



2018 년 12 월 27 일 (27.12.2018) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/005135

(22) 국제출원일: 2018 년 5 월 3 일 (03.05.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0077221 2017 년 6 월 19 일 (19.06.2017) KR

(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101 (연건동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 이은주 (LEE, Eun Ju); 02719 서울시 성북구 정릉로 305, 101동 1406호, Seoul (KR). 김효수 (KIM, Hyo-Soo); 04419 서울시 용산구 독서당로 111, 105동 T202호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

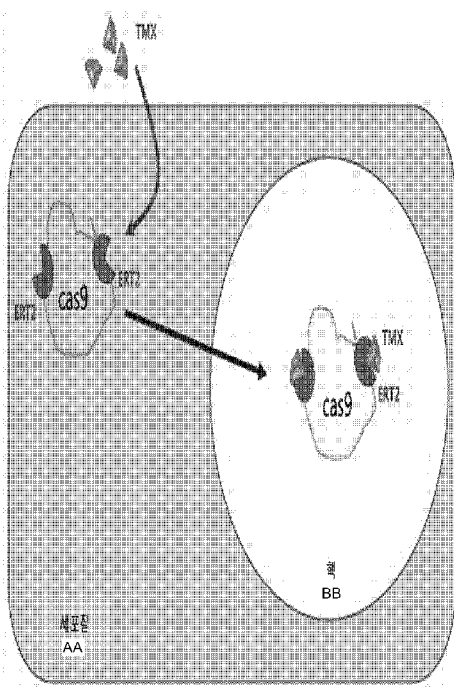
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: DNA MODIFICATION INDUCING PROTEIN COMPLEX AND RECOMBINANT VECTOR CARRYING GENE CODING THEREFOR

(54) 발명의 명칭: DNA 변형 유도 단백질 복합체 및 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터

AA ... Cytosol
BB ... Nucleus

(57) Abstract: The present invention relates to a protein complex in which estrogen receptor 2 (ERT2) is fused to CRISPR associated protein 9 (Cas9) and a recombinant vector carrying a gene coding therefor, wherein the ERT2 is bonded to the N-terminus and C-terminus of nuclear localization sequence (NLS)-removed Cas9. The protein complex of the present invention has the advantage of translocating from the cytosol into the nucleus at a certain time point upon treatment with tamoxifen. As such, the protein complex that has translocated into the nucleus can modify a specific DNA with the aid of guide RNA (gRNA), ultimately enabling a more elaborate DNA modification operation in a desired part at a desired time point. Therefore, the present invention is expected to be used for developing new and convenient DNA modification technology.

(57) 요약서: 본 발명은 Cas9 (CRISPR associated protein 9) 에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체 및 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 상기 ERT2는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 단백질 복합체는 타목시펜 (Tamoxifen)을 처리함으로써 특정시점에 세포질에서 핵 내로 이동할 수 있다는 장점이 있는바, 이처럼 핵 내로 이동한 상기 단백질 복합체는 guide RNA (gRNA)를 통해 특정 DNA를 변형시킬 수 있으므로, 궁극적으로 원하는 시점에 원하는 부분에서 보다 정교한 DNA 변형 작업을 가능하게 함으로써, 본 발명은 새롭고 편리한 DNA 변형 기술을 개발하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: DNA 변형 유도 단백질 복합체 및 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터

기술분야

- [1] 본 발명은 DNA 변형 유도 단백질 복합체 및 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 특정한 시기에, 원하는 부분에서 원하는 DNA를 변형 (modification) 시키기 위하여 현재 Cre-Lox 재조합 (Cre-Lox recombination), TET시스템 (TET system) 등에 조직 특이적 프로모터를 이용하는 방법이 존재한다.
- [3] 이 중 TET시스템 (TET system)은 대장균의 전이인자 (transposon) Tn10에 있는 테트라사이클린 (Tc) 내성발현조절계를 사용한 포유류배양세포, 동물개체에서의 유전자발현유도시스템을 말하며, 2개의 요소로 구성되어 있다. 첫째는 tTA (tetracyclin-controlled transactivator) 인데, 이는 Tc억제인자(tetR)에 단순 헤르페스 바이러스 VP16인 전사활성화 영역을 결합한 단백질이고, 둘째는 tetR와 결합할 수 있는 작동유전자 (operator) (tetO)와 사람세포 거대바이러스 (CMV) 촉진체의 하류에 목적유전자를 배치한 것이다. 상기 Tc존재 하에서는 그와 결합한 tTA는 tetO와 결합하지 못하지만, Tc를 제거하면 tTA가 tetO와 결합하여 표적유전자의 발현을 유도하게 된다(TET-OFF시스템). 역으로 tetO와 결합하여 표적유전자의 발현유도를 하는 rtTA (reverse tetracyclin- controlled ransactivator)를 사용한 TET-ON시스템의 구축을 위한 연구도 계속 되고 있다.
- [4] Cre-Lox 재조합(Cre-Lox recombination)은 세포 DNA의 특정 부위에서 결실, 삽입, 전좌 및 역전을 수행하는 데 이용되는 부위 특이적인 재조합 효소 기술로써, 진핵 생물과 원핵 생물 시스템에서 모두 실행되는데, DNA 변형이 특정 세포 유형을 표적으로 하거나 특정 외부 자극에 의해 촉발되도록 한다. 특히 Cre-lox 재조합 시스템은 신경 세포 학자들이 복잡한 세포 유형과 신경 회로가 함께 모여 인지과 행동을 생성하는 두뇌를 연구하는 데 있어 유용하다.
- [5] 다만, 상기의 DNA 변형 방법들은 그 절차가 복잡하고, 과정에 긴 시간이 소요되며, 이를 통하여 제조된 동물모델에서 원하는 부분의 DNA 변형을 위하여 약물을 처리한 경우, 정밀한 작업이 이루어지지 않아, 그 결과를 신뢰할 수 없는 경우가 많다는 점에서 한계가 있어, 현재 단일 분자 조작에 의한 DNA 변형 (한국 특허공개번호 10-2016-0003629) 등 DNA 변형에 대한 유의성 있는 연구가 거듭되고 있다.
- [6] 한편, 다양한 DNA 변형 방법 중 Cas9 system은 상대적으로 짧은 시간에 저비용으로 동물모델을 제조할 수 있고, DNA 상에서 정교한 작업이 용이하다는 장점이 있으나, 특정 시기에 원하는 부분에서의 DNA 변형을 유도하기 위한

