

# Double-stranded RNA(dsRNA)를 이용한 해충방제의 현황과 미래

윤준선\* · 지창윤<sup>1</sup> · 성건목<sup>2</sup> · 최만연<sup>3</sup>

전북대학교 농축산식품융합학과, <sup>1</sup>제놀루션 R&D Center, <sup>2</sup>충남대학교 응용생물학과, <sup>3</sup>미농무부 농업연구청

## Current and Future of dsRNA-mediated Pest Management

June-sun Yoon\*, Chang Yoon Ji<sup>1</sup>, Keon Mook Seong<sup>2</sup> and Man-yeon Choi<sup>3</sup>

Department of Agricultural Convergence Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54596, Korea

<sup>1</sup>R&D Center, Genolution Inc., Seoul 07793, Korea

<sup>2</sup>Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 34134, Korea

<sup>3</sup>USDA-ARS Horticultural Crops Research Unit, Corvallis, Oregon 97330, USA

**ABSTRACT:** Over the past decade, double-stranded RNA (dsRNA)-mediated gene silencing technology has progressed significantly for pest management in agriculture and for protecting beneficial insects from pathogens. Recently, breakthroughs in RNA interference (RNAi) applications for insect pest management by academia and commercial entities have provided RNAi products as commercial biopesticides. Although RNAi technology has vast potential and advantages for pest control, challenges, and limitations remain in practical applications. This review explores current challenges in the development of dsRNAs as a pest management tool and considers new approaches to overcome biological and environmental obstacles, such as poor stability and resistance.

**Key words:** RNAi, dsRNA, Knockdown, Biopesticide, Pest management

**초 록:** 지난 10년 동안, 이중 가닥 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)를 이용한 특정 유전자 발현 간섭(RNA interference, RNAi) 기술은 의약품 개발뿐만 아니라 작물보호 분야에 해충방제부터 식충보호까지 다양하게 그 기술이 사용되어 왔다. 그동안 학계 및 산업체에서 활발히 연구되어 온 RNAi 기술을 이용한 작물 및 식충보호제는 상용화를 눈앞에 두고 있다. 미래 농업 시장에서 해충방제제와 식충보호제로써의 개발을 위한 RNAi의 기술적 응용은 상당한 잠재력을 가지고 있지만, 현장에 직접 사용되기에는 아직 여러 가지 한계점이나 극복해야 할 과제가 남아있다. 본 리뷰에서는 최근에 활발히 진행되고 있는 작물보호제 및 식충보호제(Protection of crops and beneficial insects)로써의 dsRNA의 다양한 활용과 그 잠재성(potential)을 소개하고자 한다.

**검색어:** RNAi, dsRNA, 녹다운, 생물농약, 해충방제

RNA 간섭현상(RNA interference, RNAi)은 1990년 초반 petunia 꽃을 보라색으로 만드는 과정에서 발견된 ‘전사 후 유전자 침묵(Post transcriptional gene silencing, PTGS)’ 현상으로, 1998년 앤드류 파이어(Andrew Fire)와 크레이그 멜로(Craig Mello)그룹이 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 ‘전사 후 유전자 침묵 현상’의 원리를 발견하였다. 이는 예쁜꼬마선충에서 근육 구조와 기능에 관여하는 unc-22 (twitchin kinase) 단백질을 녹다운(knockdown)하는데, 유전자 염기 서열

과 상동하는 단일 가닥 RNA (single-stranded RNA)가 아닌 이중 가닥 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)에 의하여 일어난다고 발표하였다(Fire et al., 1998). 그 이후 초파리를 비롯한, 식물, 균, 포유류에서도 이중 가닥 RNA (dsRNA)가 RNA 간섭을 유발한다는 것이 밝혀졌고, 더 많은 생물군에서 세부적인 작용기작이 발견되었다. 한 가지 중요한 사실은, dsRNA가 곤충과 포유류에서 RNA 간섭현상을 일으키지만, dsRNA의 길이에 따라서 작용기작의 차이가 존재한다. 곤충과 포유류는 세포 안에서 dsRNA를 받아들이는 면역체계가 다르기 때문에, 곤충은 long dsRNA (200~2,000 bp)가 RNA 간섭현상을 일으키지만, 포유류는 19-23 bp의 짧은 형태인 small interfering RNA (siRNA)

\*Corresponding author: [jsyoon@jbnu.ac.kr](mailto:jsyoon@jbnu.ac.kr)

Received January 28 2022; Revised February 17 2022

Accepted February 22 2022

가 RNA 간섭현상을 일으킨다고 밝혀졌다(Wang et al., 2016). RNAi 발견과 많은 작용기작 연구 이후 생물학과 의학 분야에서 다양한 기초/응용연구가 활발하게 진행되었으며, RNAi 발견의 공로가 인정되어 2006년 앤드류 파이어(Andrew Fire)와 크레이그 멜로(Craig Mello)는 노벨상을 수상하였다. RNAi의 다양한 기술적 활용은 유전자의 생물기능(Biological function)을 규명하는데 큰 역할을 하였지만, 그 이외에도 의료와 농업 분야도 많은 변화를 주고 있다(Chernikov et al., 2019; Kim et al., 2015; Zhu and Palli, 2020). RNAi의 종류 및 작용기작, 그리고 dsRNA 제조기술 관련해서는 2017년에 본지에 발표된 ‘dsRNA를 이용한 해충방제 기술’ 참조하길 바란다(Kim, 2017). 본 리뷰에서는 최근에 활발히 진행되고 있는 작물보호제 및 의충보호제(protection of crops and beneficial insects)로서의 dsRNA의 다양한 활용과 그 잠재성(potential)을 소개하고자 한다.

