(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0053092
(43) 공개일자 2024년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8213 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0132168
(22) 출원일자 2022년10월14일
심사청구일자 2022년10월14일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
주식회사눌라바이오
경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 305 (가좌동)
(72) 발명자
김재연
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호(가좌동, 센트럴웰가)
부티엔반
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **KU80 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 KU80 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 이용하면 식물체에서 상동재조합 기반의 유전자 타겟팅(gene targeting) 효율을 증가시킬 수 있으므로, 작물에 유용한 대립 유전자의 도입을 매우 정확하게 할 수 있으며 GM 작물 개발시 도입된 유전자를 특정 염색체의 특정 위치에 피라미딩하는 기법으로 사용 가능하며, 다양한 단백질의 태깅(tagging)이나 in planta 단백질 엔지니어링과 같은 기초과학에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/8202 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
(72) 발명자
우엔 티 으언
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)
김지혜
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711156282
과제번호 2020M3A9I4038352
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 유전자교정 도구 전달 효율증진 및 상동성수선(HDR) 기반 범용성 식물 유전체교정 활용 원천기술 개발
기 여 율 8/10
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711174911
과제번호 2022-주문연구창업-공공-SB1-01
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 (재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명 연구산업육성
연구과제명 식물유전자교정기반 주문연구 서비스 및 BM 개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 ㈜눌라바이오
연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 엔도뉴클레아제 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제는 ttCas12a(temperature tolerant CRISPR associated protein 12a)인 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에, 항생제 마커 발현 카세트; 타겟팅 유전자의 상동성 기반 DNA 수선(homology-directed DNA repair, HDR)을 위한 주형 서열을 포함하는 공여(donor) 서열 발현 카세트; 타겟팅 유전자의 crRNA 발현 카세트; 및 토마토 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물.

청구항 6

토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터로 토마토 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 엔도뉴클레아제 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제는 ttCas12a(temperature tolerant CRISPR associated protein 12a)인 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에, 항생제 마커 발현 카세트; 타겟팅 유전자의 상동성 기반 DNA 수선(homology-directed DNA repair, HDR)을 위한

주형 서열을 포함하는 공여(donor) 서열 발현 카세트; 타겟팅 유전자의 crRNA 발현 카세트; 및 토마토 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 KU80 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 새로운 생명공학 기술로 큰 주목을 받고 있는 유전자가위를 이용한 유전체 재설계 기법은 인간을 포함한 모든 동물 및 식물의 유전정보를 연구자가 원하는대로 교정 또는 편집하는데 널리 활용되고 있다. 인공 뉴클레아제(engineered nuclease)를 의미하는 유전자가위는 18~40개로 구성된 염기서열을 특이적으로 인식하여 DNA 두 가닥을 절단하도록 고안된 효소이다. 유전자가위를 이용하면 세포 내에 존재하는 특정 유전자에 이중나선손상(double strand break)이 유도되며, 모든 세포에는 이를 효과적으로 복구하는 두 가지 수선체계가 존재한다. 하나는 비상동말단연결(non-homologous end joining, NHEJ)이고, 다른 하나는 상동재조합(homologous recombination, HR)이다. 비상동말단연결은 절단 부위를 그대로 이어주는 효과적인 복구 시스템으로, 이 과정에서 몇 개의 염기가 삽입 또는 제거(insertion and deletion, indel)된다. 상동재조합은 비상동말단연결과는 달리 indel을 수반하지 않는 정교한 DNA 수선체계이다. 일반적으로 절단된 DNA 이중나선손상의 수선은 다른 한쪽의 염색분체(chromatid)와 동일한 염기서열을 가진 DNA를 주형으로 하여 절단된 부분을 복구하기 때문에 염기서열의 삽입이나 제거 등과 같은 에러가 발생하지 않는다(error-free DSB repair mechanism). 이러한 원리를 이용하여 절단된 DNA 주변과 동일한 염기서열(homologues arm)을 포함하는 타겟팅 벡터(targeting vector) 또는 공여 DNA(donor DNA)를 유전자가위와 함께 세포에 도입하면, 원하는 위치에서 손쉽게 특정 유전자의 발현을 유도 또는 제어할 수 있다. 이러한 상동재조합 기반의 유전자 교정을 효과적으로 수행하기 위해서는 원하는 유전자를 정확하게 표적하는 유전자 타겟팅(gene targeting) 효율이 중요한데, 식물에서는 그 효율이 매우 낮은 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, KU80 단백질은 KU70 단백질과 헤테로다이머(heterodimer)를 형성하여 이중나선손상이 일어난 DNA 말단에 결합하여 비상동말단연결(NHEJ) 경로에 관여한다고 알려져 있다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2022-0040983호에는 '편집 효율이 향상된 프라임 편집 기반 유전자 교정용 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제2339732호에는 '올리고뉴클레오타이드 매개 유전자 보수를 사용한 표적화된 유전자 변형의 효율을 증가시키기 위한 방법 및 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 KU80 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 토마토 유래 KU80 단백질의 단편(427-709번째 아미노산 서열)이 CRISPR/Cas 효소(ttCas12a)와 독립적으로; 또는 CRISPR/Cas 효소(ttCas12a)의 N-말단 또는 C-말단에 융합되어; 발현되도록 각각의 벡터를 구축하였고, 상기 벡터를 이용하여 토마토 식물체를 형질전환시킨 후, 유전자 타겟팅(gene targeting, GT) 효율을 분석한 결과, KU80 단백질의 단편(427-709)이 CRISPR/Cas 효소(ttCas12a)와 독립적으로 발현되었을 때는 GT 효율에 영향을 미치지 못한 반면, CRISPR/Cas 효소에 융합되어 발현되었을 때 특히, N-말단에 융합되어 발현되었을 때는 GT 효율이 대조군 대비 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하