방법이 필수적임에도 불구하고, 아직 이에 대한 연구는 미비한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자는 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여, Cas9을 이용해 원하는 시기에 원하는 특정 부분에서 DNA 변형(modification)을 유도할 수 있는 방법에 관하여 예의 연구한 결과, Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리함으로써 특정시점에 상기 Cas9-ERT2를 세포질에서 핵 내로 이동시킬 수 있으며, 이처럼 핵 내로 이동된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 guide RNA를 통해 특정 DNA를 변형 (modification) 시킬 수 있다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [8] 이에, 본 발명은 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 상기 ERT2는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 벡터를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 제조합 벡터가 미세주입 된 배아를 대리모 동물에 착상시켜 제조한 형질전환 동물 및 해당 형질전환 동물의 제조방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체로서, 상기 ERT2는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 복합체를 제공한다.
- [13] 본 발명의 일구현예로, 상기 단백질 복합체는 타목시펜 (tamoxifen)을 처리함으로써 세포질에서 핵 내로 이동하는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 벡터를 제공한다.
- [15] 본 발명의 일구현예로, 상기 제조합 벡터는 gRNA (guide RNA) 및 프로모터를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 프로모터는 CMV (cytomegalovirus) 프로모터일

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터가 미세주입 된 배아를 대리모 동물에 착상시켜 제조한 형질전환 동물을 제공한다.

[18] 본 발명의 일구현예로, 상기 형질전환 동물은 생쥐일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[19] 또한, 본 발명은 a) 본 발명의 재조합 벡터(vector)를 제조하는 단계; b) 상기 벡터를 배아에 미세주입 하는 단계; 및 c) 상기 배아를 대리모의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계를 포함하는, 형질전환 동물의 제조방법을 제공한다.

[20] 본 발명의 일구현예로, 상기 a) 단계의 재조합 벡터는 gRNA 및 프로모터를 더 포함하는 것일 수 있다.

[21] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 대리모 동물은 생쥐일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[22] NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 ERT2가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 본 발명의 단백질 복합체는 타목시펜 (Tamoxifen)을 처리함으로써 원하는 특정시점에 세포질에서 핵 내로 이동할 수 있다는 장점이 있다. 이처럼 핵 내로 이동한 상기 단백질 복합체는 guide RNA (gRNA)를 통해 특정 DNA를 변형시킬 수 있는바, 원하는 시점에 원하는 부분에서 더욱 정교한 DNA 변형 작업을 가능하게 함으로써, 본 발명은 새롭고 편리한 DNA 변형 기술을 개발하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 세포질에 존재하는 Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜 (Tamoxifen; TMX)을 처리함으로써 상기 단백질 복합체가 핵 내로 이동하는 과정을 나타낸 모식도이다.

[24] 도 2a는 nuclear localization signal (NLS)이 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 ERT2를 융합시킨 Cas9-ERT2 단백질 복합체 구조를 나타낸 것이고, 도 2b는 억제하고자 하는 특정 유전자의 gRNA (guide RNA), U6 프로모터, CMV (cytomegalovirus) 프로모터, 및 Cas9-ERT2를 연결한 구조를 나타낸 것이다.

[25] 도 3은 본 발명의 일 실시예로, 본 발명의 단백질 복합체를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 맵을 나타낸 것이다.

[26] 도 4는 본 발명의 일 실시예로, 본 발명의 재조합 벡터를 제조하기 위한 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

[27] 도 5는 본 발명의 일 실시예로, 본 발명의 재조합 벡터를 배아에 미세주입하기 위하여 제작된 미세주입 (microinjection) 용 DNA를 나타낸 것이다.

[28] 도 6a는 타목시펜 (Tamoxifen; TMX)을 처리하지 않았을 때, Cas9-ERT2 단백질 복합체의 발현양상을 확인한 것이고, 도 6b는 TMX를 처리하였을 때, Cas9-ERT2 단백질 복합체의 발현양상을 확인한 것이다.

[29] 도 7은 ROI 1 (up cell)과, 벡터의 transfection이 이루어지지 않은 세포인 ROI 2 (down cell)을 비교하여 나타낸 것이다.

[30] 도 8은 타목시펜을 처리하였을 때, ROI 1과 ROI 2의 발현양상을 Intensity에 따라 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[31] 본 발명자는 Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리함으로써 특정시점에 상기 Cas9-ERT2를 세포질에서 핵 내로 이동시킬 수 있으며, 이처럼 핵 내로 이동된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 guide RNA를 인지하여 DNA를 변형 (modification) 시킬 수 있다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[32] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[33] 본 발명은 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체로서, 상기 ERT2는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 복합체를 제공한다.

[34] 본 발명에서 "Cas9"는 "CRISPR associated protein 9"의 약자로, "CRISPR-CAS9"을 지칭하는데, CRISPR-CAS9는 3세대 유전자가위로서, 이용하고자 하는 특정 염기서열을 인식하여 절단하고 편집하며, 게놈의 목적 장소에 특정 유전자를 삽입하거나 특정 유전자의 활동을 정지시키는 조작을 간단하고 신속하고 효율성 있게 실시하는데 유용하다.

[35] 본 발명에서 "ERT2"는 "Estrogen receptor 2"의 약자로, 에스트로젠 수용체를 지칭하는데, 에스트로젠 수용체는 표적유전자 촉진자에 존재하는 에스트로젠응답 증폭자배열(공통배열: 5'-AGGTCANNNTGACCT-3')에 호모이합체로서 결합하여 호르몬 의존적으로 전사를 촉진하는 전사조절인자로서 작용한다.

[36] 본 발명에서 "gRNA"는 "guide RNA"의 약자로, RNA를 편집할 때 수식반응의 주형이 되는 염기순서정보를 갖는 45~70뉴클레오타이드가량의 작은 RNA를 지칭하는데, gRNA의 5'측 영역은 RNA편집되는 mRNA의 일부와 상보적 순서로 되어 있고, 이 영역을 매개로 하여 mRNA에 결합되며, 3'측 영역에는 편집 후의 최종적 mRNA의 순서에 상보적 염기순서가 존재하고, 그 순서정보에 따라 우리딘 (uridine) 염기의 삽입이나 결실이라는 RNA수식반응이 일어난다.

