

116141-1

단일염기서열 선별 세트 활용을 통한
콩 조속종 품종개발 마커 발굴

2017
농림수산식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개()
농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002234-01

단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조속종 품종개발 마커 발굴

최종보고서

2018. 4. 5.

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

농림축산식품부
농림수산식품기술기획평가원

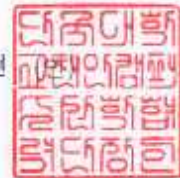
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

'단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴'
(연구개발 기간 : 2016. 12. 5. ~ 2017. 12. 4.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2018. 3. 23.

주관연구기관명 : 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (대표자) • 김철현



주관연구기관책임자: 강성택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에
동의합니다.

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조속종 품종개발 마커 발굴’
(연구개발기간 : 2016. 12. 05 ~ 2017. 12. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 3. 23.

주관연구기관명 : 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (대표자) 김철현 (인)

주관연구책임자 : 강성택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에
동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116141-01	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.12.05.- 2017.12.04.	단 계 구 분	(해당단계)/ 1 (총 단 계) 1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발			
연구책임자	해당단계 참 여 연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 50,000천원 민간: 16,670천원 계: 66,670천원	
	총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 16,670천원 계: 66,670천원	
연구기관명 및 소속부서명	단국대학교 산학협력단			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
				보고서 면수 : 38	

〈요약문〉

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제한된 면적에서 국내 콩의 자급률을 높이기 위해 이모작체계에 적용 가능한 조숙·단기성 콩 품종 개발은 매우 필요하며 본 연구에서는 국내에서 적용가능한 조숙종 선발 SNP를 개발하여 콩 분자유종체계에 활용토록 하는 것이다. ○ 콩 분자유종을 통한 단기조숙형 품종개발에 활용할 수 있는 개화기 및 성숙기와 연관된 단일염기다형성(SNP) 마커개발을 위해 기존 연구를 통해 확인한 조숙성에 가장 영향을 미치는 <i>GIGANTEA</i> 유전자에서 단일염기서열 변이를 탐색한다. ○ 개발된 개화기 연관 SNP 및 탈립성 연관 SNP 등을 확보하여 검정용 probe를 제작하고 이들 SNP의 분자유종시스템에서 활용가능성을 검정함으로써 적용가능성을 탐색한다 ○ 국내 기업에 의해 개발된 기술을 활용하여 SNP probe를 제작하고 관련기술의 국산화 및 산업화 가능성을 탐색한다 ○ 궁극적으로 본 연구에서는 품종개발에 활용될 수 있는 SNP set을 개발하여 분자유종 기술 발전을 통한 우수 품종을 개발함으로써 국내의 식량 자급률증진과 품질향상 및 세계 식량문제 해결 등에 이바지하고자한다. 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 조숙종 콩 품종개발에 필요한 유전자 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 대표적인 조숙종 품종에서 개화기와 연계된 유전자는 Glyma.10g221500인 <i>GIGANTEA</i> gene 즉 콩에서 E2 gene을 확인함 ○ 콩 Genome 상에 목표유전자 부위를 sequencing 하여 연관 SNP 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 염기서열의 변이를 통해 2번, 6번, 10번 exon에서 아미노산의 변화 확인 및 2번 exon에서 premature stop codon을 형성 ○ 후보유전자 sequencing을 통한 SNP 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - premature stop codon이 형성된 유전자는 우리나라 남부지역에 주로 위치하였음 ○ SNP 검정을 위한 Probe 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 조숙콩 품종개발에 필요한 성숙기, 탈립성연관 SNP Probe 제작 ○ 개발된 SNP probe의 분자유종 적용가능성 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 탈립성연관 마커는 저항성 품종선발에 활용이 가능하나 개화기 연관 마커는 추가연구 필요 ○ 국내 SNP 분석용 형광 probe 제작기술의 산업화 가능성 점검 <ul style="list-style-type: none"> - 국내기술로 제작된 SNP probe와 국외기술로 제작된 SNP probe를 활용하여 분리세대를 Genotyping한 결과에서는 큰 차이를 보이지 않았음 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 단일염기서열 set 제작을 통한 새로운 분자유종 관련 연구방법 제시 ○ 동·식물 관련 기업 및 육종회사에 단일염기서열 정보 활용한 선발방법 제시 ○ 아시아시장 개척을 위하여 국제학회 참석을 통해 고객 및 바이어 확보 ○ 신품종 개발시 분자마커 활용과 종자생산 후 순도검정 목적 등으로 활용 ○ 농·생명 분야 분자마커후보를 이미 개발한 연구그룹 뿐만 아니라 시험연구소, 종자회사를 통한 사업화 가능 				
중심어 (5개 이내)	단일염기서열변이	유전자	품종개발	분자유종	

〈SUMMARY〉

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ To increase the self-sufficiency rate of soybean in a limited area of farmland, the development of early maturity soybean varieties for adapting double cropping system is necessary. ○ The purpose of this study is to develop a set of SNP, which can be used for development of early maturity variety with molecular marker breeding system. ○ Ultimately, this research focuses on developing a set of SNP for increasing the selection efficiency to target traits in the field of crops breeding. It will improve the production of soybean in Korea through development of molecular breeding technology, also contribute to enhance domestic food self-sufficiency. ○ Developing SNP Set related to select the early maturity soybean <ul style="list-style-type: none"> - To develop the SNPs, which are linked to early maturity and shattering trait, for breeding of early maturity cultivar in soybean, previously reported SNPs in soybean gene will be investigated - Sequencing of Early maturity <i>GIGANTEA</i> gene resource collected from Korea will be conducted, and identified SNPs will be applied to molecular marker for selection. 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ The candidate genes in early maturity soybean breeding system were identified in the previously reported E2 locus, <i>GIGANTEA</i> homologous, in soybean ○ The valuable SNPs, which can be used for development of early maturity soybean variety adapted in Korea cultivation condition, were detected in 2th, 6th, 10th exon region by the sequence variation in <i>GIGANTEA</i> ○ Major SNPs being the stop codon in exon region were mainly distributed at the southern area such as Kyongsang-do and Jeolla-do. ○ The useful SNPs related flowering and shattering were selected and the probe were designed for SNPs validation by domestic technology ○ SNPs related shattering were well matched between phenotype and genotype results. But SNPs for flowering were not fitted each results ○ When Compared between domestic and common probe design technology, the domestic probes were showed similar result. So this technology can be used for commercialization with minor complement. 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Increase of Farmland Utilization through the species development of early maturity and short-term soybean applicable to Double cropping system. ○ To suggest a new research method related to molecular breeding by developing SNP sets. ○ To suggest a new selection tool for animal or plant related companies or breeding company by utilizing SNP information ○ To secure the buyers through joining the international conference about animal or plant related companies. ○ To apply the proposed reagents for molecular breeding or purity check after seed production ○ Commercialization not only to research group which already develop the molecular markers in agricultural life but also research institute or breeding companies 				
Keywords	SNP	Gene	Development of variety	Molecular Breeding	

CONTENTS

Chapter 1 Outline of research project	7
Section 1. Research purpose	7
Section 2. Research necessity	7
Section 2. Research scope	7
Chapter 2 Current status of domestic and foreign Technology	8
Section 1. Domestic and foreign research and market status.....	8
Chapter 3 Contents of research and results	10
Section 1. Theoretical and experimental approach.....	10
Section 2. Research & development propulsion.....	10
Section 3. Research & development schedule.....	11
Section 4. Research & development results.....	11
Section 5. Research & development performance.....	20
Section 6. Research results.....	20
Chapter 4 Achievement and Contribution to Related Industries	23
Chapter 5 Application of the results	24
Chapter 6 Research information collected during research progressing ..	26
Chapter 7. Security grade of research & development performance	26
Chapter 8. Registered research facility and equipment	26
Chapter 9. Safety implementation for laboratories	26
Chapter 10. Representative research performance	28
Chapter 11. Others	28
Chapter 12. References	29

〈 목 차 〉

제1장 연구개발과제의 개요	7
제1절 연구개발의 목적	7
제2절 연구개발의 필요성	7
제3절 연구개발 범위	7
제2장 국내외 기술개발 현황	8
제1절 국내외 기술수준 및 시장현황	8
제3장 연구수행 내용 및 결과	10
제1절 이론적 실험적 접근방법	10
제2절 연구개발 추진체계	10
제3절 연구개발 추진일정	11
제4절 연구개발결과	11
제5절 연구개발성과	20
제6절 연구결과	20
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	23
제5장 연구결과의 활용계획	24
제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	26
제7장 연구개발성과의 보안등급	26
제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	26
제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	26
제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	28
제11장 기타사항	28
제12장 참고문헌	29

<별첨> 자체평가의견서

제1장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

1절. 연구개발 목적

- 연구 개발 목적 : 콩은 단백질 40%, 탄수화물 30%, 지방 20%와 비타민 등을 함유하며 주요 곡물 중 단백질 함량이 가장 높아 영양학적 및 상업적으로 가치가 높은 작물이다. 그러나 농림축산식품부에서 발표한 2015년 국내 식용콩 자급률은 32% 정도로 매우 낮았으며 2014년 대비 3.8% 하락하였다. 우리나라에서 한정된 농지 면적에서 콩의 자급률을 높이기 위한 방안으로 이모작체계에 적용 가능한 조숙·단기성 콩 품종 개발은 매우 중요하다. 본 연구는 통해 SNP 선별 키트를 활용하여 콩에서 단일염기서열을 마커를 발굴해 set를 제작함으로써 신속한 분자유종이 가능하게 한다. 궁극적으로 개발된 set를 작물분자유종분야에 적극 활용될 수 있게 보급하여, 분자유종 기술을 발전시켜 우수 품종을 개발함으로써 국내의 식량 자급률 향상 및 품질향상, 세계 식량문제 해결 등에 이바지할 수 있는 제품을 제작하는데 있다.

2절. 연구개발의 필요성

- 골든씨드프로젝트를 비롯한 다부처 유전체 사업과 농·식품 관련 연구개발사업의 연구 목적이 분자마커 개발과 유전체를 활용하는 핵심 기술을 사용되고 있다.
- 분자표지(Molecular marker)를 이용하여 선발육종(Marker-Assisted Selection, MAS)을 할 경우 육종초기세대에 정확한 선발가능 및 환경적 영향을 최소화와 양적형질의 통계적 분석 가능으로 많은 품종개발에 이용되고 있다.
- 분자유종에 있어서 SNP마커를 활용하는 것은 실제 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열(A,T,G,C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이를 분석하여 생물종의 유전적 차이를 분석하는데 활용할 수 있기 때문이다.
- SNP 마커는 최근 가장 많이 이용되는 분자마커로서 분자유종의 활성화를 위해서는 대규모의 Chip을 활용한 대량 genotyping외에 간편하고 쉬운 특정 형질을 검출 할 수 있는 소량의 SNP set를 제작할 필요성이 있다.
- 단일염기서열 세트를 활용하여 분자마커를 만드는 것은 추후 분자 육종에 새로운 플랫폼을 제시 할 수 있을 것이다.

