

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2017년 10월 26일 (26.10.2017) **WIPO | PCT**

WO 2017/183936 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12R 1/89* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004268

(22) 국제출원일: 2017년 4월 21일 (21.04.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0049439 2016년 4월 22일 (22.04.2016) KR
10-2017-0041761 2017년 3월 31일 (31.03.2017) KR
10-2017-0041762 2017년 3월 31일 (31.03.2017) KR

(71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: 진언선 (JIN, Eon Seon); 04582 서울특별시 중구 퇴계로90길 74, 103동 802호(신당동, 래미안신당하이베르), Seoul (KR). 배상수 (BAE, Sang Su); 06592 서울특별시 서초구 사평대로 240, 502동 103호(반포동, 미도2차아파트), Seoul (KR). 백광열 (BAEK, Kwang Ryul); 10449 경기도 고양시 일산동구 경의로 33, 현대밀라트1차B동 811호 (백석동), Gyeonggi-do (KR). 김덕형 (KIM, Duk

Hyoung); 14694 경기도 부천시 소삼로 47, 105동 201호 (소사본동, 부천소사역 푸르지오), Gyeonggi-do (KR). 정주연 (JEONG, Joo Yeon); 02532 서울특별시 동대문구 사가정로 148, 102동 1503호 (전농동, 전농 SK아파트), Seoul (KR).

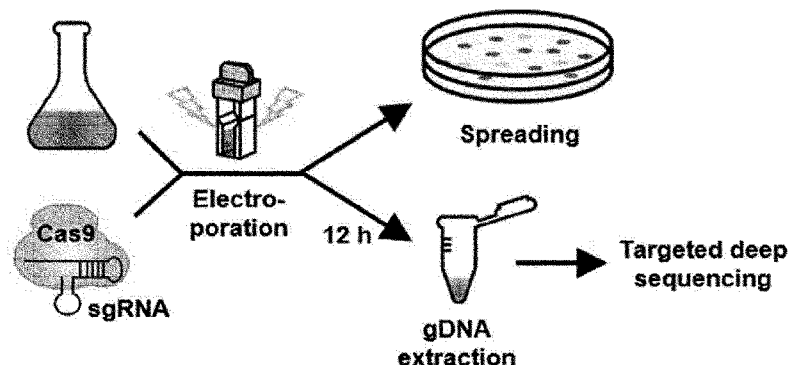
(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울특별시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

(54) Title: METHOD FOR CORRECTING MICROALGAE USING RGEN RNP

(54) 발명의 명칭: RGEN RNP를 이용한 미세조류의 교정 방법



(57) Abstract: The present invention provides: a method for correcting a microalgae gene without DNA introduction by using a RNA-guided engineered nuclease (RGEN) RNP complex; and a microalgae variant with a corrected gene. The gene correction method according to the present invention has an advantage in that a desired gene can be selectively and accurately corrected without DNA introduction. In addition, the present invention is directed to novel algae with an improved pigment producing ability, and the use of a mutant strain of the present invention can produce carotenoid-based pigments, specifically, xanthophylls, through the consumption of less energy, thus leading to an efficient production of pigments at the industrial level. In addition, the present invention can be applied as a raw material for food, health functional food, and medicine containing pigments. Especially, a procedure of manufacturing the mutant strain is not assumed to be regulated by GMO legislation since DNA fragments are not likely to be inserted into a target nucleotide sequence or a non-target nucleotide sequence. Therefore, it is expected that the present invention will have a great economic effect in an industrial aspect in which lutein and zeaxanthin are produced using microalgae.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 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. 또한, 본 발명은 색소 향상된 색소 생산능을 갖는 새로운 조류에 관한 것으로, 본 발명의 변이주를 이용하면 적은 에너지를 소모하여, 카로티노이드계 색소, 구체적으로 잔토필을 생산하는 것이 가능하므로 산업 수준에서 효율적으로 색소를 생산할 수 있다. 또한, 색소가 포함되는 식품, 건강기능식품 및 의약품의 원료로 적용이 가능하다. 특히, 상기 변이주가 제작되는 과정은 DNA 조각이 표적 염기서열 또는 표적외 염기서열 내에 삽입될 가능성이 없기 때문에 GMO로 규제되지 않을 것으로 예상되므로 미세조류를 이용하여 루테인과 지아잔틴을 생산하는 산업적인 측면에서 큰 경제 효과를 낼 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: R G E N R N P 를 이용한 미세조류의 교정 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 RGEN RNP를 이용한 미세조류의 교정 방법에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 RGEN RNP를 이용하여 개발된 색소 생산능을 갖는 조류, 상기 조류를 포함하는 색소 조성물 그리고 상기 색소를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [3]

배경기술

- [4] 미세조류(microalgae)는 이산화탄소와 물을 원료로 광합성을 하는 단세포 생물로서 고등식물보다 세포분열 및 성장의 주기가 매우 짧아(약 5-8시간) 건강보조식품, 향노화 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.
- [5] 한편, 크리스퍼 유전자 가위(RNA-guided engineered nuclease; RGEN)는 2013년 처음 개발된 이래, 지난 2년 여간 비약적으로 발전하여 인간세포는 물론, 가축, 곤충, 버, 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.
- [6] 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.
- [7] 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 형질 전환시키는 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.

- [8] 황반변성이란 눈의 안쪽 망막의 중심부에 위치한 신경조직인 황반에 변성이 일어나 시력장애를 일으키는 질환으로, 시세포의 대부분이 황반에 모여있고 물체의 상이 맺히는 곳도 황반의 중심이므로 황반은 시력에 대단히 중요한 역할을 담당하고 있다. 황반변성을 일으키는 가장 많은 원인은 연령증가(연령관련 황반변성)를 들 수 있고, 가족력, 인종, 흡연과 관련이 있다고 알려져 있다. 황반부는 중심 시력을 담당하는 곳이므로, 이 이곳에 변성이 생기면 시력감소, 중심암점, 사물이 찌그러져 보이는 증상인 변시증 등이 나타난다. 황반변성은 크게 비삼출성(건성)과 삼출성(습성)으로 구분하게 되는데 비삼출성인 경우 망막 및 맥락막 위축이 나타나는 후기를 제외하고는 대부분 시력에 큰 영향을 주지 않고, 망막 하에 드루젠이라는 노란 침착물이 보이는 단계이나, 망막 하 출혈이나 망막 하액, 색소상피박리 등이 나타나는 삼출성의 경우에는 이러한 병변의 위치가 황반 아래 또는 황반에 바로 연하여 있는 경우에는 초기부터 시력저하가 나타난다. 삼출성 황반변성의 경우 전체 황반변성의 10~20% 정도를 차지하지만, 만일 삼출성 황반변성을 치료하지 않고 그대로 방치해두면, 시력이 빠르게 저하되어 많은 환자들이 진단 후 2년 내에 실명에 이르게 된다. 황반변성을 예방하기 위해서는 정기적인 안저 검사를 통해 황반부의 이상을 초기에 발견과 비만, 흡연, 고혈압 등의 조절 가능한 인자를 줄이도록 애쓰는 것이 중요하다. 흡연은 맥락막 순환에 손상을 주어 혈중 항산화 인자를 떨어뜨리고, 맥락막 혈관수축을 야기하여 저산화 손상을 야기하므로, 황반변성의 위험성이 있는 환자는 반드시 금연이 필요하다. 또한, 황반색소(lutein, zeaxanthin)는 노화에 의한 손상을 감소시켜 망막을 건강하게 유지하는 역할을 하므로, 야채와 과일을 통해 충분히 섭취하거나, 상용화된 비타민제를 복용함으로써 황반변성의 예방에 도움을 줄 수 있다.
- [9] 황반색소는 망막의 중앙부분에서 기인한 노인성 시력감퇴를 줄여주고, 밝은 광선에 의한 망막조직의 손상을 막아주는 역할을 하는 것으로 대표적인 예로 카로티노이드의 산소화에 의해 생산되는 카로티노이드계의 옥시카로티노이드 색소로 잔토필(크산토필, xanthophyll)가 있다. 잔토필류에 속하는 색소로는 루테인(lutein) 또는 지아잔틴(zeaxanthin) 등이 있다. 루테인은 몸속에서 자연적으로 생성되는 산소 자유라디칼(free radical)에 의해서 손상되는 눈의 내부를 보호하는 항산화제로서 활동하며, 암종양을 공급하는 혈관의 성장을 줄여 암세포를 죽이고, 유방, 결장, 폐, 난소암, 피부암 예방에 약간의 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [10] 동물은 잔토필을 생성할 수 없고, 음식의 섭취를 통해서만 얻을 수 있는데, 이러한 잔토필은 식물의 잎사귀, 꽃, 과일 등의 녹색부에 엽록소, 카로틴과 같이 존재한다. 최근 잔토필류를 포함하는 눈 건강을 위한 건강기능식품 등이 각광받고 있다.
- [11] 지아잔틴과 루테인의 원료로는 기존의 마리골드 꽃이 대표적이며, 다른

고등식물에서 추출하는 것도 연구되어 있다. 그뿐만 아니라, 박테리아에서 색소 합성 기작을 유전적으로 변이시켜 지아잔틴과 루테인을 생산하기도 한다.

미세조류로부터 이들 색소를 얻는 연구도 진행된 바 있다. 이러한 종래의 원료물질 중 마리골드 꽃은 생산을 위해 화초를 육종하기까지 시간이 오래 걸리는 단점이 있고, 생산을 위한 토지 면적에 비해서 생산량이 많지 않아 생산 단가가 높은 문제가 있다.

- [12] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 고등식물 시스템을 대체하기 위한 박테리아 시스템을 이용해 색소 합성 기작을 삽입한 지아잔틴과 루테인 생산 조류 개발이 이루어졌지만, 박테리아에서 얻어지는 색소는 궁극적으로 식품첨가물로 이용되기에는 부적합하다는 문제점이 있다. 또한, 유전자 삽입 기술 등을 이용한 유전자 재조합 식품(GMO; genetically modified organism)은 국내에서 선호되고 있지 않기 때문에 소비자들의 인식이 중요한 식품첨가물 시장에는 치명적 단점으로 작용하며, 고등식물 시스템과 마찬가지로 박테리아 배양액이나 바이오 리액터 등을 유지하는 비용이 많이 요구될 수 있는 문제가 있다.

- [13] 미세조류로부터 이들 색소를 얻는 방법의 경우, 종래의 미세조류는 개량이 되지 않은 야생형으로 루테인의 함량은 일정량 있지만 지아잔틴의 함량이 광량에 따라 매우 낮기 때문에 최적의 생산 조류로 이용하기에는 한계가 있었다.

[14] [선행기술문헌]

[15] [특허문헌]

[16] 국내 특허 출원 제2014-7007656호

[17] 국제 공개 특허 제2015-086795호

[18]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [19] 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.

- [20] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 종래 식품의 원료로 사용되는 잔토피를 대체할 수 있는 원료 또는 종래의 원료 생산방법을 대체할 수 있는 방법을 제공하는 것으로, 구체적으로 잔토피 생산능, 특히 루테인 및 지아잔틴 생산능이 우수한 미생물, 이를 포함하는 조성물 및 이를 이용한 잔토피(xanthophyll)의 생산방법을 제공하는 것이다.

[21]

과제 해결 수단

- [22] 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 세포 수, 가이드 RNA 농도, Cas9 단백질 농도의 최적 조건을 확립하여 적합한 미세조류의 유전자 교정방법을 개발하게 되었다.

- [23] 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.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 교정 방법에 의해 제조된 미세조류 변이체를 제공한다.
- [25] 게다가, 상기와 같은 또 다른 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, 종래의 클라미도모나스 레인하르티아이 조류보다 황반색소 생산량이 높은 변이주를 개발, 이를 이용한 최적의 색소 생산 방법을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [26] 이러한 측면에서 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 WT의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지며, 잔토피 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 WT의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지며, 잔토피 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 WT의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 염기 A를 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지며, 잔토피 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 제공한다.
- [29] 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 3종은 각각 잔토피 생산능을 가질 수 있다.
- [30] 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 3종은 각각 루테인(lutein)과 지아잔틴(zeaxanthin); 그리고 엽록소 b(chlorophyll b), 엽록소 a(chlorophyll a) 및 베타-카로틴(β -carotene)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 색소의 생산능을 가질 수 있다.
- [31] 또한, 본 발명은 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주의 배양물을 제공한다.

- [32] 또한, 본 발명은 상기 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 색소 조성물을 제공한다.
- [33] 또한, 본 발명은 상기 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 경구 투여용 조성물을 제공한다.
- [34] 또한, 본 발명은 상기 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 사료 또는 사료첨가제용 조성물을 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 상기 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 식품 또는 식품첨가제용 조성물을 제공한다.
- [36] 또한, 본 발명은 상기 변이주를 이용한 색소 생산방법을 제공한다.
- [37] 또한, 본 발명은 상기 변이주를 배양하는 단계를 포함하는 식품 또는 사료 원료 생산방법을 제공한다.

[38]

발명의 효과

- [39] 본 발명은 미세조류 클라미도모나스 레인하르티아이(*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.
- [40] 이 방법을 적용하여 클라미도모나스의 *CpFTSY*와 *ZEP* 유전자를 타겟으로 각각의 유전자가 녹아웃된 돌연변이체를 제조하였으며 두 유전자가 모두 녹아웃된 $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 이중 돌연변이체도 연속적인 돌연변이를 통해 제조할 수 있었다.
- [41] 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.
- [42] 상기 교정 방법은 미세조류의 산업적 이용 측면에서 이산화탄소의 저감, 바이오 디젤이나 항산화 물질의 생산 및 효율 향상 등 다양한 산업적 응용분야에서 요구되는 클라미도모나스 균주를 개발하는데 효과적으로 적용될 수 있다. 또한, 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.

[43] 특히, 본 발명을 통해 미세조류 클라미도모나스 레인하르티아이에서 외부 DNA의 도입이 없는 크리스퍼 유전자 가위 기술(RGEN RNPs)을 이용하여 ZEP 유전자를 녹아웃 시켜 색소 생산 돌연변이체 3종을 제작하였고 기존 야생형과 본 발명의 변이주 3종의 세포적 특성 비교하였을 때 산업적으로 유용한 색소인 지아잔틴의 양이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 상기 변이주가 제작되는 과정은 DNA 조각이 표적 염기서열 또는 표적외 염기서열 내에 삽입될 가능성이 없기 때문에 GMO로 규제되지 않을 것으로 예상되므로 미세조류를 이용하여 루테인과 지아잔틴을 생산하는 산업적인 측면에서 큰 경제 효과를 낼 수 있을 것으로 기대된다.

[44]

도면의 간단한 설명

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

[46] 도 2는 클라미도모나스 레인하르티아이 CC-4349 *CpFTSY* 유전자를 표적하기 위해 디자인된 네 개의 타겟 서열을 정리한 것이다[Cas-디자이너 (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 complement한 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.].

[47] 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 나타낸다].

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

- [49] 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 ΔCpFTSY 돌연변이주의 단일-세포 콜로니의 사진이고, b: 야생형 (WT) 및 ΔCpFTSY 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 3개의 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 나타낸다. 우측 열은 삽입 (+) 또는 결실된 (-) 염기의 수를 나타낸다.]
- [50] 도 6은 RGEN RNPs에 의한 ΔCpFTSY 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].
- [51] 도 7은 클라미도모나스 레인하르티아이 CC-4349 ZEP 유전자를 표적하기 위해 디자인된 다섯 개의 타겟 서열을 정리한 것이다[Cas-디자이너 (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 complement한 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.].
- [52] 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 나타낸다].
- [53] 도 9 ZEP 유전자 녹아웃을 연구하기 위한 수백 개의 콜로니들에 대한 클로로필(Chl) 형광을 측정한 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 ΔZEP 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].

[54] 도 10은 RGEN RNPs에 의한 ΔZEP 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].

[55] 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 ΔZEP 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*; α -Car, α -카로틴; β -Car, β -카로틴].

[56] 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 ΔZEP 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].

[57] 도 12는 RGEN RNPs에 의한 ΔZEP 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].

[58] 도 13은 ΔZEP 돌연변이체 1($\Delta Z1$)에서 *CpFTSY* 유전자 녹아웃을 유도하기 위한 수백 개의 콜로니에 대한 육안 착색 조사한 결과를 나타낸 사진이다[a: RGEN RNPs에 의한 ΔZEP 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].
- [59] 도 14a 및 14b는 RGEN RNPs에 의한 ΔZEP 돌연변이체를 대상으로 RGEN RNPs에 의한 *CpFTSY* 유전자의 연속적인 이중 돌연변이체의 *FTSY* 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과이다.
- [60] 도 15는 WT, RGEN RNPs에 의한 ΔZEP 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].
- [61] 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 ~20,000쌍의 단부 판독값을 얻었다.].
- [62] 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, ΔZEP , $\Delta CpFTSY$ 및 $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 돌연변이체의 표현형. 세포들은 고광 ($500 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) 조건 하에서 광 독립영양학적으로 성장되었다. 세포 밀도는 10×10^6 세포/mL였다. 야생형 (WT) 및 RGEN-유도된 형질도입주에서 ZEP 및 FTSY 단백질의 웨스턴-블롯 분석. 샘플의 로딩 대조군으로 클라미도모나스의 ATP 합성효소의 β -하위 유닛 (ATP β)을 사용한 단백질의 면역-검출.].
- [63] 도 18은 실시예에 사용된 프라이머를 정리하여 보여준다.
- [64] 도 19는 RGEN RNPs에 의하여 유도된 ZEP 및/또는 *CpFTSY* 유전자의 targeted indel mutations (ΔZEP , $\Delta CpFTSY$, $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 이중 돌연변이체) 관련 사항을 보여준다.
- [65] 도 20은 야생형 (파란색), ΔZEP (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*; α -Car, α -카로틴; β -Car, β -카로틴].
- [66] 도 21은 야생형 (파란색) 및 ΔZEP (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.
- [67] 도 22는 25°C에서 고광($700 \mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) 하에서 5% CO₂를 함유하는 공기가 있는 HS 배지에서 배양된 야생형 및 돌연변이체의 성장 곡선을 나타낸 것이다.

