

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2006-311-E00158/KRF-2008-313-E00026/R13-2 005-

부처명 한국학술진흥재단/한국학술진흥재단/한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 기초연구과제지원사업/기초연구과제지원사업/기초의과학지원사업(MRC)

연구과제명 척수손상동물에서 변화조절되는 background 포타슘 통로에 있어서 역할 규명/기관지천식
에서 증가되는 TRESK 통로단백질의 역할 규명/이온항상성 교란에 따른 신경기능조절 연구

기여율

주관기관 경상대학교/경상대학교/경상대학교

연구기간 2006.11.01-2007.10.31/2008.11.01-2009.10.31/2007. 03.01-2010.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

프로모터, 서열번호 1로 구성된 TRESK 유전자 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 pcDNA 3.1 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 벡터는 정제용 태그 서열을 더 포함하는 pcDNA 3.1 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 벡터는 도 1에 개시된 구조를 갖는 pcDNA 3.1 벡터.

청구항 4

프로모터, 서열번호 1로 구성된 TRESK 유전자 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 벡터로 형질전환된 수정란.

청구항 5

제4항에 있어서, 기탁번호 KCTC 11374BP인 수정란.

청구항 6

제4항의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 수득한 형질전환 동물.

청구항 7

제6항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열로 구성된 TRESK 유전자가 과발현 되는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물.

청구항 8

제6항에 있어서, 통증질환, 알레르기성 질환, 스트레스 및 우울증 연구용 형질전환 동물.

청구항 9

- (a) 프로모터, TRESK 유전자 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 단계에서 제조한 벡터를 수정란에 도입하는 단계; 및
- (c) 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 동물을 수득하는 단계를 포함하는 TRESK를 과발현하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 수정란 도입단계는 미세주입법 (microinjection technique), 줄기세포 삽입 방법 (stem cell insertion technique), 레트로바이러스를 이용한 삽입 방법 (Retroviral insertion technique), 및 정자-매개 유전자 전달 방법 (sperm-mediated gene transfer technique)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법에 의해 도입되는 것을 특징으로 하는 형질전환 동물의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 TRESK 유전자를 과발현하는 형질전환 동물에 관한 것으로서, 상세하게는 TRESK 유전자를 포함하는 벡터, 상기 TRESK 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 수정란, 및 상기 수정란을 이용한 형질전환 동물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TRESK (TWIK [tandem pore domain weak inward rectifying K^+ channel]-related spinal cord K^+ channel) 유전자는 2003년 일본 그룹에 의해 사람의 척수에서 클로닝 되었고, 2005년 생쥐의 고환에서 클로닝 된 유전자로서, 현재까지 알려진 TRESK 발현 분포 기관은 척수와 척수후근신경절이다. 이러한 분포 특징에 따라 연구자들은 통증 관련 연구에 많은 관심을 갖고 있는 유전자이나, TRESK 기능 연구는 척수와 척수후근신경절에 편중되어 있고, 뇌의 경우 그 발현량이 매우 적어, 현재까지 TRESK 기능 연구가 제대로 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

[0003] 형질전환 동물 모델은 유전자 자체의 기능에 대한 연구 뿐만 아니라, 해당 유전자와 관련된 질환 모델을 연구하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다. TRESK 유전자의 경우 상기 언급한 바와 같이, 개체에서의 발현률이 매우 낮으며, 그 기능 및 질환과의 관련성에 대해 현재까지 명확하게 밝혀지지 않아, 체계적인 연구가 이루어지지 못하고 있다. 따라서 TRESK 유전자를 발현하는 세포 수준에서의 연구 뿐만 아니라, 개체 수준에서의 기능 및 효과를 검증하기 위해서는 TRESK 유전자를 발현 또는 저해하는 생체 모델의 수립이 요구된다.