3절. 연구개발 범위

- 적용대상 : 콩 신품종개발을 위한 육종재료선발
 - 단일염기서열분석 세트를 활용하여 국내 적응하는 조숙종 콩 품종 개발을 위해 필요한 계통 선발용 SNP marker set를 개발하여 활용할 계획이다.
- 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)
 - 대표적인 조숙종 콩 유전자원을 대상으로 sequencing을 통해 *GIGANTEA* 유전자서열에서 변이를 확인하고 확인된 단일염기서열을 활용하여 전체 유전자원을 대상으로 genotyping하여 품종개발에 활용 가능한 단일염기서열 세트를 발굴하여 마커 구성

제2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

1절. 국내외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 최근 작물 육종효율 증진을 위한 다수의 연구들이 수행되어지고 있고 이중 DNA marker를 이용한 분자육종기술 개발이 가장 효율적인 방법으로 평가되고 있다. 수량성을 포함하는 주요농업형질은 다수 유전자의 복잡한 조절 과정의 산물이므로, 수량성이 증진된 우수한 신품종 콩의 개발은 우량 농업형질 결정 유전자 및 이들 alleles의 대량 발굴이 전제되어야 하는데, 최근의 염기서열 결정 기술의 진보는 표준유전체 정보가 확보된 작물의 경우에는 다수의 품종 또는 계통을 대상으로 유전체 재분석(genome resequencing)을 통한 유전체 수준의 유전정보 분석을 가능케 하였다. 유전체 분석을 통해 확보된 SNP 중 작물의 특정 형질과 연관된 SNP를 선발마커로 활용시 선발효율향상에 크게 기여할 수 있다.

○ 시장현황

- 글로벌 SNP 유전체 분석 시장은 2012년 기준으로 23억 달러이다. Sequencing의 가격 하락의 도움으로 SNP 유전체 분야 연구 및 개발이 활발히 진행되고 있으며, 그로 인한 시장의 연평균 성장률은 2013년부터 2019년 기간 동안 21.80% 나타낼 것으로 예측되고 시장규모는 94억 달러에 이를 것으로 전망된다.

<글로벌 SNP 유전체 분석 시장>

시장 구분	2012년(억 원)	2019년(억 원)	비고	
			2012년	2019년
세계시장	27,000	110,000	23억 달러	94억 달러
아시아 시장	6,750	27,500	전세계 시장 점유율 25%	
국내시장	270	1,100	전세계 1%	
국내 농산물	94.5	440	국내시장의 35%, 40%	

<출처: KOLQinions, Company Annual Reports, Experinterviews, Investing Publications, Press Releases & TMR Analysis>

- 세계 종자시장은 매년 꾸준히 5%이상 성장하고 있으며 2020년 약 615억불 규모로 성장할 것으로 추정되고 있다. 종자시장 자체는 큰 규모가 아니나 종자에 의해 만들어지는 생산물시장은 종자 시장의 약 50배로 엄청난 시장으로 확대될 수 있다.
- 작물별 종자 시장의 규모를 보면 옥수수가 가장 큰 14,100백만불이고 이후 콩이 5,500백만불로 큰 시장을 형성하고 있으며 이후 벼, 감자, 면화, 밀 순으로 시장이 형성되어있다.

○ 경쟁회사 현황

- 현재 전세계 종자시장의 약 60%는 4개의 다국적 기업이 차지하고 있어서 시장 독점화로 인한 문제가 발생하고 있고, 한국의 경우 전체종자 매출규모는 약 6천억원정도이고

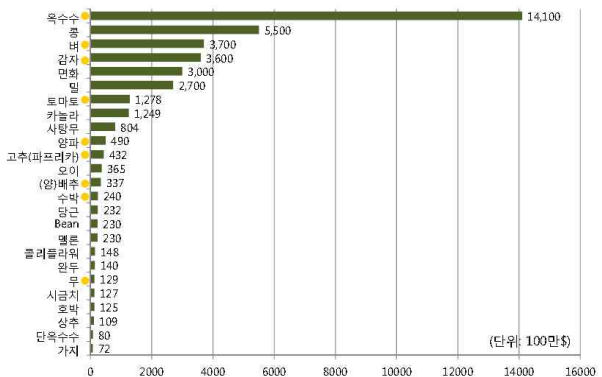
곡류는 대부분 국가에서 관장하고 채소, 과수만 기업에서 육종을 하고 있는 실정이다. 그러나 최근 일부 대기업계열회사 및 농협관련회사에서 식량작물 특히 콩, 옥수수 등 식량작물 종자개발 및 글로벌화에 투자를 하고 있어 국내에서도 점차 시장이 확대될 전망이다.

- 분자유종사업은 유전체 정보, DNA마커, Genotyping 등을 활용하여 육종사업에 기여할 수 있는 부분이 있다. 이들 분야는 특히 시설비와 개발비의 비중이 높아 특정기업에서 전체를 수행하기보다는 Service 대행 기업을 통해 필요시 업무를 대행하고 있으며 전문적으로 운영하는 기업은 많지 않다.
- 분자유종기업들은 대부분 다국적기업, 국립연구소, 학교 등에 기술을 이전하거나 공동연구를 통해 매출을 올리고있는 실정이다. 이중 분자 육종관련 전문회사는 (주)고추와육종, (주)에프엔피정도의 벤처기업이 있다.

(단위: 10억\$)



작물별 세계 종자시장 규모 (2011)



○ 지식재산권 현황

- 애기장대의 생체시계 및 개화기조절 유전자 자이겐티아(국내특허, 등록번호 : 1003193950000, 01.12.18.등록, 현재: 소멸) : 애기장대(Arabidopsis thaliana)의 생체 시계 및 개화시기 조절에 관여하는 자이겐티아(GIGANTEA, 이하 'GI'로 약칭함) 유전자 및 이의 분리 방법에 관한 것
- 식물의 개화시기를 조절하는 유전자 및 이를 이용한식물의 개화시기 조절방법(국내특허, 등록번호 : 1005109590000, 2005.8.2. 등록, 현재 소멸) : 애기장대로부터 분리된 식물의 개화 조절 유전자 COG 및 상기 COG 유전자관련 특허
- 초다뿌리혹 형성 콩 변이체에 대한 단일뉴클레오타이드 다형성 마커(국내특허, 등록번호 : 100620506000, 현재: 등록) 뿌리혹 형성 표현형에 대한 단일뉴클레오타이드 다형성 유전적 마커, 이를 이용한 뿌리혹 형성 변이체의 동정방법 및 이를 구현하기 위한 키트
- Utility of SNP markers associated with major soybean plant maturity and growth habit genomic regions (콩 식물체 성숙기와 생육습성관련 게놈 부위와 관련된 SNP 마커의 이용)(미국특허 : 08847006, 2014.09.30., 현재 : 등록) : 콩에서 식물체와 종자로부터 성숙기 및 생육습성과 관련된 특성을 선발하는 방법

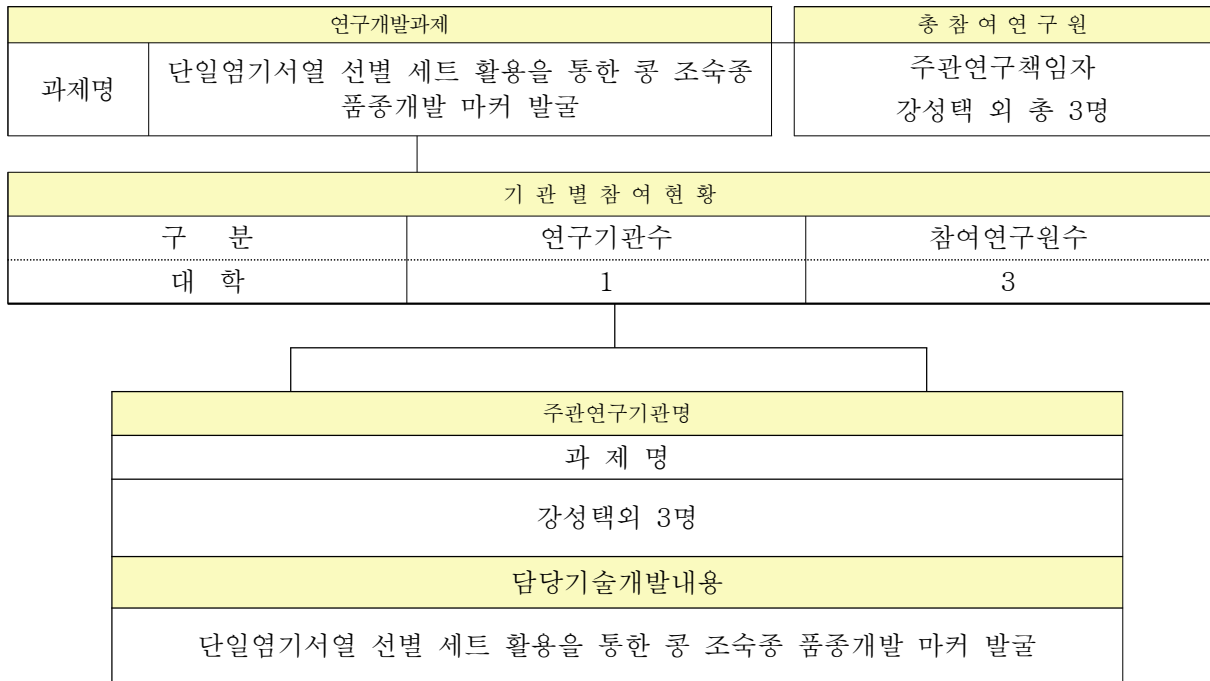
제3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

1절. 이론적, 실험적 접근방법

- 조숙종 콩 품종개발에 필요한 유전자 탐색
 - 현재 조숙종 콩 품종개발에 가장 큰 문제점인 성숙기와 탈립성에 목표를 두고 관련 유전자 발굴 및 탐색을 실시
 - 이를 위해 조숙종콩에서 성숙기와 탈립성에 가장 큰 영향을 미치는 양적형질 유전자좌 (QTL)을 탐색하고 후보유전자 발굴
- 콩 Genome 상에 목표유전자 부위를 sequencing 하여 연관 SNP 발굴
 - 품종의 조숙화와 연관성이 높은 *GIGANTEA*유전자 및 내탈립연관 유전자 부위를 sequencing 실시
 - 품종 및 유전자원을 대상으로 이들 SNP의 적용성을 검정
- 개발된 SNP를 분자유종시스템에 활용가능성 탐색을 위한 SNP 검증
 - 분리세대에서 개발된 마커를 적용하여 육종과정에서 활용성 확인
- 개발된 SNP 검정 기술을 활용한 산업화 가능성 점검
 - 개발 SNP를 이용한 산업화 가능성을 검정하기 위해 국산개발예정제품과 기상업화 제품 간에 마커의 품질평가

2절. 연구개발 추진체계



3절. 연구개발추진일정

일련 번호	연구내용	1차년도											연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		월별 추진 일정													
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
1	계획수립 및 자료조사	■												5,000	강성택 (단국대학교)
2	SNP 분석방식디자인		■	■	■									5,000	강성택 (단국대학교)
3	올리고합성				■	■	■	■						10,000	강성택 (단국대학교)
4	콩 주요유전자 sequencing						■	■	■	■				10,000	강성택 (단국대학교)
5	콩 SNP genotyping							■	■	■	■	■		20,000	강성택 (단국대학교)

4절. 연구개발결과

○ 실험재료

- 개화기 및 탈립성 관련 유전자 탐색을 위하여 큰울과 실파달을 인공교배하여 얻은 F_{8:12} RIL 115계통 이용
- 개화기 연관 후보유전자 SNP 변이 탐색을 위해 재래종 유전자원 5,000여종 중 농촌진흥청에서 2014년 조사한 결과를 토대로 파종 후 33일 이내에 개화한 자원들 중에서 한반도 육성종이거나 수집종인 것으로 제한하여 자원 60종을 선발
- 실험을 통해 발굴한 SNP를 이용하여 두 종류의 국내 기술로 SNP probe와 현재 상업적으로 널리 이용되고 있는 Taqman probe를 제작
- 국내기술로 제작한 SNP probe 재현성 검증을 위해 참울과 대원을 모부분으로 하는 F₃ 56계통 이용
- 국내개발 SNP probe의 분자유종 적용가능성을 확인하기 위해 초기세대의 F₃ 166계통, 고정세대의 52계통을 이용

