사료에 대한 및 특히 질환의 의학적 치료에 미세조류의 적용을 가능하게 할 것이다.

[0127] **실험예 1: 다른 형질주입법을 사용하여 변이체 제조 확인**

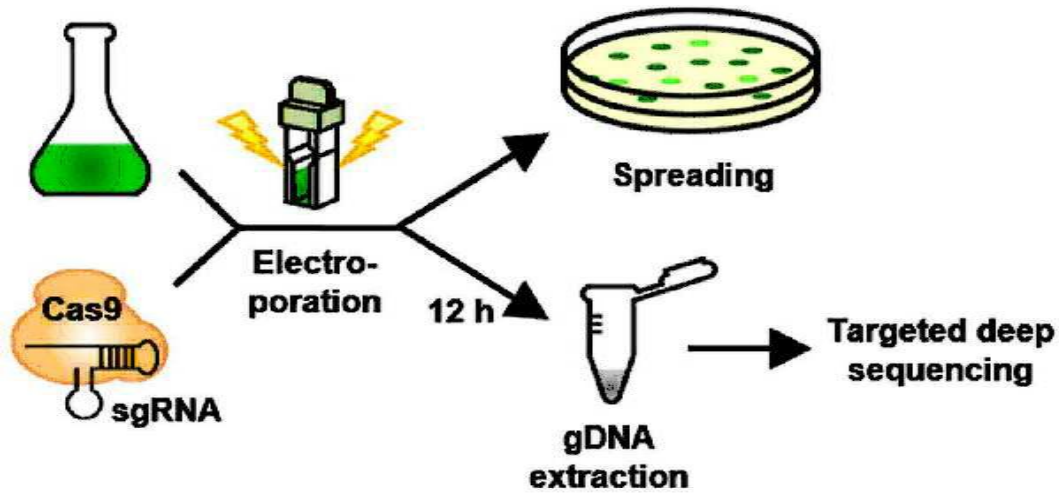
[0128] 상기 실시예 1에서 전기천공법 대신 글라스 비드법(glass bead method)을 사용하였다. 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349) 세포를 10<sup>7</sup> cells/mL까지 배양한 다음 3000 rpm에서 2분간 cell down하여 세포를 회수하였다. 이를 10 ml glass tube로 옮긴 뒤 100  $\mu\text{l}$ 의 20% PEG-8000 (Sigma, USA)와 0.3 g의 glass beads (425-600  $\mu\text{m}$ , Sigma, USA), FTSY 유전자를 target하는 RNP 복합체와 함께 섞은 뒤 Vortexer를 이용하여 maximum speed에서 25초간 물리적인 충격을 주었다(Baek, Kwangryul, et al., Biotechnology journal 11.3 (2016): 384-392. 참고). 형질전환시킨 뒤 일부를 2000개의 cell로 dilution하여 TAP agar plate에 도말하여 single colony를 얻었다. 실험결과로부터 확보된 colony를 Chlorophyll A와 B의 비율을 확인하여 스크리닝하였으나 어떠한 돌연변이도 얻지 못하였다. 이 실험 결과를 바탕으로 물리적인 충격은 RNP 복합체에 부정적인 영향을 줄 것이라고 판단하여 이 방법 대신에 전기천공법을 상기 실시예에서는 형질전환 방법으로 이용하였다.

[0130] **실험예 2: Cas9 단백질 및 sgRNA의 상이한 인큐베이션 시간 및 다양한 농도 조건에서 변이체 제조 확인**

[0131] 도 24의 b는 최초로 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)에서 RNP 실험을 시작할 때 적정 cas9 protein과 sgRNA의 농도를 찾기 위해서 각각의 농도를 달리해서 실험한 결과이다. Cas9 단백질[도 25]은 10  $\mu\text{g}$ 부터 500  $\mu\text{g}$ 까지 높여가며 조건을 달리했고 sgRNA 농도도 7  $\mu\text{g}$ 에서 350  $\mu\text{g}$ 까지 높여갔다. 그 외 조건은 실시예 1과 같이 형질전환 실험을 진행하였으며 12시간 후 세포를 수확하여 targeted deep sequencing을 통해 돌연변이(삽입 및 결실; indel) 빈도를 확인하였다. 그 결과 Cas9 단백질이 200  $\mu\text{g}$ , sgRNA가 140  $\mu\text{g}$ 일 때 가장 높은 돌연변이 빈도가 관찰되어 상기 실시예에서는 이 조건으로 고정하여 진행하였다. 도 24의 a는 실시예 1과 같이 형질전환 실험한 후 각각 12시간 후와 24시간 후에 세포를 수확하고 gDNA를 targeted deep sequencing을 통해 돌연변이(삽입 및 결실; indel) 빈도를 확인한 결과 12시간과 24시간의 상이한 인큐베이션 시간 사이에 유의미한 차이를 발견하지 못하였다. 즉, 12시간이면 충분히 derivery된 RNP가 세포에서 작동하기에 충분한 시간으로 판단하였고 상기 실시예에서도 12시간 후에 targeted deep sequencing을 통해 돌연변이 빈도를 확인하였다.

도면

도면1



도면2

	Target (5' to 3')	CDS Position (%)	Direction	GC Contents (w/o PAM, %)	Out-of-frame Score	# of off-target sites		
						0	1	2
RGEN1	ATTGCGGCTGCGCCAGCTGCGG	3.8	-	70	73.4	1	0	0
RGEN2	CTAGGCGCTGCAAGGAAGCCGGG	12.0	-	70	70.4	1	0	0
RGEN3	CGATCTTCAGAGCAGTGCGGGG	29.1	-	60	70.2	1	0	0
RGEN4	TTGTGGAGCTGCTGACGGCACGG	38.9	+	60	69.4	1	0	0

	Total sgRNA sequence (5' to 3')
RGEN1	AUUGC GGCUGCGCCAGCUG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN2	CUAGGCGCUGCAGGAAGCCG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN3	CGAUCUUCAGAGCAGUGCGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN4	UUGUGGAGCUGCUGACGGCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC

도면3

a

Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
ATTGCGGCTGCGCCAGCTGCGG	29466	0	0	29041	2	0.007
CTAGGCGCTGCAGGAAGCCGGGG*	-	-	-	-	-	-
CGATCTTCAGAGCAGTGCAGGGGG	20907	0	0	12851	35	0.272
TTGTGGAGCTGCTGACGGCACGG	13907	0	0	11693	14	0.12

b

Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
CGATCTTCAGAGCAGTGCAGGGGG	123297	0	0	131282	741	0.564

c

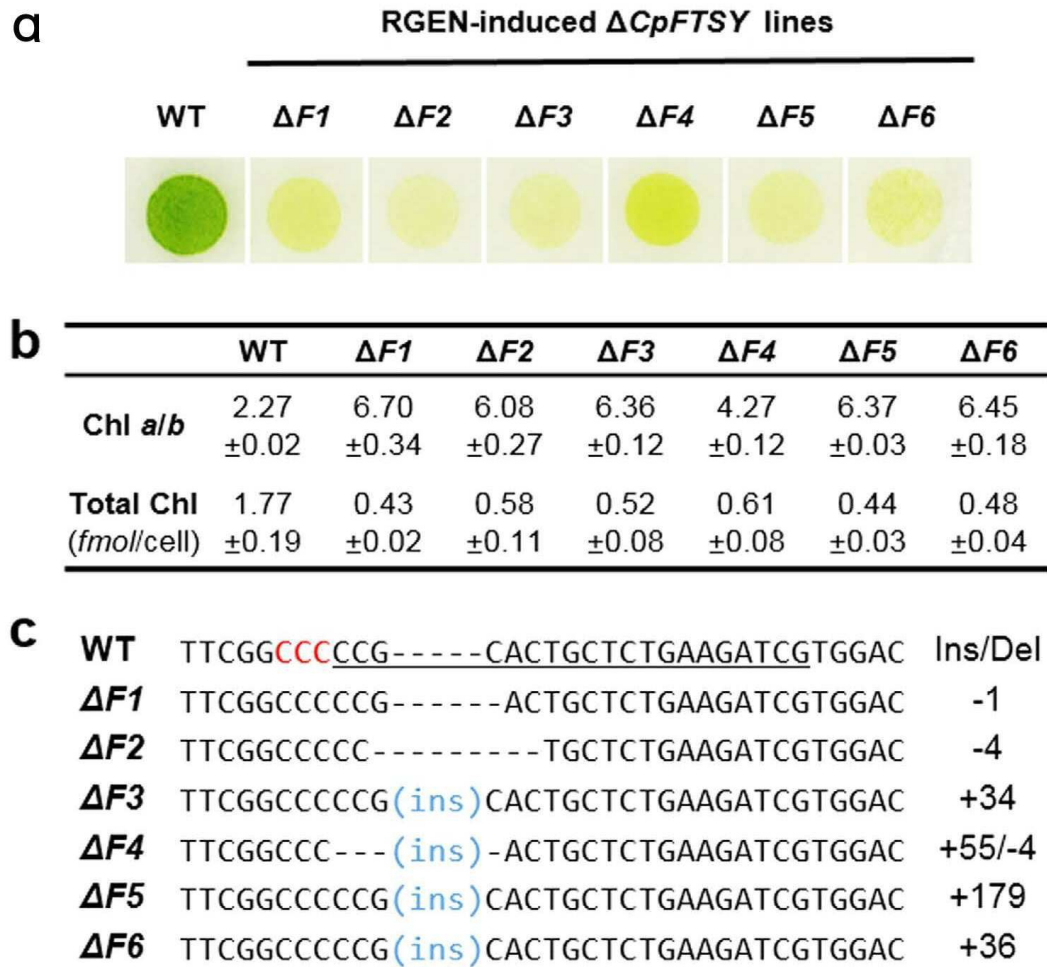
```

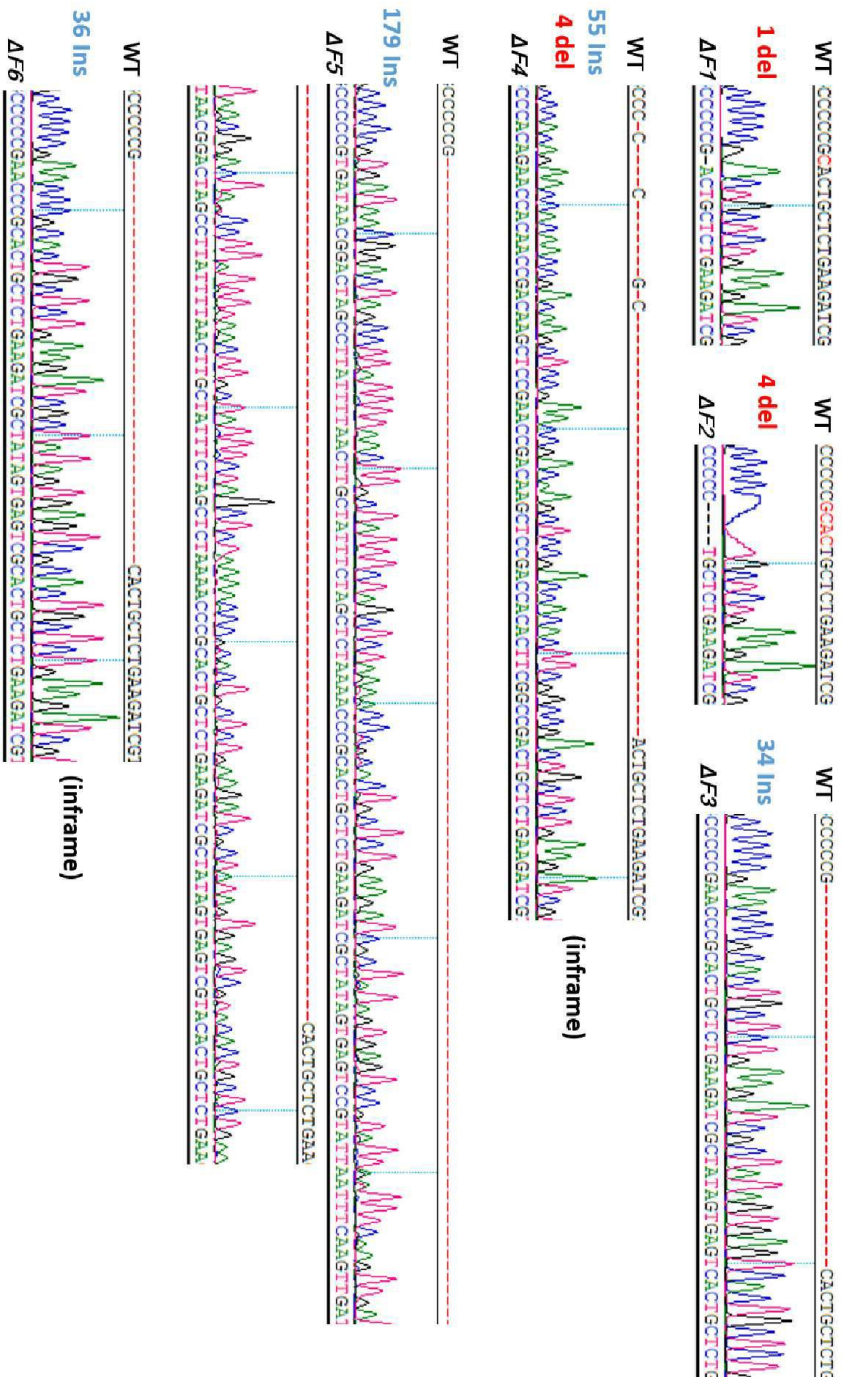
CGACTTCGGCCCCG-----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA  WT
CGACTTCGGCCCC-----TGCTCTGAAGATCGTGGA      -5
CGACTTCGGCCCCCG(ins)CACTGCTCTGAAGATCGTGGA    +25
CGACTTCGGCCCCCGA----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA    +1
CGACTTCGGCCCC-----TGCTCTGAAGATCGTGGA      -4
CGACTTCGGCCCCCG-----TGCTCTGAAGATCGTGGA    -3
    
```

