

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0152280
(43) 공개일자 2024년10월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8247 (2013.01)
A01H 1/10 (2024.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0138214(분할)
 (22) 출원일자 2024년10월11일
 심사청구일자 2024년10월11일
- (62) 원출원 특허 10-2021-0134852
 원출원일자 2021년10월12일
 심사청구일자 2021년10월12일
- (30) 우선권주장
 1020210108328 2021년08월17일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 세종대학교산학협력단
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
- (72) 발명자
 김현욱
 서울특별시 중랑구 용마산로129가길 41, 102동 901호(신내동, 영풍마드레빌)
- 박민음
 서울특별시 광진구 광나루로15길 61, 305호(군자동)
- 윤재영
 대전광역시 유성구 엑스포로123번길 26-30, 101동 1402호(도룡동)
- (74) 대리인
 특허법인리체

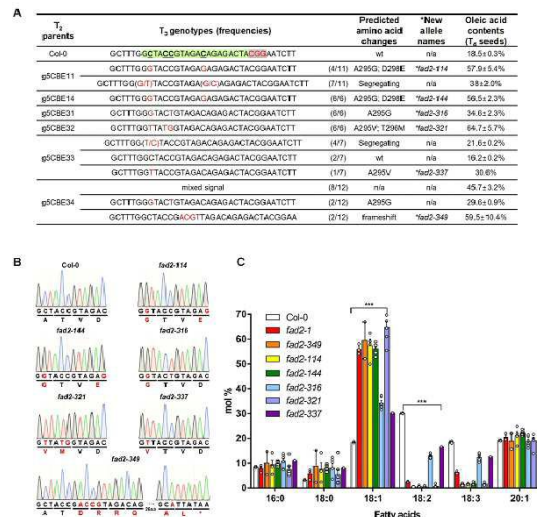
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 FAD2 단백질의 295번째 아미노산이 발린인 고올레인산 함유 종자를 생성하는 식물체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 고올레인산 종자를 생성하면서도 성장 결함의 부작용이 완화된 식물체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A01H 5/10 (2022.05)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12N 9/0071 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067436
과제번호	PJ015714012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	유전자 제어 기술을 활용한 지방산 고생산 플랫폼 개발(1주관)
기 여 율	6/10
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133387
과제번호	2021R1A2C1011674
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	식물체 CRISPR/BE 염기교정 라이브러리 스크린 개발을 통한 기능유전체학 연구와 정밀분자육종기술 고도화
기 여 율	2/10
과제수행기관명	서울대학교(평창캠퍼스)
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395066873
과제번호	PJ015326012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신육종 기반기술 개발사업
연구과제명	애기장대 기반 염기교정 기술의 고도화 및 벼 염기 교정 기술의 최적화
기 여 율	2/10
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

FAD2 단백질을 발현하고, 상기 단백질은 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열로 이루어지며, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val인 식물체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1에서 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Met인 식물체.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 식물체는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 쌀겨, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 애기장대, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스퀘렐라, 피마자 또는 옥수수인, 식물체.

청구항 4

청구항 1의 식물체가 생성한 종자.

청구항 5

식물체에서 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열로 이루어지는 FAD2 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val으로 치환된 단백질을 코딩하도록 상기 유전자를 변이시키는 단계를 포함하는 식물체의 제조 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 변이된 식물체 중, 서열번호 1에서 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Met인 단백질을 발현하는 식물체를 선별하는 단계를 더 포함하는 식물체의 제조 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 치환은 서열번호 2의 gRNA를 사용하여 수행되는 식물체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고올레인산 함유 종자를 생성하는 식물체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물성 기름은 식물의 종자나 과실에서 짜낸 기름으로, 식용으로 활발하게 사용되며 그 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 식물성 기름은 저장 안정성을 높이고 산패를 방지하기 위한 측면에서 식물성 기름에 포함된 지방산의 불포화도를 낮추는 것이 선호된다.

[0003] 이와 관련하여, 식물체의 FAD2(Fatty Acid Desaturase 2) 유전자는 단일불포화 지방산인 올레인산을 다중불포화 지방산인 리놀레산으로 전환하는 역할을 하므로, 상기 FAD2 유전자의 기능을 억제하여 올레인산 함량이 증가된 종자를 얻으려는 시도가 있어왔다.

[0004] 예를 들면, 땅콩, 대두에서 활성인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALENs)를 사용하여 FAD2 유전자를 녹아웃 시키거나, 땅콩, 대두 및 동백나무에서 CRISPR/Cas9을 이용하여 유전자를 녹아웃 시킨 사례가 있으나, 종래 기술에서 얻어진 FAD2 유전자 돌연변이는 식물체에서 성장 결함이 나타나 농경학적인 목적에서 활용에 어려움이 크다.

[0005] 이와 관련하여, 한국특허 제2117110호에서도 CRISPR-Cas9을 이용하여 콩(Glycine max L.)의 올레인산 함량을 증가시킨 FAD2 유전자에 돌연변이를 기재하고 있으나, 성장 결함 부작용을 개선하는 효과에 대해서는 기재하고 있지 않다.

[0006] 따라서, 올레인산 함량이 증가된 종자를 생성하면서도 이러한 부작용을 갖지 않는 새로운 식물체의 개발이 절실하다.

[0007]

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국특허 2117110호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 고올레인산 종자를 함유하는 새로운 형질전환 식물체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. FAD2 단백질을 발현하고, 상기 단백질은 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열로 이루어지며, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly 또는 Val인 식물체.

[0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly이고, 298번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Glu인 식물체.

[0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val이고, 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Met인 식물체.

[0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 식물체는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 쌀겨, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 애기장대, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스케텔라, 피마자 또는 옥수수인, 식물체.

[0015] 5. 위 1의 식물체가 생성한 종자.

[0016] 6. 식물체에서 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열로 이루어지는 FAD2 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly 또는 Val으로 치환된 단백질을 코딩하도록 상기 유전자를

변이시키는 단계를 포함하는 식물체의 제조 방법.

- [0017] 7. 위 6에 있어서, 상기 변이된 식물체 중, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly이고, 298번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Glu인 단백질을 발현하는 식물체를 선별하는 단계를 더 포함하는 식물체의 제조 방법.
- [0018] 8. 위 6에 있어서, 상기 변이된 식물체 중, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val이고, 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Met인 단백질을 발현하는 식물체를 선별하는 단계를 더 포함하는 식물체의 제조 방법.
- [0019] 9. 위 6에 있어서, 상기 치환은 서열번호 2의 gRNA를 사용하여 수행되는 식물체의 제조 방법.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 식물체는 고올레인산 함유 종자를 생성하면서도 FAD2 유전자가 녹아웃 된 경우보다 성장 결함이 완화되어 식물유지 사업 분야에 이용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 방법을 이용하여 고올레인산 함유 종자를 생성하면서도 FAD2 유전자가 녹아웃 된 경우보다 성장 결함이 완화된 식물체를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 애기장대 외 다른 유료작물들(oil crops)의 FAD2 아미노산 서열을 비교한 것으로, 단백질 얼라인먼트는 g5 영역을 중심으로 MEGA7 프로그램의 ClustalW를 이용하여 수행되었다. 빨간색 상자는 본 발명에서 염기편집된 부분(base editing window)을 나타낸다. At는 *Arabidopsis thaliana*, Ca는 *Corylus avellana*, Ec는 *Eucalyptus camaldulensis*, Gm는 *Glycine max*, Os는 *Oryza sativa*, Pf는 *Physaria fendleri*, Rc는 *Ricinus communis*, Zm는 *Zea mays*을 의미한다.
- 도 2는 애기장대 외 다른 유료작물들(oil crops)의 FAD2 유전자의 염기 서열을 비교한 것으로, 본 발명에서 염기편집된 애기장대의 2번째 cytosine, 12번째 cytosine 부위가 다른 작물에서도 보존되어 있음을 보여준다.
- 도 3에서 a는 지방산의 불포화에서 본 발명의 염기편집 대상인 FAD2의 기능을 도식화하여 나타낸 것이다. FAD2는 소포체(ER)에 위치하며 6개의 막 통과 도메인과 3개의 히스티딘 상자 모티프(His)를 포함한다. b는 본 발명에서 CBE 및 ABE를 포함하는 바이너리 벡터의 T-DNA에서 CRISPR 부분의 핵심 구조를 나타낸다. c는 FAD2 단백질 구조의 개략도를 나타낸 것이다. 빨간색 점은 염기편집 대상 영역을 나타낸다. d는 *Arabidopsis* FAD2 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 초록색 서열은 막 관통 부위를 나타내고, 빨간색 서열은 His 모티프이며, 빨간색 선은 해당 gRNA를 통한 염기편집 표적화로부터 영향을 받는 잠재적 아미노산을 나타낸다. e는 본 발명에서 FAD2 편집을 위한 프로토스페이서 서열이 있는 CBE 및/또는 ABE에 사용된 선택된 gRNA의 목록을 나타낸다.
- 도 4는 pJY-RpAID binary vector를 도식화한 것이다.
- 도 5의 a는 T₂ 식물체의 편집 창(editing window) 내에서 FAD2 유전자형에 대한 생어 시퀀싱 결과를 나타낸다. 상기 편집 창은 상단의 Col-0 패널에 나타나 있으며, 빨간색 문자는 변경된 DNA 및 아미노산 서열을 의미한다. b는 형질전환된 계통의 지방산 조성을 분석한 표이다. 빨간색 숫자는 분석된 T₂ 식물체 중에서 올레인산 함량이 가장 높게 나타난 경우를 표시한 것이다. *는 T₃ 세대로 진행된 대표적인 T₂ 형질전환 계통을 나타낸다.
- 도 6은 g5CBE11 내지 17, g5CBE31 내지 35의 T₁ 식물체의 시퀀싱 결과이다. 빨간색 화살표는 FAD2 유전자에서 변화된 서열을 나타낸다.
- 도 7의 a는 T₃ 분리된 패턴을 요약한 것이며, 각 유전자형에 따른 올레인산의 함량을 분석하여 나타내었다. 초록색 및 회색 음영으로 표시된 문자는 각각 프로토스페이서 시퀀스 및 PAM 시퀀스를 나타낸다. 빨간색 문자는 변경된 DNA 서열을 나타낸다. b는 FAD2 대립유전자의 편집 창 내에서 FAD2 유전자형 분석에 대한 생어 시퀀싱 결과를 나타낸 크로마토그램 결과이다. 빨간색 문자는 변경된 DNA 및 아미노산 서열을 나타낸다. c는 새로운 FAD2 대립유전자, FAD2-1 및 Col-0의 T4 종자 간의 지방산 조성을 비교한 것이다. 양방향 ANOVA 통계 분석을 사용하

여 Col-0 및 FAD2 대립유전자 간의 차이를 식별했으며(*** $p < 0.001$), 값은 평균 $\pm$ sd를 나타낸다.

도 8은 T₃ 식물체의 FAD2 유전자의 생어 시퀀싱 결과를 나타낸다. * 표시는 본 발명에서 분리한 새로운 대표 대립유전자를 의미한다.

