(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0124001
(43) 공개일자 2020년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A01K 67/027* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A01K 67/0276* (2013.01)
*A01K 2217/075* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0047300
(22) 출원일자 2019년04월23일
심사청구일자 2020년03월25일

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**박해철**
경기도 안산시 단원구 적금로 123, 의과학연구소 3510호(고잔동, 고려대학병원)
**정인영**
경기도 안산시 단원구 적금로 123, 의과학연구소 5502호(고잔동, 고려대학병원)
**성재영**
서울특별시 노원구 노원로22길 34, 103동 1205호 (중계동, 롯데아파트,우성아파트)
(74) 대리인
**특허법인 무한**

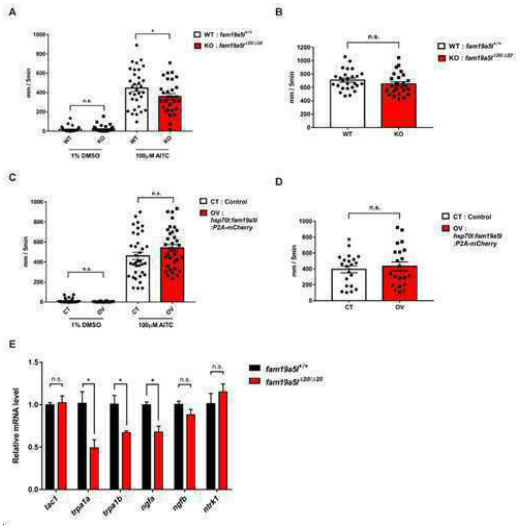
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 제브라피쉬 동물모델 및 이의 제조방법**

## (57) 요 약

본 발명은 Fam19a5l 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, FAM19A5의 제브라피쉬 상동유전자인 fam19a5l의 발현패턴과 신경계에서 기능을 규명하고자 하였다. Fam19a5l의 기능 연구를 위해 fam19a5l 녹아웃(knockout) 제브라피쉬와 열 유도성 (heat inducible) 과발현 형질전환 제브라피쉬를 제조한 결과, 상기 fam19a5l 유전자 녹아웃 제브라피쉬가 통증 감소기능을 갖고, 또한, trpa1a 및 trpa1b 유전자의 발현 조절을 통해서 유해자극에 의한 통증반응 조절에 관여함을 확인하였다.

*대 표 도* - 도9



(52) CPC특허분류
*A01K 2227/40* (2013.01)
*A01K 2267/03* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525008280
부처명 해양수산부
과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업
연구과제명 해양수산생물 유전체정보 기반 헬스케어. 재생의료소재 및 소재선별 스크리닝 시스템 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 국립해양생물자원관
연구기간 2018.09.01 ~ 2019.06.30

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

Fam19a5l 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 Fam19a5l 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델은 trpa1a 및 trpa1b 유전자의 발현을 조절하여 통증반응이 감소된 제브라피쉬 동물모델.

### 청구항 3

Fam19a5l 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델 제조 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 사람과 높은 상동성을 가진 Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 제브라피쉬 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 통증반응이 감소한 제브라피쉬 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0003] 신경펩타이드(neuropeptide)는 주로 신경세포에서 생성 및 분비되는 짧은 아미노산 서열을 가진 펩타이드로서 특정한 G단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR)와 결합을 통하여 세포 내부로 신호를 전달한다. 이러한 신경세포 사이의 신호전달을 통해, 이들은 뇌에서 공포/불안, 보상, 섭식, 수면 등의 생리적 조절 기능을 수행한다. 따라서, 신경펩타이드 작용의 이상은 신경계에서 다양한 질병을 유발할 수 있다. 현재까지 많은 신경펩타이드가 발견되고 연구가 되어왔지만, 뇌의 생리적 기능에 어떻게 일어나고 조절되는지에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 그러므로 신규 신경펩타이드의 발굴 및 생리활성 기능 연구는 뇌의 생리조절 기능 규명을 위해서 필수적이다. 뿐만 아니라, 제브라피쉬 동물모델에서는 포유류 동물 모델에서 기능이 잘 알려진 신경펩타이드에 관한 연구도 많이 이루어지지 않았다.

[0004] 통각(Nociception)은 유해한 자극으로 유발되는 감각이다. 포유류에서 통각 반응 연구가 많이 이루어져 왔지만, 여전히 진통제(painkiller) 신약 개발은 많이 이루어지지 않을 뿐만 아니라 많은 비용과 시간이 걸리고 있기 때문에 최근 이를 줄이기 위한 시도가 지속되고 있으며, 제브라피쉬가 하나의 대안으로 주목받고 있다. 현재 제브라피쉬에서도 포유류와 같이 다양한 통증모델이 확립되어 통증 연구가 활발히 진행되고 있다. 제브라피쉬에서 통증에 관한 생리학은 잘 확립되어 있으며, 포유류와 거의 유사한 것이 알려져 있다[1-3]. 제브라피쉬 통증모델은 포유류와 같이 약물, 온도, 전기 자극을 통해서 모델을 확립할 수 있으며, 현재 약물이나 온도를 이용한 통증모델이 확립되어 있다[4-6]. 약물은 포유류에서 잘 알려진 아세트산 (Acetic acid), 겨자씨 기름 (mustard oil), 시남알데하이드 (cinnamaldehyde), 히스타민 (histamine)을 통해서 제브라피쉬에서 통증을 유발할 수 있으며, 모르핀 (morphine)과 같은 진통제와 함께 처리 시 통증 반응이 감소한다는 사실이 밝혀져 있다[6]. 또한 저온과 고온에 대한 회피도를 측정하여 통증 반응을 측정하는 모델 또한 존재한다[4]. 이러한 통증 모델

은 치어 (larva)[5]와 성체[6]에서 모두 수행할 수 있는 장점이 있다. 하지만 이러한 통증 모델은 비교적 최근에 확립되었으며, 통증 반응에 관여하는 새로운 유전자 수준의 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

[0005] 한편, FAM19A (Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A) 가족 유전자는 FAM19A1에서 FAM19A5까지 총 5가지 유사 (paralogue) 유전자로 이루어져 있고, 케모카인(chemokine)의 보존된 시스테인 잔기 (cysteine residue)를 가지는 분비성 단백질을 암호화하고 있다. 최근 보고에 따르면, FAM19A5 유전자는 S1PR2 (sphingosine-1-phosphate receptor 2) 수용체 유전자를 통해서 상해 후 신생혈관내막 (postinjury neointima) 형성을 억제한다고 알려져 있다[8]. 하지만 신경계에서 FAM19A5의 기능은 알려져 있지 않다. 또한 FAM19A5 제브라피쉬 상동성 유전자에 대해서도 거의 알려져 있지 않다

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0007] 본 발명의 목적은 Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 제브라피쉬 동물모델을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 제브라피쉬 동물모델 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### *과제의 해결 수단*

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 제브라피쉬 동물모델이 제공된다.

[0012] 일 측에 따르면, 상기 Fam19a5l 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델은 trpa1a 및 trpa1b 유전자의 발현을 조절하여 통증 감소된 제브라피쉬 동물모델일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, Fam19a5l 유전자를 녹아웃 시킨 제브라피쉬 동물모델 제조 방법이 제공된다.

### *발명의 효과*

[0015] 본 발명을 통해 Fam19a5l 유전자 녹아웃 제브라피쉬 동물모델을 제조하여 통증반응에 관여하는 새로운 Fam19a5l 유전자의 기능을 발굴함으로써 진통제 신약 개발의 새로운 타겟 물질을 제시하는 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

### *도면의 간단한 설명*

[0017] 도 1은 Fam19a5l:egfp-CAAX BAC DNA 제조 과정 모식도이다.

도 2는 인간, 설치류, 제브라피쉬 사이에서 인간 FAM19A5 상동성 유전자의 아미노산 서열을 비교하여 나타낸 것이다. 이를 통해 인간 FAM19A5의 제브라피쉬 상동유전자는 fam19a5a, fam19a5b, fam19a5l 3가지가 존재함을 확인하였다.