도면4



도면5





도면6

도면7

	Target (5' to 3')	CDS Position (%)	Direction	GC Content (w/o PAM, %)	Out-of-frame Score	# of off-target sites		
						0	1	2
RGEN1	CACCAGCTGCGCGACCGAGCTGG	9.7	-	75	84.3	1	0	0
RGEN2	GCCGTTGCACTTCTGAAGCAGGG	14.0	+	55	75.3	1	0	0
RGEN3	TCCGGCGAACGCACCTGGATGGG	17.3	-	65	75.4	1	0	0
RGEN4	TGGTGGGCGCCGACGGCATCTGG	34.0	+	75	88.2	1	0	0
RGEN5	CCATGGCTTCGCAGGCATCTCGG	37.3	+	60	71.2	1	0	0

	Total sgRNA sequence (5' to 3')
RGEN1	CACCAGCUGCGCGACCGAGC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN2	GCCGUUGCACUUCUGAAGCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN3	UCCGGCGAACGCACCUUGAU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN4	UGGUGGGCGCCGACGGCAUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN5	CCAUGGCUUCGCAGGCAUCU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC

도면8

a

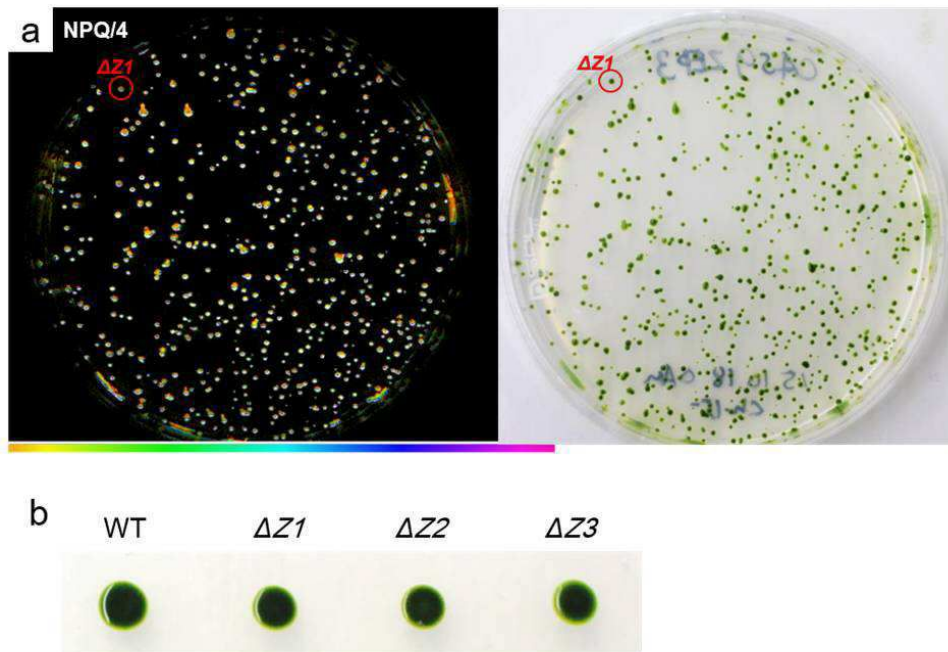
Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
CACCAGCTGCGCGACCGAGCTGG	9541	0	0	4276	4	0.094
GCCGTTGCACTTCTGAAGCAGGG	19060	0	0	16734	6	0.036
TCCGGCGAACGCACCTGGATGGG	30992	0	0	16888	77	0.456
TGGTGGGCGCCGACGGCATCTGG	17138	0	0	20274	9	0.044
CCATGGCTTCGCAGGCATCTCGG	7867	0	0	15398	17	0.11

b

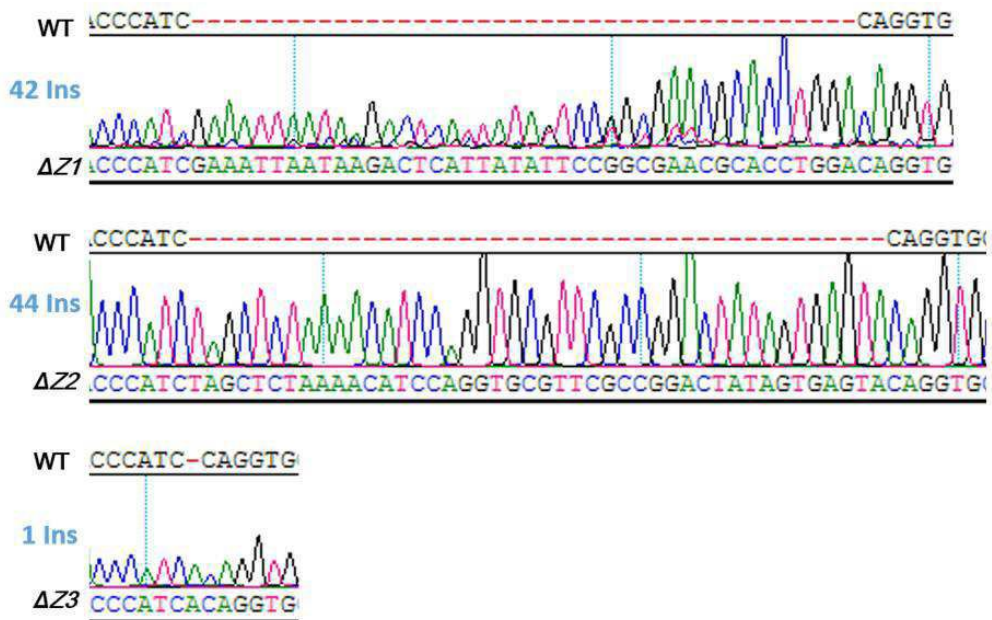
```

TACCGTGGACCCATC-----CAGGTGCGTTCGCCGGAACACCA  WT
TACCGTGGACCCATCTC-----CAGGTGCGTTCGCCGGAACACCA  +2
TACCGTGGACCCAT-----CAGGTGCGTTCGCCGGAACACCA    -1
TACCGTGGACCCA-----GGTGCCTTCGCCGGAACACCA        -4
TACCGTGGACCCATCAACATCAGGTGCGTTCGCCGGAACACCA     +6
TACCGTGGACCCATCT-----GGTGCCTTCGCCGGAACACCA     +1
    
```

