(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/11

(45) 공고일자 2004년04월28일
(11) 등록번호 10-0429397
(24) 등록일자 2004년04월16일

(21) 출원번호 10-2000-0050017
(22) 출원일자 2000년08월28일

(65) 공개번호 10-2002-0016986
(43) 공개일자 2002년03월07일

(73) 특허권자 주식회사 티지 바이오텍
서울 강동구 성내1동 452-2

허태린
대구 수성구 신매동 동서타운아파트 255동107호

(72) 발명자 허태린
대구 수성구 신매동 동서타운아파트 255동107호

박해철
대구광역시수성구신매동시지천마타운222동1005호

김철희
경상북도칠곡군왜관읍4리262번지

김형석
대구광역시수성구범어4동219-34

(74) 대리인 이원희

심사관 : 김재현

(54) 신경특이적 유전자 발현을 조절하는제브라피쉬의HuC프로모터 유전자, 이를 이용한 형광성신경을 갖는 형질전환 동물 및 그의 제조방법, 그리고 이를 이용한 신경변이체 동물의 선별방법

요약

본 발명은 신경특이적 발현을 조절하는 제브라피쉬(zebrafish)의 HuC 프로모터 유전자, 이를 이용하여 형광단백질 유전자를 신경특이적으로 발현하는 형질전환동물 및 그의 제조방법, 그리고 상기 형질전환동물을 이용한 신경 돌연변이체의 선별방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신경세포에서 특이적으로 발현하는 HuC 유전자의 프로모터 부위를 분리¡동정하여 이의 염기서열 및 조절인자들을 분석함으로써 상기 HuC 프로모터가 신경세포의 분화를 조절하는 기작을 확인하고, 이를 이용하여 형광 단백질인 GFP(green fluorescence protein) 유전자가 신경특이적 발현되어 살아있는 상태에서 신경계 전체를 가시적으로 확인할 수 있는 형질전환 제브라피쉬를 제조하고 상기 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 신경계에 유전자변이가 유발된 신경 돌연변이체를 단시간내에 가시적으로 선별하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 Huc 프로모터는 신경계의 분화를 조절하는 기작을 연구하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 상기 HuC 프로모터 및 이를 이용한 신경특이적 GFP 발현 형질전환 제브라피쉬는 상세한 신경세포의 구성과 형성과정 및 신경세포와 신경조직의 분포확인을 가능케 할 뿐 아니라 신경 돌연변이체를 다양한 제브라피쉬 돌연변이체 집합들로부터 살아있는 상태에서 손쉽게 선별, 분석하는데 이용될 수 있다.

대표도

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 3-체절 단계(3-somite stage)에서, 신경판내의 HuC(**A**)와 DeltaB(**B**)의 발현을 비교한 사진이고,
도 2 는 HuC 유전자의 UTR 부분을 포함한 5' 말단의 염기서열 및 프로모터의 특성을 나타낸 것이고,
도 3 은 프라이머 신장법에 의하여 HuC 유전자의 전사개시 부위를 밝힌 사진이고,
도 4 는 제브라피쉬 배(embryo) 상태에서 HuC 프로모터의 기능을 밝히기 위하여 제조된 결실 돌연변이의 구조와 상기 결실 돌연변이 도입시 나타나는 신경, 근육 및 기타 조직내의 GFP(green fluorescence protein) 발현양상을 나타낸 모식도이고,
도 5 는 살아있는 48시간 제브라피쉬 배에서 HuC 프로모터의 신경 특이적인 조절 양상을 GFP의 발현을 통하여 나타낸 것으로 상단부가 등쪽이고 하단부가 배쪽인 사진이고,
A : 형광상(fluorescence image) 및 광-필드 상에 의해 나타난 GFP 형광
B : 종뇌부분(telencephalic cluster), 망막 신경절 뉴우런(retinal ganglion neuron), 연수 섬유속(medial longitudinal fasciculus) 및 배측 섬유속(dorsal longitudinal fasciculus)의 GFP의 발현 양상
C : 3차 신경절 뉴우런(trigeminal ganglion neuron) 및 Rohon-Beard 뉴우런에서의 GFP 발현양상
D,E : Rohon-Beard 엑손의 측면돌기 및 척수의 배측 섬유속에서의 GFP 발현양상
ey : 눈 mlf : 연수섬유속 rb : Rohon-Beard
rg : 망막 신경절 tc : 종뇌부 tg : 3차 신경절
도 6 은 살아있는 48시간 제브라피쉬 배에서 HuC 프로모터 결실 돌연변이 콘스트럭트의 기능적 분석을 위한 GFP 발현양상을 나타낸 사진이고,
A : 1세포기에 △Hind가 도입된 배
B : 1세포기에 △Bst가 도입된 배
C : 1세포기에 △Sac가 도입된 배
D : 4세포기에 △Sac가 도입된 배
도 7 은 살아있는 형질전환 제브라피쉬의 뉴우런에서 발현되는 GFP를 나타낸 사진이고,
A : 24시간 이형접합 형질전환체의 뉴우런에서 나타나는 GFP 형광의 측면사진
B : 24시간 동형접합 형질전환체의 뉴우런에서 나타나는 GFP 형광의 측면사진
C : 두개골 신경절(*) 및 배쪽 운동신경절(→)
D : 형질전환 제브라피쉬 60시간 배의 척수 측면사진
rb; Rohon-Beard 세포 co; 연합 뉴우런 mo; 원시 운동뉴우런
도 8 은 동형접합 형질전환 제브라피쉬 배에서의 시간적, 공간적인 GFP 발현양상을 나타낸 사진이고,
A : 11시간 배의 GFP의 발현양상을 나타낸 등쪽 사진
B : 11시간 배의 합성 안티센스 RNA를 이용한 조직내 전슬라이드법에 의하여 확인된 HuC mRNA 전사체를 나타낸 등쪽 사진
C : 전슬라이드 면역염색법에 의하여 나타난 아세틸화 α-튜블린 발현의 측면 사진
D : 종뇌부(tc), 전연합(ac), 골단부(ec), 후연합(pc), 후연합관(tpc), 후시신경 연합(poc) 및 후시신경 연합관(tpoc)에서 항-GFP 항체에 의해 확인되는 24시간 배의 GFP 발현을 나타내는 측면사진
E : 후각판에서의 GFP 발현을 나타내는 전면 사진
F : 연수섬유속(MLF) 및 그 핵(nMLF)의 GFP 발현을 나타내는 등쪽 사진
G : 후뇌의 3차 신경절(tg) 및 소편(v)에서 GFP 발현을 나타내는 등쪽 사진
도 9 는 살아있는 HuC-GFP 형질전환 mib 돌연변이 제브라피쉬의 배를 나타낸 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신경특이적 발현을 조절하는 제브라피쉬(zebrafish)의 HuC 프로모터 유전자, 이를 이용하여 형광단백질 유전자를 신경특이적으로 발현하는 형질전환동물 및 그의 제조방법, 그리고 상기 형질전환동물을 이용한 신경 돌연변이체의 선별방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신경세포에서 특이적으로 발현하는 HuC 유전자의 프로모터 부위를 분리¡동정하여 이의 염기서열 및 조절인자들을 분석함으로써 상기 HuC 프로모터가 신경세포의 분화를 조절하는 기작을 확인하고, 이를 이용하여 형광 단백질인 GFP(green fluorescence protein) 유전자가 신경특이적 발현되어 살아있는 상태에서 신경계 전체를 가시적으로 확인할 수 있는 형질전환 제브라피쉬를 제조하고 상기 형질전환 제

브라피쉬를 이용하여 신경계에 유전자변이가 유발된 신경 돌연변이체를 단시간내에 가시적으로 선별하는 방법에 관한 것이다.

유전자 발현에 있어서 전사(transcription)의 조절은 외부신호에 대한 신속한 반응과 발생과정의 확립에 있어서 매우 중요하다. 유전자 발현의 시간적 및 공 간적 발현양상의 조절은 전사조절인자 단백질들이 유전자 프로모터(promoter) 근처에 존재하는 특정 DNA 서열부위를 인식하여 전사 RNA(messenger RNA)의 전사를 특이적으로 조절하여 이루어지게 된다. 따라서, 특정 유전자가 특정 조직이나 시기에만 발현되도록 하기 위해서는 유전자의 프로모터 및 이들 주위에 존재하는 유전자 전사조절인자 단백질의 결합부위가 매우 중요하다.

유전자 정보로부터 이루어지는 단백질 생합성의 조절은 상기의 전사인자에 의한 조절 외에도 유전자로부터 생성된 mRNA의 안정성을 조절하는 단백질 및 mRNA를 세포질로 이동시키거나 혹은 세포질 내에서도 특정 위치로 운반하는 단백질들의 작용들에 의해서도 이루어진다. 이런 작용을 하는 단백질들은 mRNA의 특정 부위를 인식하는 모티브를 갖고 있으며 이들의 유전자도 조직특이적 또는 발생단계에 따라 시기특이적으로 발현된다(Burd and Dreyfuss, 1994) .

HuC 유전자는 척추동물의 신경에서 특이적으로 발현되는 유전자군에 속하며, 신경계의 발생과 유지에 절대적으로 필요한 유전자인 초파리의 elav 유전자와 상동성이 높은 것으로 알려져 있다(Good, 1995; Kim et al., 1996). 척추동물의 HuC 단백질의 기능은 아직까지 잘 알려져 있지 않으나, HuC 단백질이 다양한 전사요소 유전자 및 사이토카인 유전자들의 mRNA 3'-말단의 비번역 지역(untranslation region, UTR)에 존재하는 AU 서열이 많은 부위에 결합할 수 있다는 것이 밝혀짐으로써 HuC 단백질이 후기 체세포 분열 및 척추동물의 신경계 유지에 있어 중요한 기능을 하는 것으로 알려졌다(Levine et al., 1993; King et al., 1994; Liu et al., 1995; Ma et al., 1996b; Chen and Shyu, 1995).