도 3은 FAM19A5의 제브라피쉬 상동 유전자의 발현 패턴을 확인한 것으로, fam19a5l은 신경계 특정한 영역에서 발현한다는 것을 보여주며, 신경계에서 특정한 생리학적 역할을 수행할 가능성을 제안한 결과이다.

도 4의 (A)는 제브라피쉬 신경계에서 생체 내 fam19a5l 단백질의 위치를 추적하기 위한 전략 모식도이고, (B-C”는 제브라피쉬 신경계에서 생체 내 fam19a5l 단백질의 위치를 표시하여 나타낸 사진이다.

도 5는 fam19a5l 특이적 녹색형광단백질 발현 형질전환 제브라피쉬를 제조하고, 이를 나타낸 단면도이다.

도 6은 제브라피쉬 뇌에서 fam19a5l을 발현하는 세포의 특성을 나타낸 사진이다.

도 7은 제브라피쉬 감각신경 세포와 등쪽 중간신경세포에서 fam19a5l의 발현을 나타낸 사진이다.

도 8의 (A)는 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬의 돌연변이 위치의 도면과 fam19a5l 엑손1에서 20 염기쌍이 소실된 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬에서 만들어지는 예상되는 펩타이드 서열을 나타낸 것이고, (B)는 열유도성 fam19a5l 과발현 제브라피쉬 제조에 사용된 플라스미드 DNA 모식도이다. (C, D)는 일정 실험조건에서 fam19a5l 과발현 제브라피쉬를 제조하고, 이를 나타낸 사진이다.

도 9는 fam19a5l 녹아웃 및 과발현 제브라피쉬 치어에서의 통각반응 조절 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0018] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0019] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0020] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0021] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0022] 본 발명에서는 제브라피쉬 동물 모델을 이용하여 FAM19A5 상동성 유전자들을 확인하고 fam19a5l 발현 신경 회로(neural circuit) 분석 및 fam19a5l 기능을 연구하였다. 먼저, 역전사 중합연쇄반응 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)과 RNA *in situ* hybridization을 이용하여 FAM19A5의 제브라피쉬 상동유전자 fam19a5의 발현을 확인하였다. 또한 fam19a5l 특이적 녹색 형광 발현 형질전환 제브라피쉬 (Tg(fam19a5l:egfp-caax)) 제조 및 분석을 통하여 신경계에서 fam19a5l 특이적 신경회로를 규명하였다. fam19a5l의 기능 소실 및 획득 연구 (Loss-of- and gain-of-function study)를 위해 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬와 열 유도성 fam19a5l 과발현 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다. 이를 이용하여 fam19a5l 기능연구를 수행하여 신경계에서 fam19a5l 기능을 규명하였다.

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] **실시예 1: 제브라피쉬 사육과 관리**

[0026] 모든 실험 과정은 고려대학교 의과대학 동물실험 윤리위원회 (Korea University Institutional Animal Care & Use Committee (IACUC))의 승인을 받았으며, 국립수의과학 검역원의 동물 실험 규정에 따라 실험을 수행하였다. 야생형 제브라피쉬와 Tg(fam19a5l:egfp-caax), Tg(huc:gal4), Tg(uas:egfp) 형질전환 제브라피쉬가 본 연구에서 사용되었다. 성체(adult) 및 배아(embryo) 제브라피쉬는 섭씨 28.5도씨 온도의 14시간 빛, 10시간 어둠 일주기를 가지는 사육실에서 사육되었다. 제브라피쉬 배아와 치어(larva)의 단계는 수정 후 시간(hours post-fertilization, hpf) 혹은 수정 후 며칠 (days post-fertilization, dpf) 형태학적 특징에 따라 정의되어 사용되었다[9]. 수정 후 24시간 배아에서 0.003% PTU (1-phenyl-2-thiourea) 색소 형성을 막기 위하여 배아 배지(embryo media)가 처리되었다.

[0028] **실시예 2: 역전사 중합효소 연쇄 반응 및 제브라피쉬 fam19a5l 유전자의 클로닝**

[0029] 제브라피쉬 유전자 fam19a5a, fam19a5b, fam19a5l 유전자를 동정하기 위하여 제브라피쉬 배아, 치어 및 성체 뇌에서 각각 RNA를 TRIzol 시약(Roche)으로 추출하였다. 추출된 RNA는 역전사 도구(reverse transcription kit, ImProm-II™ reverse transcriptase, Promega)를 사용하여 cDNA로 합성되었다. 역전사 중합효소 연쇄반응을 위해 사용된 fam19a5a, fam19a5b, fam19a5l 유전자 프라이머는 다음과 같다. fam19a5a forward, 5'-CAGACGGAGGCGGAGATACAG-3'; fam19a5a reverse, 5'-GACTGGTAGGCAGAGGCAGG-3'; fam19a5b forward, 5'-ATGCAGCATCTCCGTGTGGC-3'; fam19a5b reverse, 5'-GGTGCTTCCGTACGTCGCT-3'; fam19a5l forward, 5'-ATGCAGTCGGGGATGCGG-3'; fam19a5l reverse, 5'-GCTCAGCGGCGCACAATC-3'. 디자인된 프라이머는 Ensemble로부터 얻은 염기서열을 이용하여 제조되었다 (fam19a5a: ENSDARG00000069160, fam19a5b: ENSDARG00000045608 and fam19a5l: ENSDARG00000068100). 각 유전자를 클로닝하기 위하여 수정 후 5일 치어의 cDNA에서 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭한 DNA를 pGEM®Easy Vector (Promega)로 클로닝하였다.

[0031] **실시예 3: 온조직 RNA 원위치 혼성법 (Wholemount RNA in situ hybridization)**

[0032] 제브라피쉬 fam19a5l 유전자의 시공간적 RNA 발현패턴을 검증하기 위하여, fam19a5l RNA에 특이적인 안티센스-디그옥시제닌 표지 RNA 프로브 (Antisense digoxigenin-labeled RNA probes)를 제조하였다. RNA 프로브를 합성하기 위해 fam19a5l이 클로닝된 벡터를 제한효소 SacⅡ(New England Biolabs)로 잘라 선형화 후 SP6 RNA 중합효소와 디그옥시제닌이 표지된 혼합물 (Dig RNA Labeling Mix, Roche)을 이용하여 제조사 프로토콜에 따라 프로브를 합성하였다.