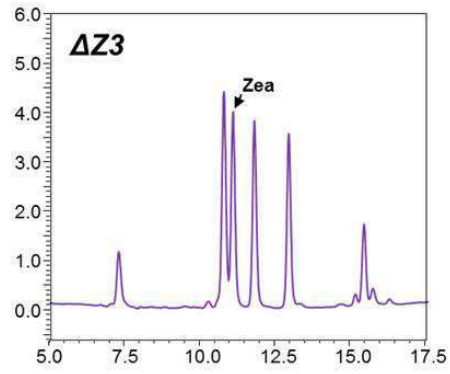
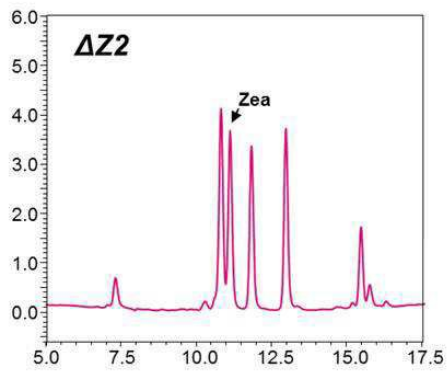
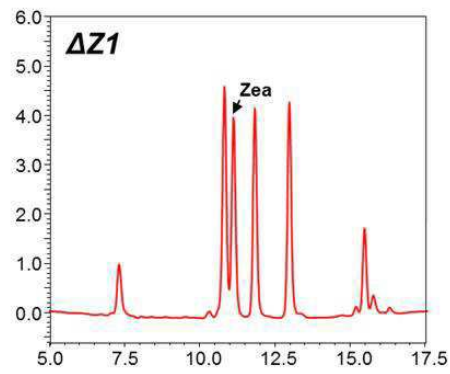
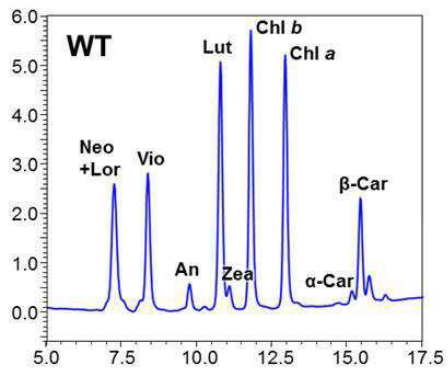
도면9



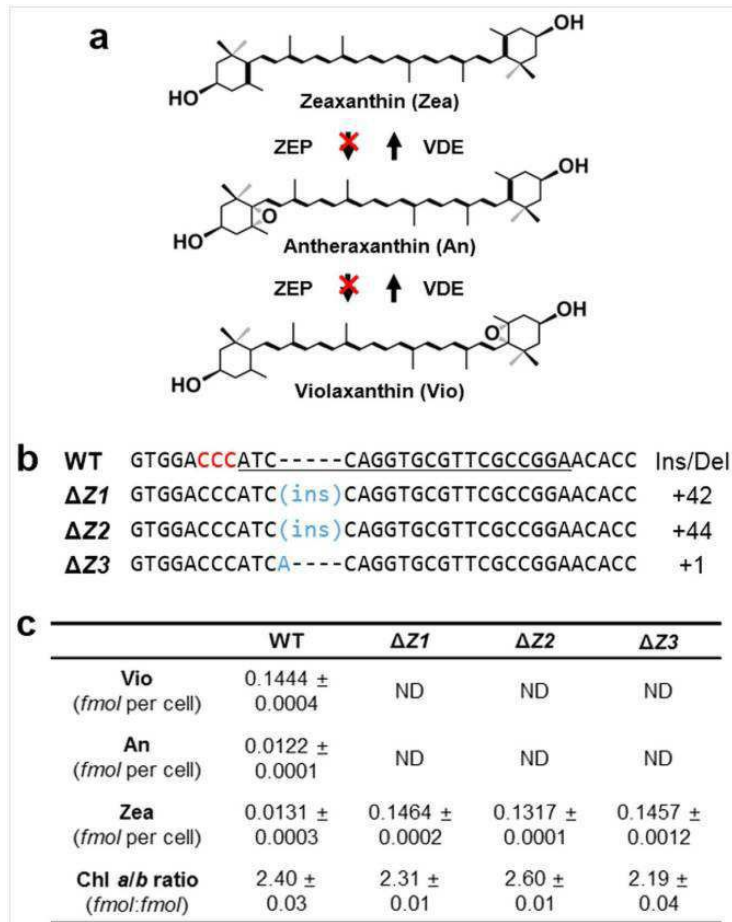
도면10



도면11a



도면11b



도면12

**a**

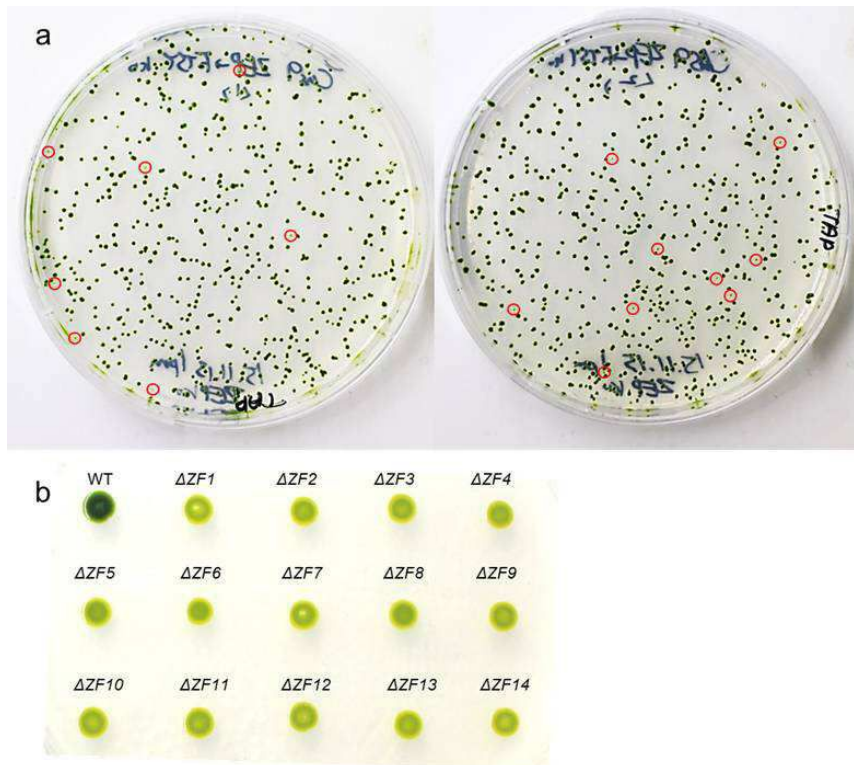
Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
CGATCTTCAGAGCAGTGCGGGG	8753	0	0	45074	502	1.11