표 1. SNP probe 검증에 이용된 계통의 모부분 정보

	모부분
F ₃ 계통	- 참울×대원 , 황금울×대원
F ₆ 이후 고정계통	-Danmi//Danmi/PI200508 -Milyang235/Milyang245 -Milyang235/Hwangkeum -Milyang235/Milyang246 -Milyang235/Milyang248 -Suwon269/Milyang247 -Milyang235/Jungmo3004 -Milyang235/Milyang245 -Milyang186/Milyang175 -Milyang172/Yukimusume -Milyang233/Milyang235 -Milyang234/Milyang210 -Milyang234/Hwangkeumol -Milyang235/Jungmo3004 -Milyang235/Jungmo3004 -Milyang233/Milyang235

○ 개화기조사

- 2005년과 2006년 큰올 × 신팔달 RIL F_{8:12} 115계통을 수원(37° 15'N, 126° 58'E)과 연천(38° 10'N, 127° 06'E)에서 재배하여 개화기 특성을 조사한 결과는 농촌진흥청 보고서(강 등, 2007)에서 인용하였고, 2015년 큰올 × 신팔달 RIL F_{8:12} 115계통을 6월 8일에 천안 단국대 실습포장(36° 83'N, 127° 17'E)에서 재배
- 계통별 개화기는 꽃이 핀 개체가 40~50% 정도에 달한 날, 개화시는 꽃이 피기 시작한 날을 기준으로 조사
- 개화일수는 파종일부터 개화기 혹은 개화시까지 일수로 산정

○ 유전자원 중복성 검정

- 국내 조숙종 유전자원은 재래종으로 중복수집에 의한 중복자원일 가능성이 높아 일부자원에 대해 Axiom 180K SoyaSNP array를 이용하여 genotyping한 결과를 바탕으로 MEGA 7을 이용하여 계통수 분석을 실시
- 나머지 자원은 종피색, 제색, 화색, 자엽색, 모용색 등을 이용하여 중복성검정

○ 유전자지도 작성

- 180,961개의 SNP로 구성된 Axiom® 180K SoyaSNP array (Affymetrix, CA)를 활용하여 큰올 × 신팔달 RIL 115계통을 genotyping하였고 scan에는 GeneTitan® Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA)를 사용
- Genotyping 결과를 바탕으로 Joinmap 4.1(Van Ooijen, 2006)을 활용하여 유전자지도를 작성
- Mapping 방법은 다형성을 보이는 marker 중 map 제작 시 사용될 marker를 선별하기 위해 Similarity of Loci 값 0.97이상에서 중복되는 marker들을 제거하여 선별하였다. LOD 값은 3.0이상으로 grouping하였으며, Algorithm은 Maxomum likelihood를 이용

○ QTL 분석

- QTL 분석은 SoyaSNP array를 이용하여 얻은 genotyping data를 2005년과 2006년 수원과 연천에서 조사한 RIL 표현형 data와 2015년 천안에서 조사한 RIL 표현형 data를 기반으로 MapQTL 6(Van Ooijen, 2009)을 활용하여 탐색
- MapQTL 6에서 Interval mapping을 시행하여 QTL을 탐색하고 Permutation test를 1,000번 실행하여 데이터의 신뢰도를 높여 critical range 조건을 잡았으며 Composite Interval Mapping 방법으로 최종 QTL을 탐색

○ 후보유전자 탐색

- 후보유전자 탐색은 Williams82(*Glycine max* Wm82.a1.v2)를 기반으로 하여 작성된 Soybase Jbrowse(<http://www.soybase.org>)를 활용하여 QTL 분석을 통해 얻은 physical position을 토대로 탐색

○ 후보유전자 SNP 탐색

- DNA 추출: DNA는 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Doyle and Doyle, 1987) 방법을 이용하여 추출
- Primer 제작: 후보유전자의 염기서열을 탐색하는데 이미 whole genome의 sequencing이 완료된 Williams82의 E2gene sequence를 토대로 exon만을 선택하여 Integrated DNA Technologies website에 Primer Quest tool을 이용하여 primer를 제작
- DNA sequencing: ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)를 이용한 Sanger sequencing 방법 이용

○ 개화기 분포

- 2005년과 2006년 연천(30°10' N, 127°06' E)과 수원(37°15' N, 126°58' E)에서 큰올 × 신팔달 RIL 115계통을 이용하여 개화기 조사한 결과는 농촌진흥청 보고서를 활용하였으며, 2015년 천안(36°83' N, 127°17' E)에서 같은 재료를 이용하여 개화기를 조사
- 개화기 조사 결과 지역과 연차간 다소 상이한 결과를 보였으나 모든 지역과 연차에서 일부계통이 모부분에 개화일수보다 적거나 높은 초월분리를 보였고 RIL계통의 개화기는 정규분포를 나타냈으며 RIL 계통의 개화기는 양적형질이며 QTL탐색이 가능함을 확인

○ 고밀도 유전자 지도 작성

- 큰올 × 신팔달 RIL을 169,028개의 marker로 구성된 Axiom® 180K SoyaSNP array를 이용하여 genotyping한 결과 염색체당 1,419개의 marker에서 모부분에 다형성을 보였으며 총 28,385개의 marker가 모부분에서 다형성을 보임
- 유전자 지도에 사용된 marker는 총 7,321개이며, 유전자의 길이는 총 3,302cM으로 평균적으로 marker간 거리는 0.5cM이며 염색체당 165cM인 지도를 작성

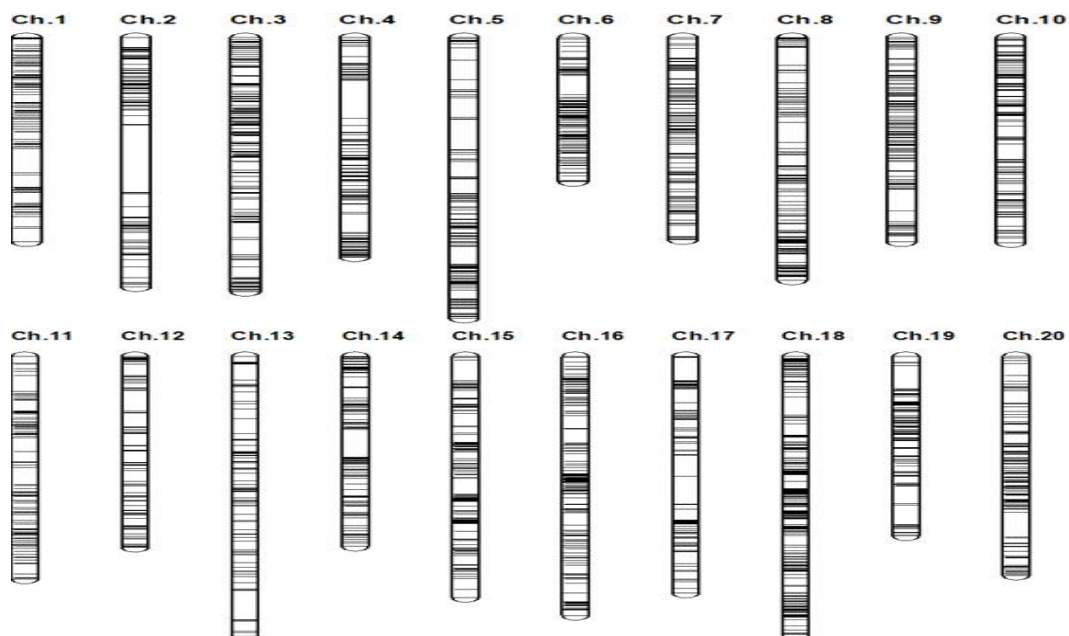


그림 1 큰올×신팔달 RIL을 이용하여 작성한 고밀도 유전자지도, 검은 막대는 염색체 상에서 SNP marker 위치를 나타냄

○ 조숙종 콩 품종개발에 필요한 유전자 탐색

- 큰올 × 실파달 RIL 115계통의 2005, 2006년에 연천과 수원에서 조사한 개화일수와 2015년 천안에서 조사한 개화일수 및 SoyaSNP array를 이용하여 개화기연관 QTL 탐색
- 개화기 연관 QTL을 탐색한 결과 10번 염색체 89.11 - 89.56 cM에 위치한 두 개의 마커 AX-90386027 - AX-90459836(물리적거리 45,232,870 - 45,329,450 bp)에 위치하였음
- 탐색된 QTL은 큰올콩에서 유래한 조숙형 QTL임을 확인되었고 조숙에 관련된 Major QTL로 판단
- 탐색된 QTL의 위치에서 후보유전자를 탐색한 결과 Glyma.10g221500, Glyma.10g221600, Glyma.10g221700 총 3개의 유전자가 확인(그림 2)
- 3개의 유전자 중 Glyma.10g221500은 애기장대에서 알려진 *GIGANTEA* gene이며 콩에서는 E2 gene임

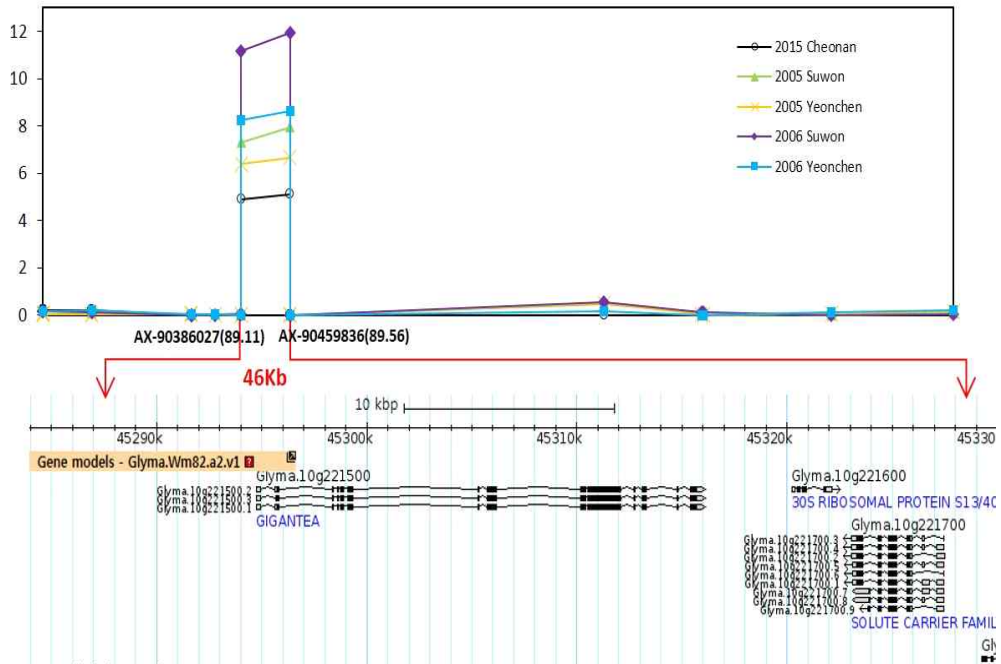


그림 2. 조숙종에서 개화기 연관 QTL 탐색 결과 및 후보유전자 확정

○ 콩 Genome 상에 목표유전자 부위를 sequencing 하여 연관 SNP 발굴

- Sanger sequencing 방법을 이용하여 sequencing한 결과 실파달, Williams 82와 큰올에서 염기서열이 서로 다른 SNP 4개를 선발
- 2번 exon의 49번째 염기서열, 6번 exon의 11번째 염기서열, 7번 exon의 152번째 염기서열, 10번 exon의 137번째 염기서열에서 조숙종과 중만숙종간에 차이 나는 SNP 발굴 (그림 3)
- 염기서열의 변이를 통해 아미노산의 변이를 확인한 결과 2번 exon, 6번 exon, 10번 exon에서 아미노산의 변화 확인하였고 이중 2번 exon은 premature stop codon을 형성하여 콩에서 개화를 억제할 것이라 판단