- [68] 도 23은 저광(50 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) 조건 하에서 야생형과 ΔZEP , ΔCpFTSY 및 $\Delta\text{ZEP}/\Delta\text{CpFTSY}$ 돌연변이체의 광합성 활성 및 색소 함량의 정량 결과를 보여준다[Vio, 비올라잔틴; An, 안테라잔틴; Zea, 지아잔틴. 데이터는 3개의 복제물로부터의 평균 $\pm$ 표준편차이다].
- [69] 도 24는 Cas9 단백질 및 sgRNA의 상이한 인큐베이션 시간 및 다양한 농도 조건에서의 돌연변이 빈도를 나타낸 것이다[a: RGEN RNP (200 μg 의 Cas9 및 140 μg 의 sgRNA)가 50×10^4 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'-CGATCTTCAGAGCAGTGCGG-3')를 사용한 돌연변이 (삽입 및 결실; indel) 빈도가 12시간 동안 인큐베이션된 후 표적화된 심층 서열화에 의해 측정되었다].
- [70] 도 25는 본 발명의 유전자 교정방법에 사용된 Cas9 단백질 서열을 나타낸 것이다.
- [71] 도 26은 본 발명에서 적용된 기술과 방법에 대한 전반적인 요약을 나타낸 것이다.
- [72] 도 27은 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형의 ZEP(Zeaxanthin epoxidase) 유전자에 대한 정보를 나타낸 것이다.
- [73] 도 28은 클라미도모나스 레인하르티아이 ZEP 유전자를 표적하기 위해 디자인된 다섯 개의 타겟 서열을 정리한 것이다[Cas-디자이너(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 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 complement한 관계의 시퀀스를 의미한다. '프레임-외 스코어'는 깨진 이중-가닥 DNA가 미세 상동성-매개된 단부 연결 (MM EJ) 경로에 의해 수선될 때 발생하는 프레임쉬프트-유도 결실의 가능성을 가리킨다. '표적-오프 부위의 #'은 전체 게놈을 통틀어 미스매치된 서열의 수를 의미한다. 타겟서열에 나머지 sgRNA 서열 (Gtttttagctagaaatagcaagttaaataaggctagtccggttatcaacttgaaaaagtgccaccgagtcggtgc) 연결하면 전체 sgRNA임].
- [74] 도 29는 DNA-free RGEN RNPs에 의해 유도된 ZEP 유전자의 돌연변이를 나타낸 것이다[a: 각 sgRNA에 대한 RGEN-트랜스펙션된 세포 및 야생형의 돌연변이 (삽입 및 결실; indel) 빈도가 표적화된 심층 서열화(Targeted deep sequencing)에 의해 측정되었다. Indel 빈도는 약 0.46%까지 측정되었다. b: a의 Targeted deep sequencing 분석 결과에서 관찰된 가장 효율이 높은 세 번째

- sgRNA로부터 얻어진 대표적인 돌연변이체 DNA 서열(RGEN3), 즉 TCCGGCGAACGCACCTGGATGGG. Targeted deep sequencing 분석 결과에 의해 타겟 서열에서 확인된 다양한 indel 패턴, PAM 서열의 3nt 상류에서 나타났다. 20-bp 표적 서열은 밑줄로 표시되고 PAM 서열은 굵게 표시하였다.]
- [75] 도 30은 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형 조류, 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 의 형태적인 특성을 나타내는 사진이다[a: ZEP 유전자 녹아웃을 연구하기 위한 수백 개의 콜로니들에 대한 클로로필(Chl) 형광의 측정, b: 한천이 들어간 고체 TAP 배지에서 Colony 상태로 배양된 사진, c: HS 배지에서 액체 배양한 후 동일한 농도(OD 750 = 1)로 맞췄을 때의 상태를 보여주는 사진].
- [76] 도 31은 DNA-free RGEN RNPs에 의해 발생된 세 개의 ZEP 돌연변이체에서 실제적인 ZEP 유전자 위치의 표적 DNA 서열 변화를 확인한 것이다[a: wildtype, b: ZEP mutant 1($\Delta Z1$), c: ZEP mutant 2($\Delta Z2$) d. ZEP mutant 3 ($\Delta Z3$)].
- [77] 도 32a는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 $\Delta Z1$ 의 ZEP 유전자에 대한 정보를 나타낸 것이다.
- [78] 도 32b는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 $\Delta Z2$ 의 ZEP 유전자에 대한 정보를 나타낸 것이다.
- [79] 도 32c는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 $\Delta Z3$ 의 ZEP 유전자에 대한 정보를 나타낸 것이다.
- [80] 도 33은 독립영양 배양 용기를 나타낸 것이다.
- [81] 도 34는 혼합영양 배양 용기를 나타낸 것이다.
- [82] 도 35는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형, 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 의 색소 프로파일을 나타내는 HPLC 분석 그래프이다[neo+lor: 네오잔틴(neoxanthin) + 로로잔틴(loroxanthin), vio: 비올라잔틴(violaxanthin), an: 안테라잔틴(antheraxanthin), lut: 루테인(lutein), zea: 지아잔틴(zeaxanthin), chl a: 엽록소 a(chlorophyll a), chl b: 엽록소 b(chlorophyll b), α -car: 알파-카로틴(α -carotene), β -car: 베타-카로틴(β -carotene)].
- [83] 도 36은 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형, 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 의 시간에 따른 성장곡선(부피당 세포 수, cells/ml)을 나타내는 그래프이다.
- [84] 도 37은 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형(WT)과 ZEP 녹아웃 돌연변이체 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 의 시간에 따른 루테인과 지아잔틴 색소 생산량을 비교한 그래프이다[a: 시간에 따른 루테인의 생산량(mg/L), b: 시간에 따른 지아잔틴의 생산량(mg/L), c: 시간에 따른 루테인과 지아잔틴의 생산량의 합(mg/L)].
- [85] 도 38은 지아잔틴과 루테인의 함량이 높은 것으로 알려져 있는 고등식물들과 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형(WT), 클라미도모나스 레인하르티아이 ZEP 녹아웃 돌연변이체 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 와의 지아잔틴과

루테인의 함량 비교한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [86] 다만, 본 발명은 다양한 변형을 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 특정된 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변형, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [87] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [88] 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.
- [89] 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.
- [90] 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.
- [91] 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 1×10^4 개 내지 1×10^7 개 또는 1×10^5 개 내지 1×10^6 개를 사용하는 것이 형질전환 효율을 높이기 위한 이유로 바람직하다.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] 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.

- [95] Cas9 단백질은 스트렙토코커스 sp. (*Streptococcus* sp.), 예컨대, 스트렙토코커스 피요게네스 (*Streptococcus pyogenes*) 유래의 것(SwissProt Accession number Q99ZW2)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 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.
- [97] 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-분취(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 테크놀로지스(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.

- [98] 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, 엔도뉴클레오타이드 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.
- [99] 예컨대, Cas9 단백질을 포함하는 복합체 (Cas9 시스템)은 목적하는 유전자 교정을 위하여 두 개의 가이드 RNA, 즉, 유전자의 표적 부위와 혼성화 가능한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 CRISPR RNA (crRNA)와 추가적인 *trans*-activating crRNA (tracrRNA)를 필요로 하며, 이들 crRNA와 tracrRNA는 서로 결합된 이중가닥 crRNA:tracrRNA 복합체 형태, 또는 링커를 통하여 연결되어 단일 가닥 가이드 RNA (single-stranded guide RNA; sgRNA) 형태로 사용된다.
- [100] 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.
- [101] 일 예에서, *Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 단백질을 포함한 Cas9 시스템에 사용되는 crRNA는 다음의 일반식 1로 표현될 수 있다:
- [102] 5'-(N_{cas9})_l-GUUUUAGAGCUA-(X_{cas9})_m-3' (일반식 1)
- [103] 상기 일반식 1에서,
- [104] N_{cas9}는 유전자 표적 부위와 혼성화 가능한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 타겟팅 서열 부위로서 표적 유전자의 표적 부위에 따라서 결정되는 부위이며, l은 상기 타겟팅 서열 부위에 포함된 뉴클레오타이드 수를 나타내는 것으로 18 내지 22의 정수, 예컨대 20일 수 있고;
- [105] 상기 타겟팅 서열 부위의 3' 방향으로 인접하여 위치하는 연속하는 12개의 뉴클레오타이드(GUUUUAGAGCUA)를 포함하는 부위는 crRNA의 필수적 부분이다.
- [106] 또한, X_{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.
- [107] 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).

[108] 일 예에서, 상기 X_{cas9} 는 UGCUGUUUUG를 포함할 수 있으며, 생략될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[109] 또한, *Streptococcus pyogenes* 유래의 Cas9 단백질을 포함한 Cas9 시스템에 사용되는 tracrRNA는 다음의 일반식 2로 표현될 수 있다:

[110] 5'-(Y_{cas9})_p-UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (일반식 2)

[111] 상기 일반식 2에서,

[112] 60개의 뉴클레오타이드

(UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGC)를 포함하는 부위는 tracrRNA의 필수적 부분이고,

[113] Y_{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.

[114] 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.

[115] 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.

[116] 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.

[117] 상기 tracrRNA 또는 sgRNA는 tracrRNA의 필수적 부분(60nt)의 3' 말단에 5개 내지 7개의 우라실(U)을 포함하는 종결부위를 추가로 포함할 수 있다.

[118] 일 예에서 상기 가이드 RNA는 "Kim, H. & Kim, J.-S. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 321-334 (2014)"에 기재된 내용을 참조하여 준비할 수 있다.

- [119] 다른 예는 미세조류의 특정 유전자의 교정 (삽입 및/또는 제거)을 위한 가이드 RNA를 제공한다.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 또한, 본 발명은 1×10^4 개 내지 1×10^7 개의 미세조류에 도입 시 가이드 RNA 20 ~ 200 μg (더욱 바람직하기로는 100 ~ 180 μg) 및 Cas 단백질 30 ~ 300 μg (150 ~ 250 μg)의 RGEN RNP 복합체를 사용하는 것이 보다 바람직하다.
- [123] 또한, 본 발명은 상기 유전자 교정방법에 의해 제작된 유전자 교정 미세조류 변이체를 제공한다.
- [124] 상기 용어 "유전자 교정"은 유전자의 전부 또는 특정 부위가 제거 및/또는 임의의 뉴클레오타이드의 삽입에 의하여 변이가 유발된 것을 의미한다.
- [125] 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.
- [126] 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.
- [127] 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.

- [128] 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.
- [129] 상기 표적 유전자에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체는 앞서 설명한 바와 같다.
- [130] 상기 미세조류 변이체 제조 방법에 의하여 미세조류 변이체를 제조하는 경우, DNA 운반체를 사용하지 않으므로, 유전자 변형 유기체의 위험성이 없다는 이점이 있다.
- [131] 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 (50×10⁴ cells (*Chlamydomonas*)에 약 200 μg의 Cas9 단백질 및 약 140 μg의 sgRNA 사용 시). 상기 성공률은, 기존의 미세조류에서 Cas9 단백질을 이용해 성공적으로 형질전환체를 얻은 사례가 없었던 것을 고려할 때, 현저하게 개선된 수치라고 할 수 있다.
- [132]
- [133] 본 발명은 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*) 변이주에 관한 것이다.
- [134] 상기 클라미도모나스 레인하르티아이는 단세포 녹조류(*Chlorophyta*)로서 민물, 해양 등의 다양한 환경에 분포하는 진핵생물이며, 6 ~ 8시간의 doubling time을 가지고 있다. 또한, 가장 널리 보급되어 있는 미세조류 모델 시스템들 중 하나로, 바이오리액터에서 생산이 가능하다.
- [135] 상기 변이주는 일반적인 돌연변이 처리가 아닌 RGNE RNPs를 이용하여 즉, 외부 DNA의 도입이 없는 크리스퍼 유전자 가위 기술을 이용하여 ZEP(Zeaxanthin epoxidase) 유전자를 녹아웃시켜 제작되었다.
- [136] 상기 변이주는 서열번호 13으로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 WT의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 서열번호 14로 표시되는 염기서열(gaaattaata agactcatta tattccggcg aacgcacctg ga)을 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지는 변이주(이하, ΔZ1로 명명함)이다. 즉, 서열번호 15로 표시되는 ZEP 유전자 변이를 가지는 변이주이다.
- [137] 또한, 상기 변이주는 서열번호 13으로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 WT의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 서열번호 16으로 표시되는 염기서열(tagctctaaa acatccaggt gcgttcgccg

gactatagtg agta)을 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지는 변이주(이하, ΔZ2로 명명함)이다. 즉, 서열번호 17로 표시되는 ZEP 유전자 변이를 가지는 변이주이다.

- [138] 또한, 상기 변이주는 서열번호 13으로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 WT의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 염기 A를 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지는 변이주(이하, ΔZ3로 명명함)이다. 즉, 서열번호 18로 표시되는 ZEP 유전자 변이를 가지는 변이주이다.
- [139] 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 3종은 각각 색소 생산능, 구체적으로 잔토피 생산능을 갖는다. 구체적으로, 루테인(lutein)과 지아잔틴(zeaxanthin) 생산능을 가질 수 있다. 더욱 구체적으로, 루테인(lutein)과 지아잔틴(zeaxanthin); 그리고 엽록소 b(chlorophyll b), 엽록소 a(chlorophyll a) 및 베타-카로틴(β -carotene)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 색소의 생산능을 가질 수 있다.
- [140] 상기 변이주는 세포당 지아잔틴의 생산능이 종래 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형과 비교해서 현저하게 높고, 루테인과 지아잔틴 함량이 높은 것으로 알려져 있는 고등식물들과 비교해도 12배 이상 많아[도 36 참조], 잔토피 생산을 위한 조류로 효과적으로 사용될 수 있는 장점이 있다.
- [141] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 변이주가 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형과 비교해서, 시간에 따른 지아잔틴의 생산량이 크게 증가한 것으로 확인되었는 바(도 37의 b), 본 발명의 변이주는 잔토피, 특히 지아잔틴의 생산능이 매우 우수한 균학적 성질을 가짐을 알 수 있고, 이를 활용하여 잔토피 색소의 생산원으로 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [142] 본 발명의 변이주는 약광(dim light)에서 생존 가능하고, 구체적으로 10 내지 2,000 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 범위의 광도 조건 하에서 배양될 수 있다. 상기 변이주가 약광 조건 이하인 완전한 어둠에서는 광합성을 할 수 없고, 너무 높은 광 조건에서는 광 스트레스에 의해 세포가 데미지를 입을 수 있다. 상기 조건에서 본 발명의 변이주를 배양하는 경우, 변이주 내 잔토피 함량을 높이면서도, 우수한 생장률을 갖는 장점이 있다.
- [143] 상기 변이주는 통상의 클라미도모나스 레인하르티아이 조류의 성장환경(광도 조건, 온도 조건, 배지 등) 내에서 적절한 성장을 할 수 있다. 또한, 낮은 광도에서도 우수한 지아잔틴의 축적능을 갖는 바(도 37), 이런 우수한 잔토피 생산능에 의하여 잔토피 색소 생산 미생물로 산업적으로 효과적으로 사용될 수 있고, 고광도 하에서도 군집 내의 밀도가 다른 조류와 비교해서 상대적으로 낮아, 단일 세포 내 광합성에 의한 색소 생산 효율이 우수한 효과를 갖는다. 구체적으로 클라미도모나스 레인하르티아이 야생형은 지아잔틴을 거의 생산하지 못하였으나, 본 발명의 변이주는 야생형 보다 지아잔틴 함유량이 약 50 배 이상 더 높다.

- [144] 상기 변이주는 일반적인 클라미도모나스 레인하르티아이 조류를 배양할 수 있는 환경에서 배양할 수 있으며, 구체적으로 약한 광도 조건에서 조류를 배양할 수 있는 배양 배지를 사용할 수 있다. 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연 배지, 합성 배지 또는 선택 배지를 모두 포함하는 개념이다. 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다. 예를 들면, 광합성 배지인 HS 배지 또는 TAP 배지로 배양할 수 있으며, 탄소원을 추가할 수 있다. 일 구현예에 있어서, 본 발명의 실시예 내 표 4의 배양액 조성환경에서, 본 발명의 변이주가 우수한 지아잔틴 생산능을 가짐을 확인하였다.
- [145] 상기 배양 배지의 pH는 클라미도모나스 레인하르티아이가 생존 및 성장 가능한 범위라면 특별히 제한되지 않고, 일 예로 pH 6 이상, 구체적으로 pH 6 내지 pH 9에서 생존 가능하며, pH 7.0 이상 내지 pH 8.0 미만에서 최적의 성장률을 가질 수 있다.
- [146] 상기 변이주는 기존의 변이 유발 물질을 처리하거나 외래 유전자 삽입을 통한 유전자 재조합 변이체가 아닌 야생형 균주에 외래 DNA 도입 없이 크리스퍼 유전자 가위 기술을 이용하여 ZEP 유전자 내 타겟 서열에 직접 RGEN RNPs로 도입함으로써 제작할 수 있다.
- [147] 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주는 세포 내에 색소, 특히 잔토피계 색소를 고함량으로 축적할 수 있고, 그 중 지아잔틴의 함량을 더욱 높게 포함할 수 있어, 상기 조류를 배양하여 식품, 사료, 의약품 등의 원료로 효과적으로 사용될 수 있다.
- [148] 이러한 측면에서, 본 발명은 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주의 배양물에 관한 것이다.
- [149] 본 발명에서 "배양물"이란 특정 미생물이 배양된 배지, 즉 배양 후 배지를 의미하는 것으로, 상기 배양물은 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 포함하는 것을 의미한다. 또한, 상기 배양물은 배양 후 배양배지를 농축, 건조 등의 가공을 한 상기 배양물의 농축물 또는 상기 배양물의 건조물을 모두 포함하는 의미이다. 상기 배양물은 그의 부산물을 포함할 수 있고, 그 제형이 한정되지 아니하며, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.
- [150] 상기 배지는 특성 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다. 상기 배지의 pH는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주가 성장 가능한 범위일 수 있고, 일 예로 pH 6 이상, 바람직하게는 pH 6 내지 pH 9일 수 있다.
- [151] 또한, 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 상기 조류의 배양물,

이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[152] 상기 조성물은 인간 및 동물의 건강 증진을 위한 용도로 사용될 수 있다.

[153] 본 발명의 변이주는 지아잔틴 및 루테인을 포함하는 잔토필계 색소를 생성하여 체내 축적하는 특성을 가지는 바, 이러한 측면에서 상기 조성물은 색소 조성물 또는 잔토필 색소 조성물일 수 있다.

[154] 상기 색소 조성물은 조성물에 포함된 총 색소 100 중량부에 대하여 지아잔틴이 5 내지 15 중량부로 포함된 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따라, 클라미도모나스 레인하르티아이 야생형 조류, 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주 각 세포당 총 색소 내 지아잔틴의 함량을 측정한 결과, 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주의 경우 야생형과 비교해서도 색소 중 지아잔틴의 함량이 현저하게 높은 것을 확인할 수 있었다(도 37의 c).

[155] 상기 색소 조성물은 식품 또는 사료의 원료로 사용될 수 있고, 경구 투여를 위한 제제로 사용될 수 있다.

[156] 따라서, 상기 조성물 또는 추출물을 포함하는 색소 조성물 또는 잔토필 색소 조성물은 식품, 의약품 또는 사료 등에 포함되는 경구로 공급될 수 있다는 점에서 경구 투여용 조성물일 수 있다.

[157] 경구 투여용 조성물의 경우, 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 젤제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화된 경구용 제제에 포함될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의 정제물을 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다.

[158] 또한, 상기 조성물은 식품 또는 사료에 특별한 목적 용도를 달성하기 위하여 첨가될 수 있으므로, 이러한 측면에서 식품 조성물, 식품첨가제용 조성물, 사료 조성물 또는 사료첨가제용 조성물일 수 있다. 상기 조성물이 사료 또는 식품에 사용되는 경우, 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주에 의해 생산되고 세포에 축적된 잔토필 색소, 특히 지아잔틴 및 루테인에 의하여 체내 건강을 유지 또는 강화할 수 있다. 구체적으로, 상기 지아잔틴 및 루테인은 황반 색소로서 황반의 변성 등을 예방 또는 개선할 수 있어, 황반 변성과 관련된 눈 질환의 예방 또는 개선에 효과적이다. 더욱 구체적으로 상기 지아잔틴 및 루테인은 눈 건강 강화 또는 유지; 황반변성 예방 또는 개선; 눈의 기능 저하 예방

또는 개선; 망막의 손상 개선 또는 예방; 노화 억제; 망막 건강 유지; 황반변성 발병 위험 감소; 또는 시력감퇴 예방 또는 개선 효과가 있으므로, 상기 사료 또는 식품 조성물은 상기 증상의 예방 또는 개선, 또는 상기 효과를 위한 용도로 사용될 수 있다.

