

마약성과 비마약성 대마 품종의 식별을 위한 카나비놀 생합성 유전자 분석법

박현승^{1#} · 오혜현^{2#} · 김성민^{2#} · 박지영¹ · 김진태¹ · 심현아¹ · 양태진^{1*}

¹서울대학교 농업생명과학대학 농림생물자원학부, 식물유전체육종연구소

²대검찰청 과학수사부 디엔에이·화학분석과

Cannabinol Synthase Gene Based Molecular Markers for Identification of Drug and Fiber Type *Cannabis sativa*

Hyun-Seung Park^{1#}, Hye Hyun Oh^{2#}, Sungmin Kim^{2#}, Jee Young Park¹, Jintae Kim¹, Hyeonah Shim¹, and Tae-Jin Yang^{1*}

¹Department of Agriculture, Forestry and Bioresources, Plant Genomics & Breeding Institute, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Korea

²Forensic Genetics & Chemistry Division, Supreme Prosecutors' Office, Seoul 06590, Korea

Abstract – *Cannabis sativa* is an important industrial plant utilized to produce fiber, oil, and medicinal ingredients. A chemotype of cannabis is divided into “Drug type” with predominance of tetrahydrocannabinolic acid (THCA) and “Fiber type” with cannabidiolic acid (CBDA). To develop molecular markers for the discrimination of these two types, nucleotide sequences of THCA synthase and CBDA synthase as well as their pseudogenes were retrieved from the recently published cannabis genome in chromosome scale. Gene-specific SNPs were discovered by multiple alignment of these sequences, and 2 dominant marker sets from each gene were designed for selective amplification. Our markers successfully identified “Drug type” and “Fiber type” cannabis plants as well as forensic samples including processed materials. Our molecular markers will provide a fast and efficient system for molecular-based identification of the cannabis plant.

Keywords – *Cannabis sativa*, THCAS, CBDAS, Molecular marker

삼과에 속하는 일년생 식물인 대마(*Cannabis sativa*)는 섬유원료 및 유료(oil crops) 작물로 전세계에서 널리 재배되고 있다.¹⁾ 또한 항정신성 효과를 나타내는 이차 대사산물을 생산하기 때문에 전통적으로 의약품이나 종교적인 목적으로 이용되어 왔으며,²⁾ 국내에서는 대표적인 마약류 식물 중 하나로 분류되어 관리되고 있다.

대마는 다양한 이차대사산물을 만들어 내는데 특히, 대마 특이 테르펜 계열의 대사산물의 총칭인 cannabinoids에는 약 113종 이상의 다양한 물질이 포함되어 있다.³⁾ 대표적인 cannabinoids에는 Δ9-tetrahydrocannabinolic acid(THCA)와 cannabidiolic acid(CBDA)가 있으며 이들은 열에 의해 활성 형태인 tetrahydrocannabinol(THC)와 cannabidiol(CBD)로

자연분해되는 특징을 가지고 있다. THC는 척추 동물의 중추신경계에 존재하는 카나비노이드 수용체 1(cannabinoid receptor type 1, CB1)과 결합하여 신경계를 활성화시키며, 대마로 인한 환각이나 망상은 THC 성분에 의해 유발된다고 알려져 있다.⁴⁾ THC를 이용한 대표적인 의약품 제품으로는 미 FDA의 승인을 받은 Dronabinol이 있으며, 항암제로 인한 메스꺼움이나 구토를 완화시키고 에이즈 환자의 식욕 증진을 위한 목적으로 처방되고 있다.⁵⁾ CBD는 THC와는 달리 CB1 수용체와 직접적으로 결합하지 않고 별도의 경로를 통해 작용하기 때문에, THC와는 달리 항정신성 효과를 유발하지 않으며 다량으로 섭취하더라도 안전하다는 장점이 있어 의약품으로 주목받고 있다.⁶⁾ CBD는 조현병과 알츠하이머병에 대한 효능이 보고된 바 있으며, CBD를 주성분으로 개발된 Epidiolex(GREENWICH, USA)는 소아 뇌전증 치료제로 미국 FDA 승인을 받아 판매되고 있다.^{7,8)}

[#]These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): tjyang@snu.ac.kr

(Tel): +82-2-880-4547

대마 내에서 THCA와 CBDA의 생합성 관련 효소들의 유전 양상은 많은 대마 연구자들로부터 논쟁의 대상이 되어 왔다. 다양하게 육성되어온 대마 품종들은 THCA와 CBDA의 상대적 함량에 따라 크게 세 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 THCA의 함량이 매우 높은 마약성 계열(마리화나, drug type), 두 번째는 CBDA의 함량이 매우 높은 비마약성(혹은 저마약성) 계열(삼, fiber type), 마지막으로 이 둘의 중간형 계열이다.^{9,10)}

THCA synthase(THCAS)의 염기서열과 CBDA synthase(CBDAS)의 염기서열이 각각 2004년과 2007년에 발표된 이후로,^{11,12)} 이들 두 유전자의 유전 양상을 해석하기 위하여 먼저 기본 멘델의 유전법칙 모델이 제시되었다.¹⁰⁾ 이 모델에 따르면 THCAS와 CBDAS가 동일한 유전자좌를 공유하고 있으며 이들은 공우성으로 유전될 것이라고 가정하였으며, 마약성 대마에서는 THCAS가 동형 접합으로 존재하는 반면 비마약성에서는 CBDAS 동형 접합으로 존재할 것이며, 두 개의 유전자형을 모두 가지고 있으면 중간형 계열이 될 것으로 예측하였다.¹⁰⁾

하지만, 2006년에 발표된 또 다른 연구에서는 13개의 마약성 및 비마약성 대마 수집개체들로부터 THCAS 유전자 서열을 PCR로 분석하였을 때 이들 간에 다수의 변이가 존재하는 것이 관찰되었다. 이를 바탕으로 멘델의 단일 유전자 법칙 모델이 아닌 유전자 연관 모델이 제시되었는데, 이는 THCAS와 CBDAS 합성과 관련된 유전자가 단일 유전자가 아니라 2개 이상의 유전자좌가 서로 연관되어 있을 것으로 가정하는 것으로 두 유전자의 발현 정도나 효소의 활성도 차이에 의해 THCA와 CBDA의 함량이 달라진다고 설명하고 있다.^{13,14)}