### RNAi 이해를 돕는 3가지 용어

RNAi는 위에서 언급한 바와 같이 dsRNA라는 ‘물질’에 의해 일어나는 ‘현상’이라고 볼 수 있다. 일반적으로 말하는 dsRNA는 보통 수백의 염기쌍(base pair, bp)으로 구성된 long dsRNA를 의미한다. 작용기작 연구에서도 밝혀졌듯이, long dsRNA는 인터페론을 통해 사람의 선천적 면역 선천적 면역반응(innate immune response)을 유발하기에 19-23bp의 짧은 dsRNA 형태인 siRNA가 사람에게는 RNAi를 일으키는 물질인 것이다(Wang et al., 2016). RNAi의 일반적인 결과로써 유전자의 발현량이 감소하는 gene knockdown ‘결과’를 발견할 수 있다. Gene knockdown은 RNAi현상의 결과(consequence)로써 mRNA의 발현량(mRNA expression level)이 줄어들면서 그에 상응하는 단

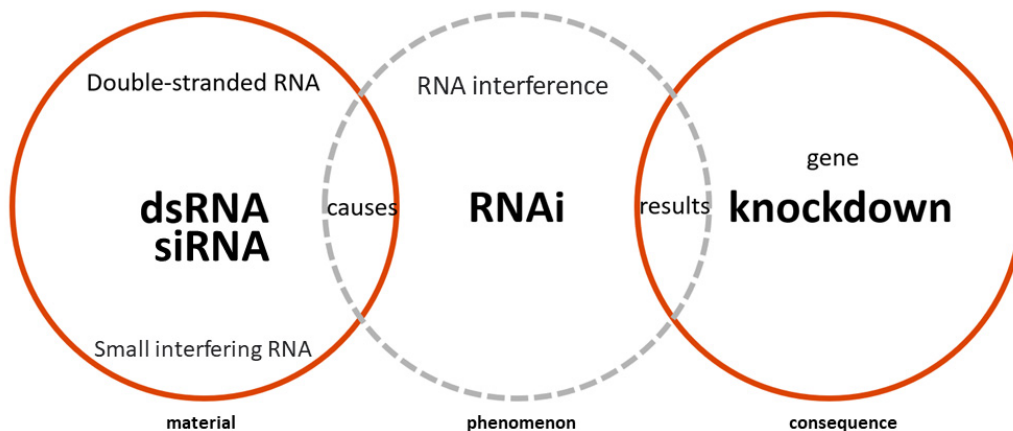
백질 생성이 줄어드는 현상이다(Fig. 1). 즉, DNA 상의 유전자가 단백질로 번역(translation)되는 과정에 있는 mRNA의 양이 줄어드는 현상이고, Gene knockout은 DNA상의 유전자에 상응하는 mRNA가 생성되지 않는 현상이다. Gene knockdown은 dsRNA나 siRNA가 얼마나 잘 세포 속으로 전달되어, 표적 mRNA를 효과적으로 제거 또는 제어하는가에 따라 knockdown의 효과가 다르게 나타날 수 있다.

## RNAi의 응용

### RNAi 신약개발

인간의 대표적인 유전적 질병으로는 특정 유전자가 체내에서 과잉 발현(overexpression)되거나 돌연변이(mutation)발현으로 유발된다. 사람에게 siRNA를 이용하여, 질병 유발 유전자를 갖고는 있지만, 해당 유전자의 발현량을 낮춤으로써, 유전자의 이상발현으로 유발되는 질병의 가능성을 줄일 수 있다. 이러한 siRNA를 이용한 신약 개발은 상당한 가능성을 보여주고 있다. 대표적인 예로, 2018년 8월 Alnylam (엘라일람/알나이람)사는 미국 식품의약청(FDA)으로부터 ‘온파트로(Onpattro, Patisiran)’를 hATTR 아밀로이드증(hereditary ATTR amyloidosis)의 첫 번째 RNAi 치료제로 승인받은 이후, 2018년 11월 ‘기블라리(Givlaari, Givosiran)’가 급성 간성 포르피린증(Acute Hepatic Porphyria)에 두 번째 RNAi 치료제로 승인받았다(Urits et al., 2020). 이외에도 Dicerna, Quark, Sylentis와 같은 회사도 siRNA를 이용한 다양한 질병치료제를 임상실험 중에 있다.

siRNA가 좀 더 다양한 질병 치료제로 개발되기 위해서는 몇 가지 극복해야 할 것들이 있는데(Hu et al., 2020), 대표적인 것



**Fig. 1.** Three important terminologies. In general, dsRNA refers to long double-stranded RNA (200-2,000 bp). Small interfering RNA (siRNA) is double-stranded RNA that is 19-23 bp long. dsRNAs/siRNAs induce RNA interference (phenomenon) leading to gene knockdown.

으로 siRNA 제약의 안정성(stability)과 대상 유전자 특이성(target specificity)이다. siRNA가 체내에 투입되었을 때, 대부분의 siRNA는 표적하는 세포에 도달되기 이전에 세포내의 핵산분해효소(nuclease)에 의해 분해(degradation)되거나, 신장을 통해 밖으로 배출된다. 생체 내로 들어간 siRNA가 목표로 하는 표적세포에 전달되어 그 효과를 보이기까지 일정량의 siRNA가 전달되어야 하지만, 그 과정에 dsRNA를 분해하는 효소인 nuclease의 작용으로 그 양이 줄게 되어 기대효과를 볼 수가 없게 된다. 이는 사람뿐만 아니라 곤충에서의 dsRNA 전달에서도 비슷한 문제점을 가지고 있다.

