

무엇을 편집할 것인가:

극지 유전자원의 기능진화 분석을 통한 단축진화 수행

What to edit:

Rapid Evolution Through Analysis on  
Functional Evolution of Polar Genetic Resource

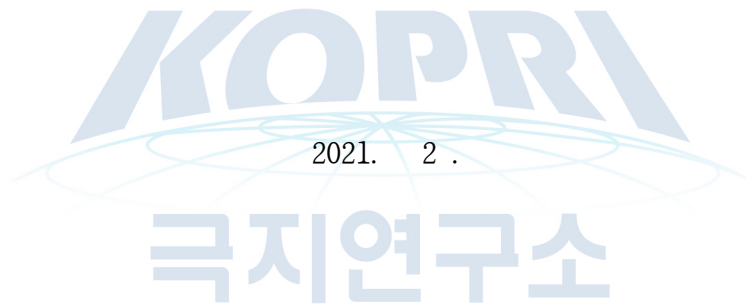


서강대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “ 국내 학·연 극지연구진흥프로그램(PAP사업)” 에 관한 연구 “(무엇을 편집할 것인가: 극지 유전자원의 기능진화 분석을 통한 단축진화 수행)” 과제의 최종보고서(무엇을 편집할 것인가: 극지 유전자원의 기능진화 분석을 통한 단축진화 수행)로 제출합니다.



연구기관명 : 서강대학교  
연구책임자 : 이 병 하  
참여연구원 : Seher Yolcu  
“ : 유 시 인  
“ : 유 경 재  
“ : 배 노 아  
“ : 김 희 진  
“ : Yidi Xu  
“ : 김 미 선

# 요 약 문

## I. 제 목

무엇을 편집할 것인가: 극지 유전자원의 기능진화 분석을 통한 단축진화 수행

## II. 연구개발의 목적

- 기발굴 극지이끼 유전자원에서 기능적 진화를 가능하게 한 아미노산기를 실험적으로 확정하고, 유전자편집을 통해 타식물의 비진화 homologous 유전원에 기능진화 아미노산기를 도입하는 단축진화를 시도한다.
- 또한, 스트레스 저항성에 관여함이 본 연구팀에 의해 이미 밝혀진 극지이끼 유전자원을 대상으로 그 상대적 기능적 우수성을 확인하여 기능 진화 유전자원을 확장한다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

- 전사인자인 MBF1c 과발현시, 애기장대 유전자 (AtMBF1c)가 고온스트레스 저항성만을 일으키는 것과는 달리, 기 발굴 극지이끼 유전자 (PaMBF1c)는 고온 뿐만 아니라, 염스트레스 저항성을 일으키는 기능적 진보성을 가지고 있다.
- 극지이끼 유전자원 PaMBF1c의 선행연구 결과에 근거하여, 유전자 기능 분석이 가능한 리포터 시스템을 구축하고 이를 활용하여, AtMBF1c의 아미노산기 돌연변이 유도 및 기능 분석을 통해, 기능성 강화 아미노산기를 탐색했다.
- 기능성 부여가 확정된 아미노산에 대해 애기장대 내재 homolog, AtMBF1c에 대해 유전자 편집술을 적용, 극지 이끼 유전자의 기능성 강화 아미노산기를 AtMBF1c에 도입할 수 있는 단축 진화를 유도했다.
- 아울러, 연구 개발 대상 유전자원의 확장하는 병행 연구를 진행하여, 보다 범용적인 연구 적용을 수행했다.

## IV. 연구개발결과

- PaMBF1c의 목적 유전자 후보인 RUBP의 프로모터에 luciferase 리포터 유전자를 결합한 RUBP promoter-luciferase 리포터 시스템을 담배잎과 애기장대 원형질체에 적용, 구축하였다.
- 이 RUBP promoter-luciferase 리포터시스템을 이용하여, PaMBF1c에서 인산화가 발생할 것으로 추정되는 부위가 도입된 AtMBF1c가, 비변형 AtMBF1c 보다 높고, PaMBF1c 정도 되는 전사활성력을 가지게 됨을 발견하였고, 이 기능성 강화 아미노산기를 포함하는 AtMBF1c를 과발현시, 애기장대에서 염저항성이 정상체보다 더 커진 것을 확인하였다. 이를 근거로 CRISPR/Cas9 유전자 교정을 시도하여, 기능성 강화 아미노산기가 유전자 교정된 AtMBF1c를 보유하는 애기장대 식물을 제작하였다.
- 또한, 스트레스 저항성이 온대식물의 상동유전자 보다 더 우수한 신규 극지이끼 유전자 plastocyanin을 발굴하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구와 기술을 기반으로 한 극지이끼, 나아가 극지식물 유전자원을 활용한 작물개량체 제작 과제를 추진하고, 극지 이끼 유전자의 기능 진화를 가능하게 한 아미노산기 확정 및 유전자 기능성 특허 출원을 추진한다.

# SUMMARY

## I. Title

What to edit: Rapid Evolution Through Analysis on Functional Evolution of Polar Genetic Resource

## II. Purpose and Necessity of R&D

- We aimed to identify amino acid residues that make the functional evolution of polar moss gene possible and try rapid evolution and give evolutionary functionality to plants by introducing the functional evolution-causing amino acid residues to the less-functional homologs through the gene editing.
- We aimed to try to find more functionally evolved polar moss genes by analyzing their functional superiority.

## III. Contents and Extent of R&D

- MBF1c is a transcriptional regulator. When overexpressed, Arabidopsis MBF1c (AtMBF1c) resulted in only high temperature tolerance. In contrast, *Polytrichastrum alpinum* MBF1c (PaMBF1c) showed tolerance to high salt stress as well as high temperature stress, suggesting its functional evolution.
- Through functional analysis on amino acid residues of polar moss gene PaMBF1c, we attempted to identify the amino acid residues that gives PaMBF1c superior functions to MBF1c of temperate plants.
- To this end, we established the reporter system for functional analysis, induced amino acid mutation in MBF1c, and performed screening for the functional amino acid residues.
- We then induced rapid evolution by modifying the identified amino acid residues of Arabidopsis homolog, AtMBF1c through gene editing technology.
- Parallely, we will find more polar moss genes with superior functions.

## IV. R&D Results

- We established the PaMBF1c target gene (RUBP) promoter driven-luciferase reporter system in tobacco leaves and Arabidopsis protoplasts to monitor MBF1c transcriptional activity.
- Using this reporter system, we found that the modified AtMBF1c to contain putative phosphorylation sites only in PaMBF1c acquired higher transcriptional activity than the unmodified AtMBF1c at the levels similar to PaMBF1c. Overexpression of the “functionally evolved” AtMBF1c in Arabidopsis improved salt stress tolerance. We also gene-edited the endogenous AtMBF1c by CRISPR/Cas9.
- In addition, we identified one more polar moss gene, plastocyanin that has superior stress tolerance compared to Arabidopsis homologous genes.

## V. Application Plans of R&D Results

- We will try to pinpoint the functionally important amino acid residue of PaMBF1c for superior stress tolerance and apply our findings to crops to improve their stress tolerance traits.

# CONTENTS

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| Chapter 1 Introduction                                  | 6  |
| Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations | 7  |
| Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results       | 8  |
| Chapter 4 Degree of R&D Goal Achievement                | 24 |
| Chapter 5 Application Plans of R&D Results              | 28 |
| Chapter 6 References                                    | 29 |

# 목 차

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 제 1 장 서론                | 6  |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황       | 7  |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과    | 8  |
| 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 | 24 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획      | 28 |
| 제 6 장 참고문헌              | 29 |

# 제 1 장 서론

## 1. 연구과제의 중요성

- 극지 유전자원의 활용과 더불어 이를 활용한 기술적 진보는 극지 유전자원의 중요성의 부각 및 유전자 전쟁에서 유전 자원의 확보라는 국가 경제적 측면에서도 추진되어야 할 과제이다. 특히, non-GMO 방법에 의한 극지 유전자원의 활용 방법이 부재한 실정이다.
- CRISPR/Cas 유전자 편집 기술의 발전으로 non-GM 방식의 식물 개선이 이제 가능하게 되었다. 이 유전자 편집 기술의 핵심은 이제 CRISPR/Cas를 이용하여 무엇을 편집할 것인가로 바뀌고 있으며, 기능적 우수성이 확인된 극지이끼 유전자원은 이에 대한 해답을 제공해 줄 것이다.
- 즉, 기능적 진화성이 확인된 극지이끼 유전자원에서 우수기능을 부여하는 아미노산기를 확인하고, 이를 타식물의 유사 유전자에 유전자 편집기술로 도입을 시도하는 본 연구는 non-GM 방식에 의한 식물 개선이라는 목표에 극지이끼 유전자가 큰 기여를 하는 활용의 예가 될 것이다.
- 이를 통해 극지 유전자원의 단순한 1차원적인 활용에서 고차원적인 활용으로 활용이 확대되는 계기가 될 것이다.

## 2. 관련 연구동향 및 독창성

- 본 연구는 단순한 기능성 유전자 도입, 즉 GM 방식을 통해 식물의 형질을 개선하는 것이 아니고, 서로 기능의 차이가 있는 homolog를 비교하여, 극지이끼 유전자에 우수 기능성을 부여하는 아미노산기를 찾아서 대상 식물체 유전자의 해당 base만을 편집하여 식물의 형질을 개선시킬 수 있는 활용 기반을 제공하는데 그 독창성이 있다.
- “극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용기반 구축” 등 극지연구소의 기존 연구는 전체적인 유전체 분석과 기능규명에 초점이 있는 반면, 본 연구의 주안점은, 기능적 진화가 확인된 극지 유전자원에 대한 non-GM 방식의 활용을 목표로 신기술의 실현가능성을 증명하고자 하는 과제이므로, 그 지향점에서 큰 차별성이 있다.
- 기존 극지연구소 과제와는 차별화되는 동시에 연구성과의 확산을 위한 기술적 진보를 이룬다는 점에서 상호보완의 관계에 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

- 국내의 극지이끼 유전자원의 연구는 거의 모두 극지연구소에서 주도적으로 진행되고 있다. 활발한 극지연구소의 연구에도 불구하고, 열쇠말 “antarctic” 과 “moss” 로 Web of Science를 검색(생화학 유전학적 연구로 국한), 전세계 연구의 3.6%수준 (13편/355편)이다. 한편, 전세계 논문은 1990년 이래 355개 수준으로, 2000년대 들어서 20개 내외의 논문이 꾸준히 발표되고 있다.
- 극지이끼 유전자원의 활용은 최근에서야 활발하며, 일반적으로 극지이끼 유전자 전체를 식물체에 도입하여 유전자 기능을 확인, 활용하는 방법이 대부분이며, 기능성 진화의 관점으로 극지이끼 유전자에서 우수 기능에 중요 아미노산기를 발굴하고, 이를 활용하려는 연구는 부재하다 (Yolcu et al., 2020).
- 국내의 CRISPR/Cas 유전자 편집 기술 연구는 IBS 유전체 교정 연구단 (단장: 김진수 박사)에 의해서 주도적으로 진행되고 있다. IBS를 제외하고, 많은 연구실에서 CRISPR/Cas연구를 도입하고 있지만 성공적인 논문발표는 거의 없는 실정이다. IBS 유전체 교정 연구단을 제외하고 식물에서 CRISPR/Cas 연구 논문을 발표한 그룹은 3개 정도 된다. 타그룹은 대체로 protoplast나 조직배양 시스템에서 CRISPR/Cas의 효율을 보고한 수준임에 비해, 본 연구진은 애기장대에서 CRISPR/Cas 연구를 성공적으로 수행하고 CRISPR/Cas 편집된 homozygote 식물체를 포함하는 논문을 발표했다 (Cho et al., 2017).
- CRISPR/Cas 유전자 편집 기술의 발전은 단순한 deletion 및 DNA repair시 일어나는 돌연변이를 기대하는 편집에서 실제 염기서열을 정확하게 편집하는 수준에까지 이르렀다 (Barrangou et al., 2007; Jinek et al., 2012), 드디어, 미국 농무성(USDA)은 지난 3월 28일 CRISPR/Cas에 의한 유전자 편집된 작물에 대해서 규제를 하지 않겠다고 발표했다. 따라서, 비유전자조작(non-GM) 방식의 작물 개선이 가능하게 되었다.