유전체 연구의 진보와 더불어, 2011년에 발표된 대마 전장 유전체 해독 논문에서는 대마의 이차대사산물 생합성에 관여하는 유전자 서열을 모두 해독함으로써 THCAS와 CBDAS의 유전 양상을 규명하려 했으나, 당시의 유전체 해독 기술로는 반복 서열이 많고 구조가 복잡한 대마 유전체를 염색체 수준까지 해독할 수 없어 이들 두 유전자의 모델에 관하여 명확한 결론을 내리기 힘들었다.^{14,15)}

최근 이를 보다 정확히 규명하기 위하여 2019년에 Pacbio사의 SMRT 기술을 이용하여 마약성 및 비마약성 대마 품종들의 유전체를 염색체 수준까지 거의 완벽하게 해독한 연구 결과가 발표되었다.¹⁶⁾ 마약성 및 비마약성 대마 품종 간의 유전체를 서로 비교하였을 때, THCAS와 CBDAS는 원시 유전자에서 분화된 이후 서로 다른 염색체에 배타적으로 존재하며, 마약성 대마는 완전한 THCAS와 위유전자(pseudogene) 형태의 CBDAS를 가지고 있는 반면, 비마약성 대마는 완전한 CBDAS와 위유전자 형태의 THCAS를 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 이들 두 유전자와 서열 상동성이 매우 높은 또 다른 생합성 유전자인 cannabichromenic

acid synthase(CBCAS)를 발굴하여 THCAS 및 CBDAS의 염기 서열 다양성과 관련된 의문을 해소할 수 있었다.

분자 마커를 이용하여 마약성 대마와 비마약성 대마를 구분하려는 연구는 포렌식 분야를 중심으로 활발히 수행되어 왔다. 일반적으로 식물의 종 판별을 위한 DNA barcoding에는 엽록체 유전체의 일부 서열이나 핵내 45S 리보솜 유전자 서열 변이가 주로 사용된다.¹⁷⁾ 이 지역들은 종내 다양성이 비교적 낮고 종간 다양성이 높기 때문에 비교적 안정적으로 종을 판별할 수 있다. 이러한 연구 내용을 바탕으로 대마의 전장 엽록체 서열이 2015년에 발표되었으며,^{18,19)} 엽록체 유전자 지역의 변이에 관한 몇몇 연구들도 수행되었다.^{20,21)} 그러나 마약성 대마와 비마약성 대마 모두 분류학상으로는 같은 종이고, *indica*와 *sativa*로 나뉘는 아종이 존재하지만 분류 기준이 모호하다는 연구결과가 있어 일반적인 엽록체 DNA barcoding 구간의 서열상 차이만으로 마약성 및 비마약성을 식별하는 데에는 한계점이 존재한다.²²⁾

이러한 이유로 엽록체 유전체가 아니라 핵 유전체에서 마약성 성분의 생합성에 관여하는 THCAS와 CBDAS를 대상으로 해당 유전자의 서열 변이를 찾고 이를 기반으로 분자 마커를 개발하기 위한 연구들이 꾸준히 수행되어 왔다.^{13,23-25)} 그러나 당시에는 앞서 언급했던 것과 같이 THCAS 및 CBDAS의 유전 양식에 대해 이해가 부족했을 뿐 아니라, 대마 유전체 내에 존재하는 위유전자 형태의 THCAS 및 CBDAS, 그리고 CBCAS 등으로 인하여 마커 검정 결과를 해석하기 어렵다는 문제점 역시 여전히 남아있다.^{15,26)}

본 연구는 기존에 개발되었던 대마 식별 마커들의 한계점을 극복하기 위하여 엽록체 수준으로 해독된 마약성, 비마약성 대마의 전장 유전체 서열을 기반으로 마약성 성분 생합성에 관여하는 주요 유전자들의 염기서열을 비교 분석하고, 마약성 대마와 비마약성 대마를 구분할 수 있는 분자 마커를 개발하여 이를 다양한 시료에 적용하고 검증함으로써 신속하고 정확한 마약성 대마 검사 체계를 확립하는 것을 목표로 수행되었다.

재료 및 방법

대마 식물 시료들의 DNA 추출과 THC 검출 - 마약성 및 비마약성 대마의 유전자 분석을 위해 검증 시료는 대검찰청과의 철저한 협조에 의해 이루어졌다. 마약성 대마 식물 시료와 개발된 분자 마커 검정에 사용된 5점의 대마 관련 시료(대마 초콜릿, 대마 쿠키, 대마 중자 2점, 대마 잎 감정물)는 대검찰청 디엔에이·화학분석과에서 범생물 DNA 감정을 위하여 추출한 DNA 감정물의 잔여 DNA 중 일부를 제공받았으며, 비마약성 대마는 국내에서 섬유용으로 재배하기 위해 *Cannabis sativa* 품종을 개량한 청삼 품종을 사용하였다. 액체 질소로 냉동된 시료를 막자와 막자 사발로 균

질화시키고, Qiagen Dneasy Mini kit와 제조사에서 제공하는 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 분광광도계(Nanodrop)를 이용하여 OD260에서 농도를 측정하였다. 대마 관련 시료5개에 대한 THC 검출은 대검찰청 법화학감정실의 도움을 받아 수행되었으며, 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE)과 가스크로마토그래피/질량분석법(GC/MS)을 이용하였다.²⁷⁾

대마 Cannabinoid 생합성 유전자 및 위유전자(Pseudogene) 서열 발굴 - 마약성 대마(Purple Kush 품종, PK) 및 비 마약성 대마(Finola 품종, FN) 유전체는 NCBI에 등록되어 있는 서열을 이용하였으며(Bioproject: PRJNA73819), 대마 유전체 논문¹⁶⁾에 기재되어 있는 Scaffold 상에서의 위치 정보를 바탕으로 THCAS, CBDAS 및 CBCAS의 염기 서열을 추출하였다. 이후 이들 서열들을 Query로 사용하고, 마약성 및 비마약성 대마 전장 유전체를 대상으로 BLASTN 분석을 통해 유전체 내에 존재하는 위유전자들의 위치 정보를 파악하고 염기서열을 추출하였다.

