



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136212
(43) 공개일자 2022년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12Q 1/6841 (2018.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
G01N 33/533 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0275 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0038407

(22) 출원일자 2022년03월28일

심사청구일자 2022년03월28일

(30) 우선권주장

1020210041202 2021년03월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박재용

서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동, 래미안라센트)

권오성

서울특별시 노원구 한글비석로 396, 108동 1016호 (상계동, 벽산아파트)

(74) 대리인

이명진

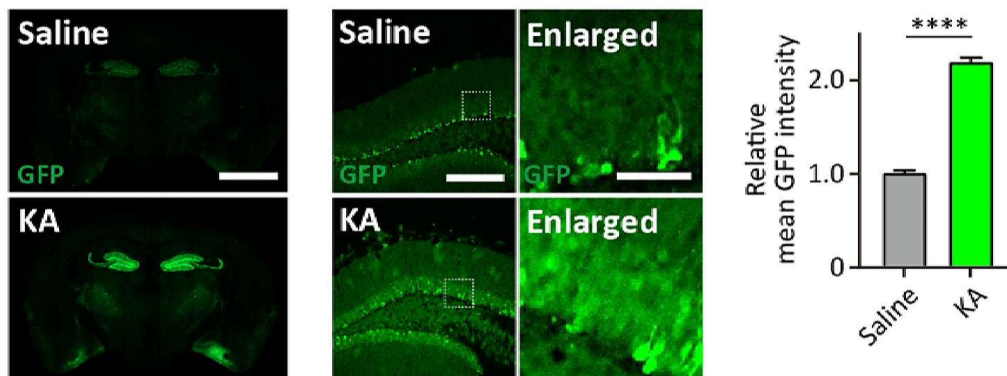
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 KCNK1 BAC-GFP로 형질전환된 동물모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 KCNK1 BAC-GFP로 형질전환된 동물모델 및 이의 제조방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 형질전환 동물모델을 통해 KCNK1 유전자의 발현을 GFP의 발현을 관측하여 용이하게 확인할 수 있으며, 신경세포 활성화 의존적 KCNK1 유전자 발현 증가 기전을 확인하였다. 따라서, 본 발명으로 KCNK1 유전자 발현을 조절하는 인자를 스크리닝할 수 있으며, 다양한 뇌 질환의 새로운 치료법을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6841 (2018.05)
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/533 (2013.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
A01K 2217/20 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133475
과제번호	2016M3C7A1904149
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명	막단백 기반 뇌염증 제어기술 개발
기 여 율	25/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711148109
과제번호	2017R1A2B3012502
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	인터랙툼 기반 TWIK1 이온통로의 뇌세포 특이적 기능연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130286
과제번호	2017M3C7A1079692
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명	정서장애 관련 고빠핵 신경회로 규명 및 국소적 조절기술 개발
기 여 율	25/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자 세트는 KCNK1 유전자의 시작 코돈 앞에 삽입되는 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유전자 세트는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 KCNK1 유전자는 치아이랑에서 발현하는 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 표지 단백질은 GFP(Green fluorescent protein), YFP(Yellow fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(Cyan fluorescent protein), DsRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, ZsTellow, mApple, mTagBFP2, 및 mCherry로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 BAC 벡터의 크기는 100 내지 350kb인 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 표지 단백질의 발현이 증가하는 것은 KCNK1 유전자의 발현의 증가를 의미하는 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 동물모델은 신경세포가 과활성되면 KCNK1 유전자의 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델.

청구항 9

KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 배아줄기 세포에 넣는 단계; 및

상기 배아줄기 세포를 암컷 동물에 이식하는 단계를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델 제조방법.

청구항 10

하기 단계를 포함하는 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법:

(a) KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 동물모델에서 표지 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및

(c) 후보물질 비처리군과 비교하여, 표지 단백질의 발현량이 감소한 경우에, 상기 후보물질을 뇌질환 치료제로 판정하는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 뇌질환은 뇌전증, 파킨슨씨병, 알츠하이머, 우울증, 및 조울증으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 12

KCNK1 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 KCNK1 BAC-GFP로 형질전환된 동물모델 및 이의 제조방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뇌전증(epilepsy)이란 다양한 원인과 복합적인 발병 과정을 통하여 반복적으로 발작(seizure)이 발생하고, 신경 생물학적, 정신적, 인지적, 사회적 변화를 수반하는 심각한 신경 질환으로, 원인에 따라서 원인을 모르는 특발성 뇌전증(idiopathic epilepsy), 위험인자나 원인이 확인되는 증상뇌전증(symptomatic epilepsy), 위험인자나 원인이 있을 것으로 추정되는 잠재뇌전증(symptomatic epilepsy)으로 나뉜다. 뇌병변을 일으킬 수 있는 다양한 질환이 뇌전증 발생의 위험인자 또는 원인으로, 선천 발달 및 유전질환은 대부분 소아기, 사춘기 및 초기 성인기의 주요 원인이며, 머리외상, 중추신경계 감염 및 뇌종양은 모든 연령에서 뇌전증의 원인이고, 뇌혈관 질환은

60세 이상의 뇌전증에서 가장 흔한 원인으로 알려져 있다. 뇌전증은 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 뇌졸중(Stroke)에 이어 세 번째로 흔한 신경계 질환으로, 전 세계적으로 약 6,500만 명이 앓고 있으며 유병률이 1000명 당 2.2명에서 41명으로 보고되고 있으나 보통 4~10명 정도로, 일생 동안 누적 발생률은 약 4.5%에 달한다. 국내의 경우에는 약 30~40만 명의 뇌전증 환자가 있는 것으로 추정되며 인구 1,000명 당 약 4명의 유병률을 보인다.

[0004] 일반적인 뇌전증의 진단에는 뇌파검사와 뇌 영상 검사가 이용된다. 뇌파검사는 뇌전증의 진단에 있어서 가장 중요한 검사이나 민감도가 낮아 일반적으로 뇌전증 환자가 첫 번째 뇌파검사를 받을 경우 뇌전증과파가 기록될 확률은 50%에 지나지 않는다. 뇌전증이 의심되는 환자에서는 일반적으로 3회 정도 검사를 반복하며, 여러 차례 검사를 하더라도 두피에서 기록되는 뇌파검사는 약 20% 정도는 뇌전증과파를 기록하지 못한다고 알려져 있다. 또한 정상인의 약 1~2% 정도에서는 뇌전증과파와 비슷한 모양의 뇌파가 관찰되는 경우도 있고, 특히 소아에서는 이러한 뇌파에 의해 판독이 어려운 경우가 있다. 뇌 영상 검사, 특히 뇌 자기공명영상 촬영(뇌 MRI)은 뇌전증의 원인을 규명하는데 뇌파검사와 함께 가장 중요한 검사이지만 MRI로 병리적 변화를 발견할 수 있는 확률은 새로 뇌전증을 진단받은 환자에서는 10~30%이고, 난치성 뇌전증 환자에서는 60% 정도로 알려져 있다. 이처럼 현존하는 검사 방법으로 뇌전증이 진단되지 못하는 경우가 존재한다. 또한, 뇌전증의 분자/유전학적 기전의 연구와 뇌전증 약물 치료제 검증에 활용하기 위한 적절한 동물모델이 부족한 실정이다.

