(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0006142
(43) 공개일자 2017년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0276 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0096638
(22) 출원일자 2015년07월07일
심사청구일자 2015년07월07일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
백자현
서울특별시 강남구 선릉로 221, 204동 1201호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
강병준
서울특별시 도봉구 덕릉로66길 17, 1708동 702호 (창동, 주공17단지아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

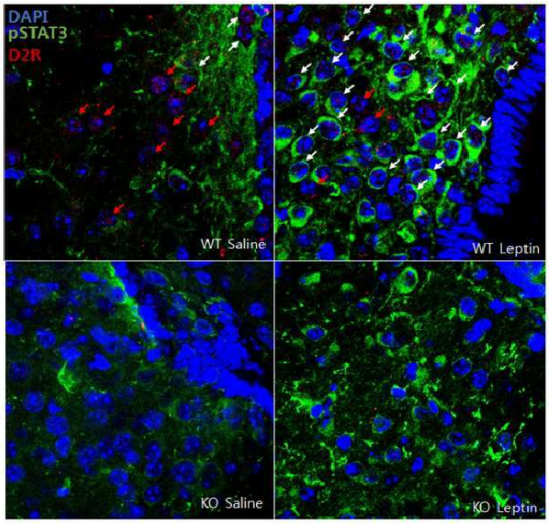
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **뉴런 특이적 도파민 수용체 D2형 유전자 적중 마우스 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 도파민 수용체 D2형 유전자 적중 마우스 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 도파민 수용체 D2형 유전자를 세포 혹은 조직 특이적으로 제거시킨 조건적 유전자 제거(conditional knockout) 형질전환 마우스에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조건적 유전자 제거(conditional knockout) 형질전환 마우스는 뇌의 특정 부위의 D2R 결핍에 따른 도파민성 신경정신, 신경내분비 등의 특정 질환 연구 및 시상하부 렙틴 수용체 발현 세포에서의 D2R 결여에 따른 에너지 대사 조절 등의 연구에 유용하다.

대 표 도 - 도22



(52) CPC특허분류
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013M3C7A1056101
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 도파민성 보상회로의 뇌 대사체 분석을 통한 중독성 질환 제어 및 질환 마커 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교
연구기간 2013.08.01 ~ 2016.07.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

첫 번째 loxP(locus of X-over P1) 부위; 도파민 수용체 D2형(D2R) 게놈 유전자의 2번째 엑손, 3번째 엑손 및 4번째 엑손까지의 유전자 절편; KpnI 절단부; 네오마이신 저항 유전자; 두 번째 loxP(locus of X-over P1) 부위; 디프테리아 독소 A(Diphteria toxin A) 유전자; 지오신 저항 유전자; 및 MluI 절단부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 D2R 유전자 적중 벡터(targeting vector).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 네오마이신 저항 유전자는 FRT(Flippase Recognition Target) 부위, 네오마이신 저항 유전자 및 FRT 부위 순서로 이루어진 것을 특징으로 하는 D2R 유전자 적중 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 첫 번째 loxP 부위는 D2R 게놈 유전자의 2번째 엑손 5' 방향 300bp 업스트림(upstream)의 인트론(intron)에 위치하는 것을 특징으로 하는 D2R 유전자 적중 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 두 번째 loxP 부위는 D2R 게놈 유전자의 4번째 엑손 3' 방향 180bp 다운스트림(downstream)의 인트론(intron)에 위치하는 것을 특징으로 하는 D2R 유전자 적중 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 D2R 유전자 적중 벡터가 도입된 재조합 배아줄기세포.

청구항 6

제3항의 배아줄기세포를 정상 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 분화시켜 제조한 키메라(chimera) 마우스.

청구항 7

제4항의 키메라 마우스를 정상 마우스와 교배시켜 제조한 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 D2R floxed 마우스.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 D2R floxed 마우스는 네오마이신 저항 유전자가 제거된 이형접합 마우스를 교배하여 제조한 동형접합인 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 9

제7항의 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 D2R floxed 마우스(D2R loxP HO)와 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시켜 제조한 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서 D2R이 결핍된 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-Cre 마우스.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스는 LepRb-Cre 마우스와 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스를 교배시켜 제조한 D2R loxP HT;LepRb-Cre 마우스를 다시 한번 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스와 교배시켜 제조한 D2R loxP HO;LepRb-Cre 마우스인 것을 특징으로 하는 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서 D2R이 결핍된 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-Cre 마우스.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 도파민 수용체 D2형(D2R) 유전자 적중 마우스의 제조방법:

i) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 D2R 유전자 적중 벡터(targeting vector)를 마우스의 배아줄기세포에 도입하여 배아줄기세포 클론을 얻는 단계;

ii) 상기 배아줄기세포 클론을 정상 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 분화시켜 키메라(chimera) 마우스를 제조하는 단계;

iii) 상기 키메라 마우스로부터 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 floxed D2R 마우스를 제조하는 단계; 및

iv) 상기 D2R floxed 마우스와 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시켜 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스를 제조하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 iv) 단계의 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스의 제조는 다음 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

a) 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스와 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스를 교배시켜 D2R loxP HT;LepRb-Cre 마우스를 제조하는 단계;

b) 상기 D2R loxP HT;LepRb-Cre 마우스와 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스를 다시 한번 교배시켜 D2R loxP HO;LepRb-Cre 마우스를 제조하는 단계; 및

c) 상기 D2R loxP HO;LepRb-Cre 마우스와 D2R loxP 동형접합(HO) 마우스를 교배시켜 D2R이 결핍된 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-Cre 마우스를 제조하는 단계.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스는 뇌의 시상하부 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서만 D2R이 제거된 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 도파민 수용체 D2형 유전자 적중 마우스 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 도파민 수용체 D2형 유전자를 세포 혹은 조직 특이적으로 제거시킨 조건적 유전자 제거(conditional knockout) 형질전환 마우스에 관한 것이다.

[0002]

배 경 기 술

[0003] 도파민은 뇌의 신경전달 물질로서, 도파민을 생성하는 세포는 태아기의 중뇌 배쪽에서 생성되고, 이 생성 과정에는 많은 전사인자와 신경전달 기작의 복잡한 상호관계가 요구된다(Perrone-Capano C *et al.*, *Neurosci Biobehav Rev.*, 24(1):119-24, 2000; Simon HH *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.*, 991:36-47, 2003; Riddle R and Pollock JD, *Brain Res Dev Brain Res.*, 30;147(1-2):3-21, 2003). 현재까지 도파민의 기능과 관련하여 도파민이 운동, 인지, 감각, 감정 및 자율(예를 들어, 식욕, 체온, 수면의 조절) 기능을 포함하는 여러 가지 뇌 기능에서 필수적이라는 사실이 알려졌다. 따라서, 이러한 도파민 기능의 조절은 뇌기능에 영향을 미치는 광범위한 장애를 치료하는데 이용될 수 있으며, 실제적으로는 신경 장애 및 정신 장애 모두는 뇌에서의 도파민 시스템과 수용체와의 상호 작용을 바탕으로 하는 약물에 의해 치료되고 있다.

[0004] 도파민의 기능은 막수용체인 도파민 수용체(Dopamine Receptor)와 결합하여 이루어지게 되는데, 상기 수용체는 G-단백질(GTP-binding-proteins)과 결합하여 이차 신호전달자를 활성화 시키거나 특정한 신호전달체계를 활성 또는 억제시키며 생리적 반응에 이르는 것으로 알려져 있다. 현재까지 알려진 도파민 수용체로는 5개의 서브타입(D1, D2, D3, D4 및 D5)이 있는데, 이들은 다시 그들의 구조와 약리학적인 성질에 의해서, 아데닐산고리화효소(adenylate cyclase)를 활성화하여 세포 내 cAMP 형성을 촉진시키는 D1-like Recepter 그룹(D1 및 D5)과, D1R과는 반대로 cAMP 형성을 억제하는 D2-like receptor 그룹(D2, D3 및 D4)으로 분류될 수 있다.

[0005] 렙틴(leptin)은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로써 음식 섭취량과 체중을 조절하는 중요한 인자이며, 렙틴에 의한 신호 전달이 활성화될 경우 섭식이 억제되는 것으로 알려져 있으며, 실제로 쥐에서 렙틴 수용체 혹은 렙틴 자체가 발현되지 않는 경우 먹이 섭취량 증가로 인해 중증 비만이 유도된다. 이러한 렙틴의 먹이 섭취 조절 및 에너지 대사 조절은 포만 중추라 여겨지고 있는 궁상핵(Arcuate nucleus, ARC)과 섭취 중추로 여겨지는 외측시상하부구역(lateral hypothalamic area, LHA)에서 이루어진다. ARC에는 렙틴 수용체가 발현되는 신경세포가 있는데 이들은 pro-opiomelanocortin(POMC) 또는 agouti-related protein/neuropeptide Y(Arg/NPY)를 발현하는 세포로 나뉘게 된다(Scott MM. *et al.*, *J Comp Neurol.* 10;514(5):518-32, 2009; Cowley *et al.*, *Nature.* 24;411(6836):480-4, 2001; Elias *et al. Neuron.* 23(4):775-86, 1999). 이 두 종류의 신경 세포는 반대되는 역할을 가지며 렙틴에 의한 음식섭취 및 에너지 대사 조절한다. 이처럼 비만에 중요한 렙틴 신호 전달이 도파민 수용체 D2형(D2R)에 의해 억제된다는 것을 본 연구팀에서 밝힌 바 있으며, D2R 넉아웃 마우스에서 섭식량이 감소하고 산소 소비량은 증가하여 체중이 감소하게 되는 것은 렙틴 신호 전달을 억제하고 있는 D2R이 넉아웃되면서 렙틴 신호 전달이 강화되었기 때문임을 보고하였다(Kim *et al.*, *Journal of Biologicl Chemisrty*, 285:8905-17, 2010).

