

(11) 공개번호 10-2020-0087536
(43) 공개일자 2020년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/65 (2006.01) *C12N 5/0793* (2010.01)
C12N 9/88 (2006.01) *C12Q 1/02* (2017.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/65 (2013.01)
C12N 5/0619 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0003938

(22) 출원일자 2019년01월11일
심사청구일자 2019년01월11일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자
김윤희
서울특별시 강남구 삼성로51길 37 대치동 래미안
대치팰리스 107동 1301호(대치동, 래미안 대치 팰
리스(1단지))

김효민
경기도 안산시 상록구 석삼말로 231 이동(이동)

김정희
서울특별시 강남구 학동로68길 30 삼성동중앙하이
츠 102동 701호

(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 17 항

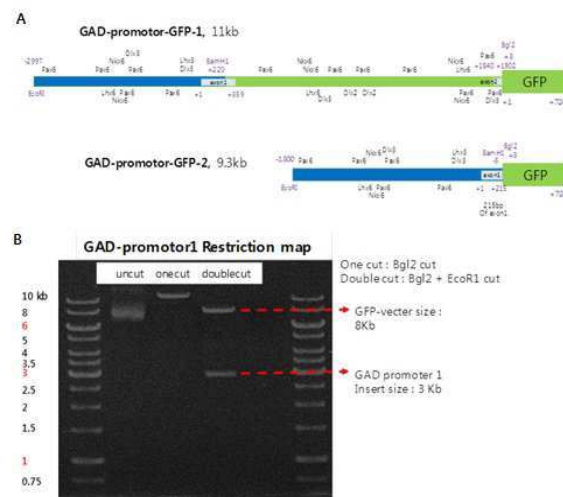
(54) 발명의 명칭 GAD 유전자의 프로모터를 포함하는 가바성 신경세포의 검출용 조성물

(57) 요약

본 발명은 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 프로모터를 포함하는 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 가바성 신경세포의 검출용 조성물, 검출방법, 가바성 신경세포의 제조용 조성물 및 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 GAD 프로모터는 줄기세포에서 가바성 신경세포로의 분화에 필수적이므로, 상기 프로모터는 분화된 가바성 신경세포를 간편하게 검출하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)

C12Q 1/02 (2013.01)

C12Y 401/01015 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9B3061952

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업/바이오·의료기술개발사업

연구과제명 중추신경질환 치료를 위한 미세환경 적중기술 개발 및 실용화

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 (총괄: 가톨릭대학교 의과대학)

연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018M3C7A1056276

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학 원천기술개발사업

연구과제명 뇌장벽 손상에 의한 알츠하이머병 발병 기전 규명 및 신규치료 타겟 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 대구경북과학기술원

연구기간 2018.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 발현을 조절하는 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열은 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 +360 내지 +1902 영역인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 전사인자 결합부위를 포함하는 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 전사인자는 Dlx2(distal-less homeobox 2)인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 리포터 유전자(reporter gene)가 작동가능하게 연결된 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 녹색을 포함하는 형광 단백질(fluorescent protein)인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포는 신경 줄기세포, 신경 전구세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출방법.

청구항 11

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열은 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 +360 내지 +1902 영역인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 조성물은 상기 프로모터에 특이적인 전사인자를 추가로 포함하는 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 전사인자는 Dlx2(distal-less homeobox 2)인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조용 조성물.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항의 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포는 신경 줄기세포, 신경 전구세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 프로모터를 포함하는 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 가바성 신경세포의 검출용 조성물, 검출방법, 가바성 신경세포의 제조용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 가바성 신경세포(GABAergic neurons)는 억제성 신호전달물질인 가바(γ -aminobutyric acid; GABA)를 분비하는 신경세포로서, 다양한 정신질환과 연관되어 있다. 예로서, 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit/hyperactivity disorder; ADHD), 자폐증(autism), 간질(epilepsy), 뇌졸중, 조현병 등이 가바 또는 가바성 신경세포의 결핍에 의해 발병된다고 알려져 있다.

[0004] 상술한 정신질환의 발병원인 및 발병기전은 명확하게 밝혀지지 않은 상태이나, 일부 보고에 의하면 억제성 신경전달물질과 흥분성 신경전달물질의 불균형에 의한 질환으로 보고 있다. 이러한 불균형은 신경발생학적으로 흥분성 신경전달물질을 분비하는 흥분성 신경세포와 억제성 신경세포의 발생 분화의 불균형에 의해 야기되는 것으로서, 실제로 자폐증 환자의 뇌에서는 정상인보다 억제성 신경세포의 수가 적으며, 흥분성 신경세포의 수는 많은 것으로 보고되고 있다.

[0005] 따라서, 상기의 정신질환을 치료하기 위해서는 신호전달체계가 복잡한 흥분성 신경전달물질/흥분성 신경세포를 활용하는 것보다 억제성 신호전달물질/억제성 신경세포를 이용하는 것이 더욱 효율적인 바, 대표적인 억제성 신호전달물질인 가바의 생성을 촉진하거나 또는 억제성 신경세포인 가바성 신경세포의 분화를 촉진하는 것이 하나의 치료방법이 될 수 있음이 보고되었다(Giada Cellot, 2014, Front Pediatr., 2: 70.).

[0006] 구체적으로, 체내에서 분리한 신경 줄기세포, 신경 전구세포, 중간엽 줄기세포 등의 줄기세포를 가바성 신경세포로 분화시킨 뒤, 이를 검출하여 체내에 직접 이식한다면 자폐증, 뇌졸중, 만성 간질, 조현병 또는 만성 통증 등의 질환을 치료할 수 있고, 또한 검출한 가바성 신경세포를 상기 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 약물의 스크리닝에도 이용할 수 있으므로, 가바성 신경세포를 검출하거나 제조하는 방법의 개발이 필요한 실정이었다.

[0007] 이와 관련하여, 녹색형광단백질 발현 유전자를 이용한 줄기세포 선별방법 등이 개발된바 있으나(한국 공개특허 공보 제10-2017-0043709호), 이는 허혈성 질환(ischemic disease)에 관한 것일 뿐, ADHD, 자폐증, 간질, 조현병 또는 만성 통증 등의 치료에 활용될 수 있는 가바성 신경세포의 검출방법은 개발된바 없었다.

