

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0165463
(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
C12Q 1/6897 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0065213
(22) 출원일자 2022년05월27일
심사청구일자 2022년05월27일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
박해철
경기도 과천시 별양로 12, 337동 903호(원문동, 래미안 슈르)
이정현
경기도 안산시 단원구 고잔로 18, 1411호(고잔동, 늘봄스위트빌)
(74) 대리인
특허법인 무한

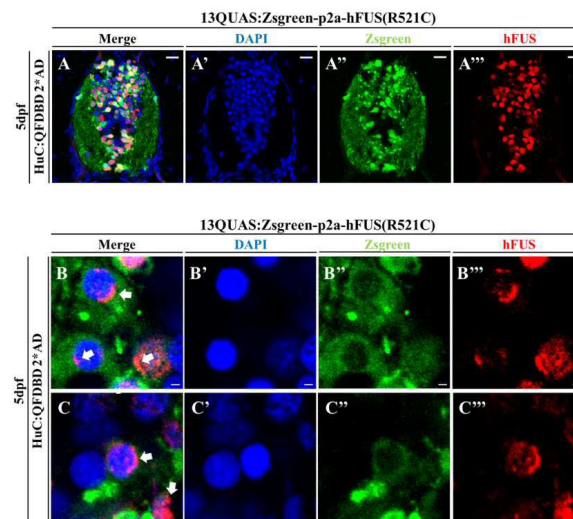
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 형질전환 제브라피쉬를 이용한 근위축성 측삭경화증 동물모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 hFUS(R521C) 유전자의 과발현을 유도한 형질전환 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 동물모델, 이의 제조방법 및 이를 이용한 근위축성 측삭경화증 약물 스크리닝 방법 등에 관한 것으로서, 본 발명의 동물모델 제조 방법은 binary expression system을 이용하여 안정적으로 균일한 동물모델을 대량으로 생산할 수 있으며, 본 발명의 방법으로 제조된 동물모델은 빠르게 질환이 유도되어 약물의 스크리닝 등을 포함한 근위축성 측삭경화증 질환 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6897 (2018.05)
A01K 2217/056 (2013.01)
A01K 2227/40 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)
C12N 2015/8527 (2013.01)

노현주

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15, 502동
 1803호(도룡동, 스마트시티)

(72) 발명자

서용보

대구광역시 달서구 호산로 126, 106동 1501호(호산
 동, 삼성한국형아파트)

이정수

대전광역시 유성구 과학로 125(어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141139
과제번호	2021M3H9A109759411
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	형광리포터 제브라피쉬 협력센터
기 여 율	35/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.09.01 ~ 2022.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1485018521
과제번호	G232020012103
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	한국환경산업기술원
연구사업명	환경기술개발사업
연구과제명	생활화학제품 안전사용을 위한 제브라피쉬기반 신규 신경독성 평가법 개발
기 여 율	35/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711158950
과제번호	2022R1A2C1012375
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	CHIP (STUB1) E3 유비쿼틴 리가아제 돌연변이에 의해 발병하는 척수소뇌 위축증 기

전 연구 및 표적 약물 발굴

기 여 율	15/100
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711170633
과제번호	KGM9992211
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국생명공학연구원
연구사업명	한국생명공학연구원연구운영비지원(주요사업비)
연구과제명	단백질 분해 기반 신약개발 플랫폼 기술 개발
기 여 율	15/100
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) HuC 프로모터 하에서 작동하는 QFDBD 2*AD 유전자를 포함하는 유전자 카세트(gene cassette)s; 및
- (2) 13QUAS 프로모터 하에서 작동하는 인간 유래 FUS 돌연변이(hFUS(R521C)) 유전자를 포함하는 유전자 카세트;가 도입된 형질전환 제브라피쉬.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (2) 유전자 카세트는 13QUAS 프로모터 하에서 작동하는 리포터 유전자를 포함하는 것인, 형질전환 제브라피쉬

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 리포터 유전자는 hFUS(R521C) 유전자와 자가 절단 펩타이드(self-cleaving peptide)를 암호화하는 유전자로 연결된 것인, 형질전환 제브라피쉬.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 자가 절단 펩타이드는 P2A인 것인, 형질전환 제브라피쉬.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 리포터 유전자는 형광 단백질을 암호화하는 유전자인 것인, 형질전환 제브라피쉬.

청구항 6

(1) 하기 (A) 및 (B) 단계를 포함하는 제1 형질전환 제브라피쉬 제조단계:

(A) HuC 프로모터 하에서 작동하는 QFDBD 2*AD 유전자 발현용 카세트가 포함된 제1 플라스미드 벡터 제조단계 및

(B) 상기 (A) 단계에서 제조한 제1 플라스미드 벡터를 제브라피쉬 수정란에 형질전환하는 단계.

(2) 하기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 제2 형질전환 제브라피쉬 제조단계:

(a) 13QUAS 프로모터 하에서 작동하는 인간 유래의 FUS 돌연변이(hFUS(R521C)) 유전자 및 이펙터 리포터 유전자 발현용 카세트가 포함된 제2 플라스미드 벡터 제조단계 및

(b) 상기 (a) 단계에서 제조한 제2 플라스미드 벡터를 제브라피쉬 수정란에 형질전환하는 단계

(3) 상기 (1) 및 (2) 단계에서 형질전환된 제브라피쉬 수정란을 배양하여 성체(F0)로 발달시키는 단계;

(4) 상기 제1 및 제2 형질전환 제브라피쉬 성체를 서로 교배하는 단계; 및

(5) 상기 (4) 단계에서 교배 후 확보된 제브라피쉬 중에서 리포터 유전자를 발현하는 제브라피쉬(F1)을 선별하는 단계;를 포함하는 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델 제조방법으로서,

상기 (1) 단계 및 (2) 단계는 동시에 또는 순차로 수행될 수 있으며, 순차로 수행되는 경우 (1) 단계와 (2) 단계의 순서는 무관한 것인, 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (B) 및 (b) 단계는 (A) 및 (a) 단계에서 제조한 각 플라스미드 벡터를 제브라피쉬 수정란 1세포기에 유전자전이효소(transposase)와 함께 미세주입 (microinjection)하여 수행되는 것인, 동물모델 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 (A) 단계에서 제1 플라스미드 벡터는 프로모터 하에서 작동가능하게 연결된 제1리포터 유전자를 포함하고, 상기 (1) 단계는 (B) 단계 이후에 (C) 제1리포터 유전자를 발현하는 개체를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 동물모델 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 제2 플라스미드 벡터는 프로모터 하에서 작동가능하게 연결된 제2리포터 유전자를 포함하고, 상기 (2) 단계는 (b) 단계 이후에 (c) 제2리포터 유전자를 발현하는 개체를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 동물모델 제조방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 hFUS(R521C) 유전자와 이펙터 리포터 유전자는 자가 절단 펩타이드(self-cleaving peptide)를 암호화하는 유전자로 연결된 것인, 동물모델 제조방법.

청구항 11

제6항, 제8항, 또는 제9항에 있어서,

상기 이펙터 리포터 유전자는 형광 단백질을 암호화하는 유전자인, 동물모델 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 리포터 유전자는 루시페라제(luciferase), 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein; mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP), 변형된 적색 형광 단백질(modified red fluorescent protein; mRFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP) 및 증강된 남색 형광 단백질(ECFP)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 동물모델 제조방법.

청구항 13

제6항의 방법으로 제조된 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델.

청구항 14

(가) 제13항의 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;

(나) 상기 후보물질을 처리한 동물과 후보물질을 처리하지 않은 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델에서 하기 (1) 내지 (5)로 이루어진 근위축성 측삭경화증 질환의 증상 및/또는 상기 질환의 바이오마커 중 하나 이상

을 측정하는 단계: 및

- (1) 운동성
- (2) 신경근접합부에서 탈신경화
- (3) 산화 스트레스
- (4) TNF- α 발현 수준
- (5) griala 발현 수준

(다) 상기 후보물질을 처리한 동물이 후보물질을 처리하지 않은 동물보다 운동성이 증가되거나, 신경근접합부에서 탈신경화의 발생 빈도가 높거나, 산화 스트레스가 감소하거나 TNF- α 의 발현 수준이 감소 및/또는 griala의 발현 수준이 증가하는 경우 상기 후보물질을 근위축성 측삭경화증 질환의 치료 물질로 선별하는 단계;를 포함하는 근위축성 측삭경화증 질환의 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 hFUS(R521C) 유전자의 과발현을 유도한 형질전환 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 동물모델, 이의 제조방법 및 이를 이용한 근위축성 측삭경화증 약물 스크리닝 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 근위축성 측삭경화증은 루게릭병으로 알려져 있는 신경계 퇴행성 질환이다. 뇌와 척수의 운동신경이 사멸하며 운동능력의 손실이 발생하는 질환으로, 발병시 호흡 부전의 원인으로 3~5년 안에 사망하는 치명적인 질환이다. 1993년 최초의 원인 유전자가 밝혀진 이후 많은 연구가 진행되었지만 최근까지 다양한 원인들이 밝혀지고 있다. 하지만 근위축성 측삭경화증의 공통되는 기전이 밝혀지지 않고 있으며, 이로 인해 효과적인 치료제 역시 부재한 상태이다. 현재까지 FDA에 승인된 근위축성 측삭경화증 치료 약물은 생존 기간을 단지 몇 개월 늘려주거나 진행을 늦춰 줄 뿐이다.