THCAS 및 CBDAS 특이 SNP 발굴 및 유전자 기반 특이 마커 개발 - Cannabinoid 생합성 유전자 염기서열 3종과 BLASTN으로 발굴한 위유전자들의 염기서열들을 모두 모아 MAFFT²⁸⁾로 pairwise 정렬을 실시하고 변이지역을 발굴하였다. 먼저 THCAS 유전자에만 특이적으로 존재하며, CBDAS, CBCAS 및 다른 위유전자들과 구별될 수 있는 SNP들을 선별하여 THCAS 특이 SNP로 분류하였다. 마찬가지로 CBDAS 유전자에만 특이적으로 존재하며, THCAS, CBCAS 및 다른 위유전자들과 구별될 수 있는 SNP를 선별하여 CBDAS 특이 SNP로 분류하였다. 분류된 각 유전자 특이 SNP 중에서 두 SNP 사이의 거리가 150~400 bp 내외인 조합을 선정하고, 이들이 정방향과 역방향 primer의 3' 말단에 위치할 수 있도록 Primer-BLAST²⁹⁾를 이용하여 특이 primer를 디자인하였다(Table 1). PCR을 이용한 마약성 대마 및 비마약성 대마의 감별을 위하여 약 20ng의 genomic DNA와 각 10 pmole의 정방향 및 역방향 primer를 Inclone Taq DNA polymerase kit와 혼합하여 반응물의 총량이 25 ul가 되도록 제조하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성 시

킨 후 95°C(20초), 62°C(20초), 72°C(20초), 3단계를 총 35회 반복 수행하고 72°C에서 7분간 최종적으로 증폭시켰다. 증폭된 산물에 대해, 3% 농도의 agarose Gel에서 100V 전압으로 30분간 전기영동을 실시한 후 UV광 아래에서 각 산물의 크기를 확인하였다. 다만, Taq polymerase의 종류 및 제품에 따라 본 연구에서 제시된 PCR 결과와는 상이한 결과가 나올 수 있으므로, 이 경우 알려진 검체들을 이용하여 PCR 조건을 최적화할 것을 권장한다.

결 과

Cannabinoid 생합성 유전자 및 위유전자(pseudogene) 서열 발굴 - Laverty 등이 수행하였던 선행 연구 결과를 바탕으로 마약성 대마와 비마약성 대마의 전장 유전체 서열을 대상으로 BLASTN 분석을 수행하여 대마에서 마약성과 비마약성 대마에 각각 배타적으로 존재하는 THCAS 유전자와 CBDAS 유전자의 위유전자 서열을 발굴하였다(Fig. 1). 먼저 THCAS 유전자를 Query로 사용하여 마약성 대마 전장 유전체를 탐색하였을 때 염색체 2번, 3번, 6번, 7번에서 9개의 위유전자 서열이 발견되었다. 이 중 7번 염색체에 위치한 위유전자 서열 2개가 선행연구에서¹⁶⁾ 보고했던 것과 동일한 것으로 분석되었고, 나머지 2번, 3번, 6번에 위치한 서열들은 보고되지 않은 새로운 위유전자 서열로 판단된다. 2번과 7번 염색체에 존재하는 위유전자 서열을 제외한 5개 서열은 모두 길이가 1,000 bp 이상이었으며 THCAS 유전자와 비교하였을 때 78.3%~92.3%의 높은 상동성을 보여주었다. 마찬가지로 CBDAS 유전자를 Query로 사용하여 비마약성 대마 전장 유전체를 탐색하였을 때 3번과 6번 염색체에서 6개의 위유전자 서열이 발굴되었으며, 이 중 6번 염색체에 위치한 1개 서열이 기존에 Laverty 등이 보고했던 것과 동일한 것으로 분석되었고 나머지 5개 서열들은 보고되지 않은 새로운 위유전자 서열로 판단된다. 이들은 CBDAS와의 상동성이 74.6%~76.9% 정도였으며, 마약성 대마 전장 유전체에서 발굴된 위유전자보다는 다소 낮은 유사도 수치를 보여주었다.

Table I. Primer sequences for THCAS/CBDAS specific markers

Serial number	Primer name	Sequence (5' -> 3')
1	PK_AS_4_F	CAAATAACTCCCATATCCAAGCA
2	PK_AS_6_R	ATTGACTAAGTGTGCATCAATA
3	PK_AS_12_F	ACCCTTACGGTGGTATAATGGAG
4	PK_AS_13_R	GGGACACATAAGGAGTCGTA
5	FN_AS_4_F	TTGGGTTAATGAGAAAAATGAGAG
6	FN_AS_9_R	TGCTCCACCACCACGTAA
7	FN_AS_7_F	GCTATGGACCATTGATGAGAAGC
8	FN_AS_13_R	CAGCTCAATTGTCTGCAATCC

