



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0143913
(43) 공개일자 2016년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0079135
(22) 출원일자 2015년06월04일
심사청구일자 2015년06월15일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
지에이치바이오(주)
대전광역시 유성구 대덕대로 593, 1008호(도룡동, 대덕테크비즈센터)
(72) 발명자
김철희
대전광역시 유성구 어은로 57 132동 204호 (어은동, 한빛아파트)
박두상
대전광역시 유성구 과학로 125
유경원
전라북도 익산시 고봉로 30길 51 비사별아파트 104-604
(74) 대리인
이원희

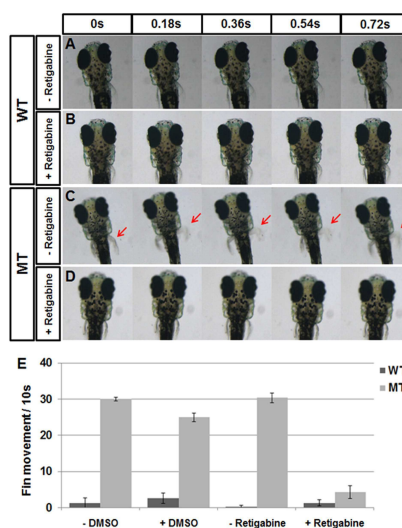
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 ZC4H2 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 동물모델 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 ZC4H2 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 형질전환 동물모델 및 이의 용도에 관한 것으로, ZC4H2 유전자 녹아웃(knock-out) 제브라피쉬(zebrafish)를 제작한 결과, 상기 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬가 운동 장애 증상을 갖고, V2a 인터뉴런, GABA성 뉴런 및 V2b 억제성 뉴런의 발현이 감소되는 것을 관찰하였으며, ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, GABA성 뉴런의 발현이 회복됨을 확인함으로써, 본 발명의 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬는 뇌전증을 포함한 운동 장애 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A01K 2227/40 (2013.01)

A01K 2267/0318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A11053562

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자(도약연구)지원사업

연구과제명 유전자가위기술(TALEN/RGEN) 기반의 KO질환모델동물 제작 및 신규 질환유전자 기능분석

기 여 율 90/100

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014031273

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업(생명연구)

연구과제명 생물자원 및 연구성과물 확보·활용사업

기 여 율 10/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

ZC4H2 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 운동 장애 관련 질환은 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 형질전환 동물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 동물은 제브라피쉬(zebrafish)인 것을 특징으로 하는 형질전환 동물.

청구항 6

ZC4H2 유전자가 녹아웃된 형질전환 수정란.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것을 특징으로 하는 형질전환 수정란.

청구항 8

ZC4H2 유전자가 녹아웃된 형질전환 정자.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것을 특징으로 하는 형질전환 정자.

청구항 10

- 1) 제 1항의 형질전환 동물에 피검화합물을 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하

는 단계를 포함하는 운동 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자등으로부터 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 운동 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 단계 2)의 증상 회복여부 판단은 신경세포 관련 유전자의 발현 변화 또는 이상 행동의 회복을 통해 판단하는 것을 특징으로 하는 운동 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 운동 장애 관련 질환은 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 운동 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 14

- 1) ZC4H2 유전자 녹아웃(knock-out) 콘스트럭트를 제조하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 수정란에서 ZC4H2 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 단계 1)의 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 단계 2)의 도입은 미세주입(microinjection)의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 운동 장애 관련 질환은 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 19

제 14항에 있어서, 상기 형질전환 동물은 제브라피쉬(zebrafish)인 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 20

제 14항에 있어서, 제조된 형질전환 동물을 야생형과 교배시켜 동형접합 형질전환체를 제조하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ZC4H2 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 형질전환 동물모델 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 신경세포의 이상으로 인한 운동의 장애를 일으키는 대표적인 질병에는 파킨슨병(parkinson's disease), 뇌전증(epilepsy) 등이 있다.

[0004] 파킨슨병은 신경퇴행성 질환으로써, 신경퇴행성 질환은 신경세포들이 어떤 원인에 의해 소멸하게 되어 이로 인해 뇌 기능의 이상을 일으키는 질병을 지칭한다. 파킨슨병, 파킨슨증후군 등 의미의 구분이 어려우나 대표적인 증상으로 안정시 떨림, 손 떨림, 근육 경직, 자세 불안정 등의 특징적 양상을 보이며 현대 의학 발전으로 인해 약물 치료로 인해 호전을 보일 수 있다. 국내에서는 파킨슨병 자체에 대해 대규모 연구가 부족한 상황이며, 위와 같은 증상을 보이는 경우, 유병률이 18세 이상에서 10만명 당 374명, 60세 이상에서는 1.47%로 나타났다.

[0005] 한편, 또 다른 질병인 간질 또는 뇌전증은 만성적인 신경 장애의 하나이며, 현대의학의 급격한 발전은 뇌전증(간질)의 개념을 과거의 치유될 수 없는 만성 질환으로부터 치유 가능한 질병으로 바꾸었다.

[0006] 뇌전증(간질)의 핵심을 이루는 증상은 간질성 발작(epileptic seizure)이며, 간질성 발작은 국소성 뇌병변이나 전신성 대사장애, 약물중독, 저산소증, 두부외상 또는 극심한 과로 및 수면부족 등 여러가지 요인에 의해 발생되는 증후성 증상이다. 간질성 발작은 신경생리학적으로 갑작스럽고 무질서한 대뇌피질세포의 이상흥분상태라고 정의되는데, 이는 임상적으로 발작 뇌파 소견에 의해 쉽게 이해될 수 있다. 정상적인 기능을 하던 신경세포가 왜 갑작스러운 이상흥분상태로 전환하는가에 대해서는 아직 확실히 알려져 있지 않지만 정상적 뇌기능을 위한 흥분과 억제 균형 조절이 여러가지 원인에 의해 깨지게 됨으로써 발생하는 것으로 이해되고 있고, 이는 실험적으로 흥분성 신경전달물질의 기능을 증가시키거나 또는 억제성 신경전달물질의 기능을 억압시킬 경우에 간질성 발작이 일어나게 되는 현상에 의해 뒷받침된다.

[0007] X-성염색체 연관된 지적장애(X-linked intellectual disability, XLID)의 하나인 Miles-Carpenter Syndrome(MCS)의 원인유전자로 밝혀진 ZC4H2 유전자는 결손시 뇌전증과 같은 운동장애 질환을 보임이 보고되어 있어 있으나, 명확한 매커니즘은 규명되지 않고 있다.

[0008] 뇌전증은 소아기와 노년기에서 많은 발병률을 보이며 뇌전증 환자는 세계적으로 전 인구의 1% 내지 1.5% 정도의 비율로 발생하고 있으며, 특히 후진국이나 개발도상국에서 보고된 발생률은 대부분 100,000명당 100명 이상으로 비교적 높은 반면 선진국의 경우에는 40 내지 70명 정도로 비교적 낮게 보고되어 있다. 특히 우리나라에도 약 40만 명 정도 환자가 있을 것으로 추정된다.

[0010] 형질전환 동물(transgenic animals)은 인위적으로 외부의 유전자를 삽입하거나 또는 유전자를 제거하여 의도하는 유전형질을 발현시킨 동물을 말하며, 생명체에서의 특정 유전자의 역할을 파악하는 기초연구에 유용하게 쓰일 수 있다. 즉, 그 기능이 의심되는 유전자를 삽입 또는 결실시키고, 그 영향이 어떻게 나타나는지를 관찰하여 상기 유전자가 매개하는 생리적 기능을 유추할 수 있다. 뿐만 아니라, 형질전환 동물은 사람 질병의 모델로서 사용할 수 있고, 질병의 원인이나 질병의 진행과정 등을 파악하거나 잠재적 치료약품의 효과나 부작용을 알

아보는데 매우 유용하다. 현재 치매, 암, 심장병, 유전병 등의 질병에 걸린 형질전환 마우스, 제브라피쉬 등이 개발되고 있다.

[0012] 제브라피쉬(zebrafish)는 발생배가 투명하고, 체외수정을 하며, 수정란을 대량으로 쉽게 확보할 수 있고, 발생이 매우 빨라 대부분의 조직 및 장기가 하루만에 형성된다. 또한, 현재 전체 유전체의 유전정보가 밝혀졌고 이를 제브라피쉬 데이터베이스를 통해 쉽게 검색할 수 있으며, 척추동물로서 유전체 구성이 인간과 비슷하다는 장점이 있기 때문에, 인간 유전자의 기능분석 및 천연물이나 화합물을 대상으로 생체기능조절물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용되어왔다. 상기의 장점으로 인해 형질전환 제브라피쉬에 관한 연구는 매우 활발히 진행되어왔으며, 제브라피쉬 형질전환 기술은 포유류에 적용되는 기술이 용이하게 적용되고 있다. 제브라피쉬의 배아(embryo)는 수적으로 대량으로 쉽게 구할 수 있고, 투명하여 다루기 쉬우며, 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)나 트랜스포손(transposon) 등의 다양한 벡터가 적용될 수 있는 장점이 있다.

[0014] 이에 본 발명자들은 쉽고 빠르게 접근할 수 있는 인간의 질환 모델을 개발하기 위해 노력하던 중, ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬가 Miles-Carpenter Syndrome 환자의 증상과 매우 유사한 운동 장애 증상을 갖고, V2a 인터뉴런, GABA성 뉴런 및 V2b 억제성 뉴런의 발현이 감소되는 것을 관찰하였으며, ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, GABA성 뉴런의 발현이 회복됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 ZC4H2 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 형질전환 동물모델 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ZC4H2 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 ZC4H2 유전자가 녹아웃된 형질전환 수정란을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 ZC4H2 유전자가 녹아웃된 형질전환 정자를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은,

[0022] 1) 본 발명의 형질전환 동물에 피검화합물을 처리하는 단계; 및

[0023] 2) 상기 단계 1)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 단계를 포함하는 운동 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은,

[0025] 1) ZC4H2 유전자 녹아웃(knock-out) 콘스트럭트를 제조하는 단계;

[0026] 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계; 및

[0027] 3) 상기 단계 2)의 수정란에서 ZC4H2 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법을 제공한다.