[37] 또한, 본 발명은 상기 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제공한다.

[38] 본 발명에서 "벡터"는 DNA 재조합 실험에 있어서 목적하는 DNA 단편을 숙주균 등에 도입시켜 주고 증식할 수 있는 DNA로서, 클로닝 운반체 (cloning vehicle)라고도 하는데, 벡터 (vector) DNA는 제한효소 등으로 절단하여 개환하고 여기에 목적으로 하는 DNA 단편을 삽입하여 연결하고 숙주균에 도입시킨다.

목적 DNA 단편을 연결한 벡터 DNA는 숙주균이 증식됨에 따라 복제하여 균의 분열과 더불어 각 낭세포로 분배되어 목적 DNA 단편을 대대로 유지하여 이어져 나가며, 플라스미드 (plasmid), 파지 염색체를 주로 사용한다.

[39] 또한, 본 발명은 본 발명에 의해 제조된 재조합 벡터가 미세주입 된 배아를 대리모 동물에 착상시켜 제조한 형질전환 동물을 제공한다.

[40] 본 발명의 다른 양태로서, a) 본 발명의 재조합 벡터(vector)를 제조하는 단계; b) 상기 벡터를 배아에 미세주입 하는 단계; 및 c) 상기 배아를 대리모의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계를 포함하는, 형질전환 동물의 제조방법을 제공한다.

[41] 본 발명의 일 실시예에서는, Cas9을 이용하여 원하는 시기에 특정 부분에서 DNA 변형 (modification)을 유도할 수 있는 단백질 복합체를 제조하기 위하여, Cas9과 ERT2를 연결하는 구조를 구상하였다(실시예 1 참조).

[42] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 단백질 복합체를 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터를 제조하였으며(실시예 2 참조). 상기 재조합 벡터가 미세주입 된 배아를 생성하여, 형질전환 된 생쥐를 생산하였다(실시예 3 참조).

[43] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 단백질 복합체의 발현양상을 확인하기 위하여 면역염색법을 수행하였다(실시예 4 참조).

[44] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[45] 실시예 1. DNA 변형 유도 단백질 복합체의 제조

[46] 본 발명자는, DNA 변형 유도 단백질 복합체를 제조하기 위하여, 도 1에 나타난 바와 같이, 발현 시에 핵 내로 이동하는 Cas9을 보다 정교하게 조절하고자, Cas9의 nuclear localization signal (NLS)을 제거하여 세포질 (cytoplasm)에 존재하도록 하였고, 상기 NLS이 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 ERT2를 융합시켜 제조한 Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜 (tamoxifen; TMX)을 처리하여 특정시점에 핵 (nucleus) 내로 이동시킬 수 있는 Cas9-ERT2 단백질 복합체(ERT2-Cas9-ERT2)의 구조를 구상하였다(도 2a 참조).

[47] 특히, 원하는 시점에 특정한 유전자를 변형시킬 수 있도록, 특정 유전자의 gRNA (guide RNA), U6 프로모터, CMV 프로모터, 및 상기 Cas9-ERT2 단백질 복합체를 연결한 구조를 설계하였는데(도 2b 참조), 이 때, CMV promoter의 사용으로 ubiquitous expression이 가능하다.

[48] 실시예 2. 재조합 벡터의 제조

[49] 본 발명의 일 실시예로, 본 발명의 단백질 복합체를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다(도 4 참조). 구체적으로, Addgene으로부터

pCAG-ERT2CreERT2 (#13777)와 pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (#42230) 플라스미드를 구매하였고, Santa Cruz로부터 mouse TIF1 γ CRISPR/Cas9 knockout (KO) 플라스미드 (sc-430111)를 구매하였다. mouse LRAT (Lecithin retinol acyltransferase) 프로모터 시퀀스 (promoter sequence)는 promoter prediction (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>)를 사용해 높은 활성이 예측되는 시퀀스 (-5,500 to + 72 bps)를 선택하였고, 보통의 mouse DNA (C57BL/6N)를 사용하여 하기 표 1과 같은 특이적 프라이머와 함께 PCR을 수행해 LRAT 프로모터를 획득하였다.

[50] [표1]

Primer sequence (5'-3')	
Forward	GACATTGATTATTGACTAGTCCTTAAAGAGAGGCATCCGGGGTC
Reverse	GTTCTTCTCCTTTGCTAGCCATGACGCTCACGCTAAAGAGCTTGAAG

[51] 상기 LRAT 프로모터에 의존적이면서, 타목시펜으로 간 섬유화 억제 유전자 (TIF1 γ) 발현 조절이 유발되는 플라스미드를 생성하기 위해, CAG 프로모터와 pCAG-ERT2CreERT2의 Cre는 LRAT 프로모터와 SpCas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9)으로 각각 대체하였다.

[52] 그 다음, U6 프로모터를 갖는 하기 표 2의 TIF1 γ gRNA 3개를 상기 플라스미드에 삽입하였다.

[53] [표2]

gRNA sequence (5'-3')	
gRNA 1	GGTGCGGCTGGGCCCGACGA
gRNA 2	CTACATTCTTGACGACATAC
gRNA 3	GAAGATAATGCAAGTGCAGT

[54] 이렇게 제조된 pLrat-ERT2Cas9ERT2-TIF1 γ gRNA 플라스미드는 생어 염기서열 분석 (Sanger Sequencing)에 의하여 확인되었다.

[55] 실시예 3. 형질전환 생쥐의 생산

[56] 타목시펜으로 특정시점에, 특정 유전자 발현이 조절되는 형질전환 (transgenic; TG) 생쥐를 생산하기 위하여, 5 내지 8주령의 C57BL/6N 암컷 생쥐에 임마혈청성 생식샘자극호르몬 (pregnant mare serum gonadotrophin; PMSG) (7.5IU) 및 인간융모막성 생식샘자극호르몬 (human chorionic gonadotropin; hCG) (5IU) 을 각 48시간 간격으로 복강내 (Intraperitoneal; IP) 주사하여 과배란을 유발시켰으며, hCG을 주사한 후, 상기 암컷 생쥐를 C57BL/6N 번식용 수컷 생쥐와 교배시켰다. vaginal plug를 통해 암컷 생쥐의 임신여부를 확인하고, 암컷 생쥐로부터 수정된 배아를 수확하였다.