[0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 ADHD, 자폐증, 조현병, 간질 등의 정신질환의 치료에 활용될 수 있는 가바성 신경세포의 검출 또는 제조방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, GAD 유전자의 프로모터 및 이에 결합하는 Dlx2 전사인자를 이용하면 신경 줄기세포, 신경 전구세포 또는 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포로 높은 효율로 분화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 분화된 세포들을 간편히 검출할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 가바성 신경세포의 검출방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는, 가바성 신경세포의 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 가바성 신경세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는, 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 검출용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서는, 종래 통상의 GAD 유전자의 프로모터인 -1 내지 -1093을 이용할 때 가바성 신경세포의 검출이 용이하지 않다는 문제점을 인식한 후, 신경 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포가 가바성 신경세포로 분화하는데 필수적으로 작용하는 GAD 유전자의 프로모터 영역을 확인하였는데, 특히 통상의 GAD 유전자의 프로모터에 엑손 1과 엑손 2 사이의 인트론 1 영역인 +360 내지 +1902의 염기서열을 추가로 포함된 프로모터를 이용하면 가바성 신경세포로의 분화를 크게 촉진할 수 있으며 여기에 GFP와 같은 형광단백질을 재조합하면 육안으로 보다 간편하고 효과적으로 관찰 및 검출할 수 있고, 또한 상기 프로모터에 결합하는 전사인자를 사용하는 경우 가바성 신경세포로의 분화를 촉진할 수 있음을 최초로 확인하였다.
- [0018] 따라서, 상기 프로모터를 포함하는 본 발명의 조성물은 가바를 생성하는 가바성 신경세포를 가시적으로 검출할 수 있고, 가바성 신경세포의 분화율, 생존율, 사멸, 재생을 등을 높은 정확도로 간편히 측정할 수 있다. 나아가, 상기 검출된 가바성 신경세포를 통해 다양한 뇌질환의 치료제 및 치료방법 등의 개발에 활용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어, "가바성 신경세포"(GABAergic neurons)는 "가바"로 명명되는 감마아미노부티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)을 분비하는 억제성 신경세포를 의미한다. 상기 가바는 포유류의 뇌 속에만 존재하는 특이한 아미노산 유도체로서, 신경계의 억제성 신경전달물질로 알려져 있으며, 신경정신질환에서 흥분성 신경전달물질에 비해 부족한 것이 병인으로 알려져 있고, 치료를 위하여 널리 사용되는 것으로 보고된다. 억제성 신경전달물질이 적어 문제가 되는 많은 뇌질환의 경우, 혈액뇌장벽(Blood Brain Barrier, BBB)으로 인해 주사로 치료 시 뇌로 흡수되지 않아 직접 뇌 내부로 넣어야 하는 문제점이 있어, GAD 유전자를 직접 주입하여 유전자 치료를 하거나 GAD 유전자를 도입한 세포를 뇌에 주입하는 것이 일반적이다.
- [0021] 본 발명의 용어, "프로모터"는 RNA 중합효소에 대한 결합부위를 포함하고, 프로모터 하류(downstream)에 위치한 유전자의 전사 개시 활성을 갖는, 유전자 암호화 영역의 상류(upstream)에 위치한 비해독된 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 일반적으로, 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 전사인자 결합 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 본 명세서에서, 상기 프로모터는 'GAD 프로모터' 또는 'GAD1 프로모터' 등으로 혼용되어 명명될 수 있다.
- [0022] 구체적으로, 상기 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터로, 보다 구체적으로는 서열번호 2로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 서열번호 1의 염기서열은 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 +360 내지 +1902 영역으로, 이때, 상기 용어 "+360 내지 +1902 영역"은 GAD 유전자의 전사 개시점(transcription start site)의 염기를 +1로 설정하였을 때, 상기 전사 개시점으로부터 하류 방향으로 360번째에 위치하는 염기부터 1902번째에 위치하는 염기까지의 영역을 의미한다. 유전자의 발현을 조절하는 프로모터는 유전자의 전사 개시점으로부터 5' 상류에 위치하는 것이 일반적이나, 본 발명에 따른 GAD 프로모터는 GAD 유전자 개시점으로부터 하류인 첫번째 인트론을 포함하는 것이 특징이다.
- [0024] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, "실질적인 동일성"은 본 발명에서 제공하는 GAD 프로모터와 동일한 기능을 나타내는 한, 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0025] 따라서, 상기 서열번호 1로 표시되는 염기서열 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90%이상의 높은 상동성을 갖

는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

- [0026] 또한, 상기 프로모터는 GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자의 발현을 조절하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 용어, "GAD(Glutamate decarboxylase) 유전자"는 글루타메이트(glutamate)의 탈카복실화를 촉매하는 효소로서, 이를 통해 글루타메이트로부터 신경계의 억제성 신경전달물질인 가바(GABA; γ -aminobutyric acid)를 합성하는 효소이다. 특히, 상기 GAD 유전자는 신경 줄기세포, 신경 전구세포 또는 중간엽 줄기세포가 가바를 분비하는 가바성 신경세포로 분화하는 것을 촉진하는 역할도 수행한다고 알려져 있다. 따라서, 상기 유전자의 발현을 조절하는 본 발명의 프로모터를 이용하는 경우, 분화된 가바성 신경세포를 간편히 검출할 수 있다.
- [0028] 아울러, 상기 프로모터는 전사인자 결합부위, 구체적인 예로 전사인자인 Dlx2(distal-less homeobox 2)에 대한 결합부위를 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 용어, "Dlx2(distal-less homeobox 2)"는 Dlx2 유전자에 의해 코딩되는 단백질로서, 전뇌(forebrain) 및 두개안면(craniofacial)의 발달에 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 상기 Dlx2 단백질의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다(예: GenBank Accession EAX11180.1, NM_004405.3 등). 특히, 상기 Dlx2는 GAD 유전자의 발현을 촉진하는 전사인자로서의 역할도 수행하는바, 본 발명의 목적상, 상기 Dlx2는 상기 프로모터에 결합하여 줄기세포가 가바성 신경세포로 분화하는 것을 촉진하는 것일 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 프로모터는 리포터 유전자(reporter gene)가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어, "리포터 유전자(reporter gene)"는 유전자의 발현 양상 또는 프로모터 활성 등을 확인하기 위해 사용되는 표지 유전자를 의미한다. 주로 형질전환 및 형질주입 어세이, 유전자 발현 어세이, 프로모터 어세이, 이중-하ybrid 스크리닝(two-hybrid screening) 등에 사용된다. 또한, 리포터 유전자는 특정 유전자의 프로모터 서열에 연결되며, 선택 마커로서 쉽게 확인, 측정 또는 검출될 수 있는 특징을 갖는 유전자가 주로 사용된다. 구체적인 예로 β -갈락토시다제(β -galactosidase; LacZ), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(Chloramphenicol acetyltransferase; CAT), 적색 형광 단백질(Red fluorescent protein; RFP), 녹색 형광 단백질(Green fluorescent protein; GFP) 등이 주로 사용되며, 가장 구체적인 예로, 본 발명에 따른 리포터 유전자는 녹색 형광 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 용어, "작동가능하게 연결된"은 하나의 폴리뉴클레오티드 단편이 다른 폴리뉴클레오티드 단편과 결합되면 통상적으로 이들 각각의 기능 또는 발현이 다른 폴리뉴클레오티드 단편의 영향을 받지만, 이들 폴리뉴클레오티드 단편의 여러 가능한 결합 조합 중에서 각 단편이 그 기능을 수행하는데 있어 검출할 만한 영향이 없는 상태의 결합을 의미한다. 작동가능한 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 가바성 신경세포의 분화에 필수적인 GAD 유전자의 프로모터 영역은 인트론 1(intron 1) 내지 엑손 2(exon 2)의 일부(+360 내지 +1902, 약 1.7kb, 서열번호 1)임을 확인하였고(도 1), 상기 서열을 포함하는 프로모터 영역을 이용하면 신경 줄기세포 뿐만 아니라(도 2) 중간엽 줄기세포도 가바성 신경세포로 간편히 분화시킬 수 있음을 확인하였다(도 3). 또한, 중간엽 줄기세포에 상기 프로모터 영역 및 Dlx2 전사인자가 함께 포함되는 경우, 프로모터만 포함하는 경우보다 가바성 신경세포로 분화되는 세포의 수가 더 많음을 확인하였다(도 4). 아울러, 상기 가바성 신경세포의 검출은 상기 프로모터 영역에 연결된 리포터 유전자의 발현 여부 및 발현양을 통해 간편히 검출할 수 있음을 확인하였다(도 1 내지 3).
- [0034] 이는, 상기 서열번호 1을 포함하는 프로모터 및 Dlx2 전사인자를 포함하는 본 발명의 조성물은 가바성 신경세포의 검출 용도로 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0036] 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 가바성 신경세포의 검출방법을 제공한다.
- [0037] 이때, 상기 용어 "가바성 신경세포"와 "조성물"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0038] 본 발명의 목적상, 상기 조성물이 도입되는 세포는 신경 줄기세포, 신경 전구세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다. 일반적으로, 중간엽 줄기세포는 체내에 약 100만 개 정도의 많은 수가 존재하며, 시험관에서는 무한정 증식이 가능함에 따라 임상에서 가장 흔히 사용되는 줄기세포이다. 그

러나, 신경세포로의 분화에 요구되는 인자(factor) 등이 부족하여 이들을 신경세포, 특히 가바성 신경세포로 분화하고자 하는 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이었다. 본 발명에서는, 본 발명의 조성물을 이용하는 경우에는 중간엽 줄기세포 또한 가바성 신경세포로 간편히 분화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 중간엽 줄기세포에서 분화된 가바성 신경세포를 간편히 검출할 수 있음을 확인하였다.