초파리의 elav 유전자는 신경계의 발생과 함께 신경계의 유지에 필수적인 유전자로서 신경세포 특이적으로 발현하는 RNA 결합 단백질로서는 처음 발견된 것이다. elav 유전자는 RNA 결합 모티브의 존재에 기초하여 동정되었는데, 이는 상기 단백질이 신경의 RNA 대사와 연관이 있음을 제시하여 준다(Robinow et al., 1988). 항체를 이용한 발생 전 과정에서의 elav 단백질의 연구 결과, elav 유전자는 1) 초기 신경이 생성될 때의 시간대와 동일한 시간대에 발현되어 나타나고, 2) 발생과정이 진행되면서 중추신경계와 말초신경계 전반에 걸쳐 나타나며, 3) 핵안에서 생성되고, 4) 신경아세포(neuroblast)나 신경교(glia)에서는 발견되지 않음이 밝혀졌다(Robinow et al., 1988, 1991). 이러한 결과들은 elav 유전자가 적절한 신경의 발생과 유지에 요구되는 기능을 가진 하우스키핑(housekeeping)의 역할을 수행함을 제시하고 있다.

신경세포의 초기 분화시점에서부터의 이러한 필요성으로 인하여, elav는 초기 신경 선별표지로서 이용되어 왔고, 그의 발현양상에 대한 연구는 초파리에서의 초기 신경분화를 조절하는 세포적, 분자적 및 유전적 연관관계를 밝히는 데 도움이 되어왔다(Campos et al., 1987; Robinow and White, 1988). 최근 초파리가 척추동물, 특히 재브라피쉬 및 제노퍼스(Xenopus)와 초기 신경세포 분화를 조절하는 기작이 동일함이 밝혀지면서, elav 유전자와 척추동물에서 상동성이 높은 HuC 유전자가 제브라피쉬에서 초기 신경분화의 연구를 위한 유용한 도구로 이용될 수 있음이 제시되었다(Kim et al., 1996).

제브라피쉬에서 초기 신경세포들은 신경판의 3부분으로 분포된다. 상기 각 부분의 일부세포들은 HuC를 발현시키고 신경세포로 분화된다. 기본적인 핼릭스-루프-핼릭스(basic helix-loop-helix, bHLH) 전사 요소인 뉴로제닌 1(neurigenin 1, ngn1)의 발현은 전체 신경세포 분포위치 중에서 세포가 신경세포로 분화되는 잠재성을 가지는 곳에서만 제한적으로 나타난다(Blader et al., 1997; Kim et al., 1997; Korzh et L., 1998). 그러나, ngn1은 주변 세포에서 활성화되어 수용체인 Notch와 결합함으로써 이들 세포의 ngn1 발현을 다시 감소시키는 억제 리간드인 DeltaA의 발현을 유도한다. 이러한 억제 피이드백(feedback)의 결과로, 세포의 특정부분만이 ngn1 및 DeltaA의 발현을 높은 수준으로 유지하게 된다(Appel and Eisen, 1998; Haddon et al., 1998). 그리고, 세포에서는 신경의 운명에 관여하는 다른 Delta 유사 유전자인 DeltaB 및 신경세포로의 안정적인 분화를 야기하는 Myt1, Zcoe2와 같은 유전자의 발현이 시작된다(Bellefroid et al., 1996; Bally-Cuif et al., 1998). 이러한 세포들은 또다른 bHLH 전사인자로서 HuC와 같은 초기 신경분화의 표식인자의 발현을 유도하는 neuroD의 발현을 시작한다(Korzh et al., 1998). Notch 활성화에 의하여 신경세포로의 분화가 억제된 주변세포는 다른세포로 분화되거나, 발생 후기에 신경세포로 분화되기 위한 미분화세포로 남게된다. 이 때, Notch 및 Delta 유전자와 같은 신경 관련 유전자의 기능이 억제되면, 측면억제 기능이 상실되어 HuC 발현 세포의 과생성을 유도하게 된다(Appel and Eisen, 1998).

한편, 제브라피쉬는 초기 발생에 관여하는 유전자를 동정하기 위하여 널리 이용되어 왔다. 이들은 비교적 간단한 신경계를 가지며, 특히 대량으로 배(embryo)를 얻을 수 있고, 짧은 기간내에 성체로 자라기 때문에 유전적 분석에 적합하다. 또한, 제브라피쉬의 배들은 초기 신경계가 확립되는 발생 하루동안 완전히 투명하여 관찰이 용이하다(Chitnis and Kuwada 1990, Wilson et al., 1990).

이와 함께, 돌연변이 스크리닝에 의하여 이미 초기 신경계의 패턴이 변화된 다수의 제브라피쉬 돌연변이가 동정되었는데, 이 때 HuC 유전자 발현을 신경계 변이체 선발의 지표로 사용하고 있다. 이는 HuC mRNA의 발현 분포가 변형된 배를 조직내 혼성화(in situ hybridization) 방법을 이용하여 확인하는 것으로서, 신경유전적 형질변화에 의한 제브라피쉬 돌연변이체를 밝혀내는데 초기 신경 지표 유전자인 HuC의 가치를 입증하여 주었으다. 하지만, 상기 조직내 혼성화를 이용하는 방법은 배를 화학약품에 고정시켜 죽이게 되므로 살아 있는 배에서 직접 신경계 변화를 관찰할 수 없을 뿐 아니라, 합성 mRNA의 제조 및 복잡한 실험과정을 거쳐야 한다. 그러므로 기존의 혼성화방법을 이용한 신경계 변이체들의 확인 방법은 미지의 살아있는 변이체들 중에서 신경계 변이체들만 특이적으로 선별하고 이들에 일어난 신경계 형성 변화를 직접 분석하는데에는 한계성이 있어서 살아있는 배들중에서 직접적으로 초기 신경계 변이체들을 신속하게 선별하고 확인할 수 있는 진보된 선별방법의 개발 필요성괴 이의 중요성이 대두되고 있는 실정이다.

이에 본 발명자들은 신경세포에서 특이적으로 발현하는 HuC 유전자의 프로모터 부위를 분리¡동정하여 이의 염기서열 및 포함된 조절인자들을 분석함으로써 상기 HuC 프로모터가 신경세포의 분화를 조절하는 기작을 확인하고, 이를 이용하여 형광 단백질인 GFP(green fluorescence protein)의 발현이 신경특이적으로 일어나는 형질전환 제브라피쉬를 제조하여 신경 돌연변이체를 가시적으로 선별, 분석하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 제브라피쉬의 신경세포에서 특이적으로 발현하는 HuC 유전자의 프로모터를 제공하는 것이다.
또한, 본 발명의 목적은 HuC 프로모터 및 이에 의하여 발현이 조절되는 GFP(green fluorescence protein) 외부 유전자가 결합된 융합컨스트럭트 및 이를 게놈내에 포함하는 형질전환 동물을 제공하는 것이다.
아울러, 본 발명의 목적은 상기 형질전환 동물의 제조방법 및 이를 이용하여 신경계에 변성이 일어난 신경 돌연변이체를 선별, 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 신경세포에서 특이적으로 발현 하는 HuC 유전자의 프로모터를 제공한다.
HuC 유전자로부터 발현되는 HuC 단백질은 RNA를 인식하는 모티브를 갖고 있으며, rRNA의 생성이나, 번역의 시작, 구조성 RNA의 생성 및 RNA의 세포질로의 이동과 같은 일반적인 RNA 대사를 수행하는 RNA 결합 단백질의 일종으로 Hu 패밀리에 속한다. 현재까지 밝혀진 인간의 Hu 단백질 중 HuD, HuC, Hel-N1은 3개의 RNA 인식 모티브를 가지고 있으며, 서로간에 86-90%의 높은 유사성을 갖고 있다. 이들 단백질은 신경특이적인 국소적 발현과 신경계의 발생과 유지에 절대적으로 필요한 것으로 그 기능이 이미 밝혀진 초파리 elav 단백질과의 높은 상동성으로 미루어 볼 때 elav 단백질과 동일하게 신경세포의 분화 및 조절에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.
신경계 분화시, 신경세포는 집합체를 형성하고 있다가 분열을 하고, 체세포 분열을 거친 후 분화된 세포로 발전한다. 이 때 Hu 단백질은 상기 과정의 진행에 있어 유용한 지표로 이용될 수 있다. 제브라피쉬의 배(Zebrafish embryo)의 경우 HuC는 신경판의 신경 전구세포에서 최초로 발현되며, 신경계의 전과정에서 높은 정도로 발현한다(Kim et al., 1996a). 신경특이적으로 발현하는 Hu 단백질은 쥐의 musashi 유전자에 의해 만들어지는 다른 RNA 결합 단백질과 상호 보완적이다(Sakakibara et al., 1996). 쥐의 musashi 유전자는 신경간세포(neural stem cell)에서 발현하나 세포가 신경으로 전환되면 더 이상 발현하지 않고, Hu 단백질이 발현을 시작한다. musashi 유전자는 증식에 필요한 조절을 하며 분열된 세포를 유지시키는 반면, Hu 유전자는 분화에 관련된 유전자들을 조절하며 분화된 상 태를 유지시키는 역할을 한다. 결론적으로, musashi 유전자는 분화를 억제하며, Hu 유전자는 증식을 억제한다고 할 수 있다(Okano , 1995). Hu 단백질은 이들이 가진 RNA 결합 모티브를 통해 RNA의 특정 부분에 결합하여 발생과정동안 그들의 발현을 조절하는 것으로 추측된다.
제브라피쉬는 척추동물의 초기 신경발생 조절을 이해하기 위한 중요한 모델을 제공하는데, 이는 비교적 간단한 신경계를 갖고 있으며 초기 발생에 관한 많은 유전자들이 동정되어 폭 넓게 연구되고 있기 때문이다. 이들은 특히 많은 배를 얻을 수 있고 비교적 빠른 시간에 성체로 성장하므로 유전학적 분석에 매우 적합하다. 더우기 이들 배의 신경계 골격이 확립되는 발생 하루동안에는 완전히 투명하게 보여 가시적인 관찰이 용이하다.
HuC 유전자의 신경특이적인 발현의 조절이 어떠한 기작으로 이루어지는지를 규명하기 위하여는 상기 HuC 유전자의 프로모터 동정이 반드시 먼저 선행되어야 한다. 본 발명자들은 상기한 바와 같이 초기 신경발생 연구에 유용한 도구로써 이용되고 있는 제브라피쉬의 HuC 프로모터를 분리, 분석하여 이를 초기 신경 발생을 조절하는 세포적, 분자적 및 유전학적 상호반응의 연구에 이용하고자 하였다.
본 발명에서 제공하고 있는 HuC 프로모터는 G로 시작되는 전사 개시부위를 가진다(**도 2** 참조). 이는 RNA 중합효소 II가 퓨린에서 우세하게 시작된다는 보고와 일치한다(Baker and Ziff, 1981). 전사 개시위치의 바로 위 상류지역에는 1개의 CCAAT-box(-64/-60), GATA-1(-242/-238) 및 SP1(-213/-208)가 존재하는데, 이는 HuC의 핵심-프로모터(core promoter)가 상기 지역에 위치할 가능성이 있음을 의 미한다. 그러나, 전사 개시 위치의 30 bp 상류지역 가까이에는 TATA-box가 존재하지 않는다. HuC 유전자의 5' 말단 지역에서 가장 두드러진 구조는 18개의 E-box 서열이 존재하는 것이다. 이는 HuC 유전자의 신경세포 특이적인 조절에 있어 E-box에 결합하는 bHLH 전사인자가 중요한 역할을 함을 의미한다(Murre et al., 1994). 상기의 사실은 이전에 제안된 신경으로의 분화에 있어 ngn1과 같은 bHLH 전사인자가 중요 역할을 한다는 사실과 일치하는 것이다. 또한, 신경 분화에 있어 필수적인 것으로 보고된 MyT1 결합부위도 -2687/-2680에 존재한다.
또한, 본 발명은 상기 HuC 프로모터와 이에 의하여 발현이 조절되는 유전자가 결합된 융합 유전자 컨스트럭트 및 이를 게놈내에 포함하는 형질전환 동물을 제공한다.
초기 신경의 분화과정을 밝히기 위하여, HuC 발현세포의 분포변화가 일어난 제브라피쉬의 돌연변이를 이용한 연구가 시도되고 있는데, 이러한 HuC 발현을 확인하기 위하여 현재 RNA 조직내 혼성화(RNA in situ hybridization)의 방법이 이용되고 있다. 하지만, 상기 혼성화 방법은 발현양상을 확인하는 과정에서 화학약품의 처리에 의해 배가 죽게 되고 실험과정이 까다로워 대량으로 많은 수의 살아있는 변이체를 확인하는 것이 불가능하다는 단점이 있다.
본 발명에서는 현재 이용되고 있는 조직내 mRNA 분포를 확인하는 방법인 혼성화 방법의 한계를 극복하고, 살아있는 배에서 초기 신경분포의 변화를 가시적으로 신속히 감지하는 발생학적 기술을 개발하고자, 상기에서 분리, 동정한 H