[57] 형질 전환 생쥐 제조의 일 실시예로, 상기 배아에, 도 5에 나타낸 바와 같이, 타목시펜을 통한 간 섬유화 억제 유전자 (TIF1 γ) 발현의 조절을 유발하는 DNA (pLrat-ERT2Cas9ERT2-TIF1 γ gRNA) 3개를 AvrII/PvuI으로 이중 절단 (double

cut)하여 선형화 해 미세주입 (microinjection)용으로 준비하였고, 1-세포기 배아 (one cell staged embryo)에 상기 DNA 3개를 같은 농도로 미세 주입하였다. 이와 같은 형질전환 생쥐의 생산에 표준 미세주입 절차가 사용되었다(마크로젠, 서울, 대한민국).

[58] 상기 3개의 DNA 혼합물 총 4ng/ul을 접합자 (zygote)의 전핵 (pronucleus)에 미세조작기 (micromanipulator)를 사용하여 직접적으로 주입하였고, 이처럼 DNA 혼합물을 미세주입 한 배아를 37°C에서 1-2시간 동안 배양하였다. 상기 배아 중 14 내지 16개를 가상 임신한 대리모 (pseudo-pregnant recipient) 생쥐 (ICR)의 난관에 외과적 방법을 사용하여 이식하였다.

[59] 이와 같은 방법으로 생산되는 형질전환 생쥐는 (주)마크로젠(서울, 대한민국)에서 병원체가 없는 조건 하에 교배되었으며, 모든 조작은 (주)마크로젠의 실험동물운영위원회의 승인을 받아 수행되었다.

[60] **실시예 4. DNA 변형 유도 단백질 복합체의 발현 분석**

[61] 본 발명의 DNA 변형 유도 단백질 복합체의 발현양상을 확인하기 위하여 면역염색법을 수행하였다. 이를 위하여, LX2 Cell (Human hepatic stellate cell lines)에 transfection 후, 타목시펜(Tamoxifen; TMX) 1nM을 처리한 다음, 4시간 후 상기 TMX의 처리 유무에 따른 Target 유전자 (TIF1 gamma; TIF1 γ)의 감소와 반대적 유전자(alpha SMA; α -SMA)의 증가 양상을 확인하였다.

[62] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타낸 바와 같이, TMX를 처리하지 않았을 때, 세포질 (cytosol)에 발현된 Cas9-ERT2 단백질 복합체의 핵 내로 이동이 억제되었고, α -SMA는 낮았으며, TIF1 γ 는 핵 내에 높게 발현되었다(도 6a 참조). 반면, TMX 처리 시 세포질에 발현된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 핵 내 이동함을 확인할 수 있었으며, α -SMA는 높았고, TIF1 γ 는 핵 내 발현이 감소되었다(도 6b 참조).

[63] 또한, 소프트웨어를 이용하여 Intensity에 따라 분석한 결과, 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, ROI 1 (up cell)과 백터의 transfection이 이루어지지 않은 세포인 ROI 2 (down cell)을 비교하였을 때(도 7 참조), 세포질에 발현된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 TMX 처리로 핵 내 이동함을 확인할 수 있었고, ROI 1이 ROI 2보다 핵 내의 Cas9이 높았으며, 세포질에서 α -SMA이 높고, 핵 내 TIF1 γ 발현이 감소하였다(도 8 참조).

[64] 참고로, 본 발명의 서열목록 리스트는 하기 표3과 같다.

[65] [표3]

서열목록 1	Forward Primer
서열목록 2	Reverse Primer
서열목록 3	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA 1
서열목록 4	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA 2
서열목록 5	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA 3
서열목록 6	Cas9-ERT2 Forward Primer
서열목록 7	Cas9-ERT2 Reverse Primer
서열목록 8	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA U6-F
서열목록 9	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA gRNA1-R
서열목록 10	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA gRNA2-R
서열목록 11	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA gRNA3-R
서열목록 12	ERT2-Cas9-ERT2
서열목록 13	RNA polymerase III promoter for human U6 snRNA
서열목록 14	human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter
서열목록 15	Cas9 (Csn1) endonuclease from the <i>Streptococcus pyogenes</i> Type II
	CRISPR/Cas system

[66] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[67] 본 발명의 단백질 복합체는 guide RNA (gRNA)를 통해 특정 DNA를 변형시킬 수 있고, 또한 원하는 조직 또는 세포 특이적 발현을 하는 유전자의 promoter를 이용함으로써 원하는 시점에 원하는 부분에서 더욱 정교한 DNA 변형 작업이 가능하다. 따라서, 본 발명은 새롭고 편리한 DNA 변형 기술을 개발하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