- [0039] 본 발명에서, 상기 가바성 신경세포의 검출방법은 아래의 단계를 추가로 포함할 수 있다:
- [0040] (a) 본 발명의 가바성 신경세포의 검출용 조성물을 조성물이 도입되는 세포에 도입하는 단계;
- [0041] (b) 상기 단계 (a)의 조성물이 도입된 세포를 배양액에서 배양하는 단계; 및
- [0042] (c) 상기 프로모터의 활성이 높은 세포를 선별하는 단계.
- [0043] 구체적으로, 상기 단계 (a)는, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 세포에 도입하는 단계로서, 이는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 일 예로, 상기 프로모터는 벡터에 포함되어 도입될 수 있다.
- [0044] 상기 프로모터를 포함하는 벡터의 세포로의 도입은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 미세 주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980); 및 Harland와 Weintraub, J. Cell Biol. 101:1094-1099(1985)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질도입법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 벡터를 세포 내로 이입시킬 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 단계 (b)는, 상기 단계 (a)의 조성물이 도입된 세포를 배양액에서 배양하는 단계로서, 신경 줄기세포, 신경 전구세포 또는 중간엽 줄기세포 등 본 발명에 이용될 수 있는 세포의 배양에 필요한 배지, 배양일, 배양온도 등의 배양 조건은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 중간엽줄기세포는 골수, 지방, 제대혈, 제대조직, 등에서 유래할 수 있으며, 반드시 이에 제한된 것은 아니다.
- [0047] 마지막으로, 상기 단계 (c)는 본 발명의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하며, 상기 프로모터의 활성이 높은 세포를 선별하는 단계로서, 이는 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 이용하여 수행할 수 있다. 이때, 상기 프로모터의 활성 유무 및 활성 정도는 리포터 유전자의 발현 여부 및 발현량 등에 따라 판단할 수 있다.
- [0048] 구체적으로, 본 발명의 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프로모터는 GAD 유전자의 발현을 조절하므로 상기 프로모터의 활성이 증가하는 것은 GAD 유전자의 발현이 증가하는 것을 시사하고, 상기 GAD 유전자의 발현이 증가하면 가바성 신경세포로의 분화가 촉진되므로 상기 프로모터의 활성이 증가하는 것은 가바성 신경세포로의 분화가 촉진되는 것을 시사하며, 상기 프로모터의 활성이 증가하면 이에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자의 발현량이 증가하므로 상기 리포터 유전자의 발현량이 증가하는 것은 가바성 신경세포로의 분화가 촉진되는 것을 시사한다. 따라서, 본 발명의 가바성 검출용 조성물을 이용하면 가바성 신경세포를 간편히 검출할 수 있다.
- [0049] 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자의 활성 확인은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 구체적으로, 형광현미경, 면역블로팅(Immunoblotting), 형광 활성 세포 분리(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 중합효소연쇄반응 또는 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, GAD 유전자의 +360 내지 +1902 프로모터 영역을 이용하면 신경 줄기세포 뿐만 아니라 중간엽 줄기세포도 가바성 신경세포로 간편히 분화시킬 수 있음을 확인하였고(도 1), 중간엽 줄기세포에 상기 프로모터 영역 및 D1x2 전사인자가 함께 포함되는 경우, 프로모터만 포함하는 경우보다 가바성 신경세포로 분화되는 세포의 수가 더 많음을 확인하였다(도 3). 아울러, 상기 가바성 신경세포의 검출은 상기 프로모터 영역에 연결된 리포터 유전자의 발현 여부 및 발현량을 통해 간편히 검출할 수 있음을 확인하였다(도 1 내지 3).

- [0051] 이는, 상기 프로모터 및 Dlx2 전사인자를 이용하는 본 발명의 방법은 가바성 신경세포의 검출에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0053] 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는, 가바성 신경세포의 제조용 조성물을 제공한다.
- [0054] 이때, 상기 "프로모터" 및 "가바성 신경세포"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0055] 본 발명에서, 가바성 신경세포의 제조용 조성물은 상기 프로모터에 특이적인 전사인자를 추가로 포함하는 것일 수 있고, 이에 제한되지 않지만, 상기 전사인자는 Dlx2(distal-less homeobox 2)일 수 있다.
- [0056] 이때, 상기 "Dlx2(distal-less homeobox 2)"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0057] 상기 Dlx2는 전사인자로서 GAD 유전자의 발현을 촉진하므로, GAD 유전자의 발현 촉진에 의해 달성되는 가바성 신경세포의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, GAD 유전자의 +360 내지 +1902 프로모터 영역을 이용하면 신경 줄기세포 뿐만 아니라 중간엽 줄기세포도 가바성 신경세포로 간편히 분화시킬 수 있음을 확인하였고(도 1 및 2), 중간엽 줄기세포에 상기 프로모터 영역 및 Dlx2 전사인자가 함께 포함되는 경우, 프로모터만 포함하는 경우보다 가바성 신경세포로 분화되는 세포의 수가 더 많음을 확인하였다(도 3). 아울러, 상기 가바성 신경세포의 검출은 상기 프로모터 영역에 연결된 리포터 유전자의 발현 여부 및 발현양을 통해 간편히 검출할 수 있음을 확인하였다(도 1 내지 3).
- [0059] 이는, 상기 프로모터 및 Dlx2 전사인자를 포함하는 본 발명의 조성물은 가바성 신경세포의 제조 용도로 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0061] 또 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 가바성 신경세포의 제조방법을 제공한다.
- [0062] 이때, 상기 "프로모터" 및 "가바성 신경세포"의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0063] 본 발명의 목적상, 상기 세포는 신경 줄기세포, 신경 전구세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0064] 본 발명에서, 상기 가바성 신경세포의 제조방법은 아래의 단계를 추가로 포함할 수 있다:
- [0065] (a) 본 발명의 가바성 신경세포의 제조용 조성물을 세포에 도입하는 단계; 및
- [0066] (b) 상기 단계 (a)의 세포를 배양액에서 배양하는 단계.
- [0067] 구체적으로, 상기 단계 (a)는, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터 및/또는 상기 프로모터에 특이적인 전사인자를 세포에 도입하는 단계로서, 이는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 일 예로, 상기 프로모터는 벡터에 포함되어 도입될 수 있다. 또한, 상기 전사인자는 벡터에 포함되어 도입될 수 있다. 상기 프로모터를 포함하는 벡터의 세포로의 도입은 전술한 바와 같이, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다.
- [0068] 또한, 상기 단계 (b)는, 상기 단계 (a)의 세포를 배양액에서 배양하여 가바성 신경세포로 분화를 촉진하는 단계로서, 신경 줄기세포, 신경 전구세포 또는 중간엽 줄기세포 등 본 발명에 이용될 수 있는 세포의 배양에 필요한 배지, 배양일, 배양온도 등의 배양 조건은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, GAD 유전자의 +360 내지 +1902 프로모터 영역을 이용하면 신경 줄기세포 뿐만 아니라 중간엽 줄기세포도 가바성 신경세포로 간편히 분화시킬 수 있음을 확인하였고(도 1 및 2), 중간엽 줄기세포에 상기 프로모터 영역 및 Dlx2 전사인자가 함께 포함되는 경우, 프로모터만 포함하는 경우보다 가바성 신경세포로 분화되는 세포의 수가 더 많음을 확인하였다(도 3). 아울러, 상기 가바성 신경세포의 검출은 상기 프로모터 영역에 연결된 리포터 유전자의 발현 여부 및 발현양을 통해 간편히 검출할 수 있음을 확인하였다(도 1 내지 3).

[0070] 이는, 상기 프로모터 및 Dlx2 전사인자를 이용하는 본 발명의 방법은 가바성 신경세포의 제조에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에 따른 GAD 프로모터는 줄기세포에서 가바성 신경세포(GABAergic neurons)의 분화에 필수적이므로, 상기 프로모터는 분화된 가바성 신경세포를 간편하게 검출하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1의 A는 GAD1(glutamic acid decarboxylase 1) 프로모터에 리포터 유전자인 GFP(Green fluorescent protein)가 결합된 폴리뉴클레오티드 구성체를 보여주는 이미지이다. 구성체 1(GAD promoter-GFP-1 construct)은 GAD1 프로모터 영역이 포함된 것이고, 구성체 2(GAD promoter-GFP-2 construct)는 GAD1 프로모터 영역에서 인트론 1(intron 1) 내지 엑손 2(exon 2)의 일부(+360 내지 +1902, 약 1.7kb) 영역이 결합된 통상의 GAD1 프로모터를 나타낸 것이다. 도 1의 B는 구성체 1의 구조를 증명하는 제한효소 지도이다.

도 2는 상기 구성체 1을 포함하는 형질전환된 줄기세포(MSC-GAD promoter)의 분화 여부에 따른 GFP 발현 정도를 보여주는 이미지 및 그래프로, A 내지 D는 신경줄기세포, E는 중간엽 줄기세포에 관한 것이다. 이미지에서 초록색은 GFP, 파란색은 DAPI를 나타내며, 그래프의 값은 DAPI 발현 세포의 수에 대한 GFP 발현 세포의 수로 나타내었다.