[0033] 제브라피쉬 배아 및 치어를 마취제 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, 200 mg/L (MS222, Sigma))를 이용해 마취시킨 후, 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)/PBS (1X phosphate buffered saline)에 넣어 4℃에서 12~18시간 이상 고정시켰다. 고정된 배아 혹은 치어는 100% 메탄올을 이용하여 4번 이상 교체하였고, 메탄올에 -20℃에서 보관하였다. 메탄올에 보관된 치어 및 배아들을 75%, 50% 및 25% MeOH/PBS로 10분씩 단계별로 세척한 뒤, PBStx (1XPBS+0.2% Triton-X)를 사용하여 10분 간격으로 4번 씻어주었다. 배아 및 치어단계에 따라 10-50 ㎍/㎖ 단백질 절단효소 proteinase K)를 포함하는 PBStx를 5분에서 30분 사이로 처리한 뒤 4% 파라포름알데하이드/PBS로 20분 이상 상온에서 고정시켰다. 이후 PBStx로 10분씩 4번 씻어준 후, 60-65℃에서 데워진 500 ㎕ 혼성 용액 (hybridization solution: 50% 포름아미드, 5X SSC, 5 ㎎/㎖ 토룰라(torula) RNA, 50 ㎍/㎖ 헤파린(heparin), 구연산(Citric acid), pH6, 0.1%, 0.2 % Triton-X)를 첨가하고 60℃에서 5분 동안 씻어주었다. 그 후, 혼성용액 500 ㎕로 다시 교체하여 60-65℃에서 2-3시간 이상 사전 혼성(Prehybridization)시킨 후 프로브(probe)를 200-300 ng정도 첨가하여 60-65℃에서 18시간 이상 동안 혼성(hybridization)시켰다. 60-65℃에서 프로브(probe)를 제거하고 100%, 75%, 50% 및 25%의 혼성용액/2X SSCtw(2xSSC buffer + 0.1% tween-20)를 순차적으로 10분마다 세척하였다. 동일한 온도에서 2 X SSCtw로 교체하여 15분 동안 두 번 씻어준 후, 0.2X SSCtw에서 20-30분마다 4회, 0.1X SSCtw로 15분 씻어주었다. 그 후, 상온에서 75%, 50% 및 25%의 0.1X SSCtw/PBStw (PBS+0.1% tween-20)를 사용하여 10분 간격으로 순차적으로 교체하고 PBStw로 10분씩 2번 씻어 주었다. 이후 2% 양 혈청 (sheep serum), 2% 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin) /PBStw (Blocking solution) 500㎕를 넣어준 후, 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 그 후, Blocking solution에 1/4000배로 희석시킨 항-Dig-Alkaline phosphatase Fab(anti-dig-AP Fab)(150 u/200 ㎕; Roche)을 300 ㎕ 넣은 후, 4℃에서 14 - 18시간 동안 반응시켰다. PBStw로 10분간 3번, 15분 이상 12번 씻어준 후, 염색 버퍼(staining buffer, 0.1 M Tris-Cl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl2, 0.1% Tween-20)로 5분간 3번 씻어주었다. 발색기질인 NBT/BCIP(Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo 4-Chloro 3- Indolyl Phosphate, Roche)를 염색 버퍼에 각각 10 ㎕ NBT/BCIP/염색버퍼 500㎕로 넣어준 후, 빛을 차단하여 상온에서 반응시켰다. 염색을 한 후, 현미경으로 관찰하여 염색부위를 확인하였다. 염색이 끝난 수정란들은 PBStw로 10분씩 4번 씻어 준 후, 4% 포름알데하이드에 4℃에서 14 - 18시간 동안 고정시켰다. 염색된 제브라피쉬 배아 및 치어의 사진촬영을 PBStw으로 10분씩 4번 씻어준 후 25%, 50%, 75% 글리세롤/PBStw로 단계적으로 용액을 교체한 후 진행하였다.

[0035] **실시예 4: 면역조직염색법**

[0036] 제브라피쉬 배아와 치어는 마취제 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, 200 mg/L (MS222, Sigma))

를 이용해 마취시킨 후, 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)/PBS (1X phosphate buffered saline)에 넣어 4℃에서 12~18시간 이상 고정시켰다. 고정된 배아와 치어는 1.5% 아가로스 (agarose)/5% 수크로스 (sucrose) 용액에 담가 블록으로 만든 후 30% 수크로스 용액에 블록이 평형을 이뤄 가라앉을 때까지 4℃에서 12~18시간 이상 보관하였다. 액체질소에 메틸 부탄올(2-methyl butane)을 담은 스테인리스 컵을 넣은 후 가라앉은 블록을 물기를 제거해 플라스틱 mold 위로 올린 후, 이를 메틸 부탄올 위에서 블록을 얼렸다. 얼린 블록은 저온 절편기(cryostat microtome)를 이용해 14-16㎛ 절편두께로 잘라서 글라스 슬라이드(glass slide)에 붙였다. 절편들이 붙은 글라스 슬라이드는 PBS로 30분 정도 씻어준 후 5% 양 혈청 (sheep serum), 5% 소 알부민 혈청 (bovine serum albumin)/PBS (Blocking solution)에 1시간 이상 반응시킨 후 1차 항체를 blocking solution에 희석하여 이를 4℃에서 12~18시간 이상 반응시켰다. 이후 PBS로 1-2시간 동안 슬라이드를 씻어준 후 blocking solution에 1시간 반응시켰다. 그 후 2차 항체를 blocking solution에 희석해 4℃에서 12~18시간 이상 반응시켰다. 반응 후 조직세포의 핵을 염색하기 위해 blocking solution에 희석한 DAPI로 15분간 상온에서 반응시켰다. 그 후 PBS로 1-2시간 동안 씻어준 후 75%글리세롤/25%PBS 용액 150-200㎕ 가 올려진 커버슬라이드로 슬라이드 글라스를 덮어준 후 형광 사진 촬영을 수행하였다. 실험에 사용 한 1차 및 2차 항체는 다음과 같다. 1차 항체: 마우스 항-HuC/D 항체(mouse anti-HuC/D, 1:100, Molecular Probes, Cat. No. A21271), 토끼 항-Pax2 항체 (rabbit anti-Pax2, 1:200, Covance, Cat. No. PRB-276P), 마우스 항-Isl1/2 항체 (mouse anti-Isl1/2, 1:100, Developmental Hybridoma, 39.4D5), 토끼 항-BLBP 항체 (rabbit anti-BLBP, 1:500, Millipore, ABN14), 닭 항-GFP 항체(chick anti-GFP, 1:200, Abcam, Cat. No. AB13970). 2차 항체: 488-, 568-, 647- 형광 시료가 부착된 2차 항체 (Alexa 488-, 568-, 647-conjugated secondary antibodies, 1:1000, Invitrogen, Cat. No. A-11001, A-11004, A11008, A-11011 and Abcam, Cat. No. ab96947). 세포핵 염색시약: DAPI (D1306, Invitrogen).

[0038] **실시예 5: 플라스미드 DNA 및 형질전환 제브라피쉬의 제조**

[0039] Fam19a5l 특이적 녹색형광 발현 형질전환 제브라피쉬 (Tg(fam19a5l:egfp-caax))를 만들기 위해서 제브라피쉬 fam19a5l 유전자 발현조절부위를 포함하고 있는 박테리아 인공 염색체 (Bacterial artificial chromosome, BAC)를 사용하였다. Fam19a5l BAC DNA를 변형시키기 위해 대장균 기반 상동성 재조합 (E.coli-based homologous recombination) 시스템을 사용하여 fam19a5l:egfp-caax BAC DNA를 제조하였다. 이 변형된 BAC DNA는 막녹색형광단백질 (membrane EGFP, EGFP-CAAX)을 암호화하는 DNA 서열이 BAC DNA의 fam19a5l 유전자의 개방형 해독틀(open reading frame, ORF)의 개시코돈 ATG 부위에 결합되어 만들어졌다(도 1). Fam19a5l:egfp-caax BAC DNA를 제브라피쉬 1세포기 수정란에 미세주입(microinjection)하여 성체(Founder, F0)로 키운 후 이들을 야생형 제브라피쉬와 교배하여 얻은 제브라피쉬 배아가 fam19a5l 특이적 녹색형광단백질을 보이는 제브라피쉬(F1)를 발견 하였고, 이 제브라피쉬를 사육 및 교배를 통하여 안정적인 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다.

[0040] 열 유도성 fam19a5l 과발현 형질전환 제브라피쉬(heat-inducible fam19a5l-overexpressing transgenic zebrafish Tg(hsp70l:fam19a5l:p2a-mcherry))를 제조하기 위하여 제브라피쉬 cDNA로부터 fam19a5l 유전자의 개방형 해독틀을 증폭시키기 위해 attB1과 attB2 염기서열이 포함된 fam19a5l 유전자 특이적 프라이머를 제조 및 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다. Fam19a5l forward, 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGCAGT CGGGGATGCGGG-3'; fam19a5l reverse, 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCGGACGGCT CCTTGGGCAGA-3'. attB1/2 염기서열이 포함된 중합효소 연쇄반응 산물은 BP 클론반응 효소 (BP clonase, Invitrogen)에 의해 중간 진입 벡터(middle entry vector)에 클로닝 되었다. 또한 열 충격 70l 프로모터 (heat shock 70l promoter) 염기서열이 포함된 5'-진입 벡터와 바이러스 2A 펩타이드가 결합된 적색 형광단백질(mCherry) 암호화된 염기서열이 포함된 3'-진입 벡터를 제조하였다. LR클론반응 효소(LRⅡ clonase, Invitrogen)와 5'-, 중간, 3'-진입벡터들을 사용해 다중 게이트웨이 LR 반응(multi-site gateway LR reaction)을 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 만들어진 hsp70l:fam19a5l:p2a-mcherry 플라스미드 DNA를 제브라피쉬 1세포기 수정란에 미세주입(microinjection) 하여 성체(Founder, F0)로 키운 후 이들을 야생형 제브라피쉬와 교배하여 얻은 제브라피쉬 배아가 열충격에 의해 특이적 적색형광단백질을 보이는 제브라피쉬 (F1)를 발견하였고, 이 제브라피쉬를 사육 및 교배를 통하여 안정적인 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다.