도 9 및 10은 약화된 FAD2 대립유전자의 생리학적 반응 분석 결과를 나타낸다. 도면의 a는 1/2 MS, b는 1/2 MS; 150mM NaCl, c는 MS; 300mM 만니톨 조건에서 수행된 FAD2 대립유전자에 대한 발아 시험 결과이며, a-c는 올레인산 함량의 증가가 정상 및 스트레스 조건 모두에서 발아에 영향을 미치는지 여부를 테스트하기 위해서 진행하였으며 파종 후 96시간이 경과한 후를 확인한 사진이다. 발아율은 12시간마다 측정하였고 3반복으로 진행하였다. d 내지 f의 경우, 묘목을 1/2 MS에서 4일 동안 성장시킨 후 5일 동안 뿌리 발달이 이루어지도록 정상 및 스트레스 조건에서 FAD2 대립형질의 뿌리 성장 속도 분석한 결과이다. d는 실험 조건에서 5일 동안 자란 묘목의 뿌리 길이를 식별하기 위해 촬영한 사진이며, e는 다양한 조건에서 뿌리 길이를 나타내는 그래프, f는 75mM NaCl 및 200mM 만니톨 조건에서 상대적인 뿌리 길이를 나타내는 그래프이다. 1/2MS에서 뿌리 길이를 100%로 설정하고, 모든 값은 평균 $\pm$ sd으로 나타났다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명에서는 FAD2 단백질 전체 구조를 기반으로 다양한 유전자 변형 위치를 선정하고, 각 위치에서 다양한 유전자 변형을 시도하여 FAD2 단백질의 기능이 "약화된" 식물체를 얻었다.
- [0026] 본 발명에서 FAD2 단백질의 기능이 약화된 식물체란, FAD2 단백질의 기능이 완전히 소실되지 않은 식물체를 의미하며, 예를 들면 FAD2 단백질의 기능 중 일부 기능이 약화되고, 다른 기능은 약화되거나 유지된 식물체를 의미한다.
- [0027] 즉, 본 발명에서는 FAD2 단백질을 코딩하는 유전자가 단순히 녹아웃되지 않은 식물체를 얻기 위하여 FAD2 단백질의 여러 위치를 타겟으로 정교한 아미노산 변형을 수행하였으며, 그 결과 FAD2 단백질의 올레인산 변환 기능이 약화되어 고올레인산을 함유하는 종자를 생성하면서도, FAD2 단백질의 염 스트레스에 대한 저항 기능을 완전히 소실하지 않아 성장 결함의 부작용이 개선된 식물체를 얻어 본 발명을 완성하였다.
- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명은, FAD2 단백질을 발현하고, 상기 단백질은 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열로 이루어지며, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly 또는 Val인 식물체에 관한 것이다.
- [0032] 상기 FAD2(Fatty Acid Desaturase 2) 단백질은 지방산 불포화효소의 일종으로, 식물체에서 불포화 지방산 올레인산(18:1^{Δ9})을 리놀레산(18:2^{Δ9,12})으로 합성하는데 관여한다.
- [0033] 상기 "지방산"은 1개의 카복시기(-COOH)를 가지는 탄화수소 사슬을 의미한다. 자연 상태의 지방산은 대부분 4 내지 36개 정도의 정수 개 탄소를 가지며, 지방산은 사슬의 포화(또는 탄소-탄소 이중결합) 여부에 따라 포화 또는 불포화 지방산으로 나눌 수 있다.
- [0034] 상기 "포화 지방산"은 단일결합으로 이루어진 지방산을 의미하며, "불포화 지방산"은 하나 이상의 탄소간 이중결합을 포함하는 지방산을 의미한다. 불포화 지방산은 탄소-탄소 이중결합이 시작하는 위치에 따라 오메가-3 지방산, 오메가-6 지방산, 오메가-7 지방산, 오메가-9 지방산으로 분류될 수 있으며, 예를 들면 오메가-9 지방산은 탄소사슬 끝에서 아홉 번째 탄소에서부터 이중결합이 시작되는 불포화 지방산을 의미한다.
- [0035] 식물성 기름에는 두 가지 포화지방산 팔미트산(16:0) 및 스테아르산(18:0)이 포함되며, 세 종류의 불포화 지방산 올레인산(18:1^{Δ9}), 리놀레산(18:2^{Δ9,12}) 및 리놀렌산(18:3^{Δ9,12,15})이 포함된다.
- [0036] 상기 "올레인산"은 오메가-9 불포화 지방산으로, 대부분 동식물유 속에 함유되어 있고, 특히 동백 기름, 올리브유 등의 유지류의 주성분이다.
- [0037] 본 발명에서 FAD2가 합성에 관여하는 리놀레산(18:2^{Δ9,12})은, 오메가-6 지방산이며 식물체를 통해 섭취해야 하는 사람의 필수 지방산들 중 하나이다.

- [0038] 식물체에서 상기 FAD2의 기능을 억제함으로써 생성된 종자의 올레인산 함량을 높일 수 있고, 상기 리놀레산은 올레인산과 비교하여 쉽게 산화되는 성질이 있으므로, 고올레인산을 함유한 종자에서 생성된 식물성 기름은 저장안정성이 높다.
- [0039] 한편, 식물에서 FAD2 단백질의 활성은 디엔산의 함량 증가와 관련되어 추위와 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키며, 살리실산(SA), 산화효소, 압시스산, 자스몬산(JA) 경로에 관여하므로, FAD2 단백질을 단순히 녹아웃시키는 경우에는 성장 결함의 문제가 발생하게 된다.
- [0040] 서열번호 1은 본 발명의 실시예에서 사용된 모델 식물인 애기장대(Arabidopsis)의 전장 FAD2 단백질 서열을 나타낸 것이다.
- [0041] 상기 "대응되는 서열"은 두 서열을 배열(alignment)하였을 때 다른 서열에서 대응되는 서열을 의미하며, 상기 "대응되는 위치"는 상기 서열을 대응되는 서열과 배열(alignment)하였을 때 대응되는 위치를 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 도 1 및 도 2에서와 같이 상기 애기장대의 FAD2 유전자 또는 단백질 서열을 여러 식물종의 FAD2 유전자의 염기서열 또는 단백질 서열과 배열하여 대응하는 위치를 확인할 수 있다. 상기 FAD2 단백질 서열은 식물 종 사이에서 서열의 보존성이 높은 서열이며, 구체적으로 본 발명에서 염기편집 대상이 된 서열번호 1의 295번째, 296번째 및 298번째 아미노산 A,T 및 D가 여러 식물체에서 동일하게 보존되어 있음을 도 1 및 도 2에서 확인할 수 있다.
- [0042] 상기 식물체는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 쌀겨, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 애기장대, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스퀘렐라, 피마자 또는 옥수수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명은 상기 단백질은 서열번호 1에서 상기 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly일 때 298번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Glu인 식물체를 포함한다.
- [0044] 본 발명은 상기 단백질은 서열번호 1에서 상기 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val일 때 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Met인 식물체를 포함한다.
- [0045] 본 발명은 상기 식물체가 생성한 종자를 포함한다.
- [0046] 상기 식물체는, FAD2 단백질을 발현하는 식물체이며, FAD2 단백질 서열이 전술한 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly 또는 Val인 식물체, 서열번호 1에서 상기 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly일 때 298번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Glu인 식물체, 또는 서열번호 1에서 상기 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val일 때 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Met인 식물체를 의미한다.
- [0047] 상기 종자는 올레인산 함유 비율이 높다. 예를 들면, 야생형 종자는 종자의 전체 지방산 무게에서 올레인산 함량이 일반적으로 20 wt.%이하이나, 본 발명의 식물체에서 생성된 종자는 올레인산 함량이 30 내지 65 wt.%로 현저히 높았다.
- [0048] 또한, 본 발명은 식물체에서 서열번호 1의 서열에 대응되는 서열로 이루어지는 FAD2 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly 또는 Val으로 치환된 단백질을 코딩하도록 상기 유전자를 변이시키는 단계를 포함하는 식물체의 제조 방법을 포함한다.
- [0049] 상기 식물체는 FAD2 단백질을 발현하는 식물체이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 쌀겨, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 애기장대, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스퀘렐라, 피마자 또는 옥수수일 수 있다.
- [0050] 상기 유전자 변이는, 예를 들면 FAD2 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA의 염기 서열을 변형하는 것일 수 있으며, 상기 변형 방법은 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있는 방법이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0051] 상기 "염기 서열"은 DNA 또는 RNA의 기본단위 뉴클레오타이드의 구성 성분 중 하나인 염기들을 순서대로 나열해 놓은 것을 말한다. 상기 염기가 일렬로 3개씩 모이면 하나의 트리플렛 코드(Triplet code)를 형성하여 하나의 아미노산을 지정한다. 이 트리플렛 코드들이 여러 개 모이면 궁극적으로 하나의 단백질을 지정하게 되므로, 염기가 3개씩 모이면 트리플렛 코드를 형성하여, 단백질 서열로 변환된다. 따라서, 예를 들면 서열번호 1의 295번째 아미노산 Ala은, 이를 코딩하는 DNA 염기 서열 "GCT"를 "GGT"로 변형함으로써 Gly로 치환되거나, "GTT"로 변형함으로써 Val으로 치환될 수 있다. 또한, 서열번호 1의 296번째 아미노산 Thr은 이를 코딩하는 DNA

염기 서열 “ACC” 을 “ATG” 로 변형함으로써 Met으로 치환될 수 있고, 서열번호 1의 298번째 아미노산 Asp은 이를 코딩하는 DNA 염기 서열 “GAC” 를 “GAG” 또는 “GAA”로 변형함으로써 Glu로 치환될 수 있다.