[0004] 이에 본 발명자들은, TRESK 유전자를 정상 개체보다 과발현하는 형질전환 동물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, TRESK 유전자를 벡터에 삽입시키고, 이를 미세조작에 의해 수정란에 도입한 후, 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 TRESK 유전자를 발현하는 형질전환 동물을 안정적으로 수득할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 프로모터, 서열번호 1로 구성된 TRESK 유전자, 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 pcDNA3.1 벡터를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 수정란을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 수득한 형질전환 동물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 제조하는 단계; 제조된 벡터를 수정란의 핵으로 도입하는 단계; 및 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 동물을 수득하는 단계를 포함하는 TRESK를 과발현하는 형질전환 동물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 따라서, 하나의 양태로서 본 발명은 프로모터, 서열번호 1로 구성된 TRESK 유전자, 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 pcDNA3.1 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명에서 사용되는 용어, "TRESK (TWIK [tandem pore domain weak inward rectifying K^+ channel]-related spinal cord K^+ channel) 유전자"란 Gm781, Kcnk18, Tresk-2, $K_{2p18.1}$ 또는 Trik라고도 불리며, 칼륨 채널 서브패밀리 K의 멤버 18 (potassium channel, subfamily K, member 18)인 유전자로서, 마우스의 경우 19번 염색체에 존재하는 EntrezGene ID 번호가 332396인 유전자이다. 마우스의 TRESK 유전자에 대한 cDNA는 GenBank accession number AY325301로 알려져 있다. 인간의 경우에는 염색체 10q25.3에 존재하며 EntrezGene ID 번호는 338576로 알려져 있다. 이러한 TRESK는 2-공 도메인 칼륨 채널 (2-pore domain potassium channel)의 멤버로 알려져 있으며, 증가된 칼슘 농도에 의해 활성화 되는 것으로 보고 되고 있다. 이러한 TRESK의 발현을 조절함으로써, Ca^{2+} -이동 호르몬 및 신경전달물질 (neurotransmitter)에 반응하여, 뉴런 및 다른 타입의 세포 민감도를 조절할 수 있을 것으로 예상되며, 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 이러한 TRESK의 구체적인 기능 및 이와 관련된 질환 모델을 제공하기 위한 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 수정란 및 상기 수정란으로부터 생산된 TRESK를

과발현하는 형질전환 동물 모델을 제조하였다.

- [0011] 본 발명에서 용어, "벡터"란 상기 벡터가 도입된 세포에서 목적 유전자를 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 벡터 내에 도입된 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다. 바람직하게 본 발명은 TRESK 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있으며, 상기 제조된 재조합 벡터를 이용하여 이를 수정란에 도입함으로써, 형질전환된 수정란을 제조할 수 있게 된다.
- [0012] 바람직하게 본 발명에서 사용되는 프로모터는 당업계에서 통상적으로 사용되는 발현벡터를 제조하기 위한 프로모터 서열을 제한 없이 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 프로모터의 예로는 SP6 프로모터, T3 프로모터, 또는 T7 프로모터 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 프로모터 서열이 제한되는 것은 아니다. 이러한 프로모터는 필요에 따라 조직 특이적으로 발현시키기 위하여 특정 프로모터를 사용할 수 있다. 예를 들면, TRESK 유전자를 간 조직 특이적으로 발현시키고자 하는 경우, Apo E (Apolipoprotein E) 프로모터, TTR (transthyretin) 프로모터, 또는 알부민 프로모터 등을 사용할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 동물의 모든 조직에서 과발현을 유도하기 위하여 T7 프로모터를 사용하였다. T7 프로모터는 T7 박테리오파지 (T7 bacteriophage)에서 분리된 서열로서, RNA 중합효소 (RNA polymerase)와 친화성이 매우 좋아 다량의 mRNA를 수득할 수 있다.
- [0013] 또한 바람직하게 본 발명의 폴리아데닐화 서열은 통상적으로 사용되는 폴리아데닐화 서열, 예를 들면 SV40 폴리아데닐화 서열, 인간 성장호르몬 폴리아데닐화 서열, 마우스 프로타민-1 유전자 폴리아데닐화 서열 (protamine-1 poly A signal), 라지 T 항원 폴리 A 영역 (large T antigen poly A region)으로 부터 유래된 폴리아데닐화 서열, 토끼 β -글로빈 (β -globin)으로부터 유래된 폴리아데닐화 서열 또는 소태아 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열 등이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0014] TRESK 유전자가 과발현 되었는지를 확인하기 위하여, 본 발명의 벡터 내에는 단백질 분리 정제 또는 확인용 태그 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 태그 서열의 예로는 GFP, GST (Glutathione S-transferase)-tag, HA, His-tag, Myc-tag, T7-tag 등이 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 태그 서열이 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 His-tag를 사용하여 TRESK의 발현 유무 및 발현량을 확인하였다. 바람직하게 상기 방법으로 제조된 벡터(pcDNA3.1)는 도 1에 개시된 벡터일 수 있다.
- [0015] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 TRESK 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 수정란을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명에 사용되는 수정란은 당업계에서 형질전환을 위해 사용되는 수정란을 제한 없이 사용할 수 있으며, 본 발명의 목적상 상기 수정란은 마우스의 수정란 일 수 있다. 수정란은 4 내지 7주령의 암컷 마우스에 PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) 및 hCG (human Chorionic Gonadotropin)를 주사하여 생산될 수 있으며, 바람직하게는 7 IU의 PMSG를 복강 주사하고, 48 시간 경과 후 hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. 이어 수정란 생산을 위해 hCG 복강 주사 후 바로 12주령의 수컷 마우스와 교미시켜 질전 (vaginal plug)이 있는 암컷 마우스의 난관으로부터 수정란 (zygote)을 수득하였다.
- [0017] 상기 TRESK 유전자를 포함하는 벡터를 수정란으로 도입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 유전자를 수정란으로 도입하는 방법의 예는, 1) 수정 직후 전핵 단계에 있는 접합체의 웅성전핵 내에 미세조작 기술로 유전자를 주입하는 미세주입법 (Microinjection technique), 2) 배아 간세포 (embryonic stem cells)에 유전자를 삽입하고 이를 배반포기의 수정란 내에 이식하는 방법 (Stem cell insertion technique), 3) 레트로바이러스 (retrovirus) 벡터를 이용하여 유전자를 수정란 내에 주입하는 방법 (retrovirus insertion technique), 및 4) 수컷의 정소 내에 유전자를 주입하여 정자에 삽입시키고, 이를 난자와 수정시키는 방법 (sperm-mediated gene transfer technique) 등이 있으나, 상기 예에 의해 벡터를 수정란에 도입하는 방법이 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 미세조작에 의해 유전자를 도입하는 미세주입법을 이용하여 TRESK 유전자가 형질전환된 마우스 수정란을 제조하였다.