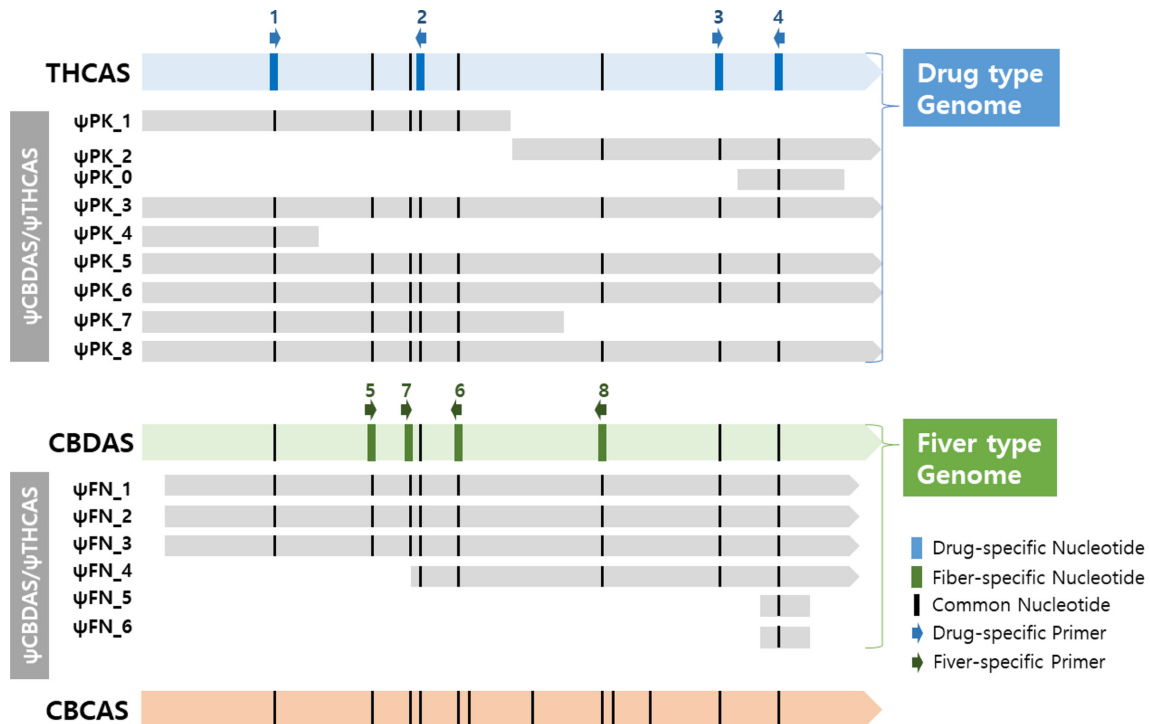


Fig. 1. A schematic diagram of the relative structure of THCAS, CBDAS, CBCAS genes and pseudogenes (ψ THCAS/ ψ CBDAS, Pseudogene) found in drug and non-drug *Cannabis sativa* and the location of THCAS/CBDAS specific SNPs. The pseudogenes discovered by BLASTN are indicated by gray bars, and those discovered in the drug type genome (ψ PK) are under the THCAS gene, and the above genes discovered in the non-drug type genome (ψ FN) are under the CBDAS. The nucleotide sequence variation of each gene is indicated by a vertical line. The primer positions were denoted by arrows and labeled with serial numbers in Table 1.

THCAS, CBDAS 특이 SNP 발굴 및 마커 개발 – Cannabinoid 생합성 유전자 3종과(THCAS, CBDAS, CBCAS) 앞서 발굴한 위유전자 서열들을 대상으로 MAFPT를 이용하여 다중염기서열에서의 변이 지역을 탐색하였다. 이들은 1.6 kb 정도 되는 THCAS 및 CBDAS 유전자 전반에 걸쳐 골고루 분포하고 있으며, 이 중 THCAS 유전자 특이 SNP 4개와 CBDAS 유전자 특이 SNP 4개를 발굴하여 분자 마커를 디자인 하였다(Fig. 1). 각 유전자 특이 SNP 중에서 유전자 증폭 산물의 크기가 400 bp 이하가 되도록 2쌍의 조합을 선정하였으며, 이들을 각각 정방향과 역방향 primer의 3' 말단에 위치시켜 대상 유전자만을 특이적으로 증폭될 수 있도록 allele-specific primer를 제작하였다. THCAS 특이 SNP 4개와 CBDAS 특이 SNP 4개를 각각 증폭하는 2쌍의 primer를 마약성 대마 및 비마약성 대마 품종 청삼 DNA에서 PCR 하였을 때 모두 기대했던 마커 증폭 양상을 보여주는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, 2B).

의료용 대마의 수요가 폭발적으로 증가하면서 최근에는 건조된 대마초 이외에 대마를 원료로 하는 가공된 형태의 마약류가 많이 적발되고 있다. 가공물 형태의 감정물은 원료의 특성상 DNA 추출 효율이 낮아 미량의 DNA를 활용하면서도 다양한 분석기법을 동시에 적용해야 하는 경우가

많다. 따라서 앞서 개발한 THCAS 특이 primer 2쌍과 CBDAS 특이 primer 2쌍을 대상으로 multiplex PCR의 구현 가능성을 테스트해 보았다(Fig. 2C). THCAS 특이 primer들을 이용하는 multiplex PCR(PK_AS_4F, PK_AS_6R, PK_AS_12F, PK_AS_13R)의 경우에는 앞서 확인한 증폭산물 외에도 PK_AS_4F primer와 PK_AS_13R primer의 조합으로 생성된 새로운 PCR 산물이 확인되었으며, 이들은 모두 대마 시료에서만 특이적으로 증폭되었다. 반면 CBDAS 특이 primer간의 multiplex PCR(FN_AS_4F, FN_AS_9R, FN_AS_7F, FN_AS_13R)의 경우에는 기존 primer 조합으로 증폭된 산물이 아닌 다른 조합에서 유래된 크기의 증폭 산물만이 관찰되었으나 여전히 비마약성 대마 품종 청삼에서만 특이적으로 반응하는 것을 알 수 있었다. 또한 THCAS 특이 primer 1쌍과 CBDAS 특이 primer 1쌍을 서로 섞어 multiplex PCR을 하였을 때에도(PK_AS_12F, PK_AS_13R, FN_AS_7F, FN_AS_13R), THCAS 특이 조합은 대마 시료에서만, 그리고 CBDAS 특이 조합은 비마약성 대마 품종 청삼 시료에서만 특이적으로 PCR 산물을 증폭하는 것을 확인할 수 있었다.