- [0052] 상기 염기 서열의 변형은 "형질 전환" 방법에 의한 것일 수 있다. 형질 전환은 원래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 유전자가 포함된 DNA 사슬 조각, 플라스미드 같은 벡터가 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합하여 유전형질을 변화시키는 것을 말한다.
- [0053] 식물의 형질 전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질 전환 방법은 본 발명에 따른 재조합 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens et al., 1982, Nature 296: 72-74; Negrotti et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8: 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3: 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al., 1987, Nature 327: 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질 전환에 의한 아그로박테리움 투파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.
- [0054] 상기 식물의 형질 전환에 이용되는 "식물 세포"는 특별히 제한되지 않으며, 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물의 세포일 수 있고, 상기 조직은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0055] 상기 형질 전환은, 재조합 벡터를 이용하여 식물체의 세포를 형질전환하고, 상기 형질 전환된 식물체 세포로부터 형질 전환 식물체 세포를 재분화하는 단계를 포함할 수 있다. 형질 전환 식물체 세포로부터 형질 전환 식물체 세포를 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다(Perez-Garcia, P., Moreno-Risueno, M. A. (2018) Stem cells and plant regeneration. Developmental Biology, 442: 3-12, Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A. 등 (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development (Cambridge, England), 143: 1442-51).
- [0056] 상기 "재조합 벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 또한, 본 발명에서 바이너리 벡터(Binary Vector)란 두 개의 벡터 system에 걸쳐서 기능을 발휘하도록 고안된 벡터로, 식물 형질전환에 사용되는 아그로박테리아의 Ti-plasmid는 그 크기 때문에 조작이 어려워 이를 두개의 리플리콘에 나누어 이용하는데 그 하나에는 vir 유전자들이 들어 있고 나머지 유전자들은 다른 리플리콘에 있게하여 조작을 쉽게한다.
- [0057] 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등과 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 유전자 편집 기술을 매개하는 것일 수 있으며, 예를 들어 BEs(Base Editors), 징크핑거 뉴클레이즈(ZFNs), 탈렌(TALENs), CRISPR/Cas9 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 바람직하게는, 전술한 염기 치환은 CRISPR/Cas9으로부터 개발된 기술인 BEs(Base Editors)을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 BEs는 표적 부위에 두 가닥 절단(DSBs) 없이 C-to-T(사이토신을 티민으로 치환) 또는 A-to-G(아데닌을 구아닌으로 치환)의 염기편집을 유도할 수 있으므로, 표적 부위에 정밀한 돌연변이를 일으키기 위한 방법으로 광범위하게 사용된다.
- [0060] BEs는 Nickase Cas9(nCas9)을 사이토신 디아미네이즈 또는 아데닌 디아미네이즈와 융합하여 개발된 기술이며, 이를 각각 사이토신 염기 편집기(CBE; conversion C to T) 또는 아데닌 염기 편집기(ABE; conversion A to G)라 한다. BEs는 아미노산의 변화 또는 스플라이싱의 개조를 일으킬 수 있고, 두 개의 CBE 시스템, base editor 3(BE3) 및 activation-induced cytidine deaminase(AID)은 cytidine deaminase 도메인으로 쥐의 rAPOBEC1 및 바다 칠성장어의 PmCDA1이 적용되었다.
- [0061] 상기 유전자 편집의 표적 부위는 "gRNA(guide RNA)"에 의하여 특정될 수 있다. gRNA는 DNA 중에 어떤 부분을 변형할 것인지 안내하는 가이드 역할을 하는 RNA로, 표적 서열에 상보적 결합이 가능하므로, CRISPR가 이러한 RNA

의 특성을 활용하여 표적 서열에 결합할 수 있다.

- [0062] 상기 CRISPR 유전자 가위가 작동하기 위해서는 표적 서열에 인접하여 PAM(Protospacer-Adjacent Motif) 서열이 필요할 수 있으며, 상기 PAM 서열은 NGG(N은 A, T, G 및 C 중 임의의 염기서열을 의미한다.) 형태일 수 있다.
- [0063] 상기 "CRISPR/Cas9"이란 3세대 유전자 가위의 한 종류이며, "gRNA"와 DNA를 절단하는 효소인 "Cas9"으로 이루어져 있다. CRISPR는 박테리아와 고세균과 같은 원핵생물 유기체의 게놈에서 발견되는 DNA 서열이다. Cas9은 CRISPR 서열에 상보적인 DNA의 특정 줄기를 인식하고 절단하기 위하여 가이드로서 CRISPR 서열을 사용하는 효소이다. 여기서 gRNA는 DNA의 이중 나선을 절단하는 제한효소인 Cas9과 복합체를 형성한다. 유전자를 조작하고 싶은 부분에 이 효소를 넣으면 목표한 DNA 서열을 찾아내 Cas9가 DNA를 절단한다. 세포는 DNA가 절단되었을 때, 복구하는 기능을 가지고 있다. 이 과정이 반복되면 "복구 오류"가 나타나고 원래의 서열과 몇 개의 염기에서 차이를 보이게 된다. 이러한 차이가 생기면 CRISPR는 작동을 멈추고, 복구 오류로 변화된 서열은 원래의 기능을 발휘하지 못하게 된다.
- [0064] 이런 식으로 절단하고자 하는 유전자를 정확하게 찾아내, 녹아웃 시키는 것이 가능해지며, 또한 이 기술을 활용해 절단뿐만 아니라 원하는 곳에 유전자를 추가할 수 있다. CRISPR/Cas9과 함께 새롭게 추가하고 싶은 DNA 서열을 넣으면, 세포가 절단된 부분을 복구하는 과정에서 추가된 DNA 서열을 흡수하게 된다.
- [0065] 결과적으로, CRISPR/Cas9은 표적 부위에 무작위로 형성된 삽입 또는 결실(indel)이 생성되어 기능 상실 대립유전자(유전자 녹아웃)를 초래할 가능성이 높으므로, 본 발명의 실시예에서는 전술한 BEs를 사용하여 형질 변환을 수행하였다.
- [0066] 본 발명에서 상기 치환은 서열번호 2의 gRNA를 사용하여 수행될 수 있다. gRNA에 대한 설명은 전술하였으므로 중복 기재를 피하기 위하여 생략한다. 구체적으로, 상기 서열번호 2의 gRNA는 FAD2 단백질의 295번째 내지 298번째 아미노산을 코딩하는 유전자에 상보적으로 결합할 수 있으며, 따라서 본 발명에서 타겟으로 하는 아미노산 위치의 변형을 유도할 수 있다.
- [0067] 상기 gRNA는 유전자 편집을 위해 도입하는 재조합 벡터에 이용될 수 있으며, 예를 들면 본 발명의 도 3b로 표시되는 벡터의 sgRNA(single guide RNA) 일 수 있다. 상기 벡터에서 gRNA의 발현은 U6 프로모터에 의해 제어되며, AIDv2 의존성 CBE 및 ABE7.10은 RPS5A 프로모터에 의해 제어된다.
- [0068] 또한, 본 발명은 상기 변이된 식물체 중, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Gly이고, 298번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Glu인 단백질을 발현하는 식물체를 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0069] 또한, 본 발명은 상기 변이된 식물체 중, 서열번호 1에서 295번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산이 Val이고, 296번째 위치에 대응되는 위치의 아미노산은 Met인 단백질을 발현하는 식물체를 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 선별 방법은 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있는 방법이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 전술한 치환이 일어난 유전자 또는 단백질에 상보적인 조각을 이용하여 대상 식물체를 검출하거나, 대상 식물체의 서열 분석 방법에 의하여 상기와 같은 치환이 일어난 유전자 또는 단백질을 선별하는 것일 수 있다.
- [0071] 예를 들면, 상기 검출 방법에는 서던 블롯, 노던 블롯, 웨스턴 블롯, 형광 핵산 혼성화(fluorescence in situ hybridization) 등이 사용될 수 있으며, 상기 서열 분석 방법에는 생어 시퀀싱, NGS 시퀀싱, 맥삼-길버트법(Maxam-Gilbert sequencing) 등의 방법이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명의 일 실시예에서는 형질변환된 식물체의 염기서열을 확인하기 위하여, DNA 복제 시 진행되는 DNA 중합 효소(DNA polymerase) 반응을 기반으로 복제가 진행되는 동안 주형 DNA 서열에 짝을 이루는 상보적인 염기가 새로운 DNA 가닥에 하나씩 결합하는 과정을 읽어 나가는, 생어 시퀀싱 방법을 사용하였다.
- [0074] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 보다 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0076] 실험 방법

1. 식물 재료 및 성장 조건

모든 실험은 *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0)과 FAD2-1을 control로 하여 수행되었다. FAD2-1은 EMS (Ethyl Methane Sulphonate) 처리에 유기된 FAD2 유전자가 돌연변이된 비교군을 의미한다. 애기장대의 종자는 70%의 EtOH과 0.5%의 NaOCl로 소독된 후에, 종자를 심기 전 7~8회 증류수로 세척되었다. 종자는 4° C에서 3일 동안 층적처리하였다. 종자는 23° C의 16 h light/8 h dark cycle을 갖는 조직 배양기에서, 1%의 수크로스를 포함하는 ½ MS media에서 성장하였다.

2. 플라스미드의 구성

기저가 되는 CBE binary vector pJY-RpAID을 제조하기 위하여, Integrated DNA technology (Iowa, USA)을 통해 식물(*Arabidopsis thaliana*)의 코돈에 최적화된 코딩 시퀀스 PmCDA1을 합성했다. 먼저, pJY-RpEmpty vector를 만들기 위해 pKI1.1R (Addgene #85808;)이 사용되었으며, 여기서 original Cas9 시퀀스가 제거되고, 대신 XmaJI 및 XhoI 두 개의 효소의 위치가 삽입되었다. XmaJI/XhoI 처리된 pJY-RpEmpty vector에 in-fusion cloning method (Takara, Japan)를 수행하여, Nickase Cas9 (D10A) 및 코돈에 최적화된 AID을 pJY-RpAID binary vectors를 만들기 위해 PCR 증폭하였다. pJY-RpAID vector는 pKI1.1R로부터 original Cas9 발현 카세트 대신에 다음 인자들을 포함한다: RPS5A promoter-SV40 NLS-nCas9 (D10A)-SV40 NLS-67aa linker-3X FLAG-PmCDA-SV40 NLS-UGI-heat shock protein 18.2 terminator (도 3b 및 도4). 식물 형질전환용 vector를 위하여 AarI-mediated gRNA cloning이 전술한 바와 같이 수행되었다. 애기장대의 FAD2 유전자 염기편집을 위하여, 여섯 개의 다른 20-mer guide 시퀀스가 (도 3e) CRISPR RGEN Tool (<http://www.rgenome.net>)을 통해 디자인되었으며, AarI-처리된 pJY-RpAID 또는 pJY-RpABE vector로 복제되었다.

3. 애기장대의 형질전환 및 형질전환 식물의 선별

Agrobacterium strain GV3101을 사용한 floral dipping을 진행하여, *A. thaliana*을 형질변환하였다. 생성된 T₁ 종자들은 1% sucrose와 50 ng · μL⁻¹ hygromycin을 포함하는 ½ MS media에서 발아하였다. 오직 media에서 생존한 식물체만을 선별하여 흙으로 옮기고 후속 분석을 수행하였다. 생어 시퀀싱을 위해 앞에서 genomic DNA를 추출한 후, FAD2 유전자에 염기 편집 발생 여부를 분석하였다.

4. 생어 시퀀싱

추출한 genomic DNA를 템플릿으로, Ex Taq(Takara)를 이용하여 PCR을 수행하여 후속 시퀀싱 분석을 위한 FAD2 amplicon을 얻었다. forward primer 5'-GCATTGTTCAAACGCTCAA와 reverse primer 5'-TCATACTTATTGTTGTACAGTAC을 이용하여, 하기 조건에서 30-cycle PCR을 수행하였다: 사전 변성(95° C에서 5분 동안); 변성(95° C에서 30초 동안); 어닐링(52° C 에서 30초 동안); 및 연장(72° C에서 1분 동안); 확장 후(72° C에서 10분 동안). PCR 산물을 정제하기 위해 정제 키트(Cosmo Genetech)를 사용하였다. 생산물의 품질 및 양은 시퀀싱 회사(Bioneer)에 맡기기 전 Nano drop(Denovix)을 사용하여 확인하였다.