[0006] 따라서, 도파민 수용체 D2R은 중추신경계에서 많이 발현하고 있으며 도파민의 다양한 생리적인 기능을 조절하는 중요한 수용체로, 시상하부에서 궁상핵의 렙틴 수용체와 상호작용하는 것은 항상성적인 대사조절뿐 아니라 식욕조절에 관여하는 것으로 알려진 도파민의 비만신호조절 역할에서 중요한 의미를 가진다고 볼 수 있으므로, 본 발명자들은 고전적 유전자 제거(conventional gene knockout)을 이용한 도파민 D2 결핍 마우스를 통해 D2R이 뇌에서 에너지 항상성 조절과 스트레스 및 약물중독에 대한 신경가소성 조절에 매우 중요한 인자임을 확인하였다(Sim *et al.*, *Nature Communications* 4:1579, 2013; Baik *et al.*, *Frontiers in Neural Circuits* 7:152, 2013). 그러나, 아직 D2R의 작용기전은 명확하지 않기 때문에 넉아웃 마우스 모델을 이용한 분자 또는 세포생물학적 분석을 통해 좀 더 명확한 기전규명이 요구된다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 뇌의 특정회로에서의 D2R의 기능을 보다 정확하게 밝힐 수 있는 동물 모델을 만들고자 예의 노력한 결과, 렙틴 수용체 중 대사 조절에 중요한 역할을 갖는다고 알려진 LepRb 수용체가 발현하는 특정 세포에서만 D2R을 조건적으로 제거한 조건적 유전자 제거 마우스(conditional knockout mice)를 제작하여, 상기 넉아웃 마우스의 대사조절 형질을 분석하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 적중 벡터, 상기 적중 벡터가 도입된 마우스의 배아줄기세

포, 상기 배아줄기세포 클론을 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 제조한 키메라(chimera) 마우스, 상기 키메라 마우스로부터 제조한 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 마우스 및 상기 D2R floxed 마우스를 이용하여 제조한 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 도파민 수용체 D2형(D2R) 유전자 적중 마우스의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 첫 번째 loxP(locus of X-over P1) 부위; 도파민 수용체 D2형(D2R) 게놈 유전자의 2번째 엑손, 3번째 엑손 및 4번째 엑손까지의 유전자 절편; KpnI 절단부위; 네오마이신 저항 유전자; 두 번째 loxP(locus of X-over P1) 부위; 디프테리아 독소 A(Diphteria toxin A) 유전자; 지오신 저항 유전자; 및 MluI 절단부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 D2R 유전자 적중 벡터(targeting vector)를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 D2R 유전자 적중 벡터가 도입된 재조합 배아줄기세포를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 배아줄기세포를 정상 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 분화시켜 제조한 키메라(chimera) 마우스를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 키메라 마우스를 정상 마우스와 교배시켜 제조한 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 D2R floxed 마우스를 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 floxed D2R 마우스(D2R loxP HO)와 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시켜 제조한 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서 D2R이 결핍된 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-Cre 마우스를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, i) 상기 D2R 유전자 적중 벡터(targeting vector)를 마우스의 배아줄기세포에 도입하여 배아줄기세포 클론을 얻는 단계; ii) 상기 배아줄기세포 클론을 정상 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 분화시켜 키메라(chimera) 마우스를 제조하는 단계; iii) 상기 키메라 마우스로부터 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 floxed D2R 마우스를 제조하는 단계; 및 iv) 상기 D2R floxed 마우스와 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시켜 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스를 제조하는 단계를 포함하는 도파민 수용체 D2형(D2R) 유전자 적중 마우스의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 도파민 수용체 D2형 유전자가 세포 혹은 조직 특이적으로 제거된 조건적 유전자 제거(conditional knockout) 형질전환 마우스는 뇌의 특정 부위의 D2R 결핍에 따른 도파민성 신경정신, 신경내분비 등의 특정 질환 연구 및 시상하부 렙틴 수용체 발현 세포에서의 D2R 결여에 따른 에너지 대사 조절 등의 연구에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 D2R 적중 유전자에서 loxP 위치 선정에 대한 도식도이다.

도 2는 첫 번째 loxP site의 도입을 위한 PL452 벡터 지도를 나타낸 것이다.

도 3은 첫 번째 loxP site가 도입된 BAC construct 및 이를 확인하기 위한 PCR 프라이머를 나타낸 것이다.

도 4는 첫 번째 loxP site의 도입과 Cre 발현으로 Neo 카세트 제거 여부를 PCR로 확인한 결과이다.

도 5는 두 번째 loxP site의 도입을 위한 PL451 벡터 지도를 나타낸 것이다.

도 6은 두 번째 loxP site 도입 부위 및 이를 확인하기 위한 PCR 프라이머의 위치를 나타낸 것이다.

도 7은 두 번째 loxP site 도입 후 Flp 발현 유도에 따른 Neo 카세트 제거 여부를 PCR product 사이즈 변화로

확인한 결과이다.

도 8은 Retrieval을 위한 지오신 내성 부위 도입에 필요한 pCR-Blunt II-TOPO 벡터를 나타낸 것이다.

도 9는 pCR-Blunt II-TOPO 벡터를 이용한 지오신 내성 부위 도입 전략에 관한 도식도이다.

도 10은 Retrieval 벡터 지도 및 지오신 내성 부위가 도입된 Retrieval 벡터 DNA를 제한효소로 확인한 결과이다.

도 11은 Retrieval 벡터에 음성 선택 마커로 사용될 DTA를 클로닝 하기 위한 전략을 나타낸 것이다.

도 12는 Retrieval 벡터에 DTA를 클로닝한 후 PCR로 확인한 결과이다.

도 13은 Retrieval 벡터에 DTA를 클로닝한 후 제한효소로 확인한 결과이다.

도 14는 마우스 D2R floxed 적중 벡터 지도의 도식도이다.

도 15는 D2R 적중 벡터 발현 후 네오마이신 처리하여, 생존한 세포들의 gemomic DNA를 분석한 결과이다. (돌연변이 세포주는 11.5kb 및 4kb의 band 2개가 확인됨)

도 16은 돌연변이 세포주를 마우스의 배반포에 주입 후 분화시켜 얻은 키메라 마우스에서 D2R 유전자의 FRT 및 loxP를 확인한 결과이다.

도 17은 D2R Flox 마우스의 적중 전략을 나타낸 도식도이다.

도 18은 Retrieval 적중 벡터 바깥쪽에 위치한 5' 또는 3' 프로브를 이용하여 서던 블롯팅으로 확인한 결과이다 (a: 5' KpnI 절단, b: 3' SpeI 절단).

도 19는 D2R floxed 마우스의 PCR 유전형질분석을 위한 (a) 도식도, (b) 프라이머 및 (c) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 LepRb-Cre 마우스와 D2R floxed 마우스를 교배하여 LepRb를 발현하는 세포에서만 D2R이 조건적으로 제거된 마우스를 얻기 위한 전략을 나타낸 (a) 도식도 및 상기 마우스의 (b) 유전형질분석 결과이다.

도 21은 D2R flox:LepRb Cre 마우스의 유전자 분석 결과이다 (a: D2R 5' loxP, b: D2R 3' loxP, c: LepRb Cre).

도 22는 시상하부 궁상핵 부위에서 렙틴 수용체 발현 뉴런 특이적인 D2R의 넉아웃을 확인한 결과이다. (WT: 야생형 마우스, KO: D2R flox:LepRb Cre, 붉은색 화살표: 렙틴 수용체가 발현하지 않는 뉴런에서 D2R의 발현, 흰색 화살표 : 렙틴 수용체가 발현하는 뉴런에서 D2R의 발현)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0024] 본 발명에서는 조건적 유전자 제거 마우스를 만들기 위해, Recombineering을 이용한 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 적중 벡터 제작하고 상기 제작된 벡터를 마우스의 배아줄기세포에 발현시켜 클론을 탐색 분리하였다. 이후, 얻어진 배아줄기세포 클론을 마우스 배반포(blastocyst)에 삽입하여 키메라 획득하고, 다시 키메라와 정상 마우스를 교배하여 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 D2R floxed 마우스를 제작하였다. 마지막으로, D2R floxed 마우스를 이용하여 시상하부 궁상핵 렙틴 수용체 발현 신경세포 특이적 D2R이 제거된 넉아웃 마우스를 제작하고 유전형질 분석(genotyping)을 수행하였다.

[0025] 따라서, 본 발명은 제1관점에서 첫 번째 loxP(locus of X-over P1) 부위; 도파민 수용체 D2형(D2R) 게놈 유전자의 2번째 엑손, 3번째 엑손 및 4번째 엑손까지의 유전자 절편; KpnI 절단부위, 네오마이신 저항 유전자; 두 번째 loxP(locus of X-over P1) 부위; 디프테리아 독소 A(Diphteria toxin A) 유전자; 지오신 저항 유전자; 및 MluI 절단부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 D2R 유전자 적중 벡터(targeting vector)에 관한 것이다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 네오마이신 저항 유전자는 FRT(Flippase Recognition Target) 부위, 네오마이신 저항

유전자 및 FRT 부위 순서로 이루어질 수 있는 특징이 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 첫 번째 loxP 부위는 D2R 게놈 유전자의 2번째 엑손 5' 방향 300bp 업스트림(upstream)의 인트론(intron)에 위치하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 두 번째 loxP 부위는 D2R 게놈 유전자의 4번째 엑손 3' 방향 180bp 다운스트림(downstream)의 인트론(intron)에 위치하는 것이 바람직하나, 이 또한 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명은 제2관점에서, 상기 D2R 유전자 적중 벡터가 도입된 재조합 배아줄기세포에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 제3관점에서, 상기 배아줄기세포를 정상 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 분화시켜 제조한 키메라(chimera) 마우스에 관한 것이다.