- [159] 본 발명에서 "첨가제용"은 식품 또는 사료에 주원료가 외에 첨가되는 구성이라면 모두 포함되며, 구체적인 예로 식품 또는 사료에서 기능성을 갖는 유효 활성물질 또는 가공식품에서 착색, 보존 등을 위해 첨가되는 식품 의약품 안전처에서 정의하고 있는 식품첨가물일 수 있다.
- [160] 상기 식품은 건강 기능성 식품일 수 있다. 보다 구체적으로, 눈 건강을 위한 건강 기능성 식품일 수 있다.
- [161] 상기 식품, 식품첨가제, 사료 또는 사료첨가제용 조성물은 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 상기 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물의 활성을 해치지 않는 범위에서 다른 유효성분을 더 포함할 수 있다. 또한, 담체 등의 부가 성분을 더 포함할 수 있다.
- [162] 본 발명에서 사료용 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛형태 및 사일리지(silage) 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 상기 변이주의 건조 균체, 상기 변이주의 배양물 및 이의 추출물을 포함하고, 추가적으로 여러 가지 미생물 균 또는 효소들을 포함하여 제조할 수 있다. 상기 배합사료는 여러 종류의 일반 사료와 본 발명의 변이주, 상기 변이주의 건조 균체, 상기 조류의 배양물 및 이의 추출물을 포함하여, 혼합하여 제조될 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 발효사료 또는 배합사료를 펠렛기로 제형화하여 제조될 수 있다. 사일리지는 청예사료와 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 상기 변이주의 건조 균체, 상기 변이주의 배양물 및/또는 이의 추출물을 혼합하여 제조될 수 있으나, 본 발명의 조성물의 사용이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [163] 상기 조성물은 식품 또는 약제학적 분야에서 통상적으로 사용하는 담체 및 향료와 혼합하여 정제 (tablet), 트로키(troche), 캡슐(capsule), 엘릭실(elixir), 시럽(syrup), 산제 (powder), 현탁제(suspension) 또는 과립제(granule) 등의 형태로 제조 및 투여될 수 있다. 담체로는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제 등을 사용할 수 있다. 투여방식은 경구, 비경구 또는 도포법을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 경구 투여하는 것이 바람직하다. 또한, 투여용량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 피투여자의 연령, 성별, 상태 등에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 조성물의 pH는 조성물이 사용되는 약제, 식품 등의 제조조건 등에 따라서 용이하게 변경 가능하다.
- [164] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 상기 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로

포함할 수 있고, 상기 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

[165] 상기 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주는 그 자체 또는 건조된 형태로 조성물에 포함될 수 있고, 상기 조류의 배양물은 농축 또는 건조된 형태로 조성물에 포함될 수 있다. 또한, 상기 건조물은 상기 조류 또는 그 배양물의 건조된 형태를 의미하는 것으로, 동결건조 등에 의해 제조된 분말 형태일 수 있다.

[166] 또한, 상기 추출물은 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 이의 배양액 또는 이의 건조물로부터 추출하여 얻어진 것을 추출물을 의미하는 것으로, 용매 등을 이용한 추출물, 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 파쇄하여 얻어진 것을 포함한다. 구체적으로 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주의 세포 내에 축적된 색소를 물리적 또는 화학적 방법으로 추출 및 분리한 것일 수 있다.

[167] 상기 추출과정은 통상의 방법에 의하여 수행될 수 있고, 일 예로 추출용매를 가하고 균질화한 후, 균체를 파쇄하여 목적 색소를 추출할 수 있다. 추출 후에는 원심분리하여 조류의 파쇄물을 제거하고, 추출용매는 감압증류 등의 방법으로 제거할 수 있다. 또한 통상의 정제공정을 더 포함할 수 있다. 상기 색소의 경우 물에 녹지않는 성질을 가지므로, 본 발명의 조류로부터 더욱 용이하게 추출될 수 있다.

[168] 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주는 낮은 광도에서 잔토피, 특히 지아잔틴의 우수한 생산능을 가지므로, 상기 변이주 및 이의 부산물을 포함하는 조성물은 신체 활성 향상, 체기능성 유지 및 저하 예방 효과를 가진다. 구체적으로, 상기 잔토피 색소는 황반변성 억제 효과, 항산화, 항암 효과 등이 있는 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 조성물은 신체건강 유지용, 구체적으로 상기 잔토피 색소가 관여하는 신체 기능의 유지, 저하 예방 또는 향상을 용도로 식품, 건강 기능식품, 의약품 또는 사료 등에 포함되는 원료로 이용될 수 있다.

[169] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 이용한 색소 생산방법을 제공하는 것이다.

[170] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 배양하는 단계를 포함하는 식품 또는 사료 원료 생산방법을 제공하는 것이다.

[171] 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 이용하는 경우 배양되는 상기 조류 내의 잔토피 축적량을 높일 수 있어, 산업적으로 사용되는 원료의 공급 등을 효율적으로 수행할 수 있다.

[172] 상기 생산방법은 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[173] 또한, 상기 생산방법은 상기 배양 단계 이후에, 배양물로부터 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주를 분리하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

상기 분리된 조류는 건조를 포함한 가공 단계를 더 거칠 수 있다.

- [174] 또한, 상기 생산방법은 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주, 상기 변이주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 또는 상기 배양물의 건조물로부터 색소를 추출하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [175] 상기 배양은 pH 6.0 내지 8.0 조건의 배지에서 수행될 수 있다. 또한, 약광 조건, 구체적으로 10 내지 2,000 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 범위의 광도 조건 하에서 수행될 수 있다. 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주의 경우 낮은 광도에서도 색소 생산능이 우수하여, 체내 잔토피 함유를 높일 수 있는 바, 고광도의 에너지를 투여하지 않고도 우수한 잔토피 축적을 달성할 수 있어, 산업적으로 효과적으로 이용될 수 있다.
- [176] 상기 이러한 추출은 미생물로부터 색소를 추출하는 방법에 대한 통상적인 방법으로 수행할 수 있고, 일 예로 효소법, 초음파 추출법, 기계 추출법 등이 있으며 이에 한정되지 않는다.
- [177] 상기 생산방법은 배양 단계 외에, 배양 후 조류의 함량을 높이는 농축 단계, 농축 단계를 거친 조류의 수분을 더욱 감소시킴으로써 건조시키는 건조 단계를 더 포함할 수 있다. 그러나 농축단계 또는 건조 단계가 반드시 필요한 것이 아니며, 일반적으로 본 발명이 속하는 분야에서 통상적으로 사용되는 농축 및 건조 방법, 기계를 사용하여 수행할 수 있다.
- [178] 상기 생산방법은 상기 추출 단계 이후 정제단계를 더 포함하여 수행할 수 있고, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 정제방법에 의하여 수행될 수 있다.
- [179] 상기 농축 또는 건조 단계를 거쳐 제조된 잔토피는 식품, 건강기능성 식품, 화장품 또는 약제 등의 원료로 사용될 수 있다.
- [180] 상기 잔토피 생산방법은 본 발명의 효과를 해치지 않는 범위 내에서 다른 방법을 채용하여 수행될 수 있다.
- [181] 상기 변이주 및 조성물에 대한 내용은 본 발명의 생산방법에도 준용될 수 있다.
- [182]

발명의 실시를 위한 형태

- [183] 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.
- [184]
- [185]
- [186] [실시예]
- [187] 참조예: 실험방법
- [188] 1. 균주 확보

[189] 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)를 통해 확보하였다[<http://www.chlamycollection.org/product/cc-4349-cw15-mt-goodenough-330a/>].

[190]

[191] **2. 세포 배양**

[192] 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-아세테이트 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.

[193]

[194] **1) Autotrophic culture media 조성**

[195] 광합성만을 이용하여 외부의 탄소원 공급이 없는 상태로 배양하는 Autotrophic culture를 하는 경우 최소 배지인 HS 배지에서 5% CO₂를 공급하여 배양하였다. 하기 표 1과 같은 조성을 가진 배지를 만든 뒤 Autoclave하여 준비한 다음, 활발한 growth stage에 있는 cell을 이용하여 배양액에 10⁶ 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.

[196] [표1]

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

[197] 2) Mixotrophic culture media 조성

[198] 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 10^6 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.

[199] [표2]

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

[200]

[201] **3. RNA 제조**

[202] 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 MEGA쇼트스크립트 T7 키트 (Ambion)를 사용하여 전사하였다. 전사된 RNA를 페놀:클로로포름 추출, 클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 정제하였다. 정제된 RNA를 분광 분석에 의해 정량하였다.

[203]

[204] **4. 클라미도모나스 형질전환**

[205] 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)에서 RNP 복합체를 사용하여 표적-특이적 녹아웃 돌연변이체를 제조하기 위하여, 50×10^4 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 플레이팅하여 나중의 연구를 위해 단일 콜로니를 얻었다 (도 24).

[206]

[207] **5. 표적화된 심층 서열화**

[208] 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)에서 승인 번호 PRJNA327012 하에 심층 서열화 데이터를 활용할 수 있다.

[209]

[210] **6. 잠재적인 표적-오프 부위의 조사**

[211] 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.

[212]

[213] **7. 유전자형 특성화**

[214] 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 마이크로프렙 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).

[215]

[216] **8. 돌연변이체 선택**

[217] 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 선발하였다(도 9의 a).

[218]

[219] **9. 색소 및 광합성 활성 측정**

[220] 색소 측정을 위해 세포들을 저광 50 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 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 $\times$ 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. 작동 중에, 용매 농도는 0 내지 15분에 14% 0.1 M 트리스-HCl, 84%

아세트니트릴 및 2% 메탄올이었다. 15 내지 19분에는 용매 혼합물은 68% 메탄올과 32% 아세트니트릴로 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 할로젠 램프로 조명된 Hansatech Clark-형 산소 전극으로 측정하였다. 2 μ M 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 μ L의 0.5 M NaHCO_3 , pH 7.4를 측정 전의 현탁액에 첨가하였다. 산소 발생을 0에서 1,200 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 까지, 증가하는 광 세기에서 측정하였고, 각 단계를 2분 동안 기록하였다.

[221]

[222] **10. SDS-PAGE 및 웨스턴-블롯 분석**

[223] 단백질을 분석을 위하여, 70 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 하에서 TAP에서 성장한 세포들을 수확하고, 용해 완충액 (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 5 mM β -머캅토에탄올 및 1 mM PMSF) 중에 재현탁한 후 음파처리에 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. 레인하르트티로부터 ATP 합성(ATP β)의 지아잔틴 에폭시다제(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.

[224]

[225] **11. 성장 분석**

[226] 클라미도모나스 세포들을 연속적인 고광 (700 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$)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_2 로 40 mL/분의 공급 속도로 공기가 통하게 하였다. 각 배양에 대한 초기 세포 농도는 100×10^4 세포/mL이었다.

[227]

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

[229] 도 1은 본 발명에 따른 클라미도모나스 레인하르트티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)에서 RGEN RNPs를 이용하여 유전자 녹아웃 돌연변이체를 제조하는

과정을 나타낸 개략도이다. *CpFTSY*는 광수확 복합체를 엽록체 내로 전달하는데 역할을 하며 이전에는, 클라미도모나스 레인하르트티(*C. reinhardtii*)의 *CpFTSY*의 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.

- [230] *CpFTSY* 유전자[phytozome: Cre05.g241450 또는 NCBI: XM_001697700.1][[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. "Assembly of the light-harvesting chlorophyll antenna in the green alga Chlamydomonas reinhardtii requires expression of the TLA2-CpFTSY gene." Plant physiology 158.2 \(2012\): 930-945](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.)]를 표적하기 위해 sgRNA는 Cas-Designer (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 측정하며 OD750에서 0.3 ~ 0.5 정도의 활발히 배양 중인 시기의 세포를 사용하였다. RNPs 복합체를 만들기 위해 200 μ g의 Cas9 단백질[도 25]은 140 μ g의 sgRNA[도 2]와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 인큐베이션하였다. 결합된 RNPs 복합체는 50×10^4 개의 클라미도모나스 레인하르트티아이 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 Δ *CpFTSY* 돌연변이체의 특성 분석한 결과이다. 도 5의 a는 야생형과 Δ *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 Δ CpFTSY 돌연변이체를 확인하였다. 모든 Δ 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 Δ CpFTSY 돌연변이체의 CpFTSY 유전자 위치에서 Sanger sequencing에 의한 Chromatogram 결과이다.

[231]

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

[233] 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 에폭시드화 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.

[234]

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. RNPs 복합체를 만들기 위해 200 μ g의 Cas9 단백질[도 25]은 140 μ g의 sgRNA[도 7]와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 인큐베이션하였다. 결합된 RNPs 복합체는 50×10^4 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 녹아아웃 돌연변이체를 DNA 없는 RGEN RNP를 사용하여 생성한 후에, 페트리디쉬에서 모든 세포에 대해 Chl 형광을 측정하였고 여러 개의 추정되는 ZEP 녹아아웃 세포주를 선별하였다. 도 9의 a의 적색 원형은 저광(50 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) 조건 하에서 TAP 아가 배지 상에서 성장한 추정되는 ZEP 녹아아웃 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 ΔZEP 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.

[235]

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

[237] 실시예 2를 통해 얻은 ZEP 유전자 녹아아웃 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 녹아아웃 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 μg 의 Cas9 단백질[도 25]은 140 μg 의 sgRNA[도 2]와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 인큐베이션하였다. 결합된 RNPs 복합체는 50×10^4 개의 클라미도모나스 레인하르티아이 $\Delta Z1$ 의 세포와 함께 4mm Electroporation cuvette에서 Biorad Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems를 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 야생형 보다 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)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).

[238]

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

[240] 도 17을 통해 야생형과 RGEN RNPs에 의한 ΔZEP , $\Delta FTSY$ 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 ΔZEP , $\Delta CpFTSY$ 돌연변이체와 $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 이중 돌연변이체에서는 해당하는 단백질의 밴드가 검출되지 않았다. ATP synthase의 β -subunit(ATP β)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 ΔZEP , Δ

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 돌연변이에서는 violaxanthin, antheraxanthin이 없고 zeaxanthin 증가한 결과가 확인되었으며 $\Delta CpFTSY$ 돌연변이체에서는 전체 색소의 감소과 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, 고광(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 ΔZEP 돌연변이체와 비교할 때 광합성율이 증가하였으며 그 수준은 $\Delta CpFTSY$ 돌연변이체와 ΔZEP 돌연변이체의 중간 수준을 보여주었다. 도 22는 HS 배지, 25 °C, 고광도 조건에서(700 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) 5% CO₂ air를 공급하면서 돌연변이체는 야생형의 성장곡선을 관찰한 결과이다. 고광도 조건하에서 $\Delta CpFTSY$ 돌연변이체와 $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 이중 돌연변이체의 성장은 야생형 및 ΔZEP 돌연변이체의 성장보다 극적으로 더 좋았다(도 22). 그러므로, $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 이중 돌연변이체는 ΔZEP 돌연변이체보다 더 큰 광합성 효율 및 세포 성장율을 나타냈고, 그것은 이중 돌연변이체가 고광도 성장 조건 하에서 더 큰 바이오매스 축적을 유도할 수 있을 것임을 보여준다. 야생형, ΔZEP , $\Delta CpFTSY$ 및 $\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$ 이중 돌연변이체의 광합성 활성을 도 23에 요약하였다.

[241] 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 특이 질환의 의학적 치료에 미세조류의 적용을 가능하게 할 것이다.

[242]

[243] 실험예 1: 다른 형질주입법을 사용하여 변이체 제조 확인

[244] 상기 실시예 1에서 전기천공법 대신 글라스 비드법(glass bead method)을 사용하였다. 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349) 세포를 10⁷ cells/mL까지 배양한 다음 3000 rpm에서 2분간 cell down하여 세포를 회수하였다. 이를 10 ml glass tube로 옮긴 뒤 100 μl 의 20% PEG-8000 (Sigma, USA)와 0.3 g의 glass beads (425-600 μm , Sigma, USA), FTSY 유전자를 target하는 RNP 복합체와 함께 섞은 뒤 Vortex를 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.

[245]

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

[247] 도 24의 b는 최초에 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 μ g부터 500 μ g까지 높여가며 조건을 달리했고 sgRNA 농도도 7 μ g에서 350 μ g까지 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 μ g, sgRNA가 140 μ g일 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 delivery된 RNP가 세포에서 작동하기에 충분한 시간으로 판단하였고 상기 실시예에서도 12시간 후에 targeted deep sequencing을 통해 돌연변이 빈도를 확인하였다.

[248]

[249] 실시예 5: ZEP 유전자 녹아웃 돌연변이체 제작

[250] 클라미도모나스 레인하르티아이의 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 다섯 개의 sgRNA를 디자인하였으며 이를 In vitro transcription 방법을 통해 합성하였다. 도 28은 ZEP 유전자를 표적하기 위해 제작된 다섯 개의 sgRNA의 타겟 서열에 대한 서술이다. Cas9 단백질 경우 E.coli를 이용하여 recombinant Cas9 protein을 발현시켜 정제를 거쳐 준비하였다. 실험에 사용된 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)은 Chlamydomonas

Resource Center(www.chlamycollection.org)를 통해 확보하였다[<http://www.chlamycollection.org/product/cc-4349-cw15-mt-goodenough-330a/>]. 클라미도모나스 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 측정하며 OD₇₅₀에서 0.3 ~ 0.5 정도의 활발히 배양 중인 시기의 세포를 사용하였다. RNPs 복합체를 만들기 위해 200ug의 Cas9 단백질(도 25, 서열번호 21)은 140ug의 sgRNA(서열번호 20)와 nuclease-free water에서 섞고 10분간 상온에서 incubation하였다. 결합된 RNPs 복합체는 50×10⁴개의 클라미도모나스 레인하르트티아이 cw15 mt- 야생형 (CC-4349)의 세포와 함께 4mm Electroporation cuvette에서 Biorad Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems을 이용하여 (Voltage 600V, Capacity 50uF) 전기충격을 통해 형질전환시킨 뒤 12시간 동안 dark incubation 후에 gDNA extraction 하여 Targeted deep sequencing하여 분석하였으며, 일부는 2000개의 cell로 dilution하여 TAP agar plate에 도말하여 single colony를 얻었다. 도 29는 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 29의 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 29의 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)

- [251] 이렇게 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 선별하였다. 적색 원형은 약광(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. 야생형 (WT) 및 ΔZEP 돌연변이주의 단일 세포 콜로니들이 약광(50 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$) 조건 하에서 최소 아가 배지 상에서 성장하였다[도 30의 a, b]. 이렇게 확인된 콜로니 중 황반색소 함량이 증가된 변이주 3개(ΔZ1 , ΔZ2 , ΔZ3)를 선별하였으며, RGEN RNPs에 의해 발생된 세 개의 ZEP 돌연변이체에서 실제적인 ZEP 유전자 위치의 표적 DNA 서열 변화를 Sanger sequencing을 통해 확인하였다[도 31].

- [252] 도 30의 b에 나타낸 바와 같이, 동일한 조건의 광도 하에서 TAP agar plate에서 클라미도모나스 레인하르트티아이 cw15 야생형, 그리고 변이주 ΔZ1 , ΔZ2 , ΔZ3 의 colony가 서로 유사한 형태와 크기로 자란 것을 확인할 수 있었다. 또한, HS

배지에서 광합성을 통해 액체 배양된 세포들 경우, 같은 세포수의 농도에서 클라미도모나스 레인하르티아이 야생형은 녹색을 띄는 것에 비해 변이주 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 은 풀색 톤의 유사한 녹색을 띄는 것을 확인할 수 있다[도 30의 c].

[253] 선발된 변이주 중 변이주 Z1는 클라미도모나스 레인하르티아이 ZEP 변이주 1(Z1)[*Chlamydomonas reinhardtii* ZEP mutant 1($\Delta Z1$)]로 명명하였으며, 상기 변이주는 한국생명공학연구원 생명자원센터(KCTC)에 2017년 3월 22일자로 기탁되어, 수탁번호 KCTC 13230BP를 부여받았다.