[0028]

발명의 효과

[0029] 본 발명은 ZC4H2 유전자 녹아웃(knock-out) 제브라피쉬(zebrafish)를 제작한 결과, 상기 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬가 운동장애 증상을 갖고, V2a 인터뉴런, GABA성 뉴런 및 V2b 억제성 뉴런의 발현이 감소되는 것을 관찰하였으며, ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, GABA성 뉴런의 발현이 회복됨을 확인함으로써, 본 발명의 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬는 운동 장애 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 유

용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 인간, 마우스 및 제브라피쉬의 ZC4H2 아미노산 서열 비교를 나타낸 도이다.

도 2는 제브라피쉬(zebrafish)에서 ZC4H2의 시간적 및 공간적 발현양상을 나타낸 도이다.

도 2A 및 2B는 48 hpf 제브라피쉬에서 ZC4H2의 시간적 및 공간적 발현양상을 나타낸 도이다.

도 2C, 2D 및 2E는 도 2B의 단면을 절단하여 나타낸 도이다.

도 3은 TALEN(transcription activator-like effector nuclease)을 이용한 ZC4H2 녹아웃 콘스트럭트 제작 설계를 나타낸 도이다.

도 3A는 ZC4H2 엑손2의 TALEN-매개 돌연변이 타겟 사이트를 나타낸 도이다.

도 3B는 TALEN-매개 돌연변이 병변을 나타낸 도이다.

도 3C는 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬를 판별하는 PCR 결과를 전기영동 결과를 통해 나타낸 도이다.

도 4는 ZC4H2 유전자 녹아웃(knock-out) 제브라피쉬의 운동장애 증상(hyperactivity)을 나타낸 도이다.

도 4A 및 4B는 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 턱 움직임의 정도 및 빈도의 양상을 나타낸 도이다.

도 4C 및 4D는 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 비정상적인 시각운동을 나타낸 도이다.

도 4E 및 4F는 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 비정상적인 가슴 지느러미 움직임을 나타낸 도이다.

도 5는 ZC4H2 정상과 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 운동뉴런의 존재를 나타낸 도이다.

도 5A 및 5B는 운동뉴런을 표지하는 is11유전자의 발현을 나타낸 도이다.

도 5C, 5D, 5E 및 5F는 운동뉴런과 정상적인 축삭돌기를 표지하는 Znp1 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

도 6은 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 뉴런 발현 양상을 나타낸 도이다.

도 6A, 6B, 6C 및 6D는 V2a 인터뉴런 및 V2a/b 전구체를 표지하는 vsx2 및 vsx1의 발현을 나타낸 도이다.

도 6E 및 6F는 복부 신경 전구체 도메인(ventral neural progenitor domains) 인접 부위를 표지하는 nkx6.1 및 dbx2의 발현을 나타낸 도이다.

도 6G 및 6H는 GABA성 뉴런을 표지하는 gad1의 발현을 나타낸 도이다.

도 6I 및 6J는 V2b 저해성 인터뉴런을 표지하는 gata3의 발현을 나타낸 도이다.

도 6K 및 6L은 글라이신 뉴런을 표지하는 glyt2a의 발현을 나타낸 도이다.

도 6M 및 6N은 글루타메이트 흥분성 뉴런을 표지하는 vglut2.1의 발현을 나타낸 도이다.

도 7은 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, 뉴런 발현 양상을 나타낸 도이다.

도 7A 및 7B는 정상 제브라피쉬와 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 gad1 발현을 나타낸 도이다.

도 7C, 7D, 7E 및 7F는 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, gad1 발현을 나타낸 도이다.

도 7G, 7H, 7I, 7J, 7K 및 7L은 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때와 복원하지 않았을 때의 gad1 발현을 정량 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 뇌전증치료제 레티가빈을 처리하였을 때, 비정상적인 턱 근육의 움직임에 대한 조절효과를 나타낸 도이다.

도 8A 및 8B는 정상 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 턱 근육 움직임을 나타낸

도이다.

도 8C 및 8D는 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 턱 근육 움직임을 나타낸 도이다.

도 8E는 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 턱 근육 움직임에 대한 정량 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때, 비정상적인 가슴 지느러미 움직임에 대한 조절효과를 나타낸 도이다.

도 9A 및 9B는 정상 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 가슴 지느러미 움직임을 나타낸 도이다.

도 9C 및 9D는 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 가슴 지느러미 움직임을 나타낸 도이다.

도 9E는 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 레티가빈을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때의 가슴 지느러미 움직임 변화에 대한 정량 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 ZC4H2 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물을 제공한다.
- [0033] 상기 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 또한, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0035] 또한, 상기 운동 장애 관련 질환은 외상후 뇌전증을 포함하는 뇌전증, 파킨슨씨 병, 소아성 뇌전증, Miles-Carpenter Syndrome, 정신병, 편두통, 대뇌 빈혈, 알츠하이머 병, 헌팅턴 무도병, 조발성 치매, 강박 반응 이상(OCD), AIDS와 연관된 신경병학적 결함, 수면 장애(불면증 및 수면 발작 포함), 질드라투렛 증후군(Gilles de la Tourette's syndrome)과 같은 경련, 외상성 대뇌 손상, 이명(耳鳴), 신경통, 신경성 통증, 치통, 암 통증, 당뇨병과 같은 질병에서 신경 건강 불량을 유발하는 부적절한 신경 활성화, 다발성 경화증(MS), 운동성 뉴런 질병, 운동실조증, 근경직증(경련성), 측두하악골 관절 기능 장애 및 근 위축성 측색 경화증(ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증인 것을 특징으로 한다.
- [0036] 또한, 상기 제조방법의 형질전환 동물은 제브라피쉬인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 임상 보고서를 바탕으로 Miles-Carpenter Syndrome(MCS) 질환을 가진 환자들이 공통적으로 ZC4H2 돌연변이 유전자를 갖는 것을 발견하였으며, 이를 바탕으로 다형성 분석(Polymorphism analysis) 및 발현 조직 분석을 통해 ZC4H2 유전자의 변이 및 발현 조직을 확인하였다. 이 후, 제브라피쉬에서 상기 유전자를 분리하여, 인간 및 마우스와 아미노산 서열의 상동성을 분석하였으며(도 1 참조), ZC4H2 유전자가 주로 발달중인 CNS 근처에서 발현됨을 확인하였고(도 2 참조), ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬를 제작하여(도 3 참조) 관찰한 결과, 정상 제브라피쉬와 비교하여 ZC4H2 녹아웃 제브라피쉬가 지나친 턱 근육의 경직현상이 보여지며, 비정상적으로 활발한 가슴 지느러미의 움직임을 갖고, 사람의 외사시 증상과 유사하게 눈의 위치가 비정상적으로 위치되는 것을 확인하였다(도 4 참조). 다만, ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬는 정상 제브라피쉬와 마찬가지로 정상적인 운동뉴런 및 축삭돌기의 형성을 확인하였다(도 5 참조). ZC4H2 유전자 녹아웃으로 인해 V2a 인터뉴런, GABA성 뉴런 및 V2b 억제성 뉴런의 발현이 감소되는 것을 관찰하였으며(도 6 참조), ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, GABA성 뉴런의 발현이 회복됨을 확인하였다(도 7 참조). 또한, ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에 뇌전증치료제로 승인된 레티가빈을 처리하였을 경우 비정상적으로 활발한 턱 및 가슴 지느러미의 움직임이 억제됨을 확인하였다(도 8, 9 참조). 따라서, 본 발명은 뇌전증, 경련 및 발작과 유사 증상을 보이는 ZC4H2 유전자 녹아웃 형질전환 제브라피쉬를 제작하였으며, 이를 이용한 관련 질환 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

- [0040] 본 발명은 ZC4H2 유전자가 녹아아웃된 형질전환 수정란을 제공한다.
- [0041] 본 발명은 ZC4H2 유전자가 녹아아웃된 형질전환 정자를 제공한다.
- [0042] 상기 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0044] 본 발명은,
- [0045] 1) 본 발명의 형질전환 동물에 피검화합물을 처리하는 단계; 및
- [0046] 2) 상기 단계 1)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 단계를 포함하는 운동 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 상기 단계 1)의 형질전환 동물은 제브라피쉬인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 또한, 상기 운동 장애 관련 질환은 외상후 뇌전증을 포함하는 뇌전증, 파킨슨씨 병, 소아성 뇌전증, Miles-Carpenter Syndrome, 정신병, 편두통, 대뇌 빈혈, 알츠하이머 병, 헌팅턴 무도병, 조발성 치매, 강박 반응 이상(OCD), AIDS와 연관된 신경병학적 결함, 수면 장애(불면증 및 수면 발작 포함), 질드라투렛 증후군(Gilles de la Tourette's syndrome)과 같은 경련, 외상성 대뇌 손상, 이명(耳鳴), 신경통, 신경성 통증, 치통, 암 통증, 당뇨병과 같은 질병에서 신경 건강 불량을 유발하는 부적절한 신경 활성화, 다발성 경화증(MS), 운동성 뉴런 질병, 운동실조증, 근경직증(경련성), 측두하악골 관절 기능 장애 및 근 위축성 측색 경화증(ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증인 것을 특징으로 한다.
- [0050] 또한, 상기 피검화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0051] 또한, 상기 단계 2)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 방법은 예를 들면, 꼬리 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 방법 또는 녹아아웃 배아의 이상 증상을 육안으로 판별하는 방법 등을 들 수 있으며, 이상 증상을 육안으로 판별하는 것이 용이하다.
- [0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명의 방법으로 제작된 ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬가 사람의 환자에서의 증상과 유사한 운동 장애 증상을 갖고 있고, 상기 녹아아웃 제브라피쉬에 뇌전증치료제인 레티가빈을 5 μ M의 농도로 처리한 그룹에서 발작 증상이 억제되는 것을 확인하였다(도 8 및 도 9 참조). 따라서, 본 발명의 녹아아웃 제브라피쉬는 뇌전증, 파킨슨병 등의 운동장애 관련 질환의 약물 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명은,
- [0056] 1) ZC4H2 유전자 녹아아웃(knock-out) 콘스트럭트를 제조하는 단계;
- [0057] 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계; 및
- [0058] 3) 상기 단계 2)의 수정란에서 ZC4H2 유전자 녹아아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법을 제공한다.
- [0059] 상기 단계 1)의 ZC4H2 유전자는 서열번호 9로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0060] 또한, 상기 단계 1)의 녹아아웃 콘스트럭트는 유전자 가위를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 유전자 가위는 ZFN(zinc-finger nuclease), TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 및 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 TALEN을 선택하여 사용하였다. 또한, 상기 TALEN을 포함하는 돌연변이 유발 전달체는 ZC4H2를 녹아아웃시키는 것이 바람직하

나, ZC4H2 서열 전체 뿐만 아니라 서열의 일부만 녹아아웃 된 경우도 모두 포함한다.