uC 프로 모터를 이용하여 신경에서 특이적으로 형광 단백질인 GFP(green fluorescence protein)를 발현하는 제브라피쉬 형질전환체를 제조하였다.

구체적으로, HuC 프로모터 하부에 GFP 유전자가 연결된 융합 유전자 컨스트럭트(HuCP-GFP)를 제브라피쉬 1 세포기 단계 수정란에 미세주입하여 2일간 성장시킨 뒤 신경에서만 GFP가 신경 특이적으로 발현하는 배들만 형광 현미경으로 선별하고 이들을 계속 키워서 성체로 성장시켰다. HuC 프로모터 하부에 GFP 유전자를 연결한 HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트인 pHuC10GFP는 2000년 6월 9일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였으며(수탁번호 : KCTC 0802BP), 이와 함께 선별된 신경 특이적으로 GFP를 발현하는 정자를 2000년 7월 27일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0844BP).

상기 수정란으로부터 3달 후 성체로 자란 50 마리의 암수 제브라피쉬를 각기 야생형의 암수와 교배시켜 배들을 얻었다. 이들 중 야생형과의 교배에서 얻어진 배들에게 HuCP-GFP 유전자를 전달하여 배에서 GFP 발현이 나타나는 수컷 성체 한 마리를 제 1세대 형질전환 동물(founder)로 선별하였다. 선별된 제 1세대 형질전환 동물의 수컷을 일반형의 암컷과 교배시켰을 때 제 1세대 형질전환 동물의 정자로부터 HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트가 F1 자손에 전달되는 빈도는 12%로 나타 났다. HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트를 물려받은 이형접합(heterozygous) F1 형질전환체(HuCP-GFP $^{+/-}$)를 성체로 성장시킨 후 이들의 암컷과 수컷을 교배시켜 얻은 전체 F2 배아 중 HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트를 물려받은 동형접합(homozygous) 형질전환 제브라피쉬(HuCP-GFP $^{+/+}$)를 25% 확률로 선별하였다.

상기 동형접합 형질전환 제브라피쉬에서의 GFP의 발현수준은 이형접합 현질전환체에서의 발현수준보다 약 2배 정도 높았으며, 형질전환체의 뇌와 척추의 신경세포에서 GFP가 신경특이적으로 발현되는 것을 쉽게 관찰할 수 있었다(**도 7** 참조). 살아있는 제브라피쉬 배에서 자세한 GFP의 신경분포양상은 레이저 컨포칼(confocal) 현미경에 의해 직접 관찰가능 하였다. RNA 조직내 혼성화 방법에 의하여 형질전환 제브라피쉬내 재조합된 HuC 프로모터에 의한 GFP mRNA의 발현양상과 야생형 제브라피쉬 자체의 HuC mRNA의 발현양상을 비교한 결과, 모두 11시간대에서 유전자 발현이 검출되기 시작하였고 모두 동일한 신경판 부위에서 GFP 유전자가 발현되었다. 이는 형질전환 제브라피쉬 배에서 나타나는 GFP의 신경특이적 발현양상이 일반 제브라피쉬 배에서의 HuC mRNA 전사체와 동일한 시간적, 공간적 양상을 나타냄을 의미하여 본 발명에서 분리, 확보된 HuC 프로모터 부위가 신경계 특이적 발현을 유발하는 HuC 유전자의 조절 부위를 완전히 포함하고 있을 뿐 아니라, 얻어진 형질전환 제브라피쉬에서 GFP 유전자의 발현이 전체 신경세포들에서만 특이적으로 발현하며 그 발현양상이 야생형 제브라피쉬의 HuC 유전자와 동일하게 이루어 지고 있음을 증명한다.

아울러, 본 발명은 상기 형질전환 동물의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 형질전환 동물의 제조방법은

1) 제브라피쉬의 신경특이적 발현을 조절하는 HuC 유전자의 프로모터를 형광 단백질 유전자와 연결한 융합 유전자 콘스트럭트를 제조하는 단계;

2) 상기 융합 유전자 콘스트럭트를 수정란에 미세주입하는 단계;

3) 상기 수정란으로부터 신경 특이적으로 형광 단백질을 발현시키는 배를 선별하는 단계;

4) 상기 선별된 배의 성체를 야생형과 교배시켜 이형접합 F1 형질전환체를 얻는 단계; 및

5) 상기 이형접합 F1 형질전환체를 다시 야생형과 교배시켜 동형접합 F2 형질전환체를 선별하는 단계로 구성된다.

상기에서 단계 1)의 형광 단백질 유전자는 GFP(green fluorescence protein), 루시퍼레이즈(luciferase) 및 β-갈락토시데이즈(β-galactosidase)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 본 발명자들은 바람직한 실시예로서 GFP 형광 단백질 유전자를 사용하여 여기에 Huc 프로모터의 5'-근접부위(5'-flanking region), 엑손-1, 인트론-1 및 엑손-2의 일부분을 융합시켜 융합 유전자 컨스트럭트를 제조하였으며 얻어진 HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트인 pHuC10GFP는 2000년 6월 9일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0802BP).

마지막으로, 본 발명은 상기 형질전환 동물을 이용하여 신경계에 변성이 일어난 신경 돌연변이체를 가시적으로 손쉽게 선별, 분석하는 방법을 제공한다.

현재, 대량의 돌연변이 형성법으로 초기 신경 변형이 일어난 많은 돌연변이 체가 밝혀지고 있다. 본 발명의 형질전환 제브라피쉬를 이용하면, 초기 신경 돌연변이체를 살아있는 상태에서 가시적으로 빠른 시간내에 선별할 수 있다. 이러한 형질전환 동물을 선별방법에 성공적으로 이용할 수 있다는 것은 초기 신경 지표로써의 HuC 유전자와 이의 프로모터, 그리고 이들을 이용하여 얻은 형질전환 제브라피쉬의 유용한 가치를 입증하여 준다.

구체적으로, 본 발명에서 제공하는 신경 돌연변이체의 선별방법은

1) HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트를 게놈내에 포함하는 동형접합 형질전환 제브라피쉬를 미지의 이형접합 신경 변이체와 교배시켜 F1 자손을 얻는 단계;

2) 상기 F1 자손을 이형접합 신경변이체와 다시 교배시켜의 동형접합 신경변이체를 얻는 단계;

3) 상기 동형접합 신경변이체의 배(embryo)에서 발현되는 GFP의 형광을 HuCP-GFP 이형접합 형질전환 제브라피쉬의 배에서 발현되는 형광과 비교하여 신경 돌연변이체를 선별하는 단계로 구성된다.

본 발명자들은 상기 신경 돌연변이체의 선별방법의 유용성을 증명하기 위하여, 이미 초기 신경계에 증가되어진 신경성 증식(neuronal hyperplasia)이 일어난 신경변이체로 이미 잘 알려진 제브라피쉬 mib(mind bomb) 이형접합 돌연변이체(mib $^{+/-}$)(Schier et al., 1996)와 본 발명에서 얻어진 HuCP-GFP 동형접합 형질전환 제브라피쉬(HuCP-GFP $^{+/+}$)를 교배하였다. 이로부터 얻어진 F1 중에서 GFP를 발현하는 배(HuCP-GFP $^{+/-}$ mib $^{+/-}$)들만 골라 성체로 키운 후 다시 mib 이형접합 돌연변 이체(mib $^{+/-}$)와 교배하였다. 이로부터 얻은 배(HuC $^{+/-}$ mib $^{-/-}$)들의 신경계에서 나타나는 GFP 형광 부위와 그 강도를 본 발명의 HuCP-GFP 이형접합 형질전환 제브라피쉬(HuCP-GFP $^{+/-}$)의 배와 비교한 결과, mib 동형접합 돌연변이체에서 GFP의 형광이 나타나는 신경세포의 부위에서 증가된 신경성 증

식이 검출됨을 형광현미경 상에서 쉽게 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명에서 얻어진 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬를 이용한 신경 돌연변이체 선별방법이 미지의 제브라피쉬 변이체들 중에서 신경계의 변이가 일어난 변이체들을 살아있는 상태에서 쉽게 선별해 낼 수 있음을 증명하는 것이다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 제브라피쉬 배의 HuC 유전자의 초기 신경특이적 발현