는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터로 토마토 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 이용하면 식물체에서 상동재조합 기반의 유전자 타겟팅(gene targeting) 효율을 증가시킬 수 있으므로, 작물에 유용한 대립 유전자의 도입을 매우 정확하게 할 수 있으며 GM 작물 개발시 도입된 유전자를 특정 염색체의 특정 위치에 피라미딩하는 기법으로 사용 가능하며, 다양한 단백질의 태깅(tagging)이나 in planta 단백질 엔지니어링과 같은 기초과학에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질(Genbank No. XP_004229815.1)의 서열을 나타낸 것으로, 빨간색으로 표시한 427-709번째 아미노산 서열이 본 발명에서 사용한 KU80 단백질의 단편 아미노산 서열(서열번호 1)이다.

도 2는 본 발명의 유전자 타겟팅에 사용된 재조합 벡터의 모식도로, A는 *HKT1;2*(sodium transporter 1;2) 유전자를 표적으로 하는 벡터이고, B는 *EPSPS1*(phosphate synthase 1) 유전자를 표적으로 하는 벡터이다. KU80DN은 서열번호 1의 KU80 단백질 단편을 의미한다.

도 3은 본 발명의 KU80 단백질의 단편(KU80DN)이 CRISPR/Cas 효소(ttCas12a)에 융합되지 않고 독립적으로 발현되도록 하는 벡터의 모식도를 나타낸 것으로, A는 *HKT1;2* 유전자를 표적으로 하는 벡터이고, B는 *EPSPS1* 유전자를 표적으로 하는 벡터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 용어 "유전자 타겟팅(gene targeting) 효율"은 상동성 기반 DNA 수선(homology-directed DNA repair, HDR)에 있어서 표적으로 하는 유전자에 대한 표적율을 의미한다.

[0012] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0013] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0014] 용어 "발현 카세트(expression cassette)"는 하기의 세 가지 주요한 요소를 포함한다: i) 프로모터; ii) 상기 프로모터에 작동가능하게 연결되고 상기 발현 카세트가 세포 내로 도입되는 경우 상기 프로모터에 의해 그 전사가 지시되는 것인 "코딩 폴리뉴클레오티드(coding polynucleotide)", 또는 "코딩 서열(coding sequence)(코딩 유전자라고도 함)"로 지칭될 수 있는 제2 폴리뉴클레오티드; 및 iii) 전사의 종료를 지시하고 상기 제2 폴리뉴클레오티드의 바로 하류에 위치하는 종결자(terminator) 폴리뉴클레오티드(전사종결인자라고도 함).