- [0061] 또한, 상기 단계 2)의 수정란은 제브라피쉬(zebrafish)의 수정란인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물 유래 수정란을 모두 사용할 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 단계 2)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 방법은 유전자 콘스트럭트를 제조한 후 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 정자를 이용하는 방법(sperm-mediated gene transfer), 바이러스 감염법(viral infection), 직접근육주입법(direct muscle injection), 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존(trnasposon)을 이용한 기법 중에서 적절하게 선택하여 형질 전환 시킬 수 있다. 본 발명에서는 발현 백터를 제브라피쉬의 배아에 미세주입법으로 형질전환시켰다.
- [0063] 또한, 상기 단계 3)의 ZC4H2 유전자 녹아아웃 배아를 선별하는 단계는 당업계에 주지된 각종 방법에 따라 선별될 수 있다. 이러한 선별 방법을 예를 들면, 꼬리 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 방법 또는 녹아아웃 배아의 이상 증상을 육안으로 판별하는 방법 등을 들 수 있으며, 이상 증상을 육안으로 판별하는 것이 바람직하다.
- [0064] 또한, 상기 제조방법의 형질전환 동물은 제브라피쉬인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0066] 또한, 상기 운동 장애 관련 질환은 외상후 뇌전증을 포함하는 뇌전증, 파킨슨씨 병, 소아성 뇌전증, Miles-Carpenter Syndrome, 정신병, 편두통, 대뇌 빈혈, 알츠하이머 병, 헌팅턴 무도병, 조발성 치매, 강박 반응 이상(OCD), AIDS와 연관된 신경병학적 결함, 수면 장애(불면증 및 수면 발작 포함), 질드라투렛 증후군(Gilles de la Tourette's syndrome)과 같은 경련, 외상성 대뇌 손상, 이명(耳鳴), 신경통, 신경성 통증, 치통, 암 통증, 당뇨병과 같은 질병에서 신경 건강 불량을 유발하는 부적절한 신경 활성화, 다발성 경화증(MS), 운동성 뉴런 질병, 운동실조증, 근경직증(경련성), 측두하악골 관절 기능 장애 및 근 위축성 측색 경화증(ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증인 것을 특징으로 한다.
- [0067] 또한, 본 발명의 방법으로 제조된 형질전환 동물을 야생형과 교배시켜 동형접합 형질전환체를 제조하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 임상 보고서를 바탕으로 Miles-Carpenter Syndrome(MCS) 질환을 가진 환자들이 공통적으로 ZC4H2 돌연변이 유전자를 갖는 것을 발견하였으며, 이를 바탕으로 ZC4H2 유전자가 녹아아웃된 제브라피쉬에서 환자의 뇌전증 증상과 유사하게 비정상적으로 턱 및 가슴 지느러미 근육의 경직성 및 멈추지 않는 움직임을 갖고(hyperactivity), 눈의 위치가 비정상적인 것(사시)(도 4 참조)을 확인함으로써, 환자에서의 증상과 매우 유사한 뇌전증, 경련 및 발작 증상을 보이는 ZC4H2 유전자 녹아아웃 형질전환 제브라피쉬를 제작하였다.
- [0071] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0072] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0074] <실시예 1> 임상 보고서를 바탕으로 ZC4H2 돌연변이 유전자 확인
- [0075] X-성염색체 연관된 지적장애(X-linked intellectual disability, XLID)의 하나인 Miles-Carpenter Syndrome(MCS)의 원인유전자를 규명하기 위하여, K8070, K8615, K9333 및 K9611 가계에서 MCS 질환을 가진 14명의 남성을 대상으로 질환의 증상 및 유전적 결함을 조사하였다.
- [0076] 임상 평가 결과, MCS 질환을 가진 남성의 50% 이상이 지적 장애(intellectual disability)를 갖고, 언행이 느리며, 작은 키, 소두(microcephaly), 말단 근무기력증(distal muscle weakness), 비정상적인 발(흔들의자바닥 기형(rocker-bottom), 평발(pes planus), 내반족(club foot)), 무릎 또는 팔꿈치 경축(contractures), 좁은 어

깨, 높은 목통, 하수증(ptosis), 외사시(exotropia), 긴 인중(long philtrum), 높은 아치형 구개(highly arched palate), 척추 만곡(spinal curvature)(척추 후만증(kyphosis), 척추 측만증(scoliosis), 척추 전만(lordosis)), 긴장 감퇴(hypotonia), 침 흘림(drooling), 및 뇌성마비성 경직(spasticity)과 같은 증상을 보였다.

[0077] 이에, 상기 MCS 질환 대상자로부터 원인유전자 및 유전자 돌연변이를 확인하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0078] 구체적으로, K8070 가계의 X-염색체의 718개 유전자에 대해 엑손 캡처(Exon capture) 및 딥시퀀싱(deep sequencing)을 수행하였다.

[0079] K8615 가계의 X-염색체의 XLID과 연관된 Xq12 지역의 스크리닝은 M13이 태그된 ZC4H2 엑손 프라이머를 이용하여 수행하였으며, PCR 생성물은 USB의 ExoSap으로 증폭되고 정제되었다. 상기 정제된 PCR 생성물은 M13 프라이머와 ABI 3730을 이용하여 라이프 테크놀로지(Life Technologies)사의 BIGDye 터미네이터 v3.1 사이클 시퀀싱 키트(BIGDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit)를 이용하여 수행하였으며, 디엔에이스타(DNASTAR)의 SEQMAN로 서열 데이터를 분석하였다. 영향을 받은 남성 질환자에서 R213W 변환이 발견되어, 모든 가족에게 실험되었다.

[0080] K9333 가계의 유전자 분석을 위해, Truseq DNA 샘플 준비 키트를 이용하여, XLID 남성 질환자 82명의 gDNA 샘플로 일루미나 시퀀싱 라이브러리(Illumina sequencing library)를 제작하였다. X 염색체의 엑손은 애질런트 슈어셀렉트 X 염색체 엑손 키트(Agilent SureSelect X chromosome exome kit)를 사용하여 농축하였다. 각각의 라이브러리는 고유 바코드화 되었으며, 75-bp 또는 100-bp pair-end 모듈을 사용하여 일루미나 HiSeq2000 플랫폼에서 서열화되었다. INDEL의 재편성과 염기 재교정은 GATK를 사용하여 수행하였다. 최종 변이 결과는 한 가닥에서 제로 범위의 변이를 제거하고, 동일한 샘플에서 다른 변이에 근접한(<10 bp) 변이를 제거하여 사전 처리되었다. 잠재적인 XLID 변이는 sib-pair 비교 필터를 이용하여 규명되었다. XLID의 회소성을 감안할 때, 상기 필터는 독특한 XLID 변이가 드물고, 오직 영향을 받은 가족 구성원 사이에 공유한 것으로 가정하였다. 시퀀싱에서 변이 결과는 상기 집단의 연관 샘플 사이에서 공유되는 변이는 고정되고, 관계없는 샘플 사이에 공유되는 변이는 제거되며 필터되었다. 추가적으로, 1000개의 지놈 프로젝트로부터 162 남성 샘플(MCS 영향을 받지 않은 그룹)에서 공유된 변이도 제거되었다. 상기 필터는 샘플 당 1774 ± 240 변이에서 샘플당 31 ± 5 변이로 변이의 총 수를 감소시켜주며, 잠재적인 질병을 일으키는 돌연변이의 식별을 용이하게 해주었다.

[0081] K9611 가계의 유전자 분석을 위해, 가계 모든 세대의 개인의 DNA가 추출되었다. 유전적 연관성은 70 mb의 최소 간격 규명된 DXS993(Xp11.4)와 DXS8055(Xq23) 사이에 확인되었다. 큰 간격 및 후보 유전자에 상응하는 수를 고려하여, 가계 내 몇몇의 개인을 대상으로, 2010년 Drmanac 등에 의해 기술된 시퀀싱 바이 라이 게이션 방법(sequencing-by-ligation method)을 사용하여, 컴플리트 지노믹스사(Complete Genomics Inc. Mountain View, CA, USA)에서 전체 게놈 이배체 시퀀싱(whole genome diploid sequencing)을 수행하였다.

[0082] ZC4H2의 변이는 gDNA의 두 번째 샘플에서 생거 시퀀싱(Sanger Sequencing)을 이용하여 확인되었으며, 4 가계의 다른 구성원들도 서열화되었다.

[0084] <실시예 2> 다형성 분석(Polymorphism analysis)

[0085] 대립 유전자 특정 증폭(ASO)으로 구성된 ZC4H2 c.484T>A 변이 및 정상 대조군(ZNF711) 스크리닝이 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 수행되었다. ZC4H2 생성물은 177 bp이며, ZNF711 생성물은 498 bp 이다.

