등록특허 10-2498185

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월10일
(11) 등록번호 10-2498185
(24) 등록일자 2023년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8243 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0152025
(22) 출원일자 2020년11월13일
심사청구일자 2020년11월13일
(65) 공개번호 10-2021-0063235
(43) 공개일자 2021년06월01일
(30) 우선권주장
1020190151645 2019년11월22일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Diana L. Zuluaga 등. Plant Molecular Biology. Vol. 101, 페이지 65-79 (2019.06.12.)
Genbank Accession number GQ478992 (2011.04.04.)
EP02708607 A2
JP2014076045 A

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
이상협
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 104동 201호(대치동, 대치삼성아파트)
김영천
서울특별시 광진구 동일로56길 52
(74) 대리인
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **글루코라파닌 고함량 식물 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 글루코라파닌 고함량 식물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 포함하는 조성물을 이용하여 효율적으로 글루코라파닌 고함량 식물을 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395065488
과제번호 PJ014872012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대농작물신육종기술개발(R&D)
연구과제명 MYB28/AOP2 유전자 편집 브로콜리/양배추 개발
기 여 율 6/10
과제수행기관명 세종대학교 산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545018774
과제번호 117043033SB010
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명 Myb 28 유전자 편집을 통한 glucoraphanin 고함량 브로콜리 개발
기 여 율 4/10
과제수행기관명 세종대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 4의 서열을 갖는 것인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 식물은 콜라드, 가이란, 콜리플라워, 양배추, 적채, 방울다다기, 콜라비, 브로콜리, 사보이양배추, 꽃양배추 및 케일로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물.

청구항 4

서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 식물 세포에 처리하는 단계를 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 4의 서열을 갖는 것인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 식물은 콜라드, 가이란, 콜리플라워, 양배추, 적채, 방울다다기, 콜라비, 브로콜리, 사보이양배추, 꽃양배추 및 케일로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법.

청구항 7

서열번호 2에서 896 내지 900번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물.

청구항 8

삭제

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 서열번호 2에서 900 내지 901번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드 사이에 하나

의 아데닌이 삽입된 서열을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 식물은 콜라드, 가이란, 콜리플라워, 양배추, 적채, 방울다다기, 콜라비, 브로콜리, 사보이양배추, 꽃양배추 및 케일로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 글루코라파닌 고함량 식물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 글루코라파닌 고함량 식물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 글루코시놀레이트(glucosinolate) 및 그 유도체들은 황이온이 풍부한 음이온성 자연 산물로서, 십자화(*Brassicaceae*)과 식물에 많이 존재하는 2차 대사 산물의 하나이다. 글루코시놀레이트는 식물체 조직이 손상을 입었을 때 내인성 가수분해 효소인 미로시나아제(myrosinases)에 의해 이소티오시아네이트(isothiocyanates), 나이트릴(nitriles) 등으로 분해되는데, 이러한 가수분해 산물은 해충에 대한 방어 물질 및 유인 물질 등 여러 다른 생물학적 활성을 가지고 있다. 높은 글루코시놀레이트 함량을 갖는 대표적인 식물로 브로콜리와 양배추를 하위 품종으로 포함하는 브라시카 올레라케아(*Brassica oleracea*)가 알려져있다.

[0004] 종래 기술은 더욱 높은 함량의 글루코시놀레이트를 갖는 품종을 육성하기 위해 글루코라파닌 함량이 높은 종(species)을 육종 프로그램에 도입하고 수 십 년간의 지속적인 교배를 수행하는 방법 등을 이용하였다. 이는 글루코라파닌 함량이 높은 다른 종의 야생자원을 품종 육성의 재료로 활용하여 오랜 기간의 교배를 지속적으로 실시해야만 품종 육성이 가능해진다는 기술적인 어려움이 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1616570호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 글루코라파닌 고함량 식물의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 글루코라파닌 고함량 식물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물.

[0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 4의 서열을 갖는 것인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물.

[0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 식물은 콜라드, 가이란, 콜리플라워, 양배추, 적채, 방울다다기, 콜라비, 브로콜리, 사보이양배추, 꽃양배추 및 케일로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물.