[0015] 본 발명의 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물에 있어서, 상기 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 토마토 유래 KU80 단백질(Genbank No. XP_004229815.1)의 427-709번째 아미노산 서열(서열번호 1, 도 1에서 빨간색으로 표시된 부분)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 또한, 상기 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 엔도뉴클레아제 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 것일 수 있으며, 바람직하게는 엔도뉴클레아제 단백질의 N-말단에 융합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에 따른 토마토 유래 KU80 단백질의 단편은 독립적으로 발현되었을 때 보다 엔도뉴클레아제 단백질에 융합되어 발현되었을 때 유전자 타겟팅 효율을 증진시키는 것이 특징이고, 특히, 엔도뉴클레아제 단백질의 N-말단에 융합되었을 때 유전자 타겟팅 효율을 더욱 증진시키는 것이 특징이다.

[0018] 또한, 상기 엔도뉴클레아제는 바람직하게는 ttCas12a(temperature tolerant CRISPR associated protein 12a)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진용 조성물에 있어서, 상기 재조합 벡터는 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에, 항생제 마커 발현 카세트; 타겟팅 유전자의 상동성 기반 DNA 수선(homology-directed DNA repair, HDR)을 위한 주형 서열을 포함하는 공여(donor) 서열 발현 카세트; 타겟팅 유전자의 crRNA 발현 카세트; 및 토마토 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트;를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 상기 항생제 마커는 하나 이상의 선택성 마커를 포함하는 것으로, 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 제오신(블레오마이신), 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카베니실린(carbenicillin), 카나마이신(kanamycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), G418과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 crRNA(CRISPR RNA)는 표적 유전자를 암호화하는 염기서열 중 표적 DNA에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA)를 의미하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 PAM(protospacer adjacent motif) 자리와 인접하며, 편집하려는 DNA의 10~20bp의 염기 서열과 상보적인 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명은 또한, 토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질의 단편과 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질이 융합된 융합 단백질의 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터로 토마토 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 토마토 식물체의 유전자 타겟팅 효율 증진 방법에 있어서, 상기 KU80 단백질의 단편 및 재조합 벡터는 전술한 것과 같다.

[0025] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0027] **실시예 1. KU80 단백질의 단편 발현 벡터 구축**

[0028] 토마토 식물체에서 KU80 단백질의 단편을 발현시키기 위한 벡터를 구축하기 위하여 토마토(*Solanum lycopersicum*) 유래 KU80 단백질(Genbank No. XP_004229815.1)의 427-709번째 아미노산 서열(서열번호 1, 도 1에서 빨간색으로 표시된 부분)을 암호화하는 DNA를 클로닝하였고, CRISPR/Cas 효소는 ttCas12a(서열번호 2)를 사용하였다. 상기 KU80 단백질의 단편(427-709)이 ttCas12a의 N-말단 또는 C-말단에 융합되어 발현되도록 하였고, 이는 35S 프로모터에 의해 발현되도록 클로닝하였다. 본 발명에서는 토마토 유래 *HKT1;2*(sodium transporter 1;2) 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA 서열(서열번호 3) 또는 *EPSPS1*(phosphate synthase 1) 유전자를 표적으로 하는 가이드 RNA 서열(서열번호 4)을 각각 디자인하여 사용하였고, 이는 U6 프로모터에 의해 발현되도록 클로닝하였다. 대장균 균주(*Escherichia coli* 10-beta)를 LB(Luria-Bertani) 배지에서 37℃, 18~24시간 동안 배양하여 실험에 사용하였으며, 벡터 구축을 위한 모든 클로닝 과정에서는 열 충격(heat shock) 방법을 통해 대장균을 형질전환하였다. 본 발명의 재조합 벡터 전체 디자인 원리 및 모든 클로닝 절차는 MoClo(Weber et al., (2011) PLoS ONE, 6, e16765) 및 Golden Gate(Engler et al., (2014) ACS Synth. Biol. 3, 839-843) 프로토콜을 따랐다(한국공개특허 제10-2022-0043605호 참고). 최종적으로 *HKT1;2* 유전자 또는 *EPSPS1* 유전자를 표적으로 하는 각각 3개의 벡터(KU80 단백질의 단편이 발현되지 않는 대조군 벡터, KU80 단백질의 단편이 ttCas12a의 N-말단에 융합되어 발현되도록 하는 벡터 및 KU80 단백질의 단편이 ttCas12a의 C-말단에 융합되어 발현되도록 하는 벡터)를 제조하였다(도 2).