[0005] 형질전환 동물(transgenic animals)이란 인위적으로 외부의 유전자를 삽입하거나 또는 유전자를 제거하여 의도하는 유전형질을 발현시킨 동물을 말하며, 생명체에서의 특정 유전자의 역할을 파악하는 기초연구에 유용하게 쓰일 수 있다. 즉, 연구하고자 하는 유전자를 삽입 또는 결손시키고, 그 영향이 어떻게 나타나는지를 관찰하여 상기 유전자가 매개하는 생리적 기능을 유추할 수 있다. 뿐만 아니라, 형질전환 동물은 사람 질병의 한 모델로서 사용할 수 있고, 질병의 원인이나 질병의 진행과정 등을 파악하거나 잠재적 치료약품의 효과나 부작용을 알아보는데 매우 유용하게 사용되고 있다. 또한, 현재 치매, 암, 심장병, 유전병 등의 질병에 걸린 형질전환 생쥐, 제브라피쉬 등이 개발되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-2210530호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 KCNK1 유전자 발현을 GFP로 손쉽게 확인할 수 있는 형질전환 동물모델을 제작하여, 본 발명의 KCNK1 유전자 발현을 조절하는 인자를 스크리닝하는 시스템 등을 완성하였다.

[0009] 이에 본 발명의 목적은 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 배아줄기 세포에 넣는 단계; 및

[0011] 상기 배아줄기 세포를 암컷 동물에 이식하는 단계를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 하기 단계를 포함하는 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:

[0013] (a) KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;

[0014] (b) 상기 동물모델에서 표지 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및

- [0015] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, 표지 단백질의 발현량이 감소한 경우에, 상기 후보물질을 뇌질환 치료제로 판정하는 단계.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 KCNK1 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 제공하는 것이다.
- [0017] 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.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 배아줄기 세포에 넣는 단계; 및
- [0021] 상기 배아줄기 세포를 암컷 동물에 이식하는 단계를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델 제조방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0023] (a) KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0024] (b) 상기 동물모델에서 표지 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및
- [0025] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, 표지 단백질의 발현량이 감소한 경우에, 상기 후보물질을 뇌질환 치료제로 판정하는 단계.
- [0026] 또한, 본 발명은 KCNK1 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에서 상기 유전자 세트는 KCNK1 유전자의 시작 코돈 앞에 삽입되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 유전자 세트는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 KCNK1 유전자는 치아이랑에서 발현하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 표지 단백질은 GFP(Green fluorescent protein), YFP(Yellow fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(Cyan fluorescent protein), DsRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, ZsTellow, mApple, mTagBFP2, 및 mCherry로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 BAC 벡터의 크기는 100 내지 350kb 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 표지 단백질의 발현이 증가하는 것은 KCNK1 유전자의 발현의 증가를 의미하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 동물모델은 신경세포가 과활성되면 KCNK1 유전자의 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 뇌질환은 뇌전증, 파킨슨씨병, 알츠하이머, 우울증, 및 조울증으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 따른 신규한 형질전환 동물모델을 통해 KCNK1 유전자의 발현을 GFP의 발현을 관측하여 용이하게 확인할 수 있으며, 신경세포 활성화 의존적 KCNK1 유전자 발현 증가 기전을 확인하였다. 따라서, 본 발명으로 KCNK1 유전자 발현을 조절하는 인자를 스크리닝할 수 있으며, 다양한 뇌 질환의 새로운 치료법을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 형질전환 생쥐 제작에 사용한 유전자 컨스트럭트(gene construct)의 개념도를 나타낸 것이다.

도 2는 전체 뇌조직 수준과 세부 뇌조직 수준에서 GFP 발현을 분석하는 two-track 조직학적 분석 기법을 나타낸 것이다.

도 3a는 치아이랑(DG)에서 GFP를 발현하는 세포가 KCNK1(TWIK-1)을 함께 발현하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 각 200 μ m, 50 μ m).

도 3b는 GFP가 발현하는 뇌의 다른 조직 LEC(Lateral entorhinal cortex)에서 GFP를 발현하는 세포가 KCNK1(TWIK-1)을 함께 발현하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 각 200 μ m, 50 μ m).

도 4a는 형질전환 생쥐의 GFP 발현의 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 각 1000 μ m, 200 μ m).

도 4b는 세포 마커와 함께 면역조직염색기법(IHC; immunohistochemistry)을 사용하여 GFP 발현 세포를 확인한 결과를 나타낸 것이다(NeuN, 신경세포 마커; GAD67, 억제성 신경세포 마커; Scale bar 는 200 μ m).

도 5a는 정상 생쥐의 뇌조직에서 형광제자리혼성화(fluorescence in situ hybridization, FISH)를 사용하여 KCNK1 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 100 μ m).

도 5b는 정상 생쥐의 뇌조직에서 면역조직염색기법(IHC; immunohistochemistry)을 사용하여 TWIK-1 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 200 μ m).

도 6은 형질전환 생쥐의 뇌의 치아이랑(DG; dentate gyrus)에서 카이닌산 여부에 따른 GFP 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 각 1000 μ m, 200 μ m).

도 7a는 생쥐의 뇌의 치아이랑에 카이닌산 또는 생리식염수를 주사하는 도식도를 나타낸 것이다.

도 7b는 쥐의 뇌의 치아이랑에서 카이닌산 여부에 따른 GFP 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다(Scale bar는 200 μ m).

도 8a는 화학유전학적 기법인 AAV-hSyn-hM3d(Gq)-mCherry 바이러스를 본 발명의 형질전환생쥐의 치아이랑 부위에 주입시키는 실험 계획 및 바이러스 주입 위치를 나타낸 것이다.

도 8b는 형질전환생쥐에서 바이러스가 도입된 치아이랑과 반대쪽 치아이랑에서 IHC를 사용하여 GFP, mCherry, c-fos 발현을 확인한 이미지; 치아이랑의 과립 신경세포층(Granule cell layer)에서의 c-fos-positive 세포의 밀도를 정량화한 그래프; 및 평균 GFP 발현을 정량화한 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는 신규한 형질전환 생쥐를 제작하고, 해마의 치아이랑에서 GFP 발현이 가장 높은 것을 확인하였고, GFP 발현이 KCNK1 유전자의 발현을 의미한다는 것을 확인하였다(실시예 1 및 2 참조).

[0040] 본 발명의 다른 실시예에서는 본 발명의 형질전환 생쥐를 이용하여 카이닌산이 KCNK1 유전자의 발현을 증가시키며, GFP 발현도 증가시킴을 확인하였다(실시예 3 내지 5 참조).