[0014] 4. 서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 식물 세포에 처리하는 단계를 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법.

[0015] 5. 위 4에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 4의 서열을 갖는 것인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법.

[0016] 6. 위 4에 있어서, 상기 식물은 콜라드, 가이란, 콜리플라워, 양배추, 적채, 방울다다기, 콜라비, 브로콜리, 사보이양배추, 꽃양배추 및 케일로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법.

[0017] 7. 서열번호 2에서 896 내지 901번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드 중 적어도 하나 이상이 결실된 서열을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물.

[0018] 8. 위 7에 있어서, 상기 서열번호 2에서 896 내지 900번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물.

[0019] 9. 위 7에 있어서, 상기 서열번호 2에서 900 및 내지 901번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드 사이에 적어도 하나의 뉴클레오티드가 삽입된 서열을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물.

[0020] 10. 위 7에 있어서, 상기 식물은 콜라드, 가이란, 콜리플라워, 양배추, 적채, 방울다다기, 콜라비, 브로콜리, 사보이양배추, 꽃양배추 및 케일로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 글루코라파닌 고함량 식물.

발명의 효과

[0022] 본 발명 가이드 RNA는 브라시카 올레라케아(*Brassica oleracea*)의 *MYB28* 을 암호화하는 유전자 서열 중 일부를 특이적으로 표적화 할 수 있다.

[0023] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물을 이용하면 짧은 기간 내에 *MYB28* 을 암호화하는 유전자를 편집할 수 있고, 따라서 효율적으로 글루코라파닌 고함량 식물을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 야생형 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열, 유전자 편집된 개체(실시예 1 내지 3)의 *MYB28* 서열 중 변이가 발생한 부분을 나타낸다.

도 2는 유전자 편집된 브로콜리 개체(실시예 1 내지 3)와 몇몇 시판 품종의 글루코라파닌 함량을 비교한 데이터를 나타낸다.

도 3은 야생형 브라시카 올레라케아 브로콜리 품종(*Brassica oleracea var. italica*)의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열 중 서열번호 1을 포함하는 일부 서열에 대하여 다른 종의 십자화과 식물의 MYB28를 암호화하는 유전자 서열을 대응시켜 정렬한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물 제조용 조성물을 제공한다.

[0027] 서열번호 1(CAGAGATGATGACCACAATGAGG)의 서열은 야생형 브라시카 올레라케아의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열에 포함된 서열이다.

[0028] 가이드 RNA는 서열번호 1의 적어도 일부에 상보적으로 결합하는 것으로, 서열번호 1 서열 전체에 완전히 상보적이거나 서열번호 1의 서열 중 일부 서열에 상보적인 것, 즉, 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적인 것일 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1의 서열 중 염기 23개, 22개 이상, 21개 이상, 20개 이상, 19개 이상, 18개 이상, 17개 이상, 16개 이상, 15개 이상, 14개 이상, 13개 이상, 12개 이상, 11개 이상, 10개 이상, 9개 이상, 8개 이상, 7개 이상, 6개 이상 또는 5개 이상에 상보적인 것일 수 있다.

[0029] 가이드 RNA의 길이는 서열번호 1의 서열과 혼성 복합체를 형성하고, 유전자 편집을 가이드 하기에 충분한 것이라면 그 길이는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 5개 이상, 8개 이상, 10개 이상, 13개 이상, 15개 이상, 18개 이상, 20개 이상, 22개 이상, 23개 또는 그 이상일 수 있다. 그 상한은 예를 들면 30개, 25개, 23개 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 바람직하게는 가이드 RNA는 서열번호 1의 서열과 완전히 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0031] 가이드 RNA는 DNA의 특정 부분에 상보적으로 결합하여, DNA 중 특정 부분을 절단하도록 안내하는 역할을 하는 RNA를 의미한다. 가이드 RNA는 DNA의 이중나선을 절단하는 효소인 Cas9과 복합체를 형성할 수 있다.