- [0018] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 수득한 형질전환 동물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명에서의 "형질전환 동물"이란 외부에서 도입된 유전자를 재조합하여, 이를 동물의 염색체 상에 인공적으로 삽입시킴으로써 그 형질의 일부가 변화된 동물을 의미하며, 동물의 종류는 자연계의 포유류라면 제한 없이 생산 가능하다.
- [0020] 상기와 같이 제조된 형질전환된 동물은 전반적으로 모든 장기에서 TRESK mRNA 발현량이 증가하였으며, 특히 대뇌 (cerebrum) 및 비장 (spleen)에서의 발현량이 현저히 높았다. 이러한 발현은 mRNA 수준 뿐만 아니라 단백질 수준 모두에서 높은 발현 양상을 나타내었다.
- [0021] TRESK가 과발현되는 형질전환된 동물은 정상 개체에 비해 코티솔 (cortisol) 호르몬의 농도가 낮게 유지되며, 포르말린 시험에 의해 유발되는 급성통증 회피반응을 유의적으로 높게 나타냈다. 또한 IL-13 (interleukin-13)이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 따라서 이러한 형질전환된 동물은 통증관련 연구, 더욱 바람직하게는 TRESK와 관련된 무감각증 및 급성통증 질환과 같은 통증질환 연구 모델로 유용하게 사용될 수 있다. 또한 알레르기 반응 및 우울증 연구에도 활용될 수 있다.
- [0022] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 TRESK 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 제조된 벡터를 수정란의 핵에 도입하는 단계; 및 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 동물을 수득하는 단계를 포함하는 TRESK를 과발현하는 형질전환 동물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 보다 상세하게, 상기 방법은 (a) 프로모터, TRESK 유전자 및 폴리아데닐화 서열을 포함하는 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 제조한 벡터를 수정란에 도입하는 단계; 및 (c) 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 동물을 수득하는 단계를 포함하는 TRESK를 과발현하는 형질전환 동물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0024] 상기 (a) 단계의 벡터는 TRESK 유전자를 수득하고 상기 유전자를 증폭시킨 후, 벡터에 삽입함으로써 제조될 수 있다. TRESK 유전자는 TRESK mRNA 추출물을 이용하여 역전사 (reverse transcription) 방법으로 하여 제조하거나, cDNA 라이브러리로부터 클로닝하여 수득할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 마우스의 TRESK 유전자를 마우스의 고환으로부터 수득한 후, 이를 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하여 다량의 TRESK 유전자를 수득하였다.
- [0025] 상기 (b) 단계에서는 TRESK 유전자 발현에 필요한 부위를 제외한 벡터의 나머지 부분을 제거하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 세 종류의 제한 효소 NruI, DraIII, ScaI으로 절단 한 후, 약 2.6 kb 의 조각을 DNA로 하여 마우스의 수정란에 도입하였다.
- [0026] 또한 상기 벡터의 수정란에의 도입방법은 상기 서술한 바와 같이, 미세주입법, 줄기세포 삽입 방법 (stem cell insertion technique), 레트로바이러스를 이용한 삽입 방법 (Retroviral insertion technique), 또는 정자-매개 유전자 전달 방법 (sperm-mediated gene transfer technique)등의 방법을 제한 없이 이용할 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 분리된 유전자를 음성전핵에 직접 주입하는 미세주입법에 의해 형질전환된 마우스 수정란을 제조하였다. 또한 상기 수정란은 TRESK로 명명한 후 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures)에 2008년 08월 01일자로 기탁하였다 (KCTC 11374BP).
- [0027] 마지막 단계로서, 상기와 같이 형질전환된 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 동물을 생산할 수 있다.
- [0028] 상기와 같이 제조된 형질전환된 동물은 전반적으로 모든 장기에서 TRESK mRNA 및 단백질의 발현량이 증가하였고, TRESK가 과발현되는 형질전환된 동물은 정상 개체에 비해 코티솔 (cortisol) 호르몬의 농도가 낮게 유지되며, 포르말린 시험에 의해 유발되는 급성통증 회피반응이 유의적으로 높게 나타나고, IL-13 (interleukin-13)이 유의적으로 증가함을 확인하였다.
- [0029] 바람직하게 본 발명의 형질전환 동물 모델은 통증 모델로 뿐만 아니라 우울증과 관련된 약물을 연구하는 질환 모델로 사용될 수 있다. 특히, 코티솔의 발현량 변화로써 우울증의 후보 약물을 스크리닝 할 수 있는데, 코티솔 (cortisol)은 부신피질에서 분비되는 호르몬으로서, 스트레스 및 우울증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 즉, 코티솔 분비 자체는 상기 질환들에 대항하기 위해 분비되는 것이지만, 이 호르몬이 지속적으로 유지되는 경