Glyma10g221500(E2, GIGANTEA)

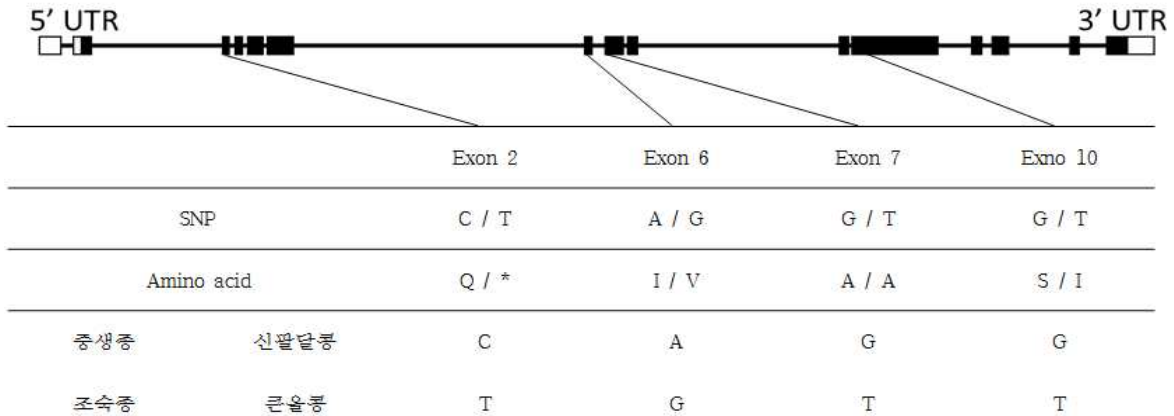


그림 3. 후보유전자 exon에서 아미노산변화를 일으키는 SNP 발굴

○ 후보유전자 sequencing을 통한 SNP 발굴

- 국내 조숙종 유전자원 41종의 2번 exon 염기서열 변이를 탐색한 결과, 국내 조숙종 유전자원 41종 중 12종은 큰울콩과 같이 2번 exon의 49번째 염기에서 티민(T)이고 29종은 신팔달콩, Williams 82와 같이 시토신(C)으로 구분되었다(그림 4)
- 결과 41종 중 12종은 E2 gene에서 premature stop codon에 의하여 개화일수의 감소를 확인할 수 있었고, 29종은 2번 exon 외에 다른 염기서열의 변이에 의해 개화기가 조절될 것으로 판단
- 큰울콩과 같이 premature stop codon이 형성된 유전자원 12종은 강원도 삼척, 경상북도, 경상남도, 전라북도, 전라남도에서 수집되어 우리나라 남부지역에 위치함

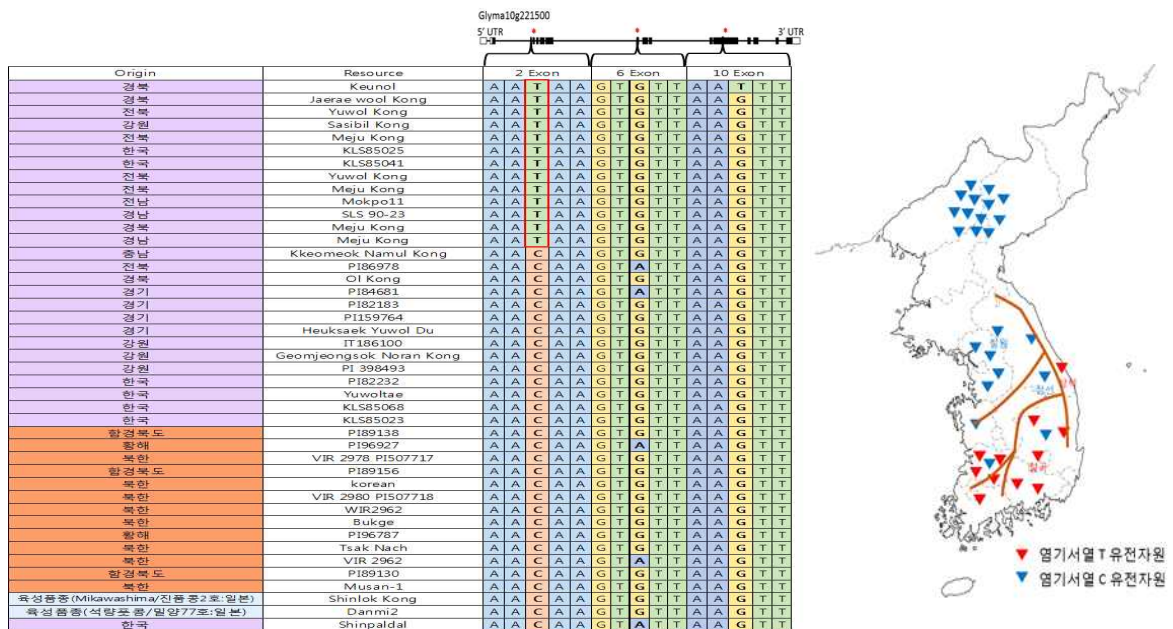


그림 4. 조숙 울콩 유전자원에서 조숙연관 SNP 의 변이

○ SNP 검정을 위한 Probe 제작

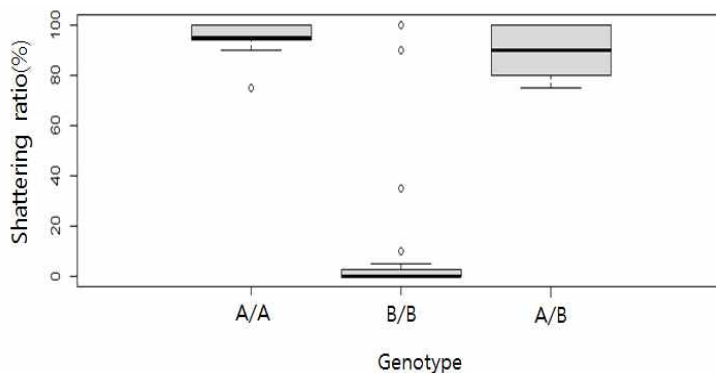
- 본 연구를 수행하기 위하여 국내 기술을 이용한 SNP probe와 상업적으로 활용되는 Taqman probe 두 가지 종류로 제작
- 본 연구에서 개발된 성숙기 연관 SNP 중 아미노산의 변이를 일으키는 3개의 SNP에 대해 Probe 작성
- 조숙콩 품종개발에 필요한 성숙기의 탈립성연관 SNP 3종을 발굴하여 Probe 제작
- 국내 콩 품종개발에 활용 가능한 종피색 및 배꼽색과 연관된 3종 SNP를 발굴하여 Probe 제작

표 1. 콩 조숙종개발에 활용 가능한 SNP 목록

Trait	SNP NO.	Sequence (5' to 3')	SNP site
Flowering	SNP01	ATATGTTGAGTACTTCATTCAGTTTACATCAGAA[C/T]	[C/T]
	SNP02	CGATGATTTGCTGTATGTTAACAGGTGCAGTGGT[A/G]	[A/G]
	SNP03	ATTTGGGAAGCTGCTTATGGCCTGATTCCTACAA[G/T]	[G/T]
Shattering	SNP04	ATAATACAAATCCCTAGTCCAATCTTAGCCCAA[A/G]	[A/G]
	SNP05	AAGTGTTTATGGTTATGTTTGCGCAAATGCTTTG[A/G]	[A/G]
	SNP06	TAGATGATGTTCGTGGAAGAAGAGGACTAAGTGCT[T/A]	[T/A]
Helium Color	SNP07	AGATTAGAAATCTTTCTGCAGATTTCTGTGTCCT[C/T]	[C/T]
Seed Coat Color	SNP08	TTCTCACTACTAGAAACATGTGATTTAGCAACTG[A/G]	[A/G]
Pubescence color	SNP09	AACTGCAAGAGAATGGCTCTGGTGGTGGGGGCCAA[G/C]	[G/C]

○ 개발된 SNP probe의 분자유종 적용가능성 탐색

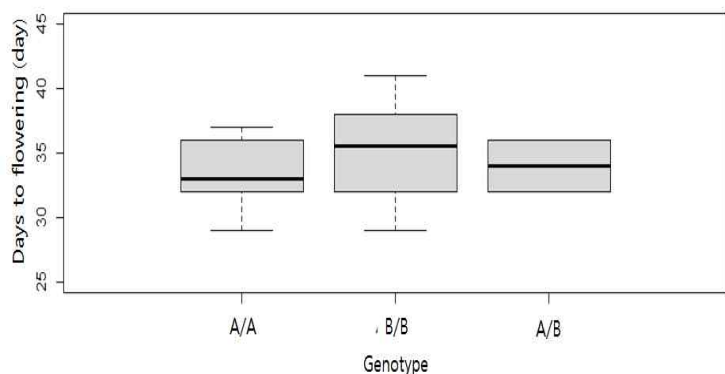
- 콩 탈립성 연관 SNP 3종을 분리세대 집단에 적용 후 실제 표현형과의 비교를 통해 마커선발 적용 가능성 탐색한 결과 A/A 및 A/B allele에서 100% 탈립성이 높은 계통이 선발되었고, A/A allele에서는 약 93%의 계통이 탈립성에 저항성을 보였으나 약 7% 정도만 탈립성을 보여 분자유종 시스템에 활용하는 데는 문제없음 (그림 5)



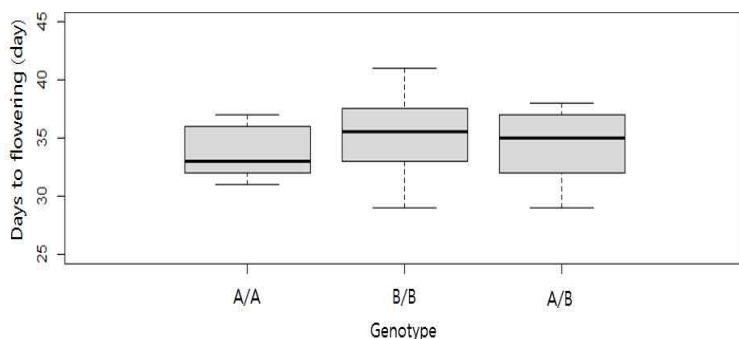
		Shattering ratio(%)		
		0~20	20~50	50~100
Geno type	A/A	0	2	17
	A/B	0	0	10
	B/B	27	0	2

그림 5. 탈립성 연관 SNP의 genotype과 phenotype 비교

- 콩 조숙종에 중요한 유전자로 작용하는 *GIGANTEA* 유전자 유래 SNP 2종을 활용하여 분리 세대 집단에서 실제 표현형과 비교를 통해 마커선발 적용 가능성 탐색한 결과 A/A 및 A/B allele에서 다소 개화기가 당겨지고 B/B allele은 좀 더 넓게 분포되어 다소 조숙종 선발이 가능하나 명확한 구분을 짓는 데는 어려움이 있어 추가로 다른 SNP가 필요함(그림 6)