[0030] 본 발명은 제4관점에서, 상기 키메라 마우스를 정상 마우스와 교배시켜 제조한 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 D2R floxed 마우스에 관한 것이다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 floxed D2R 마우스는 네오마이신 저항 유전자가 제거된 이형접합 마우스를 교배하여 제조한 동형접합인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명은 제5관점에서, 상기 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 floxed D2R 마우스(D2R loxP HO)와 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시켜 제조한 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서 D2R이 결핍된 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-Cre 마우스에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스는 LepRb-Cre 마우스와 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스를 교배시켜 제조한 D2R loxP HT;LepRb-Cre 마우스를 다시 한번 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스와 교배시켜 제조한 D2R loxP HO;LepRb-Cre 마우스인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명은 제6관점에서, i) 상기 D2R 유전자 적중 벡터(targeting vector)를 마우스의 배아줄기세포에 도입하여 배아줄기세포 클론을 얻는 단계; ii) 상기 배아줄기세포 클론을 정상 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하여 분화시켜 키메라(chimera) 마우스를 제조하는 단계; iii) 상기 키메라 마우스로부터 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 floxed D2R 마우스를 제조하는 단계; 및 iv) 상기 D2R floxed 마우스와 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스를 교배시켜 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스를 제조하는 단계를 포함하는 도파민 수용체 D2형(D2R) 유전자 적중 마우스의 제조방법에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 iv) 단계의 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스의 제조는 a) 렙틴수용체(LepRb)-Cre 재조합효소를 발현하는 마우스와 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스를 교배시켜 D2R loxP HT;LepRb-Cre 마우스를 제조하는 단계; b) 상기 D2R loxP HT;LepRb-Cre 마우스와 D2R loxP 이형접합(HT) 마우스를 다시 한번 교배시켜 D2R loxP HO;LepRb-Cre 마우스를 제조하는 단계; 및 c) 상기 D2R loxP HO;LepRb-Cre 마우스와 D2R loxP 동형접합(HO) 마우스를 교배시켜 D2R이 결핍된 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-Cre 마우스를 제조하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 뉴런 특이적 D2R 결핍 마우스는 뇌의 시상하부 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서만 D2R이 제거된 마우스인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 상기 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)는 일반적으로 시험관 내에서 배양한 착상 전 초기 배아(pre-implantation embryos)로부터 수득될 수 있다(Evans *et al., Nature,* 292:154-156, 1981; Bradley *et al., Nature,* 309:225-258, 1984; Gossler *et al., Proc. Natl. Acad. Sci* USA, 83:9065-9069, 1986). 상기 ES 세포는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 배양될 수 있다(Robertson, "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, a Practical Approach ", IRL Press, Washington D. C., 1987; Bradley *et al., Current Topics in Devel. Biol.* 20:357-371, 1986; Hogan *et al.,* "Manipulating the Mouse Embryo":A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986).

[0038] 상기 적중 벡터의 배아줄기세포로의 도입은 당업계에 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 예를 들면, 전핵주입법(pronuclear microinjection), 레트로바이러스 매개 유전자 트랜스퍼(retrovirus mediated gene transfer), 유전자 적중(gene targeting), 전기충격(electroporation), 정액 매개 유전자 트랜스퍼, 칼슘 포스페이트/DNA 공-침전법 및 미세주입법(microinjection) 등이 있다. 상기 배아줄기세포를 트랜스펙션시킨 후 특정 항생물질을 포함하는 선택 배지에서 배양하여 내성을 나타내는 배아줄기세포 클론을 선별함으로써 동형재조합이 이루어진 세포만을 선별한다.

[0039] 이러한 조건적 넉아웃 동물모델 제조방법의 장점은, 특정 유전자가 발생단계에 중요한 역할을 하여 일반적인 넉아웃 동물모델을 얻을 수 없는 경우에, 특정한 조직에서만 Cre를 발현하는 생쥐를 이용(교배)하여 생체 전 조직에서가 아닌 그 특정 조직에서만 선택적으로 유전자가 넉아웃된 동물을 얻을 수 있다는 점이다. 즉, 본 발명에 따른 조건적 넉아웃 동물모델은 다양한 조직 특이적, 또는 약물 유도성 Cre 발현 생쥐와의 교배를 통해, 선택적이며 조건적인 개체 내 유전자의 한정적 넉아웃을 유도하여 궁극적으로 해당 유전자의 생체내 생리학적 기능을 온전히 연구할 수 있다는 큰 장점이 있다.

[0040] 본 발명에서는 제한 효소나 DNA 라이게이즈가 필요없이 genomic DNA를 효율적으로 클로닝 하고 변형할 수 있는 염색체 변형 기술인 recombinogenic engineering 또는 recombineering 기술을 이용하여, 제거하고자 하는 D2R 유전자의 특정 엑손 주위에 loxP라는 특정 염기서열을 삽입한 D2R floxed 마우스를 제작하였다. 이 경우 Cre loxP recombination을 이용하여, 이들 D2R floxed 마우스를 특정 세포에서 Cre recombinase를 발현하는 Cre 형질전환 마우스와 교배시킨 후, 획득한 마우스가 Cre recombinase를 세포 특이적으로 발현시키는 경우 Cre recombinase는 loxP 부위를 인지하여 두 개의 loxP 사이의 D2R 유전자 DNA를 제거할 수 있다. 따라서 조건적 유전자 제거 동물 모델을 제작하기 위해서는 일차적으로 D2R floxed a마우스의 제작이 반드시 선행되어야 한다.

[0041] 상기 “플록스드(floxed)"란 유전학에서 두 개의 loxP 사이트 사이에 샌드위치적으로 위치된 DNA 시퀀스(sequence) 상태를 의미하여, "flanked by loxP”란 말의 축약형이다. loxP 사이트 사이에 재조합은 Cre 재조합효소(recombinase)에 의해 촉매되어 진다(catalysed). 유전자 플록싱(floxing)은 유전자를 넉아웃(deleted, knocked out)시키거나, 전위(translocated) 또는 삽입(inverted)시킬 있고, 플록싱된 유전자는 기관-특지적 넉아웃(organ-specific knockouts) 목적을 위해 사용된다.

[0042] 또한, 상기 “Cre 재조합효소(recombinase)”는 “Cre”이라고도 불리며, P1 박테리오파지(bacteriophage)에서 유래한 타입(Type) I 토포아이소머레이즈(topoisomerase)로, loxP 사이트 사이의 사이트-특이적 DNA 재조합을 촉매한다. Cre 재조합효소는 유전자 및 염색체를 변형하는 툴로서 유용하며, 실험 동물의 loxP 사이트에 둘러싸인 DNA 세그먼트(일명, ‘플록스드(floxed)')를 제거하는데 사용된다.

[0044] **[실시예]**

[0045] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명 할 것이다.

[0047] **Recombineering에 사용되는 Bacterial strains과 플라스미드**

[0048] 도파민 수용체 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 recombinnering을 진행하기 위해, recombineering에 필요한 박테리오파지 λ의 exo, bet, gam 유전자를 가지고 있는 Bacterial strain (λ 프로파지의 Red gene은 Exo, beta, gam 등이며, exo는 5'에서 3'으로의 dsDNA exonuclease 활성을 지니고 3'-overhang을 만든다. beta는 단일가닥 DNA(3'-overhang)에 부착하고 annealing하여 재조합 DNA를 만든다. Gam은 선형의 이중가닥 DNA 조각을 degradation 시키는 RecBCD 뉴클레아제를 억제한다.)과 loxP를 가지고 있는 플라스미드를 준비하고, D2R 유전자를 포함하는 BAC (bacterial Artifical Chromosome)을 준비한다.

표 1

[0049]

Strains	Genotype	Primary use
SW105	DH10B [λc1857 (*cro-bioA* <> *araC-P*$_{BAD}$*flpe*] Δ galK	BAC recombineering: galK counter-selection
SW106	DH10B [λc1857 (*cro-bioA* <> *araC-PBADcre*] Δ galK	BAC recombineering: galK counter-selection
DH5a		Plasmid isolation
selection cassettes		
PL451	*FRT.PGK.EM7.NeobpA.FRT.loxP*	
PL452	*loxP.PGK.EM7.NeobpA.loxP*	
pTamp	*a vector containing an Amp cassette*	

pCR-Blint II-TOPO	*a vector containing an Zeocine cassette*	

[0051] **D2R 조건적 제거 모델의 제작 설계**

[0052] 도파민 수용체 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 recombinnering 방법을 사용하여 조건적 유전자 제거 마우스를 만들기 위한 D2R floxed 마우스를 제작하기 위해서 다음의 단계를 진행하였다.

[0053] 1) Recombineering을 이용한 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 적중 벡터 제작;

[0054] 2) 마우스의 배아줄기세포에 제작된 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 적중 벡터 발현 및 적중 된 세포의 탐색 분리;

[0055] 3) 얻어진 배아줄기세포 클론을 마우스 배반포(blastocyst)에 삽입하여 키메라 획득;

[0056] 4) 키메라와 정상 마우스를 교배하여 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 마우스 획득; 및

[0057] 5) 넉아웃 마우스의 유전형질 분석(genotyping).

[0059] **실시예 1: Recombineering을 이용한 D2R 유전자 내에 loxP를 삽입하는 적중 벡터 제작**

[0060] 1-1: loxP의 위치 및 제한효소 선정

[0061] D2R의 효율적인 넉아웃을 위하여 loxP는 주로 엑손에서 150bp 이상 떨어진 인트론에 위치하도록 하였다. 제거시킬 엑손을 선정할 때는 엑손이 단백질의 기능에 있어서 중요한 도메인을 코딩하는지, 제거시켰을 때 truncated 단백질이 생산이 되는지 등의 여부를 고려하였으며, D2R은 엑손 1과 엑손 2 사이의 인트론이 매우 길며 엑손 2에 시작 코돈을 가지고 있다. 따라서, 적중 벡터 제작에서 시작 코돈을 제거함과 동시에 truncated 단백질이 생성되지 않도록 적중하고자 엑손 2,3,4를 적중하여 이 양쪽에 존재하는 인트론에 loxP를 위치시키기로 결정하였다(도 1).

[0062] lox 벡터나 넉아웃 마우스가 만들어지면 야생형과 구별하기 위해 서던 블롯팅을 수행하는데, 이를 위해 flox형과 야생형이 구별이 될 수 있는 KpnI과 SpeI의 특정 제한효소 부위를 유전자 적중 프라이머 제작 과정 중 삽입해 주었다. 또한, 도파민 D2R 수용체 genomic DNA가 들어있는 BAC(bacterial artificial chromosome) 클론 및 RP23-15I15(mouse chr9.49,082,761-49,260,938)을 구매하여 BAC에서 DNA를 분리하고 이 BAC DNA의 recombineering을 위해 SW106 세포로 형질전환시킨 후, 해당 BAC DNA에 존재하는 불필요한 loxP를 제거하기 위해 pTamp 플라스미드의 암피실린 내성 유전자 카세트로 재조합하였다.