이전 연구에서 낭배기 바로 이후의 초기 원시 뉴우런에서 HuC가 발현된다는 사실에 근거하여 제브라피쉬에서의 신경세포에 대한 표식인자로서 HuC가 유용하다는 것이 밝혀졌다(Kim et al., 1996; Park et al., 2000). 본 발명에서는 HuC가 발현되는 세포가 초기 뉴우런이라는 것을 추가적으로 확인하기 위하여, HuC 발현과 최근에 초기 뉴우런에서 발현되는 것으로 밝혀진 DeltaB의 발현을 비교하였다. 결 과적으로, 3-체절 단계(3-somite stage)에서, 신경판내의 각 3 부분에서의 HuC의 발현은 DeltaB의 발현과 매우 유사하였다(**도 1**)

<실시예 2> 제브라피쉬 HuC 게놈 DNA의 프로모터를 포함하는 5'-근접지역의 분리 및 특성확인

제브라피쉬의 HuC 프로모터 부위를 분리하기 위하여, 본 발명자들은 제브라피쉬 게놈 라이브러리로부터 HuC cDNA의 5'-UTR 쪽을 방사성 동위원소로 표지한 후 혼성화 방법(hybridization)을 이용하여 선별하였다(Kim et al., 1996). 먼저, 방사성 동위원소인 [α- ^{32}P]dCTP으로 표지된 제브라피쉬 HuC cDNA의 5'-UTR을 포함하는 cDNA 절편을 이용하여 제브라피쉬 게놈 DNA 라이브러리(Clontech)를 스크리닝하였다. 플라크 혼성화(plaque hybridization)를 이용하여 다수의 양성 클론들을 선별하였으며, 이들 중 15kb(클론 4)와 18kb(클론 8)의 *Not* I 게놈 DNA 절편을 갖는 두 개의 양성 클론을 선택하여 단일 파지 플라크로 정제하였다. 제한효소 지도와 부분적인 염기서열 분석에 의하여 clone #4의 15 kb *Not* I DNA 중 7 kb *Nco* I 단편이 번역 시작 코돈인 ATG 상류의 5 kb를 포함하고 있음을 밝혀내었으며, 이를 pGEM7(+)(Promega사)에 클로닝하였다. 프로모터의 범위를 좁히기 위하여 상기로부터 번역 시작 코돈인 ATG를 포함한 3.2 kb의 *Eco* R I 단편을 분리하여, 이를 디디옥시뉴클레오타이드 연쇄종결법(dideoxynucleotide chain termination)으로 분석하였다(Sanger et al., 1977).

상기 분석에 의하여 밝혀진 **서열번호 1** 의 HuC cDNA의 5'-UTR 부위에서 전사 시작 위치는 HuC cDNA의 5'-UTR 서열로부터 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 하기의 프라이며 신장법(primer extension)으로 결정하였다.

제브라피쉬 HuC 유전자의 엑손-1으로부터 얻은 **서열번호 2** 의 프라이머를 [γ- ^{32}P]ATP(Amersham사)와 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제(polynucleotide kinase, Promega사)를 이용하여 108 cpm/μg으로 표지하였다. 제브라피쉬의 24시간 배로부터 분리한 60 μg의 RNA와 효모 tRNA를 방사성 동위원소로 표지된 프라이머(5 ¡105 cpm)와 30°C에서 18시간 반응시킨 후, 반응물을 에탄올 침전시켜 20 μℓ의 역전사 효소 반응 혼합체(50 mM Tris-Cl, 6 mM $MgCl_2$, 40 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, pH 8.5)와 섞어 주었다. 200 유니트(unit)의 AMV 역전사 효소(Boehringer Mannheim사)를 가한 뒤 42°C에서 1시간 동안 반응시키고, cDNA 산물을 에탄올 침전시켜 8M 요소가 함유된 6% 폴리아크릴아마이드 젤(polyacrylamide gel)에서 전기영동을 수행하였다. 전사 시작 위치를 정하기 위해 3.6 kb 제브라피쉬 HuC 게놈 DNA의 *Eco* R I 절편을 동일한 프라이머를 이용하여 DNA 염기서열 분석(sequencing)을 수행한 후 전기영동하였다.

도 3 에 나타난 바와 같이, 24시간 제브라피쉬 배에서 분리한 mRNA를 주형으로 하였을 때 한개의 cDNA 밴드가 신장됨을 확인하였으며, 이로부터 전사 개시 부위의 염기 위치를 게놈 DNA 내에서 결정한 후 전사 개시 위치인 G를 +1로 하여 다른 염기들의 상대적인 위치를 결정하였다(**도 2**). G로 결정된 전사 개시부위는 RNA 중합효소 II가 퓨린에서 우세하게 시작된다는 보고와 일치한다(Baker and Ziff, 1981). 이전에 보고된 HuC cDNA 서열과 함께 상기에서 밝혀진 전사 개시 위치에 근거하여, 제브라피쉬 HuC 게놈 DNA의 3.6 kb *Eco* RI 절편이 2,771 bp의 5' 상류서열, 391 bp의 엑손-1(382 bp의 비해독 부위와 9 bp의 코딩 서열을 포함) 및 429 bp의 인트론-1의 일부를 포함하고 있음을 확인하였다(**도 2** 및 **도 4**). 전사 개시 위치의 바로 위 상류지역에는 1개의 CCAAT-box(-64/-60), GATA-1(-242/-238) 및 SP1(-213/-208)가 존재하였는데, 이는 HuC의 핵심-프로모터(core promoter)가 상기 지역에 위치할 가능성이 있음을 의미한다. 그러나, 전사 개시 위치의 30 bp 상류지역 가까이에는 TATA-box가 존재하지 않았다. HuC 유전자의 5' 말단 지역에서 가장 두드러진 구조는 **도 2** 에 나타나 바와 같이, 18개의 E-box 서열이 존재하는 것이다. 이는 HuC 유전자의 신경세포 특이적인 조절에 있어 E-box에 결합하는 bHLH 전사인자가 중요한 역할을 함을 의미한다(Murre et al., 1994). 상기의 사실은 이전에 제안된 신경으로의 분화에 있어, ngn1과 같은 bHLH 전사인자가 중요한 역할을 한다는 사실과 일치하는 것이다. 또한, 신경 분화에 있어 필수적인 것으로 보고된 MyT1 결합부위도 -2687/-2680에 존재하였다.

<실시예 3> HuC 유전자의 신경세포 특이적 발현을 위한 5' 상류지역의 확인

본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 3.6 kb *EcoR* I 절편에 있어, 잠재적인 HuC 프로모터 지역을 포함하는 5' 상류 서열이 신경계에서 발현 특이성을 나타내는 HuC 프로모터 부위인지 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

먼저, 3.6 kb *Eco* RI 게놈 유전자를 주형으로 하여 중합효소 연쇄반응에 의해 증폭된 3.2 kb(-2771/+382) 게놈 DNA 절편을 pEGFP-1 플라스미드 벡터(Clontech사)의 *Eco* RI/ *Sma* I 부위에 삽입하여 GFP 단백질을 코딩하는 염기서열과 융합시켜 HuC-GFP △Eco 유전자 컨스트럭트를 제조하였다. 중합효소 연쇄반응은 pfuTurbo DNA 중합효소(Stratagene사)를 이용하여 수행하였다

상기의 △Eco 유전자 컨스트럭트를 1 세포기 단계 제브라피쉬의 배로 미세주입하여 형광 현미경하에서 GFP 발현을 분석함으로써 이들의 신경세포에서의 발현 조절 작용을 분석하였다. 그 결과, 상기 48시간의 제브라피쉬의 배는 신경계의 모든 부위에서 GFP를 발현하는 것을 확인하였다. 구체적으로, 종뇌부분(telencephalic cluster), 망막 신경절

뉴우런(retinal ganglion neuron), 3차 신경절 뉴우런(trigeminal ganglion neuron), 척추의 연수 섬유속(medial longitudinal fasciculus)과 배측 섬유속(dorsal longitudinal fasciculus)에서의 GFP의 발현이 쉽게 확인되었다. 또한, Rohon-Beard 뉴우런의 말초 돌기뿐만 아니라 후뇌에서 끝나는 중앙돌기(central projection) 역시 GFP의 강한 형광에 의하여 쉽게 확인되었다. 48시간 배에서 뇌신경으로부터의 확장된 축삭 역시 형광 현미경 상에서 확실하게 관찰되었다(**도 5**).

△Eco 유전자 컨스트럭트에 의한 상기 GFP의 신경특이적인 발현양상은 항 GFP 다중클론 항체와의 반응에 의해 재확인되었다. 이러한 결과는 △Eco 유전자 컨스트럭트내에서의 5' 말단 프로모터 지역이 뉴우런에서의 HuC 발현을 특이적으로 조절하는데 필요한 조절인자를 모두 포함하고 있음을 의미한다.

<실시예 3> 제브라피쉬 배에서의 HuC 프로모터의 기능적 분석

신경세포에 특이적인 HuC 유전자 발현을 유지하기 위하여 필요한 프로모터내의 조절 부위를 확인하기 위하여, △Eco 유전자 컨스트럭트에서 HuC 프로모터 지역의 5' 말단에서 3' 말단 쪽으로 일련된 결실 돌연변이를 제조하였다(**도 4**).

먼저, ΔEco 유전자 컨스트럭트를 *Eco* RI / *Hind* III, *Eco* RI / *Sph* I, *Eco* RI / *Kpn* I, *Eco* RI / *Bst* XI 및 *Eco* RI / *Sac* I의 제한효소로 처리한 후 크기가 큰 절편만을 분리하여 자가 결합(self-liigation)시킴으로써, ΔHind(-2473 to +382 bp), ΔSph(-1962 to +382 bp), ΔKpn(-1161 to +382 bp), ΔBst(-431 to +382) 및 ΔSac(-251 to +382) 유전자 컨스트럭트를 제조하였다. 또한, ΔEkpn(-2771 to -1162 bp), ΔEbst(-2771 to -432 bp), and ΔEsac(2771 to 252 bp) 유전자 컨스트럭트를 제조하기 위하여, ΔEco 유전자 컨스트럭트를 *Eco* RI / *Kpn* I, *Eco* RI / *Bst* XI, *Eco* RI / *Sac* I으로 절단한 후, 작은 절편들을 pEGFP-1 DNA의 동일한 제한효소 부위에 삽입시켰다. 동일한 제한효소 부위가 존재하지 않을 때는 3' 말단을 클래나우(klenow) 효소를 이용하여 블런트(blunt)로 만든 후 *Eco* RI / *Sma* I 부위에 삽입하였다. ΔSac-M 유전자 컨스트럭트는 ΔSac 유전자 컨스트럭트에 존재하는 CCAAT-box를 **서열번호 3** 의 프라이머와 돌연변이 제조 키트(Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene사)을 이용하여 CCCAT로 변형시켜 제조하였다.