[254]

[255] 실시예 6: 변이주 배양

[256] 1) 독립영양 배양

[257] 광합성만을 이용하여 외부의 탄소원 공급이 없는 상태로 배양하는 Autotrophic culture를 하는 경우 최소 배지인 HS 배지에서 5% CO₂를 공급하여 배양하였다. 하기 표 3과 같은 조성을 가진 배지를 만든 뒤 Autoclave하여 준비한 다음 활발한 growth stage에 있는 cell을 이용하여 배양액에 10⁶cell/mL의 농도가 되도록 만들어 growth를 시작하였다. 배양용기는 도 33과 같이 유리로 된 column을 사용하여 아래에서 Bubble을 공급하고 양 옆에서 200uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 주었다.

[258] [표3]

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

[259]

[260] 2) 혼합영양 배양

[261] 광합성과 탄소원을 같이 공급하여 배양하는 Mixotrophic culture를 하는 경우 TAP 배지에서 아세트산(acetic acid)을 첨가하여 배양하였다. 하기 표 4와 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 34과 같이 유리로 된 flask나 bottle를 사용하여 큰 volume으로 배양하였으며 magnetic bar를 이용하여 stirring 해주었다. 70uE의 광도로 형광등을 이용해 빛을 함께 주었다.

[262] [표4]

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

[263]

[264] 실시예 7: 변이주의 색소 분석 및 성장 특성 확인

[265] 1) 변이주의 색소 분석

- [266] 실시예 5와 같이 단일 콜로니로 분리 후, 계속 배양하고, 각 콜로니에 대한 HPLC를 이용해 색소 분석을 수행하였다.
- [267] 구체적으로, 분리된 단일 콜로니들을 TAP 배지에서 70 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 조건으로 3일 동안 배양하였고, 구체적인 배양 조건은 실시예 6의 2)의 배양 조건과 같이 수행하였다. 수확된 조류들을 80% 아세톤을 사용하여 색소를 추출하고 원심분리한 상층액을 다시 나일론 필터를 이용하여 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다.
- [268] 구체적으로, 색소를 분리하기 위해 용매의 총 유속은 분당 1.2mL로 하였고, 제0분 내지 제15분까지 pH 8.0의 Tris는 14%, 아세토니트릴은 84%로부터 0%까지 각각 균일하게 감소시키고, 메탄올과 에틸아세테이트는 2%로 시작하여 제15분까지 각각 68%, 32%까지 증가시켰다. 이후 3분 동안(제15분 내지 18분) 이 용매 비율을 그대로 유지시킨 다음, 1분 동안(제18분 내지 제19분) 각 용매의 비율을 시작할 때의 비율로 되돌린 다음 나머지 6분간 그대로 유지하며 포스트-런(postrun)을 하였다. 펌프는 Shimadzu사의 LC-20A Prominence를, 컬럼은 Watera Spherisorb TMS5(DS1 4.6 x 250 mm, 5 μm Cartridge Column, USA)을 사용하였고, 컬럼의 온도는 40 °C로 유지하였다. 검출기는 포토다이오드 어레이 검출기(photodiode array detector: SPD-M20A, Shimadzu)를 사용하여 데이터를 분석하였고, 지아잔틴을 비롯한 카로티노이드 색소들은 445nm에서, 엽록소 a는 670nm에서 검출된 결과를 DHL(Agern Alle, Horsholm, Denmark)에서 구입한 카로티노이드와 엽록소 a, b를 정량한 표준곡선을 스탠다드로 사용하여 농도를 구하였다.
- [269] 도 35에 각 조류에 색소 프로파일을 나타내는 HPLC 분석 그래프를 나타내었고, HPLC를 이용해 200 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 하에서 자란 각 조류들의 지아잔틴 및 루테인 함량을 정량적으로 분석한 그래프를 도 37에 나타내었다.
- [270]
- [271] 2) 성장 속도 확인
- [272] 야생형 클라미도모나스 레인하르티아이 조류, 변이주 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 의 세포 증식 속도 및 최종 생장량을 비교하기 위해 최소 광합성 배지인 HS 배지 [표 3 참조]에서 5% CO₂ bubble을 공급한 상태로 200 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$ 의 광도 조건에서 배양하였다. 초기 접종 세포 수는 1 x 10⁶ cells/ml로서 60시간 동안 12시간 간격으로 세포수를 측정하여 성장 곡선을 그렸다. 도 12는 야생형(WT)과 ZEP 녹아웃 돌연변이체에서 이산화탄소를 이용하는 광합성을 통한 세포 성장률의 비교 실험 결과이다. 도 12에 나타난 바와 같이, 변이주 $\Delta Z1$, $\Delta Z2$, $\Delta Z3$ 는 배양기간이 경과함에 따라 야생형과 비슷한 수준의 성장률을 확인하였다.
- [273]
- [274] 실시예 8: 색소 생산 확인
- [275] 도 36의 실험을 수행하면서 동시에 12시간 간격으로 세포의 루테인과

지아잔틴의 색소 함량을 HPLC를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 이를 도 37을 통해 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형(WT)과 ZEP 녹아웃 돌연변이체의 시간에 따른 루테인과 지아잔틴 색소 생산량을 비교하였다. 야생형과 비교 시 ZEP 녹아웃 돌연변이체는 루테인 생산량은 비슷한 수준이나 야생형에는 미비하게 존재하는 지아잔틴의 양이 최소 50배 이상 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

- [276] 하기 표 5 및 도 38은 지아잔틴과 루테인의 함량이 높은 것으로 알려져 있는 고등식물들과 클라미도모나스 레인하르티아이 cw15 야생형(WT), ZEP 녹아웃 돌연변이체와의 지아잔틴과 루테인의 함량 비교한 것이다. 클라미도모나스는 도 36의 36 시간일 때 세포의 건조 중량 대비 루테인과 지아잔틴 색소량 나눠 함량($\mu\text{g}/100\text{g}$)을 계산하였다. 지아잔틴과 루테인의 함량이 높은 것으로 알려져 있는 나머지 고등식물의 색소 함량($\mu\text{g}/100\text{g}$)은 USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23 (2010)을 인용하여 비교하였다. 고등식물과 루테인과 지아잔틴의 함량을 비교 시 클라미도모나스 야생형은 최소 6배 (Nasturtium 대비) 이상의 함량을 보여주며 ZEP 유전자 녹아웃의 돌연변이체는 12배 이상 (Nasturtium 대비)의 높은 함량을 보여주었다. 특히, 고등식물과 지아잔틴 함량을 비교 시 ZEP 유전자 녹아웃의 돌연변이체는 최소 120배 이상 (Orange Pepper 대비)의 높은 함량을 보여주었다.

- [277] 도 37과 도 38을 통해 높은 생산성과 함량을 확인하였으며 이를 통해 루테인과 지아잔틴 색소 산업의 원료 시장에서 높은 경쟁력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[278] [표 5]

Product	Lutein + Zeaxanthin (μ g/100 g)
Chlamydomonas, cw15-, WT	274,397
Chlamydomonas, ZEP mutant 1 ($\Delta Z1$)	528,353
Chlamydomonas, ZEP mutant 2 ($\Delta Z2$)	502,520
Chlamydomonas, ZEP mutant 3 ($\Delta Z3$)	544,684
Nasturtium (yellow flowers)	45,000
Kale (raw)	39,550
Kale (cooked)	18,246
Dandelion leaves (raw)	13,610
Nasturtium (leaves)	13,600
Turnip greens (raw)	12,825
Spinach (raw)	12,198
Spinach (cooked)	11,308
Swiss chard (raw or cooked)	11,000
Turnip greens (cooked)	8440
Collard greens (cooked)	7694
Watercress (raw)	5767
Garden peas (raw)	2593
Romaine lettuce	2312
Zucchini	2125
Brussels sprouts	1590
Pistachio nuts	1205
Broccoli	1121
Carrot (cooked)	687
Maize/corn	642
Egg (hard boiled)	353
Avocado (raw)	271
Carrot (raw)	256
Kiwi fruit	122

[279]

[280]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO: JIN, Eon Seon

Hanyang University

222, Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 04763

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ZEP mutant 1(Δ Z1)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 13230BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: [] a scientific description [] a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March 22, 2017 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  KIM, Cha Young, Director Date: April 04, 2017

[281]

특허절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제적 형식

원 기탁에 있어서의 수탁증

규칙 7.1에 따라 발행되었다.

기탁자 이름 : 진언선

주소 : (04763) 대한민국 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교

I. 미생물의 표시	
기탁자가 붙인 식별용 표시: 클라미도모나스 레인하르트타이 ZEP 변이주 1(Z1) [Chlamydomonas reinhardtii ZEP mutant 1(Δ Z1)]	국제기탁기관에서 부여한 수탁번호: KCTC 13230BP
II. 과학적 성질 및 분류학상의 위치	
1란의 미생물에는 다음사항을 기재한 문헌이 첨부되어 있다: [] 과학적 성질 [] 분류학상의 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제 기탁당국은 2017년 3월 22일에 수령한 1란의 미생물을 수탁한다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제 기탁당국은 에 1란의 미생물을 수령하였다. 그래서 에 원기탁에서 부다페스트에 기초한 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁당국	
명칭: 생물자원센터 주소: (56212) 대한민국 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원	국제기탁당국을 대표하는 권한있는 관리의 서명 센터장, 김차영 2017년 4월 4일

(원문과 상위 없음을 확인함) 대리인 : 변리사 진 회 동

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 μg 및 Cas 단백질 30 ~ 300 μg 의 RGEN RNP 복합체를 1×10^4 개 내지 1×10^7 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.
- [청구항 12] 서열번호 13으로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 서열번호 14로 표시되는 염기서열을 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지며, 잔토피 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
서열번호 15로 표시되는 ZEP 유전자 변이를 가지는 클라미도모나스

- 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 14] 서열번호 13으로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 서열번호 16으로 표시되는 염기서열을 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지며, 잔토피 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
서열번호 17로 표시되는 ZEP 유전자 변이를 가지는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 16] 서열번호 13으로 표시되는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 ZEP 유전자 서열에서 816번째 염기와 817번째 염기 사이에 염기 A를 삽입한 ZEP 유전자 변이를 가지며, 잔토피 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서,
서열번호 18로 표시되는 ZEP 유전자 변이를 가지는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 18] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 변이주는 루테인(lutein)과 지아잔틴(zeaxanthin); 그리고 엽록소 b(chlorophyll b), 엽록소 a(chlorophyll a) 및 베타-카로틴(β -carotene)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 색소의 생산능을 갖는 클라미도모나스 레인하르티아이 변이주.
- [청구항 19] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 대한 변이주의 배양물.
- [청구항 20] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 대한 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 색소 조성물.
- [청구항 21] 제 20 항에 있어서,
상기 색소 조성물은 총 색소 100 중량부에 대하여 지아잔틴을 5 내지 15 중량부로 포함하는 것인, 색소 조성물.
- [청구항 22] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 대한 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 경구 투여용 조성물.
- [청구항 23] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 대한 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 식품 또는 식품첨가제용 조성물.
- [청구항 24] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항에 대한 변이주의 배양물, 이의 건조물 및 이의 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 눈 건강 강화 또는 유지; 황반변성 예방 또는 개선; 눈의 기능 저하 예방

또는 개선; 망막의 손상 개선 또는 예방; 노화 억제; 망막 건강 유지; 황반변성 발병 위험 감소; 또는 시력감퇴 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품.

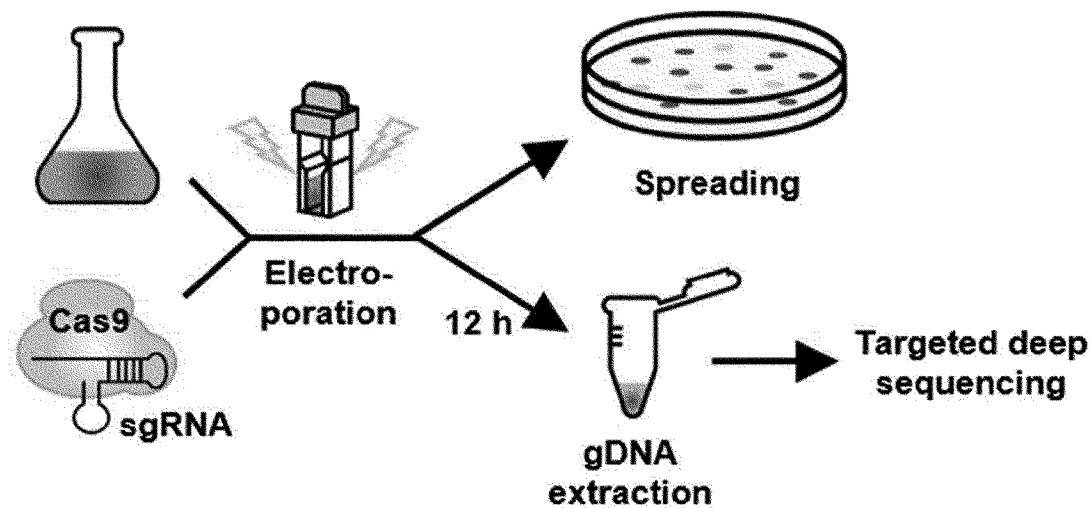
[청구항 25] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항의 변이주를 이용한 색소 생산방법.

[청구항 26] 제 25 항에 있어서,
상기 변이주, 상기 변이주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 또는 상기 배양물의 건조물로부터 색소를 추출하는 단계;를 포함하는 색소 생산방법.

[청구항 27] 제 25 항에 있어서,
상기 색소는 잔토필 색소인, 색소 생산방법.

[청구항 28] 제 12 항, 제 14 항 및 제 16 항 중 어느 한 항의 변이주를 배양하는 단계를 포함하는 식품 또는 사료 원료 생산방법.

[도1]



[도2]

	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	CTAGGCGCTGCAGGAAGCCGGGG	12.0	-	70	70.4	1	0	0
RGEN3	CGATCTTCAGAGCAGTGCGGGGG	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	AUUGCGGCUGCGCCAGCUG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN2	CUAGGCGCUGCAGGAAGCCG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN3	CGAUCUUCAGAGCAGUGCGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
RGEN4	UUGUGGAGCUGCUGACGGCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC

[도3]

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*	-	-	-	-	-	-
CGATCTTCAGAGCAGTGCGGGGG	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 (%)
CGATCTTCAGAGCAGTGCGGGGG	123297	0	0	131282	741	0.564

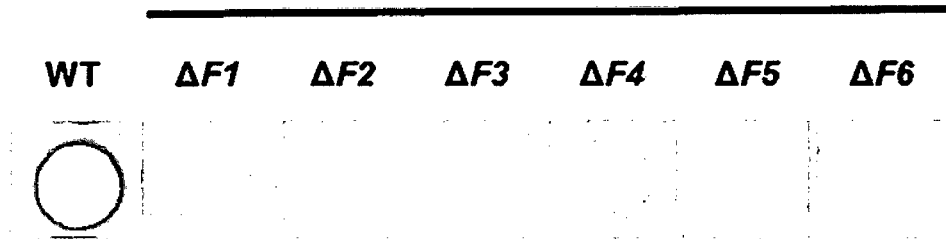
c

CGACTTCGGCCCCCG-----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA	WT
CGACTTCGGCCCC-----TGCTCTGAAGATCGTGGA	-5
CGACTTCGGCCCCCG(<i>ins</i>)CACTGCTCTGAAGATCGTGGA	+25
CGACTTCGGCCCCCGA----CACTGCTCTGAAGATCGTGGA	+1
CGACTTCGGCCCC-----TGCTCTGAAGATCGTGGA	-4
CGACTTCGGCCCCCG-----TGCTCTGAAGATCGTGGA	-3

[도4]



[도5]

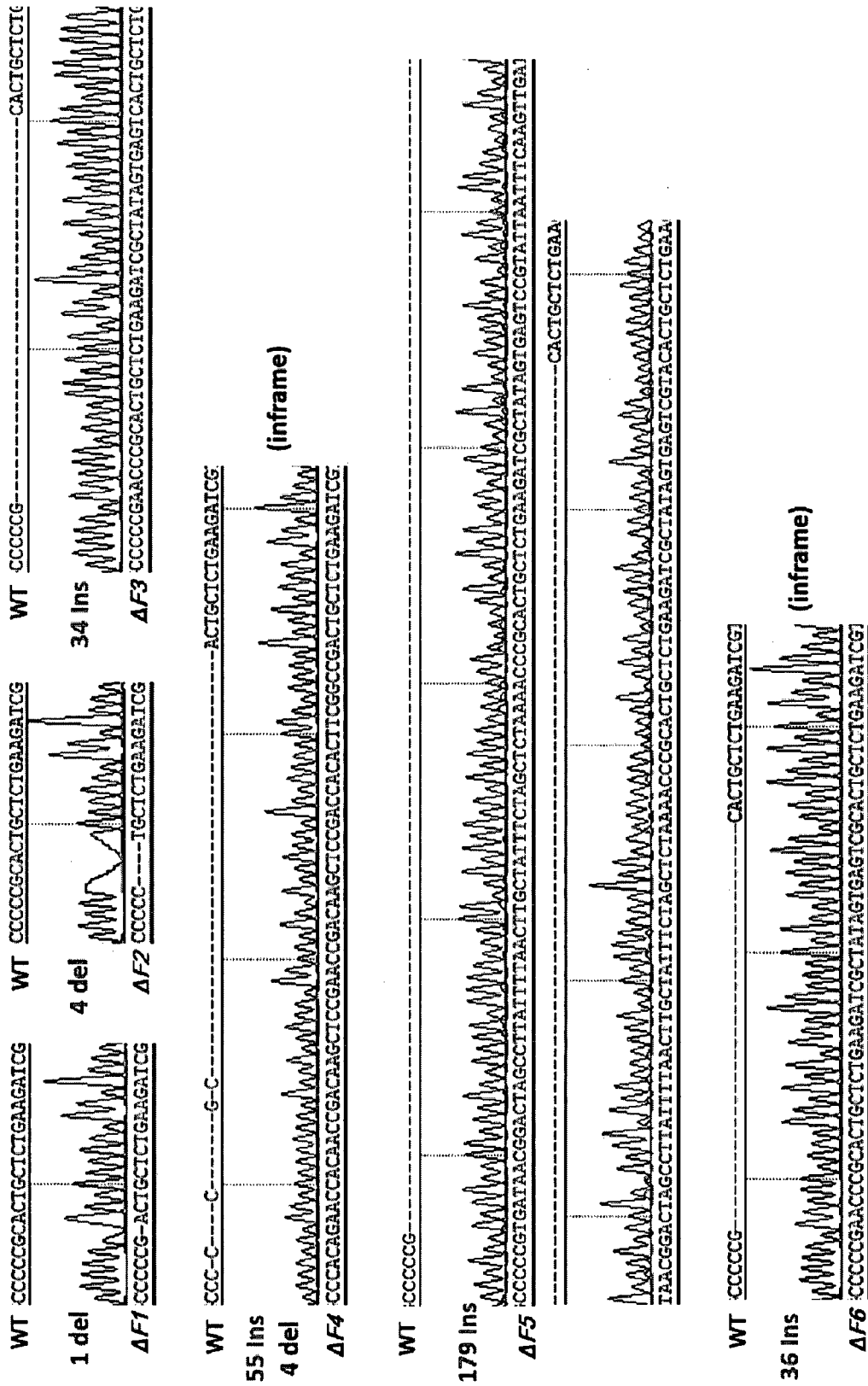
a**RGEN-induced Δ CpFTSY lines****b**

	WT	$\Delta F1$	$\Delta F2$	$\Delta F3$	$\Delta F4$	$\Delta F5$	$\Delta F6$
Chl <i>a/b</i>	2.27 ± 0.02	6.70 ± 0.34	6.08 ± 0.27	6.36 ± 0.12	4.27 ± 0.12	6.37 ± 0.03	6.45 ± 0.18
Total Chl (fmol/cell)	1.77 ± 0.19	0.43 ± 0.02	0.58 ± 0.11	0.52 ± 0.08	0.61 ± 0.08	0.44 ± 0.03	0.48 ± 0.04

c

WT	TTCGGCCCCCG-----CACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	Ins/Del
$\Delta F1$	TTCGGCCCCCG-----ACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	-1
$\Delta F2$	TTCGGCCCCC-----TGCTCTGAAGATCGTGGAC	-4
$\Delta F3$	TTCGGCCCCCG(ins)CACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	+34
$\Delta F4$	TTCGGCCC---(ins)-ACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	+55/-4
$\Delta F5$	TTCGGCCCCCG(ins)CACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	+179
$\Delta F6$	TTCGGCCCCCG(ins)CACTGCTCTGAAGATCGTGGAC	+36