[0004] 제브라피쉬는 인간 유전체와 높은 유전학적 및 기능적 유사성을 가진 척추동물로서, 신경계 및 각종 기관형성과정이 사람과 매우 유사하기에 인간의 질환연구를 위하여 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있는 중요한 동물 모델이다. 또한 개체 당 구입 및 유지 비용이 매우 저렴하고 대량의 배아 확보가 가능하기 때문에 질환 치료제 후보물질의 스크리닝에 매우 탁월한 모델이기도 하다. 뿐만 아니라 수정 후 24시간 내에 신경계와 순환계 등 대부분의 기관들이 형성되며, 수일 내로 48-well plate 또는 96-well plate를 이용한 대규모 스크리닝 실험에 사용 가능하다는 특징이 있다. 때문에 제브라피쉬를 이용한 신경계 질환 연구에 제브라피쉬가 질환모델로서 주목 받고 있다.

[0005] 근위축성 측삭경화증 역시 제브라피쉬를 질환모델로 하는 연구가 진행되어 왔지만, 현재까지 개발된 제브라피쉬 질환모델은 노년기에 발병하는 퇴행성 질환의 특징 때문에 대규모 스크리닝에 유리한 제브라피쉬의 장점을 온전히 활용하지 못한다는 단점이 존재한다. 따라서 수정 후 수일 내에 질병이 발병할 수 있는 질환모델이 요구되는 실정이다.

[0006] 가족성 근위축성 측삭경화증의 원인 유전자로 알려져 있는 FUS 유전자의 돌연변이로 인한 환자의 질병 발병은 60% 이상이 45세 이전에 나타나며 10대 후반과 20대 초반에 발병하는 사례들이 보고되었다. 반면에 다른 원인 유전자들에 의한 발병은 대부분 50대 이후에 나타난다. 근위축성 측삭경화증의 원인이라고 알려진 돌연변이는 521번째 아미노산이 아르기닌에서 시스테인으로 치환된 FUS(R521C)가 있다. 이러한 FUS 돌연변이 유래 근위축성 측삭경화증을 제브라피쉬에 도입하여 이른 나이에 질병이 발병하는 질환 모델을 제작한다면, 고효율의 약물 스크리닝에 유리할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) CN 2021-11183570

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 근위축성 측삭경화증 동물모델로서 형질전환 제브라피쉬 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 동물모델을 이용한 근위축성 측삭경화증 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 제브라피쉬에서 IQ-system을 이용하여 인간 유래 FUS 단백질의 521번째 아미노산이 아르기닌(Arginine: R)이 시스테인(Cysteine: C)로 치환된 돌연변이 FUS 단백질이 과발현 되도록 형질전환 제브라피쉬를 제작하고 상기 형질전환 제브라피쉬에서 근위축성 측삭경화증 질환의 증상과 상기 질병의 바이오마커를 확인하여 근위축성 측삭경화증 발병이 유도됨을 확인하였다.
- [0014] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 IQ-system을 이용하여 인간 유래 FUS 단백질의 521번째 아미노산이 아르기닌(Arginine: R)이 시스테인(Cysteine: C)으로 치환된 돌연변이 FUS 단백질이 과발현 되도록 형질전환된 제브라피쉬를 제작한다.
- [0015] IQ-system은 binary expression system으로서, 본 발명은 상기 돌연변이 FUS 단백질 과발현을 위한 이펙터 라인(effector line) 부(또는 모) 세대 제브라피쉬와 상기 이펙터 라인의 작동을 조절하는 드라이버 라인(driver line) 모(또는 부) 세대를 별개로 제작하고, 상기 부모 세대를 교배하여 자손을 획득하여 근위축성 측삭경화증 발병이 유도되는 형질전환 제브라피쉬를 제작할 수 있다.
- [0016] 구체적으로, 본 발명은 하기 (1) 내지 (5) 단계를 포함하는 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델 제조방법을 제공한다:
- [0017] (1) 하기 (A) 및 (B) 단계를 포함하는 제1 형질전환 제브라피쉬 제조단계:
- [0018] (A) 드라이버 라인으로서, HuC 프로모터 하에서 작동하는 QFDBD 2*AD 유전자 발현용 카세트가 포함된 제1 플라스미드 벡터 제조단계 및
- [0019] (B) 상기 (A) 단계에서 제조한 제1 플라스미드 벡터를 제브라피쉬 수정란에 형질전환하는 단계.
- [0020] (2) 하기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 제2 형질전환 제브라피쉬 제조단계:
- [0021] (a) 이펙터 라인으로서, 13QUAS 프로모터 하에서 작동하는 인간 유래의 FUS 돌연변이(hFUS(R521C)) 유전자 및 이펙터 리포터 유전자 발현용 카세트가 포함된 제2 플라스미드 벡터 제조단계 및
- [0022] (b) 상기 (a) 단계에서 제조한 제2 플라스미드 벡터를 제브라피쉬 수정란에 형질전환하는 단계
- [0023] (3) 상기 (1) 및 (2) 단계에서 형질전환된 제브라피쉬 수정란을 배양하여 성체(F0)로 발달시키는 단계;
- [0024] (4) 상기 제1 및 제2 형질전환 제브라피쉬 성체를 서로 교배하는 단계; 및
- [0025] (5) 상기 (4) 단계에서 교배 후 확보된 제브라피쉬 중에서 이펙터 리포터 유전자를 발현하는 제브라피쉬(F1)을 선별하는 단계.
- [0026] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제조방법에서 제1 형질전환 제브라피쉬 제조단계와 제2 형질전환 제브라피쉬 제

조단계는 동시에 또는 순차로 수행될 수 있으나, 순차로 수행되는 경우 그 선후는 무관하다.