우, 장기적으로는 결국 몸을 손상시키는 기제가 된다. 만성적으로 코티졸이 분비되면 불안과 초조상태가 지속되고, 심해지면 우울증, 정신장애, 수면장애를 야기한다. 이와 관련하여 본 발명의 TRESK 유전자를 발현하는 동물에서 코티졸의 농도가 낮게 유지되는 것을 확인하였는바, 본 발명의 형질전환 동물을 이용하여 코티졸 분비와 관련한 우울증 질환 치료 약물의 스크리닝을 위한 스트레스 및 우울증 질환모델로 사용될 수 있다.

[0030] 또한 바람직하게 본 발명의 TRESK 유전자를 발현하는 형질전환 동물은 알레르기 질환모델로써 유용하게 사용될 수 있다. IL-13은 기도 과민성과 관련하여 분비되는 것으로 알려진 사이토카인 (cytokine)으로서, 다양한 세포 타입 (type)에서 분비된다고 알려져 있으며, 특히 알레르기 염증 및 알레르기 질환에 중요한 매개인자로 작용한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 TRESK 유전자를 발현하는 형질전환 동물에서 바람직하게 본 발명의 TRESK 유전자를 발현하는 동물에서 알레르기 질환과 관련된 IL-13의 분비가 증가하는 것을 확인하였는바, 후보 화합물을 상기 형질전환 동물에 처리한 후, IL-13 량의 변화를 확인함으로써, 상기 형질전환 동물을 알레르기 질환과 관련된 물질(촉진제 또는 억제제)을 스크리닝하거나 기관지천식 유도 실험동물 모델로 사용될 수 있다.

[0031] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 실시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

효 과

[0032] 본 발명의 형질전환 동물을 이용하는 경우, 개체 내에서 발현률이 매우 적고, 그 발현 양상 및 발현 분포에 대해 현재까지 명확하게 밝혀지지 않은 TRESK 유전자를 생체 모델인 개체 수준에서의 연구할 수 있다. 나아가 개체 내 여러 조직 또는 기관에서 발생할 수 있는 다양한 질병연구에 사용될 수 있으며, 특히 무감각증을 포함한 통증 관련 연구에 매우 유용할 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0033] **실시예 1: 유전자의 확보 및 제조**

[0034] TRESK 통로 유전자는 역전사중합효소방법(RT-PCR)에 의하여 마우스 고환으로부터 수득하였다. Taq 중합효소 (Taq-polymerase)와 프라이머(primer)를 이용하여 TRESK 유전자(~1.2 kb, 도 1A 및 서열번호 1)를 증폭시키고, pcDNA3.1/V5-His-TOPO 벡터(5,523 bp)에 삽입하여, TRESK/pcDNA3.1/V5-His-TOPO 클론을 제조하였다(도 1B). TRESK 형질전환 마우스 제작을 위한 유전자 준비로 벡터 염기서열을 제거하기 위하여 세 종류의 제한효소 (NruI/DraIII/ScaI)로 자른 후 ~2.6 kb의 조각을 미세주입용 DNA로 사용하였다(도 1C).

[0035] **실시예 2: TRESK 유전자 미세주입 및 형질전환 마우스의 생산**

[0036] C57BL/6N, 4~7주령의 암컷 마우스에 7 IU PMSG를 복강 주사하고 48 시간 후 hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. 수정란의 생산을 위해 hCG 복강 주사 후 바로 12주령의 수컷 마우스와 교미시켰다. hCG 복강주사 및 교미 18시간째 자성 마우스의 난관으로부터 접합자(zygote)를 회수하여 미세주입 실험에 사용하였다.

[0037] 미세주입기를 이용하여 준비된 DNA를 접합자의 웅성전핵에 주입 한 후 대리모의 난관에 수정란을 이식하여 형질전환 마우스를 생산하였다.