[0064] 1-2: 첫 번째 loxP targeting

[0065] 첫 번째 loxP를 삽입하기 위해 loxP를 위치시킬 엑손 2,3,4의 양쪽 중 5' 쪽을 먼저 적중하였다. 첫 번째 loxP는 loxP-Neo-loxP 카세트를 가지고 있는 PL452 벡터(도 2)를 이용하여, loxP-Neo-loxP 카세트 주위 염기서열에 엑손 2의 300bp upstream에 두 base를 두고 양쪽으로 74bp, 72bp의 arm을 달아서 프라이머(서열번호 1 및 2)를 제작하였다.

[0066] [첫 번째 loxP targeting 프라이머]

[0067] Forward : 5'-AAGTGATTAATAAATGTTAAAGCATCAAGAATTAATGAATGCTCATTTCTGTTTCTAC CACAAGAC TCTGGA CACGTG tcctgcagcccaattccgatcat-3'(서열번호 1)

[0068] Reverse : 5'-ACATAAGTTTCAAAAGAGCTAACTCATCCATTCTTTCATTTGCTCAACACACTCACA TGCACAGTTAGTTAGGA tagaactagtggatcccctcga-3'(서열번호 2)

[0069] 서열번호 1 및 2의 프라이머를 가지고 PL452 벡터에 대해 PCR을 하면 loxP-Neo-loxP 카세트 주위로 D2R 유전자 엑손 2 upstream 부위 염기서열 arm을 가지고 있는 PCR product가 만들어지며, PCR 증폭된 DNA를 가지고 D2R 유전자 BAC 클론에서 유전자 재조합을 유도하였다. 유전자 재조합은 PCR product를 BAC DNA를 가지고 있는 SW106 세포를 전기천공법으로 형질전환시켜 수행하였으며, PCR로 재조합된 클론을 확인하고 재조합된 클론에서

Neo 카세트를 제거하기 위해 SW106 세포를 아라비노스(arabinose)가 포함된 배지에서 1시간 동안 배양하여 Cre의 발현을 유도하였다. 이후, 한쪽 loxP가 제거된 BAC 클론을 확인용 프라이머(표 2)를 이용한 PCR로 확인하였다(도 3 및 4).

표 2

[0070]

1	F1 : CCTGTGCGTCAGCATTTGGAGC (서열번호 3)
	R4 : ACCAAGAGCTAGCAGAGCTGAGA (서열번호 4)
2	F1 : CCTGTGCGTCAGCATTTGGAGC (서열번호 3)
	R2 : CTGCGCTGACAGCCGGAACA (서열번호 5)
3	F3 : TGGGCTGACCGCTTCCTCGT (서열번호 6)
	R4 : ACCAAGAGCTAGCAGAGCTGAGA (서열번호 4)
4	F7 : GCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCG (서열번호 7)
	R4 : ACCAAGAGCTAGCAGAGCTGAGA (서열번호 4)

[0072] 1-3: 두 번째 loxP targeting

[0073] 두 번째 loxP의 위치는 trumcate 단백질이 만들어질 수 있는 최소한의 확률을 지닌 엑손 2, 3, 4를 적중하는 엑손 4가 끝나는 지점에서 180bp 떨어진 인트론 내로 선정하였다(도 1). 두 번째 loxP 삽입을 위해 사용한 PL451 벡터는 FRT-.PGK-.EM7-.NeobpA-.FRT-.loxP 카세트를 가지고 있으며, neo 카세트의 양쪽으로 FRT가 flanking 되어있고 FRT의 3' 쪽에 이어서 loxP가 존재하고 있는 플라스미드를 이용하여 두 번째 loxP를 적중하였다(도 5). FRT-.PGK-.EM7-.NeobpA-.FRT-.loxP 카세트를 가지고 있는 PL451 벡터를 이용하여, 카세트 주위 염기서열에 Exone 4의 180bp downstream에 두 base를 두고 양쪽으로 74bp, 72bp의 arm을 달아서 프라이머(서열번호 8 및 9)를 제작하였다.

[0074] [두 번째 loxP targeting 프라이머]

[0075] Forward : 5'-GAGGCTGGAGGCATCACACAGATCCAATCCAACTTAGAGTTGTTCCAGATTGGGC AGGAGAAAAA TATAGGGCGAATTGGGTACCGGG-3'(서열번호 8)

[0076] Reverse : 5'-CCAAATCTTCTCTTTAGACATTTTCCCTTCTCCACATCCAGTCCCAATGTGCCTGG TGGCACTC ATGCAT GCCGCTCTAGAACTAGTGGAT-3'(서열번호 9)

[0077] 서열번호 8 및 9의 프라이머를 이용하여 PL451 벡터에 대해 PCR을 하면 FRT-.PGK-.EM7-.NeobpA-.FRT-.loxP 카세트 주위로 D2R 유전자 엑손 4의 downstream 부위 염기서열 arm을 가지고 있는 PCR product가 만들어지며, PCR 증폭된 DNA를 가지고 이미 loxP 하나가 삽입된 D2R 유전자 BAC 클론에서 유전자 재조합을 유도하였다. PL451 벡터는 두 FRT 사이에 neo 카세트가 존재하므로 이를 제거하기 위해서는 Flpe 유전자가 유도가 되는 세포가 필요하다. SW105는 아라비노스 배지에서 Flpe를 유도할 수 있으므로 두 번째 loxP를 적중하기에 앞서 SW105 세포에 앞서 준비한 loxP 하나가 삽입된 D2R 유전자 BAC DNA를 전기천공법을 이용하여 형질전환시켰다.

[0078] 유전자 재조합은 이렇게 SW105 세포에 형질전환된 loxP 하나가 삽입된 D2R 유전자 BAC DNA에 대해 앞서 제작한 FRT-.PGK-.EM7-.NeobpA-.FRT-.loxP 카세트 주위로 D2R 유전자 엑손 4의 downstream 부위 염기서열 arm을 가지고 있는 PCR product를 다시 형질전환시켰다. 이후 PCR로 재조합된 클론을 확인하고 재조합된 클론에서 Neo 카세트를 제거하기 위해 SW105 세포를 아라비노스(arabinose)가 포함된 배지에서 1시간 동안 배양하여 Flpe의 발현을 유도하였다. 이후, 확인용 프라이머로 PCR을 수행하여 재조합이 유도된 클론을 확인하였다(도 6 및 7).

[0079] [두 번째 loxP 확인용 프라이머]

[0080] 2nd loxP-ch F1 : 5'-TGGACTCAACAACACAGGCA-3' (서열번호 10)

[0081] 2nd loxP-ch R2 : 5'-CACACATGTGCAGTTTGTAAAGC-3' (서열번호 11)

[0083] 1-4: Retrieval

[0084] 두 loxP가 적중된 floxed 유전자는 BAC 클론에서 플라스미드로 이동(Retrieval)시켰으며, Retrieval 크기로는

배아줄기세포에서 상동 재조합이 일어나도록 적중 부위인 엑손 2, 3, 4를 가운데로 하여 약 13Kb가 되도록 하였다. 조건적 적중 벡터는 pCR-Blunt II-TOPO를 사용하였으며(도 8), 이 벡터는 지오신(zeocin) 내성 부위를 가지고 있어서 retrieval 후 선택 마커로 사용할 수가 있다. 서열번호 12 및 13의 프라이머로 pCR-Blunt II-TOPO 벡터에 대해 PCR을 수행한 후 얻어진 PCR product를 두 개의 loxP가 삽입된 D2R BAC 세포에 전기천공법으로 재조합을 유도하였다.

[0085] 그 결과, 원하는 D2R 엑손 2,3,4 양쪽에 두 개의 loxP가 삽입된 D2R 유전자가 pCR-Blunt II-TOPO 벡터의 지오신(zeocin) 내성 유전자와 pUC origin을 가진 부분의 플라스미드 절편에 재조합된 약 14Kb의 적중 플라스미드가 생성되었다(도 9 및 10).

[0086] 서열번호 12 및 13의 프라이머는 적중할 유전자의 13Kb의 양쪽 70bp에 pCR-Blunt II-TOPO 벡터의 지오신(zeocin) 내성 유전자와 pUC origin을 가진 부분의 양쪽 염기서열을 추가한 염기서열로 제작하였다. pCR-Blunt II-TOPO에서 retrieval 벡터로 사용될 부위는 프로모터-지오신-pUC로 적중 벡터 프라이머를 제작할 때 두 가지 제한효소 부위를 삽입하였다. 첫 번째는 retrieval 이후 음성 선택 마커로 사용할 DTA를 클로닝 하기 위하여 클로닝용 제한효소 NotI을 retrieval 부위 한쪽 바로 옆에 삽입하였으며, 두 번째는 적중 벡터가 완성이 되면 배아줄기세포에 도입하기 위한 선형화(linearization)를 위해 retrieval 부위 다른 한쪽 끝에 MluI 제한효소 부위를 삽입하였다.

[0087] [벡터 retrieval의 프라이머]

[0088] Forward : 5'-GGTGCTAGTTACAACCAGAGTTCAAGAAGCAGGCATTTCATCCCCCAGCTAAGTTGG GATACATAAAATC GCGGCCGC AGGTGGCACTTTTCGGGGAAAT-3'(서열번호 12)

[0089] Reverse : 5'-CCCCTCTCTACCACCTGTTCTTACATCAGACAAGAGTCATGGTCCTGCAACACCATAG TGGTCTAAGATG ACGCGT CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT-3'(서열번호 13)

[0090] 위와 같이 retrieval 시도 후 하기 프라이머를 이용하여 확인하였으며, 프라이머의 위치는 도 9에 나타내었다.