[0032] Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*) 유래의 Cas9 단백질, 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 유래의 Cas9 단백질 및 네이세리아 메닝기디티스 (*Neisseria meningitidis*)유래의 Cas9 단백질로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0033] Cas9 단백질은 예를 들면 서열번호 3의 서열을 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로, 서열번호 3의 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0034] 본 발명 조성물의 가이드 RNA 및 Cas9 단백질 중 적어도 하나는 핵산 형태로 벡터에 적재된 것일 수 있다.

[0035] 예를 들어, 본 발명 조성물은 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 적재하는 벡터;와 Cas9 단백질;을 포함할 수 있다.

[0036] 다른 예를 들어, 본 발명 조성물은 가이드 RNA;와 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 적재하는 벡터;를 포함할 수 있다.

[0037] 또 다른 예를 들어, 본 발명 조성물은 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 적재하는 제1 벡터;와 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 적재하는 제1 벡터;를 포함할 수 있다.

[0038] 또 다른 예를 들어, 본 발명 조성물은 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 모두 적재하는 벡터;를 포함할 수 있다.

[0039] 상기 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다.

[0040] 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 및 단순포진 바이러스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 바이러스 벡터일 수 있다.

[0041] 가이드 RNA와 Cas9 단백질은 가이드 RNA-Cas9 단백질 복합체 형태로 본 발명 조성물에 포함될 수 있다. 가이드 RNA-Cas9 단백질 복합체는 가이드 RNA의 일부 핵산과 Cas9 단백질의 일부 아미노산이 상호작용하여 형성될 수 있다.

[0042] 글루코라파닌(glucoraphanin)은 글루코시놀레이트류의 한 종류로, 미로시나아제(myrosinase)에 의해 가수분해되어 항암 활성을 나타내는 아이소티오사이아네이트(isothiocyanate) 유도체로 전환되는 것으로 알려져 있다. 글루코시놀레이트 및 이의 유도체는 황이온이 풍부한 음이온성 자연 산물로서, 십자화과 식물에 많이 존재하는 2차 대사산물의 하나이다. 글루코시놀레이트 및 이의 유도체는 식물체 조직이 손상을 입었을 때 내인성 가수분해 효소인 미로시나아제에 의해 아이소티오사이아네이트 및 나이트릴 등으로 분해되는데, 이러한 가수분해 산물은 해충에 대한 방어 물질 및 유인 물질 등 여러 다른 생물학적 활성을 가지고 있다.

[0043] 식물은 브라시카 올레라케아(*Brassica oleracea*; *B. oleracea*) 종일 수 있으며, 구체적인 하위 품종으로 콜라드(*B. oleracea* 'Acephala' 그룹), 가이란(*B. oleracea* 'Alboglabra' 그룹), 콜리플라워(*B. oleracea* 'Botrytis' 그룹), 양배추 또는 적채(*B. oleracea* 'Capitata' 그룹), 방울다다기(*B. oleracea* 'Gemmifera' 그룹), 콜라비(*B. oleracea* 'Gongylodes' 그룹), 브로콜리(*B. oleracea* 'Italica' 그룹), 사보이양배추(*B. oleracea* 'Sabauda' 그룹), 꽃양배추(*B. oleracea* 'Sabellica' 그룹), 케일(*B. oleracea* 'Viridis' 그룹) 으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0044] 식물은 브라시카 준세아(*brassica juncea*; *B. juncea*) 종, 브라시카 니그라(*Brassica nigra*; *B. nigra*) 종, 브라시카 나푸스(*Brassica napus*; *B. napus*) 종,브라시카 라파(*Brassica rapa*; *B. rapa*) 종 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 단백질;을 식물 세포에 처리하는 단계를 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물 제조 방법을 제공한다.

[0047] 가이드 RNA, Cas9 단백질 및 식물에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0048] 상기 세포는 세포벽이 제거된 원형질체일 수 있다. 원형질체는 세포벽을 갖지 않기 때문에, 세포융합, 유전자조작 및 인공적 체세포 돌연변이와 같은 인공적 조작이 용이하다.

[0049] 상기 가이드 RNA 및 Cas9 단백질 중 적어도 하나는 핵산 형태로 벡터에 적재되어 세포에 처리될 수 있다.