[0038] 정상 마우스와 교배하여 F1을 얻고, 생산된 자손은 발가락을 절단하여 게놈 DNA를 분리한 후, CMV 프라이머(5'-GGATAGCGGTTTGACTCACGG-3')와 TRESK 프라이머를 이용하여 연쇄중합효소반응을 실시한 후 유전자의 삽입을 확인하였다(도 1D).

[0039] 형질전환 마우스의 수정란은 TRESK로 명명한 후 부다페스트 조약에 의거하여 국제기탁기관인 한국생명공학연구소 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures)에 2008년 08월 01일자로 기탁하였으며, 기탁번호 KCTC 11374BP를 수여받았다.

[0040] **실시예 3: 형질전환 마우스에서 TRESK 유전자 및 단백질의 과발현 확인**

[0041] 형질전환 마우스의 각 기관별 TRESK mRNA 발현을 연쇄중합효소반응을 이용하여 GAPDH 유전자 발현에 비교하여 나타내었다 (도2A 및 2B). 대뇌(cerebrum), 소뇌(cerebellum), 척수(spinal cord, SC), 척수후근신경절(dorsal root ganglion), 흉선(thymus), 심장(heart), 간(liver), 허파(lung), 위(stomach), 비장(spleen), 신장(kidney), 고환(testis), 난소(ovary), 근육(muscle)에서 TRESK 유전자 발현량을 비교한 결과 전반적으로 모든 장기에서 TRESK 발현량이 증가함을 확인하였으며, 특히, 대뇌와 비장에서의 발현량은 현저하게 높아졌음을 확인하였다. 단백질로서 발현량을 함께 조사한 결과, 형질전환동물에서 TRESK 단백질 역시 대뇌, 소뇌, 척수, 척수후근신경절, 허파, 흉선, 비장 및 고환에서 증가하였다.

[0042] **실시예 4: TRESK 형질전환 마우스의 특징**

[0043] TRESK 형질전환 마우스는 정상 마우스에 비해 코티졸 호르몬 농도가 낮게 유지되는 것을 확인하였다(도3A).

[0044] 포르말린 시험은 통증유발 시험 모델 중 급성 통증 및 촉진성 통증 상태를 보여주는 특징적인 실험모델이다. 촉진성 상태는 국소적 조직 손상 후에 지속적인 구심성 자극에 의해 2차적으로 발생하며 아주 낮은 구심성 자극에도 불구하고 통증이 강화되어 있는 상태이다. 이러한 포르말린 통증모델의 장점은 급성 통증과 촉진성 통증 상태를 하나의 개체 (동물)에서 관찰 할 수 있다는 점이다.

[0045] TRESK의 발현이 통증 감각과 어떠한 관련이 있는 지를 확인하기 위하여 TRESK 형질전환동물을 이용하여 포르말린 시험을 실시하였다. 오른쪽 뒷다리에 5% 포르말린을 주입한 후 60분 동안 통증에 의해 유발되는 발의 떨림과 들림 등 행위검사를 조사하였다. TRESK 형질전환동물에서 포르말린에 의해 나타나는 통증은 급성통증을 나타내는 일차 시기에서 통증회피반응이 유의적으로 높게 나타났다(도 3B).

[0046] 사이토카인 변화를 측정한 결과, TRESK 형질전환동물에서 면역조절 사이토카인인 IL-13 (interleukin-13)이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 3C).

[0047] 그 밖의 TRESK 형질전환동물에 있어서 사료섭취량 및 체중변화 등은 정상 쥐와 유의한 차가 없었다.

[0048] 이상의 TRESK 형질전환 동물의 특징을 살펴본 결과 TRESK는 감각 및 운동 신경흥분작용, 특히 급성통증에 관여 되어 있을 것으로 예상된다. 또한 알레르기 반응 및 우울증 연구에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 형질전환 마우스를 생산하기 위하여 사용된 TRESK 유전자의 염기서열(A), TRESK와 pcDNA3.1/V5-His-TOPO의 클론 형성(B), 제한효소를 이용한 미세 주입 용 TRESK 유전자 준비(C) 및 미세조작에 의한 유전자의 수정란 내 주입과 산자생산 그리고 TRESK 형질전환 마우스의 확인(D)을 도식화한 그림이다.