프로모터 부위의 염기서열 결실에 의한 GFP 발현양상의 변화는 1 세포기에 상기 결실 돌연변이가 주입된 배의 48시간 후 GFP 발현양상을 조사함으로써 확인하 였다.

△Hind 유전자 컨스트럭트(-2473/+382)가 주입된 배에서는 신경세포에서의 GFP 발현이 △Eco 유전자 컨스트럭트가 주입된 경우와 동일한 양상을 보였으나, 이에 더하여 일부 근육 세포에서도 발현되는 것이 관찰되었다(**도 6** 의 **A**). 이러한 결과는 잠재적인 MyT1 결합부위(-2687/-2680) 및/또는 -2565/-2560 및 -2665/-2650에 존재하는 두 개의 17번째 및 18번째 E-Box 서열이 근육세포에서 HuC 발현을 억제함을 제시한다(**도 2** 및 **도 4**). 이 때, MyT1은 근육세포에서 발현되지 않으므로, 상기 결실 돌연변이에서는 E-Box의 제거로 인해 GFP의 신경세포 비특이적인 발현이 초래될 것으로 예상된다.

근육에서의 GFP 발현정도는 HuC 프로모터 지역의 5' 부위의 서열을 3' 쪽으로 점차적으로 제거하여 나갔을 때 신경세포에서 GFP 발현의 급격한 감소없이 근육세포에서만 GFP의 발현이 증가함을 보였다. 즉, 근육에서의 GFP 발현강도는 ΔHind(-2473/+382), ΔSph(-1962/+382), ΔKpn(-1162/+382), ΔBst(-431/+382) 유전자 컨스트럭트의 순으로 증가하였다. 결과적으로, ΔBst 유전자 컨스트럭트에 의하여 수반되는 GFP 발현은 신경 세포에서 GFP 발현을 압도할 수 있을 정도로 증가하였다(**도 6** 의 **B**). 이러한 결과는 상기 결실 지역에 포함되는 12개의 E-box가 신경특이적 발현의 유도보다는 근육에서의 HuC 발현을 억제하는데 중요한 기능이 있음을 의미한다.

상기 유전자 컨스트럭트와는 달리, ΔSac(-251/+382)는 피부, 척색(notochord), 신경을 포함하는 대부분의 배에서 GFP의 전체적 발현을 보이는 데, 이로부터 ΔBst 유전자 컨스트럭트에 존재하는 인접한 3개의 E-box가 HuC 유전자의 신경특이적 발현 유지에 필수적임을 확인할 수 있다(**도 6** 의 **C** 및 **D**).

또한, CCAAT-box의 역할을 확인하기 위하여 ΔSac 유전자 컨스트럭트에서 상기 서열중 첫번째 A를 C로 치환하여 ΔSac-M 유전자 컨스트럭트를 제조하였는데, 이는 프로모터로서의 기능이 완전히 상실되는 결과를 나타내었다(**도 4**). 즉, ΔSac 유전자 컨스트럭트에 포함된 5' 쪽의 251 bp 부위가 HuC 유전자의 핵심-프로모터(core-promoter)임을 의미한다.

상기 결과는 ΔSac 유전자 컨스트럭트에서 5'-251 bp가 제거된 ΔEbst(-2771/-431), ΔEkpn(-2771/-1162) 및 ΔEsac(-2771/-251) 유전자 컨스트럭트의 발현에 의해서도 재확인할 수 있다. ΔEbst, ΔEkpnh 및 ΔEsac 유전자 컨스트럭트가 미세주입된 배에서는 GFP 발현이 나타나지 않았는데, 이는 핵심-프로모터로서의 5'의 251 bp의 역할을 제시하여 주는 것이다. 또한, 17개의 E-box와 하나의 MyT1 결합부위의 조합이 핵심-프로모터와 함께 신경특이적 HuC 발현의 유지에 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다.

<실시예 4> 신경특이적으로 GFP를 발현하는 형질전환 제브라피쉬의 제조

<4-1> 융합 유전자 컨스트럭트의 제조

신경에서 GFP가 지속적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬를 제조하기 위하여, 본 발명자들은 5' 부위에 엑손-1, 인트론-1 및 엑손-2의 일부분과 GFP 유전자를 융합하여 HuC 프로모터(HuCP)-GFP 융합 유전자 컨스트럭트를 재조합하였다.

구체적으로, 상기 실시예 2에서 제조한 15 kb 게놈 DNA가 삽입되어 있는 클론 4를 이용하여 HuCP-GFP 융합 유전자를 구성하기 위하여 다음과 같은 연속적인 유전자 재조합 과정을 수행하였다. 우선, 플라스미드 벡터 pEGFP-C1 DNA를 제한효소 *Eco47* III와 *Xho* I으로 동시 절단하여 0.75 kb 크기의 GFP DNA를 분리한 후 이를 플라스미드 벡터 CS2A(-)의 *Sal* I과 *Xho* I 절단부위에 삽입하여 CS2A(-)-GFP를 제조하였다. 상기 플라스미드 벡터 CS2A(-)는 플라스미드 벡터 CS2(-)를 제한효소 *Sal* I 과 *Hind* III로 절단한 뒤 작은 조각의 CMV 프로모터를 제거하고 남은 큰 조각의 DNA 절편을 자가-결합(self-ligation)시켜 제조하였다. 상기 플라스미드 벡터 CS2A(-)-GFP DNA를 다시 *Nc*

o I으로 절단한 후 여기에 클론 4에 포함된 15 kb 크기의 HuC 유전자를 *Nco* I으로 부분 절단하여 얻어진 HuC 프로모터가 포함된 10.5 kb 크기의 4.6 kb 5'-근접부위(flanking region), 391 bp 엑손-1(exon-1), 5.5 kb 인트론-1(intron-1) 및 15 bp 엑손-2(exon-2)가 포함된 유전자 단편을 융합함으로써 HuC 프로모터에 의해 GFP 유전자가 발현되도록 하였다. 또한, 이에의해 상기에서 플라스미드 벡터로부터 GFP 유전자의 분리시 상실되었던 GFP 유전자의 전사 개시코돈(translation start codon)인 ATG가 새로이 생성되도록 하였다. 이로부터 얻어진 플라스미드 벡터 CS2A(-)-HuCP-GFP DNA를 다시 제한효소 *Eco* RV와 *Bam* HI으로 절단하여 5'-근접부위의 제일 앞부분에 존재하는 0.5 kb 크기의 유전자 절편을 추가로 제거한 뒤 자가-결합하여 얻어진 HuCP-GFP 융합 유전자 발현벡터를 최종적으로 제조하였다. 형질전환 제브라피쉬를 제조하기 위하여, 상기 HuCP-GFP 융합 유전자 발현벡터를 제한효소 *Sca* I 으로 절단하여 얻은 선형(linearized form)의 융합 유전자 컨스트럭트를 제브라피쉬 1세포기 수정란들에 주입하였다. 얻어진HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트인 pHuC10GFP는 2000년 6월 9일자로 생명공학 연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0802BP).

<4-2> 제브라피쉬 수정란의 준비

제브라피쉬는 28℃에서 낮 14시간, 밤 10시간 주기로 성장시켰으며 암, 수는 교배시키기 전에 나누어 키우고, 교배시에는 성체가 알을 먹는 것을 방지하기 위하여 수조 바닥이 충분히 덮일 만큼의 구슬을 깔아 주었다. 수정된 알들은 튜브를 이용하여 불을 밝힌 후 1-2시간 사이에 적당한 간격을 두고 수집하였다. 미세주입이 이루어진 배와 대조군 배는 에그워터(60μg/㎖ of sea salts, Sigma)에서 2-4일간 키운 후 일반 수조로 옮겨 성장시켰다. 제브라피쉬의 주의와 유지는 일반적인 방법을 따랐다(Westerfield, 1995).

<4-3> HucP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트가 미세주입된 수정란의 제조

상기 <4-1>에서 제조된 HuCP-GFP 융합유전자 컨스트럭트를 500개의 1 세포기 단계 제브라피쉬 배에 미세주입하고 48시간 경과후 신경에서 GFP가 발현하는 배만을 형광 현미경으로 선별하여 성체로 성장시켰다.

미세주입시 사용한 융합 유전자 컨스트럭트 DNA는 엔도프리 플라스미드 키트(EndoFree plamid kit, Qiagen사)를 이용하여 준비하였다. 상기에서 HucP-GFP 융합 유전자 발현벡터 DNA를 적절한 제한효소를 사용하여 선형으로 만든 후 페놀- 클로로포름(phenol-chloroform) 처리와 에탄올 침전단계를 거쳐 분리하였다. 제브라피쉬 배는 지름 10 ㎝의 플라스틱 용기에 보관하고 해부현미경(Stuart et al., 1990)을 이용하여 첫 번째 분열이 일어나기 전에 DNA를 미세주입하였다. 미세관은 1 ㎜ 유리관을 이용하여 미세관의 끝 부분을 직경 3 ㎛ 정도로 되게 절단하여 사용하였다. 미세주입을 위하여 DNA 농도는 0.5% 페놀 레드(phenol red)가 함유된 0.1 M KCl 1 ㎖ 당 100 μg으로 사용하였고, 배당 100-200 pl 정도의 양을 1세포기 제브라피쉬 수정란들에 미세주입하였다.

상기로부터, 얻어진 유전자 주입 제 1세대(founder) 형질전환 제브라피쉬들 중 야생형 제브라피쉬에 그 유전형질을 전달하는 제 1세대 숫컷 제브라피쉬 한 마리를 선별한 후 이를 다시 야생형의 암컷과 교배시켰다. 그 결과, 이형접합 형질전환 F1 제브라피쉬(HuCP-GFP $^{+/-}$)가 전체 F1 자손들 중 12%의 확률로 생성되었다. 얻어진 이형접합 형질전환 F1 숫컷 제브라피쉬를 성체로 성장시킨 후 이를 다시 야생형 암컷과 교배시켜 전체 F2 배아 중 25%의 확률로 생성된 동형접합 형질전환 제브라피쉬(HuCP-GFP $^{+/+}$)를 선별하였다. 이와 같이 Huc 프로모터에 의해 신경 특이적으로 GFP를 발현하는 융합 유전자 컨스트럭트 pHuC10GFP를 미세주입하여 얻어진 동형접합 F2 형질전환 제브라피쉬의 정자를 2000년 7월 27일자로 생명공학 연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0844BP).