[0050] 예를 들어, 본 발명 방법은 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 적재하는 벡터;와 Cas9 단백질;을 식물 세포에 처

리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0051] 다른 예를 들어, 본 발명 방법은 가이드 RNA;와 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 적재하는 벡터;를 식물 세포에 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0052] 또 다른 예를 들어, 본 발명 방법은 가이드 RNA를 암호화하는 핵산을 적재하는 제1 벡터;와 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 적재하는 제1 벡터;를 식물 세포에 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0053] 또 다른 예를 들어, 본 발명 방법은 가이드 RNA를 암호화하는 핵산 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산을 모두 적재하는 벡터;를 식물 세포에 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0054] 벡터에 대한 내용은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0055] 가이드 RNA 및/또는 Cas9 단백질을 식물 세포에 처리하기 위해서 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 매개, 유전자총(입자 충격법), 바이러스, 전기충격법(Electrophoration), 집접주입법, 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol; PEG), 리포솜(Liposome), 임비비션(Imbibition) 방법, 화분관 경로(Pollen-tube pathway) 방법, 인-플랜타 형질전환(In-planta transformation) 등을 이용할 수 있다.

[0056] 상기 바이러스는 꽃양배추모자이크바이러스(CaMV), 담배모자이크바이러스(TMV)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 상기 직접주입법은 미세주입법(microinjection), 다량주입법(macroinjection)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명 방법에 의해 가이드 RNA와 Cas9 단백질이 세포에 처리되면, 세포의 유전자에 포함된 서열번호 1에 가이드 RNA가 상보적으로 결합될 수 있고, Cas9 단백질이 서열번호 1을 포함하는 가닥을 절단할 수 있다. 그 후, 절단된 부위에서 다양한 인델 (indel; insertion and deletion) 이 발생할 수 있다.

[0059] 용어 '인델(indel)' 은 DNA의 뉴클레오타이드 배열에서 일부 뉴클레오타이드가 중간에 삽입 (insertion)되거나 결실 (deletion) 된 변이를 총칭한다. 전술한 바와 같이 인델은 가이드 RNA과 Cas9 단백질 복합체가 표적 유전자의 전사 조절 영역 내 표적 서열을 절단하는 경우, 상동 재조합 수리(homology directed repairing; HDR) 또는 비-상동성 말단-결합(Non-homologous end joining; NHEJ) 기작에 의해 수선되는 과정에서 표적 서열에 도입되는 것일 수 있다.

[0060] 용어 '비-상동성 말단-결합 (Non-homologous end joining, NHEJ)' 은 절단된 이중가닥 또는 단일가닥의 양 말단이 함께 결합함으로써 DNA 내 이중가닥 파손을 수복 또는 수선하는 방법으로, 일반적으로 이중가닥의 파손(예를 들어, 절단)에 의해 형성된 2 개의 적합성 말단이 빈번한 접촉을 반복하여 2개의 말단이 완전히 결합되면서 파손된 이중가닥을 복구하는 기작을 의미할 수 있다.

[0061] 용어 '상동 재조합 수리(homology directed repairing, HDR)' 는 손상된 전사 조절 영역의 DNA를 수선 또는 수복하기 위해 상동성을 가진 서열을 주형으로 이용하여 오류 없이 교정할 수 있는 방법으로, 일반적으로 파손된 DNA을 수선 또는 수복하기 위해 변형이 이루어지지 않은 상보적인 뉴클레오타이드서열의 정보를 이용하거나 자매 염색분체의 정보를 이용하여 파손된 DNA를 수선 또는 수복하는 것이다. HDR의 가장 일반적인 형태는 상동성 재조합(homologous recombination, HR)이다. HDR은 통상적으로 활발하게 분열하는 세포의 S나 G2/M 시기에 주로 발생하는 수선 또는 수복 방식이다.

[0063] 추가로, 본 발명은 야생형 브라시카 올레라케아의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열에서 896 내지 901번째의 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드 중 적어도 하나 이상이 결실된 서열을 포함하는 글루코라파닌 고함량 식물을 제공한다.

[0064] 야생형 브라시카 올레라케아의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열은 서열번호 2일 수 있다.