미 농무성의 CRISPR 편집 작물을 규제하지 않겠다는 소식을 전하는 TheScientist

- CRISPR/Cas 유전자 편집 기술의 발전으로 non-GM 방식의 식물 개선이 가능함에도 불구하고, CRISPR/Cas를 이용하여 무엇을 편집할 것인가에 대한 고민이 여전히 존재한다.
- 본 연구는 무엇을 편집할 것인가에 대한 답을 극지이끼 유전자원에서 찾고자 한다.
- 즉, 기능적 진화성이 확인된 극지이끼 유전자원에서 기능 진화를 가능하게 한 기능성 아미노산기를 확인하여, 이를 타식물의 homolog에 유전자 편집기술로 도입할 경우, non-GM 방식에 의한 극지 유전자원의 활용의 예가 될 것이다.



# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 1. 연구내용

### 가. 기능진화 분석

#### (1) RUBP promoter-luciferase 리포터 시스템 구축

- 전사조절인자인 MBF1c는, 애기장대 유전자 (AtMBF1c)가 고온스트레스 저항성만을 일으키는 것과는 달리, 극지 이끼 유전자 (PaMBF1c)는 고온 뿐만 아니라, 염스트레스 저항성을 일으키는 기능적 우수성을 가지고 있다 (Alavilli et al., 2017). 이는 극지 이끼가 염을 많이 포함하는 남극토양에 적응하기 위해 염스트레스 저항성 기능을 진화시킨 결과로 추정된다.
- 이러한 기능적 우수성을 일으키는 PaMBF1c 아미노산기를 확인하는 것을 먼저 목표로 삼는다. 이러한 한 아미노산기에 의한 기능의 차이의 예는 벼의 자포니카와 인디카의 COL1, 애기장대와 이것의 근연종인 *Thellungiella salsuginea*의 HKT1에서 찾아볼 수 있다 (Ma et al., 2015; Ali et al., 2016).
- 이를 위해, PaMBF1c의 목적 유전자로 여겨지는 RUBP(RING/U-Box Protein)를 이용하여, PaMBF1c의 RUBP 발현 유도 기능을 검증할 수 있는 RUBP promoter-luciferase (RUBPp-LUC) 리포터 시스템을 담배잎 또는 애기장대 원형질체를 기반으로 구축하려고 한다. 현재 본 연구팀은 담배잎에서 PaMBF1c가 RUBPp-LUC의 발현을 유도하는 preliminary 연구결과를 확보하고 있다.
- RUBP-LUC 리포터 시스템에 필요한 RUBP promoter-luciferase 발현 벡터와 PaMBF1c와 AtMBF1c 발현 벡터를 제작 완료하고, 이들이 담배잎 또는 애기장대 원형질체에서 작동할 적정 플라스미드 DNA 농도, AtMBF1c와 PaMBF1c의 RUBP 유도성 차이 비교 등을 분석하여 이 RUBP promoter-luciferase 리포터 시스템을 확립했다.
- 특히 정량적 분석이 상대적으로 정밀한 애기장대 원형질체 기반으로 한 리포터 시스템을 최종 목표로 하나, 담배잎을 기반으로 한 RUBP 리포터 시스템 역시 동일하게 구축하였다.

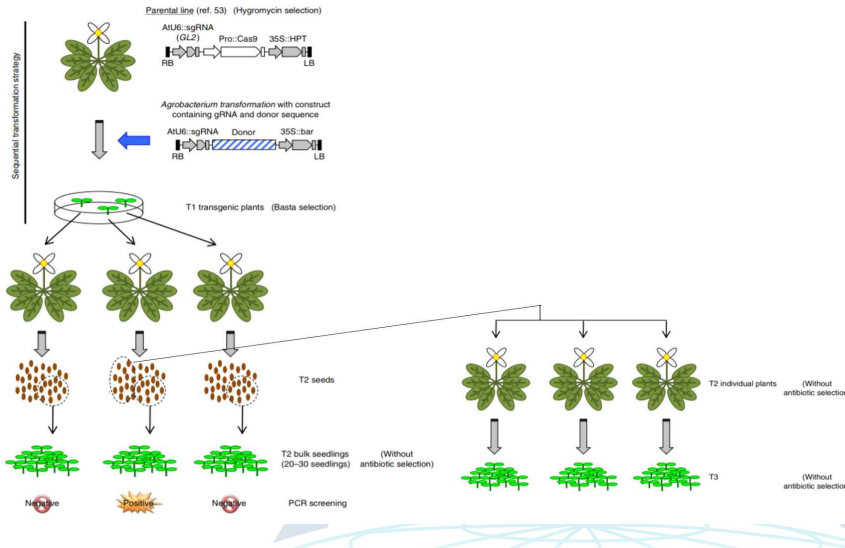
#### (2) 돌연변이 AtMBF1c 기능 분석

- 이 후, PaMBF1c와 AtMBF1c를 다른 식물체의 MBF1c의 서열과 비교하여 후보 염기서열에 돌연변이를 유도한다. 이를 위해서 site-directed mutagenesis 기법을 사용하여 각 MBF1c에 돌연변이를 도입했다.
- 우수 기능 극지이끼 유전자의 돌연변이 대상 후보 염기서열은 (1) multi-alignment, (2) putative modification sites, (3) structure-based active site prediction 등의 방법을 병렬적으로 동원하여 선정한다. 특히, 극지이끼, 온대식물, 열대식물을 상호 비교하여 아미노산과 생태환경에 따른 연관성 등을 고려하여 선정하고자 했다.
- AtMBF1c 돌연변이는 염기서열 분석을 통해서 확인하고, 돌연변이가 확인된 AtMBF1c는 RUBPp-LUC 리포터 시스템에서 기능을 검증했다.

## 나. 단축진화 수행

### (1) 애기장대 MBF1c 편집 및 편집된 AtMBF1c 형질전환체 제작

- 보다 신속하고, 성공적인 연구 수행을 위해서 기존의 단일 아미노산 변경을 통한 PaMBF1c의 기능진화를 적용하는 방법 외에, CRISPR/Cas 시스템의 homology-directed repair (HDR)을 적용한 애기장대 AtMBF1c를 PaMBF1c로 치환하고자 한다. 이를 위해서 HDR 효율이 증가된 라인을 확보하였다 (Miki et al., 2018).



- 정확히 AtMBF1c 위치에 PaMBF1c로 치환하기 위해 Miki et al (2018, CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation. Nature Communications)의 방법을 따랐다. 이 방법은 CRISPR/Cas 시스템에서 일어나는 Homology-directed repair (HDR) 과정을 이용하는 방법으로 치환하고자 하는 염기서열 주변지역에 대한 homologous DNA substrate를 삽입하여 정확한 위치에 염기서열을 치환할 수 있다.

## 다. 기능진화 유전자 확장

### (1) 기능 진화 극지이끼 유전자원의 확보

- PaMBF1c 이외 본 연구팀은 PaFKBP12, PaProfilin, PaPlastocyanin 과발현체에서 스트레스 저항성이 증가함을 확인하였다.
- 따라서, 극지 유전자의 기능적 진보를 근거로 단축 진화를 시도하는 본 연구를 PaMBF1c 이외 이들 유전자를 대상으로 확장하는 기반을 마련하고자 했다.
- 먼저, 이들 유전자원의 애기장대의 homolog 과발현체를 제작하고, 극지이끼 유전자 과발현체와 다양한 스트레스 조건하에서 저항성을 비교했다.
- 이 연구는 현 연구과제의 주 연구대상 유전자 PaMBF1c 외 기능 진화 유전자원 확보차원의 성격이 큰 연구로 기능진화 아미노산기 확정 및 단축진화 수행은 시간적 제한 때문에 PaMBF1c에 더 초점을 맞췄다. 이들 유전자원의 기능적 진보의 유무를 확인한 뒤 추후, PaMBF1c와 유사한 방식의 단축 진화를 시도하기 위한 기반 연구 수행을 시도했다.

## 2. 목표달성을 위한 연구수행 방법

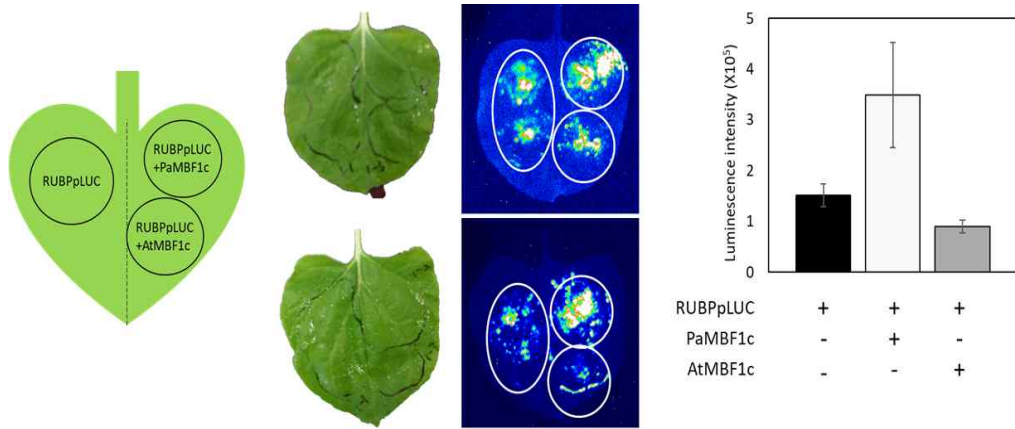
| 구분     | 연구개발 목표          | 연구수행방법<br>(이론적·실험적 접근방법)                                     | 구체적인 내용*                                                                                                    |
|--------|------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2018년도 | RUBPp-LUC 시스템 구축 | - Gateway 및 Ligation<br>- Luminescence imaging 및 luminometer | - 각종 벡터 제작 완료<br>- 담배잎/원형질체 시스템 검정                                                                          |
|        | 돌연변이 MBF1c 기능분석  | - PCR based site-directed 돌연변이                               | - Site-directed 돌연변이 대상 선정 및 돌연변이 유도                                                                        |
|        | 기능진화 유전자 확장      | - Gateway construct                                          | - FKBP12 등 과발현벡터 제작                                                                                         |
| 2019년도 | RUBPp-LUC 시스템 구축 | - Gateway 및 Ligation<br>- Luminescence imaging 및 luminometer | - 담배잎/원형질체 시스템 완성                                                                                           |
|        | 돌연변이 MBF1c 기능 분석 | - PCR base site-directed 돌연변이                                | - phosphorylation site 비교를 통한 돌연변이 대상 선정 및 돌연변이 유도<br>- 애기장대 mutated AtMBF1c 돌연변이체 제작                       |
|        | 단축진화 수행          | - CRISPR/Cas 벡터 제작<br>- CRISPR/Cas 형질전환체 제작                  | - 선별한 위치를 타겟으로 하는 sgRNA 벡터 제작<br>- HDR 반응을 위한 donor 벡터 제작                                                   |
|        | 기능진화 유전자 확장      | - Gateway construct<br>- 유채를 이용한 형질전환                        | - FKBP12 등 애기장대 형질전환체 확보<br>- 유채 FKBP12 형질전환체 확보                                                            |
| 2020년도 | 단축진화 수행          | - 단축진화된 AtMBF1c 발현 식물체 제작                                    | - CRISPR/Cas 유전자 편집 도구를 이용한, Homologous Directed Recombination 적용.<br>- PaMBF1c 기능의 단축진화된 AtMBF1c 발현 식물체 제작 |
|        | 스트레스 표현형 검정      | - 단축진화 개체 스트레스 반응성 검정                                        | - atmbf1c 돌연변이체에 극지이끼 MBF1c 의 우수형질 부여 후보 아미노산기가 도입된 AtMBF1c-KAM 발현개체 염스트레스 표현형 검정                           |
|        | 기능진화 유전자 확장      | - 우수기능 극지이끼 유전자의 기능 비교 분석                                    | - 극지이끼 및 애기장대 Plastocyanin 기능 분석<br>- 극지이끼 활성 도메인 mapping을 위한 domain swapping 수행                            |