## RNAi 농약개발

지난 수십 년 동안 사용된 합성화학농약(synthetic chemical pesticides)은 효과가 빠르고 약효가 높으며 가격이 저렴하고 보관상 편리한 장점 때문에 유용하게 사용되어왔다. 그 작용기작은 곤충에게 존재하는 중추신경계를 자극하거나 억제하여 신경증상을 유발하기에 하나의 작용기작을 가지는 농약으로 많은 곤충을 제어할 수 있는 장점이 있지만, 방제대상이 아닌 생물체를 죽이는 경우가 있다(off-target effect). 또한, 인체에 독성, 잔류농약 문제, 광범위한 살충효과로 인한 천적 및 유용생물에 피해, 환경오염, 병해충의 농약저항성 등 다양한 문제들을 야기시켰다. 최근 몇 년간 미국을 비롯한 유럽연합(EU) 및 많은 선진국에서 이러한 화학농약의 사용을 줄이고, 인체 건강과 환경을 보호하는 지속 가능하고 안전한 농업 시스템을 구축하기 위한 노력을 하였다. 유럽연합은 생물다양성의 보존을 위해 2020년부터 10년계획인 ‘팜투포크(F2F, Farm to Fork) 전략을 발표하였는데, 이 보고서에서 2030년도까지 화학농약 사용을 현재의 절반으로 줄이는 계획을 제시하였다(<https://www.arc2020.eu>). 본 계획은 화학농약의 사용량을 줄이면서 농민의 소득을 보전할 수 있도록 다양한 방법을 단계적으로 실행하겠다는 국가들 간의 약속이다. 특히, 2021년에는 생물농약 등록 절차를 간소화할 수 있도록 관련 규정을 개정하고, 2022년에는 종합적 해충방제(integrated pest management, IPM)를 적극 장려하는 방향으로 농약사용 지침을 수정한다는 내용이였다. 종합적 해충방제는 화학농약의 사용을 최소화하면서 병해충을 완전히 박멸(eradication)하는 것이 아닌 경제적인 피해 수준(economical threshold) 이하로 유지해, 해충의 피해를 억제하면서, 생물의 다양성을 유지하고 유용 곤충과 천적을 보호하는 것을 목적으로 생물적 방제, 화학적 방제, 경종적 방제, 물리적 방제법을 적절히 조합하여 병해충의 밀도를 낮추는 것을 뜻한다. 제한되고 있는 화학적방제를 대체하는 다양한 방제 방

법 중 생물농약의 개발이 급속히 진행되고 있다. 생물농약은 미생물 또는 천연물 제품을 기반으로 한 농약의 한 형태이고, 생물농약의 종류로는 천연물질, 미생물농약, 천적류, 페로몬 그리고 유전자를 이용한 농약이 존재한다. 여기서, dsRNA를 이용한 농약은 gene (유전자)를 사용한다는 점에서 넓은 의미로 보면 생물농약으로 간주될 수 있다(Fletcher et al., 2020; Kim, 2017).

## RNAi 생물농약의 현실화

RNAi 기반으로 하는 해충방제 제품개발은 산업계에서 활발히 진행되고 있다. 2017년 몬산토(Monsanto, 2018년 이후 바이엘(Bayer)로 합병됨.)에서 최초의 유전자변형 해충방제 RNAi 제품을 개발하였고, 미국 환경청(EPA)로부터 처음으로 사용승인을 받았다(<https://www.theatlantic.com/science/archive/2017/06/monsanto-rna-interference/531288/>). 이후 바이엘사에서 SmartStaxPro 라는 이름으로 2022년 RNAi의 작용기작으로 옥수수를 가해하는 서부옥수수뿌리벌레(Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*)를 방제하기 위해 유전자변형 옥수수 종자(transgenic corn seed)를 판매할 예정이다(<https://traits.bayer.com/corn/Pages/SmartStax-PRO.aspx>). 이 제품은 2가지의 다른 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 박테리아를 이용한 유전자변형 옥수수 종자인 SmartStax 제품에 RNAi 기술까지 넣어 SmartStax Pro라는 제품을 출시하였는데, 이는 RNAi 작용기작을 통해 서부옥수수뿌리벌레를 방제 뿐만 아니라 Bt 저항성을 가진 해충집단의 저항성을 낮추는 상호보완적인 방제기작으로 종자와 농약산업에 많은 영향을 줄 것으로 예상된다. 이는 2007년 Baum 그룹에서 RNAi를 통한 딱정벌레목의 해충방제 가능성을 보여준 이후(Baum et al., 2007), 15년 만에 RNAi를 이용한 해충방제의 상용화가 이루어졌다. 이처럼 siRNA 또는 dsRNA는 질병치료제부터 작물보호제까지 다양한 부분에서 쓰임이 밝혀지고 있고, 그 활용성은 더 커질 것으로 예상된다.

최근, 유전자변형제품이 아닌 외생처리(exogenous application) 방법인 RNAi 기반 분무용 농약을 산업계에서 개발하고 있다. 최근 RNA 전문기업 그린라이트 바이오사이언스(GreenLight Biosciences)는 dsRNA의 대량생산 및 dsRNA를 이용한 다양한 해충방제 기술의 현실화에 매진하고 있다. 이 회사는 RNAi 감수성이 높은 콜로라도감자벌레(Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*) 퇴치를 위한 RNAi 기반 분무용 해충방제제를 개발 중이고, 꿀벌의 질병을 매개하는 꿀벌응애(Varroa mite, *Varroa destructor*)에 대해 dsRNA를 이용해 꿀

벌을 특이적 방제할 수 있는 지적재산권을 바이엘로부터 2021년에 넘겨받아 그 사업에도 착수하고 있다(Rodrigues et al., 2021) (<https://www.greenlightbiosciences.com>). 농약회사들 중에 신젠타(Syngenta)는 RNAi 감수성이 높은 콜로라도감자벌레 퇴치를 위한 RNAi 기반 분무용 해충방제제를 개발 중이고 (<https://www.syngenta.com/en/innovation-agriculture/research-and-development/rna-based-biocontrols>), 그리고 코르티바(Cortiva)는 RNAi 기반 서부옥수수뿌리벌레를 방제하기 위한 연구를 진행 중이다(Hu and Kassa, 2022).