[도6]



[도7]

	Target (5' to 3')	CDS Position (%)	Direction	GC Content s (w/o PAM, %)	Out-of-frame e 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	CCATGGCTTCGAGGCATCTCGG	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

[도8]

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

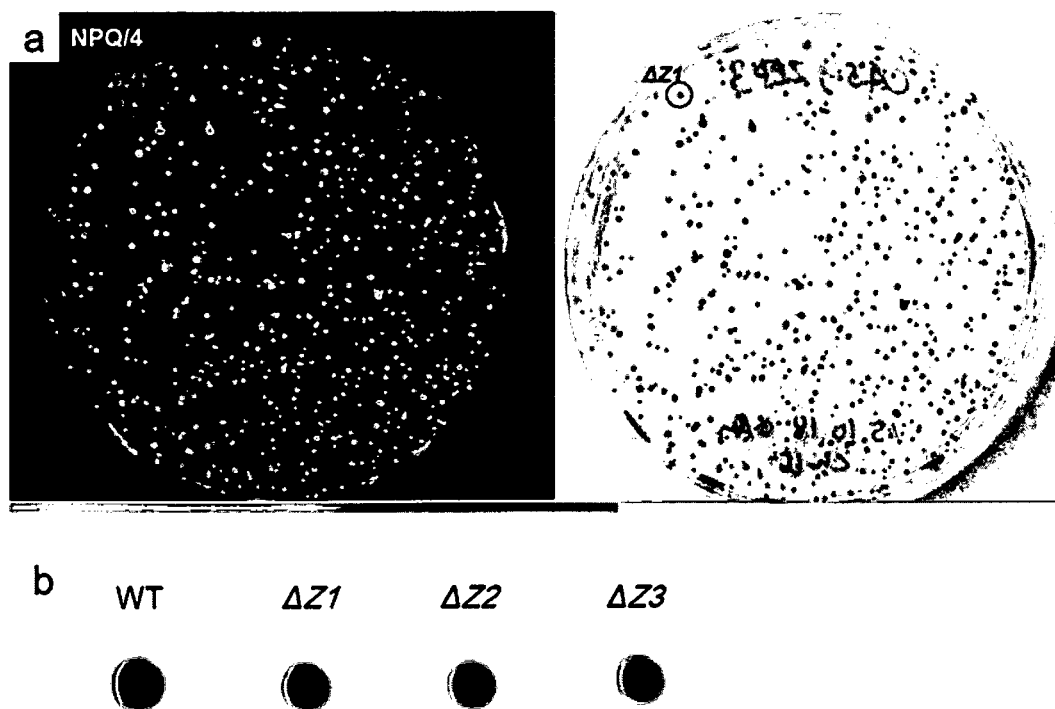
TACCGTGGACCCAT-----CAGGTGCGTTCGCCGGAACACCA -1

TACCGTGGACCCA-----GGTGCGTTCGCCGGAACACCA -4

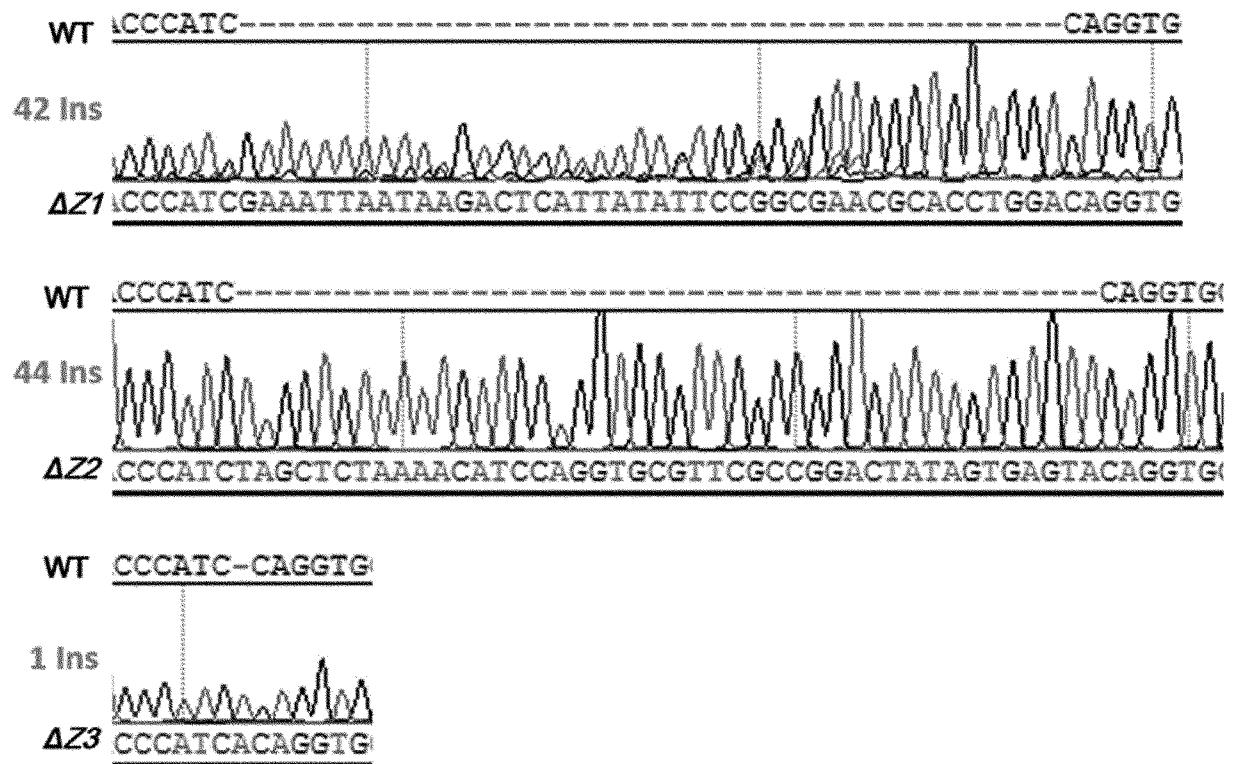
TACCGTGGACCCATCAACATCCAGGTGCGTTCGCCGGAACACCA +6

TACCGTGGACCCATCT-----GGTGCGTTCGCCGGAACACCA +1

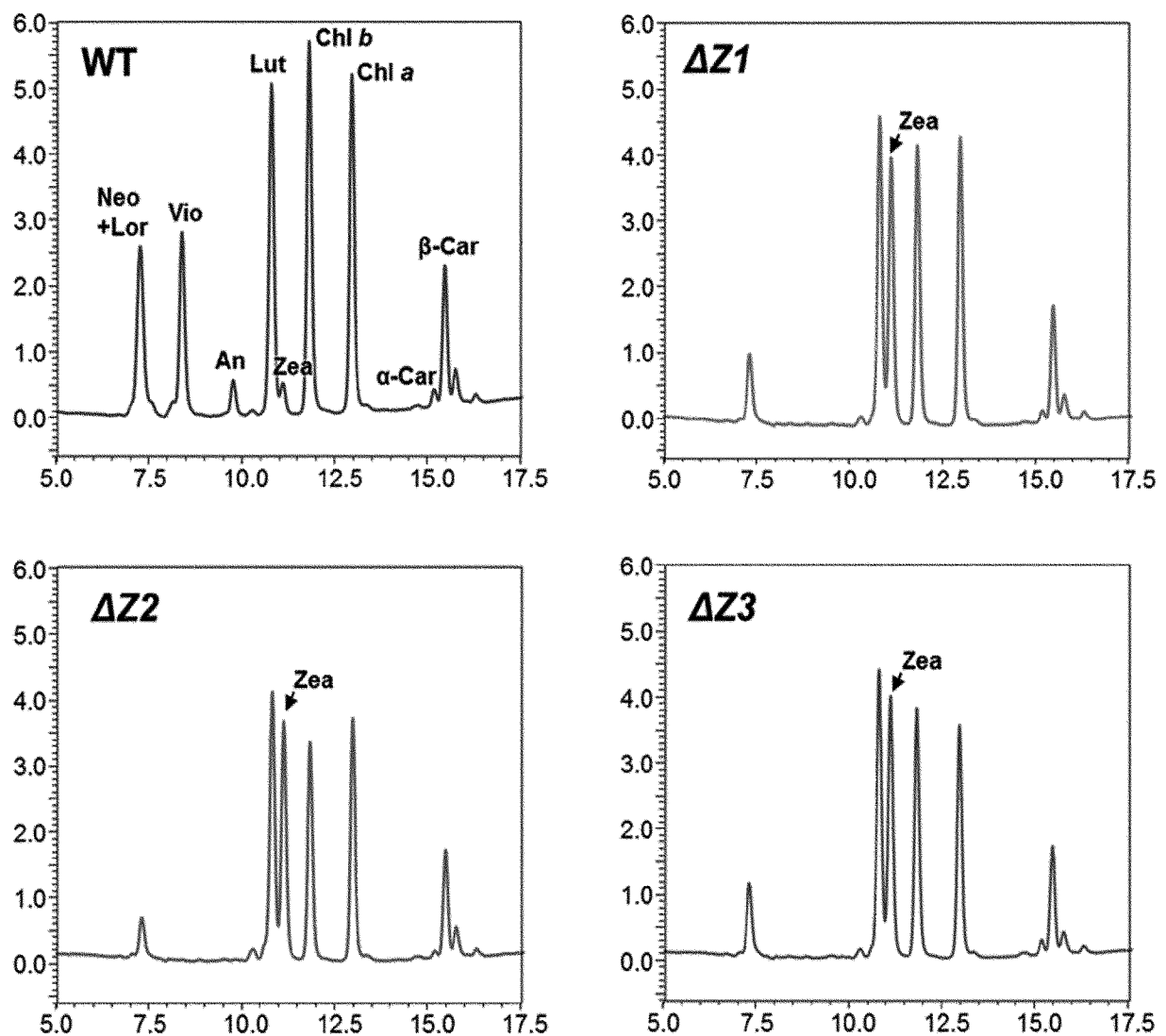
[도9]



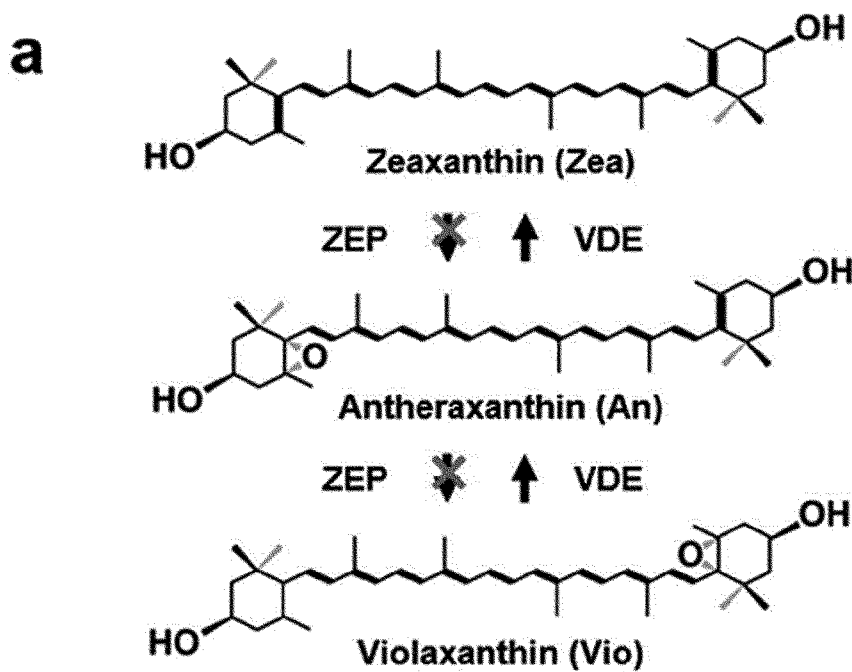
[도10]



[도11a]



[도11b]



b

WT	GTGGACCCATC-----CAGGTGCGTTCGCCGGAACACC	Ins/Del
$\Delta Z1$	GTGGACCCATC(<i>ins</i>)CAGGTGCGTTCGCCGGAACACC	+42
$\Delta Z2$	GTGGACCCATC(<i>ins</i>)CAGGTGCGTTCGCCGGAACACC	+44
$\Delta Z3$	GTGGACCCATCA-----CAGGTGCGTTCGCCGGAACACC	+1

c

	WT	$\Delta Z1$	$\Delta Z2$	$\Delta Z3$
Vio (<i>fmol</i> per cell)	0.1444 $\pm$ 0.0004	ND	ND	ND
An (<i>fmol</i> per cell)	0.0122 $\pm$ 0.0001	ND	ND	ND
Zea (<i>fmol</i> per cell)	0.0131 $\pm$ 0.0003	0.1464 $\pm$ 0.0002	0.1317 $\pm$ 0.0001	0.1457 $\pm$ 0.0012
Chl <i>a/b</i> ratio (<i>fmol:fmol</i>)	2.40 $\pm$ 0.03	2.31 $\pm$ 0.01	2.60 $\pm$ 0.01	2.19 $\pm$ 0.04

[도12]