### 3. 연구개발결과

#### 가. 기능진화 분석

##### (1) RUBPp-LUC 리포터 시스템 완성 및 돌연변이 PaMBF1c/AtMBF1c 기능 분석

- 전사조절인자인 MBF1c의 기능을 알아보기 위해 PaMBF1c의 목적 유전자로 여겨지는 RUBP (Ring/U-Box protein)를 이용한 RUBPp-LUC 리포터 시스템을 구축하였다. 이에 필요한 RUBPp-LUC 발현 벡터와 PaMBF1c, AtMBF1c 발현 벡터를 제작하였다.
- RUBPp-LUC 리포터에 대한 PaMBF1c, AtMBF1c의 영향을 알아보기 위해 담배잎을 이용하여 RUBPp-LUC 발현양 변화를 관찰하였다. RUBPp-LUC 발현양을 비교한 결과 PaMBF1c를 담배잎에서 함께 발현시킨 경우 RUBPp-LUC 리포터의 발현이 증가하였다. 반면, AtMBF1c를 함께 발현시킨 경우는 RUBPp-LUC 리포터 발현이 크게 변하지 않았다.



담배잎에서의 RUBPp-LUC 발현

- 염 저항성에 대한 PaMBF1c의 기능적 우수성을 일으키는 아미노산기를 찾기 위해 PaMBF1c, AtMBF1c의 아미노산 서열을 T.aestivum의 MBF1c (TaMBF1c) 아미노산서열을 비교하였다. 총 14개의 PaMBF1c 특이적 아미노산을 발견하였고 이 중 세개의 아미노산기를 선택하여 site-directed mutagenesis 기법을 이용하여 AtMBF1c에 돌연변이를 도입하였다.

```

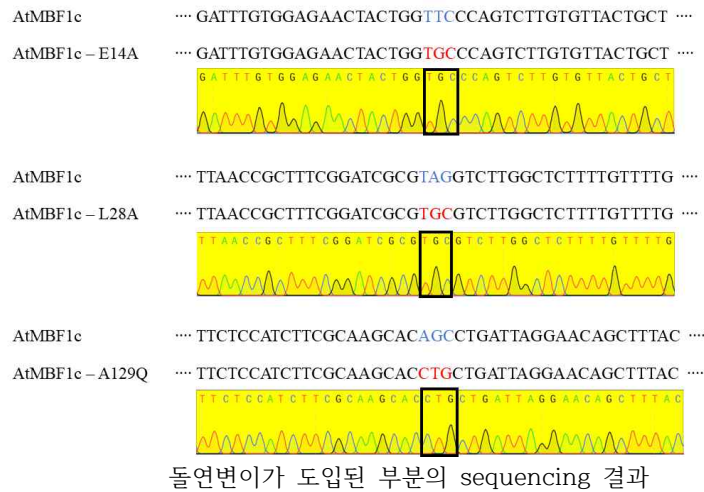
                E14A      L28A
                ↓          ↓
AtMBF1c  MPSRYPGAVTQDWEPVVLHKSQKQSDLRDPKAVNAALRNGVAVQTVKKFDAGSNKKGKS 60
PaMBF1c  MPARTAGPLSQDWAPVVVHKRAAKSADARDPKAVAAAIRAGAEIQTVRKFDAGTNKK--- 57
          **:* * :*** **:* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtMBF1c  TAVPVINTKLEETEPAAMDRVKAEVRLMIQKARLEKKMSQADLAKQINERTQVVQEYE 120
PaMBF1c  SAAPVVNTRKLDDEEHPAAFERSSEVKHSIQKARLEKKWTQAEFAQINERPQVVQEYE 117
          :* .**:* **:* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

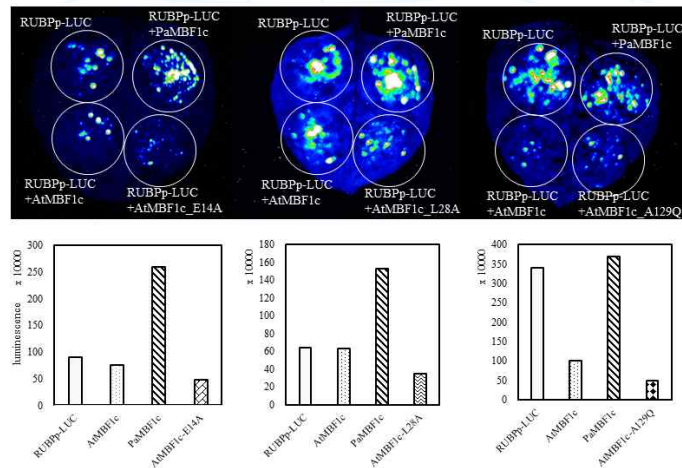
AtMBF1c  NGKAVPNQAVLAKMEKVLGVKLRGKIGK 148
PaMBF1c  SGKAIPSQQVLAKLERALGVKLRGKK- 143
          .***:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                ↑
                A129Q
    
```

각 식물체의 MBF1c 아미노산 서열 비교 및 치환한 아미노산 위치 (Red arrow)

- 돌연변이가 유도된 위치에 따라 AtMBF1c-E14A, L28A, A129Q로 명명하였다.

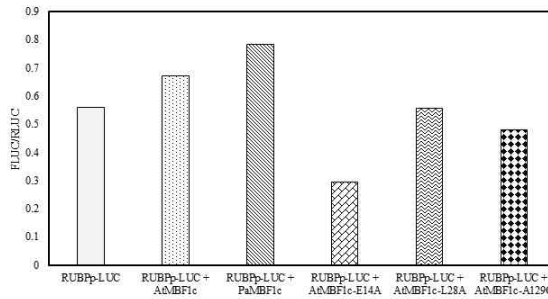


- 본 연구팀에서 구축한 RUBPp-LUC 리포터 시스템을 이용하여 RUBP-LUC 리포터에 대한 PaMBF1c, AtMBF1c, mutated-AtMBF1c의 영향을 알아보기 위해 담배잎을 이용하여 RUBPp-LUC 발현양 변화를 관찰하였다.
- 담배잎을 이용하여 RUBPp-LUC 발현양을 비교한 결과 전체적으로 RUBPp-LUC과 PaMBF1c를 함께 발현시킨 경우가 AtMBF1c를 함께 발현시킨 경우보다 RUBPp-LUC의 발현이 높았다. 아미노산이 치환된 AtMBF1c와 함께 발현시킨 경우 RUBPp-LUC의 발현은 AtMBF1c와 발현시킨 경우와 비슷하게 나타났다.



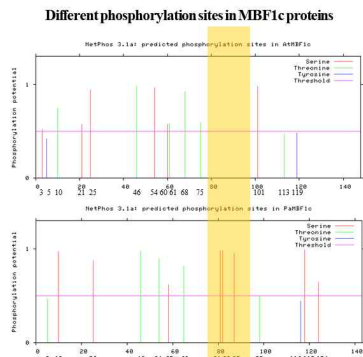
담배잎을 이용한 RUBPp-LUC 발현양 비교

- RUBPp-LUC 시스템을 원형질체에 대해서도 구축하였다. 원형질체를 이용한 시스템에서는 UBQp-rLUC을 함께 사용하여 transfection 효율에 대한 internal control로 사용하였다.
- RUBPp-LUC의 발현은 AtMBF1c보다 PaMBF1c에 의해서 더 높게 나타났다.



원형질체를 이용한 각 MBF1c에 의한 RUBPp-LUC 발현양 변화 확인

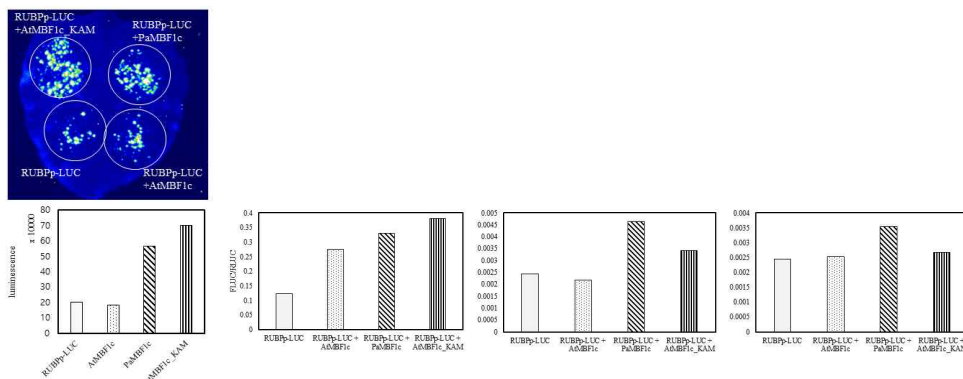
- AtMBF1c의 단일 돌연변이 유도뿐만 아니라 PaMBF1c와 AtMBF1c 단백질 간 phosphorylation site를 비교하여 두 단백질간의 차이가 있는 부분에 대한 돌연변이 유도를 진행하고 있다. PaMBF1c의 경우 81, 82, 87번째 아미노산에 phosphorylation이 일어나지만 이 위치에 해당하는 AtMBF1c의 84, 85, 90번째 아미노산에는 phosphorylation이 일어나지 않을것으로 추정한다. 이러한 차이가 염스트레스에 대한 PaMBF1c의 기능과 관계있는지 알아보기 위해 각 위치에 대한 돌연변이를 유도하였고 현재 AtMBF1c-K84S-A85 벡터를 확보하였고 AtMBF1c-K84S-A85S-M90S를 제작하였다.



| Mutant name | Pa aa numb | Pa sequence  | At aa numb | At sequence      |
|-------------|------------|--------------|------------|------------------|
| K84S        | 81         | Serine -TCT  | 84         | Lysine - AAA     |
| A85S        | 82         | Serine -TCA  | 85         | Alanine - GCA    |
| M90S        | 87         | Serine - AGC | 90         | Methionine - ATG |

AtMBF1c와 PaMBF1c의 phosphorylation site 비교 및 돌연변이 유도 위치

- 확보한 벡터를 담배잎과 애기장대 원형질체에 일시적으로 발현 시켜 AtMBF1c-K84S, A85S, M90S 가 AtMBF1c와 PaMBF1c와 비교하여 어느 정도로 RUBP 유전자의 발현을 유도하는지 보았다.