RNAi 기반 회사인 RNAissance Ag는 해충의 중장(midgut) 내에 존재하는 미생물 유전체(Microbiome)에서 면역경로에 관련하는 유전자를 타겟으로 RNAi 농약을 개발하여 나비목(Lepidoptera) 해충을 방제하는 dsRNA를 생산할 예정이다 (<https://www.rnaissanceag.net/>). 산업체에서 dsRNA 물질을 해충방제를 위한 작물보호제로서 상용화하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 한다. dsRNA를 비롯한 RNA는 화학적으로 불안정하고 분해되기 쉬운 물질로서, 농업 현장에 뿌려 졌을 때 다양한 환경요인들로부터 그 형태를 유지하여 dsRNA가 곤충 세포 속까지 전달되어 제 역할을 수행하기 위해서는 일정량 이상의 세포 속까지 안정적으로 전달되는 기술이 뒷받침되어야 한다.

### 유용곤충보호제의 RNAi

위에 언급한 RNAi를 이용한 유용곤충보호제는 비로직스(Beelogics)가 2011년 이스라엘에서 ‘RNAi 현상을 이용해 꿀벌의 꿀벌애 감염을 막는 기술’을 개발하였고, 몬산토가 이 회사를 인수하여, dsRNA를 애벌레 먹이를 통해 전달하는 방법으로 꿀벌애를 방제하여 꿀벌을 보호하는 방법을 택했다. 이후 몬산토는 바이엘과 합병되면서 결국 바이엘이 비로직스의 기술을 보유하다가, 2021년 RNAi 전문기업 그린라이트바이오사이언스로 기술이전을 하였다(<https://www.greenlightbiosciences.com/>).

국내에서도 꿀벌을 보호 하기위해 RNAi를 이용한 유용곤충보호제를 개발하고 있다. 제놀루션(Genolution)이라는 국내 회사는 dsRNA 대량생산 기술을 앞세워, 토종벌(*Apis cerana*)의 흑사병이라 불리는 낭충봉아부패병을 억제할 수 있는 바이러스 억제제를 개발 중에 있다. 낭충봉아부패병은 꿀벌 유충에 발생하는 바이러스성 질병인데 이 바이러스를 표적으로 억제하는 dsRNA를 유효성분으로 품목허가를 위한 임상시험계획서가 2021년에 승인된 상태이다(<http://genolution.co.kr>). 수년 내 RNAi 기반의 토종벌 바이러스 방제제가 출시되어 토종벌 보호와 집단복원에 그 역할이 기대된다.

### RNAi 생물농약의 잠재적 문제와 해결방안

위에서 언급한 것과 같이 siRNA가 다양한 질병을 치료하기 위한 약으로 개발되기 위해서는 안정성(stability)과 대상유전자 특이성(target specificity)을 높여야 한다. 이와 마찬가지로, 작물보호제 및 유용곤충보호제로 dsRNA가 사용되어질 경우, 분무(spray) 형태로 작물에 뿌려진 dsRNA가 곤충의 세포 속까지 전달될 수 있는 안정성(stability)을 지녀야 한다. 제약으로써 siRNA가 일정량이 주사나 알약의 형태로 인체로 전달되는 되는 것이 아닌, 생물농약으로써 dsRNA가 야외에 노출되었을 때 자외선(UV)등 다양한 환경요소들의 영향을 받게 된다. 야외에서 dsRNA가 일정한 활성을 유지하는 안정성(stability), 또한 곤충의 입을 통하여 전달된 dsRNA가 중장에서 흡수되어 중장 혹은 몸전체에서 RNAi 작용기작이 일어날 때까지 dsRNA의 안정성 유지가 중요하다. dsRNA 전달에서도 곤충 종에 따른 dsRNA를 몸속에서 전달하는 부분에서 감수성(susceptibility)의 차이가 존재한다.

또한, dsRNA가 작물보호제 혹은 유용곤충보호제로서 사용될 때 생산단가를 줄이기 위한 대량생산은 실용화에 필수적인 요소이다. 그리고 dsRNA가 농작물이나 꿀벌보호에 제공되었을 때 다른 곤충들에게 피해를 주지 않는 비표적효과(non-target effect)를 고려하면서 RNAi 표적 유전자 선발과 dsRNA 제작에 신중을 기해야한다. 이후의 단락에서는 RNAi의 작물보호제 및 유용곤충보호제로서 잠재적 문제와 해결방안에 대하여 논하고자 한다.

### 곤충종에 따른 다양한 RNAi 효과

위에서 언급했듯이 사람을 비롯한 모든 곤충에서 RNAi 현상이 일어난다. 하지만, 모든 곤충이 같은 양의 dsRNA를 통해 RNAi가 일어나지는 않는다. 이는 곤충마다 서로 다른 생리적 요인들에 의해 다양한 RNAi 효과를 보인다. 다음의 두 가지 요인이 있다. 작물에 뿌려진 dsRNA는 곤충의 입을 통해 곤충의 체내로 들어갔을 때 영양소가 흡수되는 중장(midgut)으로 전달되어진다. 곤충의 중장에는 nucleases (dsRNA 분해하는 nuclease 이기에 dsRNase라고 칭한다)라는 효소가 일반적으로 존재하는데 이 효소는 RNA를 비롯한 각종 핵산(DNA와 RNA)을 분해하는데, 이러한 효소는 중장뿐 만 아니라 침, 혈액에도 존재한다. 모든 곤충에 dsRNase 유전자가 존재하며, 중요한 점은 곤충마다 dsRNase 유전자의 개수, 발현 정도와 활성 정도의 차이가 나타난다(Yoon et al., 2021) (Table 1). 이러한 요소 때문에 곤충 종 간의 다양한 RNAi 감수성을 가진다(Shukla et al., 2016;

**Table 1.** List of dsRNase genes reported from insects. The studies with crude extracts from gut or saliva are not included (modified from Yoon et al., 2021)