표 1

서열 번호	서열
ZC4H2 ASO K8070F(서열 번호 1)	5' ATGGCCCATGTGGAGGAtCa 3'
ZC4H2 ASO K8070R(서열 번호 2)	5' CACTACCACAGCCTGCACTGA 3'
ZNF711 ex 4AF(서열 번호 3)	TTCCTGGTTGTTTGATTTT
ZNF711 ex 4AR(서열 번호 4)	ACAAGGTCAGCCACGAAAAC

[0088] <실시예 3> 제브라피쉬 사육 및 관리

[0089] 제브라피쉬는 공지된 문헌들과 동일한 기준 조건하에서 유지 관리되었다. 야생형(wild type) 제브라피쉬는 수족관(서울아쿠아리움, 대전)에서 구입하였으며, 먹이는 시판하고 있는 브라인 쉬림프(brine shrimp)를 부화시켜 사육하였다. 제브라피쉬는 온도 28.5℃, 오전 9시부터 오후 10시까지 점등하고, 그 외 시간 소등 조건에서 사육하였다. 상기 제브라피쉬에서 수득된 수정란은 에그 워터(egg water, Sea Salts, 280g)를 사용하여 세척하였고, 페트리 디쉬(petri dish)에서 발생시켰다. 그런 다음, 발생과정은 해부현미경을 통하여 관찰하였으며, 발생배를 시간별, 형태학적 변화에 따라 선별하여 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)/PBS로 고정하였다. 제브라피쉬와 관련된 모든 실험은 충남대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committees of Chungnam National University) 승인 하에 진행되었다.

[0091] <실시예 4> ZC4H2 유전자 발현 확인

[0092] <4-1> 제브라피쉬로부터 ZC4H2 유전자 분리

[0093] 제브라피쉬 ZC4H2 유전자는 24 hpf 제브라피쉬의 cDNA 라이브러리에서 분리되었고, pGEM-T 이지 벡터 시스템(pGEM-T Easy Vector System, Promega, A1360)으로 첫번째 클로닝을 하였고, pCS2+ 발현 벡터로 EcoRI 을 이용하여 서브-클로닝하였다. PCR에 이용된 프라이머는 표 2와 같다:

표 2

서열 번호	서열
zc4h2 F(서열 번호 5)	5' -ATGGCGGCGAGCAAGAGATAA-3'
zc4h2 R(서열 번호 6)	5' -TGTTACTCGTCAGGTTTCTCTTG-3'

[0096] <4-2> ZC4H2 유전자의 시간적 및 공간적 발현양상 확인

[0097] ZC4H2 유전자의 시간적 및 공간적 발현양상을 확인하기 위하여, 홀-마운트 정위치 교잡법(whole-mount *in situ* hybridization)을 수행하여 확인하였다.

[0098] 구체적으로, ZC4H2의 안티센스-디고옥시제닌 표지 RNA 프로브(Antisense digoxigenin-labeled RNA probes)를 DIG 및 형광 RNA 라벨링 믹스(Fluorescein RNA Labeling Mix, Roche catalogue number 11277073910, 11685619910)를 이용하여 제조사 프로토콜에 따라 합성하였다. 광학현미경을 통해 수정 후, 단계별로 적절한 시기의 수정란을 4% 파라포름알데하이드/PBT에 첨가하여 4℃에서 12시간 이상 고정시켰다. 수정 20시간 이상 지난 수정란은 핀셋으로 융막(chorion)을 제거한 후 꼬리가 휘지 않도록 고정시켰고, 그 이전의 수정란은 고정을 미리 한 후 융막을 제거하였다. 또한, 꼬리 싹(tail bud, 수정 후 10시간)시기부터 0.2 mM PTU(phenylthiourea)/embryonic water를 넣어 피부색소 형성(pigmentation formation)을 억제시켰다. 융막이 제거되고 고정된 수정란은 PBT(1X phosphate buffered saline, 0.1% Tween-20)로 5분 동안 3회 수세한 후, 100% 메탄올(MeOH)을 사용하여 3 내지 4번 정도 교체해 주었고, 메탄올 상태로 -20℃에서 보관하였다. 메탄올로 보관된 상기 발생배들을 75%, 50% 및 25% MeOH/PBS로 5분씩 단계별로 세척한 뒤, PBT를 사용하여 5분 간격으로 5번 세척하였다. 발생단계에 따라 10 µg/ml 프로테이나아제 K(proteinase K)를 포함하는 PBT를 상기 발생배에 처리한 뒤 PBT를 사용하여 3 내지 4회, 5분 간격으로 세척하였고, 4% 파라포름알데하이드/PBT로 30분 이상 상온에서 고정시켰다. 발생배가 상하지 않도록 조심히 PBT로 5분 간격으로 5회 세척한 뒤, 300 µl HYB(50% 포름아미드, 5X SSC, 0.1 % Tween-20)를 첨가하고 68℃에서 15분 동안 방치하였다. 그런 다음, 50% HYB(50% 포름아미드, 5X SSC, 5 mg/ml 토룰라(torula) RNA, 50 µg/ml 헤파린(heparin), 구연산(Citric acid), pH6, 0.1% Tween-20)을 300 µl씩 첨가하고 68℃에서 1 내지 2시간 이상 prehybridization시킨 후 프로브(probe)를 30 내지 100 ng정도 첨가하여 68℃에서 12시간 동안 교배(hybridization)시켰다. 68℃를 유지한 상태에서 프로브(probe)를 제거하고 100%, 75%, 50% 및 25%의 HYB*/0.2X SSCT를 순차적으로 15분마다 세척하였다. 상기과 동일한 온도에서 2 X SSCT로 교체하여 20분 동안 세척하였으며, 0.2X SSCT에서 30분마다 5회 수세하여 하이브리드(hybrid)를 하지 못한 프로브(probe)를 제거하였다. 그런 다음, 상온에서 75%, 50% 및 25%의 0.2X SSCT/PBT를 사용하여 5분 간격으로 순차적으로 교체하고 PBT로 5분마다 5회 수세하였다. 발색 및 발현부위를 확인하기 위하여, 5% 말혈청(horse serum)/PBT를 300 µl 첨가하여 상온에서 1시간 동안 방치하고, 프로브(probe)가 붙지 않은 곳에 혈청(serum)이 붙어 항체반응 시 발색 및 발현이 되지 않게 차단하였다. 그런 다음, 5% 말혈청/PBT에

1/4000배로 희석시킨 항-DIG-AP Fab(anti-DIG-AP Fab)(150 u/200 μ l; 로슈, 독일)을 300 μ l 첨가하고, 상온에서 4시간 또는 4℃에서 12 내지 16시간 동안 반응시켰다. PBT로 10분간 6번, 20분간 6번, 30분간 8번 이상 세척한 다음 염색 버퍼(staining buffer)(0.1 M Tris-Cl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20)를 사용하여 5분간 3번 세척하였다. 발색기질인 NBT/BCIP(Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo 4-Chloro 3- Indolyl Phosphate)의 저장액(stock)을 염색 버퍼에 각각 4.5 μ l/ml(저장액: 디메틸포름아미드 50 mg/ml NBT를 포함하는 디메틸포름아미드)과 3.5 μ l/ml(저장액: 50 mg/ml BCIP를 포함하는 디메틸포름아미드)를 첨가하여 빛을 차단한 상온에서 반응시킨 후, 현미경으로 관찰하여 염색부위를 확인하였다. 염색이 끝난 수정란들은 정지 용액(stop solution)(1X PBS pH 5.5, 1mM EDTA, 0.1% Tween-20)을 이용하여 5분씩 4번 세척한 다음 100% 메탄올로 10분 동안 4 내지 5번 정도 씻어주어 탈수(dehydration) 시킨 후 -20℃에서 보관하였다. 사진 작업은 75% 글리세롤(glycerol) 또는 벤질 벤조산(Benzyl Benzoate) : 벤질 알코올(Benzyl Alcohol)(2:1) 용액에서 MZ-16 현미경(라이카, 미국)을 이용하여 수행하였다.

[0099] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, ZC4H2 전사는 주로 발달중인 CNS 근처에서 발견되었으나 분화 전구세포 및 성숙 신경세포 또는/및 글리아가 발현될 것으로 예측되는 내측 심실조직(medial ventricular zone)부터 발견되지 않았다(도 2).

[0101] <4-3> 홀-마운트 면역조직화학 염색법

[0102] ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 운동뉴런 및 축삭돌기의 형성을 관찰하기 위하여 홀-마운트 면역조직화학 염색법(Whole-mount immunohistochemistry staining)을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 수정 후 24시간 및 36시간의 정상 및 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬 수정란은 핀셋으로 융막(chorion)을 제거한 후 꼬리가 휘지 않도록 4% 파라포름알데하이드/PBT에 첨가하여 4℃에서 12시간 이상 고정시켰다. 융막이 제거되고 고정된 수정란은 PBT(1X phosphate buffered saline, 0.1% Tween-20)로 5분 동안 3회 수세한 후, 100% 메탄올(MeOH)을 사용하여 3 내지 4번 정도 교체해 주었고, 메탄올 상태로 -20℃에서 보관하였다. 메탄올로 보관된 상기 발생배들을 75%, 50% 및 25% MeOH/PBS로 5분씩 단계별로 세척한 뒤, PBT를 사용하여 5분 간격으로 5번 세척하였다. 2% 말혈청(horse serum)/PBT를 300 μ l 첨가하여 상온에서 1시간 동안 방치한 뒤, 2% 말혈청/PBT에 1/500배로 희석시킨 1차 항-Znp-1 마우스 단일클론항체를 300 μ l 첨가하고, 상온에서 4시간 또는 4℃에서 12 내지 16시간 동안 반응시켰다. PBT로 15분간 4번 세척한 뒤, 2%말혈청/PBT에 1/600배로 희석시킨 2차 항-마우스-FITC 항체를 500 μ l 첨가하고, 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBT로 15분간 2번 세척한 뒤, 75% 글리세롤(glycerol)에서 MZ-16 현미경(라이카, 미국)을 이용하여 사진작업을 수행하였다.

[0104] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 정상과 ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 운동뉴런 및 축삭돌기는 정상적인 발생을 하는 것으로 확인하였다(도 5).