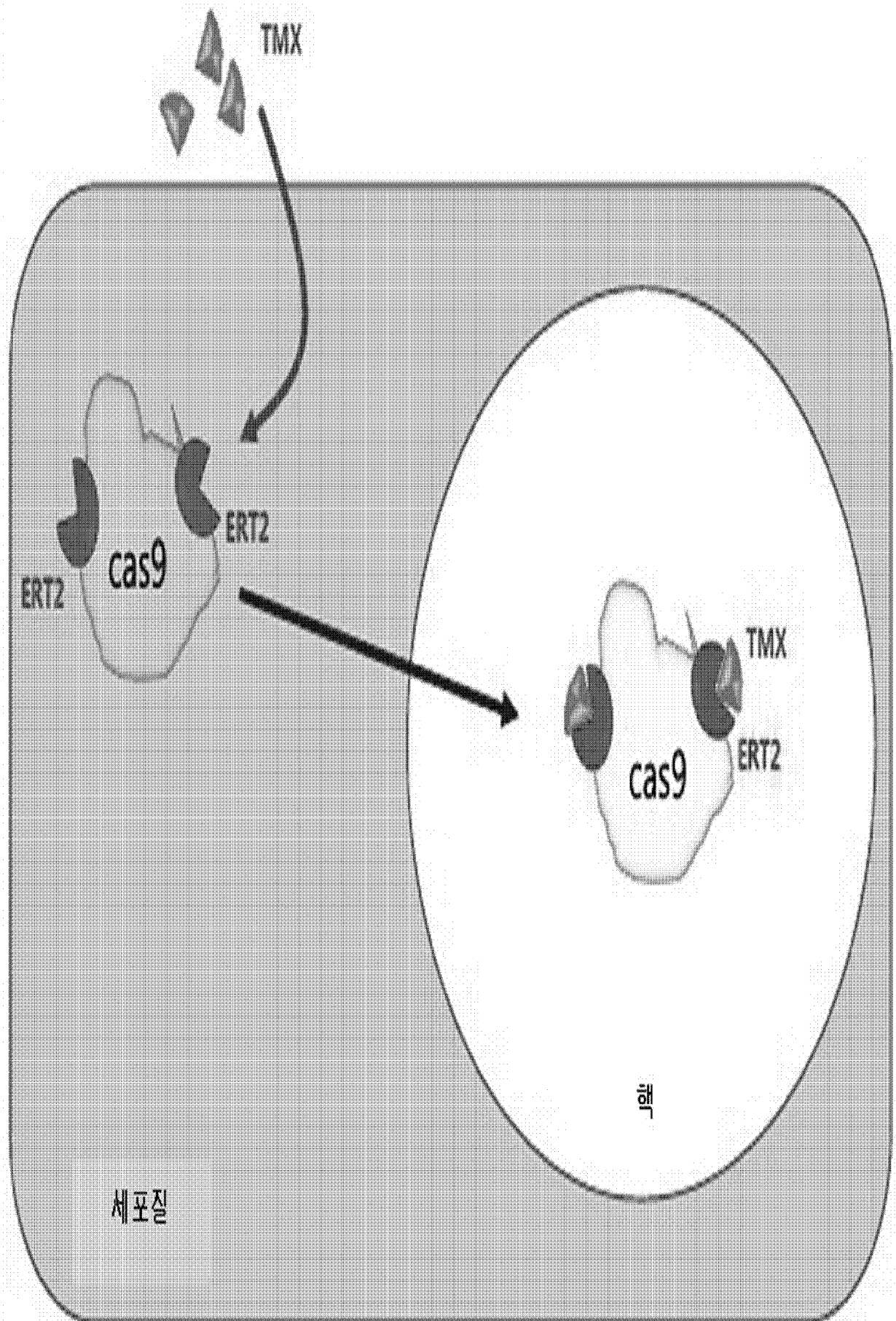
[68]

[69]

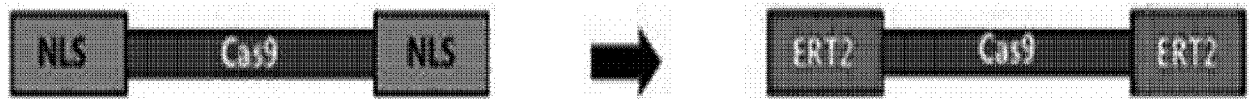
청구범위

- [청구항 1] Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체로서, 상기 ERT2는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 단백질 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 단백질 복합체는 타목시펜 (tamoxifen)을 처리함으로써 세포질에서 핵 내로 이동하는 것을 특징으로 하는, 단백질 복합체.
- [청구항 3] 제1항의 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합백터.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 재조합 백터는 gRNA (guide RNA) 및 프로모터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 백터.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 프로모터는 CMV (cytomegalovirus) 프로모터인 것을 특징으로 하는, 재조합 백터.
- [청구항 6] 제3항의 재조합 백터가 미세주입 된 배아를 대리모 동물에 착상시켜 제조한 형질전환 동물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 동물은 생쥐인 것을 특징으로 하는, 형질전환 동물.
- [청구항 8] 하기의 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법:
a) 제3항의 재조합 백터를 제조하는 단계;
b) 상기 재조합 백터를 대리모 동물의 배아에 미세주입 하는 단계; 및
c) 상기 배아를 대리모 동물의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 a) 단계의 재조합 백터는 gRNA 및 프로모터를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 형질전환 동물의 제조방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 대리모 동물은 생쥐인 것을 특징으로 하는, 형질전환 동물의 제조방법.

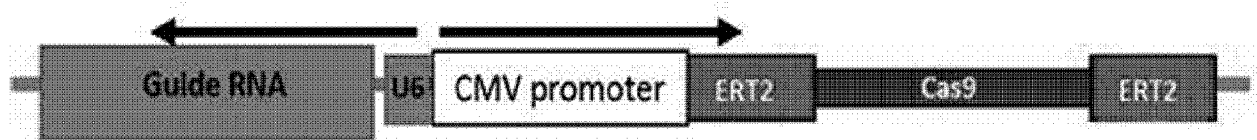
[도1]