5. 지방산 분석

각 샘플마다 최소 100개의 종자가 가스 크로마토그래피(GC) 분석에 사용되었다. 메탄올에 녹인 5%의 황산 용액과 톨루엔을 준비하였다. 용액에 침지된 각 샘플은 85° C에서 두 시간 동안 중탕되었다. 그 후, 각 샘플에 1 mL의 0.9% NaCl 및 1 mL hexane이 추가되었으며, 이후 330 X g으로 2분 동안 원심분리 되었다. 상층액을 6mL의 튜브로 옮겼으며, nitrogen concentrator (Eyela)를 이용하여 정제되었다. 추출된 Fatty acid methyl ester (FAME)는 200μL hexane에 용해되었으며, 그 후 GC vial에 삽입되었다. DB-23 column (30 m X 0.25 mm, 0.25 μm film, Agilent)이 사용되었으며, 추출된 FAME는 GC-2030 (Shimadzu)을 통하여 분석되었다. GC oven의 온도는 3° C min⁻¹로 190° C 에서 230° C까지 높였다.

6. 발아율 측정

[0093] 4° C에서 3일 동안 증적처리된 종자에 대하여 발아 테스트를 수행하였다. 발아는 ½MS media에서 뿌리가 나타나기 시작할 때 기록되었으며, ½MS는 1%의 sucrose를 포함하는 150mM의 NaCl 및 1%의 sucrose를 포함하는 300mM Mannitol로 이루어져 있다. 발아 테스트는 4일 동안 12시간마다 수행되었으며, 각 계열마다 40개의 종자에 대하여 3회 반복하였다.

[0095] 7. 뿌리 성장 측정

[0096] FAD2-1을 포함하는 Col-0 및 FAD2 alleles을 정상 조건과 스트레스 조건에서 성장시켜 뿌리 발달을 모니터링하였다. 스트레스 조건의 경우, 4 DAG (days after germination)된 묘목을 75mM NaCl 또는 200mM Mannitol을 포함하는 ½ MS media로 옮겼다. 뿌리 길이는 5개 개체에 각각에 대하여 4회 측정되었다. 뿌리 길이는 묘목을 빛에 수직하게 키운지 다섯 번째 되는 날에 측정되었다. 길이 측정은 Image J 프로그램을 이용하여 수행되었다. 상대적인 뿌리 성장(%)은 (스트레스 조건 MS media에서의 평균)/(MS media에서의 평균) x 100으로 계산되었다.

[0098] 8. 데이터에 대한 통계적 분석

[0099] GraphPad Prism를 사용한 one-way ANOVA를 수행하여, 야생형(Col-0), FAD2-1 및 CBE 계열 사이의 차이점을 분석하였다. *는 야생형 식물체와 비교하여 중대한 차이를 표시한다(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

[0101] 실험 결과

[0102] 1. 염기편집을 통한 약화된 FAD2 대립유전자의 형성

[0103] 본 발명은 식물체에 CBE 또는 ABE을 실행하여, FAD2 유전자에서 몇몇의 코딩 지역을 타겟으로 임의적인 C-to-T 및/또는 A-to-G 염기치환을 일으킴으로써, 잠재적인 "약화된" FAD2 대립유전자를 만들어내고자 하며, 위 "약화된" FAD2 대립유전자는 리놀레산 대신 올레인산의 함량이 증가되면서도 성장결함과 같은 부작용은 최소화된 것은 의미한다. 이는 FAD2 유전자의 특정 위치에 염기편집을 이용하여 미스센스 돌연변이를 일으킬 경우에는 FAD2의 유전자의 구조적인 온건함이 유지되기에, FAD2의 기능이 완전히 파괴되기 보다는 약화될 것이라는 원리에 근거한다(도 3a).

[0104] 이를 위해서, 우선 기저가 되는 CBE binary vector pJY-RpAID를 설계하였으며, 위 vector는 Arabidopsis U6 promoter의, RPS5A promoter 및 gRNA 클로닝 카세트의 조절 하에 있다(도 3b 및 도 4).

[0105] 본 발명에서는 선택된 코딩 지역을 타겟하여 염기편집을 진행하기 위하여, "g1 내지 6"로 명명한 독립된 6개의 gRNA를 설계하였으며(도 3e), 위 선택된 코딩 지역은 FAD2 단백질의 N-term transmembrane part, tandem His-motif part, membrane-proximal cytosolic part, cytosolic stretches 및 C-term part를 포함한다(도 3c 및 3d). 실험 결과 Arabidopsis Col-0에 다섯 개의 ABE, 세 개의 CBE 도입이 이루어졌다(도 1e). 선별적인 media 배양 때, 26개의 T₁ 식물체가 BE 전이유전자를 가진 것으로 선별되었으며, 이들의 T₂ 종자 각각에 대한 GC 분석을 진행하기 위해 토양으로 옮겼다.

[0106] T₂ 종자들 각각의 유전자 급원이 T₁ 식물체로부터 얻어졌으며, 지방 구성에 유의미한 변화가 있는지 알아보기 위해 parallel GC 분석을 실행하였다. GC 분석 결과, g5 guide RNA를 사용하여 CBE이 일어난 네 개의 T₁ 식물체(g5CBE1 내지 4로 명명한다)의 T₂ 종자에서, 지속적으로 올레인산이 증가된 것으로 나타났다. g5CBE1, g5CBE2, g5CBE3 및 g5CBE4은 올레인산 함량이 각각 36.5%, 36.2%, 48.9% 및 21.6%까지 증가한 반면, 야생형 Col-0과 다른 형질변환 계통의 경우에는 T₂ 종자의 올레인산 함량이 20%를 넘지 못했다. 나아가, g5CBE 식물체의 경우 올레인산의 증가와 더불어 다중불포화지방산의 수준이 감소하고, 에이코센산(20:1 Δ^{11})이 증가한 것으로 나타났으므로, 이는 위 형질전환 식물체에서 FAD2 단백질의 불호화효소 활성이 중재되었을 것임을 암시한다(표 1 및 2).

표 1

[0107]

선별된 형질전환 대립유전자들의 T₂ 종자의 지방산 조성(%)

지방산	Col-0		형질변환 라인 (n=T ₁ 의 대립유전자 번호)											
			g2ABEn		g3ABEn		g4ABEn				g5ABEn			g6ABEn
	1	2	n=1	1	2	1	2	3	4	1	2	3	1	2
16:0	13.9	13.1	8.7	8.4	7.9	13.0	14.5	13.1	14.1	8.5	9.0	8.8	13.6	9.0
18:0	11.0	9.9	3.6	3.3	3.4	9.1	11.6	9.9	11.6	3.5	3.4	3.7	9.9	3.6
18:1	17.7	18.4	12.1	17.0	19.4	16.1	17.5	18.2	17.9	15.2	13.0	15.1	15.7	13.6
18:2	24.6	26.2	29.3	29.5	26.8	28.1	25.0	25.9	23.6	28.7	29.4	30.2	25.9	29.5
18:3	15.7	16.0	21.6	18.9	18.5	15.8	14.8	15.7	14.8	20.2	21.5	20.0	16.5	20.7
20:0	2.8	1.9	3.2	2.5	2.7	2.0	2.0	1.9	1.8	3.0	2.7	2.9	2.0	3.0
20:1	14.3	14.6	21.5	20.4	21.3	15.9	14.6	15.2	16.2	20.9	20.8	19.3	16.4	20.7

표 2

[0108]

지방산	형질변환 라인 (n=T ₁ 의 대립유전자 번호)													
	g1CBEn		g4CBEn								g5CBEn			
	1	2	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4
16:0	12.9	15.9	13.6	11.8	14.2	20.0	12.8	16.4	13.5	10.2	7.5	6.9	6.2	8.6
18:0	9.6	13.7	10.4	8.1	11.3	20.2	9.1	14.7	10.3	5.2	3.5	3.6	2.9	3.8
18:1	18.5	17.5	17.1	17.2	18.9	19.1	16.8	18.5	16.8	15.3	*36.5	*36.2	*48.9	*21.6
18:2	25.9	23.7	25.9	27.9	25.3	18.6	27.8	22.6	26.5	30.5	11.9	14.5	8.0	19.3
18:3	15.9	14.5	16.2	16.9	14.3	10.8	16.5	13.2	16.1	19.0	13.8	13.7	9.5	19.6
20:0	1.9	1.8	2.0	2.0	1.8	1.6	2.1	1.8	2.1	2.3	2.3	2.4	1.8	3.1
20:1	15.3	12.8	14.8	16.1	14.3	9.7	14.9	12.8	14.7	17.4	24.2	22.4	22.5	23.6

[0109]

이후 정말로 형질전환 식물체에서 타겟된 FAD2 지역에 사이토신 염기편집이 일어나 위 증가가 나타난 것인지 알아보기 위하여, T₂ 종자에서 올레산 함량이 가장 많았던 g5CBE1과 g5CBE3를 분리하여 다음 T₂ 세대 분리를 진행하였다.

[0111]

2. FAD2 계통의 염기편집 패턴 및 지방 함량 분석

[0112]

g5CBE1과 g5CBE3 각각의 T₁ 계통으로부터, 일곱 개(g5CBE11 내지 17) 및 다섯 개 (g5CBE31 내지 35)의 T₂ 종자를 얻어 FAD2 유전자형을 분석하였다. 각각의 T₂ 식물체의 앞에서 genomic DNA를 추출하여, CBE 타겟 지역의 FAD2 유전자에 대한 생어 시퀀싱을 수행하였다. g5CBE11 내지 16에서 C2 및 C12 위치에 C-to-G의 염기치환이 발견되었으므로, protospacer adjacent motif (PAM) NGG가 21-23 위치와 관련되어, 각각 A295G 및 D298E의 아미노산 변화를 야기한 것으로 추측된다.

[0113]

T₂ 식물체 중에서, g5CBE12 및 g5CBE14이 대응하는 위치에서 별개의 C-G 치환 크로마토그램 신호를 나타내었으므로, (A295G; D298E)-type의 아미노산 변화가 발생했음을 의미한다. g5CBE11, g5CBE13, g5CBE15 및 g5CBE16은 C2 위치에서 C-to-G 및 C-to-T의 혼합된 시그널을 보여주었으며, original C와 C12 위치의 C-to-G의 혼합된 시그널은, T₂ 식물체에서 새로운 염기편집이 일어난 것이 아닌 한, T₁ 식물체에서 C2 위치의 편집된 bi-alleles와 C12 위치의 이형접합체의 C-to-G 대립유전자가 이들의 T₂ 식물체로 전달되었음을 시사한다.

[0114]

g5CBE17에서는 염기편집에 대한 구체적인 사인이 없이 야생형과 동일한 시그널만이 나타났다. g5CBE3 계통 중에서, g5CBE31 식물체는 또한 C2 위치에서 C-to-G 변환에 의한 A295G 패턴을 보여주었으며, C6 위치에서 C-to-T 변환이 함께 일어나, 동의돌연변이를 만들었다. g5CBE32에서, 배타적인 C-to-T 치환이 C2 위치에서 일어나 A295V를 만들었으며, 각 C5 및 C6 위치에서의 C-to-T, C-to-G 변환이 T296M을 만들었다. g5CBE33 식물체에서, 이형접합의 또는 모자이크 C-to-T 치환이 C2 위치에서 관찰되었다. g5CBE34 및 g5CBE35의 시퀀싱 결과는 시퀀싱 혼잡들의 혼합된 풀을 보여주며, 점 돌연변이보다 큰 유전적 변화, 예를 들면 삼입-결실 발생했을 것임을 시사한다(도 5a, 도 6).