[0029] 또한, *HKT1;2* 유전자 또는 *EPSPS1* 유전자를 표적으로 하고, KU80 단백질의 단편이 ttCas12a에 융합되지 않고 독

립적으로 발현되도록하는 벡터를 제조하였다(도 3).

[0031] **실시예 2. 토마토 형질전환**

[0032] 본 발명에서는 실시예 1의 모든 벡터를 전기천공법을 사용하여 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV301 균주로 형질전환하였다. *In vitro* 조건에서 배양시킨 토마토 홍광 품종 유래의 자엽(cotyledon) 외식편을 본 발명의 벡터를 포함하고 있는 아그로박테리움을 이용하여 형질전환하였다. 간단하게, 홍광 품종의 멸균된 종자를 1/2x MSO 배지(2.2g MS salts + B5, 20g 수크로스, 0.5g MES(pH 5.7), 7.5g 아가 for 1L)에서 25±2℃, 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건에서 7일간 배양한 후 유묘를 회수하여 자엽 잎을 0.2~0.3cm 크기로 절단한 다음, 각 단편(외식편)을 PREMC 배지[2.2g MS salts + B5, 30g 말토스, 0.1g 아스코르브산, 1.952g MES(pH 5.5), 0.2mg IAA, 7.5g 아가 for 1L; 상기 혼합물을 멸균한 후, 1.0mg 제아틴 트랜스-아이소머, 1mℓ 퓨트레신(1mM), 아세토시링곤(AS) 100 μM 첨가]를 포함하는 평판배지에 1시간 동안 올려 전처리시켰다. 전처리된 외식편을 작은 구멍이 나도록 찌른 후 본 발명의 벡터를 포함하고 있는 아그로박테리움 균주를 사용하여 상온에서 20분간 반응시켜 형질전환시켰다. 형질전환에 사용된 아그로박테리움 균주는 적절한 항생제를 포함하는 LB 배지, 30℃에서 교반시키며 하룻밤 일차 배양시킨 후, OD_{600} 값이 0.6~0.8 수준인 배양액으로부터 원심분리를 통해 세포를 회수하였다. 세포 펠릿은 200 μM의 AS를 포함하는 ABM-MS 액체배지(표 1)로 현탁시킨 후, 토마토 외식편 형질전환에 사용되었다.

[0033] 아그로박테리움으로 형질전환시킨 토마토 외식편은 공배양 배지(ABM-MS 배지, 8g/L 아가, 200μM AS)로 옮겨 25℃에서 2일간 배양시켰다. 그 후, 외식편을 비-선별 배지(NSEL, 표 1)로 옮겨 5일간 배양시킨 후, 선별 배지(SEL5)로 옮겨 배양시켰다. 선별 배지에서 형질전환시킨 외식편의 계대배양은 최적의 재생 효율에 이를때까지 10일 간격으로 수행되었다. 신초가 충분한 길이(1.5~3.0cm)에 이르면, 발근배지(SEL5, 표 1)로 옮겨 온전한 식물체로 재생되도록 유도하였다. 발근배지로부터 성장한 온전한 식물체를 버미큘라이트 포트로 옮겨 26±2℃의 온도 및 16시간 명/8시간 암의 광주기를 가진 비닐하우스 내의 토양으로 옮겨지기 전까지 경화시켰다.