[0041] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 본 발명의 형질전환 생쥐를 이용하여 신경세포 활성화 의존적 KCNK1 유전자 발현 증가 기전을 확인하였다(실시예 6 참조).

- [0043] 본 발명자들은 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델을 제공한다.
- [0044] 또한, KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트; 및 KCNK1 유전자가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, “KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1)”은 TWIK1(tandem of P domains in a weak inward rectifier K channel 1)이라고도 하며, 뇌 내 포타슘 농도를 조절하는 주요 막단백질군 중 하나인 K2P family 의 하나로서, potassium(K) 이온통로이다. 상기 potassium(K) 이온통로(칼륨 이온통로)는 신경세포의 흥분성을 조절하는 방면에서 중요한 작용을 한다. 이의 이온기초는 세포 내 칼륨 이온 농도가 세포 외 칼륨 이온 농도보다 높고 막전위 탈분극에 의해 통로를 활성화시킨 후, 양전하를 띤 칼륨 이온은 밖으로 흐르고, 막전위는 이로 인해 음전하를 띠고(재분극 또는 과분극), 세포 흥분성은 하강되는 것이다. 상기 KCNK1 유전자는 치아이랑에서 발현할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 본 발명에 있어서, “치아이랑(Dentate gyrus)”은 뇌 해마(Hippocampus)의 내부 영역으로, 해마 외부의 후각 뇌피질(Entorhinal cortex) 영역으로부터 신경입력을 받아 해마 내부의 다른 영역인 CA3(cornu Ammonis 3)로 신경출력을 내보내는 역할을 한다. 또한 상기 치아이랑은 학습과 기억, 스트레스에 의한 우울증 유발 등의 과정에 관여한다.
- [0047] 본 발명에 있어서, “BAC(bacterial artificial chromosome)”는 분자 생물 실험에서 사용되는 DNA 구조물이다. 이는 벡터로서 형질전환이나 클로닝 등에 이용될 수 있다. 플라스미드에 비해 더 큰 DNA 절편을 운반할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 세트는 2개 이상의 유전자가 모여있는 집합을 의미하는 것으로, 본 발명의 일 실시예에서는 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 유전자 세트는 KCNK1 유전자의 시작 코돈 앞에 삽입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 유전자 세트는 Poly A 서열, 및 항생제 저항성 유전자를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항생제 저항성 유전자는 엠피실린(ampicillin), 네오마이신(Neomycin, G418), 푸로마이신(Puromycin), 반코마이신(Vancomycin), 메티실린 (Methicillin), 또는 히그로마이신(Hygromycin) 항생제에 저항성을 가진 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 세트는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 명세서에 있어서, 상기 BAC 벡터의 크기는 100 내지 350kb, 100 내지 300kb, 100 내지 280kb, 100 내지 260kb, 100 내지 240kb, 100 내지 220kb, 150 내지 350kb, 150 내지 300kb, 150 내지 280kb, 150 내지 260kb, 150 내지 240kb, 150 내지 220kb, 200 내지 350kb, 200 내지 300kb, 200 내지 280kb, 200 내지 260kb, 200 내지 240kb, 200 내지 220kb, 또는 210 kb일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 표지 단백질은 GFP(Green fluorescent protein), YFP(Yellow fluorescent protein), BFP(blue fluorescent protein), CFP(Cyan fluorescent protein), DsRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, ZsTellow, mApple, mTagBFP2, 및 mCherry로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 표지 단백질의 발현이 증가하는 것은 KCNK1 유전자의 발현의 증가를 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 동물모델은 신경세포가 과활성되면 KCNK1 유전자의 발현이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명은 KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 배아줄기 세포에 넣는 단계; 및
- [0053] 상기 배아줄기 세포를 암컷 동물에 이식하는 단계를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델 제조방법을 제공한다.
- [0055] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0056] (a) KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1) 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 포함하는, KCNK1 BAC-GFP 발현 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;

- [0057] (b) 상기 동물모델에서 표지 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및
- [0058] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, 표지 단백질의 발현량이 감소한 경우에, 상기 후보물질을 뇌질환 치료제로 판정하는 단계.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 측정은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunoassay), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 후보 물질은 KCNK1 유전자의 발현 수준이 정상 수준으로 회복되는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화학물질, 펩타이드, 단백질, 항체 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌전증, 파킨슨씨병, 알츠하이머, 우울증, 및 조울증으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 “뇌전증”은 뇌의 비정상적인 과흥분과 과동기화로 인해 신경세포 중 일부가 짧은 시간에 과도한 전기를 발생시켜 반복적으로 발작(seizure)이 발생하는 만성화된 질환군으로, 신경생물학적, 정신적, 인지적, 사회적 변화를 수반하는 심각한 신경 질환이다. 또한, 신경세포의 비정상적 과다흥분성(hyperexcitability)에 의한 흥분독성(excitotoxicity)이 유발되어 뇌전증에 의한 병리학적 손상이 잘 나타나는 대뇌 부위 중 해마(hippocampus) 내에서 해마경화증(hippocampal sclerosis), 교질화(gliosis), 비정상적 신경 발생(abnormal neurogenesis)과 치아이랑 과립세포 비정상적 세포구조(cytoarchitectural abnormality of dentate granule cells), 및 이상시냅스회로 형성(aberrant synaptic circuit)등이 나타난다. 상기와 같이, 해마 내 병리학적 현상들이 진행됨으로서 만성 뇌전증 발작(chronic epileptic seizure)이 발생되고 인지 및 기억 장애뿐만 아니라 약물 치료에 반응하지 않는 약제불응성 난치성 뇌전증이 발생된다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 “우울증”은 감정을 조절하는 뇌의 기능에 변화가 생겨 부정적인 감정이 나타나는 병으로, 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않았으며, 세로토닌 및 멜라토닌을 비롯하여 도파민, 노르에피네프린 등 신경과 관련된 여러 가지 호르몬이 우울증에 영향을 미칠 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 동물은 인간을 제외하고 케이지 안에서 사육할 수 있는 동물이라면 제한되지 아니하며, 설치류, 토끼, 및 원숭이 등을 포함하나, 바람직하게는 실험용 쥐(mouse 및 rat)일 수 있다. 설치류에 속하는 쥐는 동물실험에 가장 많이 이용되는 것으로서, 특히 실험용 쥐는 마우스(mus musculus: mouse) 및 래트(rattus norvegicus: rat) 등이 있으며, 기르기 쉽고, 번식이 빠르며, 가격이 저렴하다는 점에서 실험동물로서 유리하다. 본 발명에서 실험용 쥐는 마우스와 래트를 포함하는 의미로 사용되며, 본 명세서에서 실험용 쥐는 생쥐라고 호칭한다.
- [0065] 또한, 본 발명은 KCNK1 유전자의 프로모터; 및 표지 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 세트가 삽입된 BAC 벡터를 제공한다.
- [0067] 즉, 본 발명에 따른 형질전환 생쥐는 KCNK1 유전자 발현을 조절하는 인자를 손쉽게 스크리닝할 수 있는 이상적인 동물모델로서, KCNK1과 관련된 뇌질환 연구를 위한 유용한 동물모델로 이용될 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명의 동물모델을 활용하여 뇌질환 치료 약물을 스크리닝하고, 이를 검증하는 것에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0070] 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.