RUBPp-LUC 발현양 변화

- 실험 결과, AtMBF1c-K84S, A85S, M90S는 AtMBF1c보다는 높고, PaMBF1c 와 비슷한 수준의 RUBP 유도를 보였다. 이는 치환한 세 유전자 부위가 PaMBF1c의 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 볼 수 있다.

## 나. 단축진화 수행

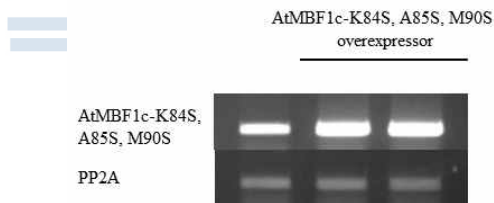
### (1) *atmbf1c* 돌연변이체에 편집된 AtMBF1c 삽입 및 AtMBF1c 과발현체 제작

- RUBPp-LUC 리포터 시스템을 통해 검증한 PaMBF1c의 아미노산기가 애기장대내에서 중요 기능을 하는지 알아보기 위해 애기장대 *atmbf1c* 돌연변이체를 확보하였고 이 돌연변이체에 PaMBF1c 아미노산으로 치환한 편집된 AtMBF1c 유전자를 과발현시켰다.
- 단일 돌연변이 AtMBF1c를 애기장대에 형질전환을 시켜 T3 homozygote인 과발현체를 확보하였다.



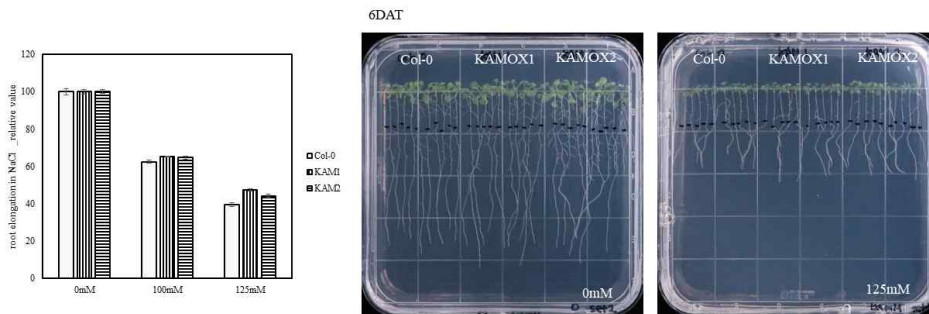
단일 돌연변이 AtMBF1c의 애기장대에서의 과발현 확인

- 또한, phosphorylation site에 의거한 세 아미노산 돌연변이 AtMBF1c(K84S, A85S, M90S)도 애기장대에 형질전환 시켜 과발현체를 확보하였다.



AtMBF1c-K84S,A85S,M90S의 과발현 확인

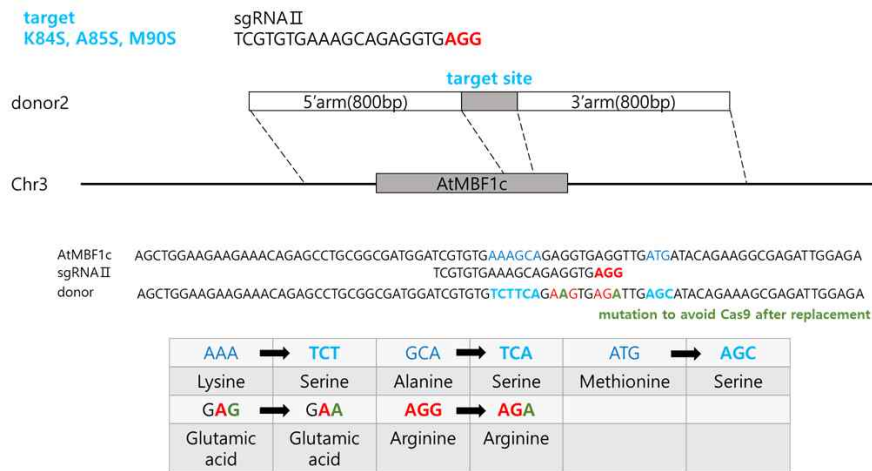
- 세 아미노산 돌연변이 AtMBF1c 과발현체들은 야생형보다 염 스트레스 배지에서 뿌리 길이가 더 길어지는 것을 확인하였다.



AtMBF1c-K84S,A85S,M90S의 염 저항성 표현형

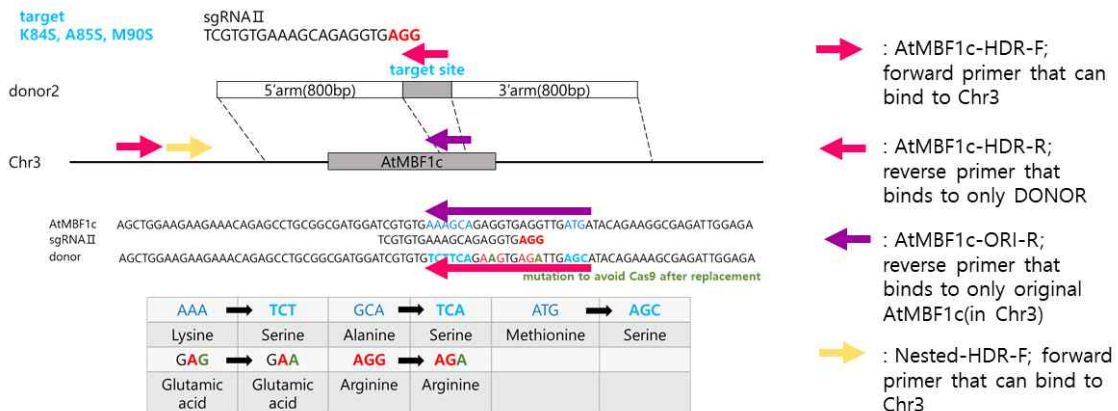
(2) CRISPR/Cas 시스템을 활용한 애기장대 AtMBF1c 아미노산 치환

- CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 애기장대 AtMBF1c의 phosphorylation site 세곳을 PaMBF1c의 아미노산 서열로 치환하고자 한다. (K84S, A85S, M90S). 이 방법은 CRISPR/Cas를 이용한 유전자 편집기술 과정에서 Homology-directed repair(HDR) 과정을 이용한 방법으로 우리가 원하는 돌연변이 염기서열이 포함된 homologous DNA substrate(donor)를 넣어주어 정확한 자리에 원하는 돌연변이를 유도하기 위한 방법이다. 이를 위해 필요한 CRISPR/Cas 시스템을 갖고 있는 식물(Cs699) 확보하였고 타겟 돌연변이가 포함된 Homologous DNA substrate를 제작하였다.



애기장대 AtMBF1c의 타겟 아미노산을 치환하기 위한 Homologous DNA substrate 제작

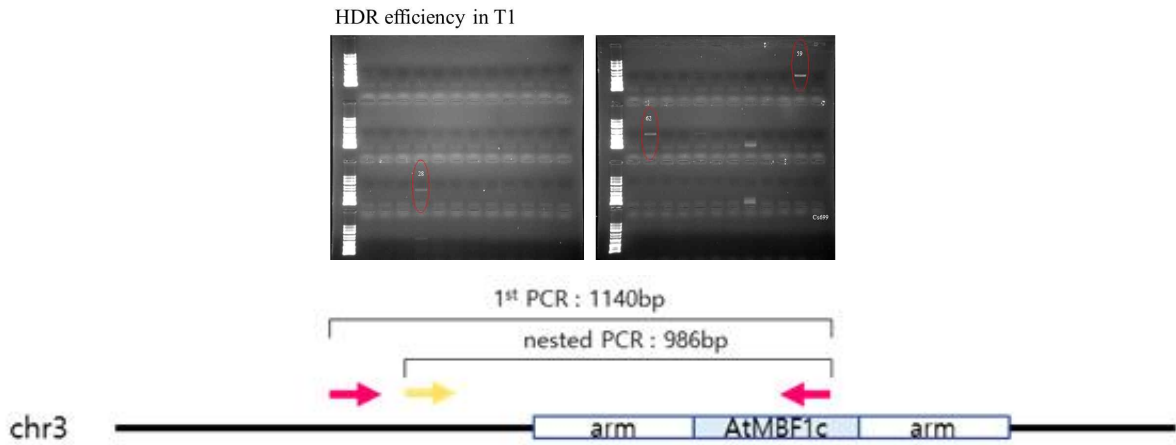
- 또한 donor를 CS699 line에 형질전환 시켜, AtMBF1c의 target site가 치환된 개체를 선별할 수 있는 primer를 디자인하여 T1과 T2 세대의 선별에 사용하였다. Donor의 염기서열과 AtMBF1c의 염기서열은 차이가 크기 때문에 각각에 해당하는 primer를 사용하여 치환 여부를 알 수 있다. 예를 들어, AtMBF1c-HDR-F와 AtMBF1c-HDR-R을 사용하여 PCR을 할 경우, 치환이 된 부분만 primer가 결합하여 밴드가 나타나며, AtMBF1c-HDR-F와 AtMBF1c-ORI-R을 사용하면 치환되지 않은 부분의 밴드가 나타난다.



형질전환체 치환 여부 선별을 위한 primer의 디자인

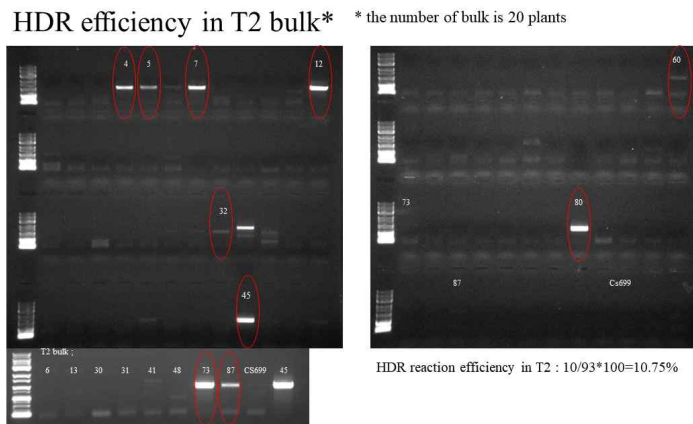


- 형질전환한 T1 세대에서 selection을 진행하여  $3/94 \times 100 = 3.19\%$ 의 치환 효율을 구할 수 있었다.