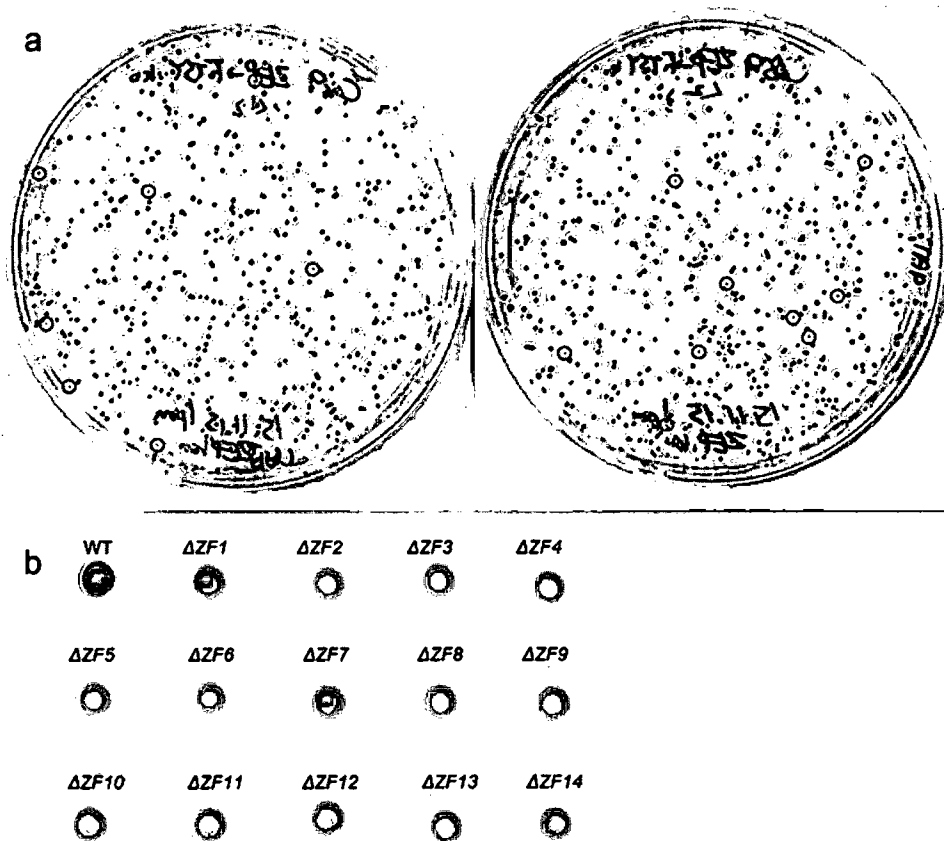
a

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

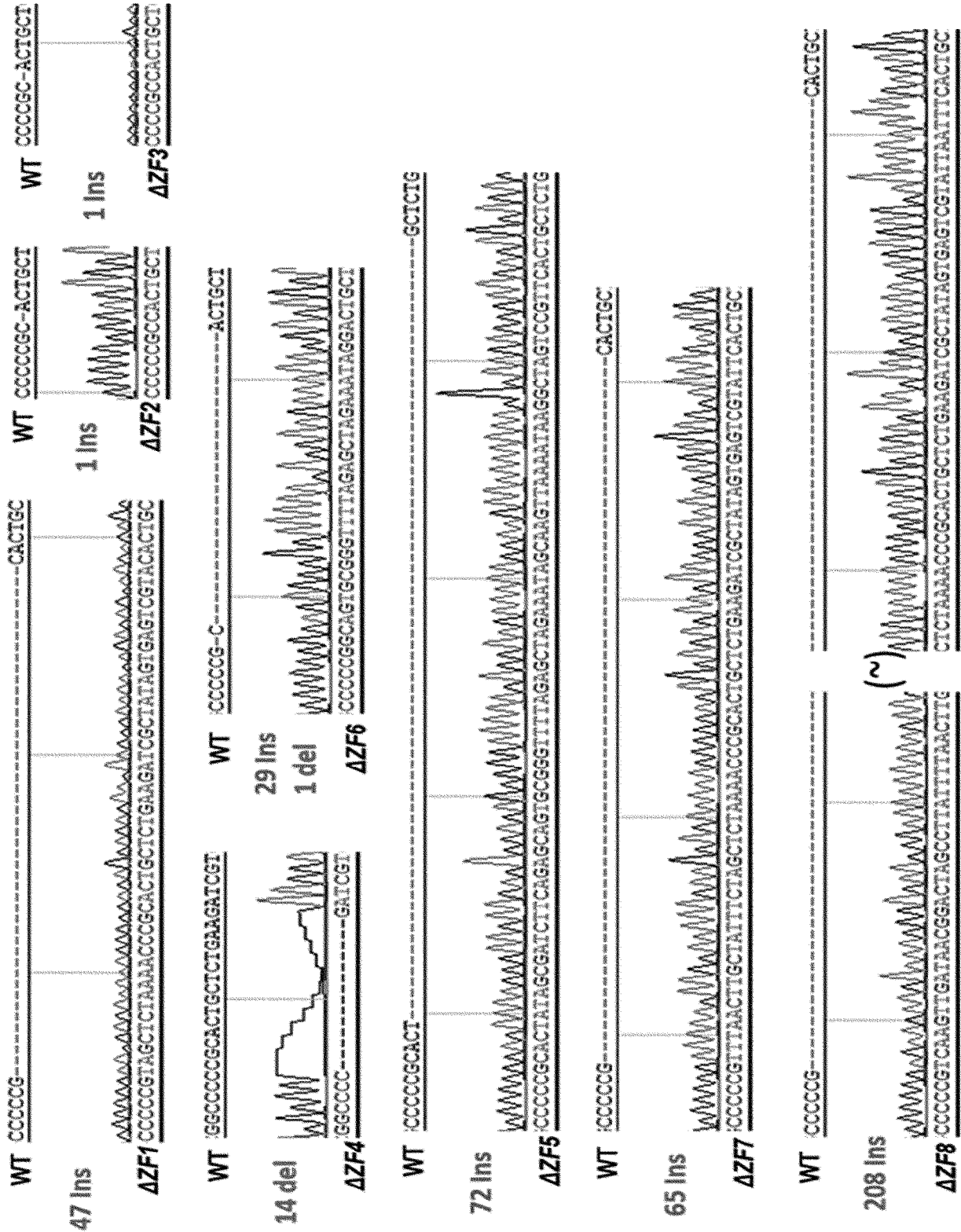
b

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

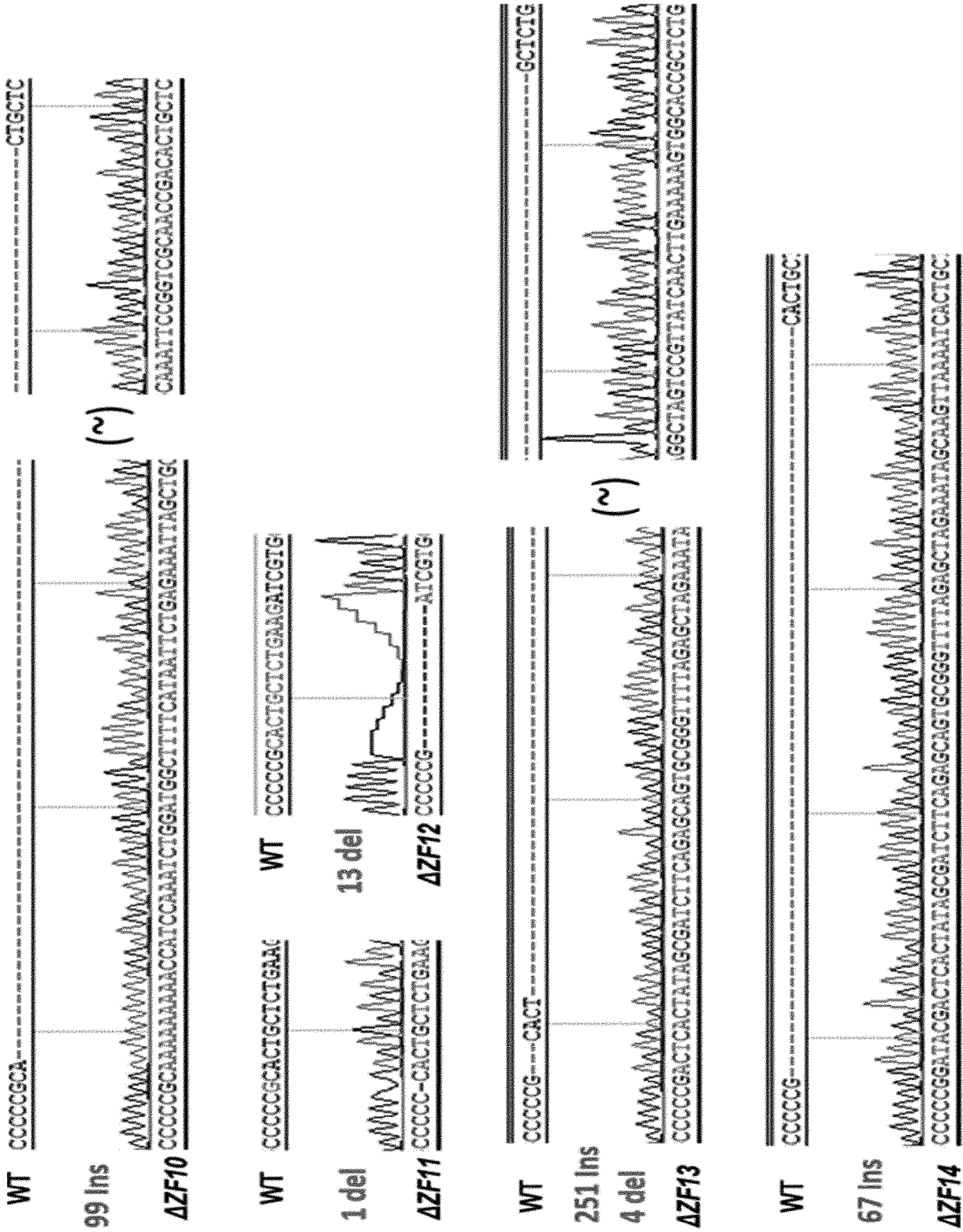
[도13]



[도 14a]



[도14b]



[도15]

	Vio (fmol/cell)	An (fmol/cell)	Zea (fmol/cell)	Chl <i>a/b</i> 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

[도16]

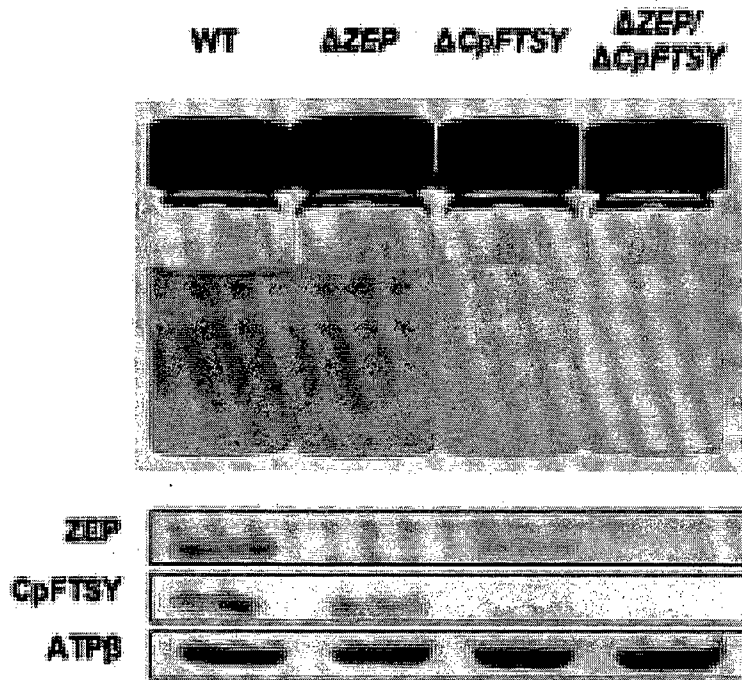
a

Target (5' to 3')	Wild type			RGEN-RNPs transfected cells		
	Total reads	Indel	Indel frequency (%)	Total reads	Indel	Indel frequency (%)
CGActTaCcGAGCAGTGCGG	4325	0	0	2688	0	0
CGcTCTcCAAtAGCAGcGCGG	32231	5	0.016	32330	3	0.009
CGcTgTTCAGcGCAGTGcTg	26676	0	0	31264	0	0
CGgTCTTCAaAGCAGcGCGt	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 (%)
cCCGGCGAGCGCACgTcGAT	211	0	0	2913	0	0
TCctGCGAGCGCAcTcGGAT	20930	2	0.01	24449	0	0
cCCGGCGcACGCACcGcAT	56426	0	0	56551	0	0
TCCGGCGAACGCcCggGcAT	53307	0	0	42259	0	0
aCCGGCGAAgGcTcATGGAT	31759	0	0	51013	0	0
TCCGGCGAcCtgACCTGGAA	12944	0	0	27270	4	0.015
cCtGGCaAACGCACCTGGAc	6127	0	0	42126	0	0
TgCGGCGAACGcTgCTGGgT	14289	0	0	35748	0	0
ggCGGCGgACGCACCTGGgT	8634	0	0	53493	2	0.004
cCCGGCGAcCGCACCTGcAc	6037	4	0.066	15948	0	0
TCCcGCGcACGCACCTtGtT	24892	2	0.008	38987	0	0
TCCGGC-AACGCACcGcAT	18402	109	0.592	35548	12	0.034
TCC-GCGAACGCgaCTGGAT	27003	55	0.204	15568	12	0.077

[도17]



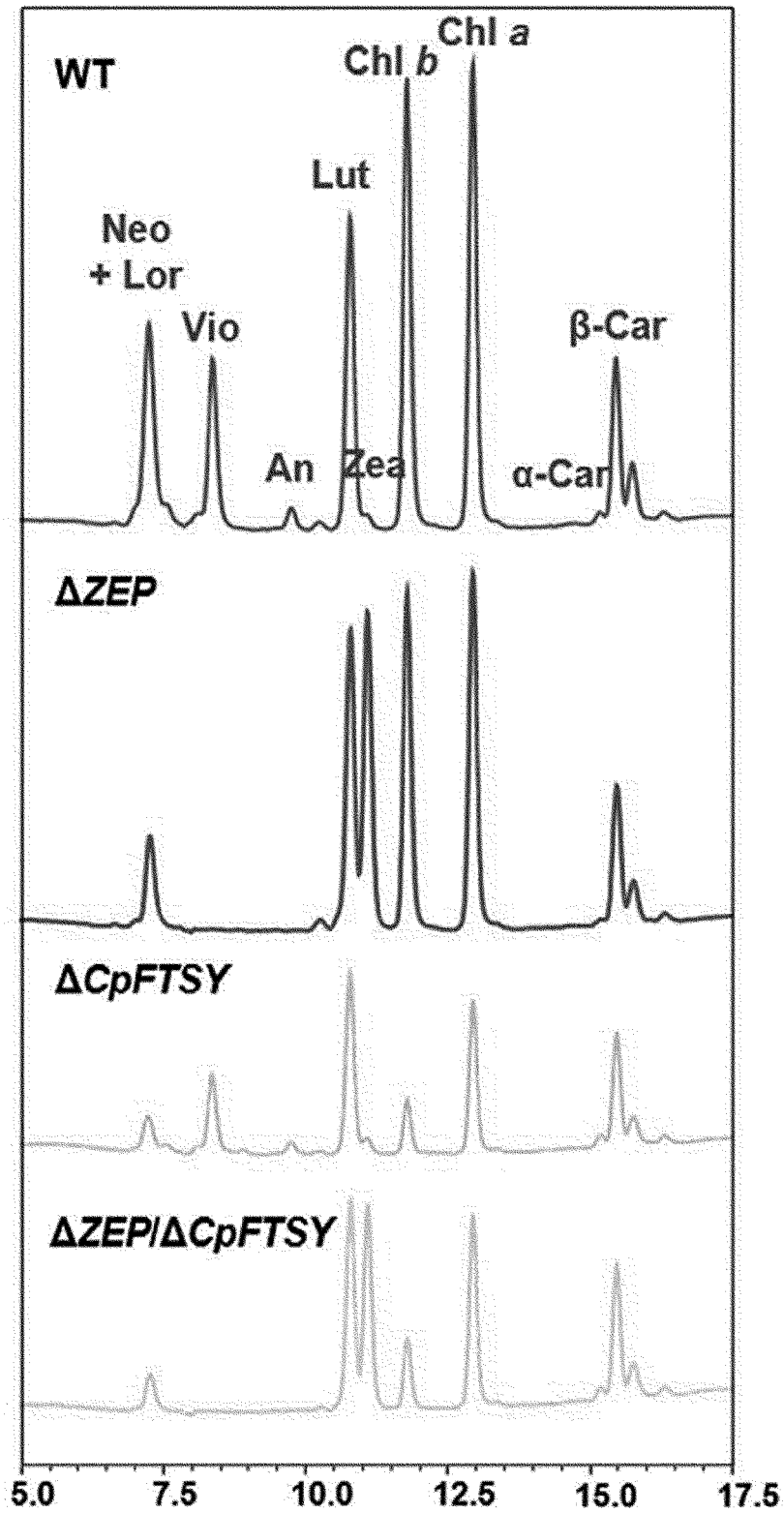
[도18]

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	actaacacacccacacccac	
ZEP_3_1st_for	ctacgtcgccttactgtgtg	PCR target locus of <i>ZEP</i> gene
ZEP_3_1st_rev	gattgcctactcaccactcg	
ZEP_3_2nd_for	ccaggttcaggtctttgagc	
ZEP_3_2nd_rev	caacgctggctaaacatgct	

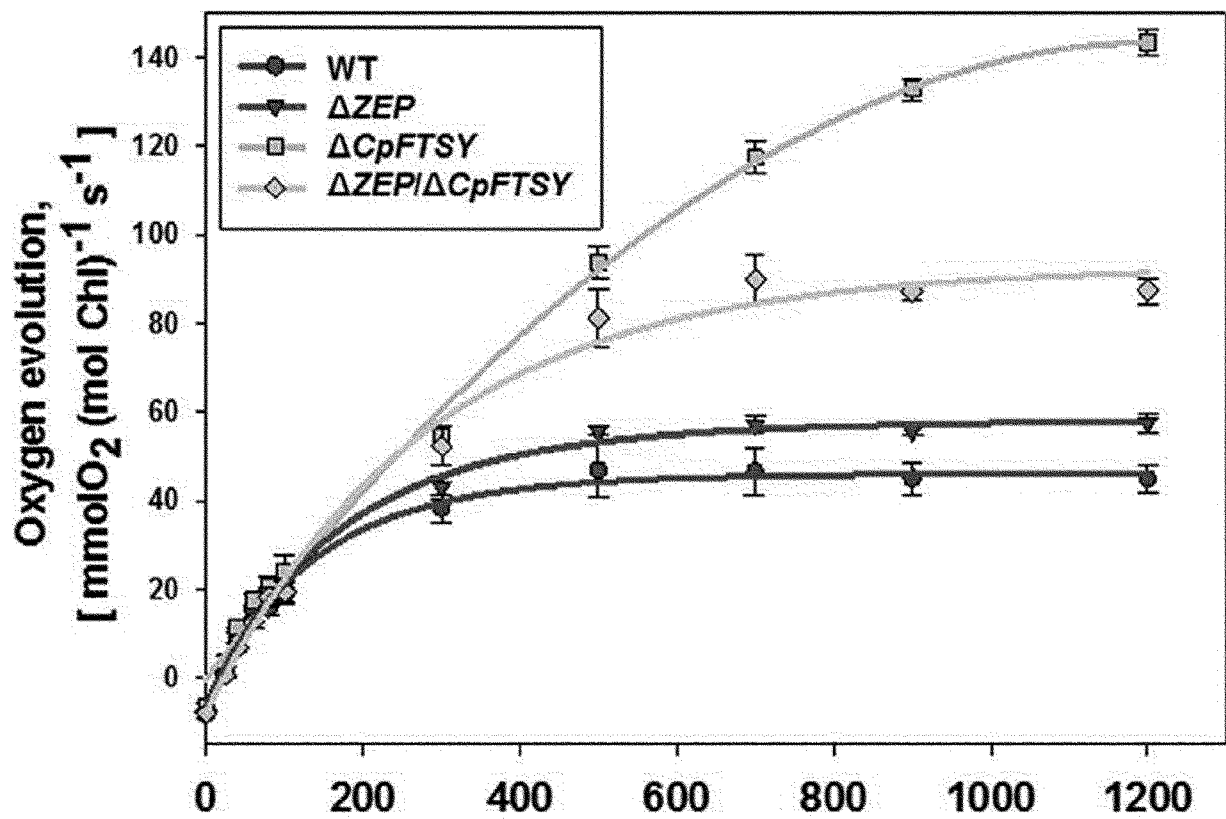
[도19]

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

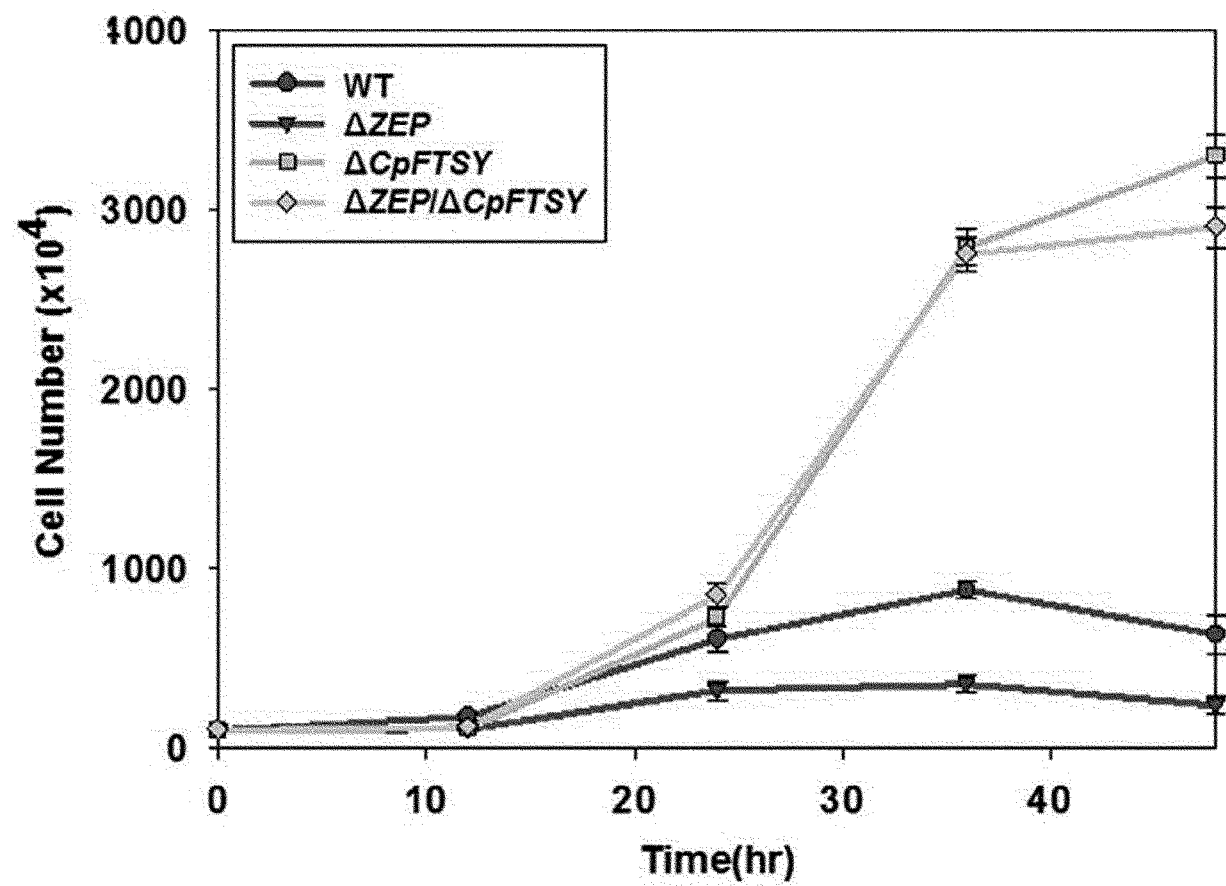
[도20]



[도21]



[도22]



[도23]

	WT	ΔZEP	$\Delta CpFTSY$	$\Delta ZEP/\Delta CpFTSY$
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) ⁻¹ s ⁻¹)	48.93 ± 0.76	61.4 ± 2.12	143.28 ± 3.24	94.77 ± 2.21

[도24]

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

[도25]

SpCas9 서열

MGSSHHHHHHVYPYDVPDYAELP **PKKKRKV** GIRIPGEKPDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKK
 FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL
 EESFLVEEDKKHERHPFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHMIKFRGHFLIEG
 DLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKILSARLSKSRLENLIAQLPGKKNGLFGNLIA
 LSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEIT
 KAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
 DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPL
 ARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE
 LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG
 TYHDLKIIKD KDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTG WGR
 SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI
 KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVE
 NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHDHVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP
 SEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMN
 TKYDENDKLIREVKVITL KSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVY
 GDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
 ATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPPKYGGFDSPTVAYSVLVVAK
 VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFEENGRKRMLASAGE
 LQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK
 VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRI
 DLSQLGGD*