Order	Species	Gene name (used for this paper)	Gene name (from original reports)	GenBank accession
Diptera	<i>Drosophila suzukii</i>	Drosu dsRNase1	dsRNase1	MW984608
		Drosu dsRNase2	dsRNase2	MW984609
	<i>Bactrocera tryoni</i>	Bactr dsRNase1	dsRNase1	JHQJ01007430.1
		Bactr dsRNase2	dsRNase2	JHQJ01002120.1
	<i>Aedes aegypti</i>	Aedae dsRNase1	AAEL004103	XM_001648419.2
		Aedae dsRNase2	AAEL008858	XM_001653429.2
Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Lepde dsRNase1	Ld_dsRNase1	KX652406.1
		Lepde dsRNase2	Ld_dsRNase2	KX652407.1
	<i>Anthonomus grandis</i>	Antgr dsRNase1	AgraNuc1	MK493024.1
		Antgr dsRNase2	AgraNuc2	MK493025.1
		Antgr dsRNase3	AgraNuc3	MK493026.1
	<i>Cylas puncticollis</i>	Cylpu dsRNase1	Cp_dsRNase-1	MK510881.1
		Cylpu dsRNase3	Cp_dsRNase-3	MK510880.1
		Cylpu dsRNase4	Cp_dsRNase-4	MK510882.1
		Trica dsRNase1	TcdsRNase1	MN167472.1
	<i>Tribolium castaneum</i>	Trica dsRNase2	TcdsRNase2	MN167473.1
		Trica dsRNase3	TcdsRNase3	MN167474.1
		Trica dsRNase4	TcdsRNase4	MN167475.1
		Bommo dsRNase	Bm-dsRNase	NM_001098274.1
	Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	Spoli dsRNase1	dsRNase1
Spoli dsRNase2			dsRNase2	MK640213.1
Spoli dsRNase3			dsRNase3	MK640214.1
Spoli dsRNase4			dsRNase4	MK640215.1
Spoli dsRNase5			dsRNase5	MK640216.1
<i>Ostrinia furnacalis</i>		Ostfu dsRNase1	OfdsRNase1	XM_028302198.1
		Ostfu dsRNase2	OfdsRNase2	XP_028158051.1
		Ostfu dsRNase3	OfdsRNase3	XM_028306522.1
		Ostfu dsRNase4	OfdsRNase4	XM_028302954.1
<i>Ostrinia nubilalis</i>		Ostnu dsRNase1	OndsRNase1	MT524715.1
	Ostnu dsRNase2	OndsRNase2	MT524712.1	
	Ostnu dsRNase3	OndsRNase3	MT524713.1	
	Ostnu dsRNase4	OndsRNase4	MT524714.1	
Hemiptera	<i>Bemisia tabaci</i>	Bemta dsRNase1	dsRNase1	KX390872.1
		Bemta dsRNase2	dsRNase2	KX390873.1
	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Acypi dsRNase1	ds-nuc1	XM_003242604.4
Orthoptera	<i>Schistocerca gregaria</i>	Schgr dsRNase1	Sg_dsRNase1	KJ135008.1
		Schgr dsRNase2	Sg_dsRNase2	KJ135009.1
		Schgr dsRNase3	Sg_dsRNase3	KJ135010.1
		Schgr dsRNase4	Sg_dsRNase4	KJ135011.2
	<i>Locusta migratoria</i>	Locmi dsRNase1	LmdsRNase2	KY274845.1
		Locmi dsRNase2	LmdsRNase3	KY274844.1

Singh et al., 2017). 두 번째는 dsRNA가 세포 속에 들어가서 세포질내로 이동되는 과정에, 엔도솜(endosome)이라고 불리는 세포소기관에 dsRNA가 축적되므로 RNAi 효과가 줄어드는 현상을 나비목에서 발견하였다(Yoon et al., 2017). 그리하여 지금까지 dsRNA의 작물보호제로써의 개발 및 연구는 서부옥수수 뿌리벌레와 콜로라도감자벌레와 같은 RNAi 감수성이 높은 딱정벌레목(Coleoptera)의 곤충을 중심으로 개발되었다. 반대로, dsRNase가 많이 발현되어 RNAi 감수성이 낮다고 알려진 나비목(Lepidoptera)에서는 그 활용도가 다소 제한적이다(Shukla et al., 2016; Singh et al., 2017). 이처럼 ‘dsRNase의 발현량’과 ‘엔도솜 축적현상(endosome accumulation)’을 피하기 위해서 지질성 나노입자(LNP: Lipid Nano Particle)를 사용해서 dsRNA 분자를 감싸므로 dsRNA의 안정성을 높이고, 입자 표면의 극성을 조절하여 엔도솜에서 쉽게 세포질로 나갈 수 있게 도와주는 역할을 한다(Zhu and Palli, 2020). 이러한 다양한 연구를 통해 향후 다양한 나비목(Lepidoptera)의 해충도 RNAi를 이용한 방제 가능성이 기대된다.

### RNAi 비표적 효과(non-target effect)

long dsRNA는 Dicer2에 의해 19-21bp의 짧은 dsRNA 형태인 siRNA가 되는데 이 짧은 형태의 siRNA가 목표하는 곤충 이외의 다른 곤충의 mRNA와 상보적으로 결합하여 RNAi를 일으킬 수 있는 가능성이 존재한다. 물론 모든 siRNA가 mRNA에 상보적으로 결합하는 타겟 곤충에 비해 그 효과가 많이 미약할 수 있는 있으나 이론적으로는 가능하다. 우리는 이를 non-target effect라고 칭하며, 이 효과의 발생여부에 대한 우려가 있으나, 아직까지 그 비표적 효과가 발견되지는 않았다. 가장 대표적인 사례는 Bayer사의 SmartStax Pro 옥수수종자에 들어있는 dsRNA 서열(dvSNF7)을 이용한 실험이다. dvSNF7은 서부옥수수뿌리벌레의 학명 dv (*Diabrotica virgifera virgifera*)와 치사유전자 SNF7 (Vacuolar-sorting protein SNF7)을 합친 단어로 몬산토사가 Mon87411이라는 이름으로 종자를 개발하였고, 바이엘사와의 합병으로 SmartStax Pro라는 이름으로 최종 상용화되었다(Naegeli et al., 2018). 이미 Mon87411이 각종 시험검사를 통과하면서 non-target effect screening 실험을 *in silico*와 *in vivo*를 통해 진행하였다. *in silico* 실험은 기존에 밝혀진 곤충들의 유전체(genome) 및 전사체(transcriptome)에서 Mon87411에 쓰인 dvSNF7 염기서열이 siRNA가 되었을 시에, 목표로 하는 곤충 외의 곤충들의 유전체나 전사체에 상응하는 siRNA 부분이 존재하지 않는지 프로그래밍을 통해 확인하는 방법이다. 그 결과, Mon87411에 사용되는 dvSNF7가 많은