[0072] **실시예 1. KCNK1 BAC-GFP 형질전환 생쥐의 제작**

[0073] KCNK1(Potassium channel subfamily K member 1)의 유전자 발현을 녹색형광단백질(GFP; Green fluorescent protein)의 형광빛으로 관측할 수 있는 형질전환 생쥐를 제작하였다. 구체적으로, TWIK-1(KCNK1) 유전자좌

(GENSAT1-BX1474, Entrez Gene ID: 16525)를 덮는 변형된 BAC 클론은 BACPAC 리소스 센터에서 구입하였다. GENSAT 홈페이지에 자세히 설명된 대로 변형된 BAC 벡터(GENSAT1-BX1474)는 BAC 벡터(RP23-385E8)를 재조합하여 생성하였다. 구체적으로, KCNK1 단백질의 시작 코돈(starting codon) 바로 앞에 녹색형광단백질(GFP) 유전자; polyA 서열; 및 재조합 유전자 선별을 위한 항생제 발현 유전자로 이루어진 유전자 세트를 삽입함으로써, KCNK1 유전자의 발현 조절 조건에 따라 GFP가 대신 발현할 수 있는 변형된 BAC 벡터(GENSAT1-BX1474)를 생성하였다. 그 후, 변형된 BAC DNA를 Large-Construct Kit(Qiagen, Cat#; 12462, Germantown MD, USA)를 사용하여 정제하고, P1-SceI 소화에 의해 선형화하였다. 그 후, 이를 C57BL/6N 암컷에서 채취한 ES 세포(embryonic stem cell)에 전해주사하였다. 그런 다음, 수정란을 가임시킨 C57BL6/N 암컷(오리엔트바이오, 성남시)에 이식하여 KCNK1의 유전자 발현 조절에 상응하여 녹색형광단백질(GFP)을 발현하는 형질전환 생쥐를 제작하였다. 도 1에 KCNK1-GFP BAC 벡터의 개략도를 나타내었다. 또한, 상기 유전자 세트의 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0075]

유전자 세트	서열(5'-3')
	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCTGGCCACCCCTCGTG ACCACCTGACCTACGGCTGACGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTAC GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATC GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCC GACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC ACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGACACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT CACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCCTAGAGCTCGTGATCA GCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTT TCCTAATAAATGAGGAAATGTCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATCTTCTGAGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGAT TGGGAAGACAAATAGCAGGATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCGACGACTAGTGCGGTA AATAGCAATAAATGGCCTTTTTATCGGCAAGCTCTTTAGGTCTTTCGCATGTATTGCGATATGCATAAACCAGCCATTGAGTAAGTTTTT AAGCACATCATCATCAAGCTTAAAGTTGGTCTCTTGGATCAATTTGCTGACAATGGCGTTTACCTTACCAGTAATGTATTCAAGGCTAAT TTTTCAAGTTTCAATCCAAACCAATGATAGGCATCACTTCTTGGATAGGGAATAGGTTTTTATATTATCAATAATATAATCAAGATAATGTTT AAATATACTTTCTAAGGCAGACCAACCATTTGTTAAATCAGTTTTTGTGTGATGTAGGCATCAATCATAATTAATTGCTGCTTATAACAGGC ACTGAGTAATTGTTTTTATTTTAAAGTGATGATAAAAGGCACCTTTGGTACCAACGCTTTTCCGAGATCCTCTACGCCGACGCATCGT GGCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTGCTGGCGCTATATCGCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCAT GAGCGCTGTTCGCGGTGGGTATGTTGGCAGGCCCGTGGCGGGGCTGCCTCGCGCTTCGCTGATGACGGTGAAACCTCTGACACAT GCAGTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGTGTTGGCGGGTGTCTG GGGCGAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGAGTGTATACTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCAT AAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG TCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGCTGTAGATAAATACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGAC CCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCGCGGAAGGGCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATC CAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTG TCACGCTCGTCTGTTGTTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT AGCTCCTTCGCTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCGCAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTC ATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCG CGGTCAACCGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGGCTCATCATTTGGAAGAACGTTCTTCGCGGCGAAAACTCTCAAGGATC TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAAGCGTTTCTGGGTGAGCA AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGC ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAA GTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAAATCCCA TGTCAGCCGTTAAGTGTCTGTGTCCTCAAAATTTGAGAGGCTCTAAGGGCTTCTCAGTGCCTTACATCCCTGGCTGTTGTGCCACA ACCGTTAAACCTTAAAGCTTTAAAGCCTTATATATCTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTTAT ATTAATTTTATGTTCAACATGAGAGCTTAGTACGTGAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGG TTTAGTTCGTTAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGG CTGCTGATCTTCAGATCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGATCGCGGCCCGCGCG

[0077]

실시예 2. 형질전환 생쥐의 뇌조직에서 녹색형광단백질(GFP) 발현 분석

[0078]

본 발명의 형질전환 생쥐의 뇌에서 GFP 발현을 분석하기 위하여, 도 2와 같이 전체 뇌조직 수준과 세부 뇌조직 수준에서 GFP 발현을 분석하는 two-track 조직학적 분석 기법을 사용하여 분석하였다. 구체적으로, KCNK1 BAC-GFP 형질전환 생쥐에서 GFP 발현을 체계적으로 분석하기 위해 거시적 해상도에서 미시적 해상도를 포함한 실험 파이프라인을 구축하였다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0079] 표 2에 나타난 바와 같이, 생쥐의 뇌 내 부위 중 특히 해마의 치아이랑(Hippocampal dentate gyrus) 부위에서 GFP 발현이 가장 높은 것을 확인하였다.

표 2

Brain Region	Expression
Outer plexiform layer	+
Piriform cortex	++
Caudate putamen	+++
Hypothalamus	+
Dentate gyrus	+++++
Reticular thalamic nucleus	+++
Peri-amygdala area	++++
Lateral entorhinal cortex	++++
Lateral lemniscus	+++
Reticular trigeminal nucleus	+++
Superior olivary complex	+++
Cerebellar granule cell layer	+++++
Cerebellar dentate nucleus	+++

[0081]

[0083] 또한, 형질전환 생쥐의 뇌 내 GFP 발현과 KCNK1(TWIK-1) 발현의 유사성을 검증하였다. 그 결과는 도 3a 및 3b에 나타내었다.