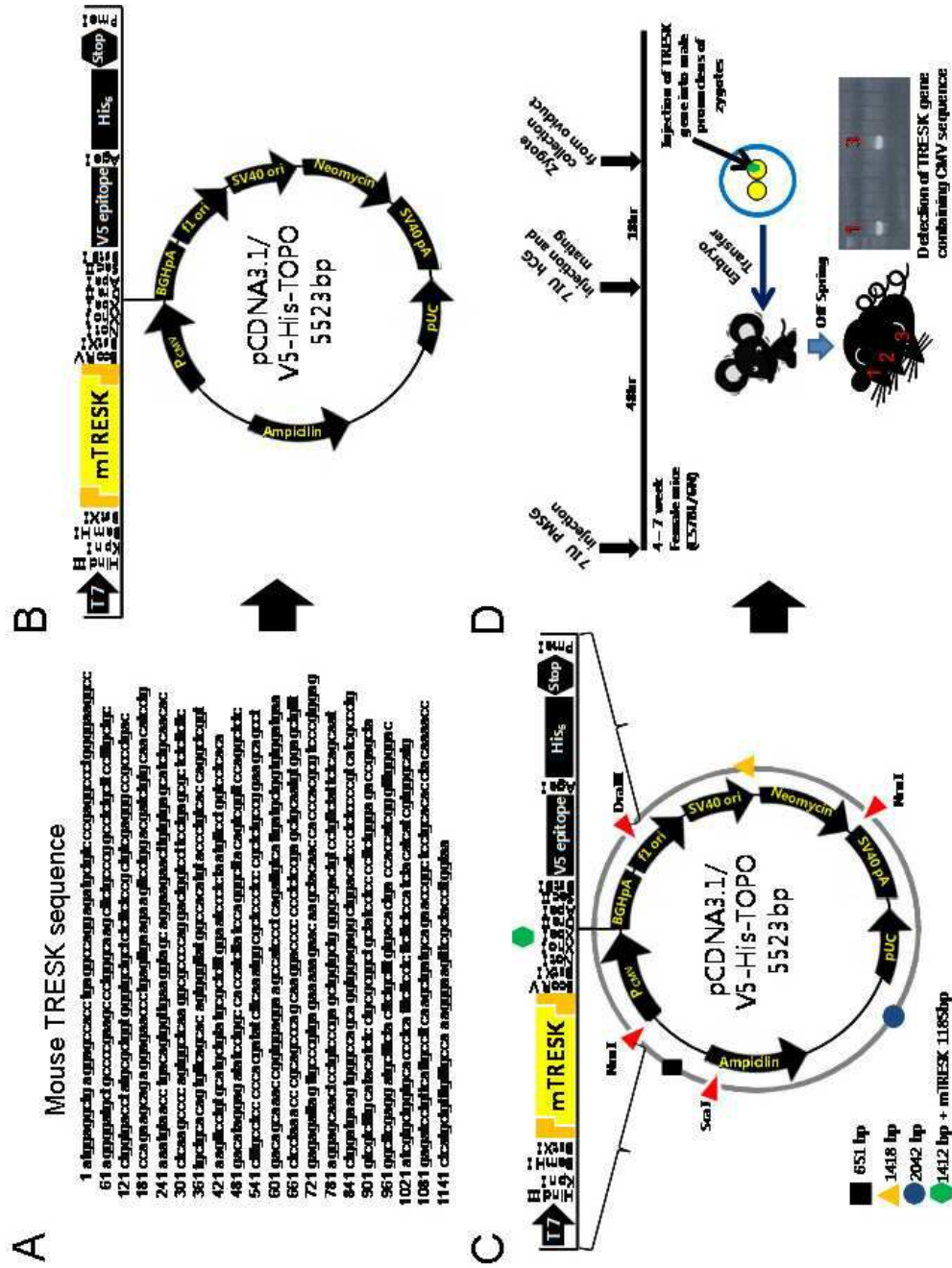
[0050]

[0051] 도 2는 형질전환 마우스의 TRESK mRNA 및 단백질의 발현량을 역전사중합효소반응과 웨스턴 블롯 분석 (Western blotting assay)(도 2B)를 통하여 확인하였다. mRNA 및 단백질의 발현량은 GAPDH와 베타액틴 (β -actin)의 기준량과 비교하였다.