**b**

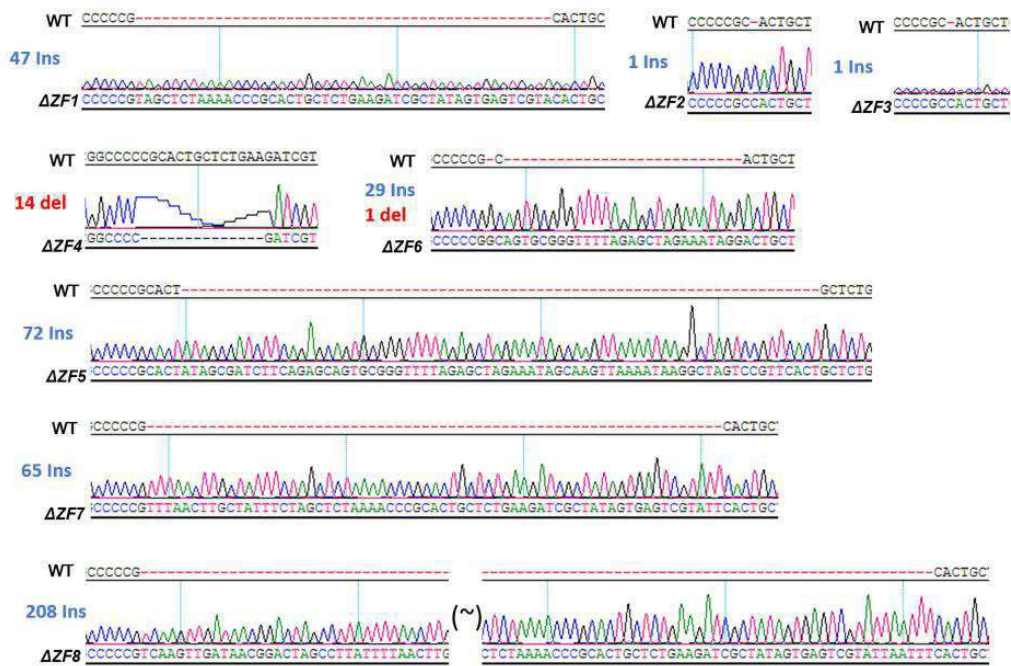
```

CGACTTCGGCCCCCG-----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA  WT
CGACTTCGGCCCCCG(ins)-ACTGCTCTGAAGATCGTGGA  +66
CGACTTCGGCCCCCGA----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA  +1
CGACTTCGGCCCC-----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA  -2
CGACTTCG-----GCTCTGAAGATCGTGGA  -11
    
```

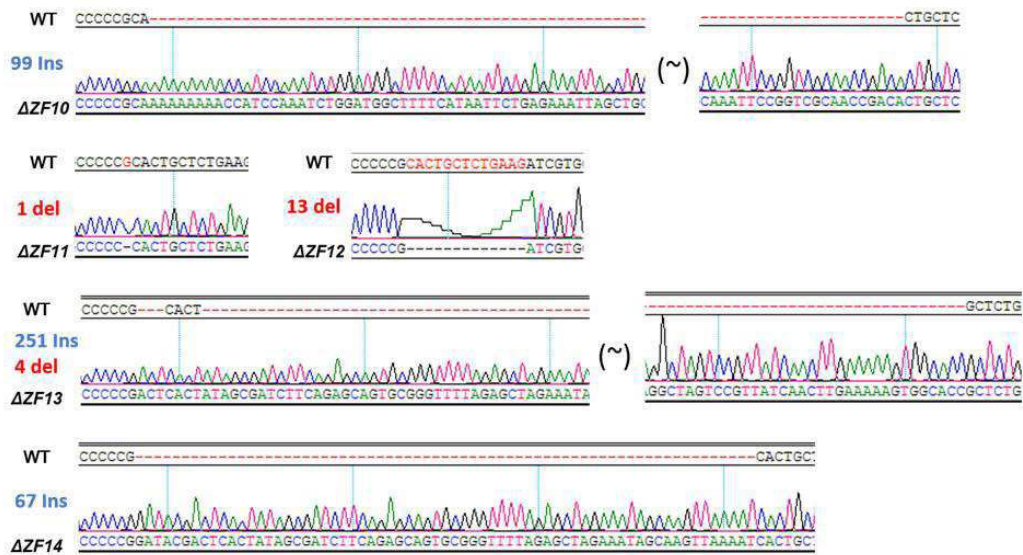
도면13



도면14a



도면14b



도면15

	Vio (fmol/cell)	An (fmol/cell)	Zea (fmol/cell)	Chl a/b ratio (fmol:fmol)	Total Chl (fmol/cell)
WT	0.2143 ± 0.0036	0.0046 ± 0.0002	0.0074 ± 0.0004	2.59 ± 0.15	2.29 ± 0.08
ZEP KO ΔZ1	Nd	Nd	0.2190 ± 0.0022	2.53 ± 0.12	1.80 ± 0.04
Double KO ΔZF1	Nd	Nd	0.1011 ± 0.0013	6.66 ± 0.45	0.49 ± 0.03
Double KO ΔZF2	Nd	Nd	0.1314 ± 0.0019	5.35 ± 0.62	0.64 ± 0.12
Double KO ΔZF3	Nd	Nd	0.1073 ± 0.0019	6.61 ± 0.03	0.46 ± 0.11
Double KO ΔZF4	Nd	Nd	0.1110 ± 0.0014	6.94 ± 0.39	0.46 ± 0.13
Double KO ΔZF5	Nd	Nd	0.1006 ± 0.0011	5.91 ± 0.01	0.56 ± 0.01
Double KO ΔZF6	Nd	Nd	0.0923 ± 0.0012	6.52 ± 0.35	0.55 ± 0.03
Double KO ΔZF7	Nd	Nd	0.1125 ± 0.0019	5.04 ± 1.15	0.55 ± 0.21
Double KO ΔZF8	Nd	Nd	0.0860 ± 0.0019	5.90 ± 0.49	0.43 ± 0.11
Double KO ΔZF9	Nd	Nd	0.0956 ± 0.0011	4.78 ± 1.29	0.52 ± 0.22
Double KO ΔZF10	Nd	Nd	0.1128 ± 0.0005	6.90 ± 0.57	0.52 ± 0.04
Double KO ΔZF11	Nd	Nd	0.1189 ± 0.0027	5.72 ± 0.07	0.51 ± 0.18
Double KO ΔZF12	Nd	Nd	0.1117 ± 0.0019	6.18 ± 0.01	0.48 ± 0.18
Double KO ΔZF13	Nd	Nd	0.0827 ± 0.0004	6.14 ± 0.17	0.54 ± 0.00
Double KO ΔZF14	Nd	Nd	0.1215 ± 0.0021	6.24 ± 0.09	0.56 ± 0.12