<실시예 5> 형질전환 제브라피쉬 신경에서의 HuC 프로모터의 조절양상 확인

상기 실시예 4로부터 제조된 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬의 신경에서의 HuC 프로모터의 유전자 발현 조절양상을 확인한 결과, 상기 동형접합 형질전환 제브라피쉬의 신경조직에서 GFP 발현수준은 이형접합 현질전환체의 발현수준보다 2배 정도 높았으며, HuCP-GFP 형질전환체에서 GFP의 발현에 따라 뇌와 척수 신경세포에서 나타나는 형광을 쉽게 관찰할 수 있었다(**도 7**). 또한, HuCP-GFP 형질전환체를 이용하여 살아있는 제브라피쉬 배에서의 자세한 신경세포 분포양상을 레이저 컨포칼(confocal) 현미경을 이용하여 직접 관찰할 수 있었다. 구체적으로, 약 24시간의 살아있는 제브라피쉬 배의 척수 연합신경세포, Rohon-Beard 신경세포 및 운동신경세포에서의 GFP 발현을 뚜렷하게 확인할 수 있어서 상세한 신경세포의 종류별 분포위치 등도 관찰 가능하였다(**도 7** 의 **D**).

HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬 배에서의 GFP 발현양상이 일반 제브라피쉬 배의 HuC mRNA 발현양상과 동일한지를 확인하기 위하여, 하기와 같은 방법으로 RNA 조직내 혼성화를 수행하였다. 먼저, DIG-RNA 표지 키트(Boehringer Mannheim사)를 이용하여 제브라피쉬 HuC cDNA의 3' 말단에 대한 안티센스 딕옥시제닌-표지 RNA 탐침(antisense digoxigenin-labeled RNA probe)을 제조한 후, 알카라인 인산화효소(alkaline phosphatase)가 결합된 항-디그옥시제닌 항체(anti-digoxigenin antibody, Vector Laboratories사)를 이용하여 Jowett와 Lettice의 설명에 따라 혼성화시켜 그 결과를 관찰하였다.

그 결과, HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬 배에서의 GFP 발현은 일반 제브라피쉬 배의 RNA 조직내 혼성화에 의해 밝혀진 HuC 발현 시간인 11시간대에서 HuC의 발 현양상과 동일하게 나타나는 것으로 확인되었다(**도 8** 의 **A** 및 **B**).

또다른 방법으로 HuCP-GFP 형질전환체에서 GFP의 신경특이적 발현을 입증하기 위해 항-GFP 폴리클로날 항체(anti-GFP polyclonal antibody)를 이용한 전슬라이드 면역염색법(whole mount immunostaining)을 이용하여 형질전환 제브라피쉬 배에서 GFP 양성반응 세포들을 확인하였다.

구체적으로, 외막을 벗긴 배를 4℃에서 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 함유한 BT 고정액(0.1M $CaCl_2$, 4% 수크로오스를 포함하는 0.1M $NaPO_4$, pH 7.4)으로 고정시킨 후, PBST(1¡PBS, 0.1% Triton X-100, pH 7.4)로 가볍게 헹구어 7분 동안 -20℃에서 아세톤에 담궈두고 PBST로 다시 3차례 세척하였다. 1시간 동안 PBS-DT 블로킹 용액(1¡ PBST, 1% BSA, 1% DMSO, 0.1% Triton X-100, 2% goat serum)에 넣어두었다가 상기에서 준비된 배를 1:1000으로 희석시킨 항-GFP 폴리클론 항체(Clontech사)와 상온에서 4시간 동안 결합시킨 뒤, PBS-DT로

2시간 동안 10번 세척하고, 1:500으로 희석시킨 바이오틴이 결합된 염소의 항-토끼 항체(biotinylated goat anti-rabbit antibody, Vector사)로 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. 상기 배를 상온에서 6시간 동안 다시 세척하고, 2시간 동안 일정시약(Vectastain Elite ABC reagent, Vector사)으로 처리한 뒤, PBS-DT 및 pH 7.4의 0.1 M $NaPO_4$ 로 각각 5차례 및 3차례 세척하여 주고, 1 ㎖의 DAB 용액(1% DMSO, 0.5㎎/㎖ diaminobenzidine, 0.0003% H_2O_2 in 0.05M $NaPO_4$, pH 7.4)과 상온에서 반응시킨 뒤, 5-10분간 관찰하여 현미경상에서 색변화가 일어나면 0.1M $NaPO_4$, pH 7.4 용액을 첨가하여 반응을 정지시켰다.
전슬라이드 조직내 혼성화 및 면역염색법의 양상은 Zeiss Axioscop 현미경으로 관찰하였다. 배와 성체는 Westerfield(1995)의 방법에 따라 트리케인(Sigma사)을 이용하여 마취시킨 뒤 Zeiss Axioscop 형광현미경에 FITC 필터를 통하여 관찰하였다. 레이저 스캐닝 동초점현미경상은 FITC 필터를 장착한 라이카 DM/R-TCS 레이저 스캐닝 동초점현미경을 이용하였다.
그 결과, 24시간대의 형질전환 제브라피쉬 배에서 종뇌부(telencephalic cluster), 전연합(anterior commissure), 골단부(epiphyseal cluster), 후연합(posterior commissure), 후연합관(tract of posterior commissure), 후시신경연합(post optic commissure), 후시신경연합관(tract of the post optic commissure), 후각판(olfactory placodes), 연수섬유속의 핵(nuclear of medial longitudinal fasciculus), 연수섬유속(medial longitudinal fasciculus) 삼차신경절(trigeminal ganglion) 및 후뇌의 7개 신경소편(seven rhombomeres in the hindbrain)과 같은 다양한 신경세포가 항-GFP 항체에 의해 검출되었다. 또한, 세가지 형태의 초기 운동신경과 Rohon-Beard 신경, 중간 뉴우런(interneuron)과 같은 척추신경에서도 레이저 컨포칼(confocal) 현미경에 의해 보이는 형광신경 양상과 같이 항-GFP 항체에 의해 검출되는 것을 확인할 수 있었다(**도 8**). 상기한 결과들은 본 발명의 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬 배에서 GFP 발현에 의해 나타난 신경특이적 양상이 일반 제브라피쉬 배에서 HuC mRNA 전사체와 동일한 시간적, 공간적 발현임을 의미한다.

<실시예 6> HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬를 이용한 신경 돌연변이체의 선별방법

본 발명의 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬를 신경 돌연변이체의 보다 용이한 선별 도구로써 이용할 수 있는지를 확인하기 위하여, HuCP-GFP 유전자를 제브라피쉬 mib(mind bomb) 돌연변이체(Schier et al., 1996)에 도입하였다. mib 돌연변이체는 감각신경, 중간뉴우런, 초기 운동신경을 포함한 분화하고 있는 초기 신경이 많은 수로 증가하는 신경성 증식(neuronal hyperplasia)이 발생한 신경변이체로 알려져 있다(Jiang et al., 1996).
이를 위하여, 우선 HuC-GFP 동형접합 형질전환 제브라피쉬인 HuCP-GFP $^{+/+}$ 를 mib 이형접합 변이체인 mib $^{+/-}$ 와 교배하여 HuCP-GFP $^{+/-}$ /mib $^{+/-}$ 를 얻고 성체로 키운 후 이를 다시 mib 이형접합 변이체인 mib $^{+/-}$ 와 교배하였다. 이로부터 얻어진 HuCP-GFP $^{+/-}$ /mib $^{-/-}$ 와 mib 유전자의 야생형인 이형접합 형질전환체 HuCP-GFP $^{+/-}$ 의 GFP 발현강도 및 발현부위를 비교한 결과, mib 유전자가 변이된 HuCP-GFP $^{+/-}$ /mib $^{-/-}$ 는 야생형인HuCP-GFP $^{+/-}$ 에 비해 신경세포에서 발현하는 GFP의 강도가 훨씬 강할 뿐 아니라 GFP가 발현되는 영역 또한 확장되어 있어서 mib 변이체에 신경세포의 수가 늘어난 신경성 증식이 발생한 것을 쉽게 확인할 수 있었다(**도 9**). 따라서, 본 발명에서 얻어진 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬는 신경변이가 발생한 제브라피쉬 돌연변이체의 선별과 분석에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 신경세포에서 특이적으로 발현하는 HuC 유전자의 프로모터 부위를 분리¡동ㅗ臼 이의 염기서열 및 조절인자들을 분석함으로써 상기 HuC 프로모터가 신경세포의 분화를 조절하는 기작을 확인하고, 이를 이용하여 GFP(green fluorescence protein)의 발현이 신경계에 특이적으로 일어나는 형질전환 제브라피쉬를 제공한다. 본 발명의 HuC 프로모터는 신경계의 분화를 조절하는 기작을 연구하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 상기 HuC 프로모터 및 이를 이용한 신경특이적 GFP 발현 형질전환 제브라피쉬는 상세한 신경세포의 구성과 형성과정 및 신경세포와 신경조직의 분포확을 가능케할 뿐 아니라 신경계에 변성이 일어난 신경 돌연변이체를 다양한 제브라피쉬 돌연변이체 집합들로부터 살아있는 상태에서 손쉽게 선별, 분석하는데 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
삭제

청구항 2.
삭제

청구항 3.
서열번호 1로 기재되는 HuC 유전자 프로모터에 GFP(green fluorescence protein) 유전자를 연결한 HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트 pHuC10GFP(수탁번호 : KCTC 0802BP).

청구항 4.
제 3항의 융합유전자 콘스트럭트를 포함하고 있는 동형접합 형질전환 제브라피쉬의 정자(수탁번호 : KCTC 0844BP).