[0041] 5xuas:fam19a5l:mcherry 플라스미드 DNA를 제조하기 위해 hsp70l:fam19a5l:p2a-mcherry 플라스미드 DNA를 만드는 것과 동일한 클로닝 방법을 진행하였다. 5'-진입벡터로는 gal4 단백질에 반응하는 uas 염기서열 5개를 가진 5'-5xuas 진입벡터가 사용되었고, 3'-진입벡터로는 적색형광단백질(mCherry) 암호화된 염기서열을 가진 3'-

mcherry 진입벡터가 사용되었다.

[0043] **실시예 6: Fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬의 제조**

[0044] Fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬를 제조하기 위하여 Wenbiao Chen 그룹에서 보고한 CRISPR/Cas9 system을 이용하였다[10]. 단일 가이드 RNA (single guide RNA)를 합성하기 위한 Cas9 표적 위치와 올리고뉴클레오타이드 선정은 ZiFiT 웹사이트에서 디자인하였다. Fam19a5l 유전자를 녹아웃 하기 위한 표적서열은 다음과 같다. 5'-GGGATGCGGGCGCTCTGTGCCGG-3'. 단일 가이드 RNA 벡터 클로닝과 가이드 RNA 합성방법은 선행연구에서 언급한 방법을 따라 진행하였다[10]. 가이드 RNA (50pg)와 Cas9 단백질 (TOOLGEN, 50pg)의 혼합물을 제브라피쉬 1세포기 수정란에 미세주입하여 이들을 성체(F0)까지 키웠다. F0 제브라피쉬의 생식계열 세포에서 가이드 RNA/Cas9 단백질에 의한 돌연변이가 일어났는지 확인하기 위하여, F0 제브라피쉬와 야생형 제브라피쉬를 교배하여 얻은 F1 수정 후 24시간 단계 배아를 모아서 유전체 DNA (genomic DNA)를 추출하였다. 추출한 유전체 DNA를 이용하여 선행연구에서 언급된 이형 이중가닥 (heteroduplex)/T7 내부 뉴클레오타이드 절단효소 I (T7 endonuclease I ) 분석법을 수행하였다. Cas9 표적 위치의 양측면을 포함하는 짧은 유전체 DNA 염기서열을 포함하는 프라이머를 제작한 후 유전체 DNA를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하여 증폭하였다. 그 후 증폭된 시료를 고온(95℃까지 높였다가 서서히 떨어뜨리는 이형 이중가닥(heteroduplex) 실험을 수행하였고, 이후 T7 내부 뉴클레오타이드 절단효소 I 를 처리하였다. 그 후, 2% 젤 전기영동 실험을 통하여 관찰했을 때 본래의 크기를 가진 증폭된 DNA band 크기와 잘린 2가지 종류의 DNA band가 관찰되는 F0 제브라피쉬를 돌연변이를 가지고 있는 후보로 선정하였다. 이를 통하여 돌연변이를 가지고 있는 F0 후보 제브라피쉬를 찾은 후, 추출한 유전체 DNA에서 상기 언급한 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 증폭한 후 pGEM®Easy Vector (Promega)로 클로닝하였다. 클로닝한 벡터의 DNA 염기서열 분석(DNA sequencing)을 통해 돌연변이가 일어난 서열을 분석하였다. 클로닝과 T7 내부뉴클레오타이드 절단효소 I 분석법에 사용된 프라이머는 다음과 같다. Fam19a5l forward, 5'-ACCAAAGCGCGTAAATTGACATCG-3'; fam19a5l reverse, 5'-TAATAAGGACAGAGCCAGAGGTGAGC-3'.

[0046] **실시예 7: 제브라피쉬 행동분석**

[0047] 제브라피쉬 치어 행동분석은 자동 행동추적 분석프로그램 Ethovision XT12 (Noldus)가 포함된 Danio Vision (Noldus)을 이용하여 수행하였다. 또한, 모든 행동실험은 오전 10시부터 오후 3시까지 수행되었고, 단일 부모개체(parents)로부터 얻은 자손개체(sibling)들을 이용하여 실험이 수행되었다. 그리고 치어의 행동과 관찰자의 편향을 피하기 위하여 모든 치어의 유전형 (genotype) 분석은 행동실험이 종료된 이후에 실시되었다. 야생형 자손개체와 fam19a5l 녹아웃 개체 또는 대조군 자손개체와 열유도성 fam19a5l 과발현 치어는 동물 윤리를 고려했을 때 수정 후 3일 단계에서 통각반응 실험이 수행되었고, 치어의 운동성 측정실험의 경우 수정 후 5일 단계에서 진행되었다. 치어는 28.5℃에서 14시간 빛/10시간 어둠 일주기를 가지는 사육실에서 키웠고, 실험이 수행되기 하루 전에 48 well-plate으로 옮겼다. 유해한 자극에 의한 운동 반응(locomotor response)을 유도하기 위해서 선행연구에서 사용한 방법 중 하나인 겨자씨 기름(Mustard oil, allyl isothiocyanate (AITC), 377430, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 대조군은 1% 농도의 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Biosesang, D1022)를 처리하였고, 실험군은 100μM 겨자씨 기름(1% 농도 DMSO에서 allyl isothiocyanate 100μM)을 처리하였다. 약물을 처리하기 이전의 치어행동은 빛이 있는 조건에서 5분동안 녹화하였고, 약물을 처리하기 이후의 치어행동 또한 빛이 있는 조건에서 5분동안 동일하게 녹화하였다. 열유도성 fam19a5l 과발현 치어의 경우, 수정 후 48시간 단계의 치어에서 39℃열충격을 20분동안 준 후, 녹아웃 치어와 동일한 과정을 거쳐 행동실험을 수행하였다. 치어의 운동성 측정을 위해서 수정 후 5일 단계 치어를 10분동안 빛이 있는 조건에서 적응시킨 후, 5분동안 동일한 조건에서 녹화하였다. 열 유도성 fam19a5l 과발현 치어의 경우, 수정 후 4일 단계에서 39℃열충격을 20분동안 준 후에 수정 후 5일 단계에서 동일한 과정을 거쳐 운동성을 측정하였다.

[0049] **실시예 8: 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응 분석**

[0050] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응은 LightCycler 96 기기(Roche)를 이용하여 수행하였다. 실험에 사용된 cDNA는 행동실험을 수행했던 단계와 동일하게 수정 후 3일 단계의 야생형 자손개체와 fam19a5l 녹아웃 치어에서 추출된 RNA로 합성되었다. 주형 cDNA 2.5 μl, 0.2 μM 프라이머, 2X Fast Start Essential DNA Green Master

Mix (Roche)을 포함한 각 반응 혼합물은 95 ℃10분, 95 ℃10초, 60 ℃10초, 72 ℃10초의 40주기(cycles)으로 이루어진 프로그램 단계를 거쳐 증폭되었다. β-actin, tachykinin 1 (tac1), transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1a (trpa1a), transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1b (trpa1b), nerve growth factor a (ngfa), nerve growth factor b (ngfb) and neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 (ntrk1) 유전자의 발현을 측정하였다.