[0065] 서열번호 2:

ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAGGAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAA
GGAGGCTGGCGTGACATTCCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGGAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTACCTAAAACCTGAAATCAAAAGAGGC
GAGTTTAGTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATGCTTCATGCTTCTCGTGGAAACAAGTGGTCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACAGACAAT
GAGATCAAGAACTACTGGAACACACATCTCAAGAAACGTTTGATCGAACAGGGTACTGATCCCGTGACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACT
GTACCTGAGAATTTGCATTCCCTAGATGCATCTAGTTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATGCCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCCTCCGGTTTC
AACACGGTTTTCGAGAATACCAGCAAAGATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTGAAGAAATCAAGTTCTACATCAAGG

CTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCTTTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATACAAGCTTTTCCAATGGCTAC
TCTGAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAGTTCGATCCCTTCCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAAT
GAAATGAATACTACTTCTGATCTCGATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAATTTCGGCAGAGATGATGACCACAATGAGGAGCACTACATG
AATCATAACTATGGTCATGATCTTCTTATGTCCGATGTGTCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCAAAT
TATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATTCCCTCGGAAAGCATATCATATGA.

[0066] 용어 '특정 종의 특정 유전자에서 특정 위치에 대응되는 위치'는 상기 특정 종과 다른 종의 상기 특정 유전자 서열을 정렬(align)시켰을 때 상기 특정 종의 특정 유전자에서 상기 특정 위치에 대응되는 위치를 의미할 수 있다.

[0067] 상기 896 내지 901번째의 위치는 야생형 브라시카 올레라케아 브로콜리 품종(*Brassica oleracea var. italica*)의 경우에 해당하는 것으로서, 상기 위치에 대응되는 위치는 상세 품종, 식물 종류 등에 따라 달라질 수 있는 것이고, 해당 위치는 식물체의 서열을 서열번호 2의 서열과 정렬하여 확인될 수 있다. 이는 후술하는 뉴클레오티드 위치에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다.

[0068] 야생형 브라시카 올레라케아 브로콜리 품종(*Brassica oleracea var. italica*)의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열(서열번호 2) 중 가이드 RNA가 상보적으로 결합하여 유전자 편집될 수 있는 부분(서열번호 1: 노란색 표시된 부분)을 포함하는 일부 서열에 대하여, 다른 종의 십자화과 식물의 MYB28를 암호화하는 유전자 서열을 대응시켜 정렬한 것을 도 3에 나타냈다.

[0069] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 서열번호 2에서 896 내지 900번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 서열번호 2에서 901번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 서열번호 2에서 898 내지 900번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 서열번호 2에서 899 내지 901번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 서열번호 2에서 900 및 901번째 위치에 대응되는 위치의 뉴클레오티드 사이에 적어도 하나의 뉴클레오티드가 삽입된 서열을 더 포함할 수 있다. 삽입된 서열의 염기는 아데닌일 수 있다.

[0074] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 가이드 RNA과 Cas9을 이용하여 유전자 편집된 식물일 수 있다.

[0075] 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 유전자 편집된 식물로, 야생형 식물 보다 글루코라파닌 함량이 높다. 또한, 본 발명 글루코라파닌 고함량 식물은 시판 품종 보다 글루코파라닌 함량이 2배 이상 높다. 예를 들어, 글루코라파닌 함량이 높은 브라시카 빌로사(*Brassica vilosa*)을 육종 시스템에 도입하여 수십년간 지속적인 교배를 통해 개발된 베네포르테란 품종보다 글루코라파닌 함량이 2배 이상 높다.

[0077] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0079] **1. MYB28을 암호화하는 유전자 편집된 원형질체 제작**

[0080] **1-1. 유전자 편집 방법**

[0081] 서열번호 1(CAGAGATGATGACCACAATGAGG)의 guide RNA(서열번호 4:CAGAGATGATGACCACAATG) 및 Cas9 단백질(서열번호 3;
MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE
ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS
GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL
RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG
SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK
HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS
GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL

QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD)을 *Brassica oleracea* var. *italica* 원형질에 polyethylene glycol(PEG) 처리하여 도입하였다.