도 3은 상기 구성체 1(MSC-GAD promoter); 또는 상기 구성체 1 및 Dlx2(distal-less homeobox 2) 전사인자의 발현 구성체를 포함하는 형질전환된 중간엽 줄기세포(MSC-Dlx2/GAD promoter)의 분화 여부에 따른 GFP 발현 정도를 보여주는 이미지 및 그래프이다. 증식 또는 분화 시 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)를 포함하는 배지를 이용하였다. 이미지에서 초록색은 GFP, 파란색은 DAPI를 나타내며, 그래프의 값은 DAPI 발현 세포의 수에 대한 GFP 발현 세포의 수로 나타내었다.

도 4는 Dlx2를 발현하는 야생형 구성체(Dlx2 WT); 또는 Dlx2를 발현하지 않는 돌연변이 구성체에 관한 것으로, A는 상기 구성체들의 구성, B는 상기 구성체들의 단백질 크기를 보여주는 이미지이다. Dlx2 1-1은 호메오도메인(homeodomain)이 결합된 구성체, Dlx2 1-2는 C-말단(C-terminus)이 결합된 구성체, Dlx2 2-1은 N-말단의 DLL_N 도메인(N-terminal DLL_N domain)이 결합된 구성체이다.

도 5는 상기 구성체들을 포함하는 분화되지 않은 중간엽 줄기세포에서의 GAD 유전자(GAD65/67)의 단백질 발현양을 보여주는 이미지 및 그래프이다. p.IRES-hr-GFP II는 상기 구성체 1만 포함하는 중간엽 줄기세포, p.IRES-TF wt는 상기 구성체 1 및 Dlx2 WT를 포함하는 중간엽 줄기세포 및 p.IRES-TF mt는 상기 구성체 1 및 Dlx2 mutant(1-1, 1-2 또는 2-1)를 포함하는 중간엽 줄기세포에 관한 것이다. 액틴(actin)은 로딩 대조군(loading control)으로 사용하였고, 그래프의 값은 액틴 발현양에 대한 GAD65/67 발현양으로 나타내었다.

도 6은 상기 구성체들을 포함하는 분화된 중간엽 줄기세포에서의 GAD 유전자(GAD65/67)의 단백질 발현양을 보여주는 이미지 및 그래프이다. proliferation은 분화되지 않은 상기 구성체 1 및 Dlx2 WT를 포함하는 중간엽 줄기세포, p.IRES-hr-GFP II는 분화된 상기 구성체 1만 포함하는 중간엽 줄기세포, p.IRES-TF WT는 분화된 상기 구성체 1 및 Dlx2 WT를 포함하는 중간엽 줄기세포, 및 p.IRES-TF mt는 분화된 상기 구성체 1 및 Dlx2 mutant 2-1을 포함하는 중간엽 줄기세포에 관한 것이다. 액틴은 로딩 대조군으로 사용하였고, 그래프의 값은 액틴 발현양에 대한 GAD65/67 발현양으로 나타내었다.

도 7은 상기 구성체들을 포함하는 분화된 중간엽 줄기세포에서의 소낭성 가바 수용체(vesicular GABA transporter)의 단백질 발현양을 보여주는 이미지 및 그래프이다. 액틴은 로딩 대조군으로 사용하였고, 그래프의 값은 액틴 발현양에 대한 vesicular GABA transporter 발현양으로 나타내었다.

도 8은 상기 구성체들을 포함하는 분화된 중간엽 줄기세포에서의 NeuN(Hexaribonucleotide Binding Protein-3)의 단백질 발현양을 보여주는 이미지 및 그래프이다. 액틴은 로딩 대조군으로 사용하였고, 그래프의 값은 액틴 발현양에 대한 NeuN 발현양으로 나타내었다.

도 9는 상기 구성체들을 포함하는 분화된 중간엽 줄기세포에서의 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)의 단

백질 발현양을 보여주는 이미지 및 그래프이다. 액틴은 로딩 대조군으로 사용하였고, 그래프의 값은 액틴 발현 양에 대한 GFAP 발현양으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0075] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0077] **실시예 1. 가바성 신경세포의 분화에 필수적인 GAD1 프로모터 영역의 규명**
- [0078] 가바성 신경세포를 시각적으로 검출하는 방법을 개발하기 위하여, GABA(gamma-aminobutyric acid) 합성효소인 GAD1(Glutamate decarboxylase 1) 유전자의 프로모터와 리포터 유전자(reporter gene)를 이용하였다.
- [0079] 구체적으로, 도 1에 나타낸 바와 같이, GAD1 프로모터에 리포터 유전자로서 GFP(Green fluorescent protein)를 결합한 구성체 1(GAD-promoter-GFP-1); 또는 GAD1 프로모터 영역에서 인트론 1(intron 1) 내지 엑손 2(exon 2)의 일부(+360 내지 +1902, 약 1.7kb) 영역이 결실된 프로모터에 GFP를 결합한 구성체 2(GAD promoter를 제작하였다. 도 1b는 구성체 1의 구조를 증명하는 제한효소 지도로서 벡터 크기가 8Kb이고 GAD 프로모터 크기가 3 Kb임을 보여준다.
- [0080] 이후, 상기 구성체를 신경줄기세포와 중간엽줄기세포에 도입하고 형질전환된 세포를 분화 배지를 이용하여 신경 세포로 분화시켰다. 먼저, 신경줄기세포는 증식 조건으로서 FBS를 포함하지 않는 배지에 FGF를 첨가하여 배양하였고, 분화 조건으로서 bFGF를 제거한 분화 배지를 사용하여 배양하였다. 보다 구체적으로, 상기 신경줄기세포를 흰쥐 배아 (E16) 뇌에서 해마 흔적부위를 얻어 단일 세포로 해체하고, N2 chemically defined media (DMEM/nutrient mixture F12, 1.55ug/ml D+ glucose, 100ug/ml transferrin, 20nM progesterone, 30nM selenium salt, 100uM putrescine, 0.5mM glutamine, 25ug/ml insulin)에 FGF(10ng/ml)를 넣고 섭씨 37℃, 5% CO₂에서 증식시킨 후 상기 구성체를 transfection한 1일 후부터 FGF를 넣지 않은 분화 조건에서 3일 또는 5일 배양하였다. DNA transfection 실험을 위해 항생제는 전혀 사용하지 않았다. 3일간 분화시킨 후에 성숙한 신경 세포의 핵에서 발현하는 NeuN 표지자를 항체를 이용하여 형광염색했을 때 도 2의 A와 B에서 보듯이 전체 세포수의 약 11% 정도였으나 상기 구조체 1을 도입한 신경세포에서 GAD-GFP의 발현은 전체 세포수의 약 18% 정도였으며, 신경줄기세포는 분화하여 신경세포로의 분화를 결정한 후에 가바성 신경세포로 성숙할 수 있으므로, 이는 GAD promoter 조절하에 GFP 형광 발현이 1차 NeuN 항체 이용 시보다 검출에 더 민감함을 보여준다. 분화 5일 후에는 NeuN 표지자를 발현하는 신경세포는 약 56%까지 증가했으나 GAD-GFP를 발현하는 가바성 신경세포의 숫자는 분화 3일과 유사한 반면 도 2의 A 내지 D에서 보듯이 세포가 돌기를 여러 개 갖는 interneuron, 즉 가바성 신경 세포의 형태로 분화했음을 볼 수 있다. 이는 알려진 대로 다른 종류의 신경세포보다 가바성 세포의 분화가 초기에 성숙됨을 보여준다. 도 2의 C와 D는 신경줄기세포 배양에서 NeuN과 GAD 표지자 발현이 증가할 때 vesicular GABA transporter(Vgat) 발현도 증가하며 이는 GAD-GFP 발현이 가바성 신경세포로의 분화를 보여줌을 확인하는 것이다. Vgat은 가바 합성효소 GAD가 세포질에서 만든 가바 신경전달물질을 시냅스 소포(synaptic vesicles)로 전달하여 가바를 분비할 수 있게 소포 내에 농축해주는 효소이므로 GAD65/67과 함께 Vgat 발현의 증가는 가바성 신경세포의 성숙에 필수적이다.
- [0081] 상기 구성체 1을 구성체 2로 바꾸어 신경줄기세포에 도입하고 분화시킨 경우는 신경세포가 Dlx2를 발현함에도 불구하고 GAD-GFP를 발현하지 않았으며 (vector control/GAD-GFP 2), 신경줄기세포에 Dlx2 DNA를 도입하여 Dlx2를 더 많이 발현한 경우 (Dlx2 wt/ GAD-GFP 2) 매우 소수의 세포에서 GFP를 발현함을 관찰하였다. 이 때 분화한 신경세포들이 GAD를 발현하는지 보기위해 분화한 신경세포를 GAD65/67 항체를 이용하여 형광염색한 결과 (red) GFP를 발현하지 않는 세포들이 GAD65/67 GAD 합성효소를 발현함을 알수 있었다. Dlx2 wt을 도입한 경우에는 GAD65/67 발현 강도가 더 높았으나 GAD-GFP를 발현하는 세포 숫자는 매우 희귀하였다.
- [0082] 또한 상기 구성체 1과 구성체 2를 지방 유래 중간엽 줄기세포에 도입하고, 형질전환된 세포를 분화 배지를 이용하여 신경세포로 분화시켰다. 이때, 중간엽 줄기세포들의 증식 조건으로서 10% FBS를 포함하는 배지를 사용하여 배양하였고, bFGF를 포함하는 N2 배지를 음성 대조군으로 사용하였고, 분화 조건으로서 중간엽줄기세포 분화 배지를 사용하여 배양하였다. 보다 구체적으로, 상기 지방 유래 중간엽줄기세포를 고농도 글루코스 -α-MEM에 10% FBS를 첨가하고 섭씨 37℃, 5% CO₂에서 증식상태를 유지하였다. 신경세포로의 분화를 위해서는 먼저 신경줄기세포는 N2 배지에 FGF를 넣어 증식 배양하므로 같은 조건으로 N2 chemically defined media에 FGF(10ng/ml)를 넣