도면16

**a**

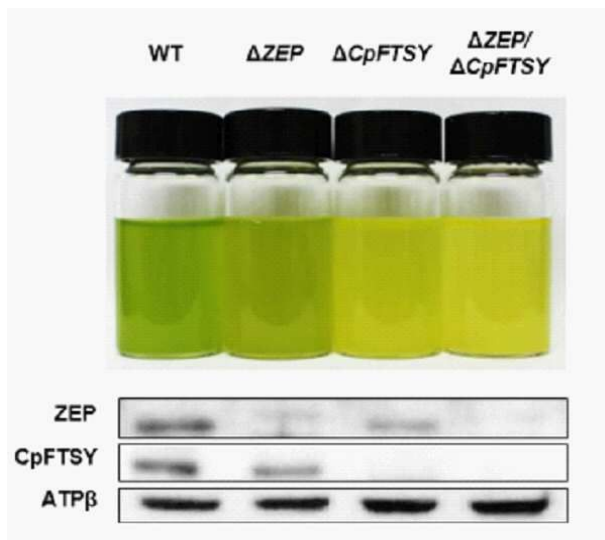
Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
CGA <b>ct</b> Ta <b>Cc</b> GAGCAGT <b>Gc</b> GG	4325	0	0	2688	0	0
CG <b>c</b> TCT <b>c</b> CA <b>t</b> AGCAG <b>c</b> G <b>Cg</b> GG	32231	5	0.016	32330	3	0.009
CG <b>c</b> T <b>Gt</b> TTCAG <b>c</b> G <b>Cg</b> AGT <b>Gc</b> T <b>G</b>	26676	0	0	31264	0	0
CG <b>G</b> TCTTCA <b>a</b> AGCAG <b>c</b> G <b>Cg</b> T	40491	0	0	27341	0	0

**b**

Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
<b>c</b> CCGGCGA <b>g</b> CGCAC <b>g</b> T <b>c</b> GAT	211	0	0	2913	0	0
T <b>Cc</b> T <b>Gc</b> GA <b>g</b> CGC <b>At</b> C <b>Gg</b> GAT	20930	2	0.01	24449	0	0
<b>c</b> CCGGCG <b>c</b> ACGCACC <b>c</b> G <b>c</b> AT	56426	0	0	56551	0	0
T <b>Cc</b> GGCGA <b>Ac</b> C <b>c</b> C <b>g</b> GG <b>c</b> AT	53307	0	0	42259	0	0
<b>a</b> CCGGCGA <b>g</b> G <b>Ct</b> C <b>a</b> TGGAT	31759	0	0	51013	0	0
T <b>Cc</b> GGCGA <b>c</b> T <b>g</b> ACCTGGA <b>a</b>	12944	0	0	27270	4	0.015
<b>c</b> T <b>Gg</b> C <b>a</b> AACGCAC <b>Tg</b> GA <b>c</b>	6127	0	0	42126	0	0
T <b>g</b> CGGCGA <b>Ac</b> C <b>t</b> gCTGG <b>T</b>	14289	0	0	35748	0	0
<b>g</b> CGGCG <b>g</b> ACGCAC <b>Tg</b> GG <b>T</b>	8634	0	0	53493	2	0.004
<b>c</b> CCGGCGA <b>c</b> CGCAC <b>Tg</b> C <b>a</b> c	6037	4	0.066	15948	0	0
T <b>Cc</b> c <b>Gg</b> c <b>Ac</b> CGCAC <b>Tt</b> G <b>t</b> T	24892	2	0.008	38987	0	0
T <b>Cc</b> GGC - AACGCACC <b>g</b> c <b>AT</b>	18402	109	0.592	35548	12	0.034
T <b>Cc</b> - GCGAACGC <b>g</b> a <b>CT</b> GGAT	27003	55	0.204	15568	12	0.077

도면17



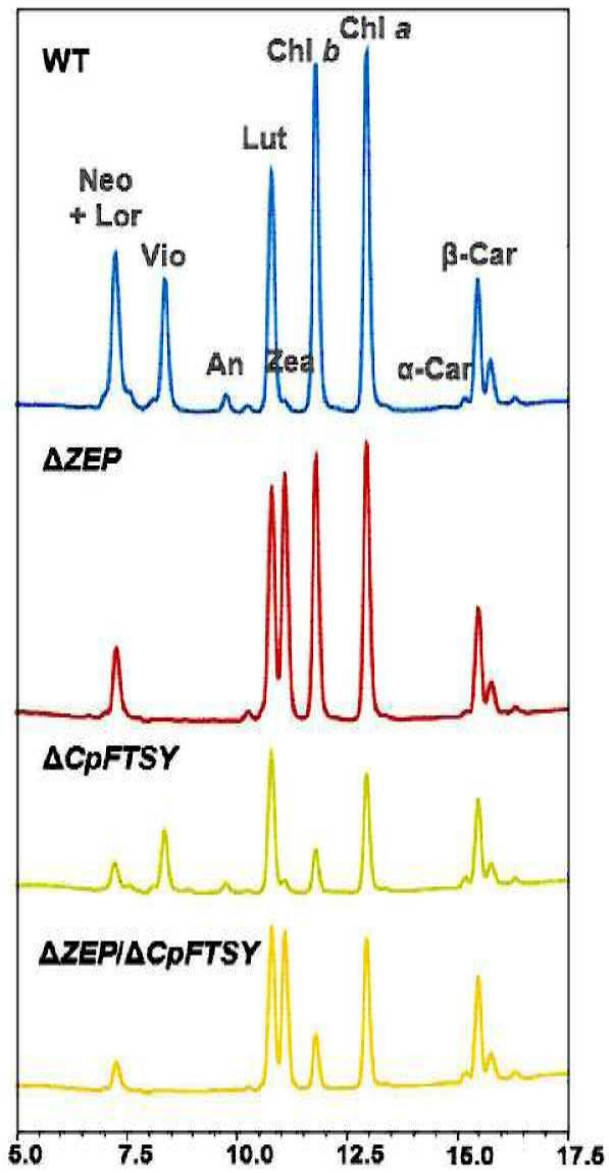
도면18

Name	Target site (5' to 3')*	Usage
FTSY_3_1st_for	ttgcacacaagaacgcatga	PCR target locus of <i>CpFTSY</i> gene
FTSY_3_1st_rev	ggcattggagtaaacgaccc	
FTSY_3_2nd_for	cgtcacctcgaatcacacac	
FTSY_3_2nd_rev	actaacacaccccaccccac	
ZEP_3_1st_for	ctacgtcgccttactgtgtg	PCR target locus of <i>ZEP</i> gene
ZEP_3_1st_rev	gattgcctactcaccactcg	
ZEP_3_2nd_for	ccagggtcaggctttgagc	
ZEP_3_2nd_rev	caacgctggctaaacatgct	