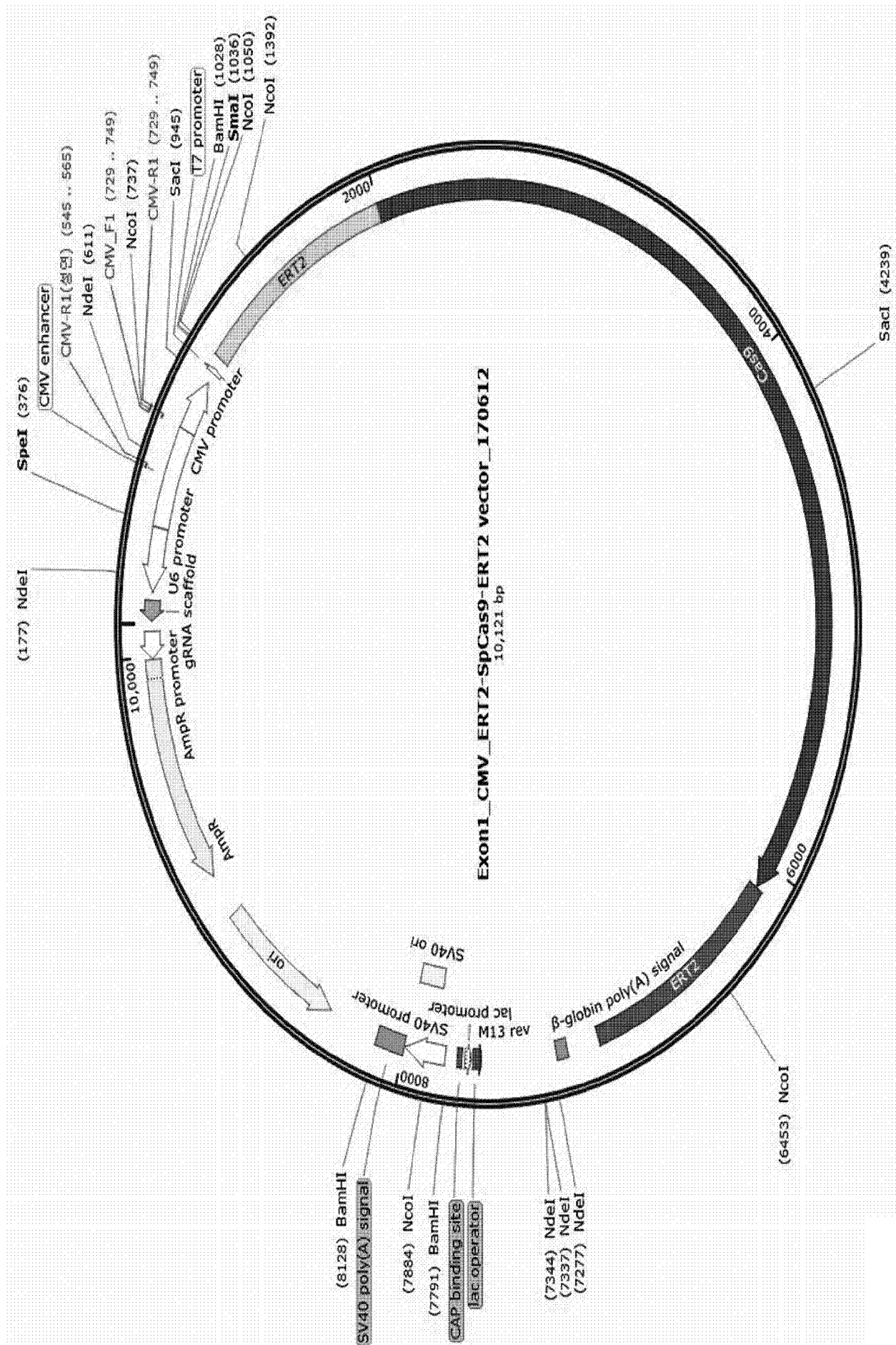
[도2a]



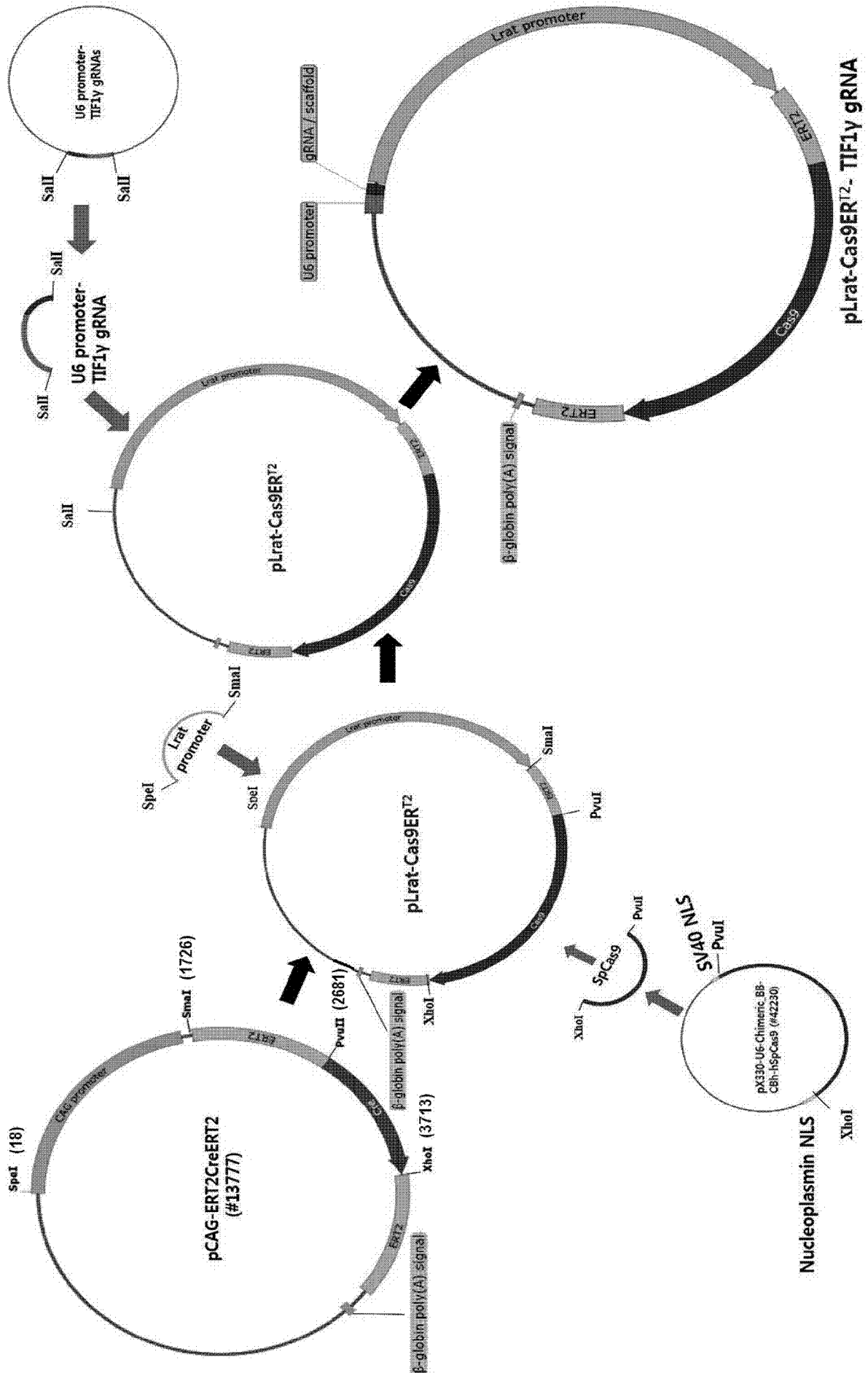
[도2b]



[도3]