[0082] 가이드 RNA(25㎍)과 Cas9 protein (25㎍)과 함께 브로콜리 원형질체 (5×10^5)에 PEG(20% PEG, 0.2M mannitol, 0.1M $CaCl_2$)를 혼합하였다. 혼합액과 동량의 배양액 1(2mM MES, 154mM $NaCl_2$, 125mM $CaCl_2$, 5mM KCl, pH5.7) 첨가를 통해 가이드 RNA와 Cas9 protein을 도입 하였다. 유전자 도입과정 후 배양액 1을 원심분리 하여 제거하였다, 배양액 2(4mM MES, 0.5M mannitol, 20mM KCl, pH5.7)를 첨가한 후 24시간 동안 25℃조건에서 배양하였다.

[0084] **1-2. 유전자 편집된 원형질체의 서열 확인**

[0085] 1-1의 방법으로 유전자 편집된 3 개체의 원형질체의 서열을 확인하였고, 그 결과는 도 1과 같다.

[0086] 상기 유전자 편집된 3 개체에서 각각 다른 형태의 서열 변이가 발생하였고, 야생형 서열과 비교할 때 염색체 두 쪽에 모두 변이가 발생한 것을 확인하였다. 야생형 *Brassica oleracea* var. *italica* 의 *MYB28*을 암호화하는 유전자의 서열은 서열번호 2와 같다.

[0087] 도 1은 야생형 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열, 유전자 편집된 개체(실시예 1 내지 3)의 *MYB28* 서열 중 변이가 발생한 부분을 나타낸다.

[0088] 도 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1은 각기 다른 형태의 4bp 결실이 각기 다른 상동 염색체(도 1 의 실시예 1_염색체 1 및 실시예 1_염색체 2 참조)에서 발생하였다. 실시예 2는 6bp 결실과 1bp 삽입이 각기 다른 상동 염색체(도 1 의 실시예 2_염색체 1 및 실시예 2_염색체 2 참조)에서 발생하였다. 또한, 실시예 3은 2bp 결실과 1bp 삽입이 각기 다른 상동 염색체(도 1 의 실시예 3_염색체 1 및 실시예 3_염색체 2 참조)에서 발생하였다.

[0090] **2. *MYB28*을 암호화하는 유전자 편집된 개체의 글루코라파닌 함량 확인**

[0091] **2-1. 유전자 편집된 개체 생산**

[0092] 가이드 RNA와 Cas9 protein이 도입된 브로콜리 원형질체를 1차 배지 (1×B5 culture medium, 70g/L D-mannitol, 20g/L glucose, 0.25mg/L 2,4-D, 1mg/L NAA, 2mg/L TDZ, 0.1g/L MES, pH 5.8)에 옮긴 10일간 25℃에서 암처리 후, long day 조건에서 1주간 배양 후 2차 배지(1×B5 culture medium, 40g/L D-mannitol, 20g/L sucrose, 0.25mg/L 2,4-D, 0.2mg/L NAA, 2mg/L TDZ, 0.1g/L MES, pH 5.8)에서 4에서 5주 동안 배양, 3차 배지(1×MS culture medium, 30g/L sucrose, 0.5mg/L NAA, 2mg/L TDZ, 0.1g/L, 6g/L agarose, pH 5.8)에서 2에서 4달간 배양, 4차 배지(0.5×MS culture medium, 10g/L sucrose, 6g/L agarose, pH 5.8) 순으로 배지조성을 교체시켜 개체를 생산 하였다.

[0094] **2-2. 유전자 편집된 개체의 글루코라파닌 함량 비교**

[0095] 유전자 편집된 브로콜리 개체인 실시예 1 내지 3과 몇몇 시판 품종(비교예 1내지 4)의 글루코라파닌 함량을 비교하였다.

[0096] 비교예 1로 시판 품종 킹돔의 모계종(kingdom maternal, KDM), 비교예 2로 시판 품종 킹돔의 부계종(kingdom paternal, KDP), 비교예 3으로 시판 품종 킹돔(kingdom, KD), 비교예 4로 시판 품종 베네포르테(Beneforete; BF)를 사용하였다.