T1에서 형질전환체의 염기서열 치환 여부를 판단하기 위한 PCR

- T2로 세대를 내려 진행한 bulk PCR 결과는 CRISPR/Cas9와 donor의 치환 작용이 T1에서만 그치는 것이 아니라, 세대가 내려가도 유효하다는 것을 보여준다.



T2 bulk에서 HDR 효율 확인

- CRISPR/Cas9의 HDR 작용을 통한 염기 치환의 효율을 구하기 위하여 T1에서 HDR이 일어났을 때, T2 individual에서의 HDR 효율과 T1에서 HDR이 일어나지 않았지만 T2 bulk에서 HDR이 일어났을 때, T2 individual에서의 HDR 효율을 구하여 표로 정리하였다.

| Number of T1 HDR occurred | T2                                  |                                 |                     |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
|                           | HDR occurrence in individual plants | The number of individual plants | % of HDR occurrence |
| 28                        | 0                                   | 58                              | 0                   |
| 59                        | 0                                   | 46                              | 0                   |
| 62                        | 6                                   | 46                              | 13.04               |

T1에서 HDR이 일어난 line의 T2 individual HDR 효율

| Number of T2 HDR in T2 bulk* |                                     |                                 |                     |
|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| T2 #                         | HDR occurrence in individual plants | The number of individual plants | % of HDR occurrence |
| 4                            | 3                                   | 59                              | 5.08                |
| 5                            | 0                                   | 53                              | 0                   |
| 7                            | 5                                   | 59                              | 8.47                |
| 12                           | 3                                   | 59                              | 5.08                |
| 32                           | 0                                   | 44                              | 0                   |
| 45                           | 10                                  | 59                              | 16.94               |
| 60                           | 2                                   | 36                              | 5.56                |
| 73                           | 10                                  | 62                              | 16.12               |
| 80                           | 4                                   | 59                              | 6.77                |
| 87                           | 0                                   | 66                              | 0                   |

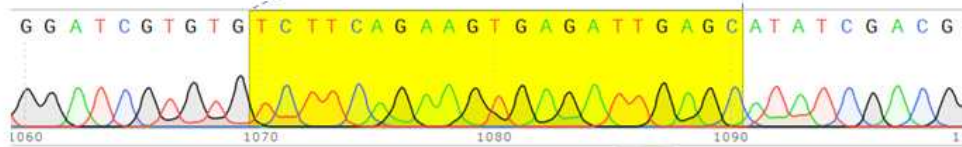
\* the number of T2 bulk is 20 plants

T2 bulk에서 HDR이 일어난 line의 T2 individual HDR 효율

- 또한, PCR로 나오는 band가 HDR로 인해 나타나는 band임을 확인하기 위해 sequencing을 수행하였고, 그 결과 염기서열에 HDR로 인한 치환이 잘 일어났음을 확인할 수 있었다.

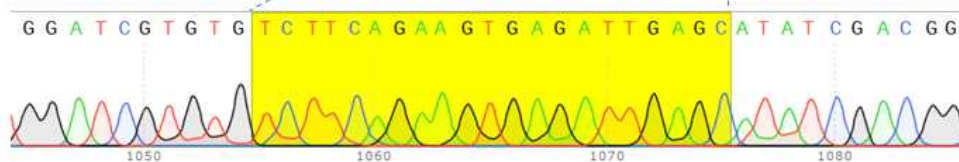
DONOR GCGGCGATGGATCGTGTG**TCTTCAGAAGTGAGATTGAGC**

#4-8 T2 GCGGCGATGGATCGTGTG**TCTTCAGAAGTGAGATTGAGC**



DONOR GCGGCGATGGATCGTGTG**TCTTCAGAAGTGAGATTGAGC**

#7-10 T2 GCGGCGATGGATCGTGTG**TCTTCAGAAGTGAGATTGAGC**



Sequencing을 통한 HDR 염기서열 치환의 확인

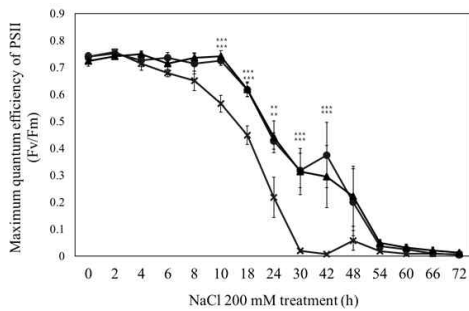
#### 다. 기능진화 유전자 확장 - 다양한 극지이기유전자 과발현체 제작 및 표현형 분석

- PaMBF1c 이외 본 연구팀은 선행연구를 통해 PaPlastocyanin, PaFKBP12, PaProfilin 과발현체에서 스트레스 저항성이 증가함을 확인하였다. 이들 유전자의 기능을 연구하기 위해 극지

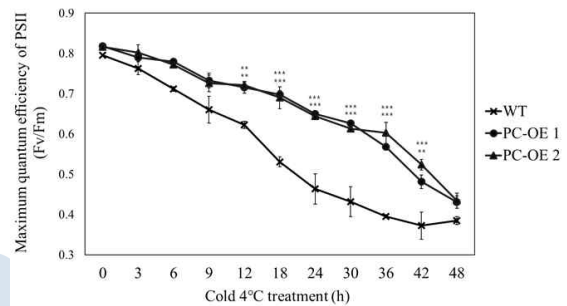
이끼 유전자뿐 아니라 이들 유전자원의 애기장대 homolog 과발현체를 제작하고, 극지이끼 유전자 과발현체와 다양한 스트레스 조건하에서 저항성을 비교하는 연구를 진행했다.

(1) PaPlastocyanin 과발현체 제작 및 표현형 분석

- 스트레스에 대한 *PaPlastocyanin*의 유전자 기능을 분석하기 위해 과발현체를 제작하였다. 애기장대에 형질전환하여 과발현체를 제작하고 homozygote line을 확립하였다. (Plastocyanin Overexpressor; PC-OE).
- 스트레스에 대한 표현형을 관찰하기 위해 염 스트레스(NaCl), 저온 스트레스를 처리하였다. 염 스트레스(NaCl) 조건과 저온 스트레스 조건에서 모두 *PaPlastocyanin* 과발현체가 정상체에 비해 더 높은 광합성 효율을 보였다.

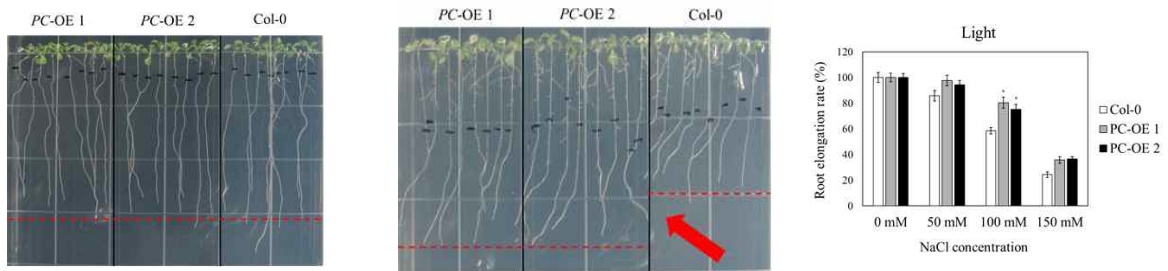


염 스트레스에 대한 광합성 효율 비교

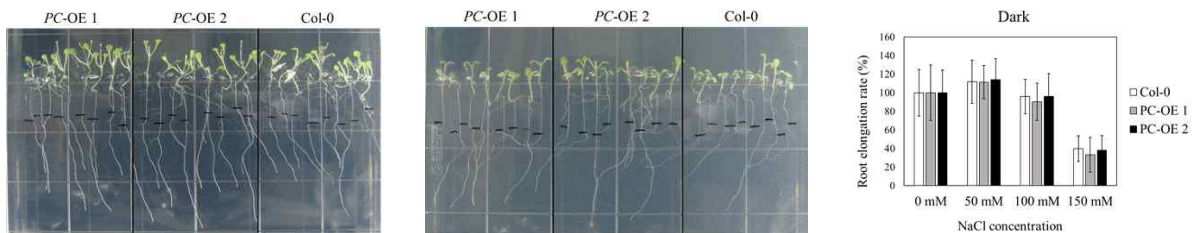


저온 스트레스에 대한 광합성 효율 비교

- 또한, 빛이 있는 환경에서 염 스트레스(NaCl)를 주었을 때 *PaPlastocyanin* 과발현체가 정상체에 비해 뿌리 생장이 더 길게 나타난 것을 관찰하였다. 그러나 빛이 없는 환경에서 같은 염 스트레스(NaCl)를 받은 경우에는 *PaPlastocyanin* 과발현체와 정상체의 뿌리 생장은 비슷한 수준을 보였다.

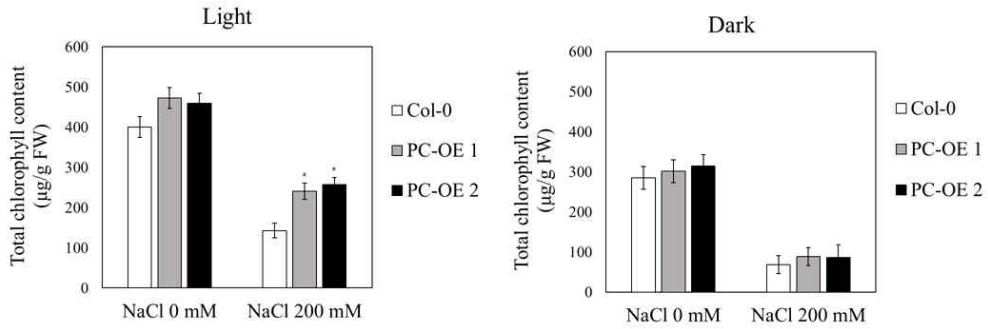


빛 조건에서 정상 조건 배지(좌측 첫번째), 염 스트레스 배지(가운데)의 뿌리 생장 비교



암 조건에서 정상 조건 배지(좌측 첫번째), 염 스트레스 배지(가운데)의 뿌리 생장 비교

- 마찬가지로 빛 조건과 암 조건에서 염 스트레스에 따른 엽록소의 함량을 비교하였다. 빛 조건에서는 *PaPlastocyanin* 과발현체가 광합성을 통해 염 스트레스를 극복하여 엽록소 함량이 야생형에 비해 적게 감소하였다. 하지만 암 조건에서는 광합성을 통한 스트레스 극복이 어려운 환경이므로 야생형과 *PaPlastocyanin* 과발현체의 엽록소 함량은 비슷한 수준을 보였다.