표 3

[0091]

		Product size
Ret-ch F1	TTTCGCCACCTCTGACTTGA (서열번호 14)	
Ret-ch R2	AGCTTCCTATGTTCCCTCCCTT (서열번호 15)	226bp
Ret-ch F3	TCTAGATAGGCAGCTTCTGAGG (서열번호 16)	
Ret-ch R4	TGATGAACAGGGTCACGTCGTC (서열번호 17)	503bp

[0092] 배아줄기세포에 상기 적중 벡터를 도입 후 음성 선택 마커로 사용하도록 해당 벡터에 DTA(Diphteria toxin A)를 retrieval 부위 바로 옆에 클로닝 하였다. Retrieval 할 때 DTA 클로닝을 위하여 삽입해 둔 NotI 부위를 이용하여 DTA를 클로닝(도 11) 한 후, 전체 염기서열을 근거로 한 확인용 프라이머(서열번호 16 및 17)로 PCR(DTA 클로닝 전: 0.5kb, DTA 클로닝 후: 1.7kb) 후 제한효소로 절단하여 DTA 삽입을 확인하였다(도 12 및 13). 이후, 적중 벡터가 완성되면 DNA를 추출하여 retrieval 한쪽 끝에 미리 삽입해 둔 제한효소 부위를 이용하여 선형화(linearization)시키고 배아줄기세포에 트랜스팩션하여 발현시킬 준비를 하였다(도 14 : 준비된 D2R floxed 적중 벡터).

[0094] **실시예 2: 마우스의 배아줄기세포에서 제작된 D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 적중 백터 발현 및 적중된 세포 탐색 분리**

[0095] 제작된 적중 벡터를 선형화한 후 선형화된 DNA를 배아줄기세포(E14Tg2AES)에 전기천공법으로 트랜스팩션하여 발현을 유도하였다. 적중 벡터는 네오마이신(neomycin) 내성 유전자 카세트를 가지고 있으므로 네오마이신을 처리하여 생존하는 세포들을 서던 블롯으로 확인하였다(도 15). 찾아낸 돌연변이 세포주를 분리하여 마우스의 배반포(blastocyst)에 주입하고 분화시켜 얻은 키메라(chimera) 마우스에서 D2R 유전자의 FRT 및 loxP 염기서열을 바탕으로 PCR을 수행하여 확인하였다(도 16).

표 4

[0096]

PCR-1 (8470-8816)	F : GCATCACACAGATCCAATCCAAC (서열번호 18)	346bp
	R : GTT GGC GCC ACT CGG TGG ATG TGG AAT GTG (서열번호 19)	
PCR-2 (9979-10550)	F : GAA TGG GCT GAC CGC TTC CTC GTG CTT TAC (서열번호 20)	571bp
	R : TTTCCCTTCTCCACATCCAGTCC (서열번호 21)	

[0098] **실시예 3: D2R 유전자 내에 loxP가 삽입된 floxed D2R 마우스**

[0099] 상기 실시예 2에서 확인된 키메라와 C57BL/6 정상 마우스를 교배하여 F1 마우스를 얻고, 다시 Flp이 제거된 (deleter) 마우스와 교배하여 FRT 염기서열에 둘러싸인 네오마이신(neomycin) 카세트가 제거된 마우스를 얻었다. 이렇게 얻어진 이형접합체(heterozygote) 끼리 교배하여 동형접합체(homozygote) floxed D2R 마우스를 얻었다. 야생형 마우스와 D2R-flox HT(heterozygote) 마우스에서 Tail DNA를 추출하여 KpnI으로 절단하여 도 17에 표기한 5' 프로브로 서던 블롯팅 및 SpeI으로 자른 후 3' 프로브로 서던 블롯팅 결과 D2R-flox HT(heterozygote) 마우스에서 예측된 band가 관찰되었다(도 17 및 18).

[0100] 또한, D2R flox 마우스 이형접합체끼리 교배하여 얻은 동형접합체 마우스에서 loxP의 삽입을 확인하기 위해, 도 19의 PCR 프라이머(서열번호 3, 4, 18 및 21)를 각 loxP가 삽입된 곳에 맞추어 제작한 후 PCR로 확인하였다(도 19).

[0101] 5' loxp-F : 5'-CCTGTGCGTCAGCATTTGGAGC-3' (서열번호 3)

[0102] 5' loxp-R : 5'-ACCAAGAGCTAGCTAGCAGAGCTGAGA-3' (서열번호 4)

[0103] 3' loxp-F : 5'-GCATCACACAGATCCAATCCAAC-3' (서열번호 18)

[0104] 3' loxP-R : 5'-TTTCCCTTCTCCACATCCAGTCC-3' (서열번호 21)

[0106] **실시예 4: D2R floxed 마우스를 이용하여 특정 세포에서만 특징적으로 D2R 제거**

[0107] 본 실시예에서는 렙틴 수용체 중 대사 조절에 중요한 역할을 갖는다고 알려진 LepRb 수용체가 발현하는 세포에서만 D2R이 특이적으로 넉아웃된 마우스를 제작하였다.

[0108] 상기 실시예 3에서 개발한 D2 엑손 2,3,4를 적중한 D2R floxed 마우스를 이용하여 Jax Mice and Services (The Jackson Laboratory, BarHarbor, Maine, USA)에서 구매한 LepR Cre 마우스 및 D2R loxP 동형접합체 마우스와 교배하여 $D2R^{loxP/loxP}$;LepRb-cre를 얻어 시상하부 렙틴 수용체를 발현하는 세포에서만 D2R 수용체가 제거된 동물 모델을 만들었으며, 이들 동물의 대사조절 형질을 분석하였다(도 20). 도 20에 나타난 바와 같이, D2R flox; LepRb Cre 수컷 마우스와 D2R flox 마우스를 교배시켜 태어난 마우스들을 대상으로 유전형질 분석을 진행하여, D2R의 엑손 2, 3, 4 upstream에 5' loxP, downstream에 3'loxP 서열이 삽입된 것을 하기 서열번호 3, 4 및 18, 21의 프라이머로 PCR을 통해 확인하였다. 또한, Cre recombinase에 대하여 하기 서열번호 22, 23 및 24, 25의 프라이머로 PCR을 진행하여 Cre recombinase 유전자가 존재하는지 확인 후, D2R flox 마우스와 D2R flox; LepRb Cre 마우스를 구별하였다(도 21).

[0109] [프라이머]

[0110] - D2R 5'loxP (WT 421bp. D2R flox 455bp)

[0111] F : CCTGTGCGTCAGCATTTGGAGC (서열번호 3)

[0112] R : ACCAAGAGCTAGCAGAGCTGAGA (서열번호 4)

[0113] - D2R 3' loxP (WT 100bp. D2R flox 298bp.)

[0114] Forward : GCATCACACAGATCCAATCCAAC (서열번호 18)

[0115] Reverse : TTTCCCTTCTCCACATCCAGTCC (서열번호 21)

[0116] - LepRb Cre (WT 324bp, LepRb Cre 324&100bp)

[0117] Forward : GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC (서열번호 22)

[0118] Reverse : GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT (서열번호 23)

[0119] Internal positive control Forward :

[0120] CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (서열번호 24)

[0121] Internal positive control Reverse :

[0122] GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC (서열번호 25)

[0124] **실시예 5: 시상하부 궁상핵 렙틴 수용체 발현 신경세포 특이적 D2R knock out 확인**

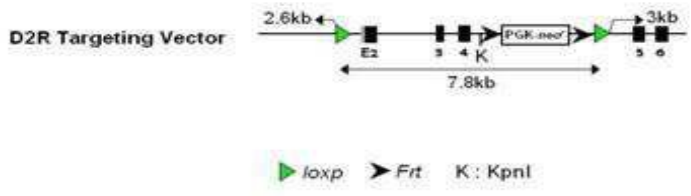
[0125] D2R flox; LepRb Cre 마우스에서 실제로 D2R이 렙틴 수용체 발현 신경세포에서 넉아웃 되었는지 확인하기 위해 면역조직염색을 진행하였다. 마우스들은 14시간 동안 단식시켜 렙틴 신호를 제거한 후, 식염수 혹은 렙틴을 복강 주사하여 렙틴 신호를 유도하였으며, 이후 면역조직염색 실험을 통하여 D2R 발현 및 렙틴 신호 전달의 하위 인자로 알려진 pSTAT3에 각각 형광이 나타나도록 염색하였다.

[0126] 그 결과, 야생형 쥐(D2R flox)에서는 pSTAT3가 관찰되는 렙틴 수용체 발현 신경세포와 pSTAT3가 관찰되지 않는 신경세포 모두에서 D2R이 발현되었지만, D2R flox; LepRb Cre 마우스에서는 pSTAT3가 관찰되는 렙틴 수용체 발현 신경세포에서 D2R의 발현이 사라진 것을 확인할 수 있었다(도 22).