- [0027] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 제1 및 제2 형질전환 제브라피쉬 제조단계에서 각 (B) 및 (b) 단계의 형질전환 단계는 (A) 및 (a) 단계에서 제조한 각 플라스미드 벡터를 제브라피쉬 수정란 1세포기에 유전자전이효소(transposase)와 함께 미세주입(microinjection)하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (A) 단계의 제1 플라스미드 벡터는 별도의 제1리포터 유전자 발현 카세트를 포함할 수 있으며, 이때 상기 (1) 단계는 (C) 제1리포터 유전자를 발현하는 개체를 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 선별된 개체를 제1 형질전환 제브라피쉬이다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (a) 단계의 제2 플라스미드 벡터는 별도의 제2리포터 유전자 발현 카세트를 포함할 수 있으며, 이때 상기 (2) 단계는 (c) 제2리포터 유전자를 발현하는 개체를 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 선별된 개체는 제2 형질전환 제브라피쉬이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b) 단계에서 hFUS(R521C) 유전자와 드라이버 리포터 유전자는 자가 절단 펩타이드(self-cleaving peptide)를 암호화하는 유전자로 연결될 수 있으며, 상기 2종 유전자는 13QUAS 프로모터 하에서 동작하여 유기적으로 발현이 유도되며, 발현 이후에 자가 절단 펩타이드에 의해 별도 단백질로 발현될 수 있다. 상기 자가 절단 펩타이드는 공지된 자가 절단 펩타이드를 이용할 수 있으며, 본 발명의 구체적인 실험에서는 P2A를 이용하였다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 이펙터 리포터 유전자는 hFUS(R521C)의 발현 수준을 확인하거나 hFUS(R521C)를 발현하는 개체를 선별하기 위한 것이고, 상기 제1리포터 유전자는 제1 형질전환 제브라피쉬를 선별하기 위한 것이며, 제2리포터 유전자는 제2 형질전환 제브라피쉬를 선별하기 위한 것으로서, 세포 또는 조직의 손상이 없이 모니터링할 수 있는 유전자라면 제한 없이 사용될 수 있으나, 시각적 관찰을 위해서 바람직하게는 형광 단백질 유전자를 이용할 수 있다. 상기 형광 단백질이 비-제한적예로는 루시페라제(luciferase), 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein; mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP), 변형된 적색 형광 단백질(modified red fluorescent protein; mRFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP) 또는 증강된 남색 형광 단백질(ECFP) 등이 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 이펙터 리포터 유전자, 제1리포터 유전자, 및 제2리포터 유전자는 각기 다른 형광 단백질 유전자를 이용하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 각각 다른 파장을 발하는 형광 단백질을 암호화하는 것일 수 있다. 본 발명은 구체적인 실험에서 이펙터 리포터 유전자로 Zsgreen을 이용하였고, 제1리포터 유전자로 EGFP 유전자를 이용하였으며, 제2리포터 유전자로 mCherry 유전자를 이용하였다.
- [0033] 상기 제조방법의 제1 형질전환 제브라피쉬와 제2 형질전환 제브라피쉬는 각각 드라이버 라인과 이펙터 라인의 DNA 컨스트럭트(construct)를 포함하고 있으며, 양 제브라피쉬의 교배를 통해 획득된 자손은 드라이버 라인과 이펙터 라인의 DNA 컨스트럭트를 모두 포함하게 되고, 드라이버 라인에서 발현되는 QFDBD 2*AD는 이펙터 라인을 구동시켜 hFUS(R521C)의 과발현을 유도한다. 과발현이 유도된 hFUS(R521C)는 제브라피쉬에 축적되어 수정 후 5일 경과시부터 유의미한 근위축성 측삭경화증의 증상과 질환과 관련된 바이오마커 변화를 관찰할 수 있다.
- [0034] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 형질전환 제브라피쉬를 근위축성 측삭경화증 질환의 동물모델로 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 동물모델에 제브라피쉬는 QFDBD 2*AD 유전자 발현용 카세트와 13QUAS 프로모터 하에서 구동하는 hFUS(R521C) 유전자 발현용 카세트를 모두 포함하며, 상기 hFUS(R521C) 유전자 발현용 카세트는 상기 13QUAS 프로모터 하에서 작동하는 이펙터 리포터 유전자를 추가로 포함할 수 있고, 상기 리포터 유전자는 hFUS(R521C) 유전자의 상부 또는 하부에 hFUS(R521C) 유전자와 자가 절단 펩타이드를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 QFDBD 2*AD 유전자 발현용 카세트는 신경계에서 특이적으로 발현될 수 있도록 HuC 프로모터를 포함하여 HuC 프로모터에 의해 QFDBD 2*AD 유전자의 발현이 조절될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 근위축성 측삭경화증 질환의 동물모델을 이용하여 근위축성 측삭경화증 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0038] 본 발명의 스크리닝 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0039] (가) 상기 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0040] (나) 상기 후보물질을 처리한 동물과 후보물질을 처리하지 않은 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델에서 하기 (1) 내지 (4)로 이루어진 근위축성 측삭경화증 질환의 증상 및/또는 상기 질환의 바이오마커 중 하나 이상을 측정하는 단계: 및
- [0041] (다) 상기 후보물질을 처리한 동물이 후보물질을 처리하지 않은 동물보다 근위축성 측삭경화증 질환의 증상이 개선되거나 상기 질환의 바이오마커가 질환이 유도되지 않은 제브라피쉬와 동일 내지 유사한 수준으로 변화한 경우 상기 후보물질을 근위축성 측삭경화증 치료물질로 선별하는 단계.
- [0042] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (나) 단계에서 근위축성 측삭경화증 질환의 증상으로는 운동성 감소 및/또는 신경근접합부에서 탈신경화일 수 있으며, 상기 질환의 바이오마커는 산화 스트레스의 증가, TNF- α 발현의 증가, 및/또는 gria1a의 발현 감소일 수 있다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명의 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 동물모델은 수정 후 5일부터 그 질환이 발병되어 근위축성 측삭경화증의 기전을 포함한 상기 질환을 증상과 진행에 영향을 미치는 물질의 작용 등 연구 수행에 효율 향상 및 속도 가속화에 기여할 수 있다. 또한, 본 발명의 근위축성 측삭경화증 동물모델은 제브라피쉬에서 빠르게 질병을 유도하여 척추동물 기반의 근위축성 측삭경화증 치료제의 대규모 스크리닝이 수 일 내에 가능하며, 나아가 binary expression system을 이용하여 상기 동물모델을 제작함으로써 질환이 유도되지 않는 부모 세대의 안정적 유지를 통해 개체 관리가 용이하고 또한 필요에 따라 원하는 균일한 질환 동물모델을 제작할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 실험을 위해 설계된 Driver line과 Effector line의 DNA constructs 이다.
- 도 2는 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬의 뉴런에서 hFUS 돌연변이 단백질이 세포질에 발현된 것을 형광을 통해 확인한 것이다.
- 도 3은 수정 후 5일 차의 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬와 정상 제브라피쉬의 운동성을 비교하여 평가한 결과이다.
- 도 4a는 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬에서 신경근접합부와 근육의 탈신경화를 확인한 것이며, 도 4b는 상기 결과를 피어슨 상관관계를 이용하여 시냅스 전 마커와 시냅스 후 마커의 연관성을 확인한 것이다.
- 도 5는 수정 후 5일 차의 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬와 정상 제브라피쉬의 산화 스트레스 정도를 비교확인한 것이다.
- 도 6은 수정 후 5일 차의 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬에서 시냅스와 관련된 단백질과 신경염증에 관여하는 TNF의 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 7은 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬를 이용한 약물 스크리닝 실험 계획도이다.
- 도 8은 에다라본을 처리한 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬에서 수정 후 3일차 및 5일차에 운동성을 측정한 결과이다.
- 도 9는 리루졸을 처리한 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬에서 TNF- α 의 발현 감소와 gria1a의 발현 증가를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 본 발명자들은 보다 빠르고 효율적으로 근위축성 측삭경화증 치료제 개발을 위하여 치어(larvae) 시기에 근위축성 측삭경화증의 증상을 나타내는 동물모델을 제작하기 위하여 IQ-system을 이용하여 인간 유래의 FUS 돌연변이 (R521C) 유전자를 과발현시킨 제브라피쉬를 제조하고, 근위축성 측삭경화증 치료제 개발을 위한 약물 후보물질

의 유효성 검증에 상기 동물모델이 효과적으로 작동함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

- [0048] Q-system은 붉은뿔곰팡이 (Neurospora crassa)에서 유래된 유전자 조절 시스템으로서, QF 전사활성자(activator)와 조절자(effector) 서열인 QUAS로 구성되어 있다. Q-system은 제브라피쉬 형질전환에 이용된 종래의 Gal4-UAS system과 유사하게 binary expression system으로서 특정 유전자의 발현 조절을 위해 사용된다. Gal4-UAS system과 달리 Q-system은 프로모터 침묵(promotor silencing)의 영향이 적고 유전자의 발현을 강력하게 촉진시키는 장점이 있으나, QF activator의 독성 문제가 있다.
- [0049] 본 발명자들은 Q-system 단점을 보완하고 보다 강력하게 유전자 발현을 유도할 수 있는 IQ-system을 개발하였다. IQ-system은 QF activator의 독성을 제거함과 동시에 전사 활성 도메인(transcriptional activation domain)을 추가하여 높은 활성을 나타내고, 프로모터에 해당하는 QUAS를 13개 중복시켜 보다 강력하게 유전자 발현을 유도할 수 있다.
- [0050] IQ-system은 binary expression system으로서본 발명자들은 질환을 유도하는 유전자(FUS 돌연변이 유전자)를 발현하는 이펙터 라인과 상기 이펙터 라인의 작동을 조절하는 드라이버 라인을 구분하여 설계하였다. 구체적으로 이펙터 라인(effector line)으로 13개 QUAS가 반복된 프로모터 하에서 작동가능하게 연결된 인간 유래의 FUS 돌연변이 유전자(hFUS(R521C))를 구축하고, 이펙터 라인을 활성화하기 위한 드라이버 라인(driver line)으로서 HuC 프로모터 하에서 작동가능하게 연결된 QFDBD 2*AD 유전자를 구축하였다. 각 라인의 구조는 아래와 같다.
- [0051] Effector Line $\hat{a}$ 13QUAS:hFUS(R521C)
- [0052] Diver Line $\hat{a}$ HuC:QFDBD 2*AD
- [0053] 이펙터 라인의 활성을 확인하기 위해서 Effector Line은 hFUS(R521C) 유전자와 동일하게13QUAS 프로모터 하에서 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하고, 상기 리포터 유전자와 hFUS(R521C) 유전자는 자가절단펩타이드 유전자로 연결되도록 설계될 수 있다.
- [0054] 각 effector line과 diver line은 유전자 클로닝 기술을 이용하여 DNA 플라스미드로 구축하였으며, 각 플라스미드는 유전자전이효소(Transposase)를 이용하여 별도의 제브라피쉬에 형질전환하였다.
- [0055] 각 플라스미드로 형질전환된 개체를 식별하기 위하여 각 플라스미드는 상술한 프로모터와 별도의 프로모터 하에서 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 이때, Diver line 과 effector line의 리포터 유전자는 서로 구별하여 식별될 수 있도록 설계함이 바람직하다. 리포터 유전자의 발현을 통해 확인된 형질전환된 부모 세대의 제브라피쉬 선별하고 서로 교배하여 리포터 유전자를 발현하는 개체를 선별하여 근위축성 측삭경화증 동물모델을 제작하였다.
- [0056] 본 발명에서 드라이버 라인이 작동되는 제브라피쉬는 제1 형질전환 제브라피쉬로 명명하고, 이펙터 라인이 작동하는 제브라피쉬는 제2 형질전환 제브라피쉬로 명명하며, 제1 및 제2 형질전환 제브라피쉬의 교배로 드라이버 라인과 이펙터 라인이 동시에 작동하는 자손 세대의 제브라피쉬는 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬로 명명하였다. 다만, 본 발명의 일 목적이 근위축성 측삭경화증 동물모델을 제공하는 것인바 본 명세서에서 특별한 언급 없는 동물모델은 근위축성 측삭경화증 유도 제브라피쉬를 의미하고, 상기 동물모델은 근위축성 측삭경화증 동물 및 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬 등의 용어와 혼용될 수 있으며, 특별히 부모세대 제브라피쉬 또는 제1 및 제2 형질전환 제브라피쉬라고 지칭하지 않고 단순히 '형질전환 제브라피쉬'로 기재된 것은 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬로 이해할 수 있다.
- [0057] 한편, 본 발명에 있어서 유전자 삽입물 발현용 DNA 카세트는 전사 활성화를 위한 추가적인 구성을 추가로 포함할 수 있으며, 일례로 본 발명자들은 신경세포 특이적으로 유전자 발현을 촉진하기 위하여 VP16 도메인을 암호화하는 영역을 드라이버 라인에 추가하여 이용하였다.
- [0058] 본 발명의 구체적인 실험에서는 이펙터 라인의 활성화와 제1 및 제2 형질전환 제브라피쉬를 시각적으로 확인하기 위하여 아래와 같은 구조의 Effector Line과 Driver Line을 이용하였다(도 1).
- [0059] Effector Line $\hat{a}$ 13QUAS:Zsgreen-p2a-hFUS(R521C)-terminator-Crystallin alpha:mcherry)