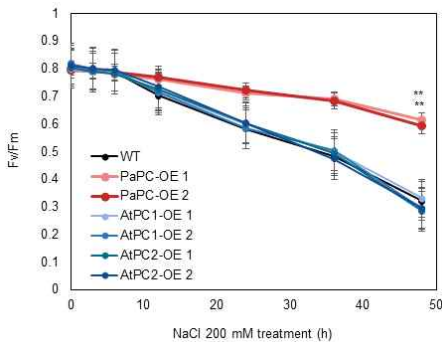
빛 조건(좌측)과 암 조건(우측)에서의 염 스트레스에 따른 엽록소 함량 비교 결과

- 이끼의 유전자와 애기장대의 유전자 homolog와 비교를 위해 *AtPlastocyanin1,2* 과발현체를 제작하였다. *AtPlastocyanin1,2* 과발현체 T3에서 homozygote line을 확보하였고 *AtPlastocyanin1,2*가 각각 과발현되었음을 확인하였다.

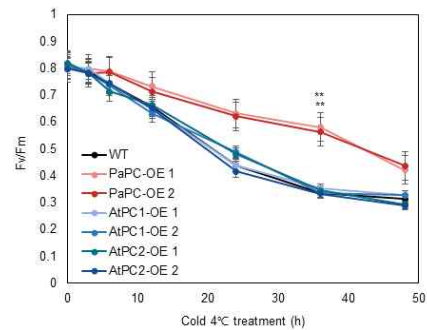


*AtPlastocyanin1*, *AtPlastocyanin2* 과발현 확인

- 스트레스에 대한 표현형을 관찰하기 위해 염 스트레스(NaCl), 저온 스트레스를 처리하였다. 염 스트레스(NaCl) 조건과 저온 스트레스 조건에서 모두 *AtPlastocyanin1,2* 과발현체와 정상체는 비슷한 수준의 광합성 효율을 보였다.

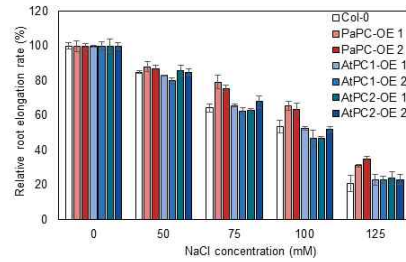
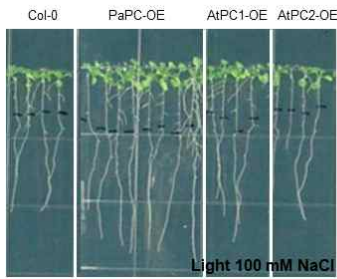


염 스트레스에 대한 광합성 효율 비교

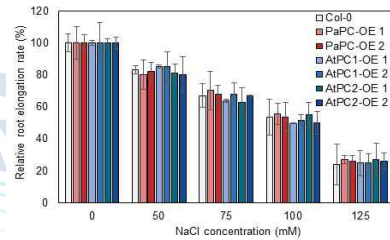
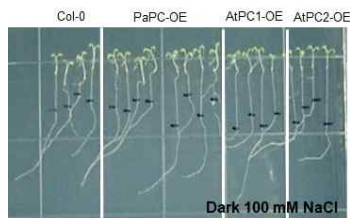


저온 스트레스에 대한 광합성 효율 비교

- 스트레스에 대한 표현형을 관찰하기 위해 염 스트레스(NaCl) 조건에서 뿌리 성장을 비교하였다. *AtPlastocyanin1,2* 과발현체는 빛이 있는 조건과 암 조건에서 모두 정상체와 비슷한 수준의 뿌리 성장을 보였다. 반면에 *PaPlastocyanin* 과발현체의 경우 빛이 있는 조건에서만 염 스트레스를 극복하여 뿌리 생장이 야생형에 비해 더 길게 나타난다. 따라서 *PaPlastocyanin*이 다양한 환경 스트레스에서 내성을 가지는 기능 진화 극지 이끼 유전자원의 좋은 후보가 될 수 있음을 시사한다.

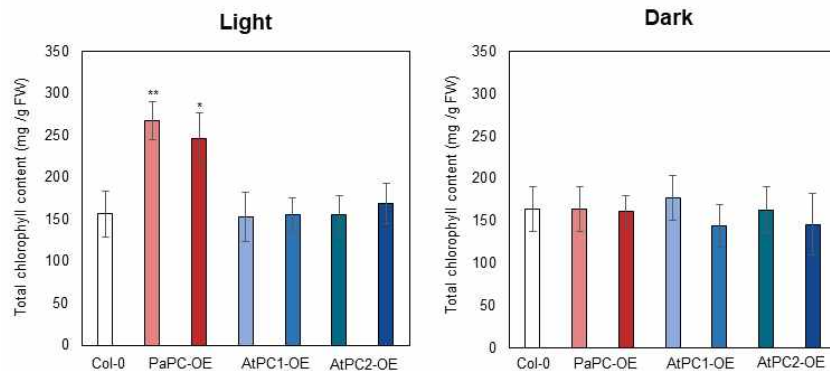


빛 조건에서 염 스트레스(100 mM NaCl) 배지의 뿌리 성장 비교



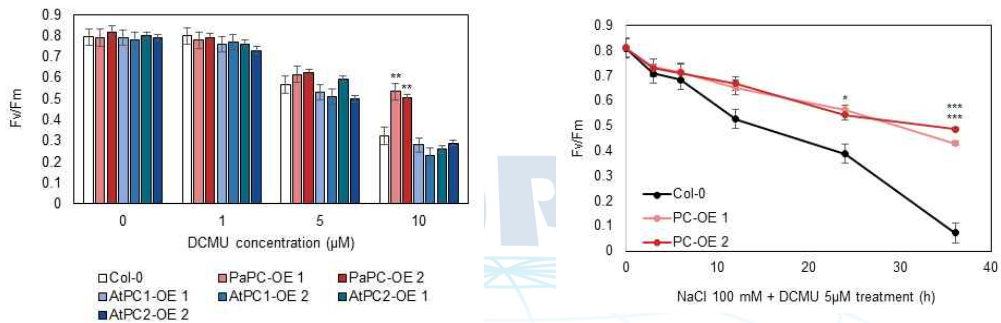
암 조건에서 염 스트레스(100 mM NaCl) 배지의 뿌리 성장 비교

- 빛 조건과 암 조건에서 염 스트레스(NaCl)에 따른 엽록소의 함량을 비교하였다. 3주차 식물을 200 mM NaCl 스트레스 조건에서 24시간 처리 후 측정하였다. 빛 조건에서는 *PaPlastocyanin* 과발현체가 광합성을 통해 염 스트레스(NaCl)를 극복하여 엽록소 함량이 야생형에 비해 적게 감소하였다. 하지만 암 조건에서는 광합성을 통한 스트레스 극복이 어려운 환경이므로 정상체와 *PaPlastocyanin* 과발현체의 엽록소 함량은 비슷한 수준을 보였다. 마찬가지로 *AtPlastocyanin1*, *AtPlastocyanin2* 과발현체의 경우 스트레스 조건에서 빛의 유무와 상관없이 정상체와 비슷한 수준의 엽록소 함량 감소를 보였다.

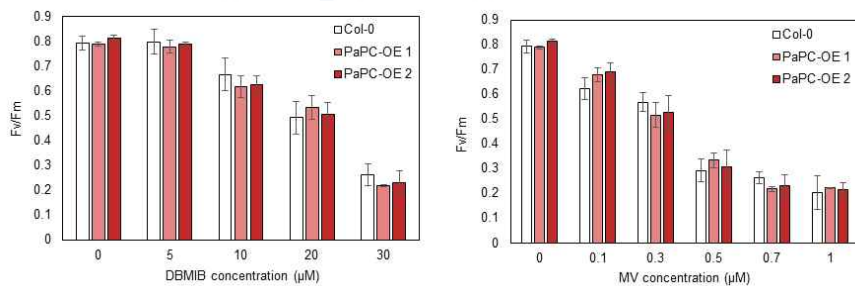


빛 조건(좌측)과 암 조건(우측)에서의 염 스트레스(200 mM NaCl)에 따른 엽록소 함량 비교 결과

- *PaPlastocyanin*, *AtPlastocyanin1* 그리고 *AtPlastocyanin2*의 광합성을 통한 스트레스 극복을 확인하기 위해서 광합성 저해제를 처리하여 광합성 효율을 확인하였다. DCMU (3-(3' 4' dichlorophenyl)-1, 1 dimethylurea) 처리를 통해서 비순환적 전자전달을 저해했을 때, *PaPlastocyanin* 과발현체는 정상체에 비해 더 높은 광합성 효율을 보였다. 반면에 *AtPlastocyanin1*과 *AtPlastocyanin2* 과발현체의 광합성 효율은 정상체와 비슷한 수준을 보였다. 염 스트레스(NaCl)와 함께 DCMU를 처리했을 때 정상체에 비해 *PaPlastocyanin* 과발현체의 광합성 효율이 더 높게 나타났다. 그러나 DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone), MV (methylviologen)를 처리한 경우, 즉 비순환적 전자전달과 순환적 전자전달 경로를 모두 저해했을 때, *PaPlastocyanin* 과발현체는 정상체와 비슷한 수준의 광합성 효율을 보였다. 따라서 이와 같은 결과로 보았을 때 염 스트레스(NaCl) 조건에서 *PaPlastocyanin*은 순환적 전자전달을 통해 스트레스 내성을 극복하는 것으로 생각할 수 있다.



광합성 저해제(DCMU) 처리 후 광합성 효율 비교 결과(좌),  
염 스트레스(NaCl) 조건에서 광합성 저해제(DCMU) 처리 후 광합성 효율 비교 결과(우)



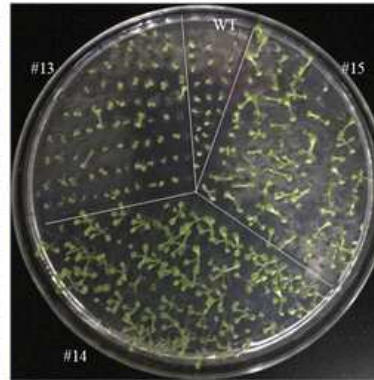
광합성 저해제(DBMIB) 처리 후 광합성 효율 비교 결과(좌),  
광합성 저해제(MV) 처리 후 광합성 효율 비교 결과(우)

## (2) FKBP12 과발현체 제작 및 스트레스 표현형 분석

- 본 연구팀은 선행연구를 통해 극지이끼의 PaFKBP12 유전자를 과발현시킨 애기장대가 고온, 가뭄, ABA 등 다양한 스트레스에 대한 저항성이 증가하는 표현형을 확인하였다 (Alavilli et al., 2018). PaFKBP12의 애기장대 homolog 유전자인 AtFKBP12의 기능도 PaFKBP12와 같이 스트레스 저항성에 관여하는지 알아보기 위해 AtFKBP12 과발현체를 제작하였다.