청구항 5.
제 3항의 융합유전자 콘스트럭트를 게놈 내에 포함하여 신경 특이적으로 GFP를 발현하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 6.
1) 제브라피쉬의 신경특이적 발현을 조절하는 서열번호 1로 기재되는 HuC 유전자의 프로모터에 GFP 유전자를 연결한 제 3항의 융합 유전자 콘스트럭트를 제조하는 단계;
2) 상기 융합 유전자 콘스트럭트를 수정란에 미세주입하는 단계;
3) 상기 수정란으로부터 신경 특이적으로 형광 단백질을 발현시키는 배를 선별하는 단계;
4) 상기 선별된 배의 성체를 야생형과 교배시켜 이형접합 F1 형질전환체를 얻는 단계; 및
5) 상기 이형접합 F1 형질전환체를 다시 야생형과 교배시켜 동형접합 F2 형질전환체를 선별하는 단계로 구성되는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 7.
삭제

청구항 8.
삭제

청구항 9.
제 6항에 있어서, 동물은 제브라피쉬(zebrafish)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

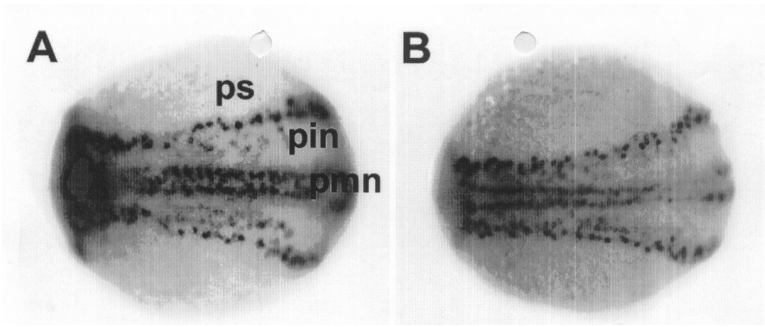
청구항 10.
제 5항의 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 신경계 돌연변이체를 선별하는 방법.

청구항 11.
제 10항에 있어서,
1) HuCP-GFP 융합 유전자 컨스트럭트를 게놈내에 포함하는 동형접합 형질전환 제브라피쉬를 미지의 이형접합 신경 변이체와 교배시켜 F1 자손을 얻는 단계;
2) 상기 F1 자손을 이형접합 신경변이체와 다시 교배시켜의 동형접합 신경변이체를 얻는 단계;
3) 상기 동형접합 신경변이체의 배(embryo)에서 발현되는 GFP의 형광을 HuCP-GFP 이형접합 형질전환 제브라피쉬의 배에서 발현되는 형광과 비교하여 신경 돌연변이체를 선별하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

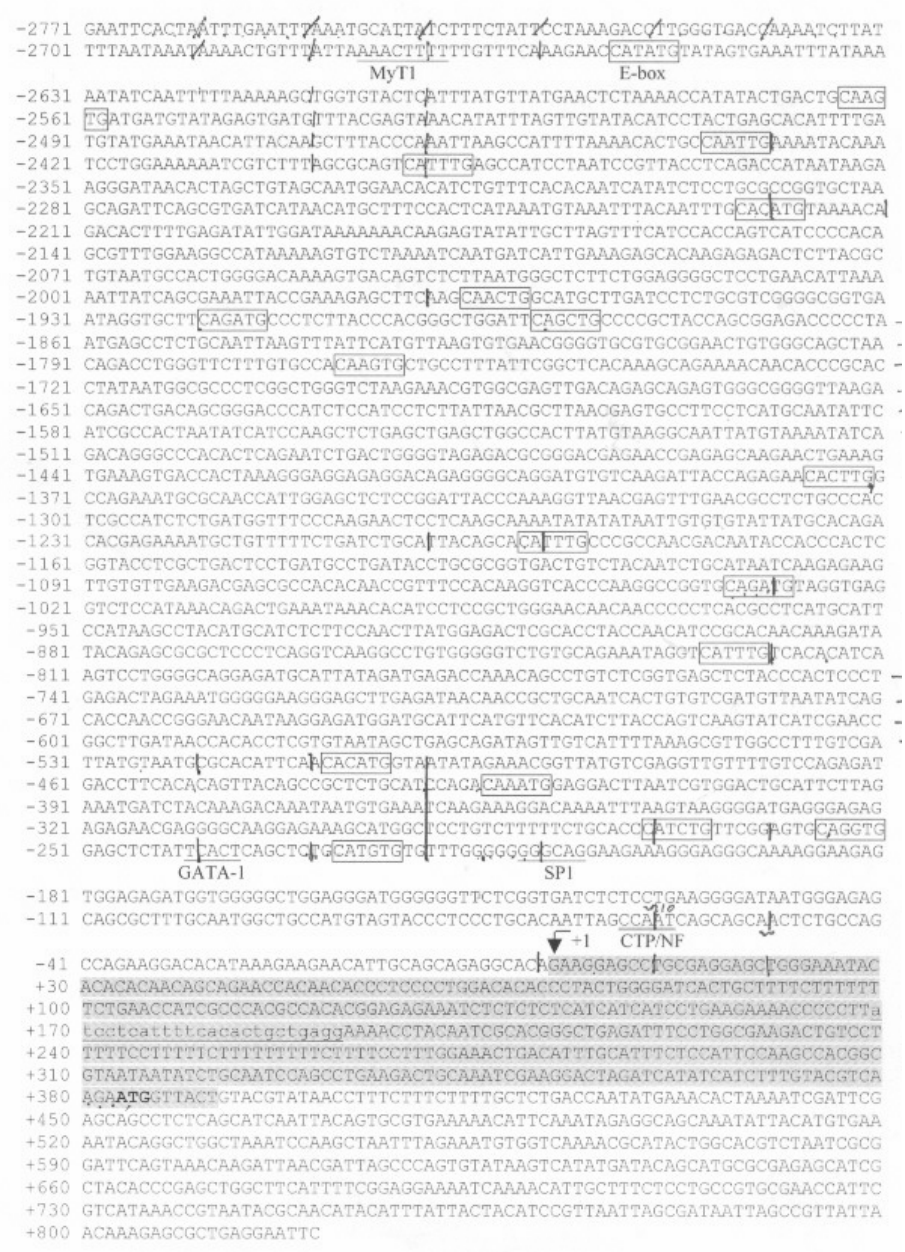
청구항 12.
제 5항의 HuCP-GFP 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 신경계 돌연변이체의 신경계 변화를 분석하는 방법.

도면

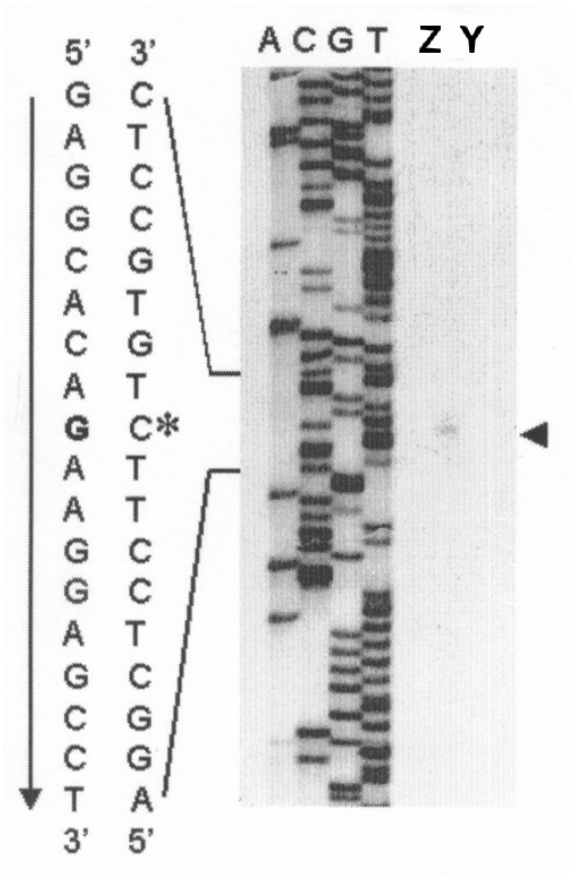
도면1



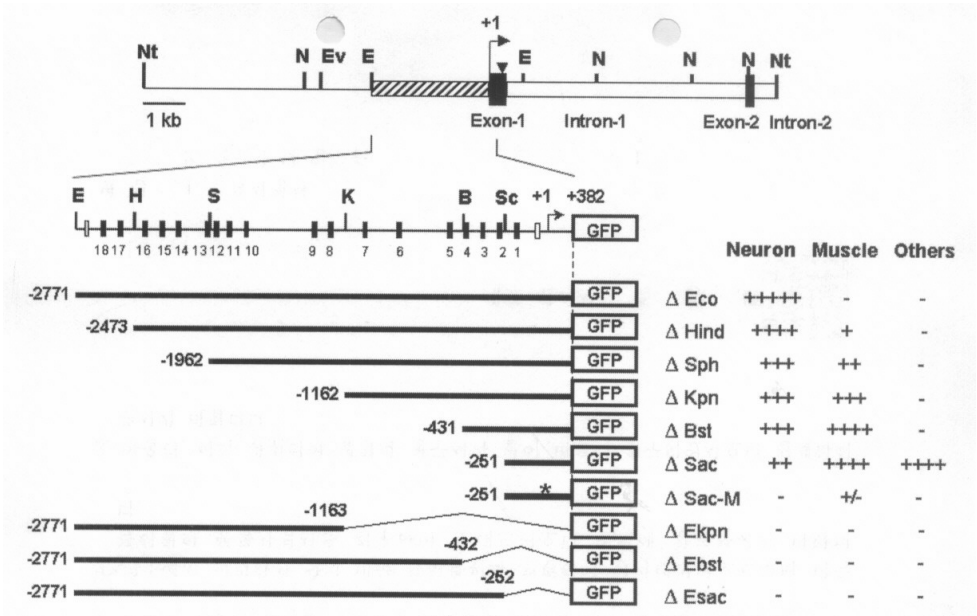
도면2



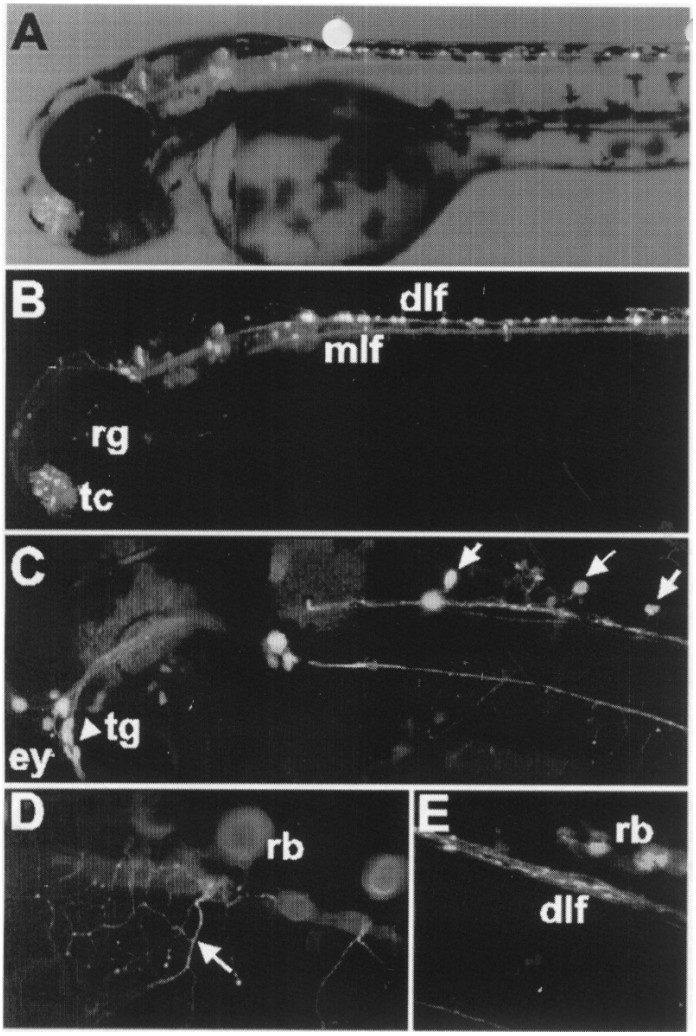
도면3


A C G T Z Y
5' 3'
G C
A T
G C
G C
C G
A T
C G
A T
G C*
A T
A T
G C
G C
A T
G C
C G
C G
T A
3' 5'