[0084] 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 치아이랑(DG; Dentate gyrus)에서 GFP를 발현하는 세포가 KCNK1(TWIK-1)을 함께 발현하고 있음을 확인하였다. 또한, GFP가 발현하는 뇌의 다른 조직인 LEC(Lateral entorhinal cortex)에서 GFP를 발현하는 세포가 KCNK1(TWIK-1)을 함께 발현하고 있음을 확인하였다. 이는 GFP 발현이 KCNK1 유전자 발현을 대신 보여줄 수 있음을 의미한다.

[0085] 또한, 치아이랑에서 GFP를 발현하는 세포의 종류를 면역조직염색기법(immunohistochemistry, IHC) 등을 통하여 확인하였다. 구체적으로, 뇌 조각을 실온에서 20분 동안 PBS로 세척한 다음, 85℃에서 30분 동안 10mM 시트르산 나트륨 완충액으로 antigen retrieval 하였다. 그 후, 슬라이스를 PBS로 세척하고, PBS 중 0.4% Triton X-100으로 실온에서 20분 동안 투과화하였다. 그런 다음, 슬라이스를 PBS 중 10% 당나귀 혈청 및 0.1% Triton X-100으로 실온에서 3시간 동안 차단한 다음 4℃에서 PBS 중 1차 항체[chicken anti-GFP(Abcam, Cat#; ab136970, 1:300); rabbit anti-TWIK-1(Alomone labs, Cat#; APC-10, 1:200); mouse anti-NeuN(Abcam, Cat#; ab104224, 1:100); rabbit anti-GAD67(GeneTex, Cat#; GTX113190, 1:300)], 5% 당나귀 혈청 및 0.1% Triton X-100과 함께 16시간 동안 인큐베이션하였다. 0.1% Triton X-100으로 실온에서 15분 동안 3회 세척한 후, PBS 중 2차 항체 [647-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:300)], 5% 당나귀 혈청, 및 0.1% Triton X-100에 4℃에서 2시간 동안 두었다. 그 후, 슬라이스를 DAPI로 대조염색하고 VECTASHIELD 변색 방지 장착 매체 (VECTASHIELD antifade mounting media, Vector Laboratories, Cat#; H-1000, Burlingame CA, USA)로 장착하였다. 거시적 이미지 데이터는 ZEISS Axio Scan.Z1 slide scanner(Carl Zeiss, RRID; SCR_020927, Oberkochen, Germany)으로 얻었으며, 현미경 이미지 데이터는 Nikon Eclipse Ti2 공초점 현미경(Nikon, RRID; SCR_021068, Tokyo, Japan)으로 얻었다. 그 결과는 도 4a 및 4b에 나타내었다.

[0086] 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, 형질전환 생쥐의 치아이랑(Dentate gyrus)에서 GFP 발현이 확인되었고, GFP 발현 세포는 과립신경세포층(granule cell layer)에서 확인되었다. 또한, 상기 세포가 흥분성 신경세포 (NeuN+GAD67-)임을 확인하였다.

[0088] 실시예 3. 정상 생쥐 뇌조직에서 카이닌산(Kainic acid)에 의한 KCNK1의 유전자 발현 변화 확인

[0089] 카이닌산(Kainic acid)은 신경세포의 과도한 활성을 일으켜 뇌전증으로 인한 세포손상을 일으키는 약물이다. 이에, 정상 생쥐에서 카이닌산에 의한 KCNK1의 유전자 발현 변화를 확인하였다. 구체적으로, 정상 생쥐에 카이닌산 또는 생리식염수(Saline)를 정맥주사한 후, 뇌조직에서 KCNK1 mRNA의 발현을 형광제자리혼성화(FISH; fluorescence in situ hybridization)를 통하여 확인하였다. 더 구체적으로, FISH는 RNAscope Fluorescent Multiplex Kit(Advanced Cell Diagnostics, RRID; SCR_012481, CA, USA) 및 Kcnk1-C1 probe (Advanced Cell Diagnostics, Cat#; ACD 535421, CA, USA)을 사용하여 제조지침에 따라 수행하였다. 또한, TWIK-1 단백질의 양을 면역조직염색기법(IHC; immunohistochemistry)을 통하여 확인하였다. 그 결과는 도 5a 및 5b에 나타내었다.

[0090] 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, 카이닌산 처리군에서 생리식염수 처리군에 비하여 유의하게 KCNK1 mRNA 발현량 및 TWIK-1 단백질 활성이 증가하였음을 확인하였다.

[0092] 실시예 4. 형질전환 생쥐 뇌조직에서 카이닌산(Kainic acid)에 의한 KCNK1의 유전자 발현 변화 확인

[0093] 실시예 3과 같은 방법으로 형질전환 생쥐에 카이닌산 또는 생리식염수(Saline)를 정맥주사한 후, GFP 발현을 확인하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0094] 도 6에 나타난 바와 같이, 카이닌산 처리군에서 생리식염수 처리군에 비하여, 생쥐 뇌의 해마조직 내 치아이랑의 GFP 발현이 증가하였음을 확인하였다.

[0096] 실시예 5. 치아이랑에 카이닌산을 직접 처리한 경우, KCNK1 유전자 발현 변화 확인

[0097] 생쥐 뇌의 해마조직 내에 치아이랑에 카이닌산 또는 생리식염수를 직접 주사한 후, GFP 발현을 확인하였다. 그 결과는 도 7a 및 7b에 나타내었다.

[0098] 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이, 치아이랑에 카이닌산을 처리한 군이 생리식염수를 처리한 군에 비하여 GFP 발현이 유의하게 증가하였음을 확인하였다. 이는 치아이랑 과립신경세포의 KCNK1 유전자 발현의 증가는 카이닌산 약물에 의한 직접적 효과임을 의미한다.