- [0115] 아미노산 변화를 수반한 대립유전자의 차이에 따라 지방 조성이 어떻게 변화하였는지 조사하기 위하여, 각 T₂ 식물체에서 얻은 T₃ 종자에 대하여 GC 분석을 수행했다. 올레인산 함량은 다불포화 지방산을 희생하여 g5CBE12, g5CBE14 및 g5CBE32의 T₃ 종자에서 각각 최대 64.9%, 63.9% 및 69.2% 로 증가되었으며, 두 개의 독립적인 사이토신 염기편집된 대립유전자가 다른 잔기에서 두 아미노산 변화를 동시에 일으켰다(도 5a).
- [0116] C2 위치의 bi-allelic edits 및 C12 위치의 이형접합성 대립유전자가 분리되었을 것으로 예상되는, g5CBE11, g5CBE13, g5CBE15, g5CBE16의 T₃ 종자의 올레인산 함량은, g5CBE12 및 g5CBE14에서의 최고 증가량과 비교할 때 보통의 증가인 42.6% 내지 45.8%으로 나타났으며, 이는 C2 위치의 C-to-T 대립유전자 및/또는 C12 위치의 WT allele로 인한 것임을 암시한다. g5CBE31는 또한 중간 단계의 올레인산 증가 수준을 보였으며, A295G가 부분적인 FAD2 활성의 억제에 책임이 있음을 의미한다. g5CBE33는, 이형접합성인 A295V를 가지며, 25.7%의 적은 수준의 올레인산 증가를 나타냈으므로, A295V는 FAD2 활성화에 용량 의존적인 방식으로 영향을 미침을 암시한다(도 5b). g5CBE34 및 g5CBE35의 올레인산 함량은 각각 54%, 49.5%으로 준수한 증가를 보였으나, g5CBE12 및 g5CBE14에서와 같은 최대 증가 수준에는 도달하지 않았다.
- [0118] **3. 염기편집된 FAD2 대립유전자의 분리**
- [0119] g5CBE11, g5CBE14, g5CBE31, g5CBE32, g5CBE33 및 g5CBE34을 다음 T₃ 세대로 진행하였으며, 이 중 일부는 아직 T₂ 세대에서 유전적으로 고정되지 않은 상태이므로, 동형접합성 대립유전자를 분리하여 지방산 조성의 변화가 possible T₃ segregation으로 인한 것인지를 명확히 하였다(도 5a 및 5b; *표시된 숫자가 포함된 열). g5CBE11가 동형접합성 D298E 돌연변이에 따른 A295G/A295V bi-allelic을 포함하는 T₂ 그룹의 대표로 선택되었다.
- [0120] g5CBE14 및 g5CBE32는 각각 A295G; D298E 및 A295V; T296M allelic groups에 대한 것이다. g5CBE31는 A295G 돌연변이 및 이와 밀접한 C-to-T 돌연변이를 가진다. g5CBE33는 이형접합성 A295V 대립유전자로 선택되었다. g5CBE34는 또한 이들의 T₃ 세대에서 삼입-결실 대립유전자의 분리를 예상하여 진행 그룹에 포함되었다.
- [0121] 생어 시퀀싱 분석은 각 allelic group의 T₃ 자손에 대해 이루어졌다. 결과적으로, 본 발명에서는 각각의 유전자형에 대하여 모든 가능한 염기편집된 T₃ 동형접합성 대립유전자 g5CBE114 (A295G; D298E), g5CBE144 (A295G; D298E), g5CBE316 (A295G), g5CBE321 (A295V; T296M) 및 g5CBE337 (A295V)를 분리하였으며, 이하 FAD2-114, FAD2-144, FAD2-316, FAD2-321 및 FAD2-337라고 명명한다.
- [0122] g5CBE34의 T₃ 자손을 위해, 4bp 삽입 돌연변이 대립유전자를 분리하였으며, 이를 FAD2-349라 하고, 이른 종결 코돈으로 인해 FAD2가 녹아웃 될 것으로 예상하였다. 분리된 g5CBE34의 T₃ 자손 또한 염기 편집된 대립유전자 (A295G)를 나타냈으며, 이는 CBE의 적용이 T₂ g5CBE34에 염기치환과 삽입 돌연변이를 모두 발생시켰음을 의미한다. 모든 T₃ 유전자형에 대하여 GC 분석이 이루어졌으며, 모든 동형접합성 염기편집된 대립유전자는 야생형 Col-0과 비교하여 그들 및 T4 종자에서 올레인산 함량이 증가한 것으로 나타났다.
- [0123] FAD2-321 (A295V; T296M)의 올레인산 함량은 최고 64.7±5.7%로, 염기편집된 FAD2 대립유전자 중 가장 높은 올레인산 증가를 보여 이들의 부모 T₂ 세대에서 관찰된 것과 일치한다(도 5b).
- [0124] 이는 이전에 보고된 FAD2-1 (A104T) (55.9±1.9%, Figure 3c, Supplementary Table S2)의 경우보다도 큰 수치이다. FAD2-114 및 FAD2-144 (A295G; D298E)는 각각 57.9±5.4%, 56.5±2.3%까지 올레인산 생산이 강화된 것으로 나타났으며, 이들의 분리된 형제들보다 높은 수치이다(38±2.0%).
- [0125] 이는 위 증가가 두 개의 아미노산에서 동시에 동형접합성 변형이 일어남에서 비롯된 것임을 암시하며, 이는 분리 유전으로, 따라서 이전 세대인 g5CBE11 또한 보통의 증가를 나타냈다. 특히, FAD2-321 및 FAD2-114에서 리놀렌산(18:2) 및 리놀렌산(18:3) 함량은 각각 2.4% 및 2% 이하로 급진적으로 감소한 한편, FAD2-1에서 리놀렌산(18:2) 및 리놀렌산(18:3) 함량은 각각 2.4±0.2% 및 6.2±0.5%이었으므로, 위 증가가 그들의 대립유전자에서 FA2의 "약화된" 불포화효소 활성 때문임을 암시한다. 특히, FAD2-321과 같은 약화된 대립유전자에서의 올레인산 함량은 FAD2-349 녹아웃 대립유전자에서의 올레인산 함량(59.5±10.4%)과 유사하였다(도 7a, 7c 및 표 3 내지 5).

표 3

[0126] g5CBE11n, g5CBE14n, g5CBE31n, g5CBE32n, g5CBE33n 및 g5CBE34n의 T₃ 종자의 지방산 조성(%) (n=T₃ 대립유전자 번호)

지방산	Col-0		FAD2-1			g5CBE11n										
	1	2	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
16:0	8.3	8.7	8.5	9.0	6.2	8.7	14.3	5.7	9.1	7.7	13.3	10.1	9.0	10.6	12.4	11.4
18:0	3.1	3.4	6.6	7.3	3.3	6.8	14.3	2.4	7.3	3.2	10.8	6.5	4.8	7.1	10.0	8.6
18:1	18.2	18.7	55.6	54.1	58.0	59.7	50.2	63.1	58.5	41.7	39.0	38.6	37.4	37.4	35.8	36.0
18:2	30.3	29.9	2.2	2.6	2.4	0.3	1.1	0.6	1.0	10.2	7.1	8.8	10.8	9.4	9.5	9.1
18:3	18.8	18.1	5.9	6.0	6.8	1.3	2.0	2.0	1.8	10.8	7.6	10.1	11.6	10.9	9.3	10.7
20:0	2.1	2.2	1.3	1.3	1.4	1.1	1.2	1.1	1.1	1.7	1.6	1.9	1.8	1.8	1.6	1.7
20:1	19.2	19.0	19.9	19.6	22.0	22.1	17.0	25.1	21.2	24.7	20.6	24.0	24.5	22.8	21.3	22.5

표 4

지방산	g5CBE14n						g5CBE31n						g5CBE32n					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
16:0	8.6	8.7	11.0	9.5	10.8	10.5	12.3	13.2	10.8	13.9	7.8	7.5	8.8	6.6	13.7	5.1	5.7	5.2
18:0	6.8	6.5	9.8	7.8	9.2	8.8	10.5	11.6	8.0	12.4	3.6	3.4	7.5	4.3	14.3	2.0	2.3	2.1
18:1	59.4	58.1	55.1	58.2	53.3	55.1	34.2	32.0	33.5	33.0	37.4	37.7	61.0	64.4	55.4	69.7	67.2	70.6
18:2	0.4	0.3	0.4	0.4	0.8	0.4	12.1	12.6	13.6	12.3	14.3	13.6	0.3	0.3	0.6	0.6	1.8	0.4
18:3	1.8	1.5	1.5	1.5	2.5	1.5	11.2	11.5	13.1	10.5	13.9	14.3	1.3	1.6	1.2	1.7	2.4	1.6
20:0	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1.7	1.8	1.8	1.7	1.9	1.8	1.1	1.2	0.8	0.9	1.0	0.9
20:1	21.8	23.9	21.2	21.7	22.4	22.8	17.9	17.4	19.3	16.2	21.1	21.7	20.0	21.6	13.9	19.9	19.7	19.2

표 5

지방산	g5CBE33n							g5CBE34n											
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	15
16:0	11.6	9.2	9.8	11.3	9.9	9.9	11.2	11.0	9.9	8.4	14.6	9.6	11.0	11.3	11.3	5.4	6.2	6.5	8.9
18:0	7.9	4.6	5.2	7.5	4.9	4.4	8.2	9.6	8.1	6.0	15.1	7.3	8.9	10.2	7.2	2.3	3.1	2.9	3.2
18:1	21.2	21.5	21.8	21.8	16.4	16.0	30.6	43.2	45.6	45.4	52.1	42.9	42.7	44.2	28.9	66.9	50.9	50.3	30.3
18:2	22.6	25.2	24.6	23.7	29.3	31.0	16.8	8.0	7.9	8.5	0.5	9.0	8.8	6.8	18.2	0.5	7.8	8.4	18.7
18:3	15.1	16.8	16.6	15.0	18.1	17.8	12.8	8.8	8.7	10.5	1.0	10.9	10.2	9.0	15.5	1.8	9.5	9.6	17.0
20:0	2.4	2.3	2.4	2.2	2.4	2.4	1.8	1.4	1.3	1.4	1.0	1.4	1.3	1.3	1.8	1.1	1.5	1.4	1.8
20:1	19.0	20.4	19.7	18.4	19.2	18.5	18.7	17.9	18.5	19.7	15.7	18.8	17.0	17.2	17.1	22.0	21.0	20.9	20.1

[0129] 4. FAD2 대립유전자의 성장 반응의 특성

[0130] 본 발명의 특정한 "약화된" FAD2 대립유전자는, FAD2 녹아웃 대립유전자와 같은 심각한 성장 결함 또는 이전에 보고된 FAD2-1 대립유전자보다 약한 결함을 가지면서, 증가된 올레인산 함량을 유지할 수 있을 것으로 가정했다.

[0131] 이와 관련하여, 새로이 생산된 FAD2 대립유전자들을 그들의 성장 반응 면에서 표현형 차이에 따라 특정하였다. 본 발명에서는 정상 조건과 스트레스 조건에서 각 대립유전자들의 발아율과 뿌리 성장률을 분석하였다.