- [0060] Driver Line Δ HuC:QFDBD 2*AD-VP16-Crystallin α :EGFP
- [0062] 질병의 기전 내지 치료제 스크리닝 등의 연구에 이용되기 위해서는 안정적으로 균일한 질환동물모델을 제작할 수 있어야 하며, 시간 및 비용적 측면에서 제작된 동물에서 질병이 빠르게 유도되어야 한다. 종래의 제브라피쉬를 이용하여 제조된 근위축성 측삭경화증 동물모델에서 질병이 발병되어 그 증상을 확인하는 데에 약 6개월이 소요되는 반면, 본 발명의 방법으로 제조된 근위축성 측삭경화증 동물모델은 수정 5일 차에 질환의 증상, 조직학적 및 분자적 변화를 나타내어 신약 스크리닝에 유효하게 이용될 수 있음을 확인하였다.
- [0063] 본 발명자들은 제조된 근위축성 측삭경화증 제브라피쉬에 FDA에서 근위축성 측삭경화증 치료제로 승인받은 리루졸(Riluzole)과 에다라본(edaravone)을 처리하여 운동능력 변화를 확인한 결과, 임상에서 확인된 상기 약물의 효능과 동일한 패턴으로 근위축성 측삭경화증 진행의 지연을 확인하였는바, 본 발명의 동물모델이 근위축성 측삭경화증 질환 치료 물질 개발 플랫폼으로서 이용될 수 있음을 검증하였다. 구체적으로 운동성 분석을 통해 스크리닝을 수행하는 경우 일주일 이내에 약물 유효성을 평가할 수 있으며, 48 well plate 당 약 30분 이내에 분석이 가능하다.
- [0064] 본 발명의 근위축성 측삭경화증 동물모델은 Driver Line으로서 HuC 프로모터 하에서 작동하는 AFDDB 2*AD 유전자와 Effector Line으로서 13QUAS 프로모터 하에서 작동하는 hFUS(R521C) 유전자를 포함한다. 상기 Effector Line은 13QUAS 프로모터 하에서 리포터 유전자와 hFUS(R521C) 유전자가 동시에 작동하도록 포함할 수 있으며, 상기 리포터 유전자와 hFUS(R521C) 유전자는 자가절단펩타이드 유전자로 연결될 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 “리포터 유전자”는 본 발명의 일 예에 따른 플라스미드 벡터의 도입 여부 또는 IQ-system의 작동을 모니터링하기 위해 사용되는 단백질을 암호화하는 유전자로서 형질전환된 세포 또는 조직의 손상이 없이 모니터링할 수 있는 유전자라면 제한 없이 사용될 수 있다. 바람직하게는 루시페라제(luciferase), 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein; mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP), 변형된 적색 형광 단백질(modified red fluorescent protein; mRFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP) 또는 증강된 남색 형광 단백질(ECFP) 등일 수 있다. 본 발명자들은 구체적인 실험에서 리포터 유전자로서 mRFP인 mCherry와 mGFP인 ZsGreen을 이용하였다.
- [0066] 본 발명에서 “벡터”는 적당한 숙주세포에서 목적 유전자를 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 벡터 내에 포함된 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 조절 요소, 즉 프로모터 등을 포함하는 유전자 구조물을 말한다. 본 발명에 따른 벡터는 바람직하게는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 또는 바이러스 벡터 등일 수 있으나, 본 발명자들은 구체적인 실험에서 벡터로서 DNA 플라스미드 벡터를 이용하였다.
- [0067] 본 발명에서 “작동 가능하게 연결된(operably linked)”은 일반적 기능을 수행하는 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 본 발명에서 각 구성은 직접적 연결인 것으로 명시하지 않는한 서로 작동 가능하게 연결된 것으로 보며, 본 명세서에서 특정 프로모터에 의해 발현이 조절되는 유전자 삽입물은 '특정 프로모터와 작동가능하게 연결된' 또는 '특정 프로모터 하에서 작동하는' 것으로 기술한다.
- [0068] 본 발명에서 유전자 삽입물, 즉 전이유전자(transgene)와 프로모터의 작동 가능한 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 이용할 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 사용된 “프로모터”라는 용어는 DNA의 일부분으로 전사를 개시할 수 있도록 RNA 중합효소의 결합에 관여한다. 일반적으로 표적 유전자에 인접하여 이의 상류에 위치하며, RNA 중합효소 또는 RNA 중합효소를 유도하는 단백질인 전사 인자(transcription factor)가 결합하는 자리로서 상기 효소 또는 단백질이 올바른 전사 시작 부위에 위치하도록 유도할 수 있다. 즉, 센스 가닥(sense strand)에서 전사하고자 하는 유전자의 5' 부위에 위치하여 RNA 중합효소가 직접 또는 전사인자를 통해 해당 위치에 결합하여 전이유전자에 대한 mRNA 합성을 개시하도록 유도하는 것으로 특정한 유전자 서열을 갖는다.
- [0070] 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.

[0071] 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, 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0072] 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.

[0073] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[실시예 1 : 제브라피쉬 사육 및 관리]

[0077] 본 연구의 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. 본 연구에서는 야생형 제브라피쉬, Tg(13QUAS:Zsgreen-p2a-hFUS(R521C)-terminator-Crystallinalpha:mcherry), Tg(HuC:QFDBD 2*AD-VP16), 및 Tg(13QUAS:Zsgreen-pA) 형질전환 제브라피쉬가 사용되었으며, 성체 (adult) 및 배아 (embryo) 제브라피쉬는 명암주기 14:10 시간, 수온 28.5℃가 유지되는 시스템에서 사육되었다. 형태학적 특징을 정의하기 위하여 제브라피쉬 배아와 치어 (larvae)의 단계는 수정 후 시간 (hours post fertilization, hpf) 또는 수정 후 며칠 (days post-fertilization, dpf)의 형태학적 특징에 따라 정의하여 사용되었다. 신약 후보 물질 및 대조군 약물 처리는 수정 후 9시간부터 Egg water와 함께 처리되었다. 음성 대조군에는 실험군과 동일한 농도의 DMSO가 처리된 Egg water를 이용하였다.

[실시예 2 : Plasmid DNA 제조]

[0080] 인간 FUS 돌연변이 유전자(hFUS(R521C))를 제작하기 위해 중합효소 연쇄반응(PCR, KOD FX, TOYOBO)을 이용하여 야생형의 인간 FUS 유전자(pENTR4_FUS Plasmid #26366, addgene) 개방형 해독틀(open reading frame, ORF)의 1561번째 염기인 사이토신을 티아민으로 치환시켰다. 중합효소 연쇄반응을 위해 사용된 FUS ORF 프라이머는 다음과 같다.