[0100] 실시예 6. 형질전환 생쥐에서 신경세포 활성화 의존적 KCNK1 유전자 발현 확인

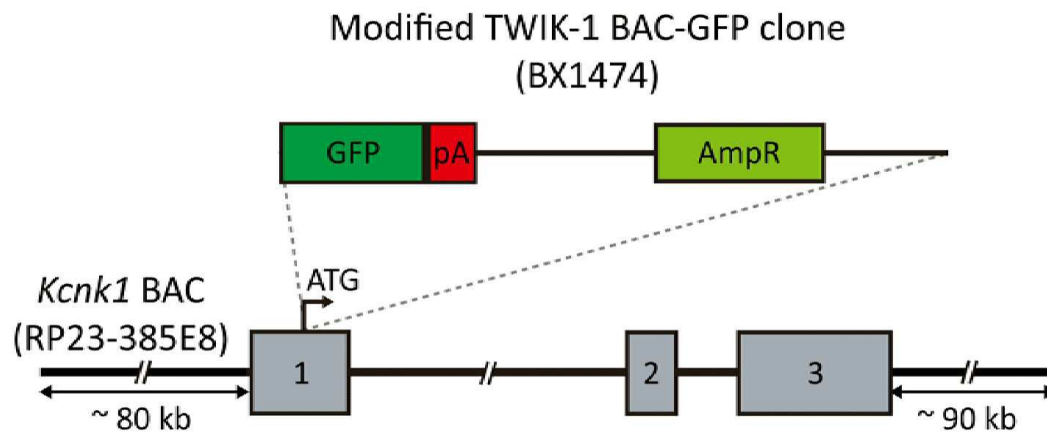
[0101] 카이닌산은 신경세포의 과도한 활성으로 뇌전증으로 인한 세포손상을 일으키는 바, 신경세포 과활성 자체가 KCNK1 유전자 발현을 증가시키는 신규 요소인지를 확인하였다. 화학유전학적 기법을 이용한 hM3d(Gq) 시스템은 CNO(clozapine N-oxide) 약물처리에 의해 세포내 칼슘의 양을 증가시킴으로써 신경세포의 활성을 선택적으로 증가시킬 수 있다. 구체적으로, hM3d(Gq)를 발현시키는 아데노 연관 바이러스(AAV; adeno-associated virus)를 본 발명의 형질전환 생쥐의 치아이랑의 한 쪽 부위에 도입하여 발현시킨 후, CNO 약물을 5일 동안 투여하여 hM3d(Gq)이 도입된 치아이랑 과립신경세포를 선택적으로 활성화시켰다. 그 후, 신경세포 활성 표적단백질인 c-fos의 활성 여부를 확인하여 치아이랑 과립신경세포의 과활성화를 확인하였고, 활성화된 과립신경세포에서 GFP 활성 증가를 확인하였다. 그 결과는 도 8a 및 8b에 나타내었다.

[0102] 도 8a 및 8b에 나타난 바와 같이, 바이러스가 도입된 치아이랑에서 바이러스가 도입되지 않은 치아이랑에 비하여, c-fos-positive 신경세포의 숫자 및 GFP 발현이 증가하였다. 즉, 신경세포의 과활성화 자체만으로도 KCNK1 유전자 발현을 증가시킬 수 있음을 확인한 것이다. 이는 신경세포 활성화 의존적 KCNK1 유전자 발현 증가 기전이 존재하는 것을 의미한다.

[0104] 상기 진술한 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.