표 1

[0034] 토마토 외식편 배양에 사용된 배지 조성

AMB (for 1L)	MS (for 1L)	ABM-MS	NSEL (for 1L)	SEL5 (for 1L)
K_2HPO_4: 2.212 g KH_2PO_4: 1.130 g NH_4NO_3: 1.496 g KCl: 0.149 g $MgSO_4$: 0.308 g $CaCl_2$: 0.015 g $FeSO_4$: 0.003 g Glucose: 20 g MES: 3.904 g pH 5.5	MS salts + B5 vitamins: 2.2 g Sucrose: 5 g pH 5.5	Mix ABM and MS as 1:1 ratio. For semisolid ABM-MS, add 8g/L of agar. Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 1.0 mg/L IAA: 0.2 mg/L putrescine (1mM): 1ml AS (200μM)	MS salts + B5 vitamins: 4.4 g MES: 0.976 g Maltose: 30 g IAA: 0.2 mg pH = 5.7 Agar: 8 g Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 2.0 mg Timentin: 300 mg Putrescine (1mM): 1ml	MS salts + B5 vitamins: 4.4 g MES: 0.976 g Maltose: 30 g IAA: 0.5 mg pH = 5.7 Agar: 8 g Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 2.0 mg Kanamycin: 80 mg Timentin: 300 mg Putrescine (1mM): 1ml

[0036] **실시예 3. KU80 단백질의 단편이 ttCas12a에 융합되어 발현되었을 때의 유전자 타켓팅 효율 분석**

[0037] 본 발명의 KU80 단백질의 단편이 ttCas12a의 N-말단 또는 C-말단에 융합되어 발현되도록 하는 벡터를 이용하여 토마토 식물체를 형질전환시킨 후, 토마토 식물체의 잎을 채집하여 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy Plant mini kit(Qiagen)를 사용하여 총 게노믹 DNA를 추출하였다. 이후, 추출한 DNA를 주형으로 한 MiniSeq sequencing system을 이용하여 시퀀싱 분석을 수행하였고, 시퀀싱 결과를 이용한 CRISPResso2 분석(http://crispresso2.pinellolab.org)을 통해 *HKT1;2* 유전자 또는 *EPSPS1* 유전자에 대한 Miniseq HDR rates 및

유전자 타겟팅(gene targeting, GT) 효율을 분석하였다.

[0038] 그 결과, KU80 단백질의 단편이 ttCas12a에 융합되어 발현되었을 때의 GT 효율은 KU80 단백질의 단편이 발현되지 않은 대조군 대비 증가하는 것을 확인하였다. 특히, *HKT1;2* 유전자의 경우에는 KU80 단백질의 단편이 ttCas12a의 N-말단에 융합되어 발현되었을 때(p35S-KU80DN-ttLbCas12a)의 GT 효율이 대조군(p35S(without intron)-ttLbCas12a) 대비 약 2배 증가하였고, *EPSPS1* 유전자의 경우에는 KU80 단백질의 단편이 ttCas12a의 N-말단에 융합되어 발현되었을 때의 GT 효율이 대조군 대비 약 1.7배 증가하는 것을 확인하였다(표 2).

표 2

[0039] KU80 단백질의 단편이 ttCas12a에 융합되어 발현되었을 때의 유전자 타켓팅 효율 분석 결과

No.	Target gene	Vector	Total reads	Miniseq HDR rates (%)	GT efficiency*
1	*HKT1;2*	p35S(with intron)-ttLbCas12a	173270	0.046	0.8
2		p35S(without intron)-ttLbCas12a	189180	0.055	1.0
3		**p35S-KU80DN-ttLbCas12a**	197040	0.110	2.0
4		p35S-ttLbCas12a-KU80DN	162043	0.090	1.6
5	*EPSPS1*	p35S(with intron)-ttLbCas12a	141059	0.044	0.3
6		p35S(without intron)-ttLbCas12a	127331	0.138	1.0
7		**p35S-KU80DN-ttLbCas12a**	126917	0.238	1.7
8		p35S-ttLbCas12a-KU80DN	126065	0.059	0.4

[0040] * GT efficiency: Fold change compared to p35S(without intron)-ttLbCas12a

[0042] **실시예 4. KU80 단백질의 단편이 독립적으로 발현되었을 때의 유전자 타켓팅 효율 분석**

[0043] 본 발명의 KU80 단백질의 단편이 ttCas12a에 융합되지 않고 독립적으로 발현되도록 하는 벡터를 이용하여 토마토 식물체를 형질전환시킨 후, 토마토 식물체의 잎을 채집하여 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy Plant mini kit(Qiagen)를 사용하여 총 게노믹 DNA를 추출하였다. 이후, 추출한 DNA를 주형으로 한 MiniSeq sequencing system을 이용하여 시퀀싱 분석을 수행하였고, 시퀀싱 결과를 이용한 CRISPResso2 분석(http://crispresso2.pinellolab.org)을 통해 *HKT1;2* 유전자 또는 *EPSPS1* 유전자에 대한 유전자 타켓팅(GT) 효율 및 Indel 돌연변이 비율을 분석하였다.