[0106] <실시예 5> ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬 라인 제작

[0107] ZC4H2 유전자가 녹아웃된 제브라피쉬를 제조하기 위해 TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 방법을 이용하였다.

[0108] 구체적으로, ZC4H2의 2번째 엑손을 타겟팅하는 TALEN 벡터는 툴젠사(ToolCen)를 통해 고안되고 구성되었다(도 3). TALEN 벡터는 PvuII에 의해 선형화되며 에탄올 침전법(ethanol precipitation)에 의해 정제되었다. mRNAs를 인코딩하는 왼편 및 오른편 TALENs는 mMESSAGE mMACHINE T7 전사 키트(Ambion, AM1344)를 이용하여 합성하였고, 페놀/클로로포름 침전법에 의해 정제되었다. TALEN mRNAs를 수정된 하나의 배아 세포에 미세주입(microinjection)하였다. 그리고나서, 위치-특이적 TALEN 기능은 gDNA의 분리를 통해, 타겟-특이적 PCR 및 T7 엔도뉴클라아제 1(endonuclease 1) 실험에 의해 확인되었다. gDNA는 단일 유생 혹은 성체의 지느러미 조직(fin-clipped tissues)으로부터 분리되었고, gDNA 분리버퍼(10 mM Tris, 50 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.5% SDS 및 7 0.5 mg/ml 프로테아제 K)를 이용하여 55℃에서 12시간 동안 용해시켰다. gDNA는 페놀/클로로포름 방법을 이용하여 정제되었다. 구체적으로, gDNA를 주형으로하여 최종 반응 부피 20 μ l로 PCR 분석을 수행되었다. 하기 표 3의 프라이머로 수행되었으며, 초기 열변성 과정으로 95℃ 5분 1번 반복, 열변성(denature) 과정 95℃ 30초, 결합(annealing) 과정 55℃ 30초, 중합(extension) 과정 72℃ 30초 30번 반복, 최종 중합 과정으로 72℃ 7분 1번 반복하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응물의 10 μ l를 1X TAE 버퍼 및 3% 아가로스젤을 이용하여 전기영동하였다.

표 3

서열 번호	서열
zc4h2 exon2 F(서열 번호 7)	5' -GACCGAGTTTGAAGTCTGG-3'
zc4h2 exon2 R(서열 번호 8)	5' -CACGTTAATATCCGCATGAATG-3'

[0109]

[0111]

그 결과, 제작된 제브라피쉬에서 ZC4H2 유전자가 녹아아웃 된 것을 확인하였다(도 3).

[0113]

<실험예 1> ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬의 행동 관찰

[0114]

상기 <실시에 5>에서 제작된 ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬의 ZC4H2 유전자 손실이 제브라피쉬의 행동에 미치는 영향을 확인하기 위해 행동 관찰을 수행하였다.

[0115]

구체적으로, 자유 수영을 관찰하기 위해, 제브라피쉬 5 dpf 야생형과 ZC4H2 유전자 녹아아웃 유생을 배아 배지안의 슬라이드 글라스에 위치시켰다. 제브라피쉬 유생은 입체현미경(LEICA, MZ16), 카메라(LEICA DC300FX) 및 현미경 이미지 소프트웨어(LEICA, IM50)를 이용하여 관찰하였다. 자유 수영의 녹화와 모니터 디스플레이는 Camtasia Studio software(TechSmith, Version 7.0.0)를 이용하여 녹화하였다. 눈, 가슴지느러미 및 턱 운동 관찰을 위해 5 dpf 제브라피쉬는 3% 메틸셀룰로오스로 코팅된 슬라이드 글라스로 옮겨졌다.

[0116]

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, ZC4H2 동형접합 녹아아웃 제브라피쉬에서 정상의 제브라피쉬와 비교하여 비정상적으로 활발한 턱 및 가슴 지느러미의 움직임을 갖고, 사람의 외사시 증상과 유사하게 눈의 위치가 비정상적으로 위치되는 것을 확인하였다(도 4).

[0118]

<실험예 2> ZC4H2 유전자에 의한 신경세포 관련 유전자의 발현양상 확인

[0119]

<2-1> ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬에서 신경세포 관련 유전자의 발현양상 확인

[0120]

상기 <실시에 5>에서 제작된 ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬를 사용하여 ZC4H2 유전자 손실이 특정 신경세포 발생에 미치는 영향을 확인하기 위하여 mRNA 프로브(probe)를 사용하여 홀-마운트 정위치 교잡법(whole-mount in situ hybridization)을 수행하였다.

[0121]

구체적으로, zc4h2, gad1, glyt2a, vglut2.1, gata2, gata3, isl1, scn1Lab, vsx2, vsx1, dbx2 및 nkx6.1의 안티센스-디그옥시제닌 표지 RNA 프로브(Antisense digoxigenin-labeled RNA probes)는 DIG 및 형광 RNA 라벨링 믹스(Fluorescein RNA Labeling Mix, Roche catalogue number 11277073910, 11685619910)를 이용하여 제조사 프로토콜에 따라 합성되었으며, 상기 <실시에 4-2>의 홀-마운트 정위치 교잡법(whole-mount in situ hybridization)과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0122]

또한, ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬의 운동뉴런 및 축삭돌기의 형성을 확인하기 위하여 항-Znp-1 마우스 단일클론항체를 사용하여 상기 <실시에 4-3>의 홀-마운트 면역조직화학 염색법(whole-mount immunohistochemistry staining)을 수행하였다.

[0123]

그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 운동 뉴런을 표지하는 isl1의 발현은 정상이었으며, 운동 뉴런의 축삭 돌기에서 발현하는 단백질인 Znp-1의 발현이 정상임을 확인하였다(도 5). 그러나, 도 6에서 나타난 바와 같이 V2a 인터뉴런을 표지하는 vsx2 및 V2a/b 전구체(precursor)를 표지하는 vsx1의 발현이 감소되고, 중뇌 뇌피개 및 후뇌에서 복부 신경 전구체 도메인(ventral neural progenitor domains) 인접 부위를 표지하는 nkx6.1의 발현이 감소됨을 확인하였다. 또한, GABA성 뉴런(GABAergic neurons)을 표지하는 gad1의 발현을 통해, 중심척수(intermediate spinal cord)에서 V2 뉴런의 결함과 일치하는 많은 GABA성 뉴런의 감소를 관찰하였고, V2b 억제성 뉴런을 표지하는 gata3의 발현이 녹아아웃 제브라피쉬 배아에서 유의하게 감소됨을 관찰하였다(도 6).

[0125]

<2-2> ZC4H2 유전자 녹아아웃 제브라피쉬에 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, 신경세포 관련 유전자의 발현양상 확인

- [0126] ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬에서 ZC4H2 유전자를 복원하였을 때, 변이로 인해 유발되었던 신경 발현 및 이상 행동이 회복되는지 확인하기 위해, 신경세포 관련 유전자의 발현변화를 확인하였다.
- [0127] 구체적으로, 제브라피쉬의 ZC4H2, 사람의 정상형, L66H, R213W 및 R18K ZC4H2의 합성 capped mRNAs는 mMESSAGE mMACHINE SP6 전사 키트(Ambion, AM1340)를 통해 주형으로 선형화된 플라스미드 DNA를 이용하여 전사되었다. mRNAs는 추적 염료로 0.2% 페놀레드를 포함하는 0.2 M KC1에 용해되었으며, PV820 Pneumatic PicoPump(WPI)를 이용하여 1 내지 2 세포 단계 배아에 미세주입되었다.
- [0128] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 제브라피쉬의 zc4h2 및 사람의 정상형 ZC4H2 mRNA를 미세주입한 경우 gad1의 발현이 회복됨을 확인하였으며(도 7), 정상적인 움직임을 보였다. L66H, R213W 및 R18K의 변이가 유발된 사람의 ZC4H2 mRNA를 주입한 경우, L66H 및 R213W mRNA 미세주입에서는 일부 회복이 실패하였으나, R18K 변이 ZC4H2 mRNA 미세주입의 경우 gad1 발현이 회복됨을 관찰하였다.
- [0130] <실험예 3> ZC4H2 유전자 녹아웃 제브라피쉬를 이용한 뇌전증 관련 질환 스크리닝 방법
- [0131] <3-1> ZC4H2 녹아웃 제브라피쉬의 사육 및 발생배의 준비
- [0132] 제브라피쉬는 상기 <실험예 3>의 제브라피쉬 사육 및 관리 방법에 따라 준비되었으며, 실험 하루 전날 오후에 ZC4H2 이형접합 녹아웃 제브라피쉬 암수 한 쌍을 전용 메이팅 케이지(mating cage)에 넣어준 후, 암실에서 보관하였다. 다음날 오전에 형광등하에서 빛으로 제브라피쉬 암수 한쌍의 체외 수정을 유도하여 수정란을 수집하였다. 수집된 수정란은 페트리 디쉬로 옮겨 28.5℃의 배양기에서 발생시켰다. 발생과정은 해부현미경을 통해 관찰하였으며, 수정 후 4일째부터 비정상적인 움직임을 보이는 ZC4H2 동형접합 녹아웃 제브라피쉬를 선별하였다.
- [0134] <3-2> 뇌전증 및 운동성 장애 치료제 후보 약물의 스크리닝 방법
- [0135] 상기 <실험예 3-1>에서 선별된 ZC4H2 동형접합 녹아웃 제브라피쉬를 이용하여, 뇌전증 및 운동성 장애 질환 모델로서 활용이 가능함을 확인하기 위해 약물 스크리닝 실험을 수행하였다.
- [0136] 구체적으로, 수정 후 5일째의 선별된 ZC4H2 동형접합 녹아웃 제브라피쉬를 한 마리씩 96웰 플레이트에 넣고, 칼륨채널오픈너(potassium channel opener)로 작용하며, 2010년 미국 FDA(United States Food and Drug Administration)로부터 뇌전증치료제로 승인된 레티가빈(retigabine)을 1, 2.5 및 5 μ M의 농도로 1시간 동안 처리하였다. 모든 처리는 대조군과 함께 진행되었으며, 약물에 대한 음성 대조군으로써 0.5% DMSO를 처리하였다. 1 μ M 또는 2.5 μ M의 농도로 처리된 그룹에서는 어떤 변화도 없었으나, 도 8, 9에서 보는 바와 같이 5 μ M의 농도로 처리된 그룹에서 ZC4H2 동형접합 녹아웃 제브라피쉬의 비정상적인 과다한 가슴 지느러미와 턱의 움직임과 같은 운동 장애 증상이 억제되었다. 반면 음성 대조군으로써 0.5% DMSO가 처리된 그룹에서는 ZC4H2 동형접합 녹아웃 제브라피쉬의 과다한 가슴 지느러미와 턱의 움직임이 유지되는 것을 관찰하였으므로 5 μ M 농도의 레티가빈에 의한 발작 유사 증상의 특이적인 억제 효과를 입증하였다(도 8, 9).
- [0138] 위와 같은 결과를 바탕으로 ZC4H2 녹아웃 제브라피쉬의 뇌전증, 경련, 발작, 파킨슨 증후군 및 소아성 뇌전증과 같은 운동 장애 관련 질환 모델 동물로서의 활용이 가능함을 밝혔으며, 관련 치료물질의 대량 스크리닝 기술을 확립하였다.