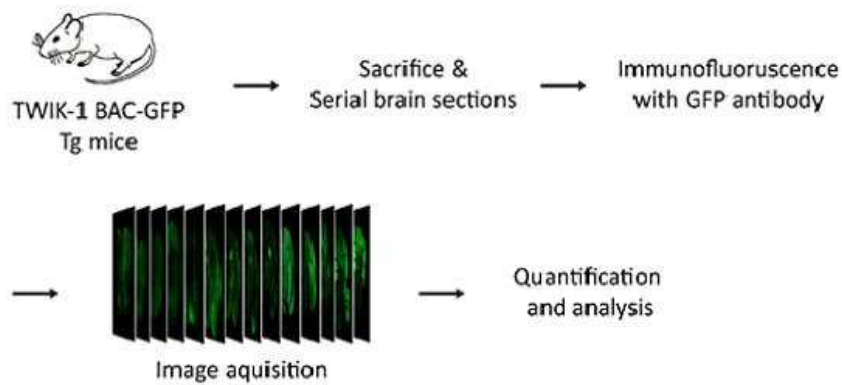
도면

도면1

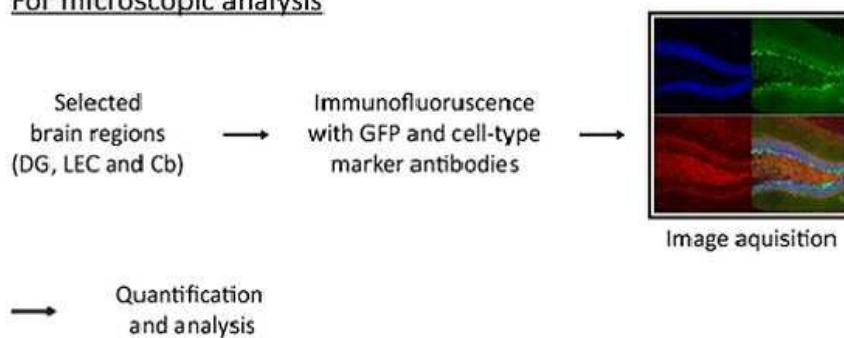


도면2

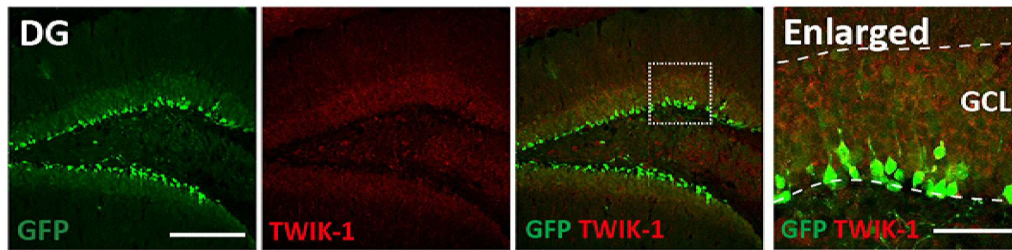
For macroscopic analysis



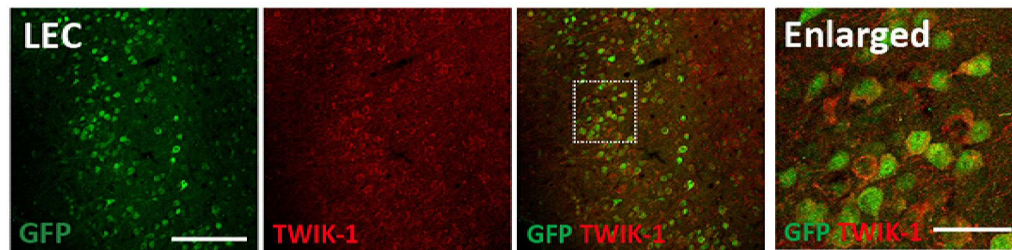
For microscopic analysis



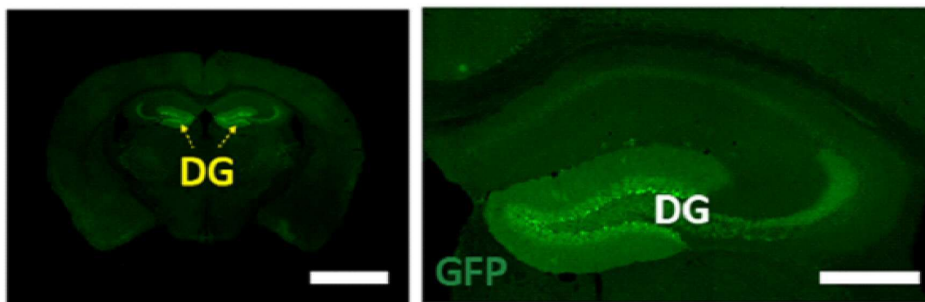
도면3a



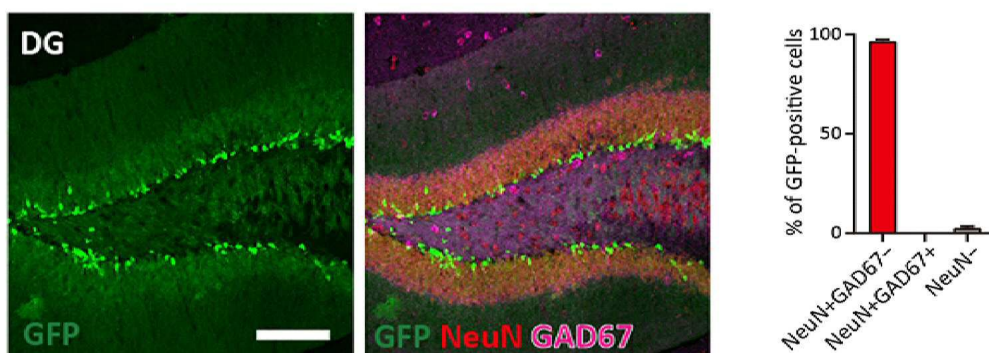
도면3b



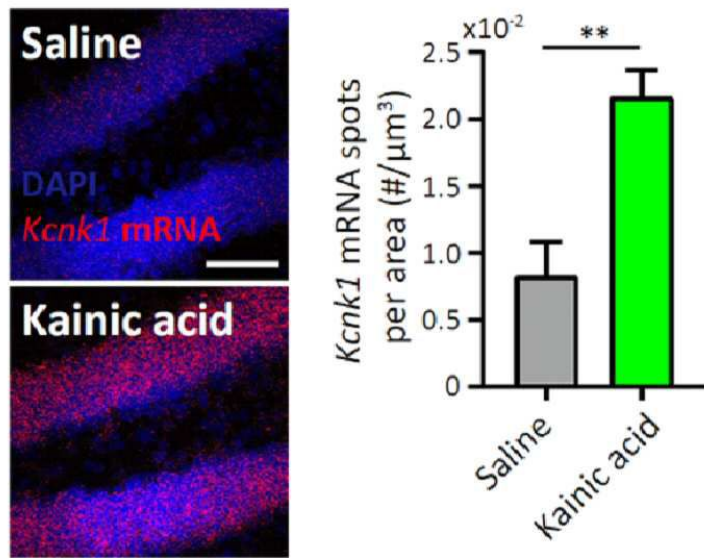
도면4a



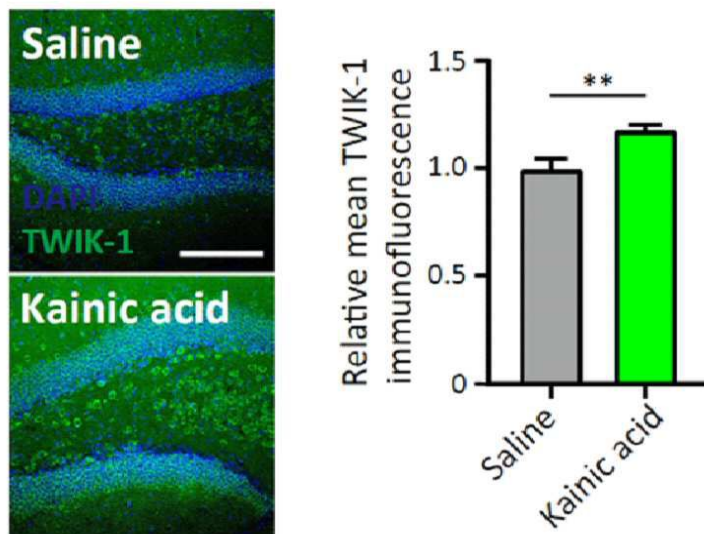
도면4b



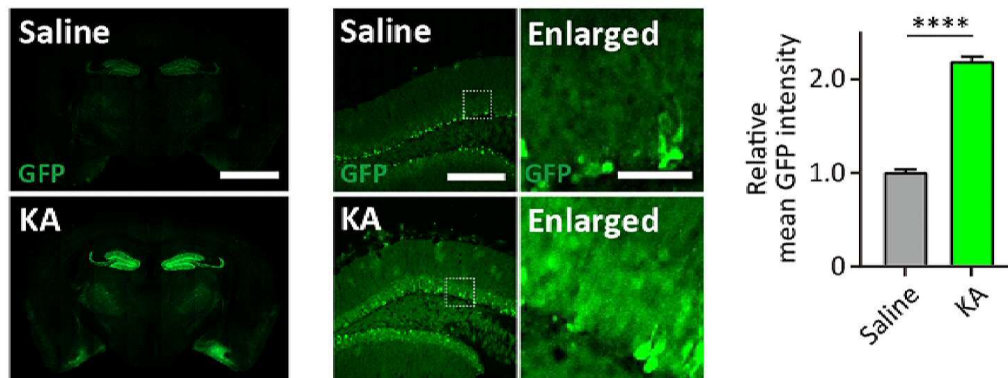
도면5a



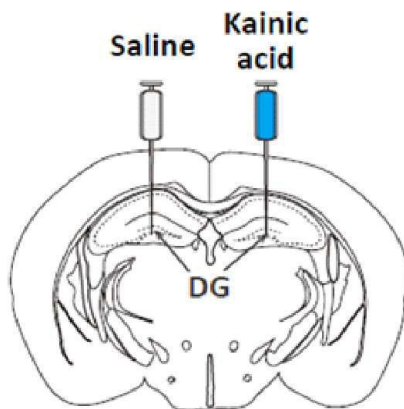
도면5b



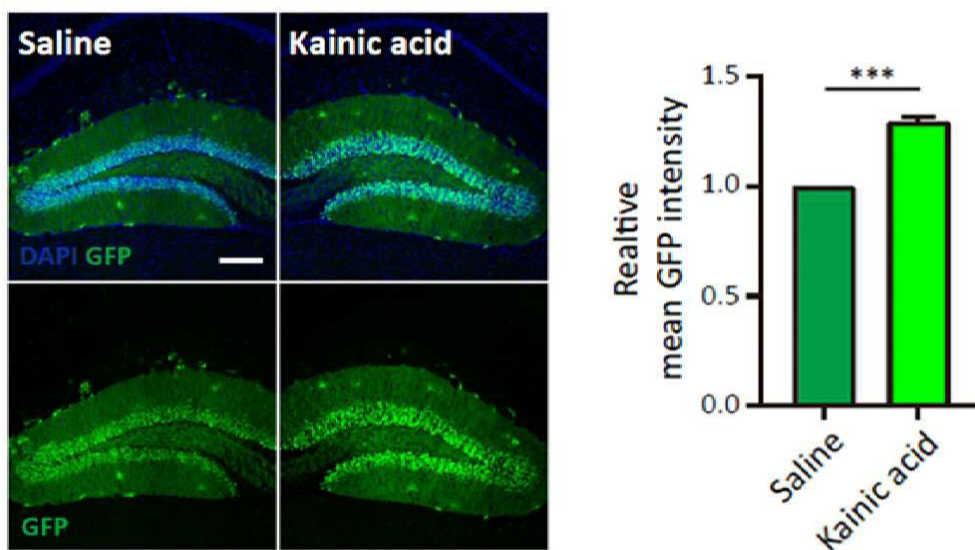
도면6



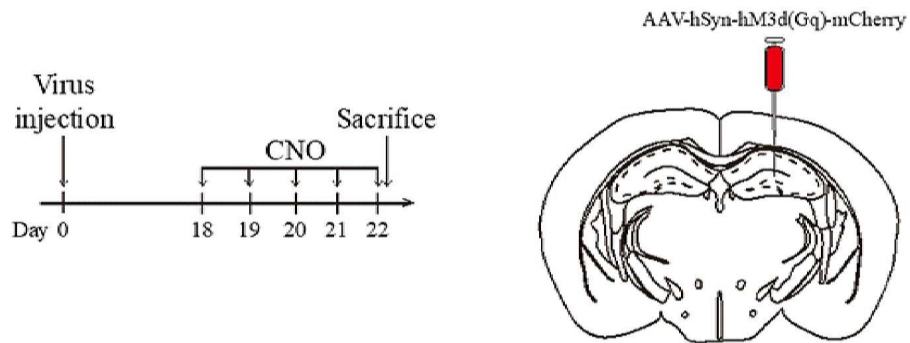
도면7a



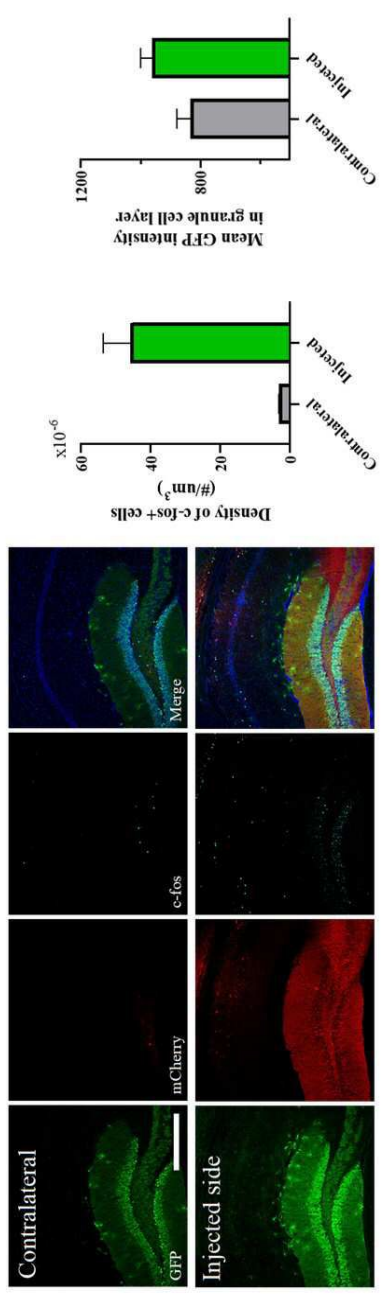
도면7b



도면8a



도면8b



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	KCNK1 BAC-GFP transgenic animal model and manufacturing method thereof	
<130>	MP21-059P1	
<150>	KR 10-2021-0041202	
<151>	2021-03-30	
<160>	1	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	3407	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	gene set	
<400>	1	
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac		60
ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac		120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc		180
ctcgtgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgga ccacatgaag		240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc		300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg		360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac		420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac		480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc		540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac		600
tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc		660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa		720
agcggcccta gagctcgtg atcagcctcg actgtgcctt ctagtigcca gccatctgtt		780
gtttgccctt ccccgctgcc ttccctgacc ctggaagggt ccaactccac tgcctttcc		840
taataaaatg aggaattgac atcgcatgtg ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt		900
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat		960
gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggctcgac gactagtgcg		1020

gtaaatacgca ataaattggc cttttttatc ggcaagctct tttaggtttt tcgcatgtat	1080
tcgatatgc ataaaccagc cattgagtaa gtttttaagc acatcatcat cataagcttt	1140
aagttggttc tcttgatca atttgctgac aatggcggtt acctaccag taatgtattc	1200
aaggctaatt tttcaagtt cattccaacc aatgataggc atcacttctt ggatagggat	1260
aaggttttta ttattatcaa taatataatc aagataatgt tcaaatatac tttctaaggc	1320