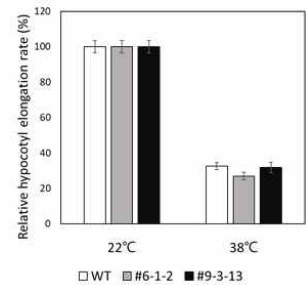
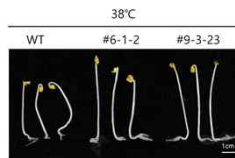
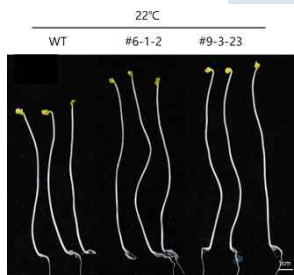
- PaFKBP12 유전자를 과발현시킨 동일한 벡터를 이용하여 AtFKBP12 과발현 벡터를 제작하였고 애기장대에 형질전환하여 single copy로 삽입된 T2 형질전환체를 확보하였다.

| pMDC32-AtFKBP12-overexpression line-T2 generation |       |          |      |           |           |
|---------------------------------------------------|-------|----------|------|-----------|-----------|
| Event number                                      | total | survived | died | resistant | sensitive |
| 1                                                 | 56    | 44       | 14   | 3         | 1         |
| 2                                                 | 65    | 49       | 16   | 3         | 1         |
| 3                                                 | 80    | 64       | 17   | 4         | 1         |
| 4                                                 | 63    | 46       | 17   | 3         | 1         |
| 5                                                 | 62    | 0        | 62   | 0         | 1         |
| 6                                                 | 71    | 30       | 41   | 1         | 1         |
| 7                                                 | 68    | 47       | 21   | 2         | 1         |
| 8                                                 | 62    | 42       | 20   | 2         | 1         |
| 9                                                 | 59    | 44       | 15   | 3         | 1         |
| 10                                                | 64    | 6        | 48   | 0         | 1         |
| 11                                                | 55    | 17       | 38   | 0         | 1         |
| 12                                                | 66    | 0        | 66   | 0         | 1         |
| 13                                                | 70    | 4        | 64   | 0         | 1         |
| 14                                                | 75    | 56       | 19   | 3         | 1         |
| 15                                                | 69    | 50       | 19   | 3         | 1         |

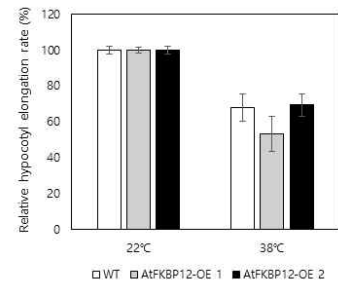
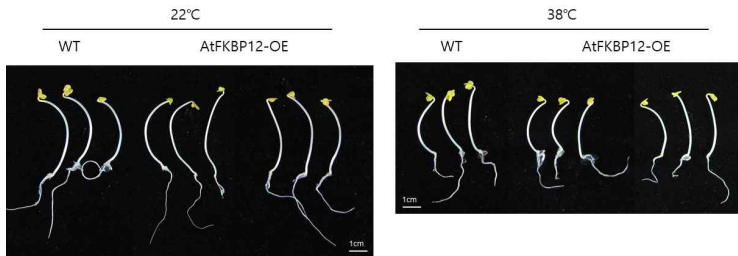


AtFKBP12 과발현체에 대한 T2세대에서의 선별

- 애기장대에 대한 PaFKBP12의 기능적 우수성 뿐 아니라 유체에서의 스트레스에 대한 반응성을 알아보기 위해 PaFKBP12 과발현 유체 형질전환체를 제작하였다.
- 애기장대 PaFKBP12 과발현체가 고온저항성을 보였기 때문에 유체 PaFKBP12 형질전환체도 고온스트레스에 대한 저항성을 비교하였다. 고온 스트레스에서 hypocotyl 길이 생장은 정상체와 PaFKBP12 과발현체가 비슷한 수준을 보인다.
- 유체 AtFKBP12 과발현체의 경우도 마찬가지로 고온 스트레스에서 hypocotyl 길이 생장은 정상체와 비슷한 수준을 보인다.



고온스트레스에 대한 유체 PaFKBP12 과발현체의 반응성



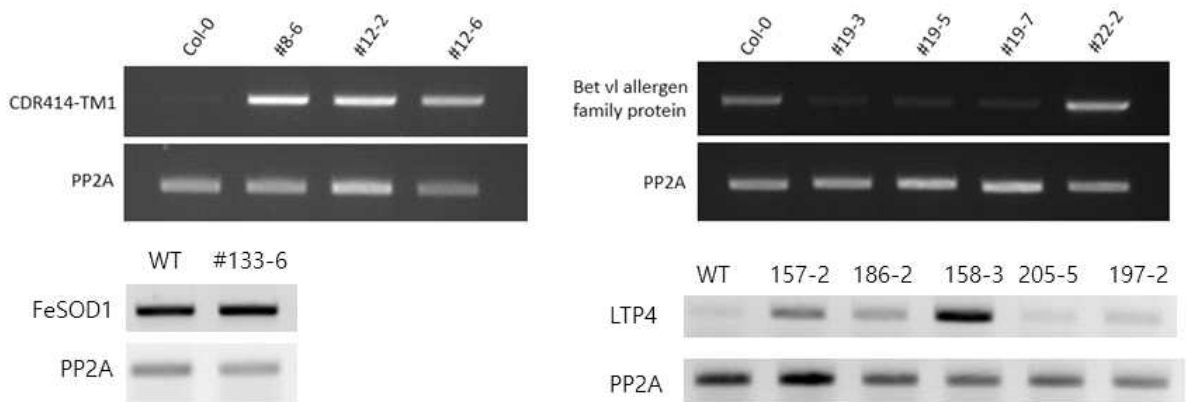
고온스트레스에 대한 유체 AtFKBP12 과발현체의 반응성

(3) 애기장대 PaMBF1c 타겟 유전자원 확보

- 본 연구팀은 선행연구를 통해 PaMBF1c 과발현체에서 정상체와 비교하여 발현이 높아진 유전자를 선별하였다. 이 중 RUBP는 가장 높은 발현을 보이는 유전자이고 RUBP 외에 5개의 유전자에 대한 PaMBF1c의 기능과 스트레스에 대한 반응성을 연구하기 위해 각 유전자에 대한 과발현체를 제작하였다.

표. PaMBF1c에서 발현이 높아진 유전자 목록

| Gene locus | Annotation                           | Fold change |
|------------|--------------------------------------|-------------|
| At1g33480  | RING/U-box superfamily protein       | 22.29       |
| At5g59310  | Lipid transfer protein 4 (LTP4)      | 14.47       |
| At1g29395  | COR414-TM1                           | 1.68        |
| At1g23130  | Bet vi allergen family protein       | 1.62        |
| At4g25100  | Fe-superoxide dismutase1 (FeSOD1)    | 1.52        |
| At1g56580  | Smaller with variable branches (SVB) | 1.53        |



각 유전자에 대한 과발현 확인



## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1. 연구목표

- **기능진화 분석:** 기 발굴 극지이끼 유전자원에서 기능적 진화를 가능하게 한 아미노산기를 실험적으로 확정한다.
- **단축진화 수행:** 유전자편집을 통해 타식물의 비진화 homologous 유전자원에 기능진화 아미노산기를 도입하는 단축진화를 시도하여, 진화된 기능성을 부여한다.
- **기능진화 유전자 확장:** 스트레스 저항성에 관여함이 본 연구팀에 의해 이미 밝혀진 극지이끼 유전자원을 대상으로 그 상대적 기능적 우수성을 확인하여 기능 진화 유전자원을 확장한다.
- **최종 목표:** 본 연구를 통해 극지유전자원의 우수성을 알릴 수 있는 논문 3편 발표와 관련 지적재산권 출원 1편을 목표로 한다.

#### (1) 정성적 목표

| 구분   | 년도   | 연구개발목표           | 연구개발내용                                         | 연구비(백만원) |
|------|------|------------------|------------------------------------------------|----------|
| 1차년도 | 2018 | RUBPp-LUC 시스템 구축 | - 각종 벡터 제작 완료<br>- 담배잎/원형질체 시스템 검정             | 10       |
|      |      | 돌연변이 MBF1c 기능분석  | - Site-directed 돌연변이<br>- Error-prone PCR 돌연변이 | 20       |
|      |      | 기능진화 유전자 확장      | - FKBP12 등 과발현벡터 제작                            | 10       |
| 2차년도 | 2019 | RUBPp-LUC 시스템 완성 | - 담배잎/원형질체 리포터시스템 완성                           | 20       |
|      |      | 돌연변이 MBF1c 기능분석  | - RUBPp-LUC시스템이용 돌연변이MBF1c 기능분석                | 30       |
|      |      | 단축진화 수행          | - CRISPR/Cas 벡터 제작<br>- CRISPR/Cas 형질전환체 제작    | 20       |
|      |      | 기능진화 유전자 확장      | - FKBP12 등 과발현식물체 제작                           | 10       |
| 3차년도 | 2020 | 단축진화 수행          | - T1/T2에서 돌연변이 스크리닝<br>- 단축진화 homozygote 확보    | 40       |
|      |      | 스트레스 표현형 검정      | - 단축진화 개체 스트레스 반응성 검정                          | 20       |
|      |      | 기능진화 유전자 확장      | - 극지이끼/애기장대 유전자과발현체 기능 비교                      | 20       |

#### (2) 정량적 목표

| 구분   | 국외논문(편) |     |      |     | 국내논문(편) |     |      |     | 특허출원(건) |    |
|------|---------|-----|------|-----|---------|-----|------|-----|---------|----|
|      | SCI     |     | SCIE |     | SCI     |     | SCIE |     | 국외      | 국내 |
|      | 주저자     | 공저자 | 주저자  | 공저자 | 주저자     | 공저자 | 주저자  | 공저자 |         |    |
| 1차년도 |         |     |      | 1   |         |     |      |     |         |    |
| 2차년도 |         |     | 1    |     |         |     |      |     |         |    |
| 3차년도 | 1       |     |      |     |         |     |      |     |         | 1  |

## 2. 목표달성도

| 구 분           | %   | 성취도 판단 |    |    | 특기사항<br>(우수성 또는 부진사유 등)                                                                              |
|---------------|-----|--------|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |     | 부진     | 정상 | 우수 |                                                                                                      |
| 2018년도 목표 달성도 | 100 |        | √  |    | 정성적인 부분에서는 100% 이상을 성취했다고 자부하나, 첫째 정량적인 논문출판에서 다소 부진함.                                               |
| 2019년도 목표 달성도 | 100 |        | √  |    | 정성적인 성취도는 100%이나, 정량적인 논문출판에서 다소 부진함. 대신 학술발표에서 계획이상의 성과가 있음.                                        |
| 2020년도 목표 달성도 | 100 |        | √  |    | 정성적인 성취도는 100%이고, 정량적인 면에서도 특히 출판과 논문 출판의 성취를 이룸. 아울러 계획에 없었던, 학술대회 발표 성과가 있었음.                      |
| 최종목표 대비 달성도   | 100 |        | √  |    | 전반적으로 정성적인 면에서 100%를 성취했으나, 정량적인 면에서 논문출판이 다소 부진함. 이를 보완하기 위한 학술대회 발표가 있었음. 연구 종료 후 추가 논문출판이 계획되어있음. |

### (1) 정성적 성과

#### - 2018년도 정성적 성과

| 연구개발목표           | 달성내용                                           | 달성도   | 증빙자료 설명/제출<br>(필요시) |
|------------------|------------------------------------------------|-------|---------------------|
| RUBPp-LUC 시스템 구축 | - 각종 벡터 제작 완료<br>- 담배잎/원형질체 시스템 검정             | 100 % |                     |
| 돌연변이 MBF1c 기능분석  | - Site-directed 돌연변이<br>- Error-prone PCR 돌연변이 | 100 % |                     |
| 기능진화 유전자 확장      | - FKBP12 등 과발현벡터 제작                            | 100 % |                     |