감정물 시료 적용 – 유전자 기반 마약성, 비마약성 감별 마커가 실제 범생물 감정에도 이용될 수 있을지 알아보기

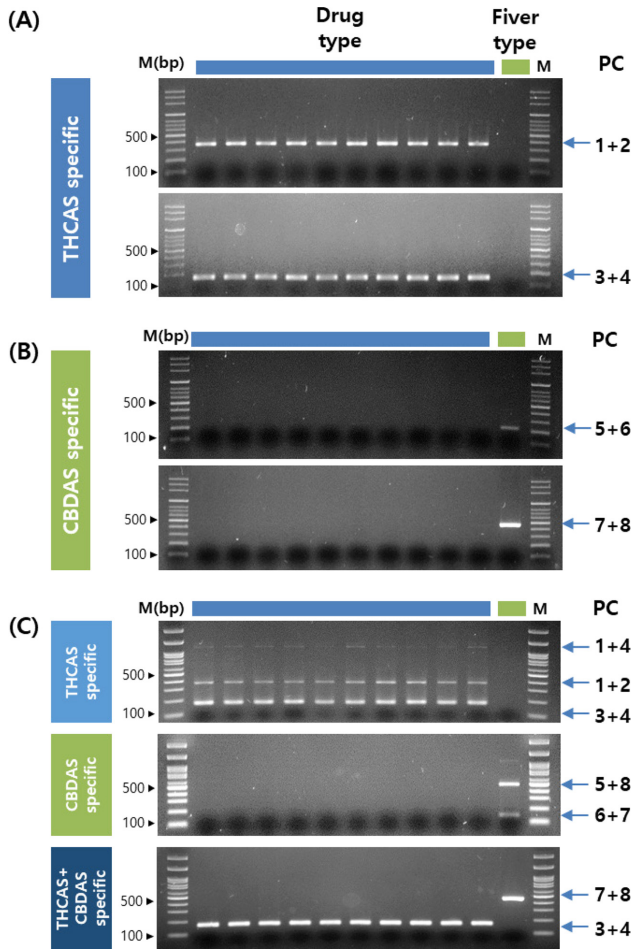


Fig. 2. PCR amplification of various samples using allele-specific molecular markers specific to THCAS and CBDAS. Ten cannabis samples of drug type and one sample of fiber type variety, “Cheongsam” were used. M, 100bp DNA size ladder; PC, primer combinations based on the serial numbers in Table 1. (A) PCR amplification using two THCAS specific markers. (B) PCR amplification using CBDAS specific markers. (C) PCR amplification using multiplex primer pairs. Top, combination of four THCAS specific primers created three bands. Middle, Four CBDAS specific primers created two bands. Bottom, two THCAS specific primers (PK_AS_12_F, PK_AS_13_R) and two CBDAS specific primers (FN_AS_7_F, FN_AS_13_R) created single band for drug and non-drug type, respectively. Primer pairs were denoted at right side of each gel panels.

위하여 4쌍의 마커를 대상으로 대검찰청에서 보관중인 DNA 시료들에 대한 식별 실험을 실시하였다(Fig. 3). 이들 시료는 표본으로 수집되어 있는 대마 초콜릿(추정) 1점, 대마 쿠키(추정) 1점, 대마 종자(추정) 2점, 대마 잎(추정) 1점이며, 대검찰청 법화학감정실의 이화학적 분석을 통한 사전 실험에서 대마 잎(추정) 감정물은 마약성 성분(THC)이 검출되었으나 대마 종자(추정) 2점, 대마 초콜릿(추정) 및 쿠키(추정)에서는 마약성분이 검출되지 않았다.

각 시료들에 대해 앞서 개발한 마커 조합을 적용하였을 대마 종자 2점의 경우, CBDAS 특이 Primer 2쌍에서만 특이적인 PCR 산물이 증폭되는 것으로 보아 비마약성(혹은 저마약성) 대마 시료로 추정할 수 있었다. 대마 잎 감정물의 경우 THCAS 특이 primer 2쌍에서만 특이적인 PCR 산물이 증폭되는 것으로 보아 마약성 대마 시료로 추정할 수 있었으며 이는 THC성분이 검출된 이화학적 분석과 일치하는 결과를 할 수 있다. 그러나 대마 초콜릿 1점과 대마 쿠키 1점의 경우 THCAS 특이 primer와 CBDAS 특이 primer 모두에서 PCR 산물이 증폭되어 마약성 성분이 검출되지 않은 이화학적 분석과는 다른 결과를 보여준다. DNA 검사 결과로 보았을 때, 이들 제품에는 마약성 원료와 비마약성 원료가 혼합되었거나 중간형 대마가 원료로 사용되었을 것으로 추측할 수 있다. 마약성 대마 씨앗의 표피에는 제거되지 못한 모체의 세포에서 기인한 THC 성분이 극미량 존재하지만,³⁰⁾ 껍질(포엽과 외종피)을 완전히 벗겨 가공할 경우 마약 성분이 없어 식품 원료로 사용이 가능하기 때문에 위와 같은 양상을 보이는 것으로 판단된다.

고찰

대마 전장 유전체 정보를 활용한 분자 마커 개발의 의의 - 대마의 주요 마약성 성분의 합성에 관여하는 THCA 생합성 유전자나 CBDA 생합성 유전자의 단백질 서열이나 염기 서열은 이미 2000년대 초반에 밝혀졌지만, 이들은 복잡한 유전 양상으로 인하여 분자 마커를 개발하기에는 여러 어려운 점이 많았다.^{15,22)} 그러나 2011년과 2019년 두 번에 걸쳐 수행된 전장 유전체 분석을 통해 대상 유전자들의 유전 양상과 위유전자들과의 진화적 관계가 밝혀지면서,^{14,16)} 두 유전자의 존재 유무를 바탕으로 대마의 마약성과 비마약성을 판별할 수 있게 되었다. 이는 전장 유전체 정보 해독과 식물 유전체의 특성에 대한 이해가 분자 마커의 정확도를 향상시킬 수 있음을 보여주는 사례라 할 수 있다.