siRNA로 변형되었을 때에도 그 어떤 생물체의 mRNA와도 겹치지(overlap) 않는다는 생물정보학적 분석 결과를 제시하였고, 꿀벌을 비롯한 다양한 곤충에도 영향을 끼치지 않는다는 것으로 밝혀졌다(Bachman et al., 2016). 한 예로, 꿀벌의 유충과 성충에 지속적으로 높은 농도의 dvSNF7 dsRNA를 먹여본 결과 벌에 아무런 영향이 없다는 것으로 알려졌다(Tan et al., 2016). 이외에도 다른 곤충들과 동물 그리고 미생물에게도 dvSNF7를 처리하여 생태학적 환경영향 평가를 진행하였고, 실험에 사용된 수십 가지의 생물들에게 영향이나 부작용이 없음을 밝혀졌다. 국내의 경우에도 동일 시퀀스를 이용해, 2016년부터 국립생태원에서 ‘유전자기반 LMO의 안정성 평가기반 구축’이라는 주제로 국내 곤충에 대한 환경영향 평가를 진행하였다(Choi et al., 2016). 이와 같은 실증연구를 통해 직접 확인해 보는 경우 뿐만 아니라 다양한 곤충과 생물의 유전체연구가 활발히 진행되면서, target site의 염기서열을 다른 생물체에 비교할 수 있어 지면서 비표적 효과를 *in silico* analysis를 통해 미리 확인할 수 있다.

### RNAi 감수성과 저항성

RNAi 감수성에 대한 다음의 두 가지 연구결과가 보고되었다. 한 지역에서 채집한 완두수염진딧물(pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*)을 genotyping을 통해 유전적으로 다른 88개체를 실험실에서 각자 다른 케이지에서 따로 사육한 뒤, 같은 양의 치사유전자 dsAQPI (aquaporin1 dsRNA)을 각각 경구(ingestion) 처리한 결과, 0%에서 100%까지 치사율을 보였다(Yoon et al., 2020). 이 연구에서 GWAS (Genome-wide association study)를 통해 어떤 SNPs (single nucleotide polymorphisms)가 RNAi 감수성에 영향을 미치는지를 보여준다. 연구결과는 한 지역에서 채집한 진딧물일지라도 다양한 RNAi 감수성을 보여주고 있다. 또 다른 연구로는 유럽의 14 지역에서 채집한 콜로라도감자벌레가 다양한 RNAi 감수성을 가지고 있다는 것으로 알려졌다(Mehlhorn et al., 2020). 이처럼 한 지역에서 채집한 곤충 집단 뿐만 아니라 여러 지역에서 채집한 같은 종에서 다양한 RNAi 감수성이 확인되었다.

RNAi 저항성에 관련하여 다음의 연구에서 최초로 진행되었다. 첫 번째는 RNAi 곤충의 치사유전자로 알려진 V-ATPase subunit A 유전자를 표적으로 콜로라도감자벌레를 방제하기 위해 실험을 하였다. 표적 RNAi에 지속적인 노출에서 생존한 성충(chronic exposure adult surviving)을 수집하여 RNAi 감수성을 확인해 본 결과 감수성 집단에 비해 저항성이 11,100배가 넘는 저항성 저항성 계통이 확인되었다(Mishra et al., 2021). V-ATPase subunit

A 유전자 이외에 다른 유전자를 처리해도 비슷한 저항성을 보여주었다. RNAi 저항성을 일어나게 하는 한 원인으로, dsRNA가 세포로 원활하게 흡수(uptake)되지 않음으로써 저항성 발달이 일어난다는 사실이 밝혀졌다(Mishra et al., 2021). 두번째 RNAi 저항성 연구는 콜로라도감자벌레 셀라인(Lepd-SL1)에서 보고되었다. 이 실험에서는 inhibition of apoptosis1 유전자를 Knockdown 함으로써 세포사멸을 유발하였는데, 세포의 90% 이상 치사를 유도하는 해당 dsRNA를 지속적으로 처리함으로써 RNAi 저항성 세포주(cell line)을 얻을 수 있었다(Yoon et al., 2018). 저항성 세포와 감수성 세포의 RNA 유전체를 비교했을 때, 두 종류의 V-ATPase subunit과 StaufenC (Coleoptera-specific Staufen) 유전자가 저항성 세포에서 특이적으로 감소된 사실이 발견되었다(Yoon et al., 2018). 위의 두 가지 연구를 통해 RNAi의 저항성은 유전자 특이적인 저항성이 아닌 dsRNA의 전달(transport) 과정에서 저항성이 유발된다고 밝혀져 왔다. 보다 더 안전하고 다양한 방법으로 dsRNA를 사용하기 위해서는 저항성 연구를 비롯한 더 많은 작용작용기작 연구가 뒷받침되어야 한다.