고 음성대조군을 배양하고, MSC를 신경세포로 분화시킬 때는 N2 배지에 FGF(10ng/ml)를 넣지 않고 30uM Forskolin을 첨가하여 가바성 신경분화를 유도하였다. 또한, DNA transfection 실험을 위해 항생제는 전혀 사용하지 않았다.

[0083] 그 결과, 구성체 1을 포함하는 분화된 줄기세포는 증식배지와 FGF 첨가배지에서는 GFP를 발현하는 세포가 5% 미만이나, 분화배지에서 신경 유사 세포로 분화시키는 조건에서는 GAD-GFP를 발현하는 세포가 약 25% 정도로 많이 관찰되었다 (도 3a와 3b). 그러나, 같은 조건의 배지에서 구성체 2를 포함하는 분화된 줄기세포는 GFP를 발현하는 세포가 거의 발견되지 않는 것을 확인하였으며, 상기 GAD1 프로모터 영역(+360 내지 +1902)은 가바성 신경세포의 분화에 중요한 역할을 한다고 알려진 Dlx2(distal-less homeobox 2) 전사인자가 실제로 결합하는 부위임을 확인하였다 (도 1 참조). 이에 Dlx2 wild type gene을 포함하는 lentiviral vector를 GAD-promoter 1과 함께 중간엽줄기세포에 도입한 결과 GFP를 발현하는 가바성 신경세포 숫자가 크게 더 증가하지는 않았으나 GFP 발현 강도가 훨씬 강해진 것을 확인하였다 (도 3).

[0084] 상기 결과를 통해, GAD1 프로모터 중에서도 +360 내지 +1902 영역(서열번호 1)이 가바성 신경세포로의 분화에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었고, 상기 영역 및 이에 연결된 리포터 유전자를 이용하면 가바성 신경세포를 시각적으로 간편히 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0085] 또한, 도 2에서 볼 수 있듯이, 구성체 1을 포함하는 경우에는 신경 줄기세포뿐만 아니라 중간엽 줄기세포도 GFP를 발현함을 확인하였다. 또한, 상기 중간엽 줄기세포가 분화하지 않은 줄기세포 집단보다 분화된 줄기세포 집단에서 GFP를 발현하는 세포의 수가 약 4배 이상 (20% 이상) 증가함을 확인하였다.

[0086] 상기 결과를 통해, 상기 프로모터 영역을 이용하면 임상에서 주로 사용하는 줄기세포 종류인 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포로 분화시킬 수 있음을 알 수 있었고, 또한 분화된 가바성 신경세포를 시각적으로 간편히 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0088] 실시예 2. GAD1 프로모터를 이용한 중간엽줄기세포의 가바성 세포로의 분화 촉진 방법 개발

[0089] 상기 실시예 1을 통해 가바성 신경세포로의 분화에 중요한 프로모터 서열 및 이에 결합하는 전사인자를 규명함에 따라, 이들을 이용하여 가바성 세포로의 분화를 촉진할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

[0090] 먼저, GAD1 프로모터의 발현 구성체 1을 포함하는 형질전환된 중간엽 줄기세포에 Dlx2 전사인자의 발현 구성체를 도입하였다. 이후, 상기 구성체들을 모두 포함하는 줄기세포를 신경세포로 분화시켰다. 이때, 상기 줄기세포의 증식 조건으로서 뇌신경 생장인자인 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)를 포함하는 N2 배지를 사용하여 배양하였고, 분화 조건으로서 BDNF를 포함하거나 포함하지 않는 분화 배지를 사용하여 배양하였다.

[0091] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있듯이, 분화하지 않은 중간엽 줄기세포 집단보다 분화된 중간엽 줄기세포 집단에서 GFP를 발현하는 세포의 수가 더 많으며, 또한 분화된 중간엽 줄기세포의 경우에는 GAD1 프로모터만 포함하는 줄기세포 집단보다 GAD1 프로모터와 Dlx2를 함께 포함하고 있는 줄기세포 집단에서 GFP를 발현하는 세포의 수가 더 많음을 확인하였다.

[0092] 상기 결과를 통해, 본 발명자가 개발한 신경분화 배지(N2 배지에 Forskolin, BDNF 첨가)에 Dlx2 전사인자를 이용하면 더 많은 수의 중간엽 줄기세포를 가바성 신경세포로 분화시킬 수 있음을 알 수 있었고, 또한 분화된 가바성 신경세포를 시각적으로 간편히 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0094] 실시예 3. 가바성 신경세포의 분화에 대한 GAD1 프로모터 및 Dlx2 전사인자의 역할 규명

[0095] 상기 실시예 2를 통해 GAD1 프로모터 및 이에 결합하는 Dlx2 전사인자를 이용하면 가바성 세포로의 분화를 촉진할 수 있음을 확인함에 따라, Dlx2 전사인자의 역할을 규명하고자 하였다.

[0096] 먼저, 도 4에 나타난 바와 같이, Dlx2를 발현하지 않는 돌연변이 구성체를 제조하였다. 구체적으로, Dlx2 야생형(WT)에 비교하였을 때, 호메오도메인(homeodomain)이 결실된 돌연변이 구성체(Dlx2 1-1), C-말단(C-terminus)이 결실된 돌연변이 구성체(Dlx2 1-2), N-말단의 DLL_N 도메인(N-terminal DLL_N domain)이 결실된 돌연변이 구성체(Dlx2 2-1)를 제조하였고, 이들은 단백질의 크기에 따라 구별이 가능함을 확인하였다(도 4).

[0097] 또한, 중간엽 줄기세포에 Dlx2 야생형 또는 돌연변이 구성체를 각각 도입한 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, Dlx2

야생형 구성체를 포함하는 중간엽 줄기세포의 경우에는 가바성 신경세포의 표지자인 GAD의 발현양이 증가하지만, Dlx2 돌연변이 구성체를 포함하는 경우에는 GAD의 발현양이 현저하게 감소함을 확인하였다.