목적 유전자의 복잡성과 검출의 정확도 - 따라서 본 연구는 이에 근거하여 CBCAS 서열 뿐 아니라, 마약성 및 비마약성 대마 유전체 전반에 걸쳐 THCAS와 CBDAS의 위유전자 서열을 수집하고 이를 동시에 비교함으로써 보다 정확도 높은 변이 지역을 탐색할 수 있었다. 실제로 THCAS와 CBDAS 염기서열을 이용한 BLASTN 결과는 기존에 보고한 위유전자¹⁶⁾보다 더 많은 유사 서열들이 존재함을 보여준다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서 발굴된 THCAS 및 CBDAS 변이 지역들은 이러한 위유전자들을 모두 고려하여 선정되었기 때문에 각 유전자를 매우 특이적으로 대표하는 염기 서열이라 할 수 있으며, 개발된 분자마커가 마약성 및 비마약성 시료를 선택적으로 잘 증폭하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 2).

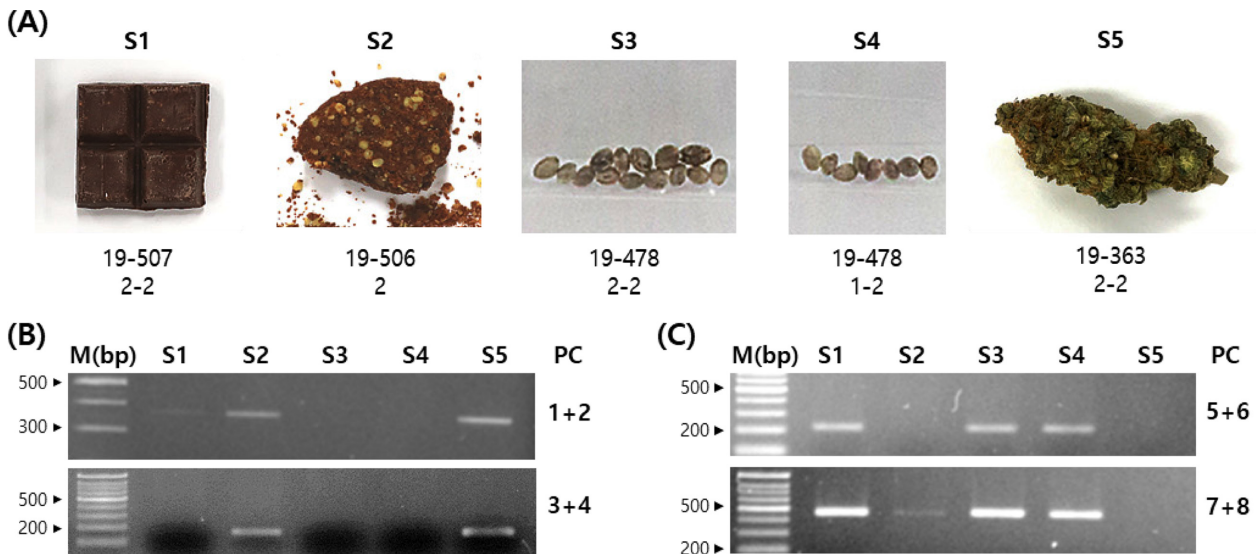


Fig. 3. Application of THCAS/CBDAS specific markers to various Cannabis samples. (A) Photo of samples (provided by Supreme Prosecutors' Office). S1, 19-507 2-2, cannabis chocolate; S2, 19-506 2, cannabis cookie; S3, 19-478 2-2, cannabis seeds; S4, 19-478 1-2, cannabis seeds; S5, 19-363 2-2, forensic sample of cannabis leaves. Only the sample S5 was positive for Δ^9 -THC by GC/MS analysis and the others were negative. (B) PCR amplification using THCAS-specific markers. M, 100bp DNA size ladder; PC, primer combinations based on the serial numbers in Table 1. (C) PCR amplification using CBDAS-specific markers. Sample 5 seems drug-type, samples 3 and 4 seems non-drug type, and samples 1 and 2 seems containing both types.

식물 시료의 판별을 위한 분자마커를 개발할 때, 마커의 민감도, 위음성 여부와 함께 위양성 결과가 나타날 수 있는지에 대해서도 반드시 고려해야 한다. 특히 마약류 관리에 관한 법률에서 대마는 *indica* type과 *sativa* type을 포함하는 칸나비스 사티바 엘(*Cannabis sativa* L.)로 정의하고 있으며, 종자, 뿌리, 성숙한 줄기를 제외한 잎과 그 수지(resin)를 규제 대상으로 하고 있다. 식품공전에는 껍질이 완전히 제거된 씨앗에 한하여 식품원료로 인정하고 있다. 최근 대마의 원형을 알 수 없도록 가공한 제품이나 미량의 마약성분이 남아있는 종자의 껍질을 탈각을 하지 않은 상태로 소지 할 경우 마약성분이 검출되거나 DNA검사로 대마 품종이 확인 되면 단속 대상이다. 하지만 의료용 대마 사용 합법화와 CBD의 효능에 기초하여 개발되는 다양한 건강기능성 제품 등이 각광을 받고 있기 때문에, 미량의 마약성분 검출이 어려운 불법 대마 가공품에 일부 적용하고 있던 기존 엽록체 DNA바코드 서열 기반 마약성/비마약성 대마 종 식별법 보다 마약성분 생성 유전자 존재 여부까지 세부적으로 식별할 수 있는 본 연구의 성과는 의미가 크다고 할 수 있다.