표 1

[0081]	hFUS ORF forward primer	5' -atggcctcaaacgattatac-3'
	hFUS(R521C) ORF reverse primer	5' -ttaatacggcctctccctgcaa-3'

[0082] hFUS(R521C) 유전자를 포함하는 IQ-system Effector diver 플라스미드를 제작하기 위하여 선행연구 (Communications biology vol. 4,1 1405. 16 Dec. 2021)에서 제공된 13QUAS:Zsgreen-p2a-terminator-Crystallin alpha:mcherry 플라스미드 벡터를 사용하였다. One-Step sequence- ligation-independent cloning (SLIC) 기법을 사용하여 hFUS(R521C) 유전자를 벡터의 p2a 이후, terminator 이전에 삽입하였다. 상기 플라스미드 벡터에서 13QUAS 프로모터는 서열번호 2의 염기서열로 이루어졌으며, terminator는 서열번호 4의 염기서열로 이루어졌다. 플라스미드를 자르기 위해 사용한 효소는 BglIII(#R0144S, NEB)이다. 삽입될 유전자를 제작하기 위해 사용된 프라이머는 다음과 같다.

표 2

[0083]	SLIC_hFUS(R521C)_F	5' - GAGAACCCTGGACCTAGATCtATGGCCTCAAACGATTATAC - 3'
	SLIC_hFUS(R521C)_R	5' - ATACCGTCGACCTCGAGATCTTAATACGGCCTCTCCCTGCA -3'

[0084] 플라스미드에 hFUS(R521C) 유전자를 삽입하기 위해 T4 DNA polymerase(#M0203S, NEB)를 사용하였다. 제작된 Effector 플라스미드 DNA는 아래의 구조를 갖는다.

[0085] plasmid : 13QUAS:Zsgreen-p2a-hFUS(R521C)-terminator-Crystallin alpha:mcherry

[0087] 실시예 3 : 형질전환 제브라피쉬 제작

[0088] 신경세포 특이적으로 ALS 유발 유전자 hFUS(R521C)를 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 제조하기 위해 IQ-system의 effector line을 제작하였다. 실시예 2에서 제작한 Effector 플라스미드를 제브라피쉬 수정란 1세포기에 유전자전이효소(Transposase)와 함께 미세주입(microinjection)하여 성체(Founder, F0)로 키웠고, 야생형 제브라피쉬와 교배하여 태어난 제브라피쉬(F1) 중 눈에서 적색형광단백질(mcherry)를 발현하는 개체를 선별하여 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다.

[0089] 드라이버 라인(driver line)인 HuC:QFDBD 2*AD-VP16-Crystallin:EGFP로 형질전환된 제브라피쉬와 교배하여 그 자손세대로부터 신경세포 특이적으로 hFUS(R521C)를 과발현하는 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다(도 1). 드라이버 라인에서 QFDBD 2*AD 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어졌으며, VP-16은 서열번호 3의 염기서열로 이루어졌다.

[0091] 실시예 4 : 절편 면역조직염색법

[0092] 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 가라 앉은 블록을 물기를 제거해 플라스틱 mold 위로 올린 후, 이를 메틸 부탄올 위에서 얼렸다. 얼린 블록은 저온 절편기 (cryostat microtome)를 이용해 14-16 μ m 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 μ l 가 올려진 커버슬라이드로 슬라이드 글라스를 덮어준 후 형광 사진 촬영을 수행하였다. 실험에 사용 한 1차 및 2차 항체는 다음과 같다.

[0093] 1차 항체: 토끼 항-FUS 항체 (rabbit anti-FUS, 1:1000, Invitrogen, Cat. No. PA552610). 2차 항체: 568-형광 시료가 부착된 2차 항체 (Alexa 568-conjugated secondary antibodies, 1:1000, Invitrogen, Cat. No. A-11011). 세포핵 염색시약: DAPI (D1306, Invitrogen).

[0095] 실시예 5 : 온조직-고정 면역조직염색법

[0096] 수정 후 1 일차부터 5일차까지의 제브라피쉬에 PTU 처리하였다. 제브라피쉬 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 치어는 PBS로 30분 정도 씻어준 후

[0097] 아세톤에 넣어 -20℃에서 7분간 반응시켰다. 이 후 PBS로 2회 씻어주고 10mg/ml의 collagenase에 40분간 반응시

켰다. 이후 PBS로 2회 씻어준 후 4% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)/PBS (1X phosphate buffered saline)에 넣어 20분간 고정 시켰다. 이 후 2회 PBS로 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 치어를 씻어준 후 blocking solution에 1시간 반응시켰다. 그 후 2차 항체를 blocking solution에 희석해 4℃에서 12~18시간 이상 반응시켰다. 그 후 PBS로 1-2시간 동안 씻어준 후 1.5% low melting agar에 고정 후 형광 사진 촬영을 수행하였다. 실험에 사용 한 1차 및 2차 항체는 다음과 같다. 1차 항체: 마우스 항-acetyl tubulin 항체(mouse anti-acetyl tubulin, 1:1000, Sigma-Aldrich T6793-2ML) 2차 항체: 568- 형광 시료가 부착된 2차 항체 (568-conjugated secondary antibodies, 1:1000, Invitrogen, Cat. No. A-11004).

[0098] 신경근접합부 염색은 위와 동일한 염색법을 통해 진행하였다. 단, 1차 항체는 마우스 항-SV2 항체(SV2, 1:50, DSHB)를 사용하였다. 2차 항체는 568- 형광 시료가 부착된 2차 항체 (568-conjugated secondary antibodies, 1:1000, Invitrogen, Cat. No. A-11004)를 사용하였으며, 알파-벵가로톡신(α -bungarotoxin, Alexa Fluor 647 conjugate, 1:1000, Invitrogen, B35450) 과 함께 처리하였다.

[0100] 실시예 6 : 제브라피쉬 행동분석

[0101] 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, 동일 부모 개체(parents)로부터 얻은 자손 개체(sibling)들을 이용하여 실험하였다. 야생형 개체에서 운동 능력이 활발해 지고, 질환모델에서의 운동능력 저하가 관찰되는 시점인 수정 후 5일 단계에서 행동분석 실험이 수행되었다. 치어는 28.5℃에서 14시간 빛/10시간 어둠 일주기를 가지는 사육실에서 키웠고, 실험이 수행되기 3시간 전에 48 well-plate으로 옮겼다. 치어의 운동성(locomotion) 측정을 위해서 수정 후 5일 단계 치어를 10분 동안 빛이 있는 조건에서 적응시킨 후, 5분동안 동일한 조건에서 녹화하였다.

[0103] 실시예 7 : 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응 분석

[0104] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응은 LightCycler 96 기기(Roche)를 이용하여 수행하였다. 실험에 사용된 cDNA는 행동실험을 수행했던 단계와 동일하게 수정 후 5일 단계의 야생형 자손개체와 질환모델 치어에서 추출된 RNA로 합성되었다. 주형 cDNA 2.5 μ l, 0.2 μ M 프라이머, 2X Fast Start Essential DNA Green Master Mix (Roche)을 포함한 각 반응 혼합물은 95 $^{\circ}$ C 10분, 95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 10초의 40주기(cycles)으로 이루어진 프로그램 단계를 거쳐 증폭되었다. β -actin, tumor necrosis factor α (tnfa), synaptosome associated protein 25a (snap25a), glutamate receptor (gria1a) 유전자의 발현을 측정하였다.

[0106] 실시예 8 : 활성산소 스트레스 농도 분석

[0107] 활성산소 농도 분석은 분석프로그램 SoftMax Pro가 포함된 SpectraMax M2 기기(molecular devices)를 이용하여 수행하였다. 수정 후 1 일차부터 5일차까지의 제브라피쉬에 PTU 처리하였다. 수정 후 5일차에 CellROX Deep Red Reagent(C10422, invitrogen)를 5 μ M 농도로 30분간 처리하였다. 마취제 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, 200 mg/L (MS222, Sigma))를 이용해 마취시킨 후 96 well plate에 한 칸 당 15마리씩 넣어 640/665nm의 형광을 측정하였다.

[0109] 실시예 9 : 통계적 분석

[0110] 모든 통계분석은 GraphPad Prism 7 소프트웨어 프로그램(GraphPad Software)을 사용하여 분석하였다. 두 집단 간의 비교에서는 모집단이 정규분포일 때 스튜던트 비쌍체 t-검사(Student unpaired t-test)를 수행하였고, 모집단이 비정규분포일 때 만-휘트니 U 검사(Mann-Whitney U test)를 수행하였다. 세 집단 이상의 비교에서는 일원분산분석(one way ANOVA)를 수행하였고, 사후검정은 Tukey 검정을 수행하였다. 모든 통계 데이터에서 통계적 유의성은 P 양측 검증 (two-tailed probability)이 0.05미만 일 때 유효성을 가지는 것으로 보았다.

[0112] [실험예]

[0113] 실험예 1. 근위축성 측삭경화증 질환 모델의 검증

[0114] 선행연구를 통해 정상 세포에서는 핵 안에 위치하여야 하는 FUS 단백질이 돌연변이 FUS 유래 ALS 환자의 뉴런에서는 FUS 단백질이 세포질 내에 잘못 위치 한다는 것이 알려졌다. 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 질환모델에서 역시 뉴런의 세포질에 돌연변이 인간 FUS 단백질이 발현되어 있다는 것을 확인하였다(도 2).