도면

도면1

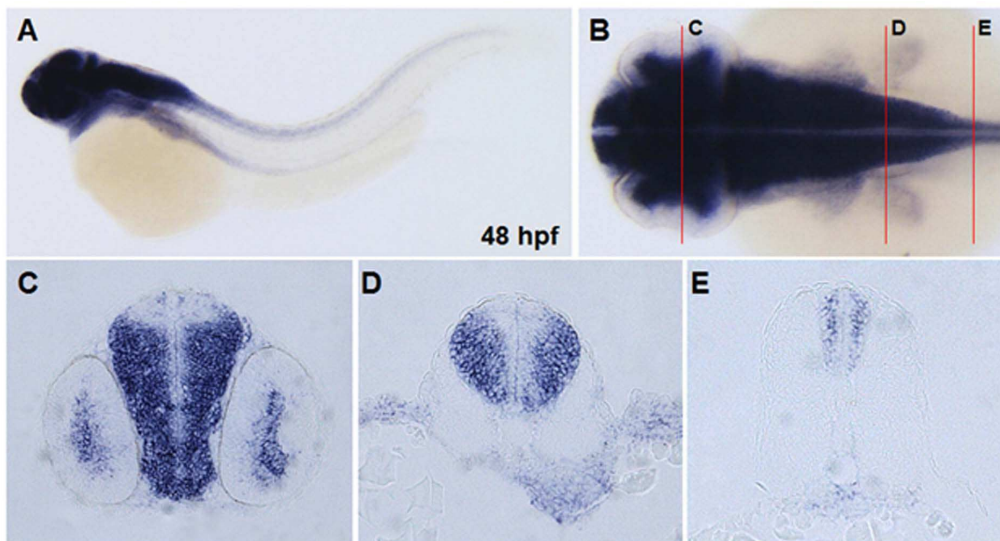
		*	20	*	40	*	60	
Human	:	MADEQEIMCKLES	IK	IRNKT	IQ	MEKIK	RLKAEFEALESEERHL	KEYQEMDLLQEKM : 60
Mouse	:	MADEQEIMCKLES	IK	IRNKT	IQ	MEKIK	RLKAEFEALESEERHL	KEYQEMDLLQEKM : 60
Zebrafish	:	MADEQEIMCKLEN	IK	IRNKT	IQ	MEKIK	RLTEFEALESEERHL	KEYQEMDLLQEKM : 60

		*	80	*	100	*	120	
Human	:	AHVEELRLIHADIN	MENTIKQ	SENDLNK	LLESTRRLH	DEYKPLKEH	VDALRMTLGLQRL : 120	
Mouse	:	AHVEELRLIHADIN	MENTIKQ	SENDLNK	LLESTRRLH	DEYKPLKEH	VDALRMTLGLQRL : 120	
Zebrafish	:	AHVEELRLIHADIN	MENTIKQ	SENDLNK	LLESTRRLH	DEYKPLKEH	VDALRMTLGLQRL : 120	

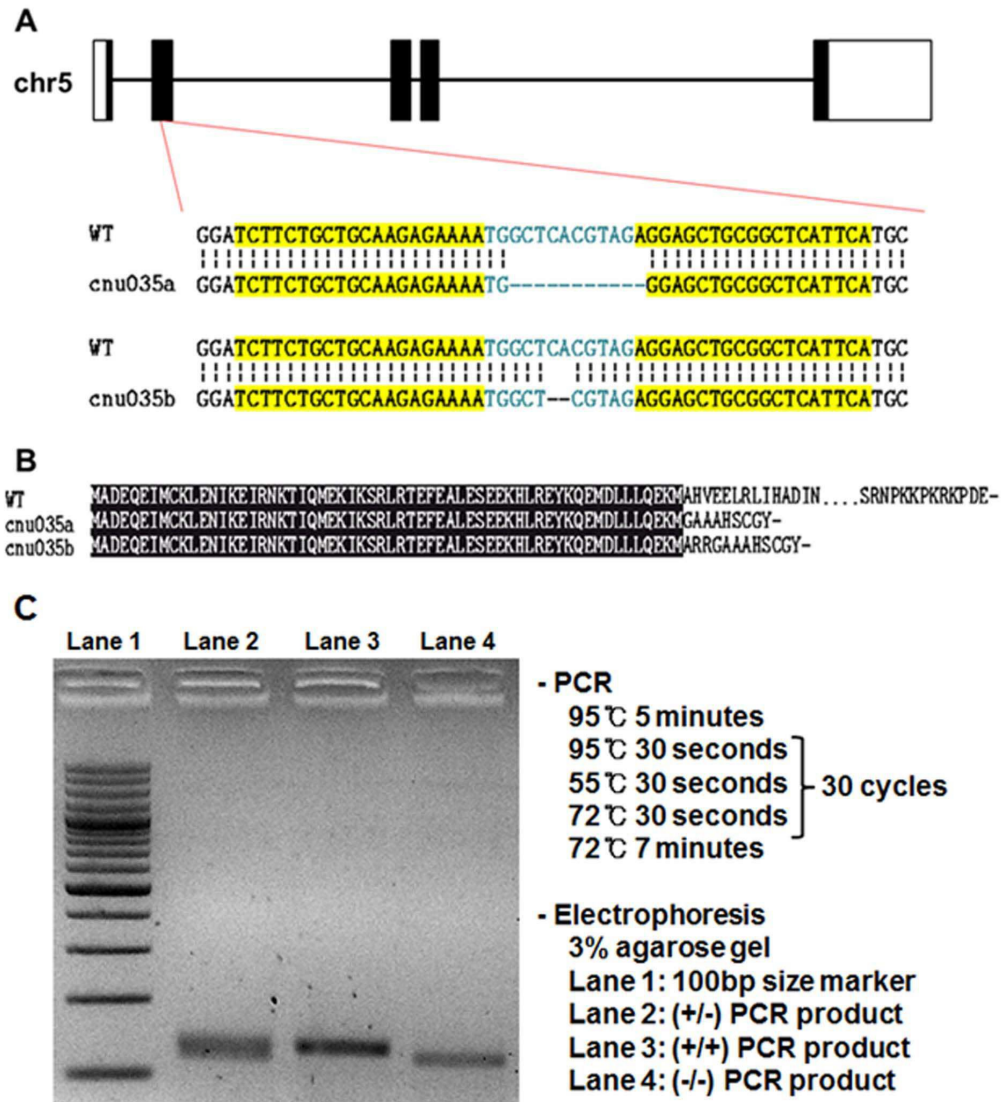
		*	140	*	160	*	180	
Human	:	PDLCEEEKLSLDY	FEKQKA	EWQTEPQ	EPPIESL	AAAAAAQ	QLVARKQDTRQTATFR : 180	
Mouse	:	PDLCEEEKLSLDY	FEKQKA	EWQTEPQ	EPPIESL	AAAAAAQ	QLVARKQDTRQTATFR : 180	
Zebrafish	:	PDLSC	EEKLSLDY	FEKQKA	EWQTEPQ	EPPIESL	AAAAAAQ	QLVARKQDTRQTATFR : 180

		*	200	*	220	
Human	:	QQPPPMKACLSCH	QQIHRN	APICPLCK	AKSRSRNP	KKPKRKQDE : 224
Mouse	:	QQPPPMKACLSCH	QQIHRN	APICPLCK	AKSRSRNP	KKPKRKQDE : 224
Zebrafish	:	QQPPPMKACLSCH	QQIHRN	APICPLCK	AKSRSRNP	KKPKRKQDE : 224