일반적인 종판별 마커의 경우 엽록체 유전체를 대상으로 개발되는 경우가 많으며,³¹⁻³⁵⁾ 엽록체 유전체의 종내변이나 미토콘드리아로 전이된 엽록체 유전체 조각이 증폭되면서 위양성 결과가 발생할 가능성이 보고된 바 있다.³⁶⁾ 그러나 본 연구의 경우 핵내 유전자를 대상으로 하였고, 완성도 높은 전장 유전체 서열 정보를 사용하였으며, 기존 논문¹⁶⁾에 보고

되지 않았던 유사 서열들까지 모두 탐색하여 위양성 결과가 발생할 가능성을 최대한 낮추고자 하였다. 물론, 전세계적으로 다양한 대마 품종들이 육종되고 있으며 품종에 따라 THCAS 및 CBDAS 유전자 서열에 변이가 발생할 수 있으므로 잠재적인 위양성 문제는 내재하고 있지만 현재 주로 재배되는 품종들에는 개발된 검사법이 잘 적용될 가능성이 높다. 더불어 현재까지 대마 관련 제품 및 감정물들은 해외에서 수입되는 비율이 점차 높아지는 추세에 있다. 특히, 탈각된 대마 종자나 뿌리 등 마약성분이 검출되지 않는 부위를 이용한 제품에서 기존 엽록체 분자마커는 종 식별에 목적을 두었다면 THCAS와 CBDAS 분자마커는 실제 THC의 이화학적 검출여부와 일치하는 결과를 보여주어 실무에서 결과해석에 혼란을 방지하고 정확한 정보를 제공하리라 기대된다. 다만, DNA에 담긴 유전정보는 식물 조직과 기관에 상관없이 기본적으로 동일하나, 실제 대사 산물은 조직과 기관에 따라 다르게 분포하기 때문에, 대마 초콜릿 및 쿠키와 같이 탈각된 종자를 이용한 제품에 마커 적용 결과에서처럼 유전자 검사결과와 이화학적 검사 결과가 달라질 가능성이 존재한다. 그러므로 본 연구에서와 같이 분자마커와 이화학적 분석의 특성을 충분히 이해하고, 이 둘을 병행하여 상호 보완하는 방향으로 적용해야 할 필요가 있으며, 알려진 표본샘플을 보다 많이 확보하여 충분한 검증을 거쳐 적합한 가이드라인을 확립하는 것이 필요하다.

결 론

본 연구에서는 카나비놀 생합성 관련 유전자를 대상으로 마약성 대마와 비마약성 대마를 식별할수 있는 분자마커를 개발하고자 하였다. 이를 위해 pseudomolecule 수준까지 완성된 대마 유전체 서열 Database에서 대마의 주요 카나비놀 생합성 유전자인 THCAS와 CBDAS의 생합성에 관여하는 유전자 서열과 관련 위유전자 서열을 모두 발굴하였고, 각 유전자들에만 특이적인 SNP들을 대상으로 분자 마커들을 디자인하였다. 마약성이 확인된 대마 검체 DNA들과 비마약성(혹은 저마약성) 품종 청삼의 DNA에 이들을 적용하였을 때, 마약성 시료에서는 THCAS 특이 밴드만이 증폭되었으며 비마약성 청삼 시료에서는 CBDAS 특이 밴드가 선택적으로 증폭되는 것을 확인하였다. 다만 THCAS, CBDAS 유전자 서열의 변이로 인한 잠재적인 위양성 발생 가능성 및 마약성분이 없는 부위를 이용한 제품에서의 마커 증폭 가능성을 배제할 수 없기 때문에, 이화학적 분석을 병행하고, 알려진 검체들을 이용하여 충분한 검증 과정을 거칠 필요가 있다.

사 사

본 연구는 대검찰청 연구 용역(과제명: 마약성 식물 종식별 유전자 마커 고도화 연구)의 지원으로 수행되었음.

인용문헌

- Russo, E. B., Jiang, H.-E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., Del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D. J., Zhao, Y.-X. and Bera, S. (2008) Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *Journal of Experimental Botany* **59**: 4171-4182.
- Skoglund, G., Nockert, M. and Holst, B. (2013) Viking and early Middle Ages northern Scandinavian textiles proven to be made with hemp. *Scientific Reports* **3**: 1-6.
- ElSohly, M. A., Mehmedic, Z., Foster, S., Gon, C., Chandra, S. and Church, J. C. (2016) Changes in cannabis potency over the last 2 decades (1995–2014): analysis of current data in the United States. *Biological Psychiatry* **79**: 613-619.
- Verhoecx, K. C., Korthout, H. A., van Meeteren-Kreikamp, A., Ehlert, K. A., Wang, M., van der Greef, J., Rodenburg, R. J. and Witkamp, R. F. (2006) Unheated *Cannabis sativa* extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. *International Immunopharmacology* **6**: 656-665.
- Beal, J. E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J. O., Bellman, P., Yangco, B., Lefkowitz, L., Plasse, T. F. and Shepard, K. V. (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *Journal of Pain and Symptom Management* **10**: 89-97.
- Bhattacharyya, S., Morrison, P. D., Fusar-Poli, P., Martin-Santos, R., Borgwardt, S., Winton-Brown, T., Nosarti, C., O'Carroll, C. M., Seal, M. and Allen, P. (2010) Opposite effects of Δ -9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology* **35**: 764-774.
- O'Connell, B. K., Gloss, D. and Devinsky, O. (2017) Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: a review. *Epilepsy & Behavior* **70**: 341-348.
- Sekar, K. and Pack, A. (2019) Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: a comprehensive review with a focus on adverse effects. *F1000Research* **8**.
- Baker, P., Gough, T. and Taylor, B. (1982) The physical and chemical features of Cannabis plants grown in the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland from seeds of known origin. *Bull. Narc.* **34**: 27-36.
- de Meijer, E. P., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V. C., Ranalli, P. and Mandolino, G. (2003) The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* **163**: 335-346.
- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y. and Taura, F. (2004) The gene controlling marijuana psychoactivity molecular cloning and heterologous expression of Δ 1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 39767-39774.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y. and Morimoto, S. (2007) Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters* **581**: 2929-2934.
- Kojoma, M., Seki, H., Yoshida, S. and Muranaka, T. (2006) DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L. *Forensic Science International* **159**: 132-140.
- Van Bakel, H., Stout, J. M., Cote, A. G., Tallon, C. M., Sharpe, A. G., Hughes, T. R. and Page, J. E. (2011) The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology* **12**: R102.
- Weiblen, G. D., Wenger, J. P., Craft, K. J., ElSohly, M. A., Mehmedic, Z., Treiber, E. L. and Marks, M. D. (2015) Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytologist* **208**: 1241-1250.
- Laverty, K. U., Stout, J. M., Sullivan, M. J., Shah, H., Gill, N., Holbrook, L., Deikus, G., Sebra, R., Hughes, T. R. and Page, J. E. (2019) A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Research* **29**: 146-156.
- Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M.,