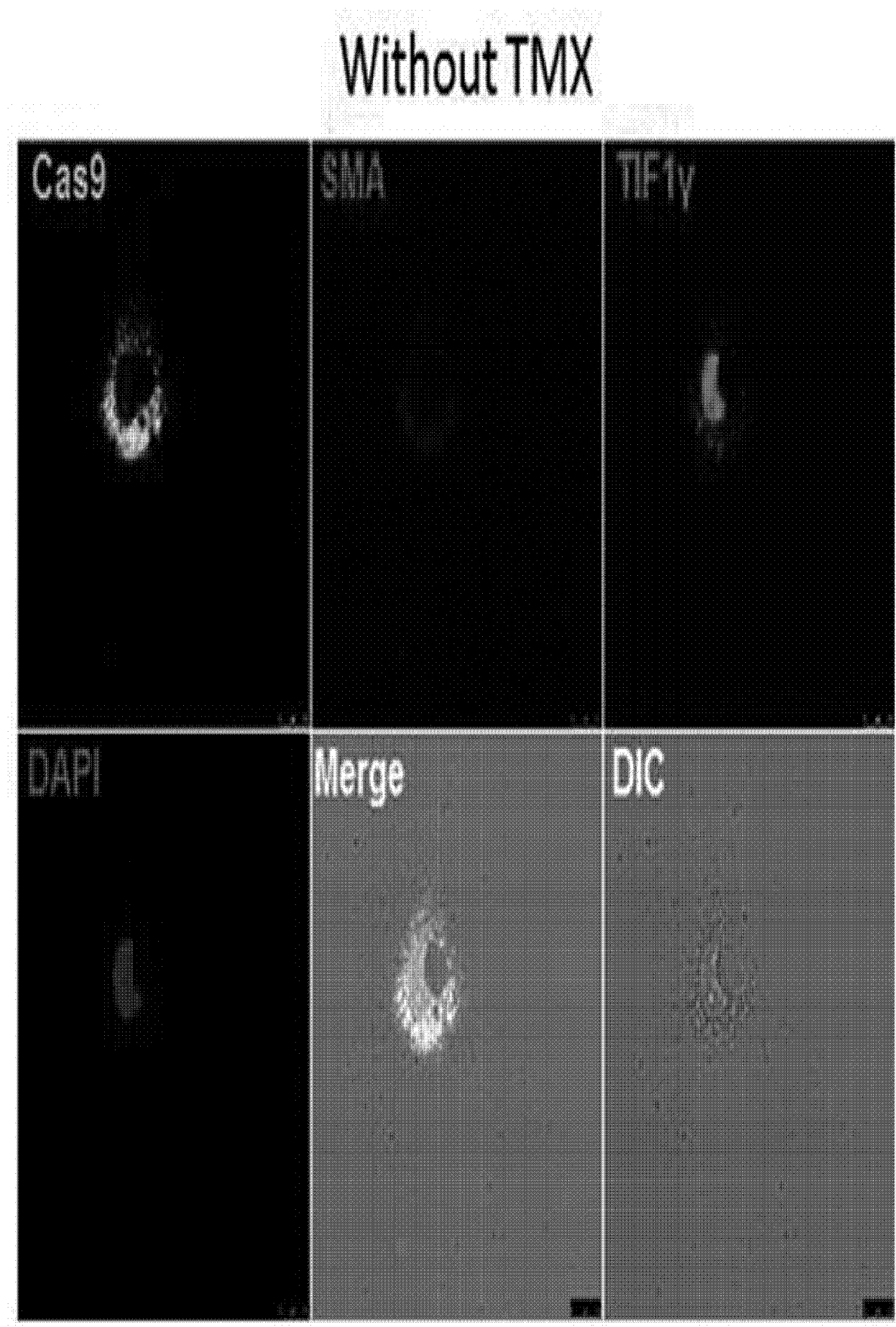


[도4]