[0052] **실시예 9: 통계적 분석**

[0053] 모든 통계분석은 GraphPad Prism 7 소프트웨어 프로그램(GraphPad Software)을 사용하여 분석하였다. 두 집단 간의 비교에서는 모집단이 정규분포일 때 스투덴트 비쌍체 t-검사(Student unpaired t-test)를 수행하였고, 모집단이 비정규분포일 때 만-휘트니 U 검사(Mann-Whitney U test)를 수행하였다. 모든 통계 데이터에서 통계적 유의성은 P 양측 검증 (two-tailed probability)이 0.05미만 일 때 유효성을 가지는 것으로 보았다.

[0055] **실험예 1: FAM19A5 제브라피쉬 상동 유전자의 발현**

[0056] 인간 FAM19A5의 제브라피쉬 상동유전자는 fam19a5a, fam19a5b, fam19a5l 3가지가 존재한다. 세 유전자의 아미노산 서열은 N말단에 존재하는 신호펩타이드(signal peptide) 부분을 제외하고 척추동물에서 진화적으로 보존되어 있는 것을 알 수 있다(도 2).

[0057] 먼저 제브라피쉬 fam19a5 상동성 유전자들이 제브라피쉬에서 발현하는지를 확인하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction)을 발생단계부터 성체 단계의 제브라피쉬를 이용하여 수행하였다. 그 결과, fam19a5 상동성 유전자들은 모두 발생단계부터 성체단계까지 발현하는 것을 확인하였다(도 3). 특히, 이들은 성체 뇌에서 또한 발현하는 것을 확인하였다(도 3A). 이번 연구에서는 세가지 상동성 유전자들 중 fam19a5l의 신경계에서의 발현과 기능 초점을 맞추어 연구를 수행하였다. 그래서 치어단계에서 fam19a5l의 공간적 발현패턴을 확인하기 위해 온조직 RNA 원위치 혼성법 (Whole-mount RNA in situ hybridization)을 수행하였다. 수정 후 2일 단계에서 fam19a5l은 뇌에서 하부겉질(subpallium), 겉질(pallium), 등쪽시상(dorsal thalamus), 소뇌판(cerebellar plate), 시개 덮개(optic tectum), 연수(medulla oblongata) 영역(도 3B-C', 검은색 화살표), 뿐만 아니라 척수에서도 발현하는 것을 확인하였다(도 3D, 빨간색 화살표). 수정 후 3일 단계에서 fam19a5l의 발현은 시각교차 앞구역(preoptic area), 중뇌덮개(midbrain tegmentum), 시상하부(hypothalamus) (도 3E-F'', 검은색 화살표) 을 포함하여 2일 단계 발현과 유사하지만 더 넓은 영역에서 발현을 관찰하였고 시개 덮개의 뇌실 영역 (ventricular zone)(도 3F'', 검은색 화살표 머리)과 눈의 망막에서도 발현을 확인하였다 (도3F, 검은색 화살표). 수정 후 7일 단계의 치어 온뇌(whole larval brain)를 사용하여 fam19a5l의 RNA 발현을 확인하였을 때도 수정 후 2, 3일 단계의 치어와 유사한 발현 패턴을 관찰하였다(도 3G-H'). 이러한 결과는 fam19a5l은 신경계에서 특정한 영역에서 발현한다는 것을 보여주며, 신경계에서 특정한 생리학적 역할을 수행할 가능성을 제안한다.

[0059] **실험예 2: Fam19a5l 펩타이드의 분비성 검증**

[0060] 선행연구에서 인간 FAM19A5 단백질은 분비성 펩타이드이고, 43개의 아미노산으로 이루어진 신호펩타이드를 가지며 성숙펩타이드는 44번째 트레오닌 잔기 (threonine residue)로 시작한다는 것을 보여주었다[8]. 인간 및 설치류의 FAM19A5의 신호펩타이드 절단부위 (cleavage site)는 제브라피쉬 상동 유전자에서도 진화적으로 보존되어 있는 것을 확인하였다(도 2). 그러므로 제브라피쉬에서 fam19a5l 또한 분비성 펩타이드인지 검증하고자 하였다. 이를 검증하기 위해서, 5xuas:fam19a5l: mcherry 플라스미드 DNA를 제조하였다. 이 플라스미드 DNA는 Gal4 단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬에 미세주입하면 Gal4 단백질이 UAS 염기서열을 통해 적색형광단백질 (mCherry)이 fam19a5l 펩타이드의 C말단에 결합된 단백질을 발현시킨다. 따라서 형광단백질의 생체 내 (in vivo) 위치를 추적 및 분석함으로써 펩타이드의 분비성을 검증할 수 있다(도 4A). 5xuas: fam19a5l:mcherry 플라스미드 DNA를 신경세포 특이적으로 Gal4 단백질을 발현시키고 UAS 염기서열을 통해 녹색형광단백질도 발현시키는 형질전환 제브라피쉬 (Tg(huc:gal4); Tg(uas:egfp))의 1세포기 수정란에 미세주입 하였다. 이후, 수정 후 3일 단계에서 생체 내 이미징을 통해 적색형광단백질-fam19a5l 결합단백질을 세포 혹은 조직 내에서 추적하였다(도 4). 실험 결과, fam19a5l-형광 결합단백질은 HuC+/DAPI+신경세포의 세포체 (cell body) 내부에 존재

하는 경우는 오직 일부만 관찰되었고(도 4B' 흰색 화살표머리), 대부분의 fam19a5l-형광 결합단백질은 HuC+/DAPI+신경세포의 부근이나 인접한 곳에 존재하였다(도 4B', B'', C''', 흰색 화살표). 뿐만 아니라 이 결합단백질은 주변에 신경세포가 없고, 세포핵 또한 존재하지 않는 곳(GFP-/DAPI) 에서도 관찰되었다(도 4B'-B'''. C'', 노란색 화살표). 이러한 결과는 많은 fam19a5l-적색형광 결합단백질은 세포 내부보다 외부에서 많이 발견된다는 것을 보여주었다. 따라서 이 실험을 통해 제브라피쉬 fam19a5l 또한 분비성 펩타이드라는 것을 보여주었다.

[0062] **실험예 3: Fam19a5l 특이적 형광 형질전환 제브라피쉬를 이용한 fam19a5l 신경회로 특성 규명**

[0063] Fam19a5l의 신경 회로를 분석하기 위해서 fam19a5l 유전자 특이적으로 막녹색 형광단백질(membrane egfp, egfp-caax)을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 제작하였다. Fam19a5l의 개시 코돈 (start codon, ATG)을 포함한 5'-조절 인자 (5'-regulatory elements)를 가장 많이 포함하는 박테리아 인공 염색체 (Bacterial artificial chromosome, BAC)을 선정하여, 상동성 재조합 (homologous recombination)을 통해 fam19a5l이 발현하는 세포에서 형광단백질의 발현이 유도될 수 있는 BAC DNA를 제작하였다(도 1). 이 DNA를 제브라피쉬 1세포기 수정란에 미세주입하여 형질전환 제브라피쉬 (Tg(fam19a5l:egfp-caax))를 제조하였다(도 5). 제조된 형질전환 제브라피쉬에서 발현하는 막녹색형광 단백질이 신경계 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다.

[0064] 먼저 제브라피쉬 뇌에서 fam19a5l을 발현하는 세포의 특성을 규명하기 위해, fam19a5l 형광 형질전환 제브라피쉬 치어에서 면역조직염색법(immunohistochemistry)을 수행하였다(도 6C-E). 그 결과, fam19a5l을 발현하는 세포는 대부분 분화된 신경세포(HuC/D+)임을 확인하였다 (도 6C-E). 또한 fam19a5l은 시개 덮개(optic tectum)과 시상(thalamus)의 뇌실 주변 영역의 세포 일부분에서 발현이 확인되었다(도 6C-E). 이 세포의 모양은 뇌실영역에 존재하는 방사신경아교세포(radial glial cell) 모양과 유사하였고, 방사신경아교세포의 표지자인 BLBP를 발현하는 세포인 것 확인하였다(도 6C-E). 이 결과는 fam19a5l은 시개 덮개와 시상의 일부 방사신경아교세포에서 발현한다는 것을 보여주었다. 그러므로 이러한 결과들은 fam19a5l은 비록 방사신경아교세포의 시개덮개 및 시상의 일부 영역에서만 발현되지만, 신경세포와 방사신경아교세포 모두에서 발현하는 것을 보여주었다.