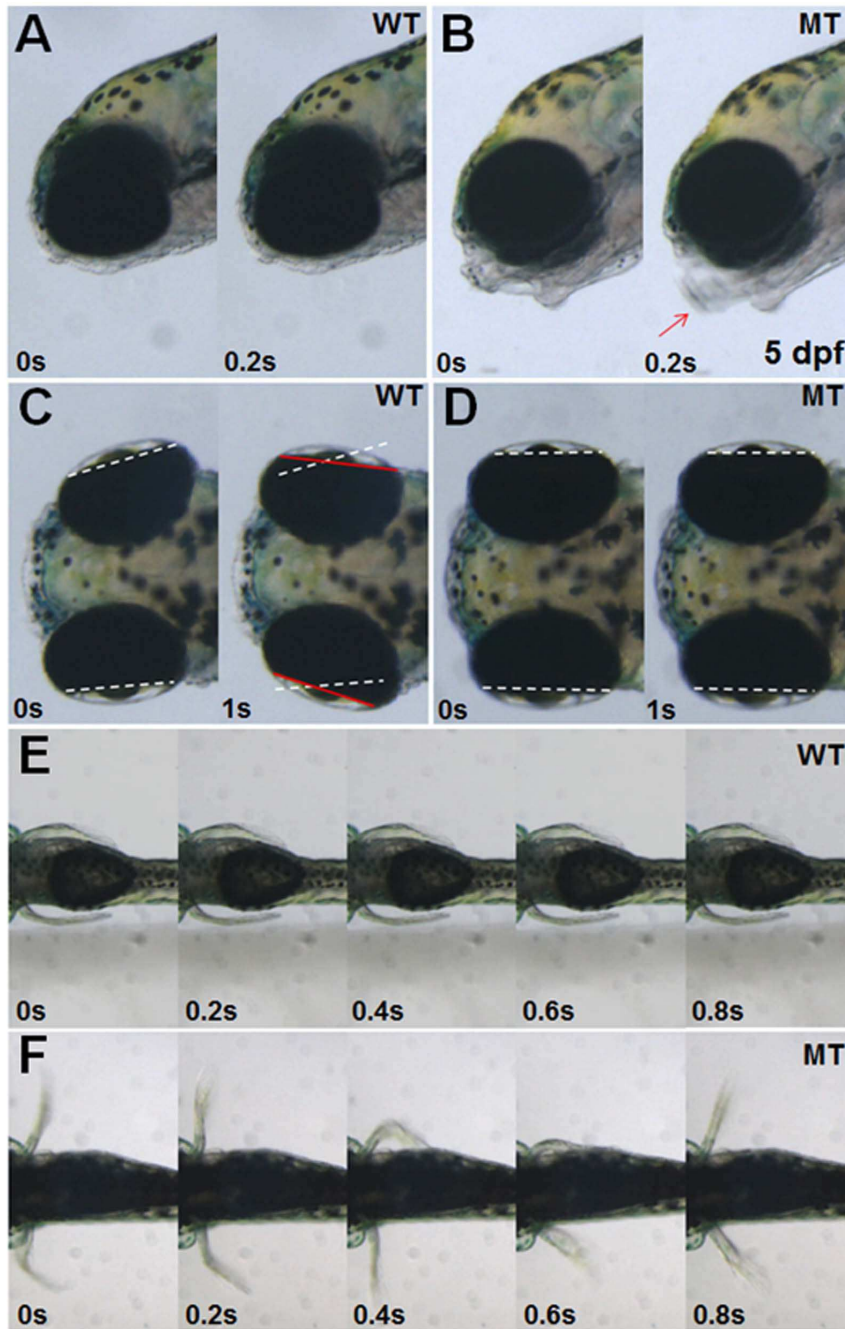
도면2



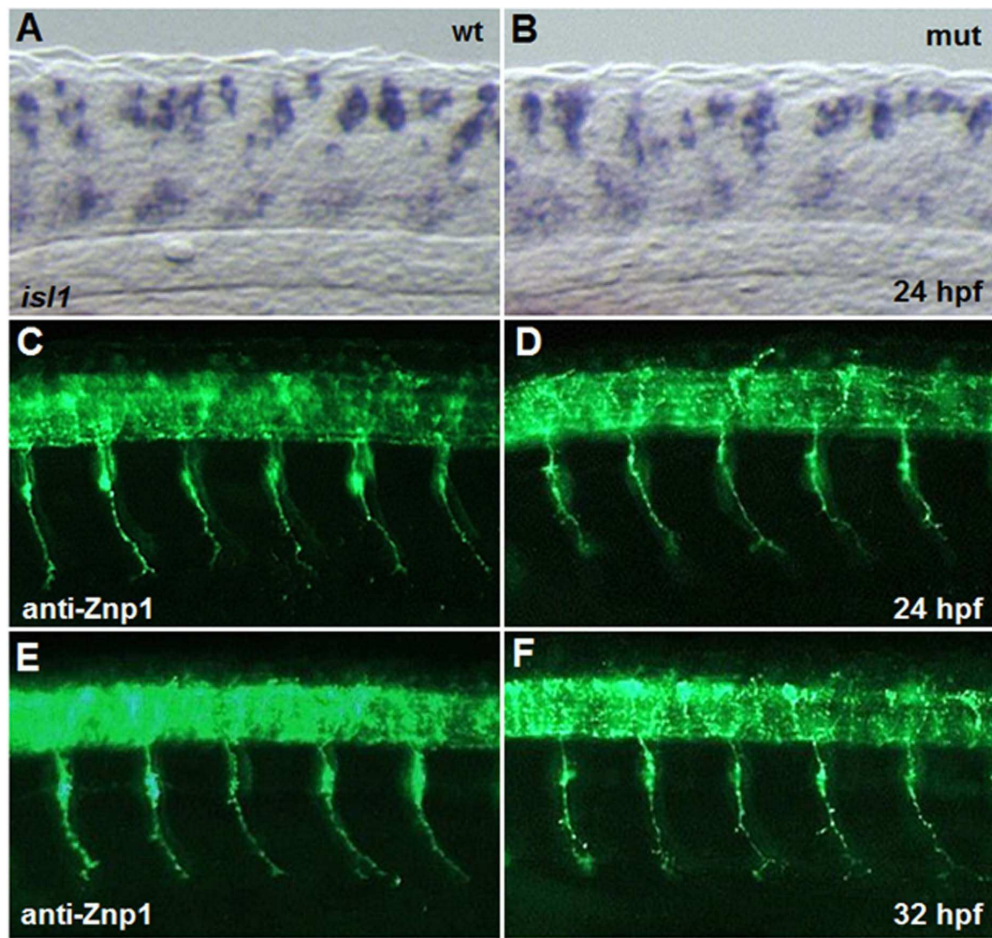
도면3



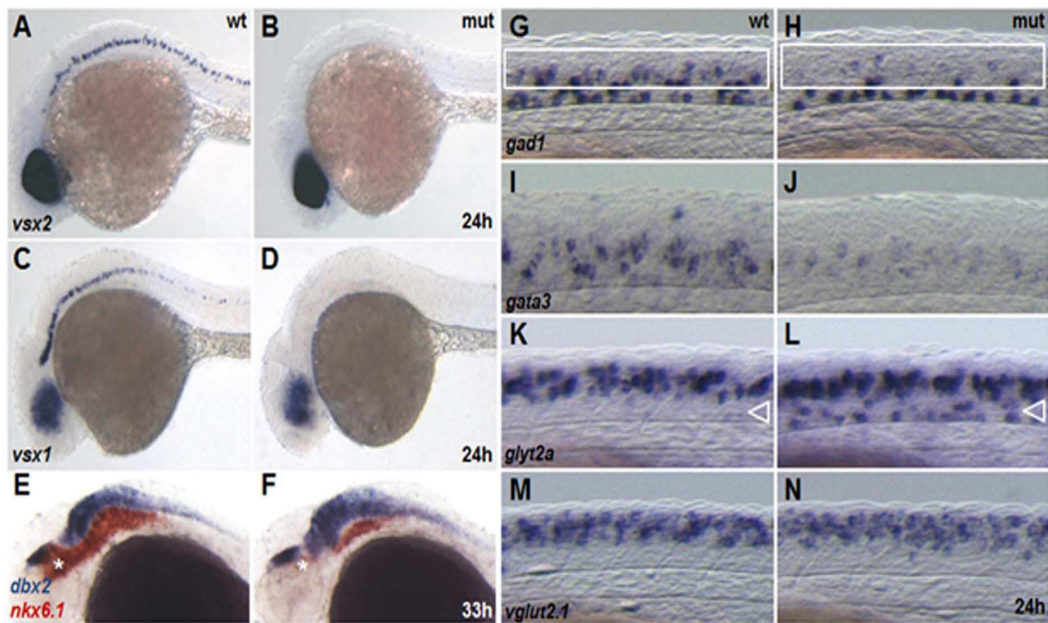
도면4



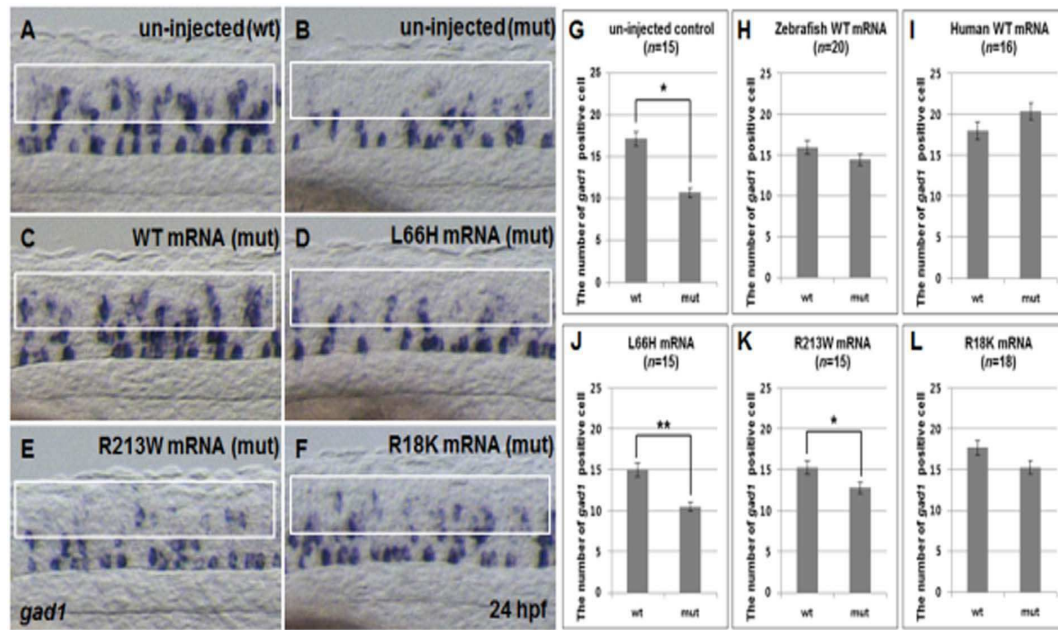
도면5



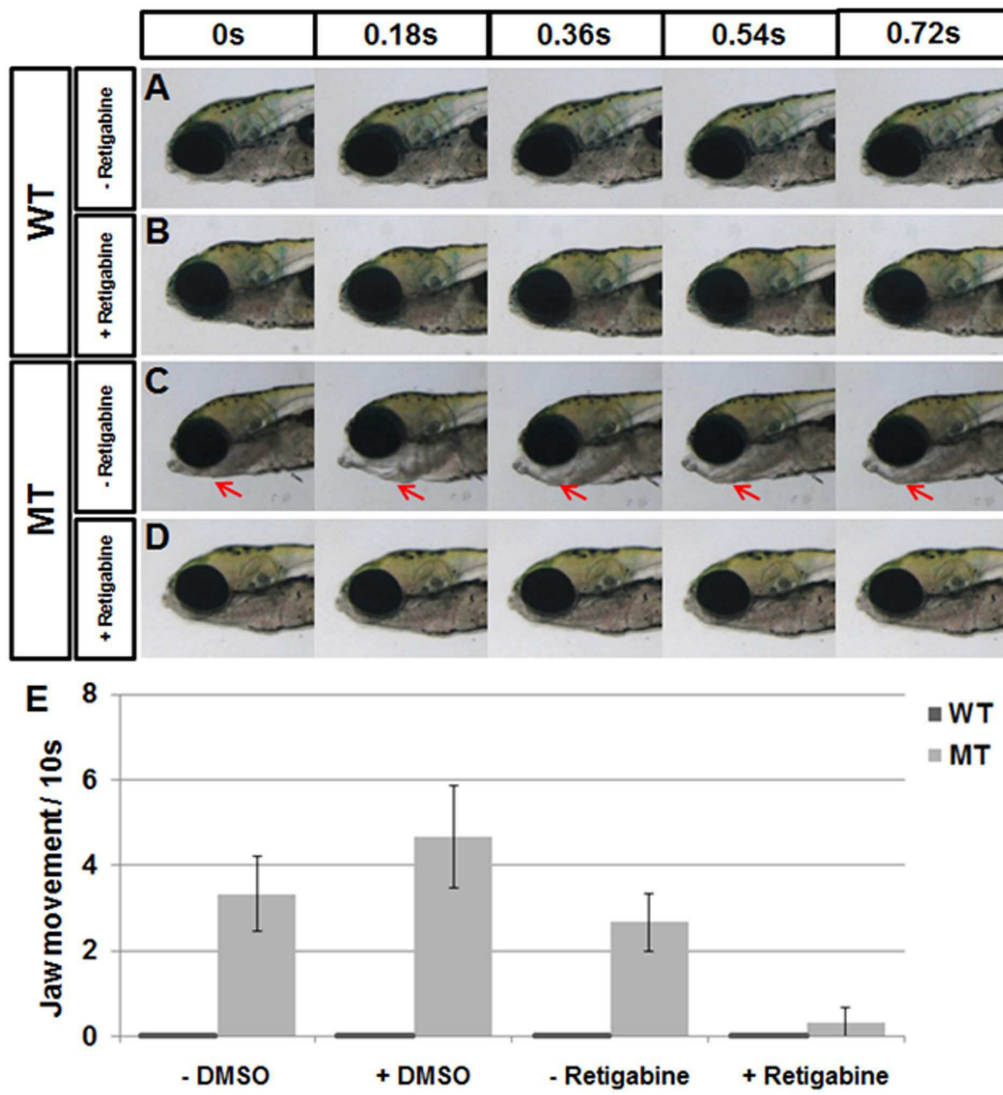
도면6



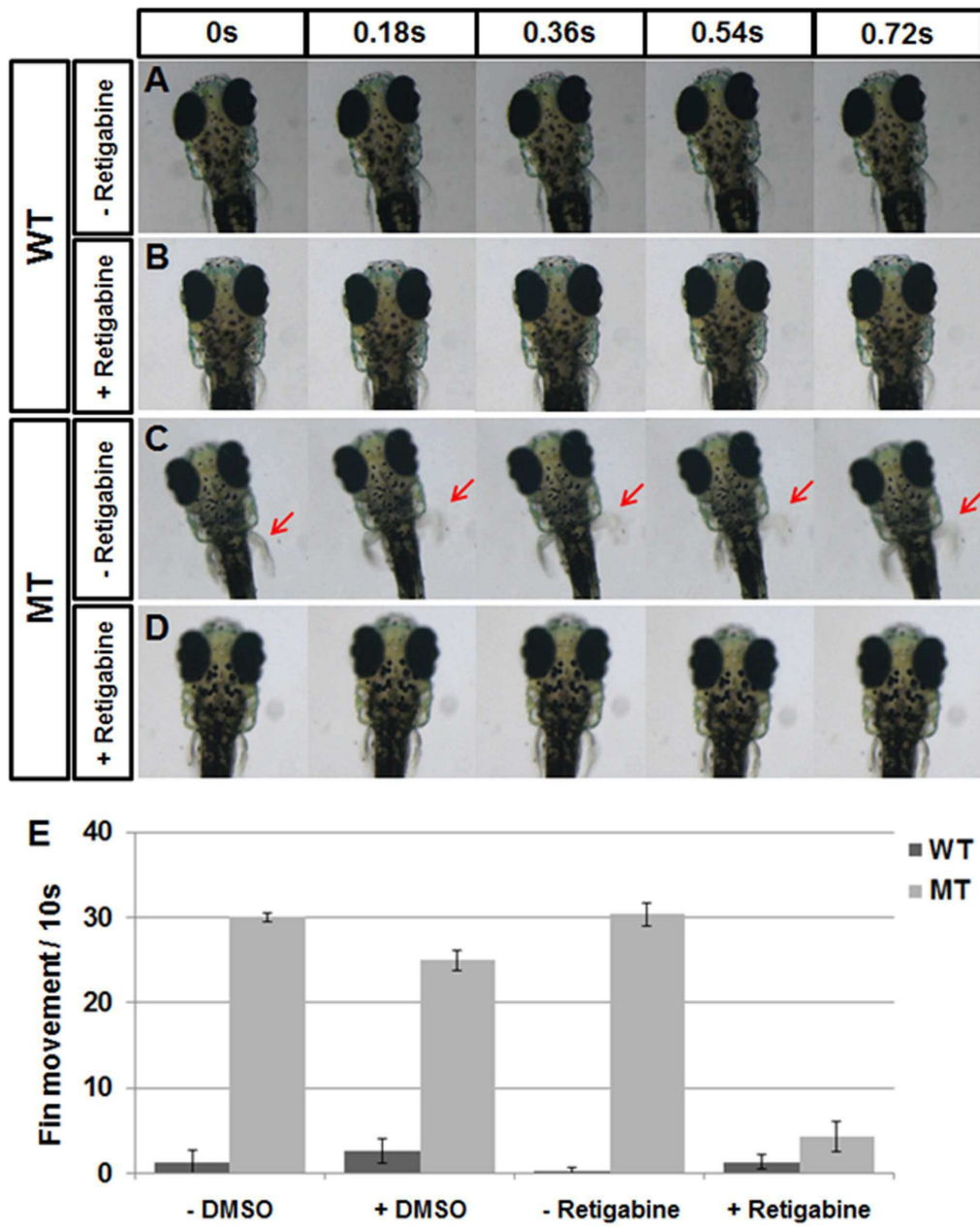
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
Chungnam National University - Industry Collaboration Foundation
- <120> ZC4H2 knock-out transgenic animal model and using thereof
- <130> 15p-03-019
- <160> 9
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZC4H2 ASO K8070F_1
 <400> 1
 atggcccatg tggaggatca 20
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZC4H2 ASO K8070R_2
 <400> 2
 cactaccaca gcctgcactg a 21
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZNF711 ex 4AF_3
 <400> 3
 ttctctggttg ttgatttt 19
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZNF711 ex 4AR_4
 <400> 4
 acaaggtcag ccacgaaaac 20
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> zc4h2 F_5
 <400> 5

atggcggcga gcaagagata a 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> zc4h2 R_6

<400> 6

tgttactcgt caggttttct cttg 24

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> zc4h2 exon2 F_7

<400> 7

gaccgagttt gaagtctgg 19