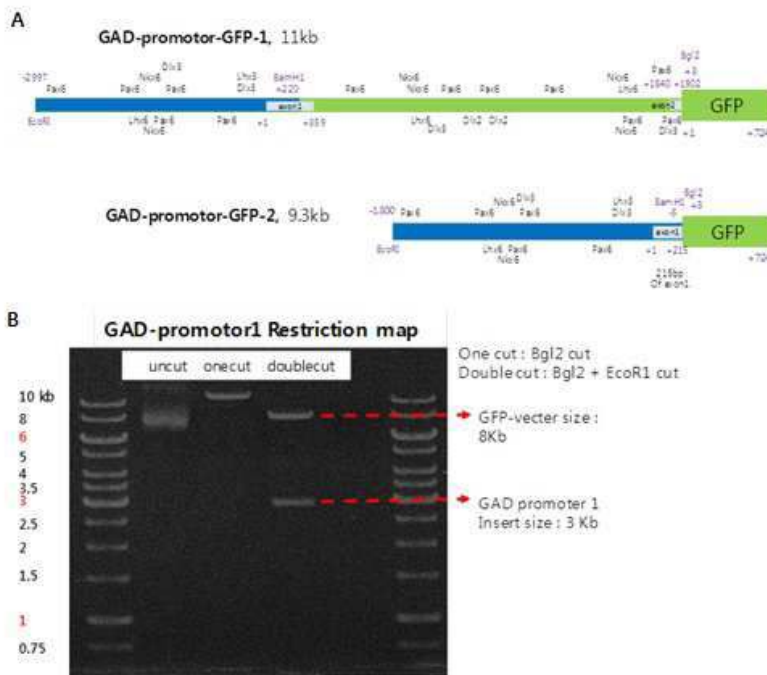
[0098] 아울러, 상기 구성체들을 포함하는 형질전환된 중간엽 줄기세포를 분화시킨 결과, Dlx2 야생형 구성체를 포함하는 경우에는 Dlx2 돌연변이 구성체를 포함하는 경우보다 가바성 신경세포 표지자인 GAD 및 소낭성 가바 수용체 (vesicular GABA transporter)의 발현이 증가하며(도 6 및 7), 신경세포 표지자인 NeuN(Hexaribonucleotide Binding Protein-3)의 발현도 증가함을 확인하였다(도 8). 반면에, 정상세포(astrocytes) 표지자인 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)의 발현은 증가함을 확인하였다(도 9).

[0099] 상기 결과를 통해, 상기 프로모터 영역에 결합하는 Dlx2 전사인자는 중간엽 줄기세포를 신경세포 중에서도 가바성 신경세포로 분화시키는데 필수적인 요소임을 알 수 있었다.

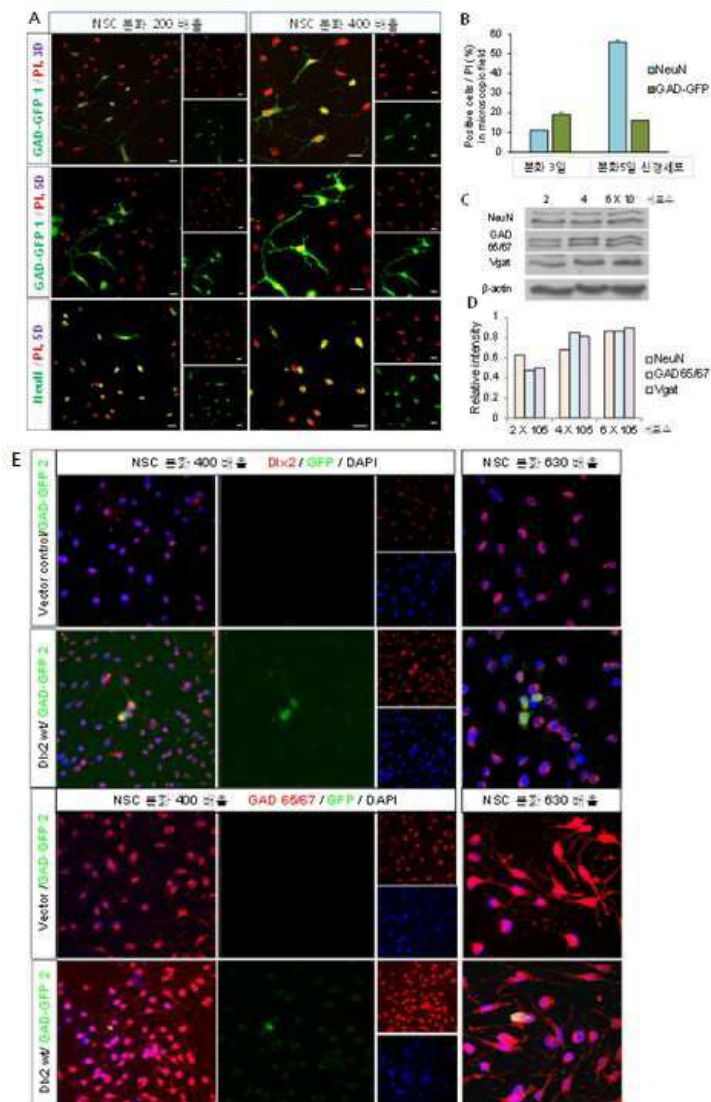
[0101] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변경된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