↵

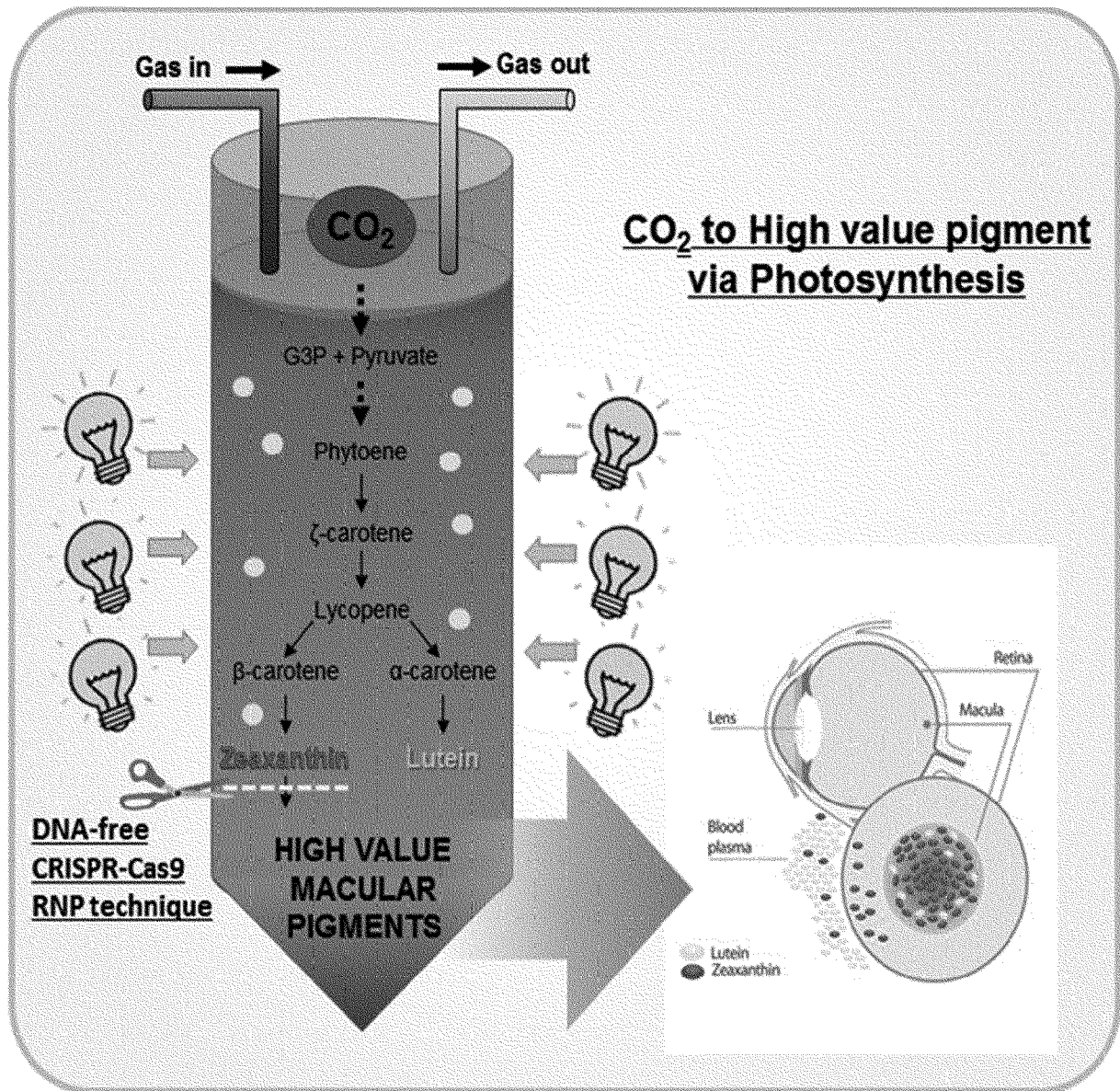
6xHis

HA tag

SV40 NLS

SpCas9

[도26]



[도27]

클라미도모나스 Wild type의 Zeaxanthin epoxidase(ZEP) 유전자와 ZEP mutant 1, 2, 3에서의 ZEP 유전자에 대한 정보

5'UTR / CDS / 3'UTR

Target sequence

Zeaxanthin epoxidase, chloroplast precursor (ZEP1) (NP22) (PMID: 13671093). Previously annotated as ZEP

>Wild type ZEP gDNA sequence

[illegible]

[도28]

	#RGEN Target (5' to 3')	Position	Cleavage Position	Direction	GC Contents (w/o PAM)	Out-of-frame Score	Mismatch 0	Mismatch 1	Mismatch 2
RGEN1	CACCAGCTGCGCGACCGAGCTGG	638	9.732573433	-	75	84.3	1	0	0
RGEN2	GCCGTTGCACTTCTGAAGCAGGG	724	13.98509426	+	55	75.3	1	0	0
RGEN3	TCCGGCGAACGCACCTGGATGGG	811	17.31696624	-	65	75.4	1	0	0
RGEN4	TGGTGGGCGCCGACGGCATCTGG	2569	33.97632617	+	75	88.2	1	0	0
RGEN5	CCATGGCTTCGCAGGCATCTCGG	2868	37.26435774	+	60	71.2	1	0	0

[도29]

a

	total	mut	freq(%)	total	mut	freq(%)
RGEN1	4276	4	0.094	9541	0	0
RGEN2	16734	6	0.036	19060	0	0
RGEN3	16888	77	0.456	30992	0	0
RGEN4	20274	9	0.044	17138	0	0
RGEN5	15398	17	0.11	7867	0	0

b

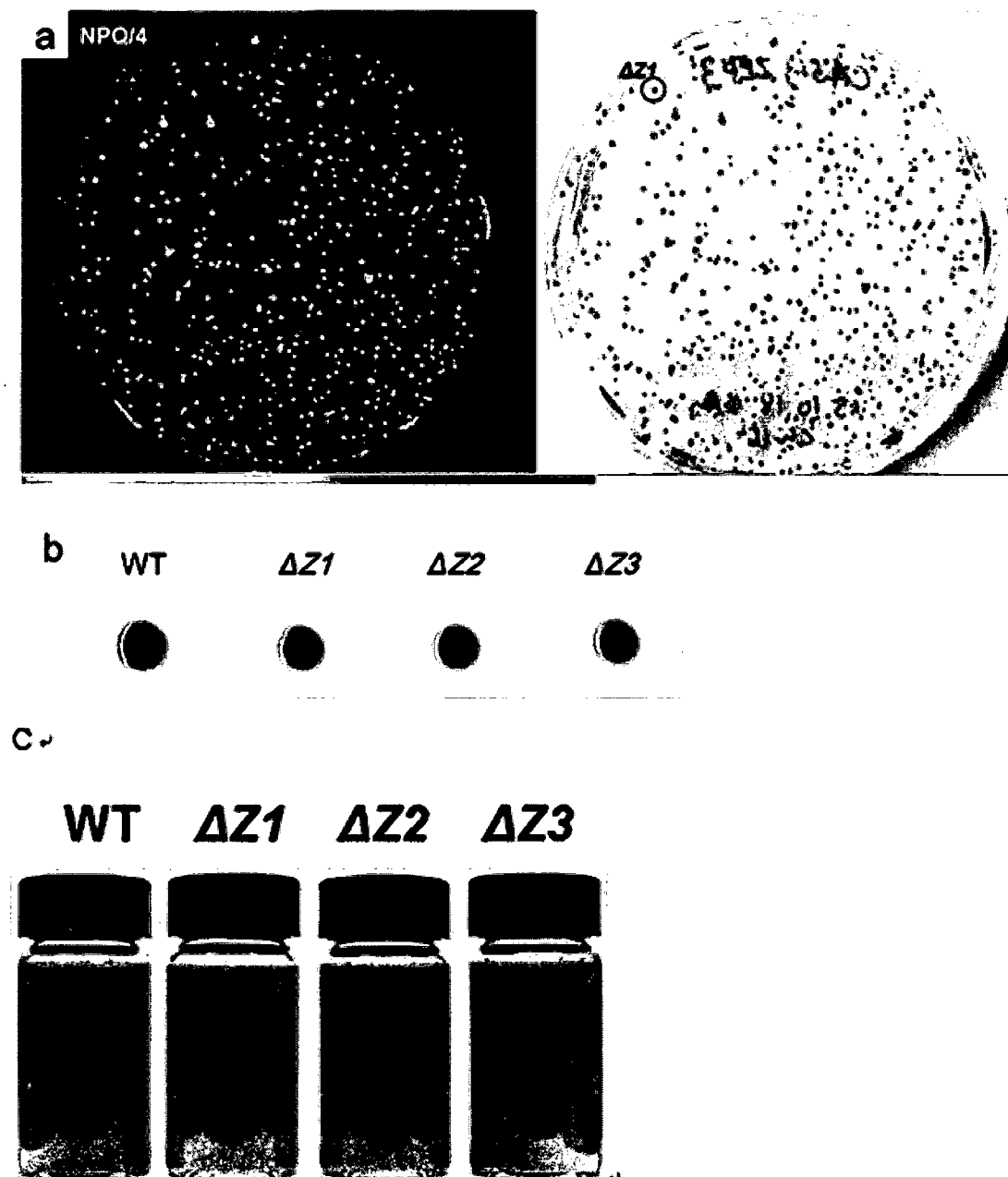
Control

GCCATCCGCGGCGAGGGCAAGTACCGTGGACCCATC-----CAGGTGCGTTGCGCGGAACCAACGCGCTTGTTTTGCTGTGCCGC

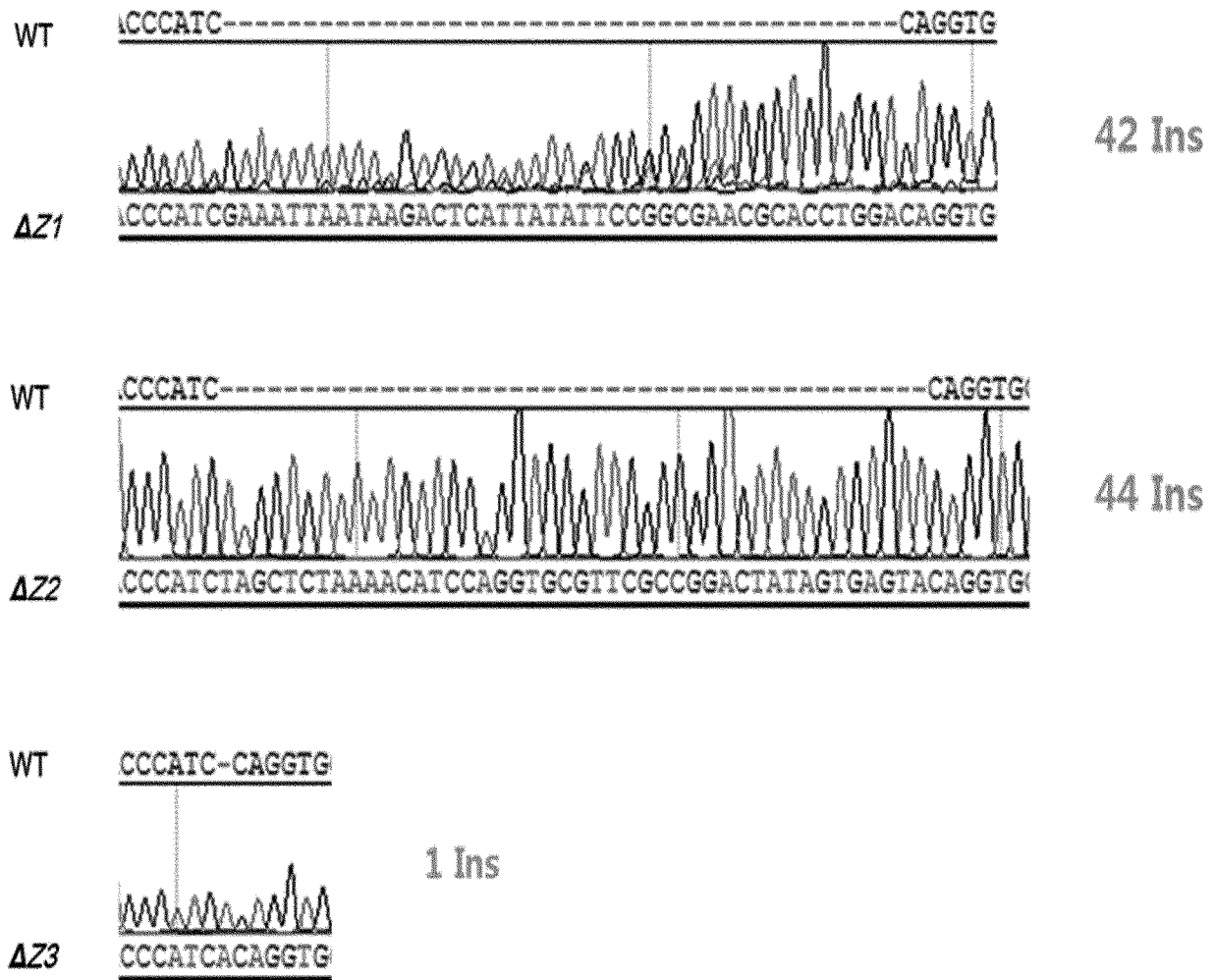
ZEP-RGEN3

GCCATCCGCGGCGAGGGCAAGTACCGTGGACCCATC-----CAGGTGCGTTGCGCGGAACCAACGCGCTTGTTTTGCTGTGCCGC	2 ins
GCCATCCGCGGCGAGGGCAAGTACCGTGGACCCAT-----CAGGTGCGTTGCGCGGAACCAACGCGCTTGTTTTGCTGTGCCGC	1 del
GCCATCCGCGGCGAGGGCAAGTACCGTGGACCA-----GGTGC GTTCGCGGAACCAACGCGCTTGTTTTGCTGTGCCGC	4 del
GCCATCCGCGGCGAGGGCAAGTACCGTGGACCCATCaacatcCAGGTGCGTTGCGCGGAACCAACGCGCTTGTTTTGCTGTGCCGC	6 ins
GCCATCCGCGGCGAGGGCAAGTACCGTGGACCCATC-----CAGGTGCGTTGCGCGGAACCAACGCGCTTGTTTTGCTGTGCCGC	1 ins

[도30]

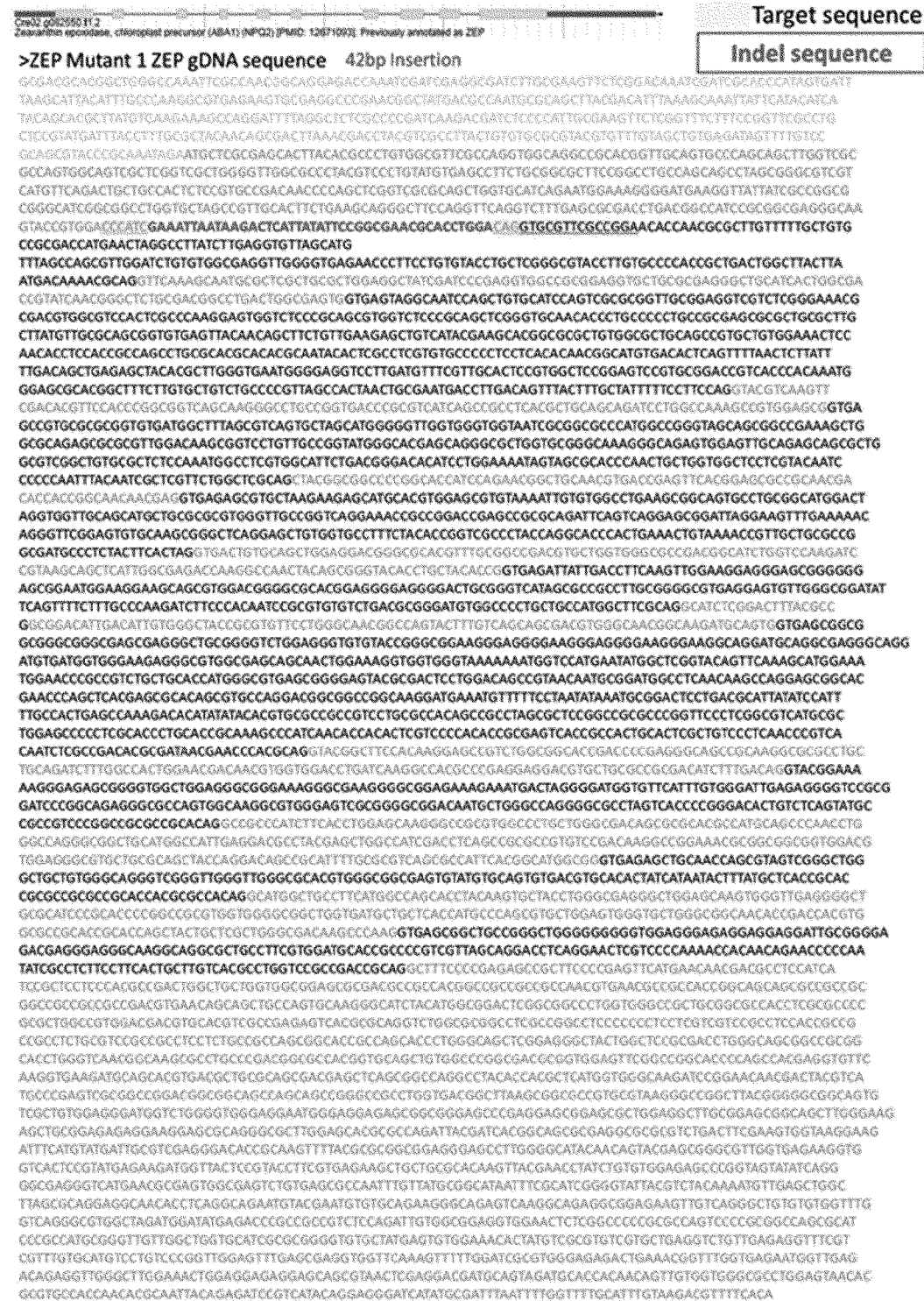


[도31]



[도32a]

클라미도모나스 Wild type의 Zeaxanthin epoxidase(ZEP) 유전자와 ZEP mutant 1, 2, 3에서의 ZEP 유전자에 대한 정보



[도32b]

클라미도모나스 Wild type의 Zeaxanthin epoxidase(ZEP) 유전자와 ZEP mutant 1, 2, 3에서의 ZEP

유전자에 대한 정보



[도32c]

클라미도모나스 Wild type의 Zeaxanthin epoxidase(ZEP) 유전자와 ZEP mutant 1, 2, 3에서의 ZEP

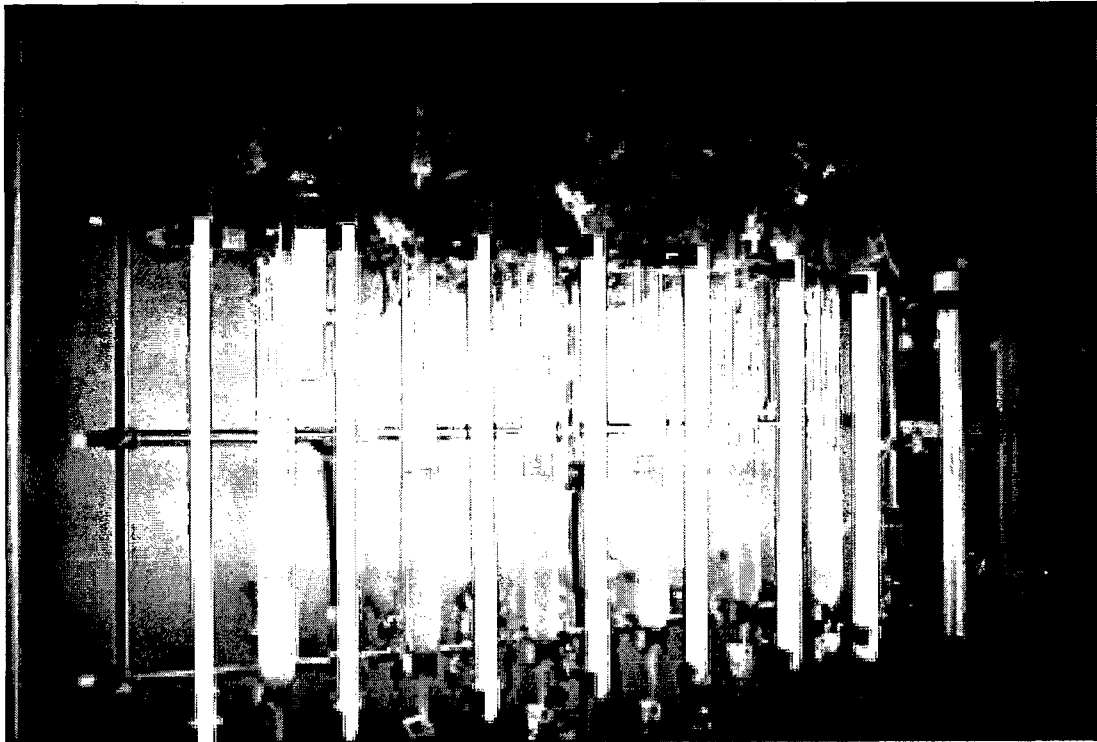
유전자에 대한 정보



>ZEP Mutant 3 ZEP gDNA sequence 1bp insertion

[illegible]