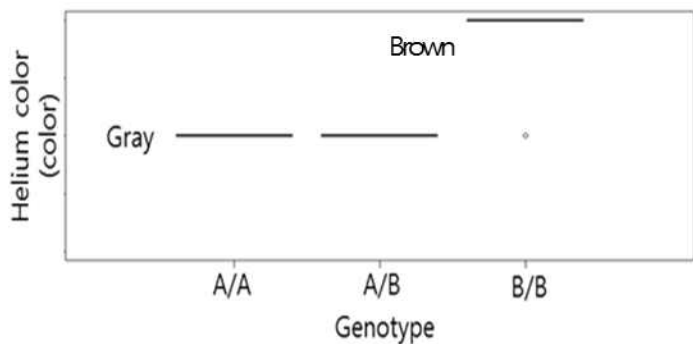
		Days to flowering(days)		
		-30	31-35	36~
Geno type	A/A	2	14	8
	A/B	0	13	3
	B/B	1	9	7



		Days to flowering(days)		
		-30	31-35	36~
Geno type	A/A	0	20	7
	A/B	2	7	3
	B/B	1	8	8

그림 6. 개화기 연관 SNP의 genotype과 phenotype 비교(상 : Exon 2, 하: Exon 6)

- 콩 모용색 연관 유전자 유래 SNP를 활용하여 육성품종 22종을 이용하여 실제 표현형과 비교를 통해 마커선발 적용 가능성을 탐색한 결과 A/A 및 A/B allele에서 모용색 회색 개체 선발이 가능하였고 금후 모용색 및 추가 SNP 활용시 제색 선발 마커로 활용 가능(그림 7)



		Helium color(color)	
		Gray	Brown
Genotype	A/A	9	0
	A/B	5	0
	B/B	1	7

그림 7 모용색 연관 SNP의 genotype과 phenotype 비교

○ 개발된 SNP probe의 재현성 검증

- 국내 기술로 개발한 SNP probe와 master mix를 이용하여 genotyping 하였고, SNP detection은 RT-PCR (StepOnePlus)를 이용
- PCR mixture는 1X의 PCR master mix 10 μ l, PCR water 5 μ l, 100ng의 genomic DNA, forward primer, reverse primer, FAM probe, TET probe를 각 1 μ l를 혼합하여 total volume이 20 μ l인 혼합 용액 이용
- PRC 열처리 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분 처리한 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5초, 48 $^{\circ}$ C에서 10초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 처리를 40회 실시
- 국내 기술로 개발한 SNP probe의 재현성을 검증하기 위해 참울과 대원을 모부분으로 하는 F₃ 56계통을 이용하여 SNP probe 당 3번의 반복실험을 통해 재현성 검증 실시
- 개화기 형질과 연관 있는 SNP probe의 경우 93.1%의 재현성을 나타냄(그림 8)
- 탈립성 연관 probe의 경우 Exon부분과 UTR부분에 위치한 SNP를 사용하여 probe를 제작하였고, 그 결과 Exon부분 probe의 경우 100%의 재현성을 나타냈으며, UTR부분 probe의 경우 32%의 다소 낮은 재현성을 나타냄(그림 9, 그림10)
- 이는 구조적인 차이로 기업에서 기술보완 중에 있으며 추후 기술 보완을 통하여 사용 가능

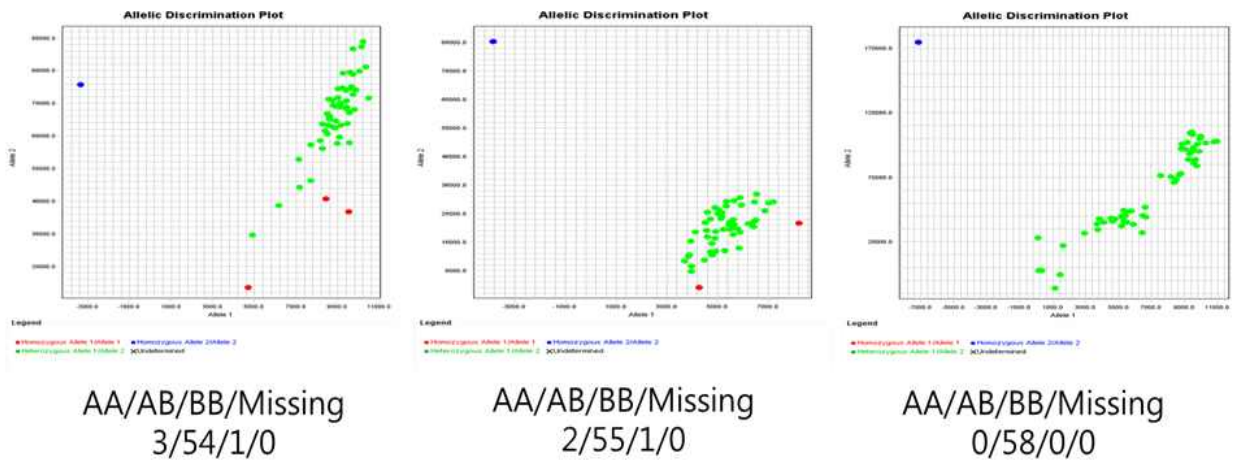


그림 8 Flowering 연관 SNP02 probe를 활용하여 재현성 검증

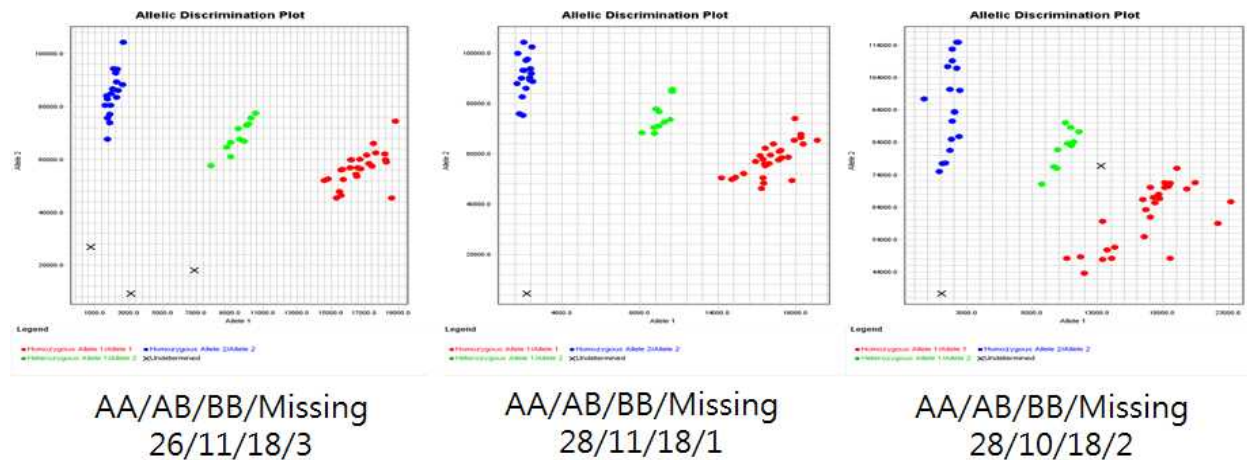


그림 9 Exon부분에서 Shattering 연관 SNP05 probe를 활용하여 재현성 검증

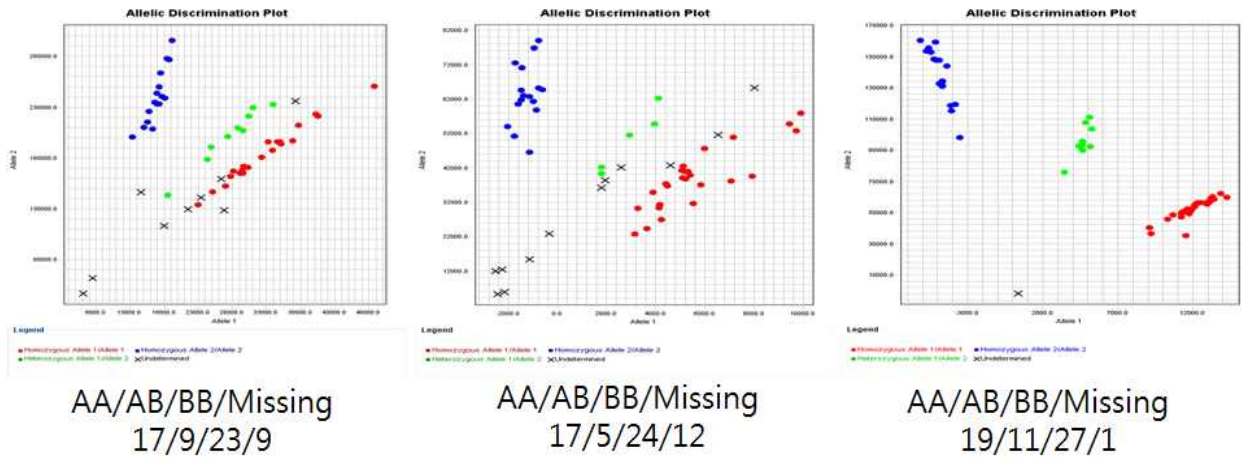


그림 10 UTR부분에서 Shattering 연관 SNP06 probe를 활용하여 재현성 검증

○ 국내 SNP 기술의 산업화 가능성 점검

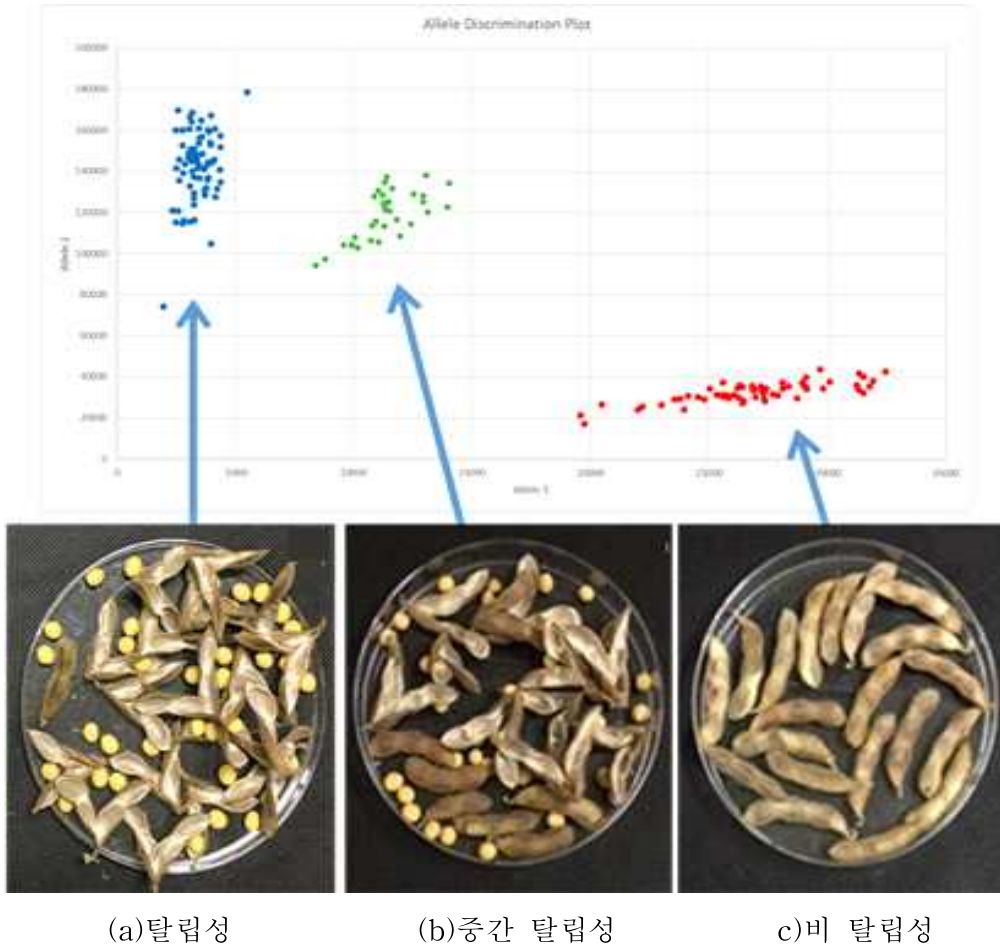
- 국내업체에서 개발한 기술로 제작된 SNP와 국외상용화 기술로 제작된 SNP를 활용하여 콩 분리세대를 Genotyping한 결과에서는 큰 차이를 보이지 않았음
- 그러나 일부 계통에서 genotyping이 되지 않아 기술의 보완이 필요함
- 현재 대부분의 SNP probe 제작을 위해서는 국외에 의뢰하여 제작하므로 비용과 시간이 과다하게 소요되는 환경에서 국산 SNP 제작기술의 활용가능성을 높임