#### - 2019년도 정성적 성과

| 당해연도 연구개발목표      | 달성내용                                        | 달성도   | 증빙자료<br>설명/제출<br>(필요시) |
|------------------|---------------------------------------------|-------|------------------------|
| RUBPp-LUC 시스템 완성 | - 담배잎/원형질체 리포터시스템 완성                        | 100 % |                        |
| 돌연변이 MBF1c 기능분석  | - RUBPp-LUC 시스템이용 돌연변이 MBF1c 기능분석           | 100 % |                        |
| 단축진화 수행          | - CIRPPR/Cas 벡터 제작<br>- CRISPR/Cas 형질전환체 제작 | 100 % |                        |
| 기능진화 유전자 확장      | - Plastocyanin 등 과발현식물체 제작 및 기능 분석          | 100 % |                        |

#### - 2020년도 정성적 성과

| 연구개발목표      | 달성내용                                                           | 달성도   | 증빙자료 설명/제출<br>(필요시) |
|-------------|----------------------------------------------------------------|-------|---------------------|
| 단축진화 수행     | - CRISPR/Cas형질전환체 제작완료 (T1/T2세대)<br>- 단축진화 MBF1c HDR line 확인   | 100 % |                     |
| 스트레스 표현형 검정 | - 단축진화 개체 스트레스 반응성 검정                                          | 100 % |                     |
| 기능진화 유전자 확장 | - 극지이끼/애기장대 유전자과발현체 비교 분석<br>- Plastocyanin 단축진화를 위한 domain 분석 | 100 % |                     |

(2) 정량적 성과

- 2018년도 정량적 성과

| 구 분         |      | 목표(건) | 달성 실적(건) | 주저자 실적 | 달성도   | 증빙자료(제출)* | 비고                                                                              |
|-------------|------|-------|----------|--------|-------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 국외 논문       | SCI  |       |          |        | %     |           |                                                                                 |
|             | SCIE | 1     |          |        | 0 %   |           | 공저자 논문 목표를 연구개시 초기라 달성하지 못함                                                     |
| 국내 논문       | SCI  |       |          |        |       |           |                                                                                 |
|             | SCIE |       |          |        |       |           |                                                                                 |
| 특허출원        |      |       |          |        |       |           |                                                                                 |
| 기 타: 국제학회발표 |      |       | 3        | 3      | 100 % | 포스터 초록 증빙 | 2018 International Conference KSMCB 2건<br>2018 International Conference KSPB 1건 |

- 2019년도 정량적 성과

| 구 분        |      | 당해연도 목표(건) | 달성 실적(건) | 주저자 실적 | 달성도   | 증빙자료(제출)* | 비고                                     |
|------------|------|------------|----------|--------|-------|-----------|----------------------------------------|
| 국외 논문      | SCI  |            |          |        |       |           |                                        |
|            | SCIE | 1          | 0        | 0      | 0 %   |           | 2019년 당시 초고 작성 완료                      |
| 국내 논문      | SCI  |            |          |        |       |           |                                        |
|            | SCIE |            |          |        |       |           |                                        |
| 특허출원       |      |            |          |        |       |           |                                        |
| 기타: 국내학회발표 |      | 0          | 3        | 3      | 100 % | 포스터 초록 증빙 | 한국식물학회동계1건 / 추계2건                      |
| 기타: 국제학회발표 |      | 0          | 2        | 2      | 100 % | 포스터 초록 증빙 | 2019 International Conference KSMCB 2건 |

- 2020년도 정량적 성과

| 구 분        |      | 목표(건) | 달성 실적(건) | 주저자 실적 | 달성도    | 증빙자료(제출)*        | 비고                                                                              |
|------------|------|-------|----------|--------|--------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 국외 논문      | SCI  | 1     |          |        | 0 %    |                  | 1건 초고 완성 (20년 12월내 투고예정)                                                        |
|            | SCIE | 0     | 1*       | 1*     | 100* % | 게재승인이메일 및 투고논문증빙 | *게재승인(온라인출판으로 올해 내 출판가능)                                                        |
| 국내 논문      | SCI  |       |          |        |        |                  |                                                                                 |
|            | SCIE |       |          |        |        |                  |                                                                                 |
| 특허출원       |      | 1     | 1        | 1      | 100 %  | 출원통지서 증빙         |                                                                                 |
| 기타: 국내학회발표 |      |       | 2        | 2      | 100 %  | 포스터 초록 증빙        | 한국식물학회동계2건                                                                      |
| 기타: 국제학회발표 |      |       | 4        | 4      | 100 %  | 포스터 초록 증빙        | 2020 International Conference KSMCB 2건<br>2020 International Conference KSPB 2건 |

### 3. 인력양성 추진 내용

#### (1) 연도별 목표대비 달성내역

- 2018년도 인력양성 추진실적

(명)

| 구 분 | 석사(석사과정) |    | 박사(박사과정) |    | 계  |    |
|-----|----------|----|----------|----|----|----|
|     | 목표       | 달성 | 목표       | 달성 | 목표 | 달성 |
| 인 원 | 0        | 0  | 0        | 0  | 0  | 0  |

- 2019년도 인력양성 추진실적

(명)

| 구 분 | 석사(석사과정) |    | 박사(박사과정) |    | 계  |    |
|-----|----------|----|----------|----|----|----|
|     | 목표       | 달성 | 목표       | 달성 | 목표 | 달성 |
| 인 원 | 0        | 1  | 0        | 1  | 0  | 2  |

- 2020년도 인력양성 추진실적

(명)

| 구 분 | 석사(석사과정) |    | 박사(박사과정) |    | 계  |    |
|-----|----------|----|----------|----|----|----|
|     | 목표       | 달성 | 목표       | 달성 | 목표 | 달성 |
| 인 원 | 0        | 1* | 0        | 0  | 0  | 1* |

\* , 2021년 2월 석사1명 졸업 예정

#### (2) 달성 및 활용실적

극지연구소

| 과제 참여연구원 |             |                                    |    | 주요 활용실적                             |
|----------|-------------|------------------------------------|----|-------------------------------------|
| 소속       | 이름          | 전공                                 | 학위 |                                     |
| 서강대학교    | Seher YOLCU | 생물학                                | 박사 | 박사후 연구원으로 전문적 분자생물학 실험 주도           |
| 서강대학교    | 유시인         | 생명과학                               | 박사 | CRISPR/Cas 연구 경험 활용                 |
| 서강대학교    | 유경재         | 분자생물                               | 학사 | 리포터 시스템 구축 및 기능 검증                  |
| 서강대학교    | 배노아         | 생명공학                               | 석사 | 극지이끼 과발현체 스트레스 표현형 분석 등 식물생리학적 연구   |
| 서강대학교    | 김희진         | 생명과학                               | 학사 | 리포터 시스템 구축 및 기능 검증                  |
| 서강대학교    | Yidi XU     | Biochemistry and Molecular Biology | 석사 | Vector construct 및 분자생물학 분석         |
| 서강대학교    | 김미선         | 생명과학                               | 학사 | MBF1c의 단축진화를 위한 CRISPR 매개 HDR 라인 제작 |

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 활용방안

- 연구 종료 후라도 우수 극지 유전자 발굴을 위해 지속적으로 연구를 수행하여, 극지 이끼 유전자의 단축 진화에 의한 극지 유전자 활용 방안 연구 논문을 출판할 것이다.
- 본 연구와 기술을 기반으로 한 극지이끼, 나아가 극지식물 유전자원을 활용한 작물개량체 제작 과제 추진이 가능할 것이다.
- 아울러, 극지 이끼 유전자의 기능 진화를 가능하게 한 아미노산기 확정 및 유전자 기능성 특허 출원이 가능할 것이다.

### 2. 기대효과

- 본 연구를 통해 훈련된 연구인력은 (1) 우수 기능성 극지 유전자원과 이를 통한 기능 진화를 분자수준에서 이해하는 기초 학문을 이해할 수 있을 것이고, (2) 첨단 유전자 편집기술을 습득하여 작물을 개선하는 응용 학문을 모두 경험하여, 관련 연구계 및 산업계 진출이 가능할 것이다.
- 본 연구팀원들은 이제 극지 유전자원에 대해 익숙하여 생명과학 및 응용과학에서 극지유전자원의 중요성에 대해 보다 더 이해하고, 이의 활용을 활발히 할 것이다.
- 유전자 편집기술의 진보가 이루어질수록 어떤 유전자를 편집하여 작물을 개량할 것인가에 대한 고민은 깊어질 것으로 예상된다. 따라서, 앞으로 유전자 편집기술의 적용을 위한, 우수한 기능의 유전자원이 발굴이 중요할 것이다. 본 연구가 이러한 연구의 토대를 구축했다고 자부한다. 특히, 극지 유전자원의 중요성이 더 주목받게 될 것이고, 그럴수록 본 연구가 극지 유전자원의 응용적 방향성을 제시해 줄 수 있을 것이다.

## 제 6 장 참고문헌

- Alavilli, H., Lee, H., Park, M., and Lee, B.-h. (2017). Antarctic moss Multiprotein Bridging Factor 1c overexpression in Arabidopsis resulted in enhanced tolerance to salt stress. *Front. Plant Sci.* 8, 1206. doi: 10.3389/fpls.2017.01206.
- Alavilli, H., Lee, H., Park, M., Yun, D.-J., and Lee, B.-h. (2018). Enhanced multiple stress tolerance in Arabidopsis by overexpression of the polar moss peptidyl prolyl isomerase FKBP12 gene. *Plant Cell Reports* 37:453-465. doi: 10.1007/s00299-017-2242-9.
- Ali, A., Raddatz, N., Aman, R., Kim, S., Park, H.C., Jan, M., Baek, D., Khan, I.U., Oh, D.H., Lee, S.Y., Bressan, R.A., Lee, K.W., Maggio, A., Pardo, J.M., Bohnert, H.J., Yun, D.J.. A Single Amino-Acid Substitution in the Sodium Transporter HKT1 Associated with Plant Salt Tolerance. *Plant Physiol.* 2016 Jul;171(3):2112-26. doi: 10.1104/pp.16.00569.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- Cho, S., Yu, S.-i., Park, J., Mao, Y., Zhu, J.-K., Yun, D.-J., and Lee, B.-h. (2017). Accession-Dependent CBF gene deletion by CRISPR/Cas system in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8: 1910. doi: 10.3389/fpls.2017.01910.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337: 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., Guo, X., Xu, S., Niu, Y., Jin, J., Zhang, H., Xu, X., Li, L., Wang, W., Qian, Q., Ge, S., Chong, K. COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell.* 2015 Mar 12;160(6):1209-21. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.046.
- Miki, D., Zhang, W.X., Zeng, W.J., Feng, Z.Y., Zhu, J.-K. (2018) CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation. *Nature Comm.* 9: 1967. DOI: 10.1038/s41467-018-04416-0.
- Yolcu, S., Alavilli, H., Lee, B.-h. (2020) Natural Genetic Resources from Diverse Plants to Improve Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Int J Mol Sci.* 21(22):8567. doi: 10.3390/ijms21228567.