[0065] 다음으로 수정 후 5일 단계의 치어 온뇌 (whole-mount larval brain)를 촬영하여 뇌 신경세포에서 fam19a5l의 구체적 발현 영역을 분석하였다(도 6A-B). 그 결과, fam19a5l은 전뇌 (forebrain)의 측면겉질 (lateral pallium)과 중간겉질 (medial pallium), 시각교차 앞구역 (preoptic area), 시상(thalamus) 및 중간뇌 (midbrain)의 시개 덮개 (optic tectum), 후뇌 (hindbrain)의 중간 및 가장자리 미주신경세포 (marginal and medial vagal neuron)의 영역에서 발현하는 것을 확인하였다. 이는 대부분 온조직 RNA 정위치 혼성법으로 확인된 fam19a5l 발현 패턴과 동일한 결과를 보였다.

[0066] 다음으로, 척수 및 말초신경계에서 fam19a5l을 발현하는 신경세포의 특성을 규명하고자 fam19a5l 형광 형질전환 제브라피쉬 배아와 치어 단계에서 온조직 (wholemount) 이미징을 수행하였다. 그 결과, 배아부터 치어단계까지 fam19a5l은 화학적 감각 (chemosensation)을 매개하는 삼차신경절 (trigeminal ganglion)의 일부 신경세포에서 발현하고(도 7A, B 흰색 화살표), 또한 평형-청각신경절 신경세포 (statoacoustic ganglion (SAG) neuron)의 일부에서도 발현함을 확인하였다(도 7A, 노란색 화살표). 그리고 치어단계에서 눈의 망막절 세포 (retinal ganglion cell) 에서도 fam19a5l의 발현을 확인하였다(도 7B, 파란색 화살표). 뿐만 아니라, fam19a5l은 기계적 자극 혹은 통각(nociception)을 감지[11,12]하는 배근신경절 (dorsal root ganglion) 신경세포의 일부에서도 발현하고(도 7C, 흰색 화살표), 척수에서 감각정보를 처리에 관여[13,14]한다고 알려진 등쪽 중간신경세포 (dorsal interneuron)의 일부에서 발현하는 것을 확인하였다(도 7C, 노란색 화살표).

[0067] 감각정보를 처리하는 fam19a5l$^{+}$ 신경세포의 특징을 추가적으로 분석하기 위하여, fam19a5l 형광발현 형질전환 제브라피쉬에서 면역조직염색법을 수행하였다. 그 결과, 척수의 fam19a5l$^{+}$신경세포의 일부와 말초신경계의 대부분 fam19a5l$^{+}$ 배근신경절 신경세포는 HuC/D$^{+}$/Isl1/2$^{+}$/Pax2$^{-}$ 신경세포인 것을 확인하였다(도 7E, F, 화살표). 선행연구에서 isl2b는 등쪽 종단 중간신경세포(dorsal longitudinal interneuron)과 배근신경절 신경세포(dorsal root ganglion neuron)에서 발현한다고 알려져 있다[15,16]. 그래서 이 결과는 척수에서 fam19a5l$^{+}$ 등쪽 중간신경세포는 등쪽 종단 중간신경세포(dorsal longitudinal interneuron)이고, 말초신경계에서 fam19a5l$^{+}$/Isl1/2$^{+}$ 신

경세포는 배근신경절 신경세포임을 보여주었다.

[0068] 따라서, 이러한 결과들은 종합적으로 fam19a5l은 제브라피쉬 신경계에서 다양한 감각신경세포 및 감각신경을 처리하는 중간 신경세포에서 발현하는 것을 보여주었다. 그러므로 fam19a5l은 감각과 통각반응에 역할을 수행할 수 있다는 가능성을 제시해주었다.

[0070] **실험예 4: Fam19a5l 기능 소실 및 기능 획득 연구를 위한 제브라피쉬 제조**

[0071] Fam19a5l의 기능 연구를 수행하기 위하여, CRISPR/Cas9 시스템[10,17]과 열 유도성 형질전환 (heat-inducible transgenic) 시스템을 이용하여 fam19a5l 녹아웃 (knock-out) 제브라피쉬와 과발현 제브라피쉬를 제조하였다(도 8).

[0072] Fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬를 제조하기 위해서 fam19a5l에서 개시코돈과 가까이에 있는 엑손 1번에 존재하는 염기서열을 표적 서열로 정하여 가이드 RNA (guide RNA)를 제작하고 이를 Cas9 protein (단백질)을 함께 제브라피쉬 1세포기 수정란에 미세주입하여 성체까지 키운 후, fam19a5l 유전자에 돌연변이가 일어난 제브라피쉬를 스크리닝 하였고, 20염기쌍이 소실된 (20bp deletion) 녹아웃 제브라피쉬를 선별하였다(도8A). 이 돌연변이는 fam19a5l 유전자에서 미성숙 정지코돈 (premature stop codon)이 생겨 비정상적인 짧은 펩타이드가 생기거나 미성숙 종결코돈 의존성 mRNA 분해 (nonsense mRNA decay)가 생길 것으로 추측된다.

[0073] Fam19a5l 과발현 제브라피쉬를 제조하기 위하여 열충격 (heat shock)에 의해 fam19a5l이 과발현되는 형질전환 제브라피쉬 (Tg(hsp70l:fam19a5l:P2A-mCherry)를 제조하였다(도 8B). 제조된 형질전환 제브라피쉬가 열충격에 의해 fam19a5l가 과발현되는지 확인하기 위해 수정 후 20시간 단계에서 열충격을 주고, 4시간이 지난 후 fam19a5l 프로브를 이용하여 온조직 RNA 정위치 혼성법을 수행하였다 (도8C-D). 그 결과, 형질전환 제브라피쉬 배아에서 열충격에 의해 fam19a5l이 과발현 되는 것을 확인하였다.

[0074] 제조된 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬와 과발현 제브라피쉬를 이용하여 fam19a5l의 기능연구를 수행하였다.

[0076] **실험예5: 통각반응에서 fam19a5l의 기능 연구**

[0077] Fam19a5l은 다양한 감각신경에서 발현하고, 특히 통각(nociception)반응에 관여하는 신경세포인 삼차신경절 신경세포(trigeminal ganglion neuron)과 배근신경절 신경세포(dorsal root ganglion neuron)에서도 발현하기 때문에, 먼저 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬에서 통각반응에 변화가 있는지 확인하고자 하였다. 통각반응을 확인하기 위하여 선행연구[18]에서 사용된 운동성이 없는 제브라피쉬 치어 초기단계에서 유해자극을 주는 약물(chemical)을 처리하여 자극에 의한 운동성 증가를 측정하는 방법을 사용하였다. 유해자극 약물은 겨자씨 기름 (mustard oil, allyl isothiocyanate (AITC))를 사용하였다. 이는 TRPA1 채널 단백질의 작용제 (agonist)로 작용한다고 알려져 있다. 겨자씨 기름 100μM을 수정 후 3일 단계의 야생형 자손개체와 fam19a5l 녹아웃 치어에 처리한 후 운동성 변화를 관찰하였다(도 9). 그 결과, 1% DMSO를 처리한 야생형 개체에 비교했을 때, 겨자씨 기름을 처리한 야생형 개체의 운동성은 급격히 증가하였다(도 9A). 한편, DMSO를 처리했을 때보다 겨자씨 기름을 처리했을 때 fam19a5l 녹아웃 개체의 운동성 또한 증가했지만 야생형 개체와 비교했을 때보다 통계적으로 유의미하게 적게 증가하였다(도 9A). 약물을 처리하지 않은 정상 상황에서 녹아웃 개체와 야생형 개체 모두 비슷한 운동성을 보였다(도 9A, B). 그러므로 이러한 결과는 겨자씨 기름에 의해 유도된 통각 반응은 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬에서 감소함을 보여주었다. 이는 fam19a5l이 통각반응 조절에 관여한다는 것을 시사한다.