agaccaacca tttgttaaat cagtttttgt tgtgatgtag gcatcaatca taattaattg	1380
ctgcttataa caggcactga gtaattgttt tttattttta aagtgatgat aaaaggcacc	1440
tttggtcacc aacgcttttc ccgagatcct ctacgccgga cgcacgttg ccggcatcac	1500
cgcgccaca ggtgcggttg ctggcgctta tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg	1560
ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg tttcgcgctg ggtatggtgg caggccccgt	1620
ggccgggggc tgcctcgccg gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct	1680
cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg	1740
cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg cgagccatg acccagtcac gtagcgatag	1800
cgagtggtat actggcttaa ctatcgggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat	1860
aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggctcgaca gttaccaatg cttaatcagt	1920
gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc	1980
gtgtagataa ctacgatagc ggagggctta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg	2040
cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc	2100
gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg	2160
gaagctagag taagtagtgc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctgca	2220
ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga	2280
tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct	2340
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg	2400
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca	2460
accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca	2520
cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct	2580
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact	2640
cgtagcacca acigatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa	2700
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc	2760
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttatgtct catgagcgga	2820
tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga	2880

aaagtccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg	2940
cgtatcacga ggccctttcg tcttcaagaa ttcccatgtc agccgttaag tgttcctgtg	3000
tcactcaaaa ttgctttgag aggctctaag ggcttctcag tgcgttacat ccctggcttg	3060
ttgtccaca cgttaaacc ttaaaagctt taaaagcctt atatattctt ttttttctta	3120
taaaacttaa aaccttagag gctatttaag ttgctgattt atattaattt tattgttcaa	3180
acatgagagc ttagtacgtg aaacatgaga gcttagtacg ttagccatga gagcttagta	3240
cgttagccat gagggtttag ttcgttaaac atgagagctt agtacgttaa acatgagagc	3300
ttagtacgtg aaacatgaga gcttagtacg tactatcaac aggttgaact gctgatcttc	3360
agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gatcgcggcc cggcgcg	3407