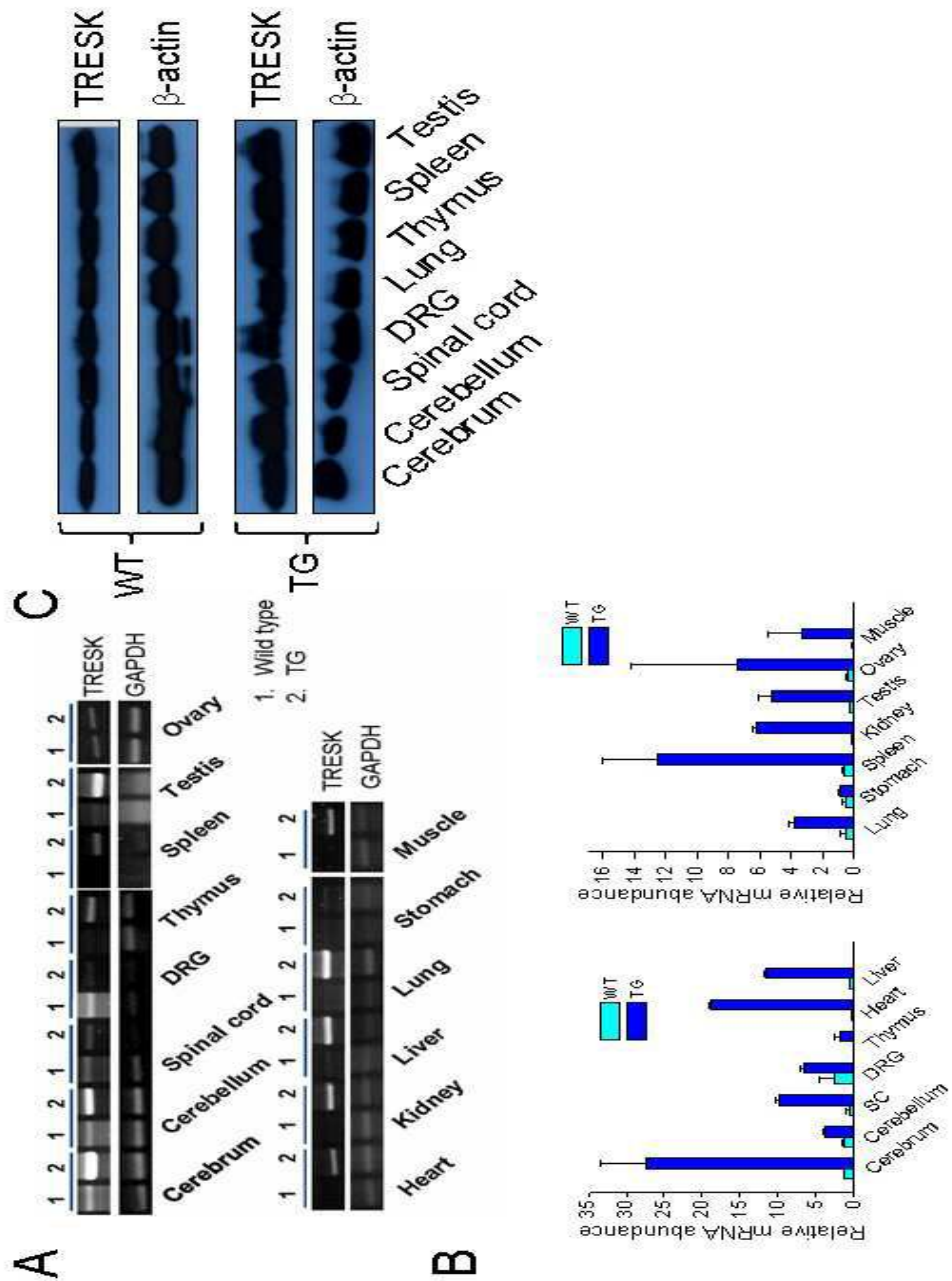
[0052] 도 3은 TRESK 형질전환 마우스에서의 코티졸 (cortisol) 농도, 통증 회피반응 및 사이토카인(cytokine) 농도 변화를 정상 마우스와 비교한 결과이다.