표 2. 국내개발 및 국외상용화 기술로 개발된 SNP 결과 비교

		국외 상용화(Taqman)				
		A/A	B/B	A/B	missing	Total
국내개발	A/A	21	0	0	0	21
	B/B	0	14	0	2	16
	A/B	0	0	8	1	9
	missing	5	0	1	3	9
	Total	26	14	9	6	55

○ 개발된 SNP probe의 분자유종 적용가능성 검증

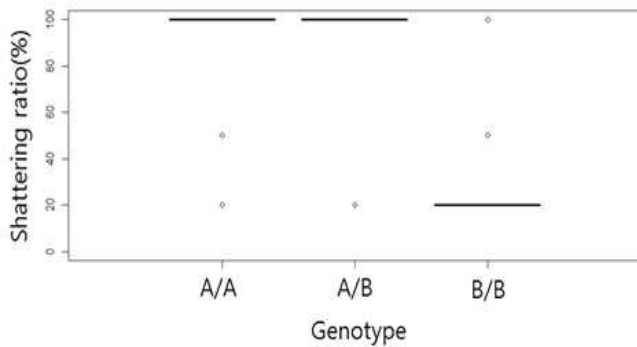
- SNP05를 활용하여 모본을 참을×대원, 황금을×대원으로 하는 초기세대 F₃ 166계통에서 분자유종 적용가능성을 확인한 결과 92.9%의 정확도를 나타냈으며 SNP probe의 적용가능성을 확인함(그림 11)



(a)탈립성

(b)중간 탈립성

(c)비 탈립성

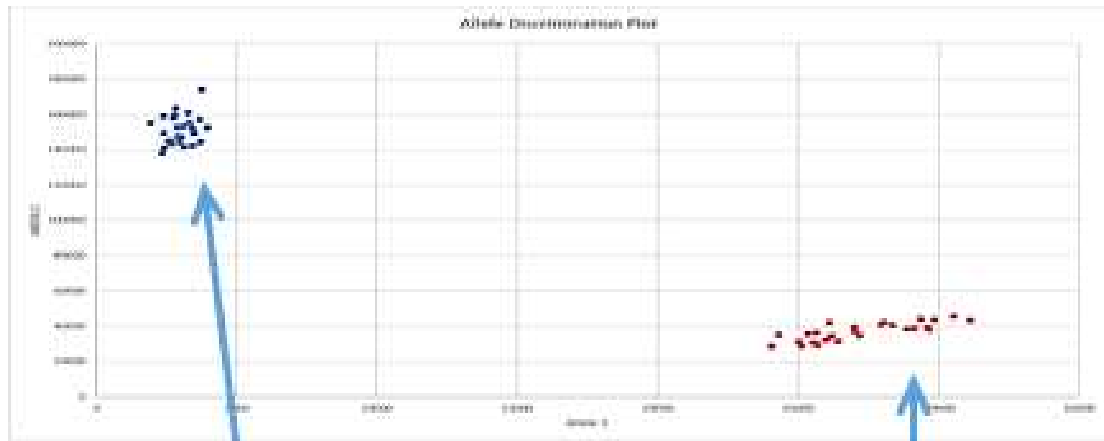


F3 166 sample		Shattering ratio(%)		
		0~20	20~50	50~100
Genotype	A/A	3	1	57
	A/B	4	2	28
	B/B	60	6	5

Accuracy A/A : 58/61 = 95.1% B/B : 66/71 = 92.9%

그림 11. 탈립성 연관 SNP05를 이용해서 초기세대 F₃ 166계통에서 SNP probe 적용 가능성 검증

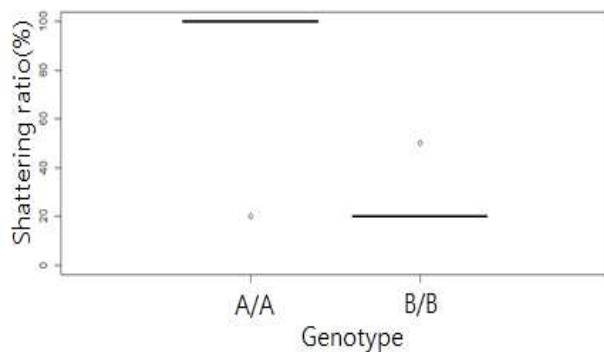
- 다양한 모부본으로 이루어진 고정세대의 지역적응성/생산력검정계통 52계통을 활용하여 SNP05의 SNP probe의 분자유종 적용성을 확인한 결과 100%의 정확도를 나타냄을 확인할 수 있었고 SNP probe로 사용가능함을 확인함(그림 12)



(a)탈립성

(b)중간 탈립성

(c)비 탈립성



지역적응성 생산력검정시험 52 sample		Shattering ratio(%)		
		0~20	20~50	50~100
Genotype	A/A	1	0	25
	A/B	0	0	0
	B/B	23	3	0

Accuracy A/A:25/26=96.1% B/B:26/26=100%

그림 12. 탈립성 연관 SNP05를 이용해서 고정세대 지역적응성/생산력검정 56계통을 활용하여 SNP probe 적용 가능성 검증

5절. 연구개발성과

- 논문발표성과 : 조숙·내탈립 콩 품종개발을 위한 연관 SNP 발굴(2017 한국작물학회 추계학술발표회)

6절. 연구결과

- 기술적성과 : 본 연구에서는 콩에서 품종개발에 활용될 수 있는 SNP set을 개발하였고, 이를 분자유종시스템에 적용하고 나아가 관련 기술의 국내 산업화 가능성을 도출하는 과정에서 콩에서 유용마커를 선발하는 기술, 개발마커를 육종시스템에 효율적으로 활용하는 기술 나아가 이들 마커 검정을 위한 관련기술의 활용에 대한 기술을 개발하였다. 개발된 기술은 국외의 기술과 비교시 개발 마커는 동등한 성능을 보였고 검정기술도 거의 유사한 결과를 도출함
- 경제적 성과 : 현재 SNP 검정에 필요한 대부분의 기술과 자재가 해외기업에 의존하고 있는 상황에서 본 실험을 통해 입증된 국산 Probe는 좀 더 정밀한 기술검토 후 상업화되면 가격과 제작소요시간단축을 통한 시장점유율향상이 기대

제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

1절. 목표달성도

- 본 연구는 당초 연구개발 세부목표인 조숙종 콩 유전자원을 대상으로 sequencing을 통해 *GIGANTEA* 유전자서열에서 변이를 확인하고 확인된 SNP를 활용하여 전체 유전자원을 대상으로 genotyping하여 품종개발에 활용 가능한 SNP마커들을 발굴하여 마커 확보를 충실히 수행하였고
- 나아가 확보된 SNP마커를 분리세대에 적용하여 분자유종 시스템에 활용가능성을 확인하여 탈립성마커의 적용가능성을 확인하였고
- 또한 이들 SNP마커의 검정시 국내의 probe 제작기술을 비교 검정함으로써 국내기술의 적용가능성도 확인하여
- 결과적으로 본 과제의 최종목표인 SNP 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴을 충실히 달성하였음

2절. 관련분야 기여도

- 최근 유전자서열분석 기술의 발달로 분석비용의 감소로 인해 인간을 포함한 동식물분야에서 다양한 유전체정보가 넘쳐남에 따라 이들 정보에 기반을 둔 SNP마커의 이용이 급격히 증가하고 있는 추세에 있음
- 육종분야에서 DNA마커를 활용하는 분자유종을 이루기 위해서는 먼저 주요 형질별 활용 가능한 마커를 개발하는 것이 우선이므로 본 과제에서는 조숙종 콩 육종과정에서 가장 중요시하는 탈립성과 성숙기를 분자유종시스템을 활용하여 간이선발 할 수 있는 유전자발굴과 연관 SNP마커를 개발
- SNP 마커를 활용하는 방법에는 목적 및 실험의 성격에 따라 다양한데 대량의 마커와 대량의 재료를 활용하기 위해서는 array 또는 Chip 방식을 활용하고, 소규모의 QTL mapping, 분자유종(MABC 또는 MARS)를 위해서는 Single-plex방식이 적합하며 Single-plex방식으로 SNP마커를 genotyping하는 platform에는 다양한 방법이 있으나 대표적으로 TaqMan (Applied Biosystems)방식과 KASP방식(LGC Genomics)이 가장 많이 이용되고 있다. 본 과제에서는 여기에 맞추어 TaqMan 방식의 single-plex 분석법을 활용하는 SNP 마커를 개발하여 활용가능성을 증대시킴
- 현재 국내연구자가 TaqMan 방식의 single-plex 분석을 활용하기 위해서는 형광염료와 소광제(quencher)가 결합되어 있는 DNA probe가 필요한데, 이러한 재료물질들의 경우 국산화가 거의 이루어지지 않았기 때문에 DNA probe 제작을 위해 해외에 고가의 가격으로 주문하여 사용하고 있어 비용 및 시간이 많이 소요되므로 국산화가 절실한 시점이다. 본 연구를 통해 DNA probe용 형광염료 및 소광제 개발을 진행하고 있는 국내기업체에서 제작된 DNA probe를 제작하고 이들 SNP마커의 적용성과 더불어 기존 외국산과 비교를 실시한 결과 국내기술에 의해 개발된 SNP DNA probe도 일부의 기술적 부분을 개선한다면 충분히 활용이 가능할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 중요기술의 국산화 및 산업화에 매우 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단됨

제5장 연구결과의 활용계획

코드번호

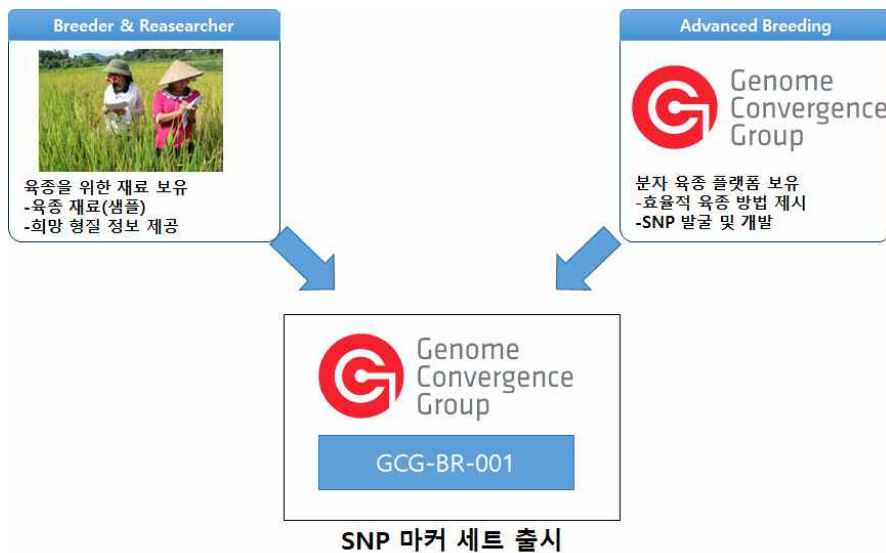
D-07

○ 과학기술적 활용 계획

- 콩에 대한 기존의 유전자원 및 새로 육성하는 품종에 대해서 조숙종 유무 판별 가능
- 국내 조숙콩 개화기 연관 SNP발굴을통해 국내 콩 계통선발에 활용
- 단일염기서열 set제작을 통한 새로운 분자유종 관련 연구방법 제시
- 신품종 개발시 분자마커 활용과 종자생산 후 순도검정 목적 등으로 활용