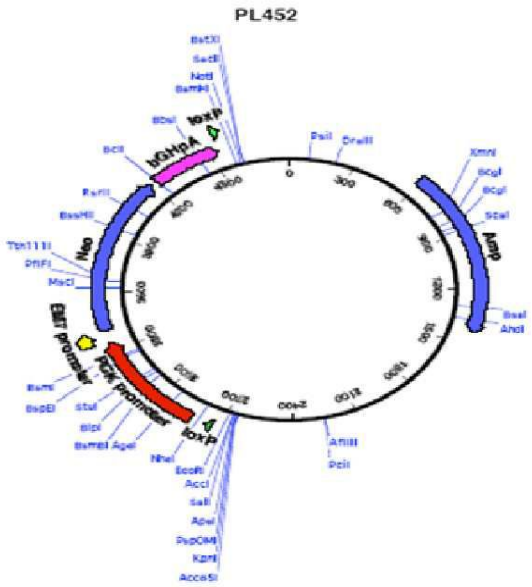
[0128] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

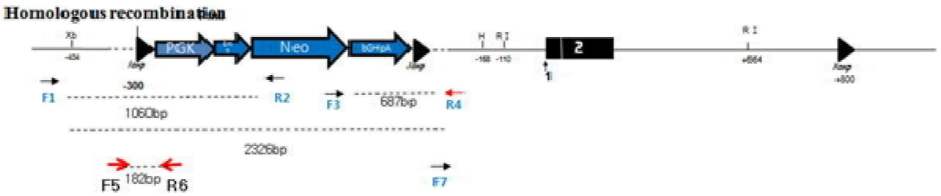
도면1



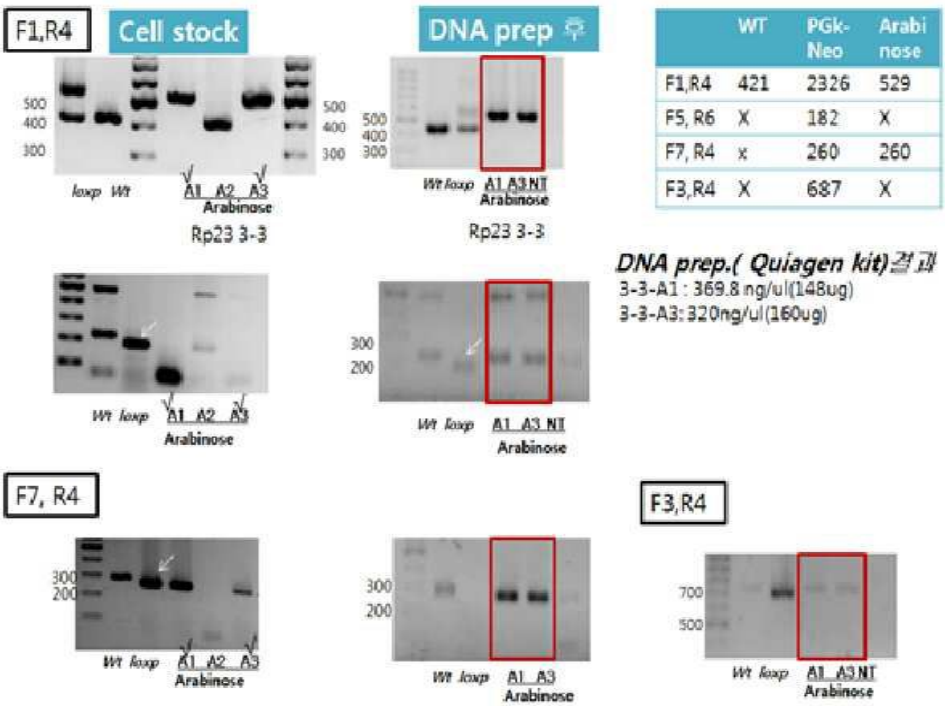
도면2



도면3

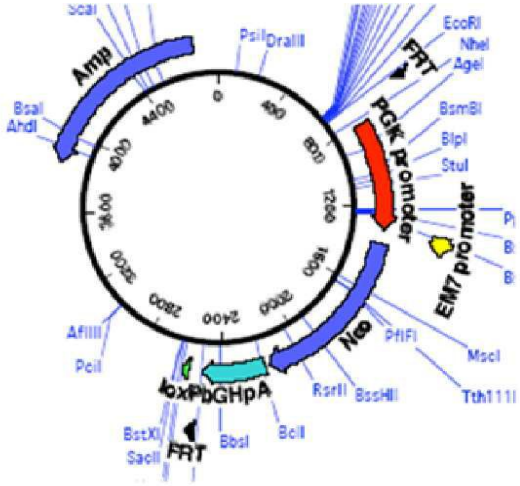


도면4

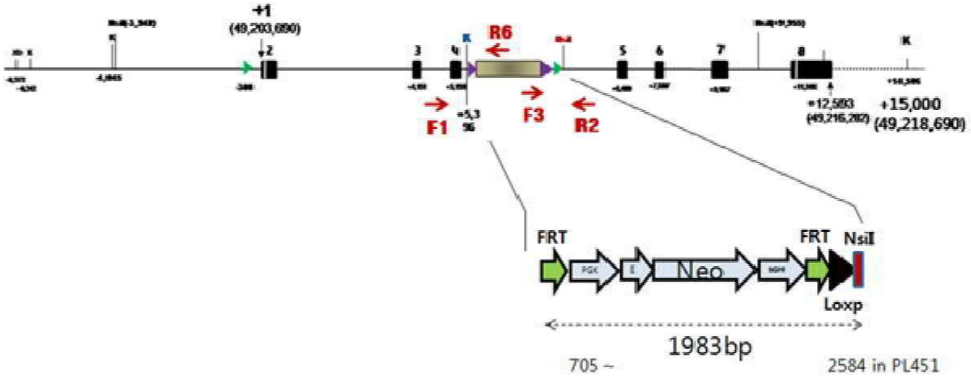


	WT	PGK-Neo	Arabinose
F1,R4	421	2326	529
F5, R6	X	182	X
F7, R4	x	260	260
F3,R4	X	687	X

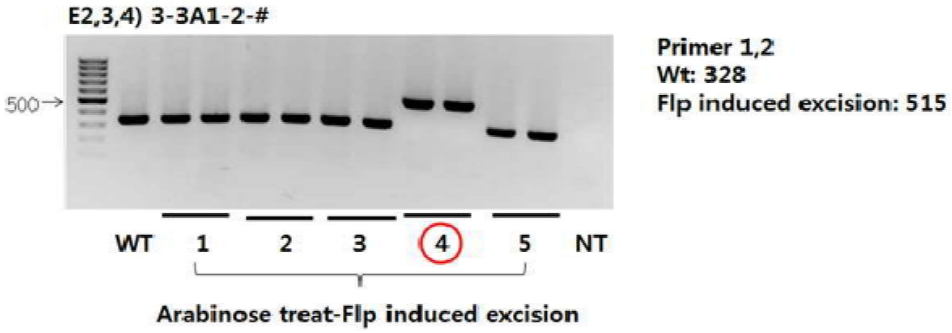
도면5


ScaI
PsiI
DraIII
EcoRI
NheI
AgeI
FRT
Amp
BsaI
AhdI
BsmBI
BlpI
StuI
PGK promoter
EM7 promoter
Neo
AflIII
PciI
PflFI
MscI
loxPbGHpA
RsrII
BssHII
Tth111I
BstXI
SacII
FRT
BbsI
BclI

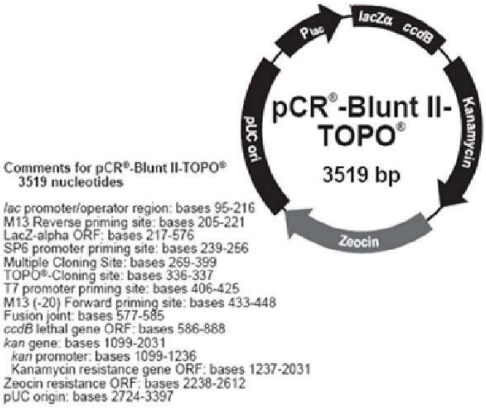
도면6


+1
(49,203,690)
R6
F1
F3
R2
+12,583
(49,216,282)
+15,000
(49,218,690)
FRT
Neo
FRT
NsiI
Loxp
1983bp
705 ~
2584 in PL451

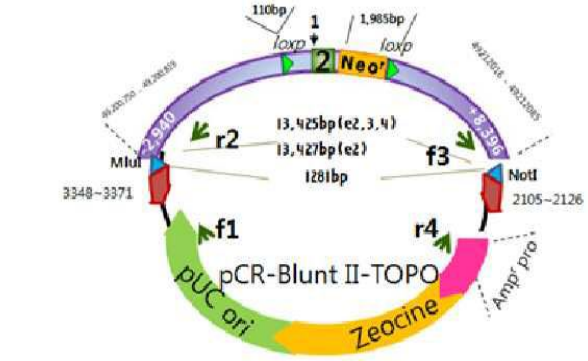
도면7


E2,3,4) 3-3A1-2-#
500
WT
1
2
3
4
5
NT
Arabinose treat-Flp induced excision
Primer 1,2
Wt: 328
Flp induced excision: 515

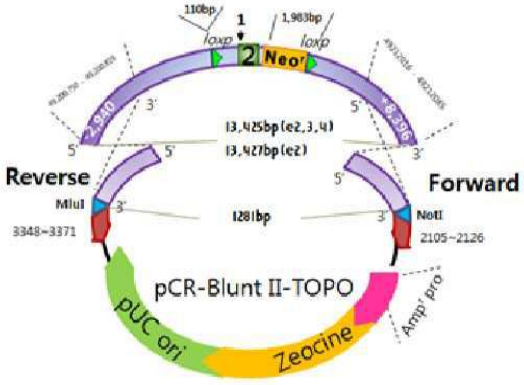
도면8



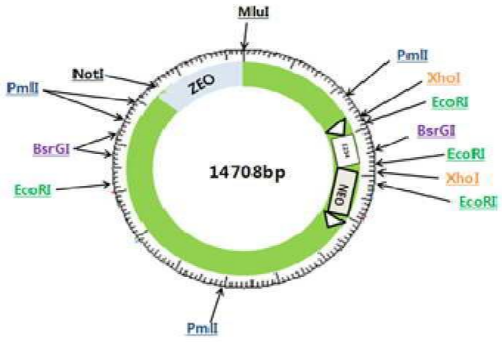
도면9

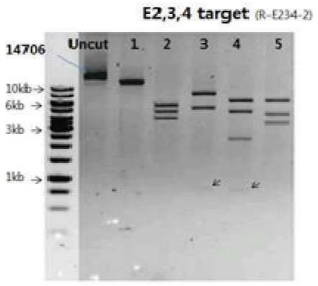


Product size: 70+8+1267+6+70=1421bp



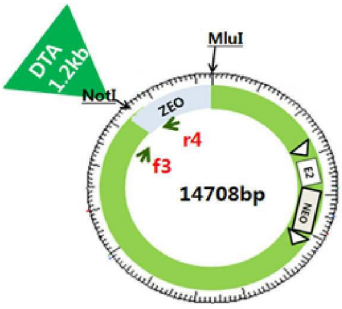
도면10



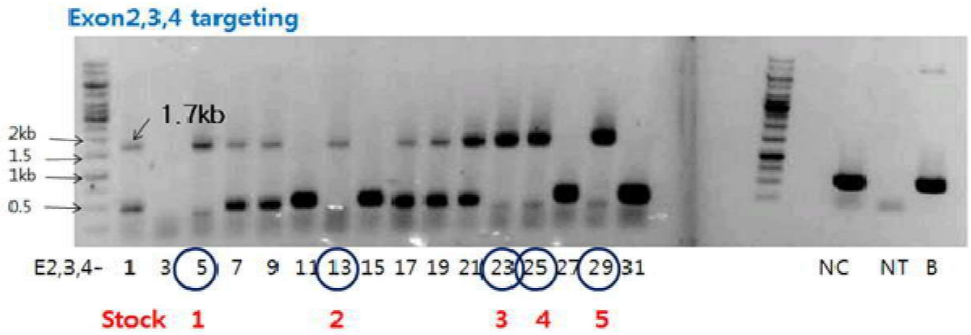


< E2,3,4 target, total 14706bp >
1) NotI= 1cut
2) XhoI/ NotI= 4008, 5826, 4872
3) BsrGI= 5400,8516,790
4) EcoRI= 773, 2366, 4875, 6692
5) PmlI= 393, 3405, 4393, 6515