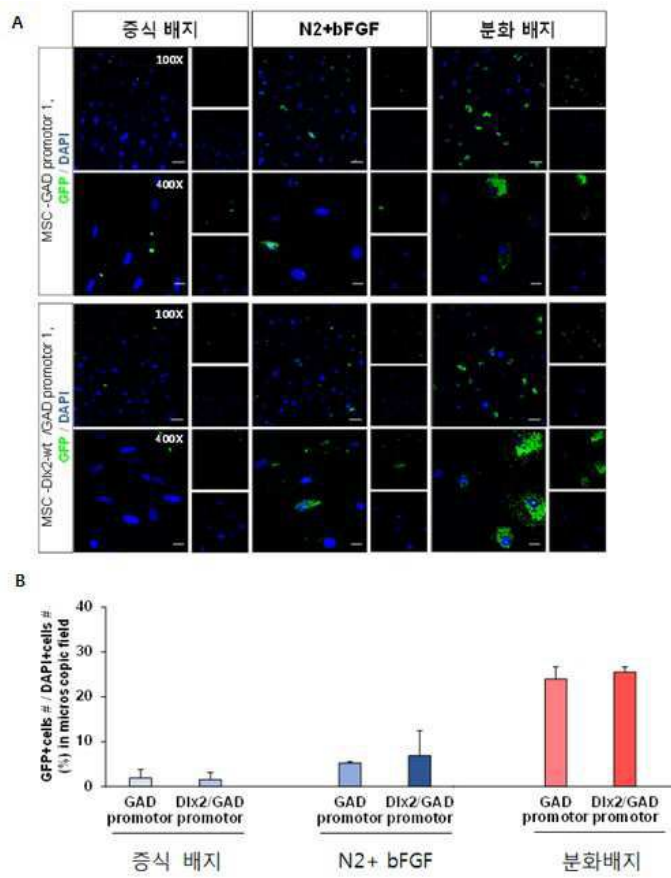
도면1



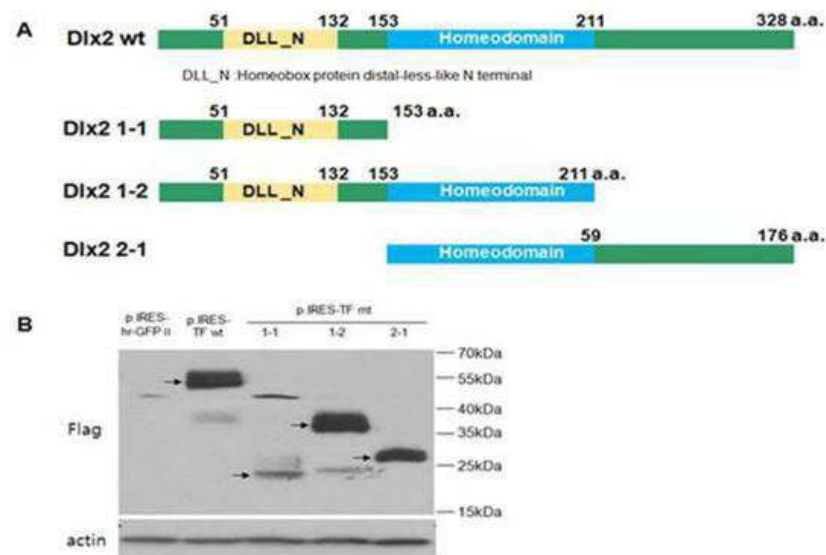
도면2



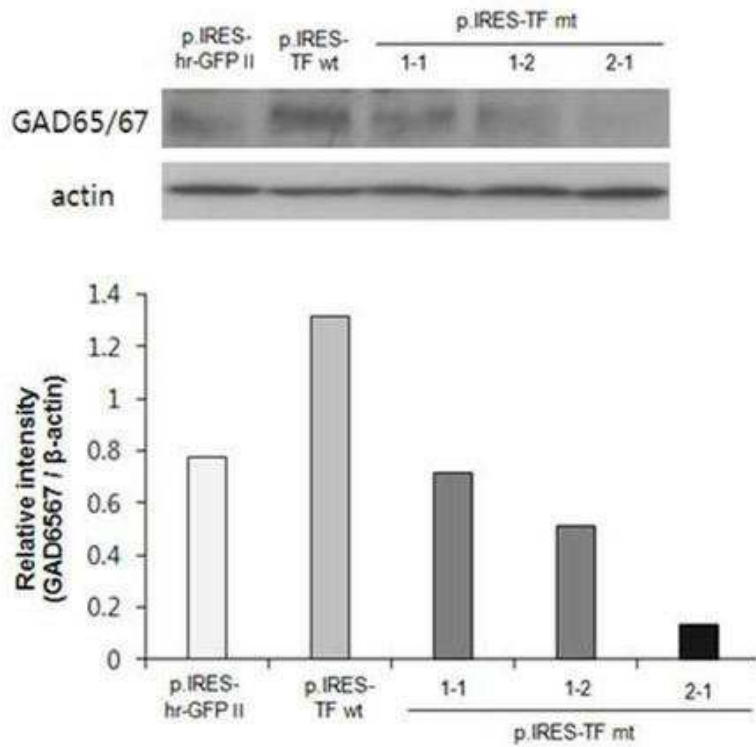
도면3



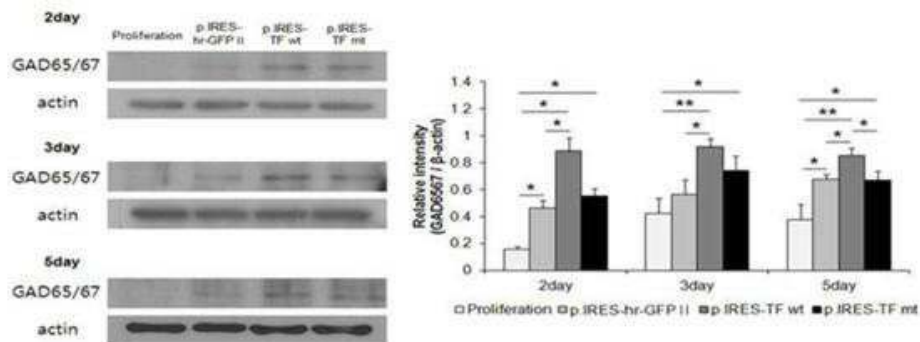
도면4



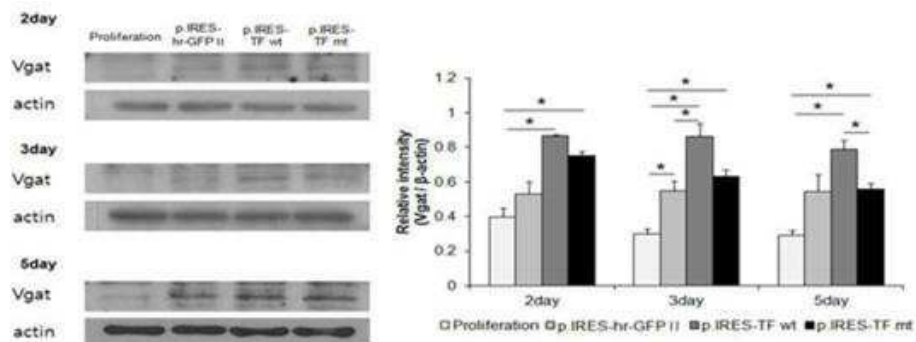
도면5



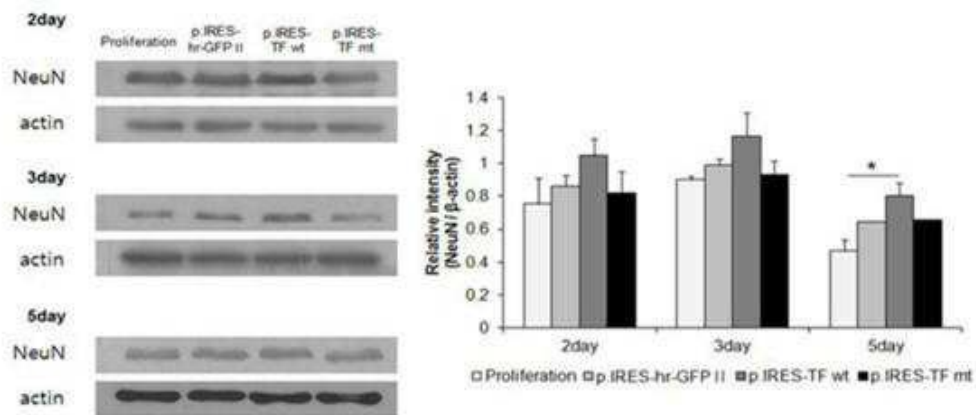
도면6



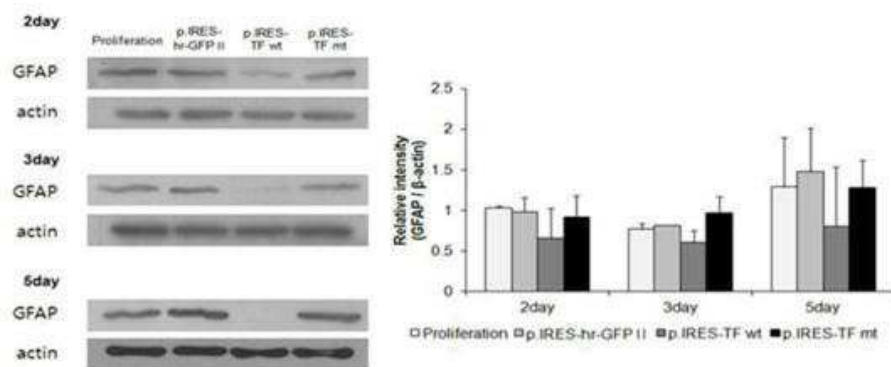
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A composition comprising promoter of GAD gene for detecting
GABAergic neurons

<130> KPA170228-KR

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1543

<212> DNA

<213> human GAD1 gene +360 to +1902

<400> 1

gtgggtaagc tagcgaccac ctggacttcc cagcgcccaa ccgtggcttt tcagccaggt 60

ccctctctcc cgcggttct caaccaacc catcccagcg ccggccaccc aacctccga 120

aatgagtgtc tctgcccgc cctagtcctt gctctccag ggtgcgtgc gcagggaccc 180

ccccccccc gcctccctcg tcactcttct tatccctgcc ctccggattc acgccccggg	240
gaagcacgga ggctgaggt ctagttgaag tggggcaaga gcgattttcc cttagacttc	300
catgctgcga ggcctgtcc ctccaaaggg cgcttggca gcagcagccg aaggcgtac	360
taggaacggt aacctgttac tttccaggg gccgtagtcg acccgctgcc cgagttgctg	420
tgcgactgcg cgcgcggggc taggagttag gtcggaggga ggggtggag gcgatggccg	480
gtgggccctt ctctgtggg tctctgatct acccagatta gcccgaatc tctctgtccc	540
ggggccttcg ggcgccatcg cgccagcgcc gagagtcgag caggggcgcc gcgcaagatc	600
tttgtccgc gcctctgcg cgctgcgcgc aagtctgtt ccccggtgac gttcccatg	660
cttacttacc ccacctctc tggatctgia ccgcgagaaa tctggggtcc tcagggggt	720
aggtagagga gaaacgctga aaccggaccg aaacctgcc ctaggcttag cgatggctaa	780
aaaccgctg ggataagagg gaggaagca acattccgac tcgtctgtt ctggctgtct	840
ggagtgaag gtgactgtg tttctctctg gccaaagtcg agggagaacg taaagatatg	900
ggccttttt cccctctcac ctgtctcac caaagtcct agtccccga gcagttagcc	960
tctttcttc caggaatta gccagacaca acaacgggaa ccagacaccg aaccagacat	1020
gcccccccc tgccctcc ccccgctggc ccacacccg gctgctgagt gccaatggg	1080
gctttagcgc gctcggtgg aaaatcgctc actgagcgt cccctgtgct cctagcctag	1140
tccccacac cttgctct tgtaactggc ttggacccc acccgaccc cgacccgcc	1200
tcgtctcggc gcttcaatc aggtcgcgc gatgcaccgc cagactcgag agcggcccag	1260
ggctacgctc cctgcgccc agtaccggag ctagecgcga cgtctctcc gctgccccca	1320
cccctgcga cccctaccg gcaggctcgc tgcctttcct cctcttctc tctccagagc	1380
cggatcttca aggggagcct ccgtgcccc ggctgctcag tccctccgt gtgcaggacc	1440
ccggaagtc tccccgaca gctctcgtt ctctttgcag cctgtttctg cggcgacca	1500
gtcaggact ctggacagta gaggccccg gacgaccgag ctg	1543
<210> 2	
<211> 2996	
<212> DNA	
<213> human GAD1 gene -1093 to +1902	
<400> 2	
gcataaataa cccctgcgtg ctgcaccacc tggggagagg gggaggacca cggtaatac	60
cagtaaagga atcactgcct acacggtgtc acccagacac gcacagacat caacattttt	120
gccctaaaga aaaaaactgg gggagaagaa aggggagaaac ttaaactagt gacaggcg	180