[0044] 그 결과, KU80 단백질의 단편이 ttCas12a에 융합되지 않고 독립적으로 발현되었을 때(p35S-ttLbCas12a-p35S-KU80DN)의 GT 효율은 KU80 단백질의 단편이 발현되지 않은 대조군(p35S-ttLbCas12a)과 유사한 반면, Indel 돌연변이 비율은 대조군 대비 증가하는 것을 확인하였다(표 3).

표 3

[0045] KU80 단백질의 단편이 독립적으로 발현되었을 때의 유전자 타켓팅 효율 분석 결과

No.	Target gene	Vector	Total reads	GT efficiency(%)	Indel rate(%)
1	*HKT1;2*	p35S-ttLbCas12a	69396	0.079	17.644
2		p35S-ttLbCas12a -p35S-KU80DN	67832	0.060	28.305
3	*EPSPS1*	p35S-ttLbCas12a	55306	0.085	13.454
4		p35S-ttLbCas12a -p35S-KU80DN	67890	0.043	13.765

[0047] 상기 결과를 바탕으로, 본 발명에 따른 KU80 단백질의 단편이 CRISPR/Cas 효소(ttCas12a)와 독립적으로 발현되었을 때는 GT 효율에 영향을 미치지 못한 반면, CRISPR/Cas 효소(ttCas12a)에 융합되어 발현되었을 때 특히, N-말단에 융합되어 발현되었을 때는 GT 효율이 대조군 대비 증가하는 것을 알 수 있었다.

도면

도면1

> Tomato KU80_XP_004229815.1 protein sequence

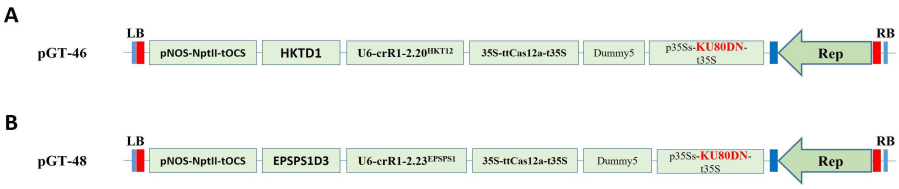
marnkealvlvidvgpsmhsvlpeiekvcslliqkklvfsrydevgfvlfgtadtknelkeeiggyehvtvlrnikvvdedlvd
alqklprgsvpgdfldaivvgtdmlikfgrtnkakrrlclitnavsrikdpfegtkedqvntiatqmtaqgikmdcvivrmkqd
retnrsimeendflmsvfsnkssskvvyvesptsllgalrtrnispvtiyrgdleisaqlkikvwvykktseekfptlkkysertp
ttdkfgahdikveyenkiiedpnkvvppeqrikgfqygpqvvpissaeleavkfkpeksvkllgftdssnimrhyylkdvnif
iaepgnknailalsalaramkemnkvaivrcvwrqgqgnvvvgvltpnvsdkdntpdsfyfnilpfaedvrdfqfpsfsnlp
ssmqpnekqqdaadklvqmldlappgkqevlspdftpnpvleryyrylnlkskhpdaavppldetlrkitepdvellsqn
ksiieelrrsfelkdnpklkksarrikerpsgsdeeieefnkdadvkaidsmeysaktevekvgdvnpvkdfedmlsrrdnp
kwiskaiqdmknrifdlvenscdgdtfhkalqclvalrkgcileqepkqfndflchlskfcqekdlrsfclyltsheitlitkaeap
dseisehearsfmvkpeldsqnmkseakaeddimsiylggk

Red sequence: 427-709 aa, 서열번호 1

도면2



도면3



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.