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> zc4h2 exon2 R_8

<400> 8

cacgttaata tccgcatgaa tg 22

<210> 9

<211> 224

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 9

Met Ala Asp Glu Gln Glu Ile Met Cys Lys Leu Glu Asn Ile Lys Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Glu Phe Glu Ala Leu Glu Ser Glu Glu Lys His Leu Arg Glu Tyr

35 40 45

Lys Gln Glu Met Asp Leu Leu Leu Gln Glu Lys Met Ala His Val Glu
 50 55 60
 Glu Leu Arg Leu Ile His Ala Asp Ile Asn Val Met Glu Asn Thr Ile
 65 70 75 80
 Lys Gln Ser Glu Ser Asp Leu Asn Lys Leu Leu Glu Ser Thr Arg Arg
 85 90 95
 Leu His Asp Glu Tyr Lys Pro Leu Lys Glu His Val Asp Ala Leu Arg
 100 105 110
 Met Thr Leu Gly Leu Gln Arg Leu Pro Asp Leu Ser Gln Glu Glu Glu
 115 120 125
 Lys Leu Ser Leu Asp Tyr Phe Glu Lys Gln Lys Ala Glu Trp Gln Thr
 130 135 140
 Glu Pro Gln Glu Pro Pro Ile Pro Glu Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Gln Gln Leu Gln Ala Ala Arg Lys Gln Asp Ala Arg Gln Thr
 165 170 175
 Ala Thr Phe Arg Gln Gln Pro Pro Pro Met Lys Ala Cys Leu Ser Cys
 180 185 190
 His Gln Gln Ile His Arg Asn Ala Pro Ile Cys Pro Leu Cys Lys Ala
 195 200 205
 Lys Ser Arg Ser Arg Asn Pro Lys Lys Pro Lys Arg Lys Pro Asp Glu
 210 215 220