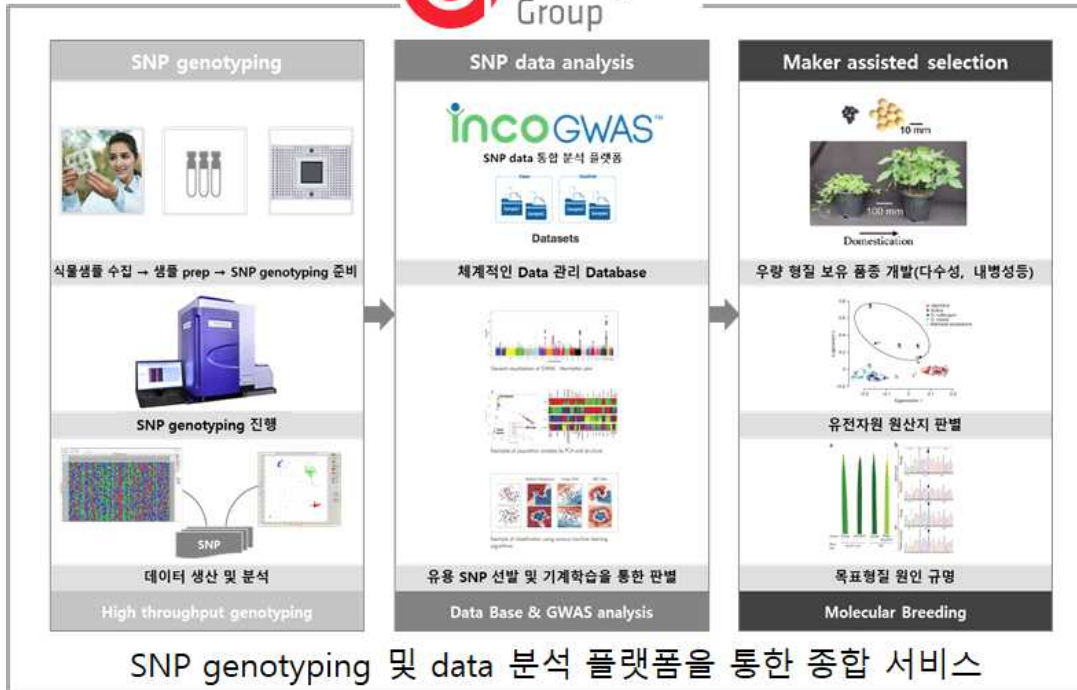
○ 산업적 활용 계획

- 콩을 활용하는 관련 기업 및 육종회사 뿐만 아니라 동·식물 관련 기업 및 육종회사에 단일염기서열 정보 활용을 통한 새로운 선발방법 제시
- 해외 생산 probe에 의존하던 SNP genotyping 기술을 국내 자체 생산 probe를 통하여 개발하였다.
- 이를 육종에 있어 실용적인 SNP 몇 개를 선발하여 국산 probe를 통하여 제작하였고 적용한 결과 분자유종에 실제 활용이 가능함을 검증하였다.
- 이를 통하여 콩을 활용하는 관련 기업 및 육종회사들에게 국산 probe를 활용한 SNP genotyping을 활용하여 원하는 방향으로 육종이 가능성을 타진할 수 있었다.
- 위와 같은 사례를 통하여 분자 육종을 희망하는 연구자 및 육종가에게 효율적으로 분자 육종 방법을 제시하여 준다면 시장성 있는 비즈니스 모델 (ex. SNP 마커 세트)을 개발할 수 있다.



○ 농·생명 분야 분자마커후보를 이미 개발한 연구그룹 뿐만 아니라 시험연구소, 종자회사를 통한 사업화 가능

- 분자 마커를 기보유 하고 있는 곳에 경우 SNP genotyping probe 제작 및 genotyping까지 도입 할 수 있음
- 육종 재료가 있고 분자마커를 보유하고 있지 않은 기관에서도 자체적인 플랫폼을 통하여 분자마커 개발부터 SNP genotyping probe 제작, 최종적으로 genotyping 까지 서비스 진원하여 분자유종 플랫폼을 사업화해 나갈 계획



○ 다양한 작물 적용 가능성 및 해외 시장 확보

- 가격 및 생산 경쟁력을 확보한 국산 probe를 활용한 SNP genotyping 방식을 콩에 한정지어 진행할 것이 아니라 다양한 작물들의 유용 형질들에 대한 적용성도 검토하여 시장을 확대해 나갈 계획
- 가격 및 시간적인 이점을 가진 국산 probe에 판매처를 국내 시장에 한정 지을 것이 아니라 아시아시장 개척을 위해서 국제학회 참석을 통하여 고객 및 바이어를 확보해 나갈 예정

○ 추가 연구의 필요성

- 1년간의 짧은 기간에 마커의 개발과 활용가능성을 모두 탐색하기에는 기술개발과 검증에 이용되는 재료 및 환경이 매우 제한적임
- 본 연구결과를 활용하여 개발마커의 육종현장에 활용성제고와 형광 DNA probe 국산화를 위해서는 좀 더 다양한 실험재료를 활용한 검증을 통해 기존의 전통육종가에게 분자마커의 신뢰도를 향상시켜야하고, 국산 형광 DNA probe 제작기술의 산업화를 위해서는 현재 genotyping에서 나타난 문제점에 대한 해결방안을 적절히 도출 후 기술보완이 선행되어야 가능할 것으로 판단

제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 기 추진한 연구 관련 해외과학기술정보 기술		

제7장 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 일반 과제		

제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>A. 연구실 안전 점검 체계 및 실시</p> <p>1) 실험실 안전 점검 체계</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구실 일상점검 실시 : 연구활동종사자가 육안으로 연구활동 시작전 매일 1회 실시 ○ 연구실 정기점검 실시 : 외부 전문기관에 의뢰하여 안전점검기기를 이용 매년 1회 실시 ○ 연구실 정밀안전진단 실시 <ul style="list-style-type: none"> - 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실 - 실시 : 2년마다 1회 실시 <p>2) 연구실안전관리규정 작성 : 2007년 2월 작성하여 연구실안전관리규정 준수</p> <p>B. 교육 훈련</p> <p>1) 개요 : 연구(실험)실 안전 확보 및 사고예방을 위하여 연구실 법정안전교육</p> <p>2) 교육대상 : 교수, 대학원생(이공계열 전원), 연구원, 학부생 및 연구활동종사자</p> <p>3) 안전교육 과목 및 시간</p>		

시 간	과 목	대 상	비 고
1교시	화학·가스 안전	학부생	10:00~12:30
2교시	실험실 장비 및 기구 취급		
3교시	전기안전		
점 심	점 심		
4교시	연구실 안전법	산학협력단, 연구원 대학원생, 학부생	13:30~16:30
5교시	화학·가스안전		
6교시	전기안전		

* 교육 과목은 일부 변경될 수 있음

C. 보험 가입 현황 : 아래 표 내용과 같으며 매년 주관부서에서 갱신

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
플러스연구활동 단체상해보험	상해사망, 후유장해 : 1억원 상해 의료실비 : 1천만원	대학원생, 연구원	대학원교학과, 산학협력단
연구활동종사자 상해보험	상해사망, 후유장해 : 1억원 상해 의료실비 : 1천만원	학부생	학생과
교직원 단체상해보험	상해사망, 후유장해 : 1억원 질병사망, 후유장애 : 3천만원 암, 허혈성심질환, 뇌혈관질환 : 1천만원 입원 의료비 : 1천만원	전임교원, 비전임교원, 정규직원, 조교, 계약직	총무과

* 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙 제6조에 의거 인건비의 1~2%이하의 금액을 안전관련 예산으로 반영하여야 함

D. 연구활동종사자 건강검진 실시 : 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자(단국대는 연구과제를 수행하는 연구활동종사자)에 대하여 정기적으로 매년 건강검진 실시(단국대병원에서 검진)

E. 추가 이행

- 1) 연구실환경개선공사 : 매년 연구실 정기점검결과를 근거로 하여 지적된 연구실의 문제 점을 보완하기위하여 지속적인 연구실환경개선공사를 실시하여 연구실의 안전확보에 만전을 기하고 있음
- 2) 실험실 폐기물처리 : 폐기물 창고에 보관 후 외부 처리업체에 위탁처리

제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1							yyyy.mm.dd		

제11장 기타사항

		코드번호	D-13
○			

제12장 참고문헌

코드번호	D-14
Akond, M., Liu, S., Kantartzi, S. K., Meksem, K., Bellaloui, N., Lightfoot, D. A., Jiazheng, Y., Dechun, W., James, A., & Kassem, M. A. (2015). A SNP genetic linkage map based on the ‘Hamilton’by ‘Spencer’recombinant inbred line population identified QTL for seed isoflavone contents in soybean. <i>Plant Breeding</i> , 134(5), 580-588.	
Cockram, J., Jones, H., Leigh, F. J., O'Sullivan, D., Powell, W., Laurie, D. A., & Greenland, A. J. (2007). Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. <i>Journal of Experimental Botany</i> , 58(6), 1231-1244.	
Cregan, P. B., Jarvik, T., Bush, A. L., Shoemaker, R. C., Lark, K. G., Kahler, A. L., Kaya, N., Vantoi, T. T., Lohnes, D. G., Chung, J., & Specht, J. E. (1999). An integrated genetic linkage map of the soybean genome. <i>Crop Science</i> , 39(5), 1464-1490.	
Dunford, R. P., Griffiths, S., Christodoulou, V., & Laurie, D. A. (2005). Characterisation of a barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) homologue of the Arabidopsis flowering time regulator GIGANTEA. <i>Theoretical and Applied Genetics</i> , 110(5), 925-931.	
Hyten, D. L., Cannon, S. B., Song, Q., Weeks, N., Fickus, E. W., Shoemaker, R. C., Specht, J. E., Farmer A. D., May G. D., & Cregan, P. B. (2010). High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. <i>BMC Genomics</i> , 11(1), 1.	
Jain, A., Bhatia, S., Banga, S. S., Prakash, S., & Lakshmikumaran, M. (1994). Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (<i>Brassica juncea</i>) and its relationship to heterosis. <i>Theoretical and Applied Genetics</i> , 88(1), 116-122.	
Lee, Y. G., Jeong, N., Kim, J. H., Lee, K., Kim, K. H., Pirani, A., Ha, B. K., Kang, S. T., Park, B. S., Moon, J. K., Jeong S. C., & Kim, N. (2015). Development, validation and genetic analysis of a large soybean SNP genotyping array. <i>The Plant Journal</i> , 81(4), 625-636.	
SoyBase, 1995. A soybean genome database. Ames, Iowa: Iowa State University.	
Tasma, I. M., & Shoemaker, R. C. (2003). Mapping Flowering Time Gene Homologs in Soybean and Their Association with Maturity (E) Loci. <i>Crop Science</i> , 43(1), 319-328.	
Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. <i>Nucleic Acids Research</i> , 23(21), 4407-4414.	
Waugh, R., & Power, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. <i>Trends in Biotechnology</i> , 10, 186-191.	
강태진(2004) 분자표지를 활용한 작물분자유종체계의 확립, 바이오그린21사업	
문중경. (2015). 한국 고유 콩 핵심집단 구축 및 유용 유전자 선발. 국립식량과학원 시험연구보고서.	
송문태(2007) 작물육종에서 분자표지 이용기술, 생물학연구정보센터 BioWave (http://bric.postech.ac.kr/webzine) Vol. 9, No. 22.	