[0078] 그렇다면 fam19a5l이 통각반응을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 수정 후 48시간 단계의 fam19a5l 과발현 제브라피쉬에서 열충격을 한번 주고 난 후, 수정 후 3일 단계에서 겨자씨 기름을 처리하였다. 그 결과, DMSO를 처리한 그룹보다 겨자씨 기름을 처리하였을 때, 야생형 개체와 과발현 개체 모두 유사하게 운동성이 증가하는 것을 관찰하였다(도 9C). 또한 약물을 처리하지 않았을 때 야생형 개체와 과발현 개체 운동성도 유사한 것을 확인하였다(도 9D). 이러한 결과는 fam19a5l 과발현은 통각반응을 증가시키기에 충분하지 않다는 것을 보여주었다. 그러므로 이는 fam19a5l은 유해자극에 대한 통각반응 조절에 필요하다는 것을 제안한다.

[0079] 다음으로 fam19a5l이 어떻게 통각반응을 조절하는지 확인하고자 하였다. 겨자씨 기름은 TRPA1 채널의 작용제로서 작용하고, 제브라피쉬에서 TRPA1 상동성 유전자가 삼차신경절 신경세포에 발현한다는 사실이 알려져 있다. 따라서 fam19a5l이 trpa1의 발현을 조절할 수 있다는 가설을 세웠고, 이를 검증하고자 하였다. 이를 위해, 수

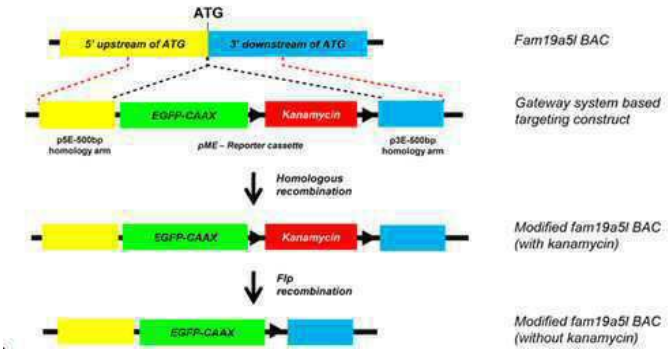
정 후 3일 단계의 야생형 및 fam19a5l 녹아웃 치어에서 추출한 cDNA를 이용하여 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 실험 통해 TRPA1의 제브라피쉬 상동성 유전자인 trpa1a, trpa1b의 mRNA 발현 수준을 확인하고자 하였다. 그 결과, 야생형 치어와 비교하였을 때, fam19a5l 녹아웃 치어에서 trpa1a와 trpa1b mRNA 발현이 30-50퍼센트가 감소하였다(도 9E). 반면에, 통각반응에 중요하다고 알려진 substance P의 전구자(precursor)인 tachykinin 1 (tac1)의 발현은 fam19a5l 녹아웃 치어에서 변화가 없었다(도 9E). 선행연구에서 TRPA1은 삼차신경절 신경세포에서 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)에 의해 발현이 증가된다는 보고가 있었다. 그래서 fam19a5l 녹아웃 제브라피쉬에서 trpa1a와 trpa1b의 mRNA 발현 감소가 신경성장인자의 발현 감소에 의한 것인지 확인하고자 하였다. 이를 위해 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 실험을 통해 신경성장인자의 제브라피쉬 상동유전자 ngfa와 ngfb 그리고 이들의 수용체 ntrk1 (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1)의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과, fam19a5l 녹아웃 치어에서 ngfa의 mRNA 발현은 감소하였지만, ngfb와 ntrk1은 차이가 없었다(도9E). 그러므로 이 결과는 fam19a5l의 trpa1 mRNA발현조절을 ngf 조절을 통해서 이루어질 가능성을 제시한다.

[0080] 이상과 같이 실시예 및 실험예들이 비록 한정된 실시예 및 실험예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

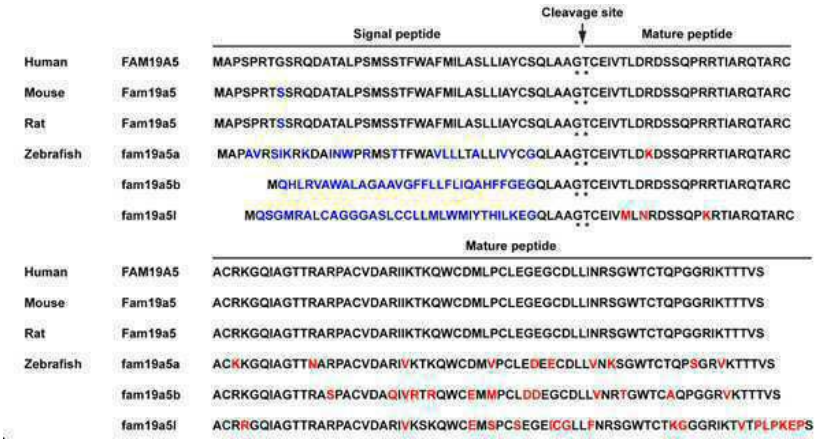
[0081] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

## 도면

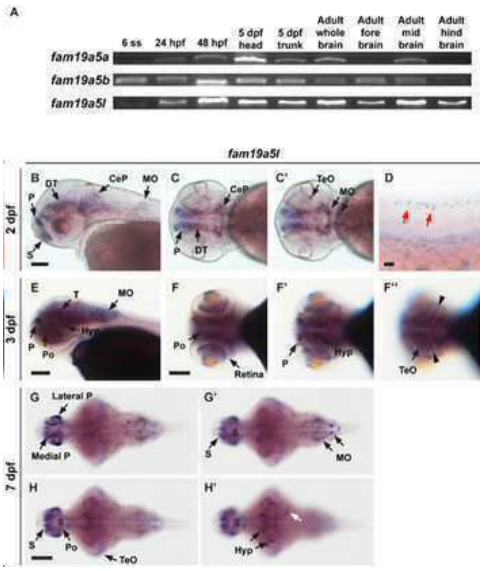
### 도면1



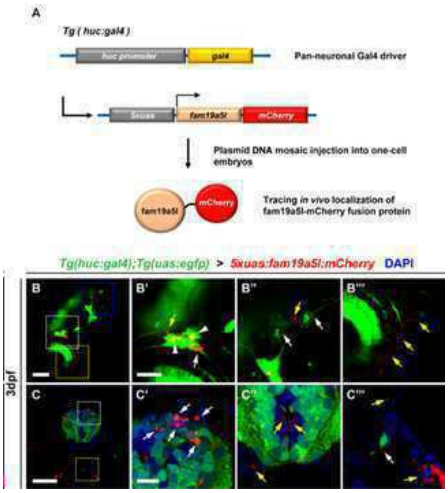

### 도면2



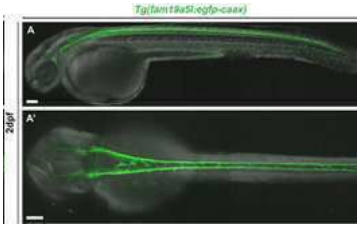
도면3


A
6 ss
24 hpf
48 hpf
5 dpf head
5 dpf trunk
Adult whole brain
Adult fore brain
Adult mid brain
Adult hind brain
fam19a5a
fam19a5b
fam19a5l
fam19a5l
2 dpf
3 dpf
7 dpf
DT
CeP
MO
TeO
Hyp
Po
Retina
Lateral P
Medial P