도면

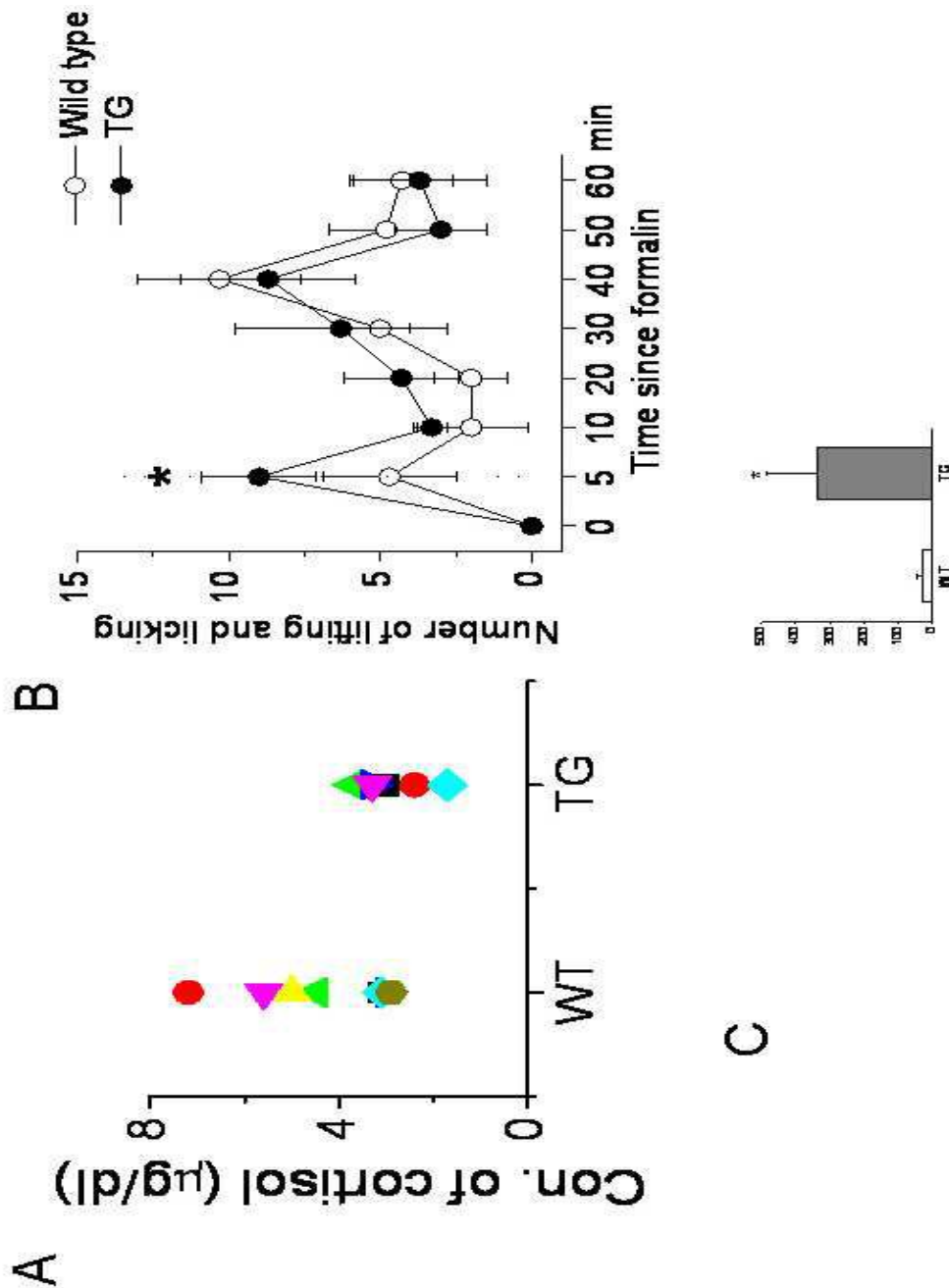
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> A TRANSGENIC ANIMAL OVEREXPRESSING TRESK GENE AND A METHOD FOR PREPARING THE SAME

<130> PA090053/KR

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1185

<212> DNA

<213> mouse tresk gene

<400> 1

atggaggctg aggagccacc tgaggccagg agatgctgtc ccgaggccct ggggaaggcc 60

aggggatgct gccccgaagc cctgggcaag ctctgtcccg gcctctgctt cctttgctgc 120

ctggtgacct atgcgctggt ggggtgctgt ctcttctccg ctgtcgaggg ccgccctgac 180

ccagaagcag aggagaacc tgagttgaag aagttcctgg acgatctgtg caacatcctg 240

aaatgtaacc tgacagtgg tgaaggtagc aggaagaact tgtgtgagca tctgcaacac 300

ctcaagcccc agtggctcaa ggcgccccag gactggctct tctgagcgc tctcttcttc 360

tgctgcacag tgctcagcac agtgggttat ggccacatgt accctgtcac caggctcggc 420

aagttcctgt gcatgctgta tgcgctcttt ggaatccctc taatgttctt ggtcctcaca 480

gacataggag atatcctggc caccatctta tccagggtt acagtcggtt ccaggctctc 540

ctttgctcc ccacgatat ctcaaatgg cgtccctcc cgctctgccg gaagcgcct 600

gacagcaaac cgttgaggga agccatccct cagattgtca ttgatgctgg tgtggatgaa 660

ctcctaaacc cgcagcccag caaggacccc cctctccga gctgcaatgt ggagctgttt 720

gagagattag ttgcccgtga gaaaaagaac aagctacaac caccacgcg tcccgtggag 780

aggagcaact cctgtccga gctggtgctg ggcgactgt cctgttctat tctcagcaat 840

ctggatgaag tgggccagca ggtggagagg ctggacatcc ctctccccgt catcgccctg 900

gtcgtctttg catacatctc ctgcgcggct gctatctcc cttcttgga gaccgagcta	960
ggcttcgagg atgttttcta cttctgcttt gtgacctga ccaccatcgg gtttggggac	1020
atcgtgctgg tgcaccctca tttcttctc tttcttcca tctacatcat cgtgggcatg	1080
gagatcctgt tcattgcctt caagctgatg cagaaccggc tctgcacac ctacaaaacc	1140
ctcatgctgt ttgtttgcca aagggaagtt tcgctacctt ggtaa	1185

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for CMV promoter

<400> 2	
ggatagcggg ttgactcacg g	21