- Chase, M. W., Cowan, R. S. and Erickson, D. L. (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 12794-12797.
18. Oh, H., Seo, B., Lee, S., Ahn, D.-H., Jo, E., Park, J.-K. and Min, G.-S. (2016) Two complete chloroplast genome sequences of *Cannabis sativa* varieties. *Mitochondrial DNA Part A* **27**: 2835-2837.
 19. Vergara, D., White, K. H., Keepers, K. G. and Kane, N. C. (2016) The complete chloroplast genomes of *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *Mitochondrial DNA Part A* **27**: 3793-3794.
 20. Linacre, A. and Thorpe, J. (1998) Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Science International* **91**: 71-76.
 21. Mello, I., Ribeiro, A., Dias, V., Silva, R., Sabino, B., Garrido, R., Seldin, L. and de Moura Neto, R. S. (2016) A segment of *rbcl* gene as a potential tool for forensic discrimination of *Cannabis sativa* seized at Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Legal Medicine* **130**: 353-356.
 22. Onofri, C. and Mandolino, G. (2017) Genomics and Molecular Markers in *Cannabis sativa* L. In Chandra, S., Lata, H., and ElSohly, M. A. (Eds.), *Cannabis sativa* L.-botany and biotechnology, 319-342, Springer, Switzerland
 23. Thichak, S., Natakankitkul, S., Chansakaow, S. and Chutipongvivate, S. (2011) Identification of drug-type and fiber-type of hemp (*Cannabis sativa* L.) by multiplex PCR. *Chiang Mai Journal of Science* **38**: 608-618.
 24. Staginuss, C., Zörntlein, S. and de Meijer, E. (2014) A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. *Journal of Forensic Sciences* **59**: 919-926.
 25. Ghosh, R., Nagavardhini, A., Sengupta, A. and Sharma, M. (2015) Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris-wilt* pathogen of chickpea. *BMC Research Notes* **8**: 40.
 26. Onofri, C., de Meijer, E. P. and Mandolino, G. (2015) Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry* **116**: 57-68.
 27. Ross, S. A., Mehmedic, Z., Murphy, T. P. and ElSohly, M. A. (2000). GC-MS analysis of the total δ^9 -thc content of both drug- and fiber-type cannabis seeds. *Journal of Analytical Toxicology* **24**: 715-717.
 28. Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K. D. (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* **20**: 1160-1166.
 29. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**: 134.
 30. Ross, S. A., Mehmedic, Z., Murphy, T. P. and ElSohly, M. A. (2000) GC-MS analysis of the total δ^9 -thc content of both drug- and fiber-type cannabis seeds. *Journal of Analytical Toxicology* **24**: 715-717.
 31. Kim, I., Park, J. Y., Lee, Y. S., Lee, H. O., Park, H.-S., Jayakodi, M., Waminal, N. E., Kang, J. H., Lee, T. J., Sung, S. H., Kim, K. Y., and Yang, T.-J. (2017) Discrimination and authentication of *Eclipta prostrata* and *E. alba* based on the complete chloroplast genomes. *Plant Breeding and Biotechnology* **5**: 334-343.
 32. Giang, V. N. L., Waminal, N. E., Park, H.-S., Kim, N.-H., Jang, W., Lee, J. and Yang, T.-J. (2020) Comprehensive comparative analysis of chloroplast genomes from seven *Panax* species and development of an authentication system based on species-unique single nucleotide polymorphism markers. *Journal of Ginseng Research* **44**: 135-144.
 33. Jung, J., Kim, K. H., Yang, K., Bang, K.-H. and Yang, T.-J. (2014) Practical application of DNA markers for high-throughput authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* from commercial ginseng products. *Journal of Ginseng Research* **38**: 123-129.
 34. Joh, H. J., Kim, N.-H., Jayakodi, M., Jang, W., Park, J. Y., Kim, Y. C., In, J.-G. and Yang, T.-J. (2017) Authentication of golden-berry *P. ginseng* cultivar 'Gumpoong' from a landrace 'Hwangsook' based on pooling method using chloroplast-derived markers. *Plant Breeding and Biotechnology* **5**: 16-24.
 35. Lee, J., Kang, S.-J., Shim, H., Lee, S.-C., Kim, N.-H., Jang, W., Park, J. Y., Kang, J. H., Lee, W. H., Lee, T. J., Nah, G. and Yang, T.-J. (2019) Characterization of chloroplast genomes, nuclear ribosomal DNAs, and polymorphic SSR Markers using whole genome sequences of two *Euonymus hamiltonianus* phenotypes. *Plant Breeding and Biotechnology* **7**: 50-61.
 36. Park, H.-S., Jayakodi, M., Lee, S. H., Jeon, J.-H., Lee, H.-O., Park, J. Y., Moon, B. C., Kim, C.-K., Wing, R. A., Newmaster, S. G. Kim, J. Y. and Yang, T.-J. (2020) Mitochondrial plastid DNA can cause DNA barcoding paradox in plants. *Scientific Reports* **10**: 1-12.
- (2021. 1. 19 접수; 2021. 3. 11 심사; 2021. 6. 3 게재확정)