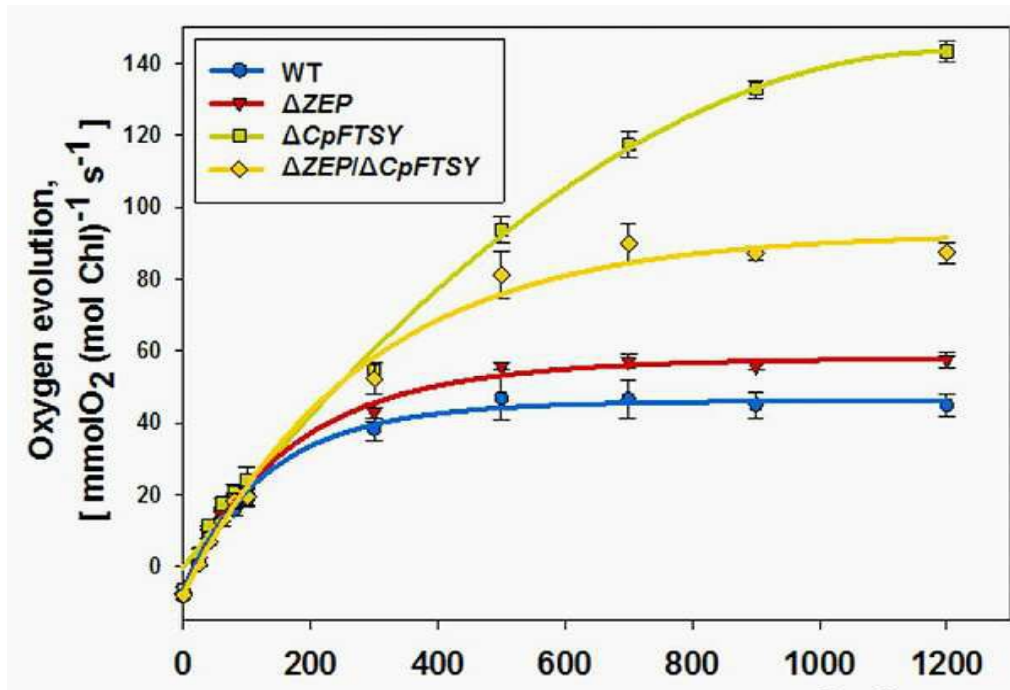
도면19

	<b>ZEP</b>	Ins/Del
<b>WT</b>	GTGGACCC-----ATCCAGGTGCGTTCGCCGGAACACC	-
<b>ΔZF6</b>	GTGGACCC( <i>ins</i> )-ATCCAGGTGCGTTCGCCGGAACACC	+42
	<b>CpFTSY</b>	
<b>WT</b>	TTCGGCCCCCG-----CACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	-
<b>ΔZF6</b>	TTCGGCCCCCG( <i>ins</i> )-ACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	+29/-1

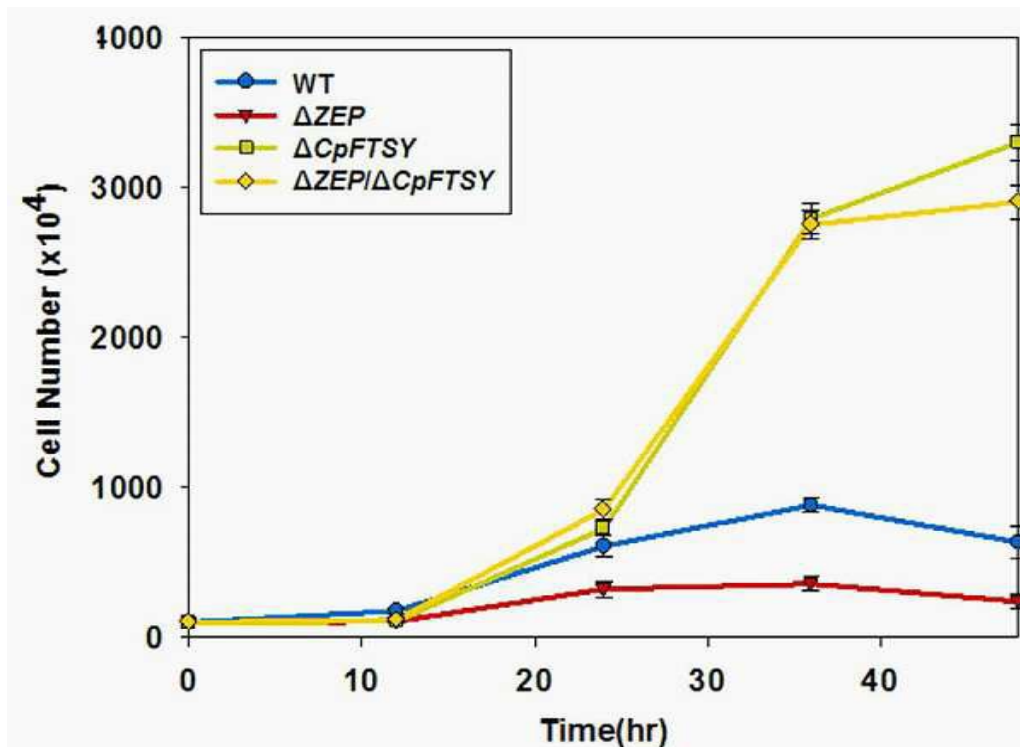
도면20



도면21



도면22



도면23

	WT	$\Delta ZEP$	$\Delta CpFTSY$	$\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$
Vio* (fmol per cell)	0.1043 ± 0.0010	ND	0.0551 ± 0.0003	ND
An* (fmol per cell)	0.0085 ± 0.0002	ND	0.0033 ± 0.0002	ND
Zea* (fmol per cell)	0.0062 ± 0.0005	0.1376 ± 0.0007	0.0056 ± 0.0002	0.0827 ± 0.0009
Total Chl* (fmol per cell)	1.66 ± 0.01	1.41 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.60 ± 0.01
Chl a/b ratio* (fmol:fmol)	2.24 ± 0.02	2.27 ± 0.02	6.22 ± 0.15	6.14 ± 0.09
Quantum yield (relative units)	100 ± 3.63	109.05 ± 14.36	117.09 ± 8.10	109.85 ± 8.59
$P_{max}$ (mmol oxygen (mol Chl) <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	48.93 ± 0.76	61.4 ± 2.12	143.28 ± 3.24	94.77 ± 2.21