[0097] 동결된 브로콜리 시료를 분쇄, 100% 메탄올 추출용매로 현탁, 1시간 동안 초음파추출 후, 1시간동안 55℃ 중탕처리 및 감압농축의 전처리 하였다. 전처리된 시료를 HPLC(high performance liquid chromatography) system으로 3반복 추출 및 정량분석 하였다. HPLC 분리분석 조건으로 5% 이동상 A: 5mM Tetramethylammonium bromide와 95% 이동상 B: 100% Acetonitrile를 0.8 ml/min 유속으로 분리하였고 분리된 물질은 UV 230nm에서 모니터닝 하였다.

[0098] 글루코라파닌 함량 분석 결과 실시예 2가 다른 시판 품종 및 실시예 1 및 3보다 2배 이상 높은 글루코라파닌 함량을 보이는 것을 확인하였다 (도 2 참조).

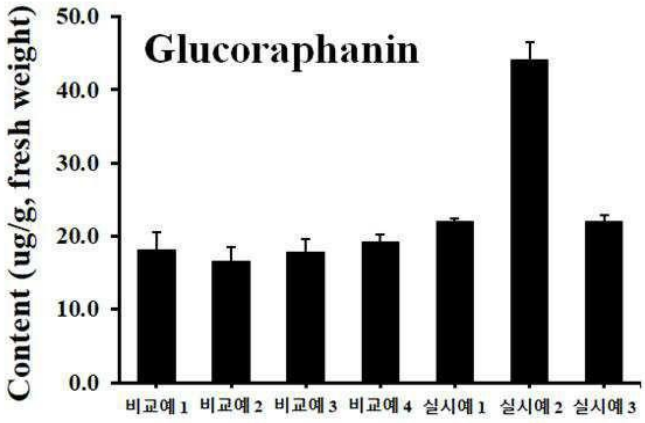
[0099] 높은 글루코파닌 함량을 보이는 실시예 2는 야생형 브라시카 올레라케아의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열(서열번호 2) 중 896 내지 900번 뉴클레오티드가 결실된 서열을 포함한다. 또한, 실시예 2는 야생형 브라시카 올레라카케아의 *MYB28*을 암호화하는 유전자 서열(서열번호 2) 중 900번과 901번 뉴클레오티드 사이에 하나의 뉴클레오티드(염기: A)가 더 삽입된 서열을 포함한다.

도면

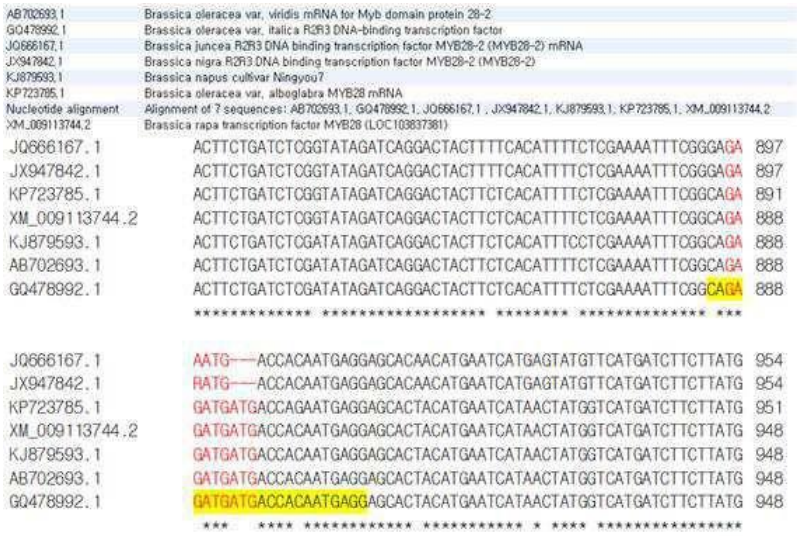
도면1

```
야생형                : CAGAGATGATGACCAC-AATGAGG
실시예 1_염색체 1 :  CAGAGATGATGAC- ---AATGAGG
          _염색체 2 :  CAGAGATGATGACC- ---TTGAGG
실시예 2_염색체 1:  CAGAGATGATG- -----AATGAGG
          _염색체 2:  CAGAGATGATGACCACAAATGAGG
실시예 3_염색체 1:  CAGAGATGATGACCAC- -ATGAGG
          _염색체 2:  CAGAGATGATGACCACAAATGAGG
```