[0116] 근위축성 측삭경화증의 가장 대표적인 증상인 운동성의 감소는 ALS 환자와 다른 질환모델에서 공통적으로 관찰되는 가장 중요한 특성이다. 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 질환모델의 행동분석을 통해 수정 후 5일차에서 대조군에 비해 유의미하게 감소된 운동성을 확인하였다(도 3). 또한 이러한 운동성의 감소는 다른 질환모델에서는 성체 때 발생하는 반면에 본 발명에서 제작한 질환 모델의 경우 수정 후 5일 차의 이른 시기에 질병을 발병시켰다.

[0118] 많은 연구에서 근위축성 측삭경화증 환자와 마우스 질환 모델에서 신경근접합부의 장애와 근육의 탈신경화가 보고되었다. 동일한 현상을 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 질환모델에서 확인 가능했다. 수정 후 5일차의 제브라피쉬에서 시냅스 전 마커와 시냅스 후 마커의 연관성을 측정하여 본 결과 대조군에 비해 질환모델에서 감소된 연관성을 보여주는을 확인할 수 있었다(피어슨 상관관계(pearson correlation))(도 4). 이는 신경근접합부에서의 탈신경화가 일어났음을 보여주는 데이터이다.

[0120] 근위축성 측삭경화증 환자의 사후조직에서 높은 산화스트레스가 검출된다. 또한 미토콘드리아 장애에 의한 증가된 산화 스트레스는 근위축성 측삭경화증의 기전 연구에서 주목받는 증상이다. 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 질환모델에서 수정 후 5일차에 증가된 활성산소에 의한 산화스트레스를 확인할 수 있다(도 5)

[0122] 근위축성 측삭경화증을 포함하는 신경퇴행성질환은 신경염증이 발생한다고 알려져 있다. 신경염증에 관여하는 사이토카인 중 $TNF\alpha$ 는 실제 근위축성 측삭경화증 환자와 마우스 모델에서 매우 증가한다고 알려져 있다. 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 질환모델에서 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응분석을 통한 $TNF\alpha$ 의 발현양을 확인해본 결과 대조군에 비해 유의하게 증가한 것을 확인하였다(도 6). 이는 염증 반응의 증가를 나타낼 수 있는 데이터이다. 이외에도 근위축성 측삭경화증과 관련이 있다고 알려져 있는 유전자들의 발현 양을 확인해본 결과 시냅스와 관련된 단백질들의 RNA의 발현 균형이 무너진 것을 확인할 수 있었다. 시냅스의 RNA 불균형은 기존의 근위축성 측삭경화증 연구에서 보고된 적 있다.

[0124] 실험예 2. 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 질환 모델을 이용한 약물 유효성 분석

[0125] 실험예 1에서 수행된 실험을 응용하여 신약 스크리닝을 위한 약물 유효성 분석이 가능하다. 근위축성 측삭경화증에 질병 진행을 억제시키는 약물을 이용하여 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 근위축성 측삭경화증 질환모델에서의 유효성을 평가하였다. 수정 후 3일차부터 5일차까지의 제브라피쉬에 약물 처리하였다. 0.1% 다이메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)가 포함된 배아 배지에 약물을 용해시켜 처리하였다. 이 후 수정 후 3일차와 5일차의 제브라피쉬에서 분석을 진행하였다(도 7). 약물은 FDA 승인된 근위축성 측삭경화증 치료제인 리루졸(Riluzole) 5uM, 에다라본(edaravone) 10uM 을 사용하였다.

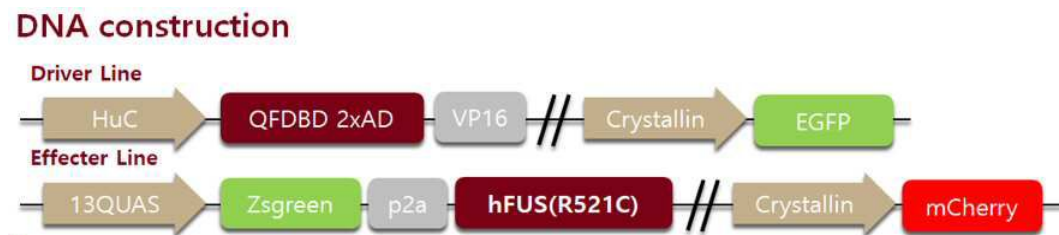
[0127] 본 발명에서 제작한 제브라피쉬 질환모델을 이용하여 운동능력 회복에서의 약물 유효성 평가를 진행하였다. 수정 후 3일차의 질환모델에서는 유의미한 운동능력 감소가 발생한 것에 반해, 에다라본 약물을 처리한 그룹의 운동능력은 통계학적으로 유의미한 수준으로 회복한 것을 확인할 수 있다. 하지만 수정 후 5일차의 제브라피쉬에서 약물을 처리하지 않은 질환모델과 동일한 수준으로 운동능력의 감소가 발생한 것을 확인할 수 있다(도 8).

이러한 결과는 에다라본이 질환모델에서의 질병의 진행을 유의미하게 지연시킨다는 것을 의미한다. 이는 실제 임상에서의 에다라본 효능과 동일하다. 이 실험 방법을 사용하여 약물 유효성 평가를 진행한다면, 현재 시판되고 있는 약물보다 더 좋은 치료 효과를 나타내는 신약을 스크리닝할 수 있다.

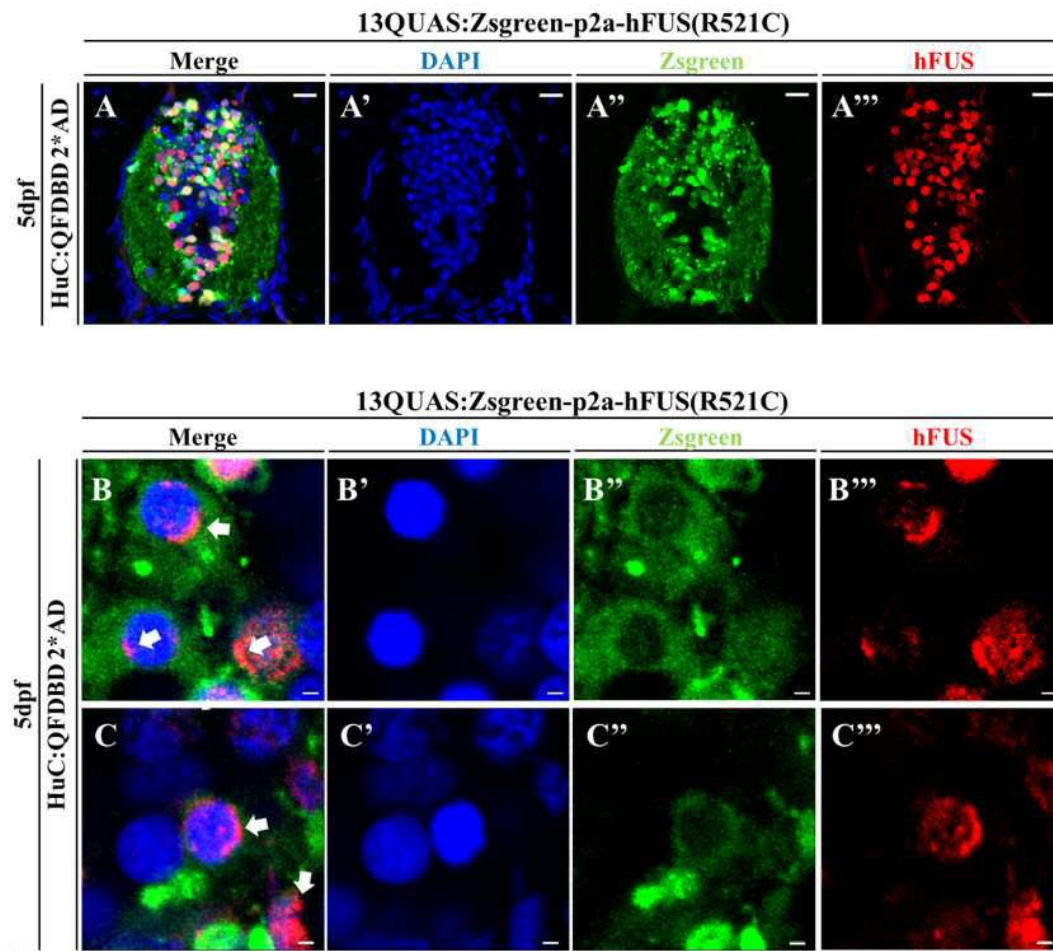
- [0129] 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응 분석을 통해 신경염증에 관여하는 사이토카인인 TNF α 와 시냅스 관련 유전자 발현 양을 확인하여 근위축성 측삭경화증 치료제인 Riluzole의 유효성을 평가하였다. 그 결과 TNF α 와 gria1a의 발현 이상이 약물을 처리하지 않은 그룹에 비해 유의미하게 회복된 것을 확인할 수 있었다(도 9).
- [0131] 위와 같은 방식으로 신약 후보 물질들의 유효성을 평가할 수 있으며, 이외에도 실험예 1에서 수행되었던 실험들에서 나타났던 질환모델의 장애 정량법을 응용하여 약물 유효성을 평가할 수 있다.
- [0133] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0134] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