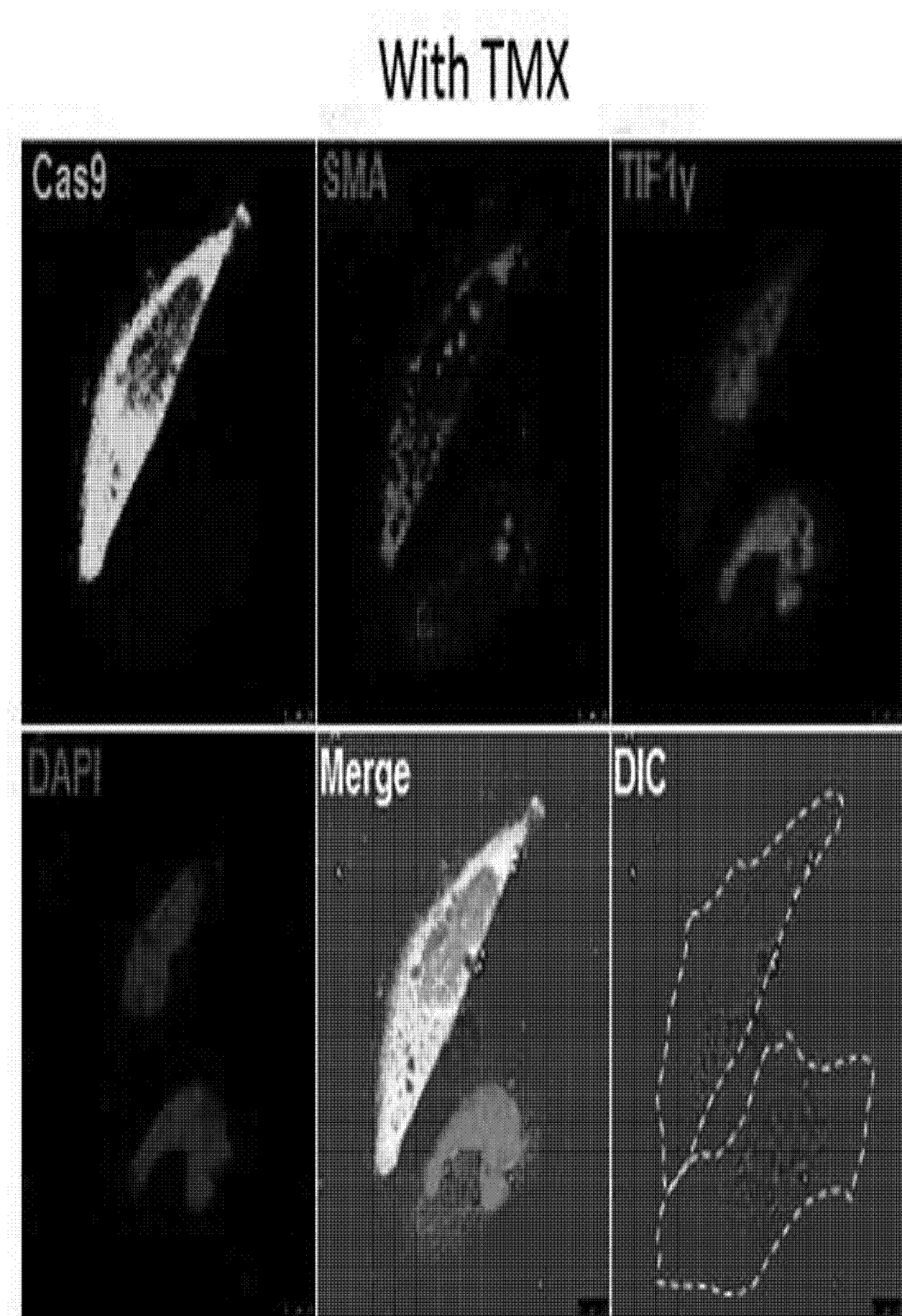


The diagram illustrates the Lrat_Cas9-ERT2 system. It shows a circular plasmid construct with a U6 promoter, a gRNA/scaffold, a PvuI site, a β-globin poly(A) signal, an AvrII site, and a 15,015 bp Lrat_promoter_ERT2-Cas9-ERT2 region. A linear DNA fragment with Exon 1, Exon 2, and Exon 3 is shown with gRNA-1, gRNA-2, and gRNA-3 binding sites. A 3D model of a cell is shown with a nucleus containing the Lrat_Cas9-ERT2 system. A table shows the components of the system: gRNA-1, gRNA-2, and gRNA-3, each with a U6 promoter, a gRNA, and a gRNA-3 binding site. A table shows the components of the Lrat_Cas9-ERT2 system: mLant, ERT2, spCas9, and ERT2. A table shows the components of the Lrat_Cas9-ERT2 system: mLant, ERT2, spCas9, and ERT2. A table shows the components of the Lrat_Cas9-ERT2 system: mLant, ERT2, spCas9, and ERT2.

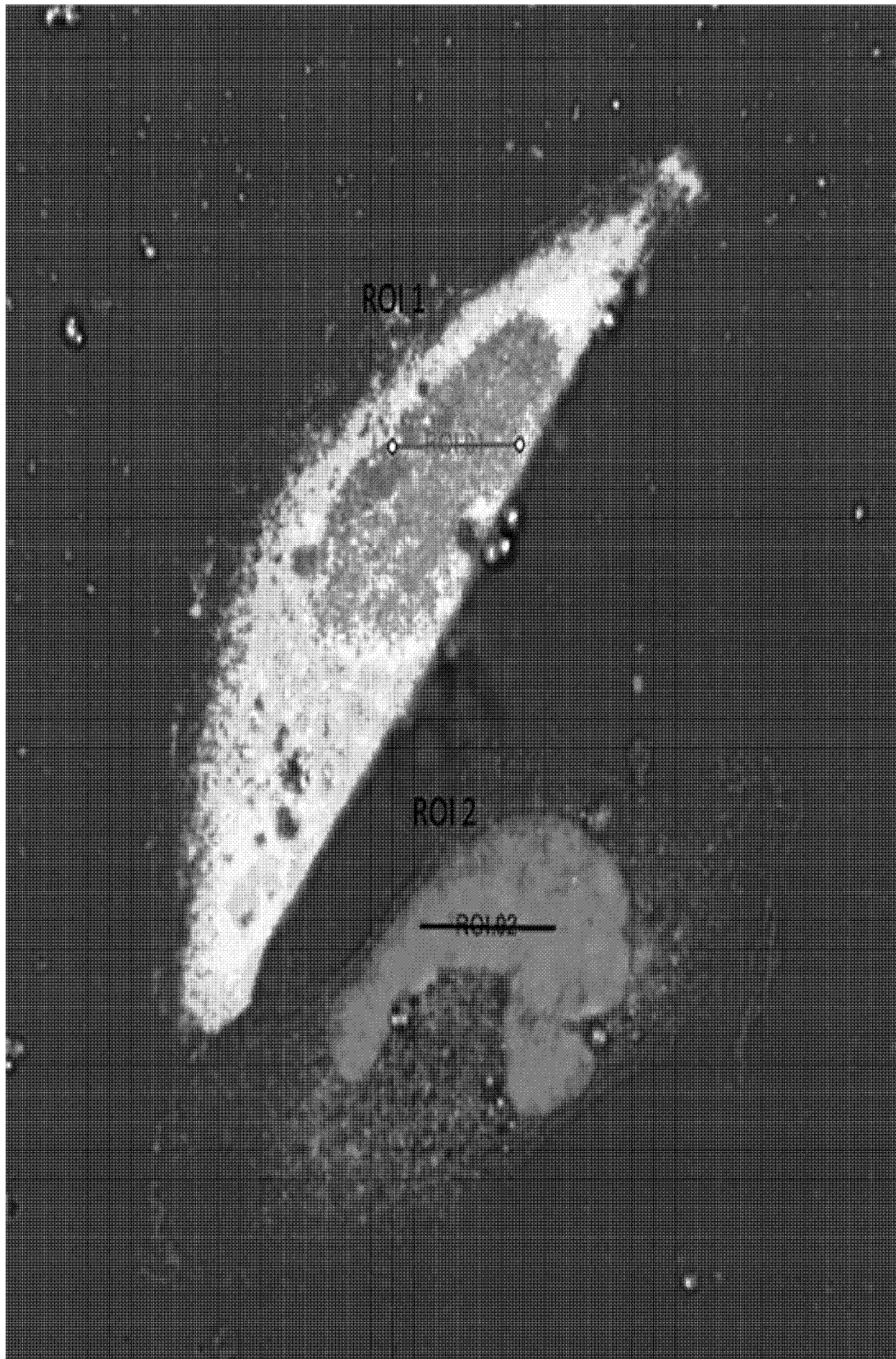
[도6a]



[도6b]



[도7]



[도8]