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴					
	(영문) Development SNP Maker for breeding Early maturity Soybean Variety through the use of SNP Screening Set					
주관연구기관	단국대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 단국대학교 산학협력단		
참 여 기 업			총 연 구 기 간	(성명) 강성택		
총연구개발비 (66,670천원)	계	66,670,000원	총 참 여 연구 원 수	2016.12.5~2017.12.4(년 월)		
	정부출연 연구개발비	50,000,000원		총 인 원	6명	
	기업부담금	16,670,000원		내부인원	6명	
	연구기관부담 금			외부인원	6명	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 연구에서는 품종개발에 활용될 수 있는 SNP set을 개발하여 분자유종 기술 발전을 통한 우수 품종을 개발함과 관련 기술의 국내 산업화를 통해 국내의 식량 자급률증진과 품질향상 및 세계 식량문제 해결 등에 이바지하고자한다. 연구를 통해 다수의 분자유종에 활용가능이 있는 마커를 발굴하였고 일부 SNP는 활용가능성이 매우 높음을 확인하였고 나아가 국내 개발기술의 산업화 가능성도 확인하였다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>조숙종 콩 품종개발에 필요한 유전자 탐색을 실시하여 대표적인 조숙종 품종에서 개화기와 연계된 유전자는 <i>GIGANTEA</i> gene 즉 콩 E2 gene을 확인하였고, 콩 Genome 상에 목표 유전자 부위를 sequencing 하여 2번, 6번, 10번 exon에서 아마노산의 변화를 확인하고 이중 2번 exon에서 premature stop codon을 형성하는 주요 SNP를 확인하였다. SNP 검정을 위한 Probe 제작을 위해 조숙콩 품종개발에 필요한 성숙기, 탈립성연관 SNP Probe를 국내외 기술을 활용하여 제작하였고, 개발된 SNP probe의 분자유종 적용가능성 탐색하여 탈립성연관 마커가 저항성 품종선발에 활용이 가능함을 확인하였고 개화기 연관마커는 추가 연구가 필요함을 확인하였다. 또한 국내 SNP probe 제작 기술의 산업화 가능성 점검을 위해 국내기술로 제작된 SNP probe와 국외기술로 제작된 SNP probe를 활용하여 분리세대를 Genotyping한 결과에서 큰 차이를 보이지 않아 좀 더 미세적인 보완이 가해진다면 충분히 국산 probe 제작이 가능함을 확인하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>본 연구 결과들은 금후 이모작체계에 적용 가능한 조숙·단기성 콩 품종 개발에 활용가능성이 매우 높아 일부 검증된 단일염기서열 set은 기술이전을 통해 새로운 분자유종에 활용뿐 아니라 종자 생산 후 순도 검정 목적 등으로 활용될 수 있다. 또한 국산 probe 제작기술은 농·생명 분야 분자마커개발에서 이미 개발한 연구그룹 뿐만 아니라 시험연구소, 종자 회사를 통한 사업화 가능성이 충분하며, 금후 국내외 학회를 통해 본 기술의 우수성을 홍보하여 국내 및 아시아시장개척이 가능할 것으로 판단된다.</p>						

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	116141-01	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	단국대학교 산학협력단		연구책임자	강성택	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.125-2017.124	50,000	16,670	66,670
	2차년도				
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 1. 30

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
단국대학교 산학협력단	부교수	강성택

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 강성택

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을
 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

콩에서 품종개발에 활용될 수 있는 SNP set을 개발하여 분자유종 기술 발전을 통한 우수 품종을 개발함과 관련 기술의 국내 산업화를 위해 1년간 수행된 과제의 연구 성과는 아주 우수한 것으로 판단된다. 연구를 통해 다수의 분자유종에 활용가능이 있는 마커를 발굴하였고 일부 SNP는 활용가능성이 매우 높음을 확인하였을 뿐 아니라 국내 개발기술의 산업화 가능성도 확인하는 우수한 성과를 도출하였다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구결과에서 확보된 분자유종시스템에서 활용가능성이 매우 높은 마커 뿐 아니라 효과가 확인된 국내 개발기술은 신뢰도를 좀 더 확보한 후 금후 콩 육종을 위한 분자마커시스템 확보에 활용이 가능하고 국산 SNP용 Probe 개발기술은 콩 뿐 아니라 타 작물에서도 활용 가능하여 국내 콩 생산성 향상 뿐 아니라 분자마커개발 및 활용분야 산업에도 지대한 영향을 미칠 수 있는 우수한 성과로 판단된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구 결과들은 금후 이모작체계에 적용 가능한 조숙·단기성 콩 품종 개발에 활용가능성이 매우 높아 일부 검증된 단일염기서열 set은 기술이전을 통해 새로운 분자유종에 활용뿐 아니라 종자 생산 후 순도 검정 목적 등으로 활용될 수도 있다. 또한 국산 probe 제작기술은 농·생명 분야 분자마커개발에서 이미 개발한 연구그룹 뿐만 아니라 시험연구소, 종자회사를 통한 사업화 가능성이 충분하며, 금후 국내외 학회를 통해 본 기술의 우수성을 홍보하여 국내 및 아시아시장개척이 가능할 것으로 판단된다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구를 수행과정에서 마커개발을 위해 다수의 자원을 genotyping 및 phenotyping하였고 일부의 자원은 sequencing을 실시하였으며 타 연구수행에서 도출된 SNP등을 발굴하여 분자유종의 가능성을 탐색하였고, 국산기술을 활용한 SNP genotyping용 probe의 활용 가능성 까지 검토하는 등 우수한 연구성과 창출을 위해 노력하였다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구결과는 추후 다수의 연구 성과를 생산할 수 있는 기반을 조성하였고, 이중 우수한 유전자 정보는 국내 특허출원을 위한 절차를 진행할 예정이고, 특허 출원이 끝나면 해외 저명잡지에 투고예정에 있다. 마커활용 및 분자유종성과에 대한 성과는 금년도에 개최 예정인 한국육종학회에 논문발표를 예정하고 있으며, 이후 연구성과를 기반으로 지속적인 연구성과 창출이 가능할 것으로 판단된다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 대표적인 조숙종 콩 유전자원을 대상으로 sequencing을 통해 <i>gigantea</i> 유전자서열에서 변이를 확인	20	100	○ 조숙종 콩 유전자원의 sequencing을 통해 <i>GIGANTEA</i> 유전자서열에서 변이를 확인과 확인된 단일염기서열을 활용하여 전체 유전자원을 대상으로 genotyping하여 품종개발에 활용 가능한 단일염기서열들을 발굴하여 마커 확보를 충실히 수행하였고
○ 확인된 단일염기서열을 활용하여 전체 유전자원을 대상으로 genotyping하여 품종개발에 활용 가능한 단일염기서열들을 발굴하여 마커 확보	20	100	○ 확보된 단일염기서열(SNP)마커를 분리세대에 적용하여 분자유종 시스템에 활용가능성을 확인하여 탈립성 마커의 적용가능성을 확인하였고 ○ 또한 이들 SNP마커의 검정시 국내의 probe 제작기술을 비교 검정함으로써 국내기술의 적용가능성도 확인하여 ○ 결과적으로 본 과제의 최종목표인 단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴을 충실히 달성하였음
합계	100	100	-

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서는 기업체에서 의뢰한 SNP DNA마커 개발과 genotyping기술 국산화를 통한 사업화를 실현하기 위해 콩에서 품종개발에 활용될 수 있는 SNP set을 개발하였고, 이를 분자유종시스템에 적용하고 나아가 관련 기술의 국내 산업화 가능성을 도출하였다. 따라서 본 과제의 결과는 당초의 목표를 충실히 수행하였고 해당 결과를 바탕으로 국내기업과 충분한 협의를 거쳐 사업화가능성도 높아 당초 본 사업에서 추구하는 학연계과정을 통한 산업의 활성화에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 기업이 개발한 기술의 산업화에 애로사항을 해결하기 위해 1년간 수행된 과제로 당초에 계획하였던 항목에 대한 시험수행 및 결과를 도출하여 논문화 및 성과발표를 추진하고 있으나 1년이라는 시간의 한계와 사업화에 대한 기업의 의사결정 시간소요 등으로 특허출원 및 논문화가 이루어지지 않아 성과도출의 시간이 다소 소요되고 있음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

현재까지 도출된 연구결과 중 개화기연관 유전자 발굴 및 SNP 개발은 국제학회지에 논문투고 중에 있고, 분자마커를 이용한 분리세대 검정 및 국산마커활용에 대한 부분은 학회발표 후 논문화 예정이며, 국산기술의 상업화부분은 관련 기업 간에 면밀한 검토를 거친 후 추진코자한다.

IV. 보안성 검토

o 국내기업이 개발한 국산기술을 이용한 probe 제작과정 등은 기업기밀이라 본 보고서에서는 상세히 기술할 수 없으며, 본 연구진이 수행한 연구결과 중 마커의 SNP서열 부분은 당분간 보완이 필요함

1. 연구책임자의 의견

상기의 의견에 동의함

2. 연구기관 자체의 검토결과

상기의 의견에 동의함

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴			
주관연구기관	단국대학교 산학협력단	주관연구책임자	강성택	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	50,000,000	16,670,000		66,670,000
연구개발기간	2016 . 12 . 05 .- 2017 . 12 . 04			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 대표적인 조숙종 콩 유전자원을 대상으로 sequencing을 통해 <i>GIGANTEA</i> 유전자서열에서 변이를 확인	○ 조숙종 콩 유전자원의 sequencing을 통해 <i>GIGANTEA</i> 유전자서열에서 변이를 확인과 확인된 단일염기서열을 활용하여 전체 유전자원을 대상으로 genotyping하여 품종개발에 활용 가능한 단일염기서열들을 발굴하여 마커 확보를 충실히 수행
② 확인된 단일염기서열을 활용하여 전체 유전자원을 대상으로 genotyping하여 품종개발에 활용 가능한 단일염기서열들을 발굴하여 마커 확보	○ 확보된 단일염기서열(SNP)마커를 분리세대에 적용하여 분자육종 시스템에 활용가능성을 확인하여 탈립성마커의 적용가능성을 확인 ○ 또한 이들 SNP마커의 검정시 국내의 probe 제작기술을 비교검정함으로써 국내기술의 적용가능성도 확인 ○ 결과적으로 본 과제의 최종목표인 단일염기서열 선별 세트 활용을 통한 콩 조숙종 품종개발 마커 발굴을 충실히 달성

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표											연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	1	1											1		1			1	
최종목표	1	1										1		1			0	0	
연구기간내 달성실적	0	0										0		1			1	1	
달성율(%)	0	0										0		100			100	0	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	국내 조숙콩 개화기 연관 SNP 발굴
②	콩에서 탈립성 연관 SNP 마커 활용
③	국산 Probe를 활용한 SNP genotyping

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v						v		
②의 기술		v						v		
③의 기술					v			v		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국제학회지에 논문투고 및 국내 콩 계통선발에 활용
②의 기술	학회발표 후 논문화 및 분자육종에 활용예정
③의 기술	기업의 면밀한 검토를 거친 후 사업화 추진가능

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	1	1										1		1				1	
연구기간 내 달성실적	0	0										0		1				0	
연구종료 후 성과창출 계획	1	1										1		1				1	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료 시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처 지원 R&D 바우처 시범사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.