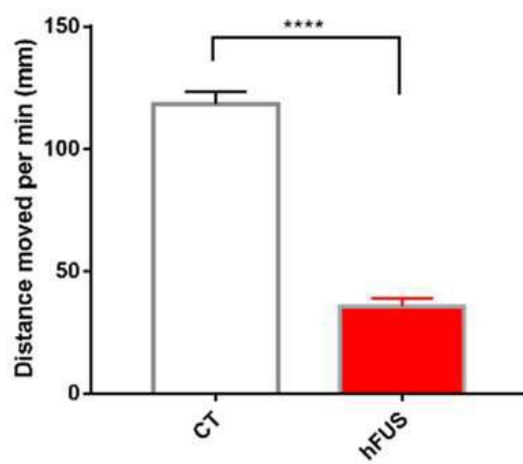
도면1



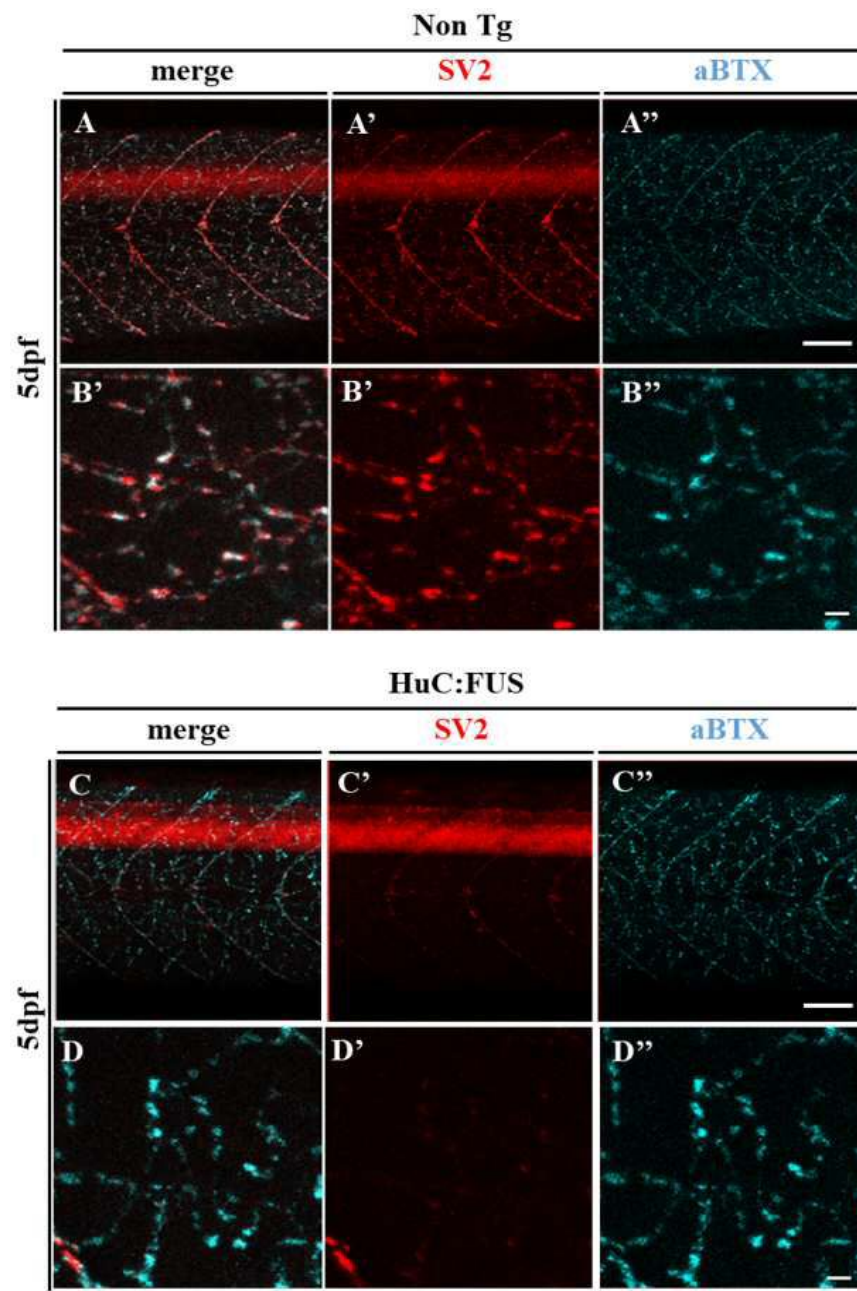
도면2



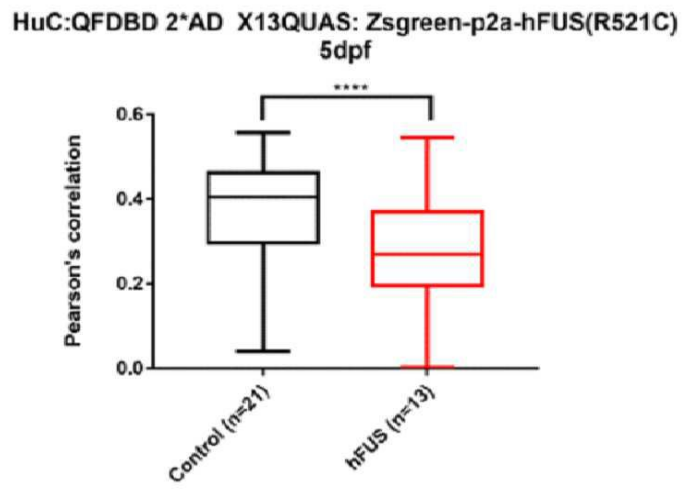
도면3



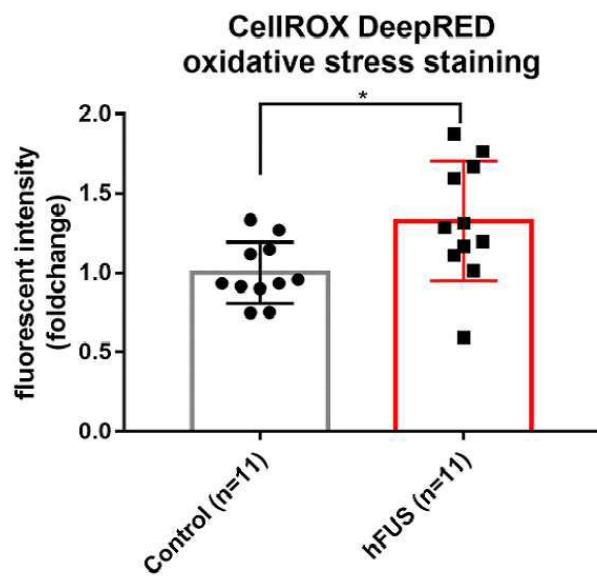
도면4a



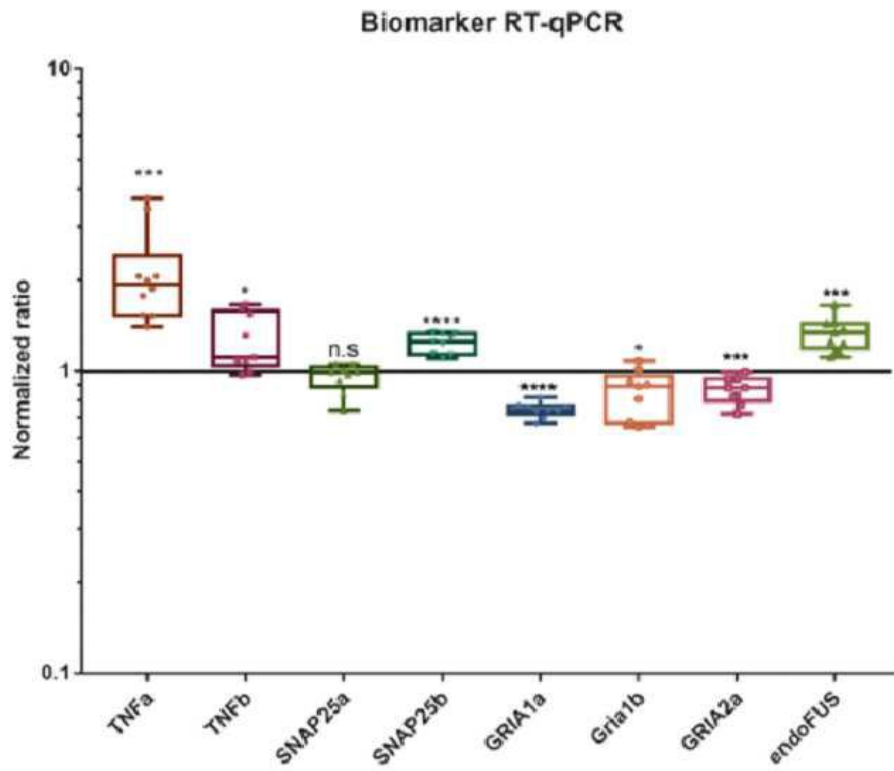
도면4b



도면5



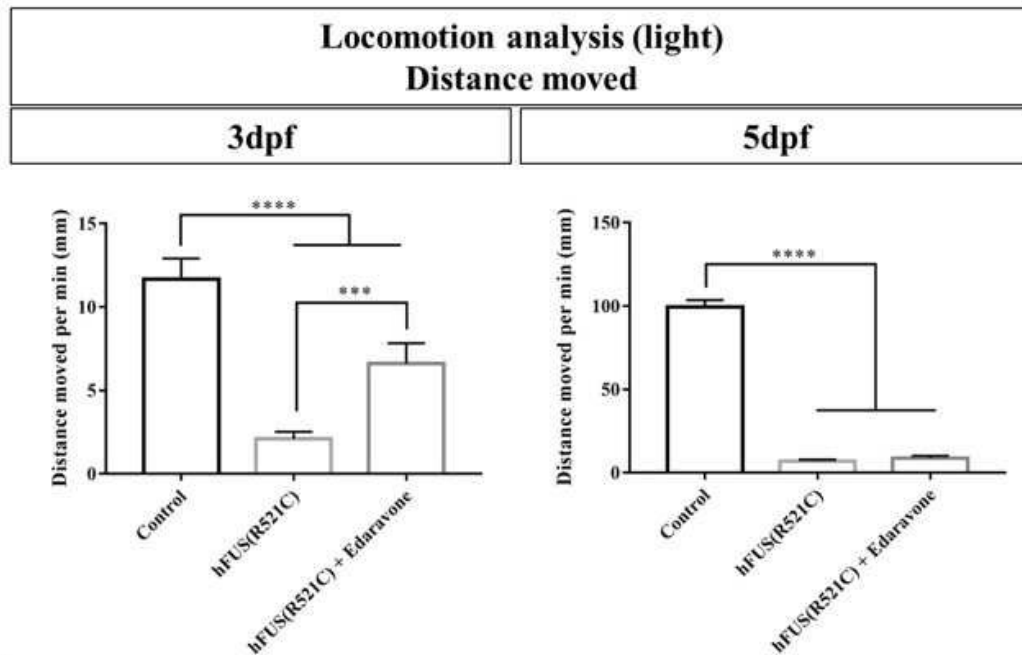
도면6



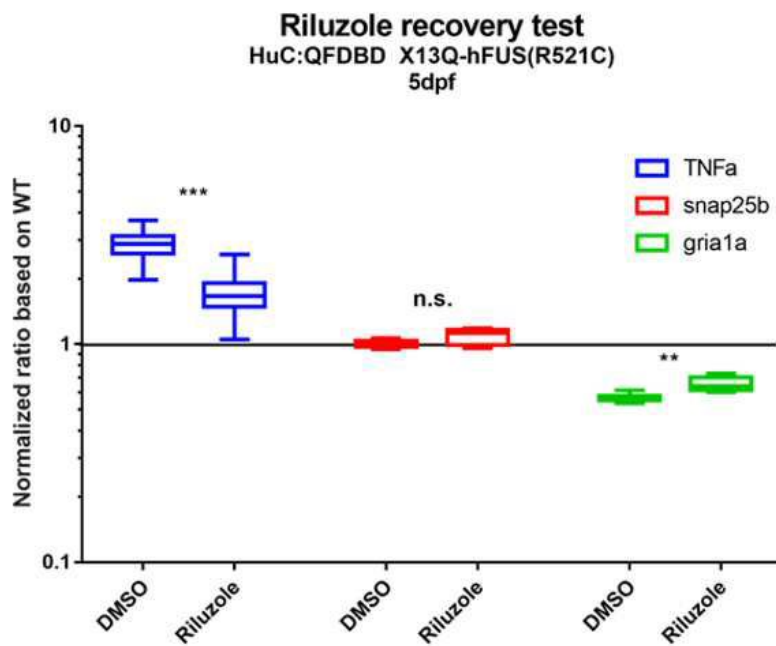
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea University Research and Buisness Foundation
- <120> Demyelinating disease animal model using transgenic zebrafish and manufacturing method thereof
- <130> APC-2022-0327
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> QFDBD 2*AD
 <400> 1
 atgccgccta aacgcaagac actcaatgcc gctgccgaag ccaatgccca cgctgatggc 60
 catgctgatg gcaatgctga tggatcatgtc gctaacctg cagcaagcag caacaacgcc 120

 cgttttgcgg acttgaccaa cattgacaca cccggcctcg gccctaccac gacgacgtta 180
 ctgtctgagc ccgtctgttc gaaacgccag agagtctcga gggcctgtga tcagtgtcga 240
 gctgcacgtg aaaagtgtga tggaaatccag ccggcttgct tcccctgtgt gtcgcagggc 300
 cggctcgtga cctaccaggc cagtcccaag aagcgaggag tccagacggg ctacatccgc 360
 actctcgaac tggtcttgcc ttggatgttc gagaacgttg cccgcagcga ggacgccctc 420
 cacaatcttt tggtcctgta tgctggccag ggcagcgtc tcctggctcg caaagactcg 480
 cctgctgcag aagccctgca tgcaagatgg gcgacgagtc gagtcaaca aagcatcacc 540

 cgctctctct caggtcagc cgcacaagat ccactgaag acggccaatc cccgtccgaa 600
 gacataaatg tccaagatca ggccgcacaa gatccatctg aagacggcca atccccgtcc 660
 gaagacataa atgtccaaga t 681
 <210> 2
 <211> 244
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 13QUAS promoter
 <400> 2
 gggtaatcgc ttatcctcgg ataaacaatt atcctcacgg gtaatcgctt atccgctcgg 60
 gtaatcgctt atcctcgggt aatcgcttat cctcgggtaa tcgcttatcc tcggataaac 120

 aattatcctc acgggtaatc gcttatccgc tcgggtaatc gcttatcctc ggataaacia 180