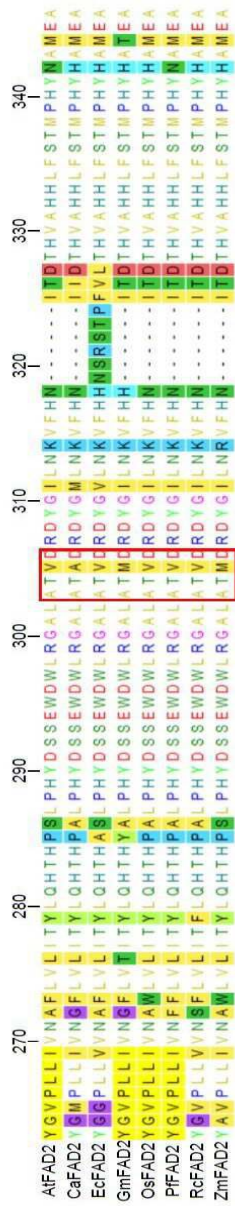
[0132] 발아와 뿌리 성장 테스트를 위한 실험적인 스트레스 조건으로, 1/2 MS media에서 각각 150 mM NaCl, 300 mM Mannitol, 및 75 mM NaCl, 200 mM Mannitol을 사용했으며, 이는 염분 또는 수분 부족 스트레스 상황을 모사한

것이다.

- [0133] 올레인산 함량의 증가가 발아에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 개체를 심은 후 초기 4일 동안 12시간 간격으로 종자의 발아를 스코어 함으로써, 각 대립유전자에 대한 발아 테스트를 진행하였다(도 9a, 9b 및 9c). 정상 컨디션 하에서, 테스트된 대립유전자의 발아 빈도는 4일 이후 전부 비슷해졌으며, 95% 이상의 발아 성공률을 보였다.
- [0134] FAD2-349, FAD2-321, 및 FAD2-144 대립유전자는 미세하게 감소된 발아율을 보였으며(~72 hours; 도 9a), 이는 이들 대립유전자가 다른 대립유전자들과 비교해서 상대적으로 높은 올레인산 함량을 가진 것으로 나타난 결과와 일치한다(도 7c).
- [0135] 두 실험적인 스트레스 조건에서 FAD2-349 및 FAD2-321 발아율은, 테스트된 모든 시점에서, 상당히 낮은 발아율을 나타낸 FAD2-1과 함께 급격히 악화되었다. 그러나 FAD2-144, FAD2-316 및 FAD2-337은 야생형과 유사한 발아율을 유지했다. 이는 증가된 올레인산 함량을 갖는 FAD2 대립유전자가 FAD2-1, FAD2-349 및 FAD2-321의 경우와 대조적으로, 발아 중 스트레스 감수성에 대한 저항성이 향상되었음을 시사한다. 특히, 가장 높은 수준의 올레인산 함량 중 하나를 보여준 FAD2-144는 두 개의 동시적인 아미노산 변화를 포함하였으며(A295G; D295E, 도 7), FAD2-1에 비해 발아에서 테스트된 스트레스 조건에 대해 상당한 저항성을 가졌다(도 9b 및 9c).
- [0136] 다음으로 각각의 FAD2 대립 유전자에서 4일 된 묘목의 뿌리 길이를 측정하여 정상 또는 스트레스 조건에서 뿌리 성장을 평가했다(도 10d, 10e 및 10f). 정상적인 성장 조건에서 테스트된 모든 FAD2 대립유전자는 야생형 Col-0에 비해 뿌리 길이가 감소했다. 예를 들어, FAD2-144 및 FAD2-321은 FAD2-1 및 녹아웃 FAD2-349에서 관찰된 것과 유사하게, 뿌리 길이가 상당한 감소를 보여, 해당 대립 유전자 변화가 정상적인 뿌리 발달을 저해했음을 시사한다. 반면에 FAD2-316과 FAD2-337은 뿌리 감소 수준이 미미하게 나타났다. 이는 대립유전자 변이가 정상적인 성장 과정을 저해하지 않았음을 의미한다.
- [0137] 스트레스 처리는 테스트된 각 대립유전자의 묘목에서 다양한 뿌리 길이 감소를 유발했다(도 10d 및 10e). 염 스트레스 조건에서, 녹아웃 대립유전자 FAD2-349는 정상 조건에서의 55.8%로 뿌리 길이가 감소하였으며(도 10f), 이는 알려진 염 스트레스 하에서의 FAD2 녹아웃 돌연변이의 성장 결함과 일치한다. 반면, Col-0 및 FAD2-1의 뿌리 길이는 각각 이들의 정상 성장 길이의 66% 및 63.6%로 나타났다. 특히, 단일 아미노산 치환으로 인해 올레인산의 중간적인 증가율이 나타난 FAD2-316(A295G) 및 FAD2-337(A295V)(도 3)의 뿌리 길이는 각각 정상 길이의 82.9% 및 79.7%로, 덜 감소하였다. 이는 이들의 성장이 야생형보다 염분 스트레스의 영향을 덜 받음을 시사한다. FAD2-144(A295G; D298E) 및 FAD2-321(A295V; T₂96M)은 두 개의 아미노산이 동시에 치환되고, 더 높은 올레인산 생성하는 대립유전자를 가지며(도 7c), 염 스트레스 조건에서 67.8% 및 69.2%의 상대적인 뿌리 성장을 보였고, 이는 Col-0에서 관찰된 감소 수준과 유사한 것이다.
- [0138] 성장 결함은 200mM Mannitol을 사용한 수분 부족 스트레스 조건에서 더 분명하게 관찰되었으며, FAD2-349의 뿌리 길이가 32.6%로 감소한 반면, Col-0은 45.5%로 감소했다. FAD2-316 및 FAD2-337은 상대적인 뿌리 길이가 각각 49.1% 및 54%로 나타나, 녹아웃 FAD2-349(32.6%) 또는 이전에 보고된 FAD2-1(35.5%)와 비교하여 수분 부족 스트레스 저항성이 상당히 증가하였다. FAD2-144 및 FAD2-321의 상대적인 뿌리 길이는 각각 40.4% 및 41.1%였으며, 이는 이들이 Col-0과 비교하여 스트레스 조건에 대한 민감도가 증가했으나, FAD2-349 및 FAD2-1 보다는 수분 부족 스트레스를 용인할 수 있음을 시사한다.

도면

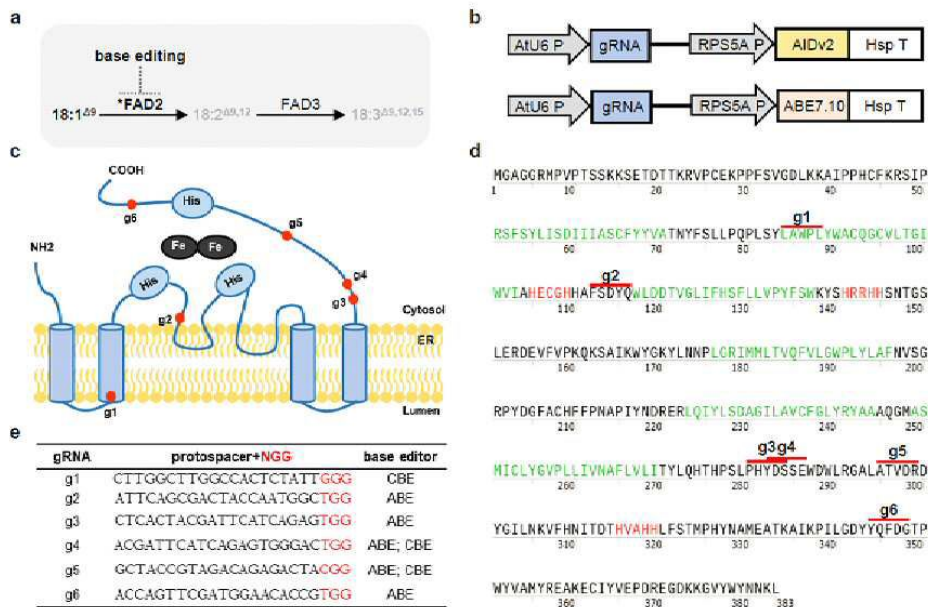
도면1



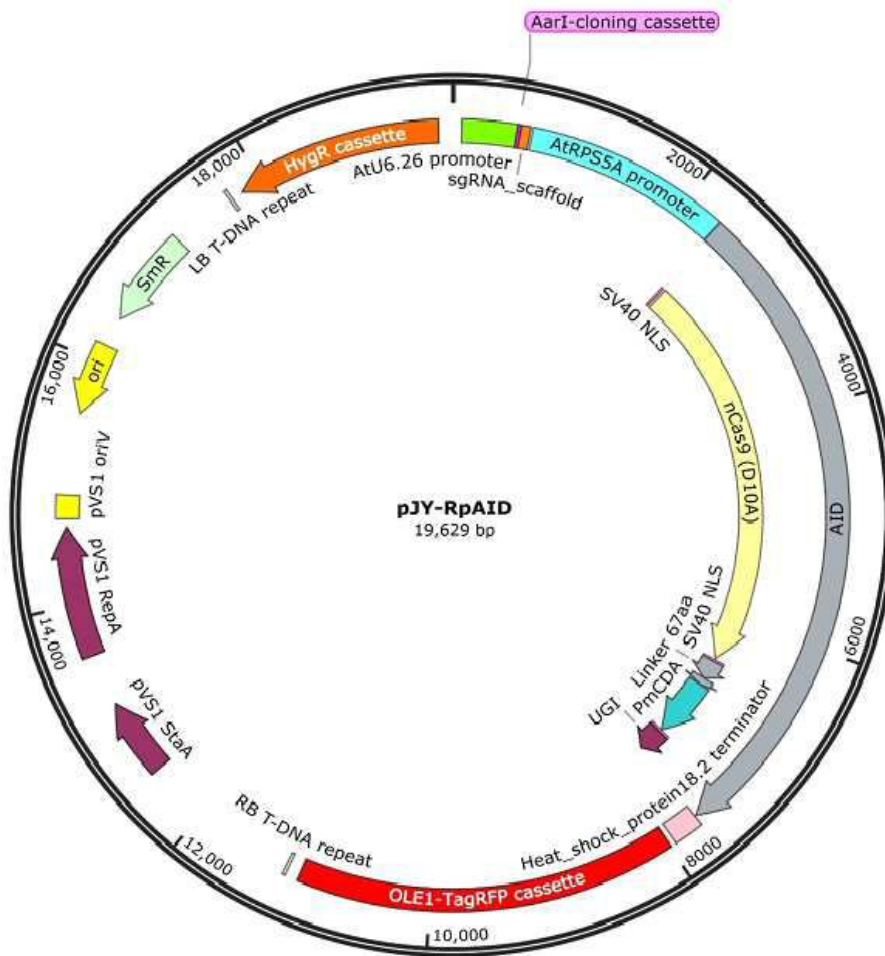
도면2

	2										12										NGG									
AtFAD2	G	C	T	A	C	G	T	A	G	A	C	A	G	A	G	A	C	T	A	C	G	G								
CaFAD2	G	C	G	A	C	G	G	C	G	G	A	T	A	G	A	G	A	T	T	A	C	G	G							
EcFAD2	G	C	G	A	C	T	G	T	T	G	A	C	A	G	G	G	A	C	T	A	T	G	G							
GmFAD2	G	C	A	A	C	T	A	T	G	G	A	C	A	G	A	G	A	T	T	A	T	G	G							
OsFAD2	G	C	C	A	C	C	G	T	G	G	A	C	C	G	C	G	A	C	T	A	C	G	G							
PtFAD2	G	C	T	A	C	T	G	T	A	G	A	C	A	G	A	G	A	C	T	A	T	G	G							
RcFAD2	G	C	A	A	C	T	G	T	T	G	A	C	A	G	A	G	A	T	T	A	C	G	G							
ZmFAD2	G	C	C	A	C	C	A	T	G	G	A	C	C	G	C	G	A	C	T	A	C	G	G							