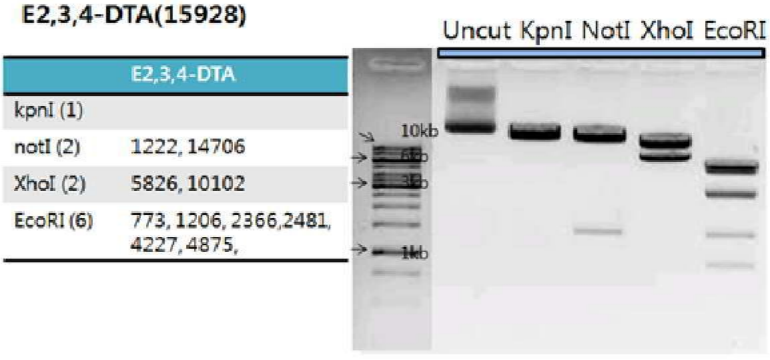
도면11



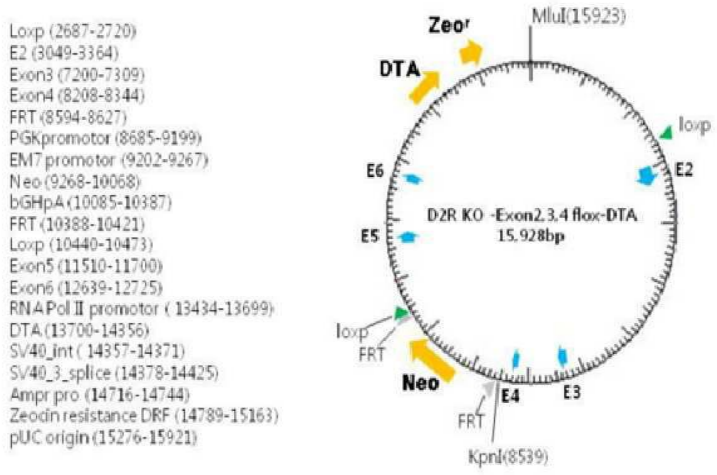
도면12



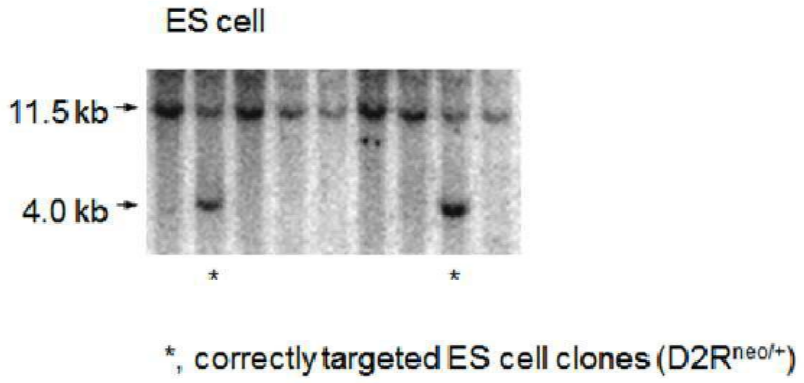
도면13



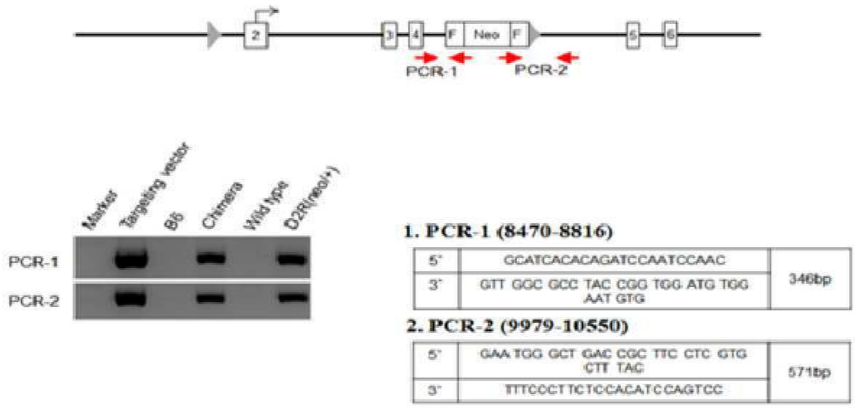
도면14



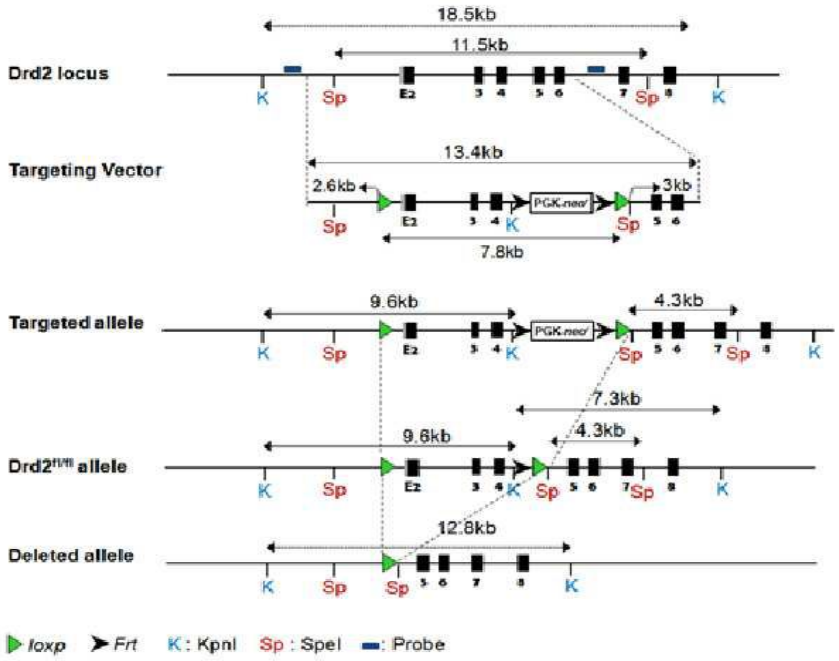
도면15



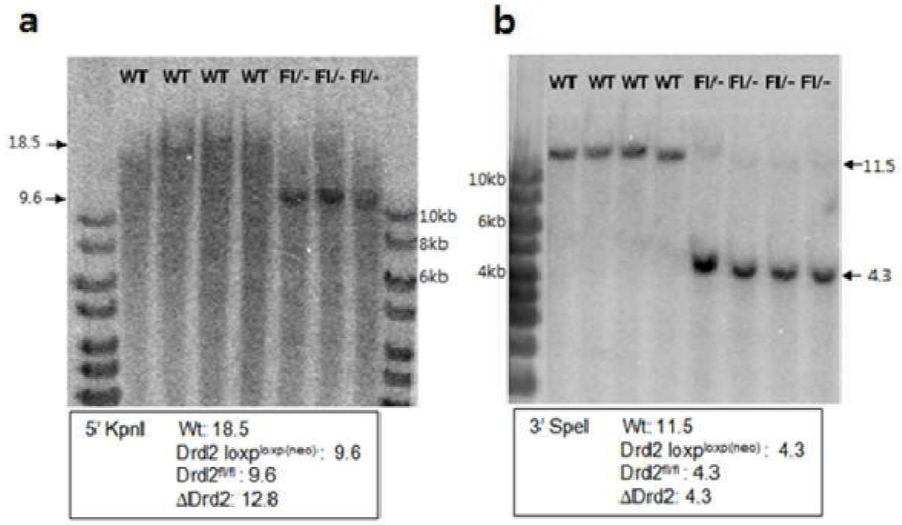
도면16



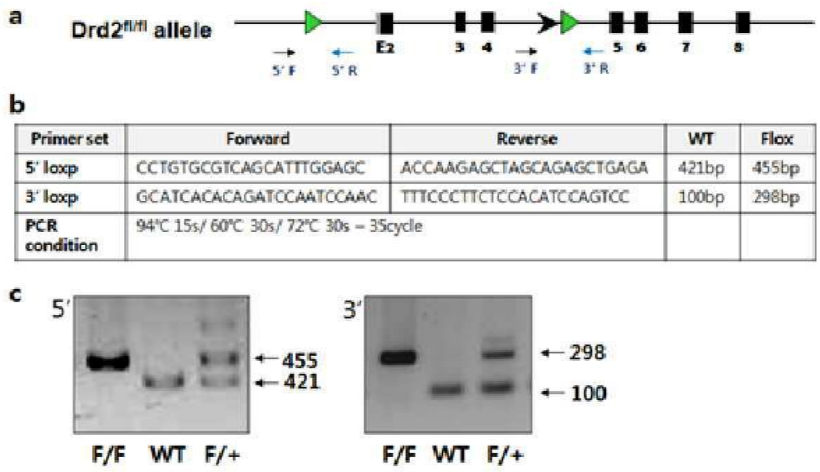
도면17


18.5kb
11.5kb
Drd2 locus
K
Sp
E2
3 4
5 6
7
Sp
8
K
13.4kb
Targeting Vector
2.6kb
3kb
PGK.neor
Sp
E2
3 4
K
Sp
5 6
7.8kb
9.6kb
4.3kb
Targeted allele
PGK.neor
7.3kb
9.6kb
4.3kb
Drd2fl/fl allele
12.8kb
Deleted allele
loxp
Frt
K : KpnI
Sp : SpeI
: Probe