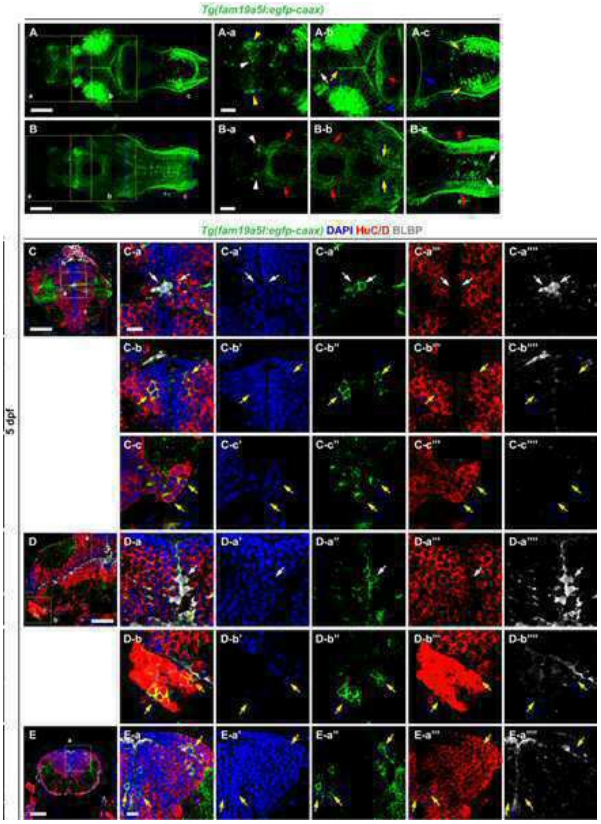
도면4


A
Tg ( huc:gal4 )
huc promoter
gal4
Pan-neuronal Gal4 driver
5xuas
fam19a5l
mCherry
Plasmid DNA mosaic injection into one-cell embryos
Tracing in vivo localization of fam19a5l-mCherry fusion protein
Tg(huc:gal4);Tg(uas:egfp) > 5xuas:fam19a5l:mCherry DAPI
3dpf

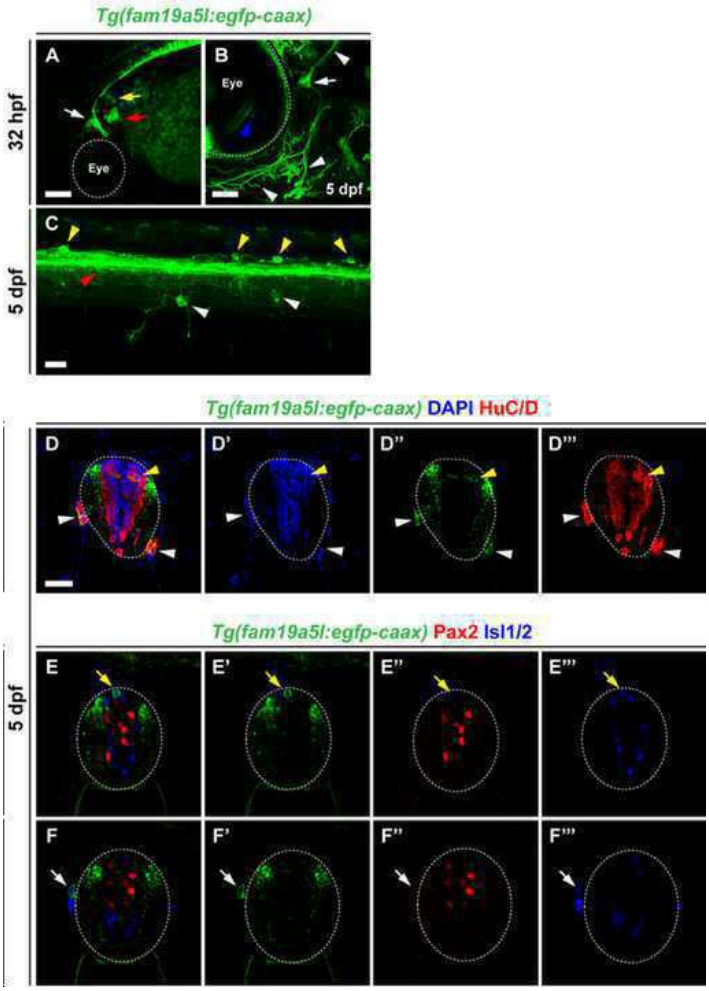
도면5


Tg(fam19a5l:egfp-caax)
2dpf

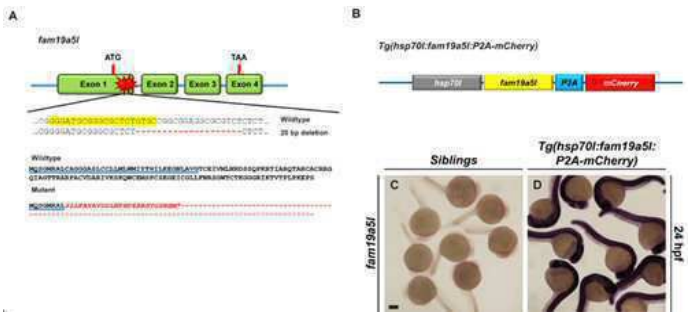
도면6


Tg(fam19a5l:egfp-caax)
Tg(fam19a5l:egfp-caax) DAPI HuC/D BLBP
5 dpf

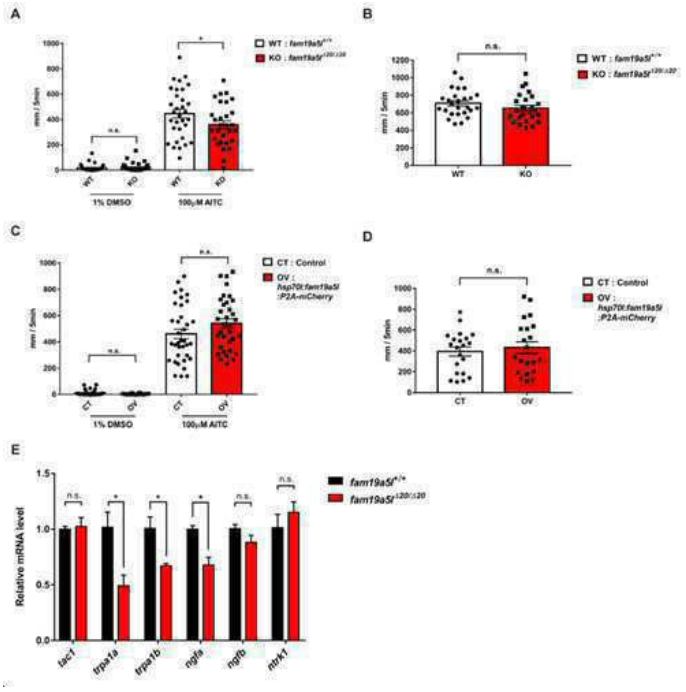
도면7


Tg(fam19a5l:egfp-caax)
A
B
Eye
Eye
32 hpf
5 dpf
C
5 dpf
Tg(fam19a5l:egfp-caax) DAPI HuC/D
D
D'
D''
D'''
Tg(fam19a5l:egfp-caax) Pax2 Isl1/2
5 dpf
E
E'
E''
E'''
F
F'
F''
F'''

도면8


A
fam19a5l
ATG
TAA
Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 4
Wildtype
Mutant
B
Tg(hsp70l:fam19a5l:P2A-mCherry)
hsp70l
fam19a5l
P2A
mCherry
Siblings
Tg(hsp70l:fam19a5l:
P2A-mCherry)
C
D
fam19a5l
24 hpf

도면9


A
B
C
D
E
n.s.
1% DMSO
100μM AITC
CT : Control
OV : hsp70l:fam19a5l :P2A-mCherry
WT
KO
mm / 5min
Relative mRNA level
tac1
trpa1a
trpa1b
ngfa
ngfb
ntrk1