## dsRNA 대량생산

대량생산(mass production)이라는 단위규모는 연구 목적의 실험실에서 요구되는 mg-g단위의 생산을 ‘대량생산’이기도 하며, 농경지 및 들판에서 적용 될 경우 Kg에서 Ton단위의 생산을 ‘대량생산’이라고도 할 수 있다. 본 주제에서는 연구 목적의 dsRNA를 대량생산하는 국내외 회사들과 대량생산 기술을 이용한 농업현장에서 실용적인 해충방제를 위한 dsRNA 대량생산 수준과 진행상황을 소개하고자 한다. 실험실 수준의 연구 목적으로 사용할 수 있는 정도의 dsRNA 대량생산하는 회사로 미국의 RNAgreentech이 대표적이며(<https://magreentech.com>), 그 밖에 많은 DNA/RNA 제작 회사를 통해 dsRNA 주문과 합성이 가능하다. 위에서 언급한 그린라이트바이오사이언스는 무세포 dsRNA 제조 플랫폼 특허를 갖고, 대량생산을 통한 분무(spray) 타입의 dsRNA 작물보호제를 상용화할 예정이다(<https://www.greenlightbiosciences.com/>). 국내의 경우 제놀루션이라는 회사가 dsRNA 대량생산/합성기술을 토대로 kg 단위까지 dsRNA 생산이 가능하며, 국내외 소비자들에게 제품을 공급하고 있다(<http://genolution.co.kr/>). 현장에서 dsRNA의 사용을 위하여 dsRNA의 대량생산이 중요한 과제이며, 이것은 RNAi를 이용한 해충방제 실용화를 위한 결정적 요구조건이 된다. 지난 10년동안 분자생물 기술의 발달로 인하여 많은 국내외 산업체에서 dsRNA 생산 단가를 낮추기 위한 연구가 다각적으로 이루어

져 왔다. dsRNA를 병원성 생물체에서 직접 생산하는 Bt나 마이리스 혹은 다른 미생물을 이용한 dsRNA 대량생산이 기대된다.

## RNAi 생물농약의 미래

위에 언급한 바와 같이, 서부옥수수뿌리벌레를 방제하기 위해 dsRNA가 발현되는 옥수수 씨앗이 2022년에 출시될 예정이다. 이 뿐만 아니라, 콜로라도감자벌레를 방제할 수 있는 뿌리는 형식의 dsRNA가 수년 내로 상용화될 예정이다. 또한, RNAi 기술을 이용해 꿀벌에 피해를 끼치는 꿀벌응애를 특이적으로 방제할 수 있는 dsRNA를 개발하거나, 토종벌의 낭충봉아부패병을 유발하는 Sacbrood virus를 억제하는 dsRNA를 개발하여 경제적/환경적으로 중요한 유용곤충을 보호하는데 RNAi 기술이 사용될 것이다. 이처럼 작물보호제 및 유용곤충보호제로써 RNAi 기술은 무한한 가능성과 잠재력을 지니고 있지만, 마지막 부분에 언급한 RNAi 농약에서 발생 될 수 있는 잠재적 저항성과 감수성에 대해서도 함께 고려해야 한다. 곤충에서 RNAi 감수성과 저항성 문제는 현재 제약개발에서 siRNA를 효과적으로 전달하기 위해서 사용되는 chitosan, liposomes, cationic polymers과 같은 나노캐리어(nanocarrier)로 dsRNA를 감싸는 기술(encapsulation)을 응용함으로써 장래 곤충에서 발생 가능한 문제들을 해결/개선할 수 있을 것으로 기대된다(Pugsley et al., 2021; Yan et al., 2021; Zhu and Palli, 2020). dsRNA가 야외에서 처리되었을 때 다양한 실외 환경으로부터 dsRNA 보호하는 안정성(stability)증가는 RNAi 농약의 잔류성(residue)과 상충적인 관계를 보여준다. 즉, 자외선, 비, 습도, 온도와 같이 실외환경 요인으로부터 dsRNA를 보호할 수 있는 기술 개발이 필요한데, 최근에 layered double hydroxide (LDH) clay nanosheets 사용하여 dsRNA의 안정성을 높여주면서, 환경친화적인 방법이 시도되고 있다(Mitter et al., 2017).

2022년에 dsRNA가 발현되는 옥수수 종자가 출시되지만, 우리가 일반적으로 쓰는 화학농약 같은 직접 뿌리는 분무 형태의 제제가 개발되어 시판되기까지는 수년이 더 걸릴 것으로 예상된다. 표적곤충의 유전자 특이적인 작용기작은 표적대상이 아닌 인축이나 곤충에 안전하다는 큰 장점을 가지고 있고, 이는 RNAi를 통한 해충방제가 새로운 방법의 IPM을 가능케 할 것이다. 효율적인 대량생산을 통한 경쟁력 있는 가격 그리고 dsRNA를 안정적으로 전달할 수 있는 방법이 개발된다면 RNAi 기술은 새로운 생물농약으로써 다양한 분야로의 상용화가 기대된다.



## 저자 직책 & 역할

윤준선: 전북대, 교수; 논문작성

지창윤: 제놀루션, 연구원; 논문작성

성건목: 충남대, 교수; 논문작성

최만연: 미농무부 농업연구청, 책임연구원; 논문작성

모든 저자는 원고를 읽고 투고에 동의하였음.

## Acknowledgements

This work was funded by a grant (PJ015763) from the Rural Development Administration of Korea.