 ttatcctcac gggtaatcgc ttatccgctc gggtaatcgc ttatcctcgg gtaatcgctt 240
 atcc 244
 <210> 3
 <211> 126
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VP16

<400> 3

caggccgcac aagatccatc tgaagacggc caatccccgt ccgaagacat aaatgtccaa	60
gatcaggccg cacaagatcc atctgaagac ggccaatccc cgtccgaaga cataaatgtc	120
caagat	126

<210> 4

<211> 1205

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> terminator

<400> 4

ctagtaatta agtctcagcc accgttaact gaacatgtca aaacctgtgg agactgttga	60
gatttgatgt tctgaaaaga taaagcctat aaataaaatg ttgcccaaatt ttcctgcctg	120
atgtttttct ttgtctttgc tacatggctt tgctgctcgg atcggtcac tctgtgtatg	180
ccacgttcac ttgtactct cttcttcacg gtaggtttat ttttttaga tgtgcagtta	240
gtttctgtga aataacacac cacacactga tattgtctgt gcattgactt ggtgagtga	300
cattgttttt gatcttgaca ttttatatt tgattgatca ggtgaactgt gtgaatctaa	360
agtgctccat acagatgttc tgcatgaaa atattctcat tttattagtga gaagtgagt	420
tatgccacat ccaatcaatt tcagcaaaca cccagtatg attaatgca aaaaaatgaa	480
ggtatcaaac acgcattact actttgcagt taaatatatta acatttattc caacacgaaa	540
aaaagcagta aataacactt tgacaaacac gtcaggacat cttatTTTTg tcaccctcac	600
aggcaattta gtataatata ttatatatat atatataatca tataataata ttcagtataa	660
tatatatata tatatcatat tataatattc agtataatat aaaacacaaa cacatatatg	720
tataatataa tataacattt ttatttattg agatgcctct atggaccgtg ttataagaag	780
taaagatcag gagaagtaaa catgaagtgt aattatgaat actgatgtta aattaagcta	840
tgatgagttt tctactgttaa ttaccatct caattaaatg ttgatgcctc catgaccaag	900
ttaagcagat gagactgaga caactgtaga agacaagatg ttcactttgc tgaatatagc	960
tggcttgaca gttatctatg actctataaa tatatatata tttttttttt tataaaatga	1020
tttttttata actatatatc cattttctcag acagggtgctt catatccctc actcccgtag	1080
ctgtccatgc tggatctgtc cccgttggtt ttaaaaagct aaataagtta ttaacatgac	1140

tgcatccagc gagccaaacc tgtctggtgt acagctacca gagaagcttg agatcctagt 1200

caccg 1205