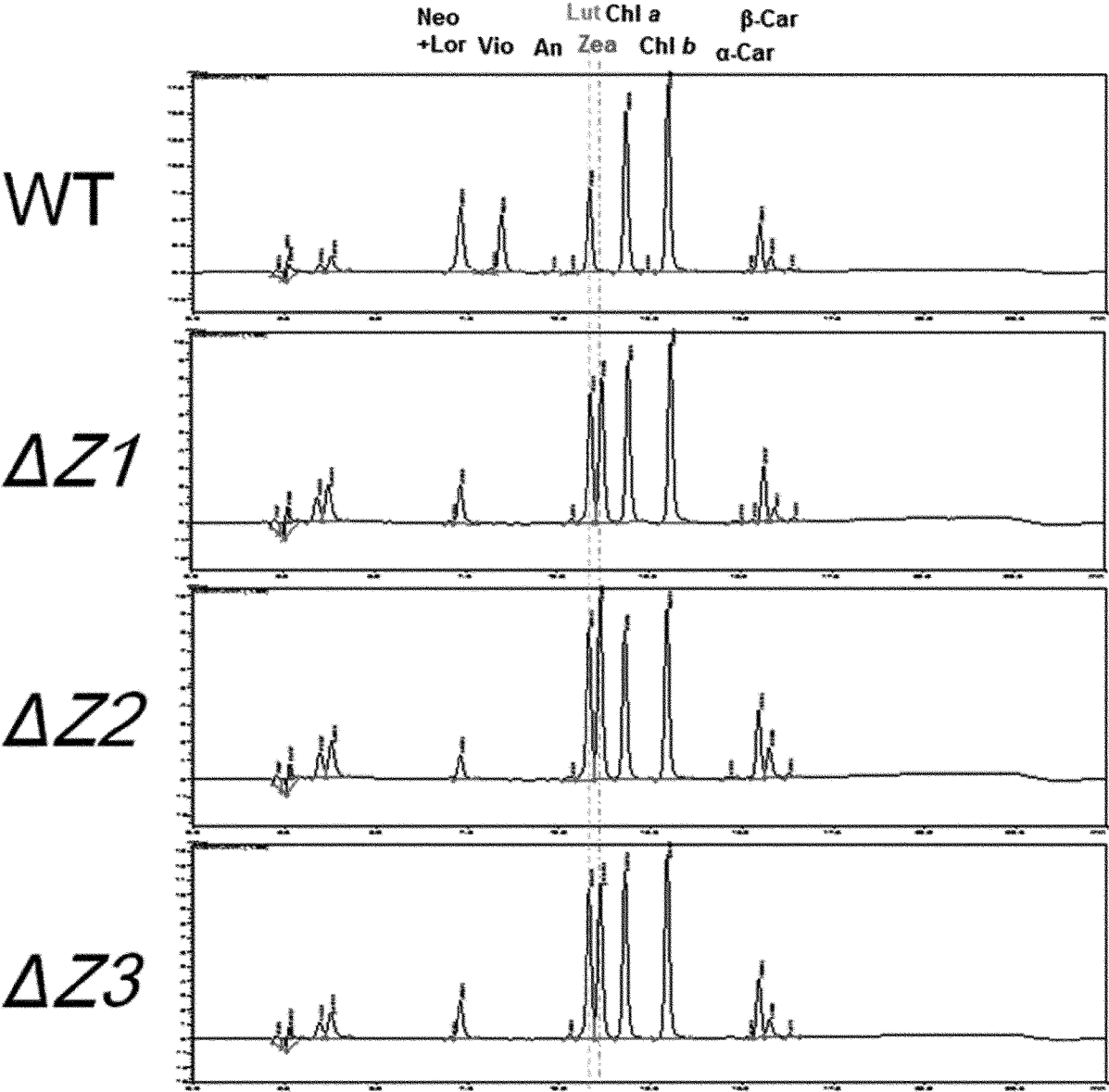
[도33]



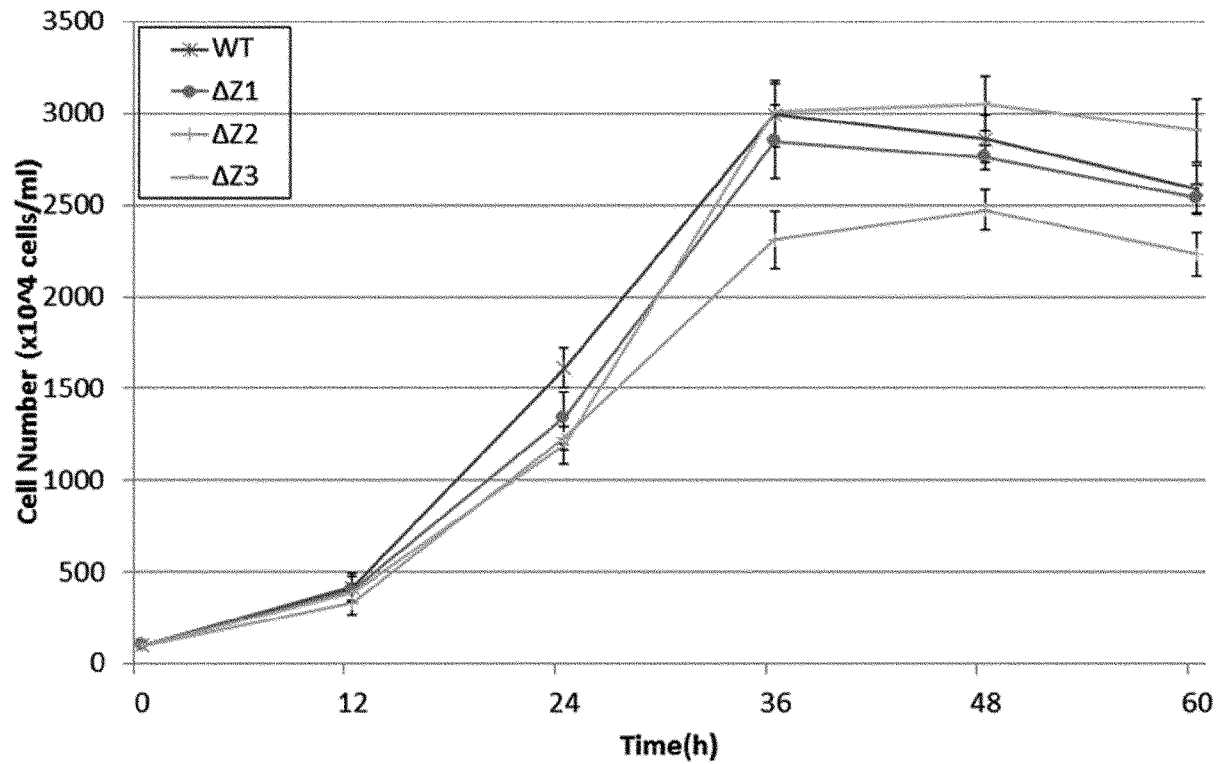
[도34]



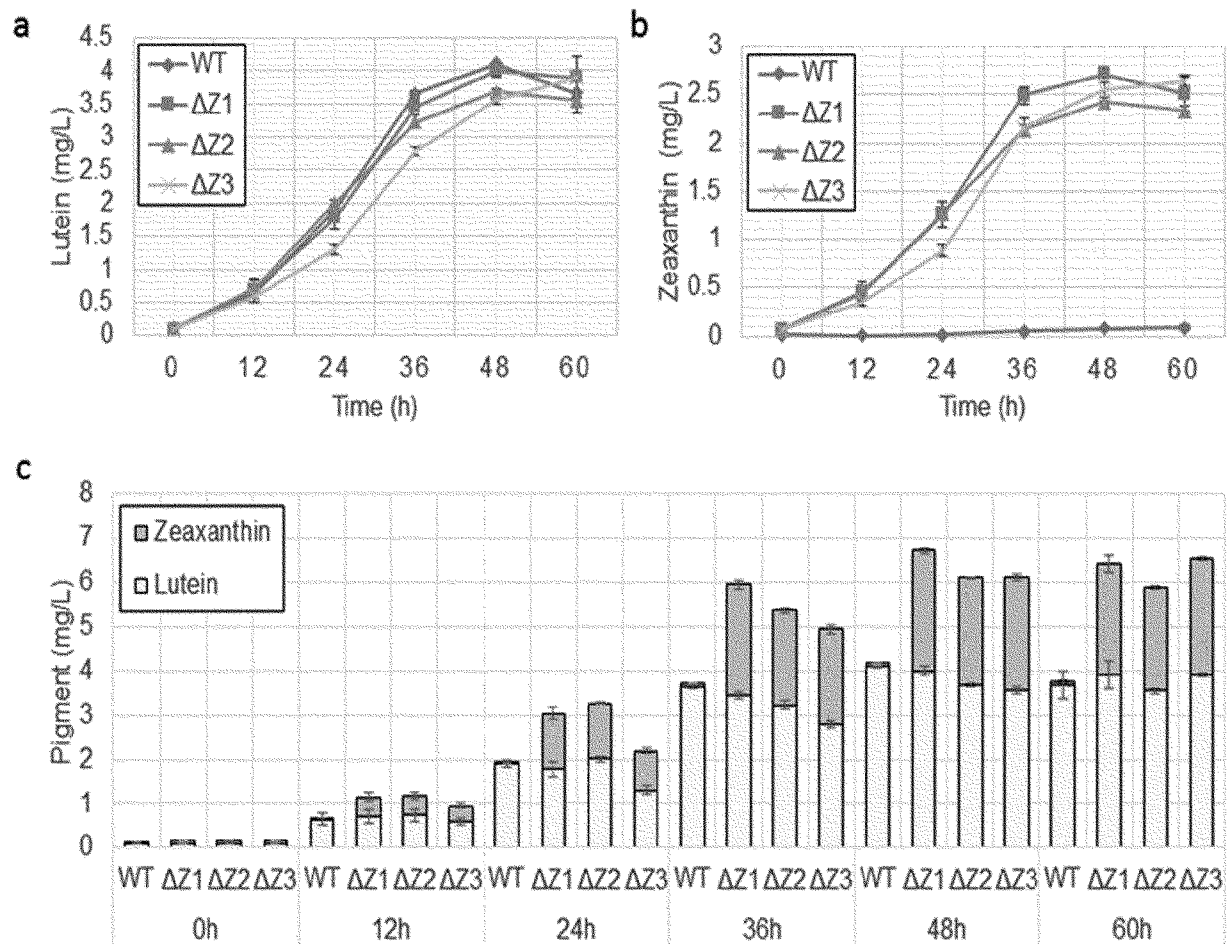
[도35]



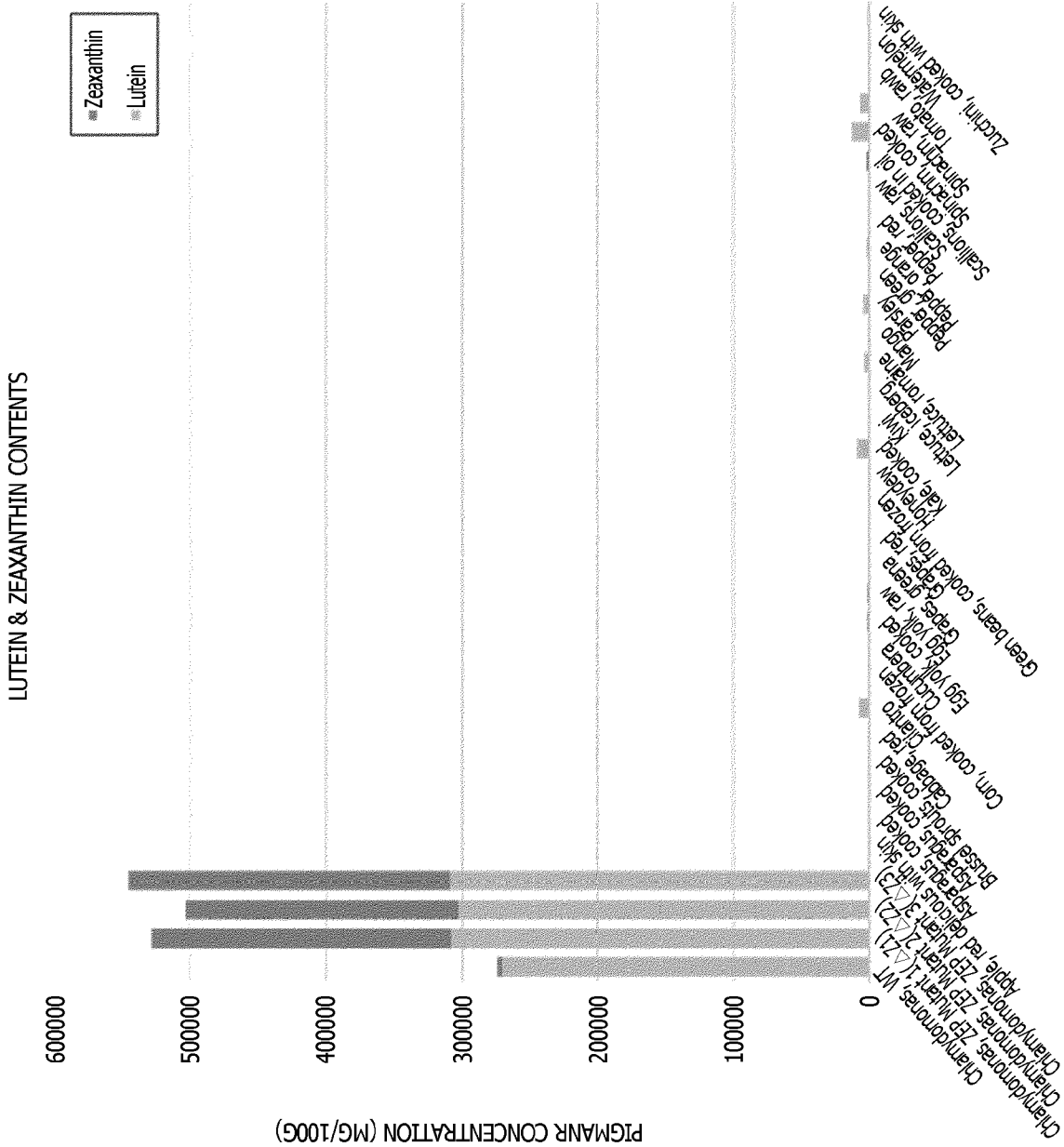
[도36]



[도37]



[도38]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12R 1/89(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/63; C12N 15/09; C12N 9/22; C12N 15/113; C12R 1/89

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Cas9, guide RNA, microalgae, gene editing, electroporation, xanthophyll

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015-086795 A1 (CELLECTIS) 18 June 2015 See abstract; pages 2, 10, 14, 16-17; and claims 1, 5, 20.	1-11
A		12-28
A	JIANG et al., "Successful Transient Expression of Cas9 and Single Guide RNA Genes in Chlamydomonas Reinhardtii", Eukaryotic Cell, 19 September 2014 (Online), vol. 13, no. 11, pages 1465-1469 See abstract; pages 1465-1467; and figure 1.	1-28
A	COUSO et al., "Efficient Heterologous Transformation of Chlamydomonas Reinhardtii Npq2 Mutant with the Zeaxanthin Epoxidase Gene Isolated and Characterized from Chlorella Zofingiensis", Marine Drugs, 12 September 2012, vol. 10, pages 1955-1976 See abstract; and pages 1965-1968.	1-28
A	JINKERSON et al., "Molecular Techniques to Interrogate and Edit the Chlamydomonas Nuclear Genome", The Plant Journal, 19 February 2015 (Online), vol. 82, pages 393-412 See abstract; and pages 399-403.	1-28



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 JULY 2017 (25.07.2017)	Date of mailing of the international search report 25 JULY 2017 (25.07.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004268

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM et al., "Highly Efficient RNA-guided Genome Editing in Human Cells via Delivery of Purified Cas9 Ribonucleoproteins", Genome Research, 02 April 2014 (Online), vol. 24, pages 1012-1019 See abstract; and pages 1013-1014, 1017-1018.	1-28
PX	BAEK et al., "DNA-free Two-gene Knockout in Chlamydomonas Reinhardtii via CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins", Scientific Reports, 28 July 2016, vol. 6, article no. 30620, internal pages 1-7, See pages 1-5.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004268

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-086795 A1	18/06/2015	AU 2014-363476 A1	23/06/2016
		CA 2933134 A1	18/06/2015
		EP 3080256 A1	19/10/2016
		JP 2016-539653 A	22/12/2016
		US 2016-0304893 A1	20/10/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12R 1/89(2006.01)n

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/63; C12N 15/09; C12N 9/22; C12N 15/113; C12R 1/89

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Cas9, 가이드 RNA, 미세조류, 유전자 교정, 전기천공, 잔토피

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2015-086795 A1 (CELLECTIS) 2015.06.18 요약; 페이지 2, 10, 14, 16-17; 및 청구항 1, 5, 20 참조.	1-11
A		12-28
A	JIANG 등, 'Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in Chlamydomonas reinhardtii', Eukaryotic Cell, 2014.09.19(online), 13권, 11호, 페이지 1465-1469 요약; 페이지 1465-1467; 및 도면 1 참조.	1-28
A	COUSO 등, 'Efficient heterologous transformation of Chlamydomonas reinhardtii npq2 mutant with the zeaxanthin epoxidase gene isolated and characterized from Chlorella zofingiensis', Marine Drugs, 2012.09.12, 10권, 페이지 1955-1976 요약; 및 페이지 1965-1968 참조.	1-28
A	JINKERSON 등, 'Molecular techniques to interrogate and edit the Chlamydomonas nuclear genome', The Plant Journal, 2015.02.19(online), 82권, 페이지 393-412 요약; 및 페이지 399-403 참조.	1-28

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 25일 (25.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 25일 (25.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM 등, ‘Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins’ , Genome Research, 2014.04.02(online), 24권, 페이지 1012-1019 요약; 및 페이지 1013-1014, 1017-1018 참조.	1-28
PX	BAEK 등, ‘DNA-free two-gene knockout in Chlamydomonas reinhardtii via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins ‘, Scientific Reports, 2016.07.28, 6권, Article No. 30620, 내부페이지 1-7 페이지 1-5 참조.	1-11

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2015-086795 A1

2015/06/18

AU 2014-363476 A1

2016/06/23

CA 2933134 A1

2015/06/18

EP 3080256 A1

2016/10/19

JP 2016-539653 A

2016/12/22

US 2016-0304893 A1

2016/10/20