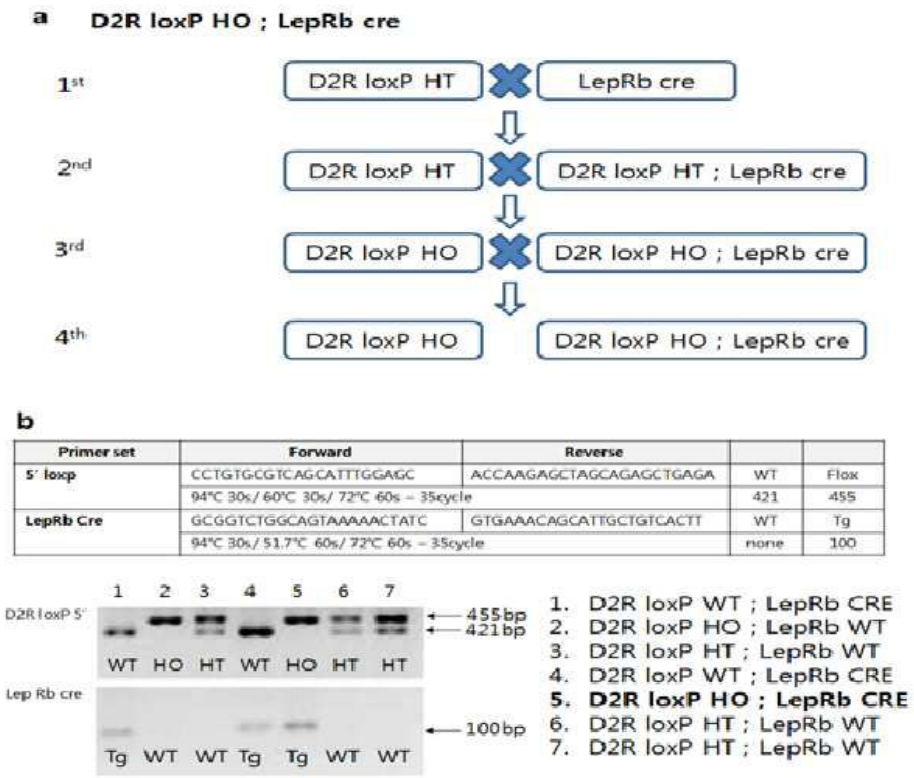
도면18


a
WT WT WT WT Fl/- Fl/- Fl/-
18.5
9.6
10kb
8kb
6kb
5' KpnI
Wt: 18.5
Drd2 loxp(loxp(neo)): 9.6
Drd2fl/fl: 9.6
ΔDrd2: 12.8
b
WT WT WT WT Fl/- Fl/- Fl/- Fl/-
10kb
6kb
4kb
11.5
4.3
3' SpeI
Wt: 11.5
Drd2 loxp(loxp(neo)): 4.3
Drd2fl/fl: 4.3
ΔDrd2: 4.3

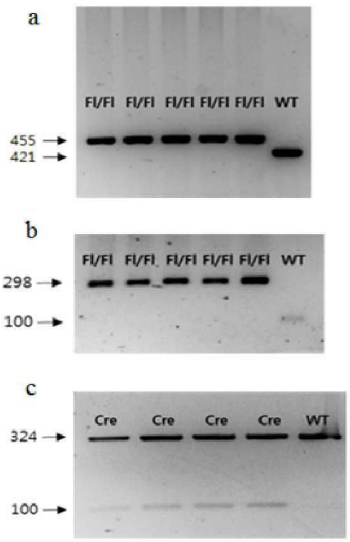
도면19


a
Drd2fl/fl allele
E2
3 4
5 6
7
8
5' F
5' R
3' F
3' R
b
Primer set
Forward
Reverse
WT
Flox
5' loxp
CCTGTGCGTCAGCATTTGGAGC
ACCAAGAGCTAGCAGAGCTGAGA
421bp
455bp
3' loxp
GCATCACACAGATCCAATCCAAC
TTTCCCTTCTCCACATCCAGTCC
100bp
298bp
PCR condition
94°C 15s/ 60°C 30s/ 72°C 30s – 35cycle
c
5'
3'
455
421
298
100
F/F WT F/+
F/F WT F/+

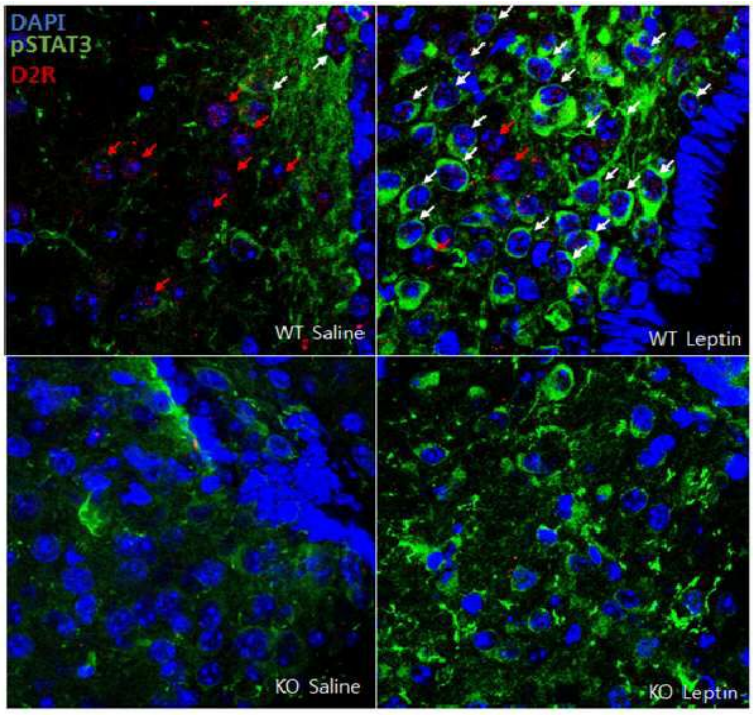
도면20


a
D2R loxP HO ; LepRb cre
1st
D2R loxP HT
LepRb cre
2nd
D2R loxP HT
D2R loxP HT ; LepRb cre
3rd
D2R loxP HO
D2R loxP HO ; LepRb cre
4th
D2R loxP HO
D2R loxP HO ; LepRb cre
b
Primer set
Forward
Reverse
WT
Flox
5' loxp
CCTGTGCGTCAGCATTTGGAGC
ACCAAGAGCTAGCAGAGCTGAGA
94°C 30s/ 60°C 30s/ 72°C 60s – 35cycle
421
455
LepRb Cre
GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC
GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
Tg
94°C 30s/ 51.7°C 60s/ 72°C 60s – 35cycle
none
100
1 2 3 4 5 6 7
D2R loxP 5'
455bp
421bp
WT HO HT WT HO HT HT
Lep Rb cre
100bp
Tg WT WT Tg Tg WT WT
1. D2R loxP WT ; LepRb CRE
2. D2R loxP HO ; LepRb WT
3. D2R loxP HT ; LepRb WT
4. D2R loxP WT ; LepRb CRE
5. D2R loxP HO ; LepRb CRE
6. D2R loxP HT ; LepRb WT
7. D2R loxP HT ; LepRb WT

도면21



도면22



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Neuron-Specific Dopamine D2 Receptor Gene Targeting Mice and Method for Preparing The Same

<130> P15-B197

<160> 25

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1

<400> 1

aagtgattaa taaatgttaa agcatcaaga attaatgaat gctcatttct gtttctacca 60

caagactctg gacacgtgtc ctgcagccca attccgatca t 101

<210> 2

<211

> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2

<400> 2

acataagttt caaaagagct aactcatcca ttctttcatt tgctcaacac actcacatgc 60

acagttagtt aggatagaac tagtggatcc cctcga 96

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3

<400> 3

cctgtgcgtc agcatttgga gc 22

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

P4

<400> 4

accaagagct agcagagctg aga 23

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5

<400> 5

ctgcgctgac agccggaaca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P6

<400> 6

tgggctgacc gcttcctcgt 20

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> P7

<400> 7

gctatacgaa gttattaggt ccctcg 26

<210> 8

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P8

<400> 8

gaggctggag gcatcacaca gatccaatcc aacttagagt tgttccagat tgggcaggag 60

aaaaatatag ggcgaattgg gtaccggg 88

<210> 9

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P9

<400> 9

ccaaatcttc tctttagaca ttttcccttc tccacatcca gtcccaatgt gcctggtggc 60

actcatgcat gccgctctag aactagtgga t 91

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P10

<400> 10

tggactcaac aacacaggca 20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P11

<400> 11

cacacatgtg cagtttgtaa agc 23

<210> 12

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P12

<400> 12

ggtgctagtt acaaccagag ttcaagaagc aggcatttca tcccccagct aagttgggat 60

acataaaatc gcggccgcag gtggcacttt tcggggaaat 100

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P13

<400> 13

cccctctcta ccacctgttc ttacatcaga caagagtcat ggtcctgcaa caccatagtg 60

gtctaagatg acgcgtcagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 100

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P14

<400> 14

tttcgccacc tctgacttga 20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P15

<400> 15

agcttcctat gttccctccc tt 22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P16

<400> 16

tctagatagg cagcttctga gg 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P17

<400> 17

tgatgaacag ggtcacgtcg tc 22

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P18

<400> 18

gcatcacaca gatccaatcc aac 23

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P19

<400> 19

gttggcgcca ctcggtggat gtggaatgtg 30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P20

<400> 20

gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 30

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P21

<400> 21

tttcccttct ccacatccag tcc 23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P22

<400> 22

gcggtctggc agtaaaaact atc 23

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P23

<400> 23

gtgaaacagc attgctgtca ctt 23

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P24

<400> 24

ctaggccaca gaattgaaag atct 24

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P25

<400> 25

gtaggtggaa attctagcat catcc 25