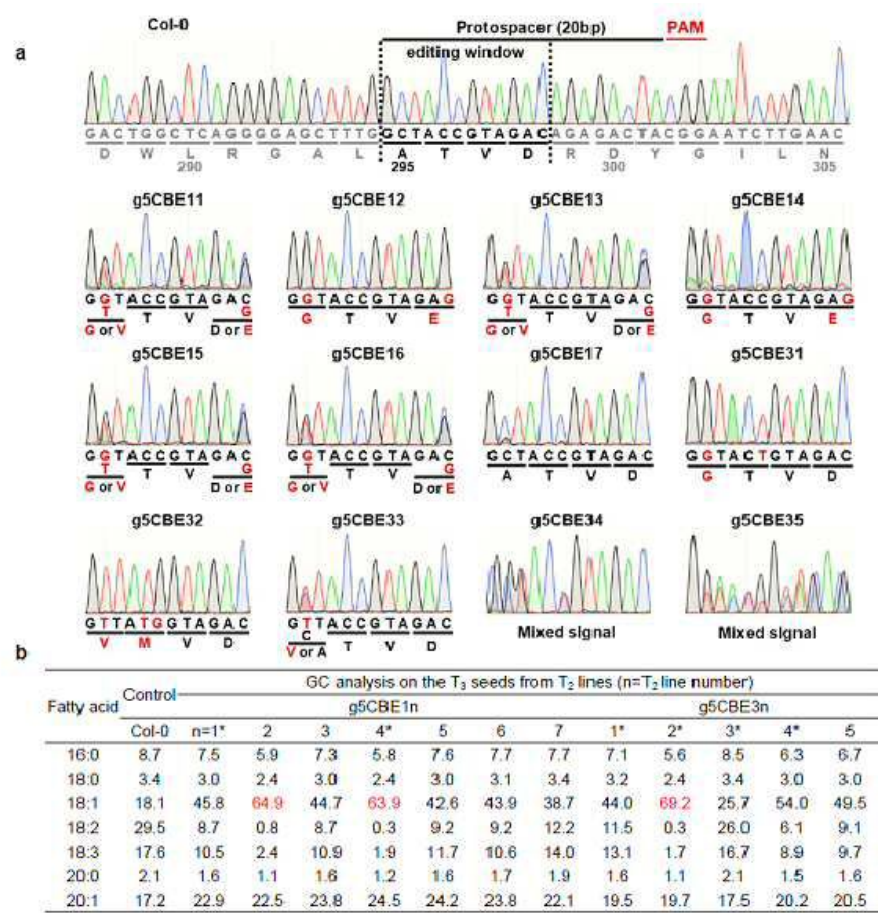
도면3



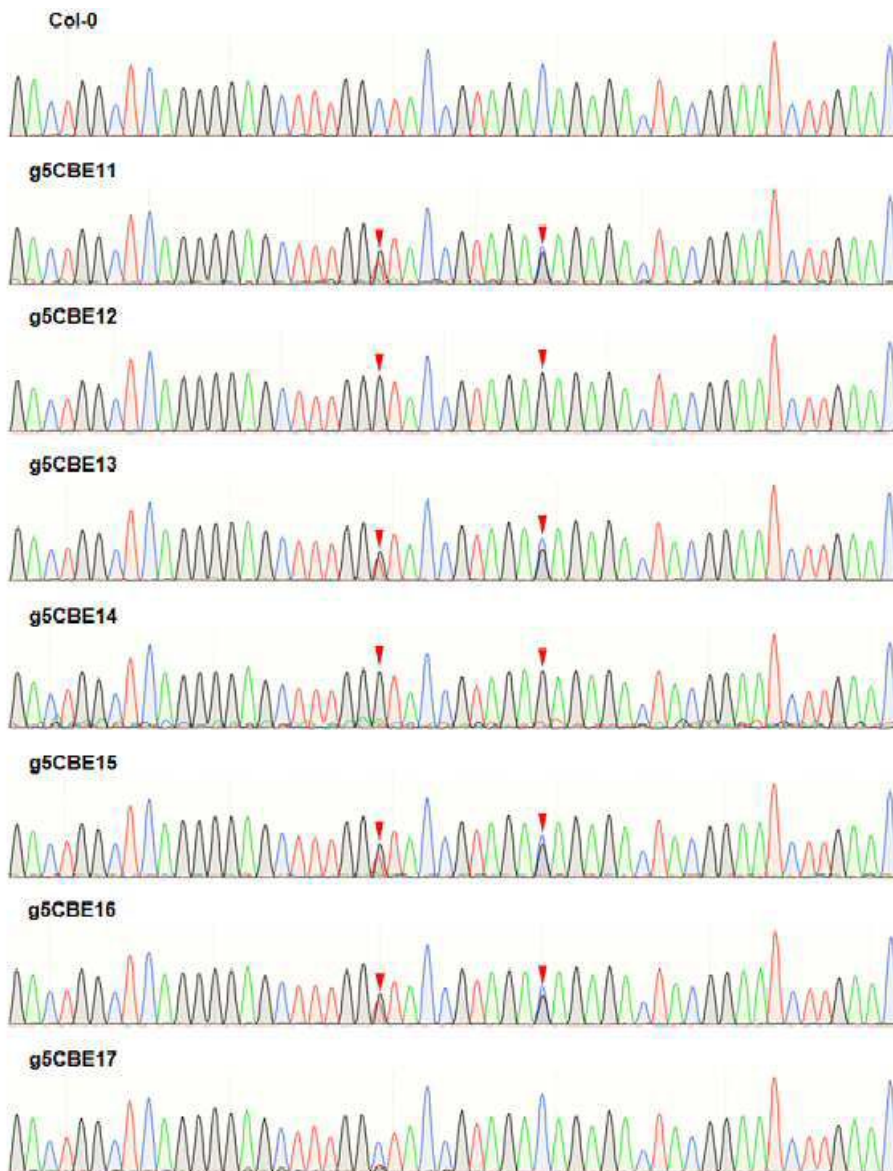
도면4



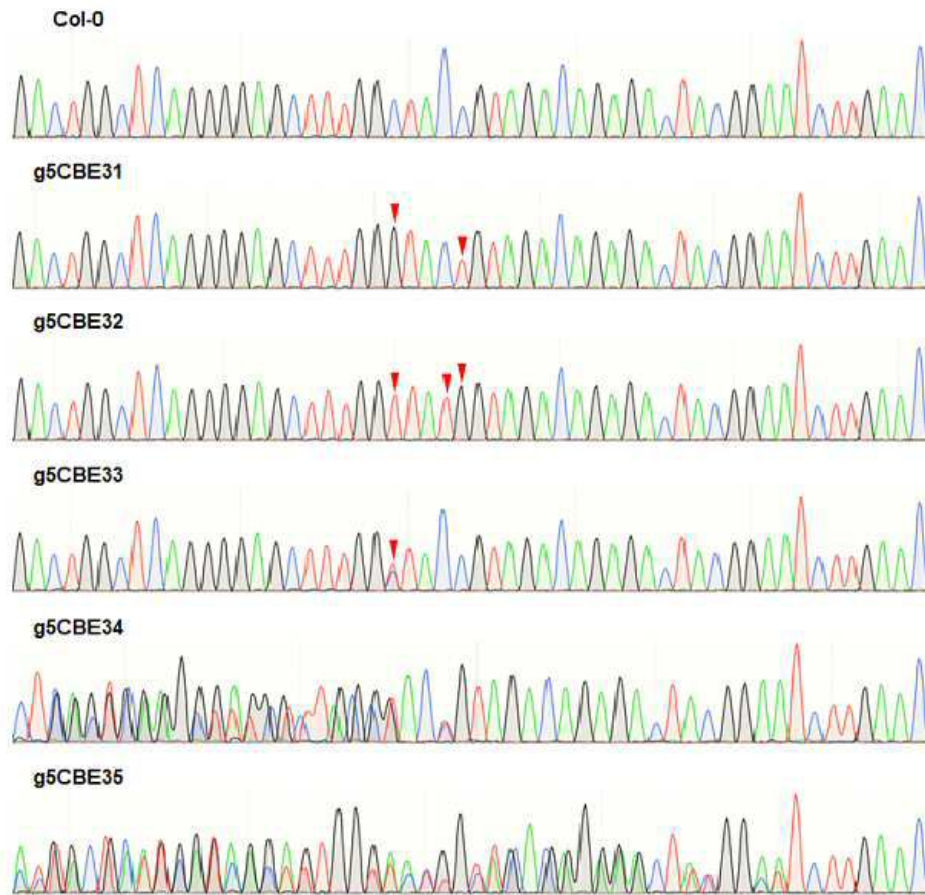
도면5



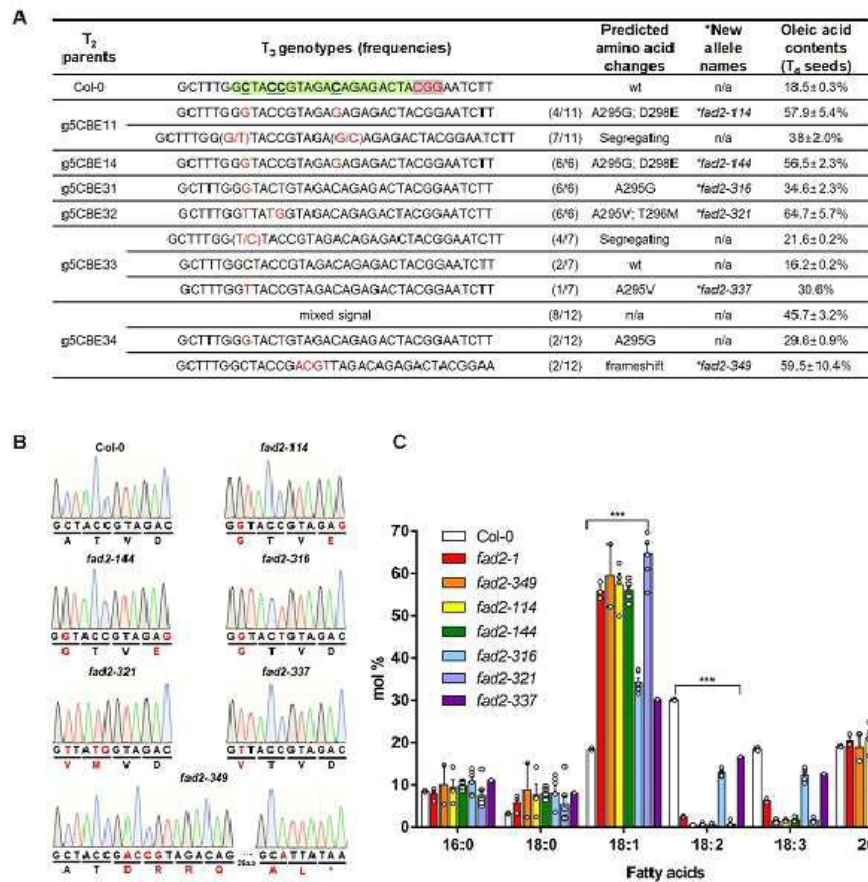
도면6a



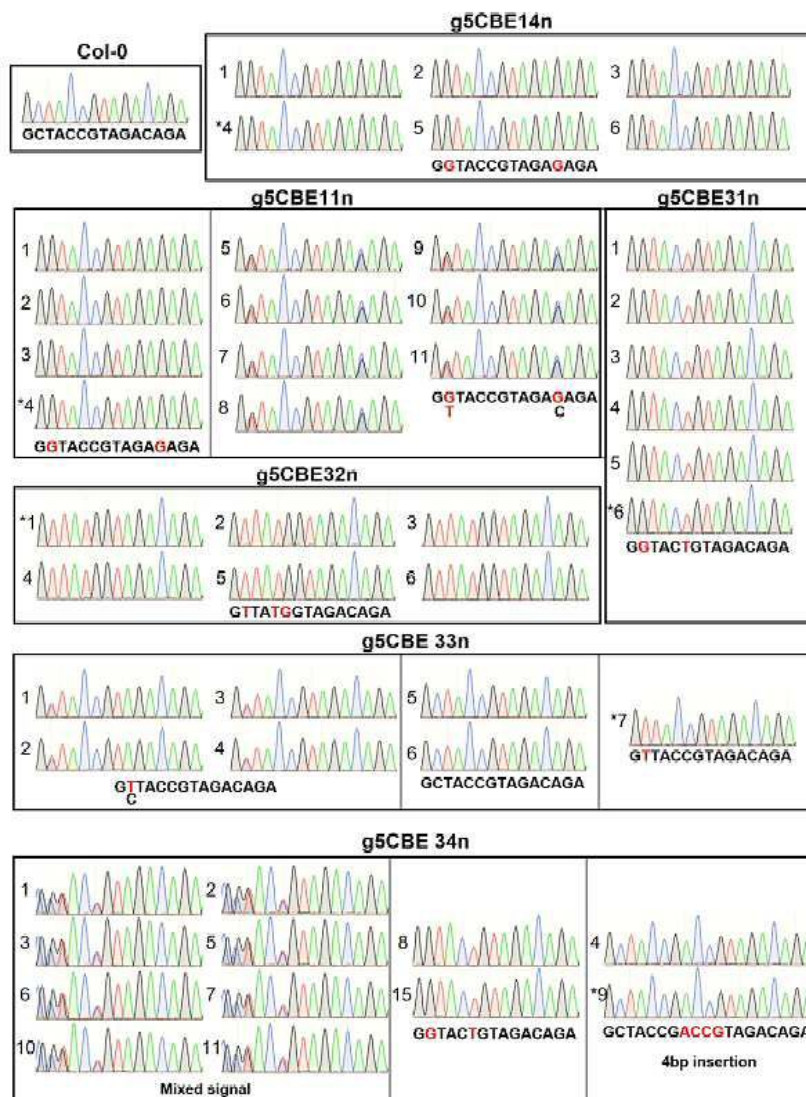
도면6b



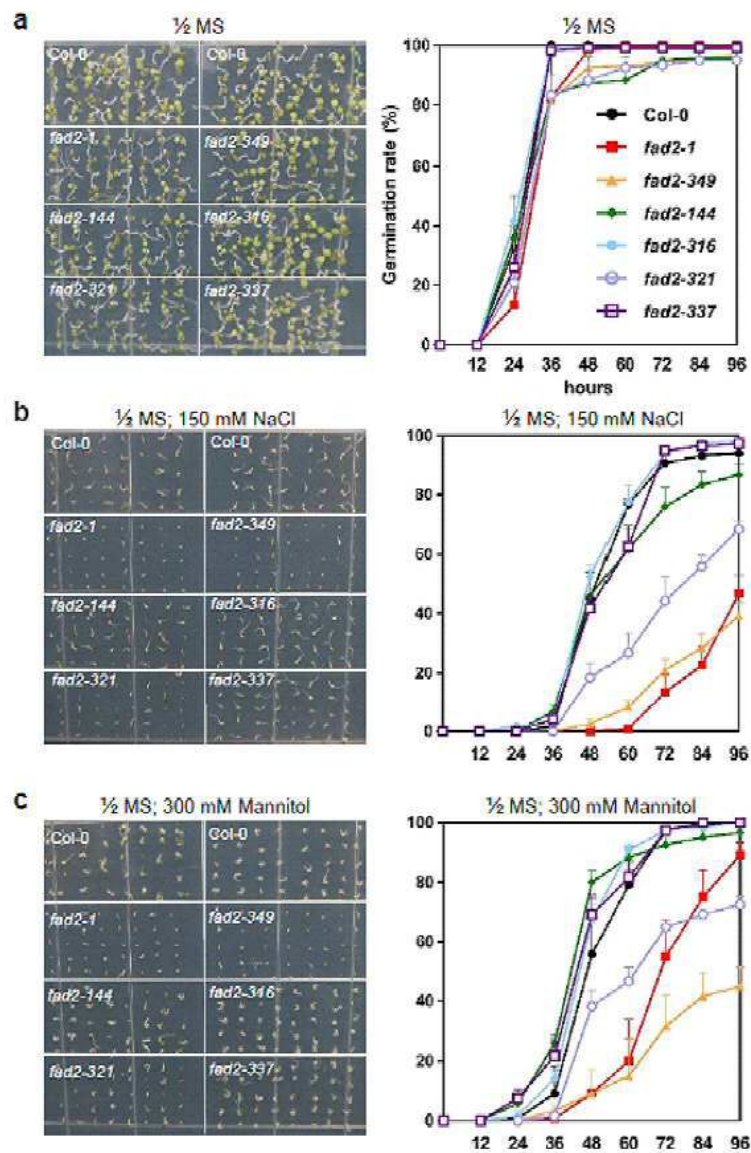
도면7



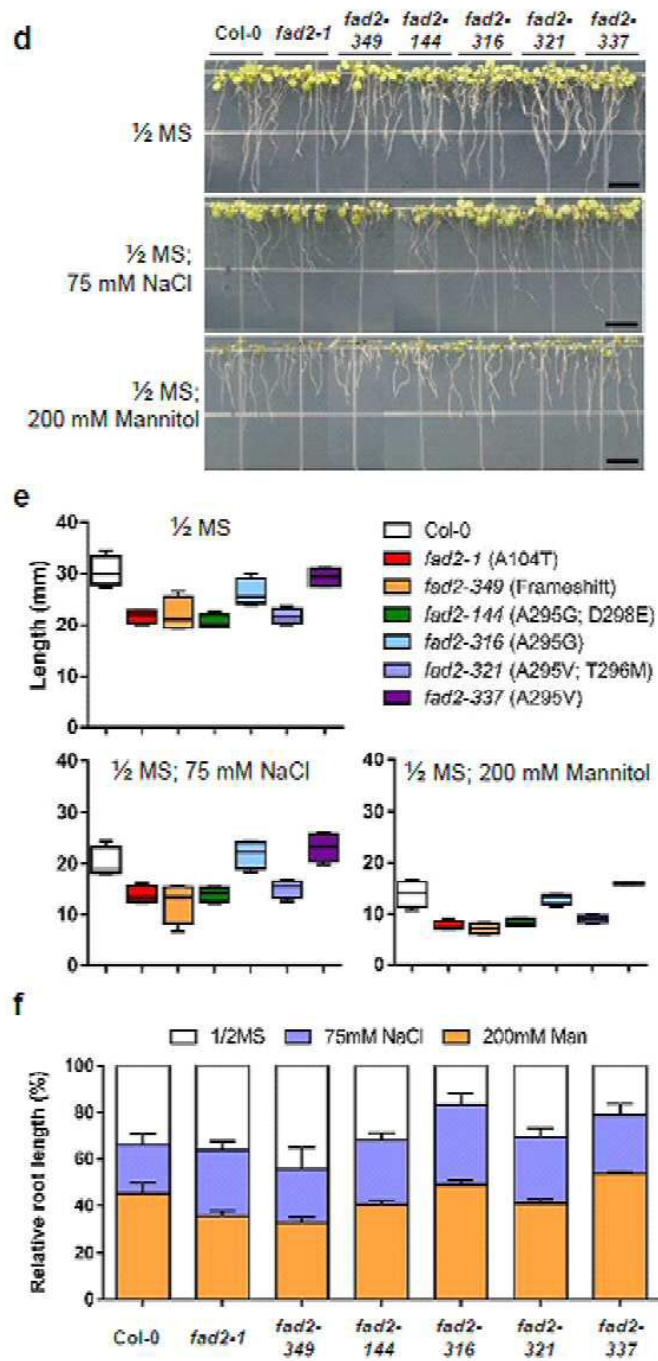
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> PLANT WITH HIGH OLEIC ACID CONTAINING SEED AND PRODUCTION METHOD THEREOF
- <130> 21P09039
- <150> KR 10-2021-0108328
- <151> 2021-08-17

<160> 2
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 1
 Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Pro Val Pro Thr Ser Ser Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Thr Asp Thr Thr Lys Arg Val Pro Cys Glu Lys Pro Pro Phe Ser
 20 25 30
 Val Gly Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser
 35 40 45
 Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Ser Asp Ile Ile Ile Ala Ser
 50 55 60
 Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Asn Tyr Phe Ser Leu Leu Pro Gln Pro
 65 70 75 80
 Leu Ser Tyr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
 85 90 95
 Leu Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
 100 105 110
 Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
 115 120 125
 Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
 130 135 140
 His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
 145 150 155 160
 Gln Lys Ser Ala Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
 165 170 175
 Gly Arg Ile Met Met Leu Thr Val Gln Phe Val Leu Gly Trp Pro Leu
 180 185 190
 Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Phe Ala Cys

195 200 205
 His Phe Phe Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln
 210 215 220
 Ile Tyr Leu Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Phe Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

 Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Met Ala Ser Met Ile Cys Leu Tyr Gly
 245 250 255
 Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu
 260 265 270
 Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp
 275 280 285
 Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu
 290 295 300
 Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His Leu

 305 310 315 320
 Phe Ser Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile
 325 330 335
 Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Trp Tyr
 340 345 350
 Val Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp
 355 360 365
 Arg Glu Gly Asp Lys Lys Gly Val Tyr Trp Tyr Asn Asn Lys Leu
 370 375 380

<210> 2
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> guide RNA
 <400> 2

gcuaccguag acagagacua

20