## Literature Cited

- Bachman, P.M., Huizinga, K.M., Jensen, P.D., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J.P., Levine, S.L., 2016. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 81, 77-88. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.08.001
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25, 1322-1326. doi: 10.1038/nbt1359
- Chernikov, I.V., Vlassov, V.V., Chernolovskaya, E.L., 2019. Current development of siRNA bioconjugates: from research to the clinic. *Front. Pharmacol.* 10, 444. doi: 10.3389/fphar.2019.00444
- Choi, W.K., Lim, H.S., Lee, J.R., Song, H.-R., Kim, J.K., Shin, S.Y., Jung, Y.J., Seol, M.-A., Eum, S.-J., Kim, I.R., 2016. Establishment of environmental risk assessment standards in gene based LMOs. National Institution of Ecology. 2016 Report, pp. 76-84.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811. doi: 10.1038/35888
- Fletcher, S.J., Reeves, P.T., Hoang, B.T., Mitter, N., 2020. A perspective on RNAi-based biopesticides. *Front. Plant Sci.* 11, 51. doi: 10.3389/fpls.2020.00051
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., Liang, X.J., 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 101. doi: 10.1038/s41392-020-0207-x
- Hu, X., Kassa A., 2022. A Random-Screening Approach to Identify RNAi targets for the control of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte), in: Vaschetto, M.L. (Eds.), RNAi Strategies for pest management methods and protocols. *Methods Mol Biol. Springer Science, New York*, pp. 91-103. doi: 10.1007/978-1-0716-1633-8
- Kim, Y., 2017. Insect pest control technique using dsRNA. *Korean J. Appl. Entomol.* 56, 153-164. doi: 10.5656/ksae.2017.03.0.008
- Kim, Y.H., Soumaila Issa, M., Cooper, A.M., Zhu, K.Y., 2015. RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 109-117. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.01.002
- Mehlhorn, S.G., Geibel, S., Bucher, G., Nauen, R., 2020. Profiling of RNAi sensitivity after foliar dsRNA exposure in different European populations of Colorado potato beetle reveals a robust response with minor variability. *Pestic. Biochem. Physiol.* 166, 104569. doi: 10.1016/j.pestbp.2020.104569
- Mishra, S., Dee, J., Moar, W., Dufner-Beattie, J., Baum, J., Dias, N.P., Alyokhin, A., Buzza, A., Rondon, S.I., Clough, M., Menasha, S., Groves, R., Clements, J., Ostlie, K., Felton, G., Waters, T., Snyder, W.E., Jurat-Fuentes, J.L., 2021. Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery. *Sci. Rep.* 11, 6523. doi: 10.1038/s41598-021-85876-1.
- Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., Fletcher, S.J., Carroll, B.J., Lu, G.Q., Xu, Z.P., 2017. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat. Plants* 3, 16207. doi: 10.1038/nplants.2016.207
- Naegeli, H., Birch, A.N., Casacuberta, J., De Schrijver, A., Gralak, M.A., Guerche, P., Jones, H., Manachini, B., Messean, A., Nielsen, E.E., Nogue, F., Robaglia, C., Rostoks, N., Sweet, J., Tebbe, C., Visioli, F., Wal, J.M., Ardizzone, M., De Sanctis, G., Fernandez Dumont, A., Gennaro, A., Gomez Ruiz, J.A., Lanzoni, A., Neri, F.M., Papadopoulou, N., Paraskevopoulos, K., Ramon, M., 2018. Assessment of genetically modified maize MON 87411 for food and feed uses, import and processing, under Regulation (EC) No 1829/2003 (application EFSA-GMO-NL-2015-124). *EFSA J.* 16: e05310. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5310
- Pugsley, C.E., Isaac, R.E., Warren, N.J. and Cayre, O.J., 2021. Recent advances in engineered nanoparticles for RNAi-mediated crop protection against insect pests. *Front. Agron.* 3. doi: 10.3389/fagro.2021.652981
- Rodrigues, T.B., Mishra, S.K., Sridharan, K., Barnes, E.R., Alyokhin, A., Tuttle, R., Kokulapalan, W., Garby, D., Skizim, N.J., Tang, Y.W., Manley, B., Aulisa, L., Flannagan, R.D., Cobb, C., Narva, K.E., 2021. First Sprayable double-stranded rNA-based biopesticide product targets proteasome subunit beta type-5 in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Front. Plant Sci.* 12: 728652. doi: 10.3389/fpls.2021.728652
- Shukla, J.N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K.E., Fishilevich, E., Singh, S., Mogilicherla, K., Palli, S.R., 2016. Reduced stability



- and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biol.* 13, 656-669. doi: 10.1080/15476286.2016.1191728
- Singh, I.K., Singh, S., Mogilicherla, K., Shukla, J.N., Palli, S.R., 2017. Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Sci. Rep.* 7, 17059. doi: 10.1038/s41598-017-17134-2
- Tan, J., Levine, S.L., Bachman, P.M., Jensen, P.D., Mueller, G.M., Uffman, J.P., Meng, C., Song, Z., Richards, K.B., Beevers, M.H., 2016. No impact of DvSnf7 RNA on honey bee (*Apis mellifera* L.) adults and larvae in dietary feeding tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 287-294. doi: 10.1002/etc.3075
- Urits, I., Swanson, D., Swett, M.C., Patel, A., Berardino, K., Amgalan, A., Berger, A.A., Kassem, H., Kaye, A.D., Viswanath, O., 2020. A review of Patisiran (ONPATPRO(R)) for the treatment of polyneuropathy in people with hereditary transthyretin amyloidosis. *Neurol. Ther.* 9, 301-315. doi: 10.1007/s40120-020-00208-1
- Wang, W., Wang, W.H., Azadzo, K.M., Su, N., Dai, P., Sun, J., Wang, Q., Liang, P., Zhang, W., Lei, X., Yan, Z., Yang, J.H., 2016. Activation of innate antiviral immune response via double-stranded RNA-dependent RLR receptor-mediated necroptosis. *Sci. Rep.* 6, 22550. doi: 10.1038/srep22550
- Yan, S., Ren, B.Y., Shen, J., 2021. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: a promising approach for sustainable pest management. *Insect Sci.* 28, 21-34. doi: 10.1111/1744-7917.12822
- Yoon, J.S., Ahn, S.J., Flinn, C.M., Choi, M.Y., 2021. Identification and functional analysis of dsRNases in spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 107, e21822. doi: 10.1002/arch.21822
- Yoon, J.S., Gurusamy, D., Palli, S.R., 2017. Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 90, 53-60. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.09.011
- Yoon, J.S., Mogilicherla, K., Gurusamy, D., Chen, X., Scrr Chereddy, Palli, S.R., 2018. Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 8334-8339. doi: 10.1073/pnas.1809381115
- Yoon, J.S., Tian, H.G., McMullen, J.G., Chung, S.H., Douglas, A.E., 2020. Candidate genetic determinants of intraspecific variation in pea aphid susceptibility to RNA interference. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 123, 103408. doi: 10.1016/j.ibmb.2020.103408
- Zhu, K.Y., Palli, S.R., 2020. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annu. Rev. Entomol.* 65, 293-311. doi: 10.1146/annurev-ento-011019-025224