tgagggaagg catgaagagg caagccggcg cgtaacctgc tggccagcag ctccaggtgt	240
gggctccgct cgggcgctgg cggagagacc cgggagcgca gggcctctcc gtctctgggc	300
tcttggcgcc ctctggtggg aatttctctt tcaacgcatt ttacggcga ggggcttctc	360
ccaacgcagc ggttctttta actacgccia aatattgcaa agggagaatc cttaaagcgc	420
gtgaaatcga agggggagcg ggccagggca aggggggctg gtccgccct tccgggcacc	480
tctgtgctcg ggtgccccat gcgcgtgcag cggcgctcgt gcgtgtcatc aaccttcaaa	540
cgtgattaat caggaggcct tcttttccca tcaccaaggg ggccaaagcg aggagcgagc	600
gcatagcaaa agggacgcgg ggtccttttc tctgccgtg gcactgggta gctgtggcca	660
ggtgtggtac ttgatgggg cccagggcctg gatgaggaaa ctgtaattcc tccatggtct	720
aagaggtctc cctcatttc tgcctccttt gcggttacia caatcccagc tccgtagaga	780
gccaacgagg acacgaccca aagcgcgtt tcgctcaagg aagcgtcgca gggtcacaga	840
tctgggggaa ccccggggaa aagcactgag gcaaaaccgc cgctcgtctc ctacaatata	900
tgggaggggg aggggaaatg ggagagggga aaggagggga gggaagaaga aacgctcaga	960
aaggcagaat tcttcgtagg aattatcttt tccctcctct caccgcagag cctgcctatt	1020
tccaaaggaa aaaaaaaaa cgtgttgagt acgttctgga ttactcataa gacctttttt	1080
ttttccttcc gggcgcaaaa ccgtgagctg gatattataat cgcctataa agctccagag	1140
gcggtcaggc acctgcagag gagccccgcc gctccgccga ctagctgccc ccgcgagcaa	1200
cggcctcgtg atttccccgc cgatccggtc cccgcctccc cactctgccc ccgcctacce	1260
cggagccgtg cagccgcctc tccgaatctc tctcttctcc tggcgctcgc gtgggatccg	1320
gaactagcga gaacgaggaa gcagctggag gtgacgccgg gcagattacg cctgtcaggg	1380
ccgagccgag cggatcgctg ggcgctgtgc agaggaaagg cgggagtgcc cggctcgctg	1440
tcgcagagcc gaggtgggta agctagcgac cacctggact tcccagcgcc caaccgtggc	1500
ttttcagcca ggtcctctcc tcccgcggct tctcaaccaa ccccatcca gcgcgggcca	1560
cccaacctcc cgaatgagt gcttctctcc cgccttagtc cctgctctcc acgggtgcgc	1620
tgcgcaggga ccccccccc cccgcctccc tcgtcactct tcttatecct gccctccgga	1680
ttcaccccc ggggaagcac ggagctgag gctctagtgt aagtggggca agagcgattt	1740
tcccttgagc ttccatgctg cgagcgctg tccctccaaa gggcgcttg gcagcagcag	1800
ccgaaggcgc tactaggaac ggtaacctgt tacttttcca ggggccgtag tcgaccgct	1860
gcccagttg ctgtgcgact gcgcgcgcgg ggctaggagt gaggtcggag ggagggtgtg	1920

gaggcgatgg ccggtgggcc cttctctgtg gggctctcga tctaccaga ttagcccgca	1980
atctctctgt cccggggcct tccggcgcca tccgcccagc gccgagagtc gaggaggggc	2040
gccgcgcaag atctttgtcc gccgcctcct gcgcgctgcg cgcaagtctg tttccccgt	2100
gacgttcccc atgcttactt accccaccct cttcggatct gtaccgcgag aaatctgggg	2160
tcctcagggg gctaggtaga ggagaaacgc tgaaccgga ccgaaacctc gccctaggct	2220
tagcgatggc taaaaaccgg ctgggataag agggaggcaa gcaacattcc gactcgtgc	2280
tttctggctg tctggagtgc aaggtagctg tggttcttct ctggccaagt ccgagggaga	2340
acgtaaagat atgggccttt tccccctct cacttctct caccaaagtc cctagtcctc	2400
ggagcagtta gcctctttct tccaggga ttagccagac acaacaacgg gaaccagaca	2460
ccgaaccaga catgcccgc ccgtgcgcc tcccccgct ggccacacg ccggctgctg	2520
agtgcctaat ggggcttcta gcggctcgcc tggaaaatcg ctactgagc gctccccgt	2580
gtctctagcc tagtccccca cacccttgcg tcttgtactg gccttgacc cccacccga	2640
ccccgaccc gcctcgtctc ggcgttcac tccaggtcgc gccgatgcac gccagactc	2700
gagagcgcc cagggtacg ctccctgcgc ccagtagcg gagctagcg gcacgtctcc	2760
tccgtgccc ccaccctgc gcaccctac caggcaggct cgctgccttt cctccctctt	2820
gtctctccag agccgatct tcaaggggag cctccgtgcc cccggctgct cagtcctcc	2880
ggtgtcagg accccggaag tcctccccgc acagctctcg cttctctttg cagcctgttt	2940
ctgcgccga ccagtcagg actctggaca gtagagggcc cgggacgacc gagctg	2996
<210> 3	
<211> 1309	
<212> DNA	
<213> human GAD1 gene -1093 to +215	
<400> 3	
gcataataa cccctgcgtg ctgcaccacc tggggagagg gggaggacca cggtaaatac	60
cagtaaagga atcactgcct acacggtgtc acccagacac gcacagacat caacattttt	120
gccctaaaga aaaaaactgg gggagaagaa aggggagaac ttaaactagt gacagggcgg	180
tgagggaagg catgaagagg caagccggcg cgtaaccgtc tggccagcag ctccaggtgt	240
gggctccgt cgggcgctgg cggagagacc cgggagcgca gggcctctcc gtctctgggc	300
tcttgccgc cttcgttggg aatttctct tcaacgcatt ttacggcga gggcctctc	360
ccaacgcagc ggttctttta actacgcta aatattgaa agggagaatc cttaaagcgc	420
gtgaaatcga agggggagcg ggccagggca aggggggctg gtccgccct tccgggcacc	480

tctgtgctcg ggtgccccat gcgcgtgcag cggcgtctgt gcgtgtcatc aaccttcaaa	540
cgtagattaat caggaggcct tcttttccca tcaccaaggg ggccaaagcg aggagcgagc	600
gcatagcaaa agggacgcgg ggtccttttc tctgccggtg gcactgggta gctgtggcca	660
ggtgtggtac ttgatgggg cccagggctg gatgaggaaa ctgtaattcc tccatggtct	720
aagaggtctc ccttcatttc tgcctccttt gcggttacia caatcccagc tccgtagaga	780
gccaacgagg acacgaccca aagcgcgtt tcgctcaagg aagcgtcgca gggtcacaga	840
tctgggggaa ccccggggaa aagcactgag gcaaaaccgc cgctcgtctc ctacaatata	900
tgggaggggg aggggaaatg ggagagggga aaggagggga gggaagaaga aacgctcaga	960
aaggcagaat tcttcgtagg aattatcttt tcctcctct caccgacag cctgcctatt	1020
tccaaaggaa aaaaaaaaaa cgtgttgagt acgttctgga ttactcataa gacctttttt	1080
ttttccttc gggcgcaaaa ccgtgagctg gatttataat cgcctataa agctccagag	1140
gcggtcaggc acctgcagag gagccccgc gctccgccga ctagctgccc ccgcgagcaa	1200
cggcctcgtg atttccccgc cgatccggtc cccgcctccc cactctgccc ccgcctacce	1260
cggagccgtg cagccgcctc tccgaatctc tctcttctcc tggcgctcg	1309