도면2



도면3



서 열 목 록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> GLUCORAPHANIN RICH PLANTS AND PREPARATION METHOD THEREOF

<130> 20P11020

<150> KR 10-2019-0151645

<151> 2019-11-22

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Brassica oleracea

<400> 1

cagagatgat gaccacaatg agg 23

<210> 2

<211> 1089

<212> DNA

<213> Brassica oleracea

<400> 2

atgtcaagaa agccatgttg tgtcggagaa gggctgaaga aaggggcatg gaccaccgag 60

gaagataaga aactcatctc ttacatccat gaacatggag aaggaggctg gcgtgacatt 120

cctcaaaaag ctggattgaa aaggtgtgga aagagttgta gactgcgatg gactaactac 180

ctaaaacctg aaatcaaaag aggcgagttt agttcagagg aggaacagat tatcatcatg 240

cttcatgctt ctcgtggaaa caagtggtcg gtcatagcga gacatttacc tagaagaaca 300

gacaatgaga tcaagaacta ctggaacaca catctcaaga aacgtttgat cgaacagggt 360

actgatcccg tgactcacaa gccactagct tctaatacaa accctactgt acctgagaat 420

ttgcattccc tagatgcatc tagttccgac aagcaatact cccggtcaag ctcaatgcct 480

tccatgtctt gtactccttc ctccggtttc aacacggttt tcgagaatac cagcaaagat 540

gggacaccag ttcgtgagga cgattccttg agtcgcaaga aacgtttgaa gaaatcaagt 600

tctacatcaa ggcttttgaa caaagttgcg gctaaggcca cttccatgaa agaagctttg 660

tctgcttcca tggaaggtag cttgaatgct aatacaagct tttccaatgg ctactctgag 720

cagattctca atgaagatga tagtcctaat gcatccctca taaacactct cgccgagttc 780

gatcccttcc tccaaacaac gttttaccct gagaatgaaa tgaatactac ttctgatctc 840

gatatagatc aggactactt ctcacatttt ctcgaaaatt tcggcagaga tgatgaccac 900

aatgaggagc actacatgaa tcataactat ggtcatgatc ttcttatgtc cgatgtgtcc 960

caagaagtct catcaactag cgttgatgat caagacaata ctaatgaggg ttggtcaaat 1020

tatcttcttg accatgctga ttttatacat gacatggatt ctgattccct cggaaagcat 1080

atcatatga 1089

<210> 3

<211> 1368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cas9

<400> 3

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95
Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110
His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125
His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140
Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175
Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190
Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205
Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220
Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn

225 230 235 240
Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser

305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys

325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe

340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser

355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp

370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg

385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu

405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe

420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile

435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp

450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu

465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr

485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser

500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys

515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln

530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr

545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp

565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly

580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp

595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr

610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala

625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr

645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp

660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe

675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe

690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu

705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly

725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly

740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln

755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile

770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro

785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu

805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser

945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys
1010 1015 1020

Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser
1025 1030 1035 1040

Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu
1045 1050 1055

Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile
1060 1065 1070

Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser
1075 1080 1085
Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly

1090 1095 1100
Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile
1105 1110 1115 1120
Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
1125 1130 1135
Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly
1140 1145 1150
Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile
1155 1160 1165

Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala
1170 1175 1180
Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys
1185 1190 1195 1200
Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser
1205 1210 1215
Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr
1220 1225 1230
Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser

1235 1240 1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His
1250 1255 1260
Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val
1265 1270 1275 1280
Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys
1285 1290 1295
His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu
1300 1305 1310

Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp

1315 1320 1325

Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp

1330 1335 1340

Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile

1345 1350 1355 1360

Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp

1365

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> guide RNA

<400> 4

cagagatgat gaccacaatg 20