도면24

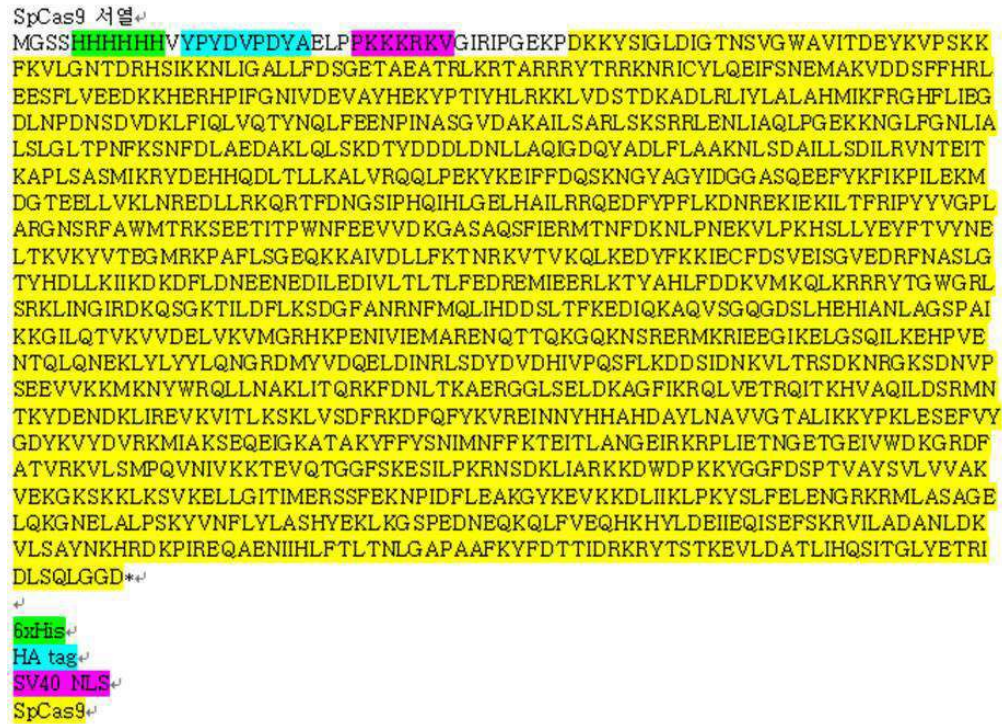
a

Incubation time	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
Wild type	123297	0	0
12 hours	18632	41	0.22
24 hours	89561	167	0.186

b

Cas9 (μg)	sgRNA (μg)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
10	7	82281	106	0.129
20	14	87575	2	0.002
50	35	91789	2	0.002
100	70	129210	103	0.08
200	140	131282	741	0.564
500	350	130709	7	0.005

도면25



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Hanyang University
  - <120> Method for gene editing in microalgae using RGEN RNP
  - <130> P16U10C2154
  - <150> KR 10-2016-0049439
  - <151> 2016-04-22
  - <160> 12
  - <170> KopatentIn 2.0
  - <210> 1
  - <211> 96
  - <212> RNA
  - <213> Artificial Sequence
  - <220><223> CpFTSY RGEN1
  - <400> 1
- |   |    |
|---|----|
| aauugcggcgug cgcccgagcug guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc | 60 |
| cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc                               | 96 |
- 
- <210> 2
  - <211> 96

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CpFTSY RGEN2  
 <400> 2  
 cuaggcgcug caggaagccg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
 <210> 3  
 <211> 96  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CpFTSY RGEN3  
 <400> 3  
 cgaucuucag agcagugcgg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
  
 <210> 4  
 <211> 96  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CpFTSY RGEN4  
 <400> 4  
 uuguggagcu gcugacggca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Chlamydomonas reinhardtii CC-4349  
 <400> 5  
 cccccgact gcttgaagat cg 22  
 <210> 6  
 <211> 96  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> ZEP RGEN1

<400> 6  
caccagcugc gcgaccgagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
<210> 7  
<211> 96  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ZEP RGEN2  
<400> 7  
gccguugcac uucugaagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
<210> 8  
<211> 96  
<212> RNA  
<213>  
> Artificial Sequence  
<220><223> ZEP RGEN3  
<400> 8  
uccggcgaac gcaccuggau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
<210> 9  
<211> 96  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ZEP RGEN4  
<400> 9  
uggugggcgc cgacggcauc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96  
<210> 10  
<211>  
96  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ZEP RGEN5  
<400> 10

ccauggcuuc gcaggcaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60  
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96

<210> 11  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Chlamydomonas reinhardtii CC-4349  
 <400> 11

cccatccagg tgcgttcgcc gga 23

<210> 12  
 <211> 1406  
 <212> PRT  
 <213> CAS9 protein  
 <400> 12

Met Gly Ser Ser His His His His His Val Tyr Pro Tyr Asp Val  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Tyr Ala Glu Leu Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile  
 20 25 30  
 Arg Ile Pro Gly Glu Lys Pro Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp  
 35 40 45  
 Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys  
 50 55 60  
 Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr  
 85 90 95  
 Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg  
 100 105 110  
 Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met  
 115 120 125  
 Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu  
 130 135 140  
 Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile

145                      150                      155                      160  
 Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu  
                                  165                      170                      175  
 Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile  
                                  180                      185                      190  
 Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile  
                                  195                      200                      205  
 Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile  
  
                                  210                      215                      220  
 Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys  
                                  245                      250                      255  
 Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys  
                                  260                      265                      270  
 Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro  
                                  275                      280                      285  
  
 Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu  
                                  290                      295                      300  
 Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile  
 305                      310                      315                      320  
 Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp  
                                  325                      330                      335  
 Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys  
                                  340                      345                      350  
 Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln  
  
                                  355                      360                      365  
 Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys  
                                  370                      375                      380  
 Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr  
 385                      390                      395                      400  
 Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro



Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu  
 660 665 670  
 Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln  
 675 680 685  
 Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu  
 690 695 700  
 Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe  
 705 710 715 720  
  
 Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His  
 725 730 735  
 Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser  
 740 745 750  
 Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser  
 755 760 765  
 Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu  
 770 775 780  
 Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu  
  
 785 790 795 800  
 Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg  
 805 810 815  
 Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln  
 820 825 830  
 Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys  
 835 840 845  
 Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln  
 850 855 860  
  
 Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val  
 865 870 875 880  
 Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr  
 885 890 895  
 Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu  
 900 905 910

Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys  
 915 920 925

Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly  
 930 935 940

Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val  
 945 950 955 960

Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg  
 965 970 975

Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys  
 980 985 990

Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe  
 995 1000 1005

Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp  
 1010 1015 1020

Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro  
 1025 1030 1035 1040

Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val  
 1045 1050 1055

Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala  
 1060 1065 1070

Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile  
 1075 1080 1085

Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn  
 1090 1095 1100

Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr  
 1105 1110 1115 1120

Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr  
 1125 1130 1135

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg  
 1140 1145 1150

Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys

1155                      1160                      1165  
 Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val  
 1170                      1175                      1180  
 Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu  
 1185                      1190                      1195                      1200  
 Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro  
                             1205                      1210                      1215  
 Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu  
  
                             1220                      1225                      1230  
 Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg  
                             1235                      1240                      1245  
 Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu  
                             1250                      1255                      1260  
 Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr  
 1265                      1270                      1275                      1280  
 Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe  
                             1285                      1290                      1295  
  
 Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser  
                             1300                      1305                      1310  
 Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val  
                             1315                      1320                      1325  
 Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala  
                             1330                      1335                      1340  
 Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala  
 1345                      1350                      1355                      1360  
 Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser  
  
                             1365                      1370                      1375  
 Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly  
                             1380                      1385                      1390  
 Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
                             1395                      1400                      1405