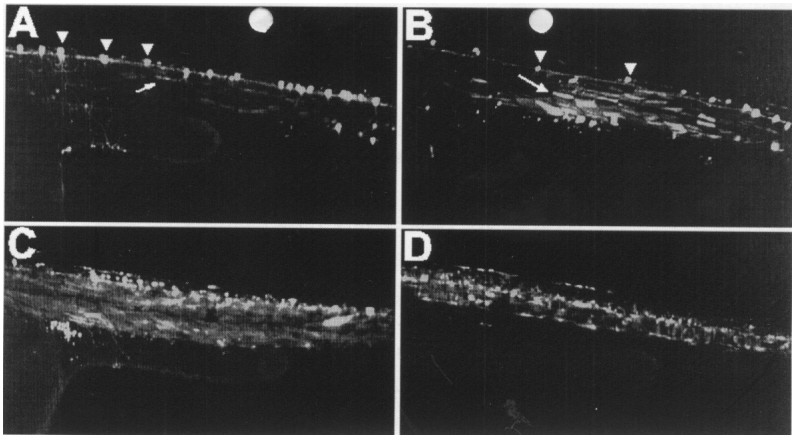
도면4


+1
Nt
N Ev E
E N N N Nt
1 kb
Exon-1
Intron-1
Exon-2
Intron-2
E H S K B Sc +1 +382
GFP
18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
Neuron Muscle Others
-2771
-2473
-1962
-1162
-431
-251
-251 *
-1163
-432
-252
Δ Eco +++++ - -
Δ Hind ++++ + -
Δ Sph +++ ++ -
Δ Kpn +++ +++ -
Δ Bst +++ ++++ -
Δ Sac ++ ++++ ++++
Δ Sac-M - +/- -
Δ Ekpn - - -
Δ Ebst - - -
Δ Esac - - -

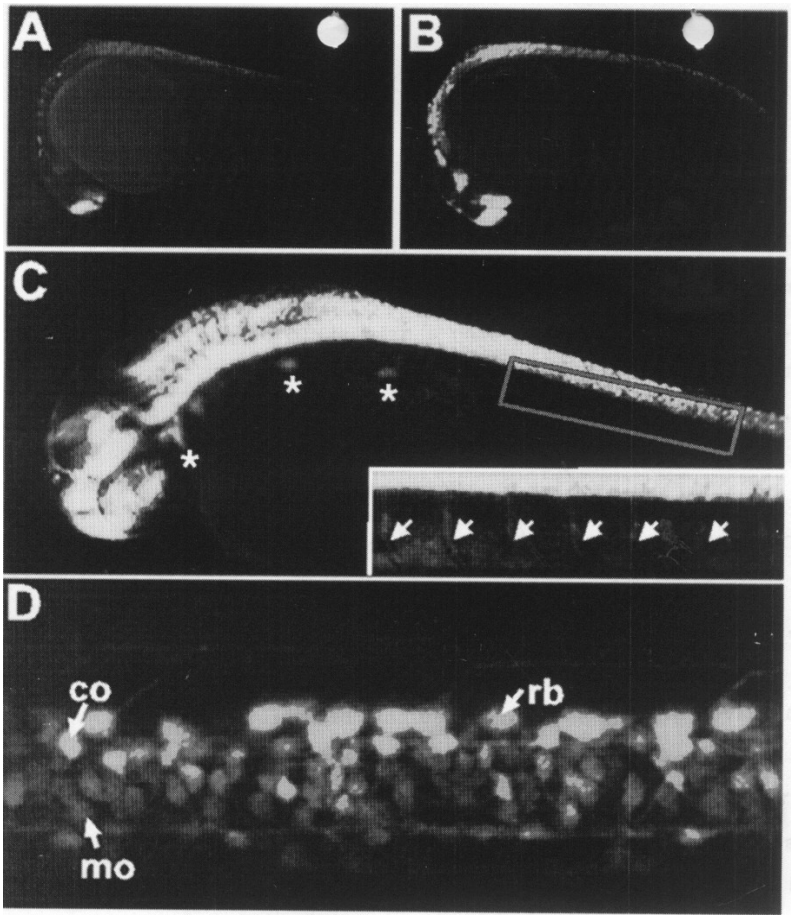
도면5



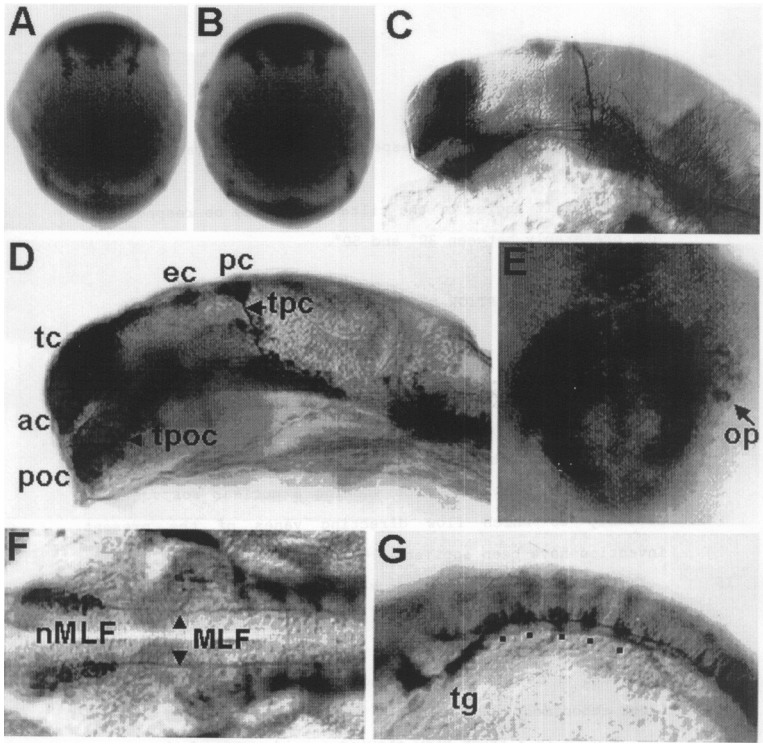
도면6



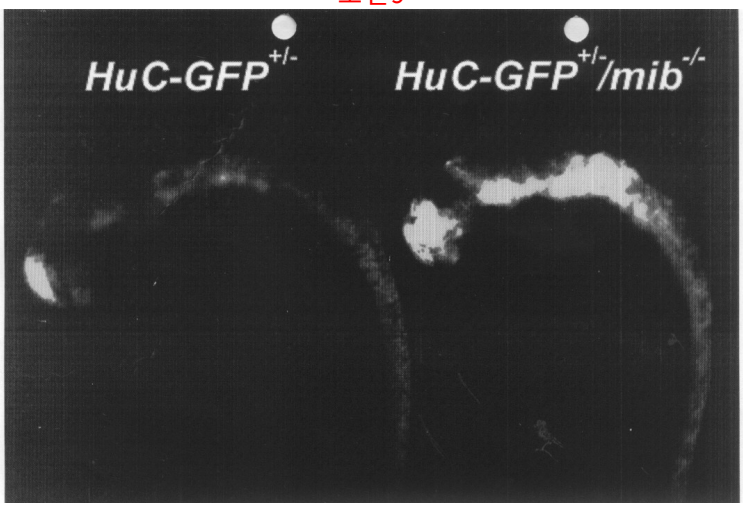
도면7



도면8



도면9



<110> HUH, Tae-Lin TG BioTech, Inc. <120> HuC promoter of zebrafish which controls neuron-specific expression of genes, a method for construction of transgenic animal conferring fluorescence neurons and its application for characterizing the neuronal mutant animal <130> Op-04-33 <160> 3 <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 3591 <212> DNA <213> Zebrafish <220> <221> promoter <222> (1)..(2771) <220> <221> promoter <222> (95)..(102) <223> MyT1 <220> <221> promoter <222> (117)..(122) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (207)..(212) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (335)..(340) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (379)..(384) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (548)..(553) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (804)..(809) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (851)..(856) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (880)..(885) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (1073)..(1078) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (1397)..(1399) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (1579)..(1584) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (1737)..(1742) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (1945)..(1950) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (2262)..(2267) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (2346)..(2351) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (2499)..(2504) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (2543)..(2548) <223> E-box <220> <221> promoter <222> (2559)..(2564) <223> SP1 <220> <221> promoter <222> (2530)..(2534) <223> GATA-1 <220> <221> promoter <222> (2708)..(2712) <223> CTP/NF <220> <221> mRNA <222> (2772)..(3591) <400> 1 gaattcacta atttgaattt aaatgcatta tctttctatt cctaaagacc ttgggtgacc 60 aaaatcttat tttaataaat aaaactgttt attaaaactt ttttgtttca aagaaccata 120 tgtatagtga aatttataaa aatatcaatt tttaaaaagc tggtgtactc atttatgtta 180 tgaactctaa aaccatatac tgactgcaag tgatgatgta tagagtgatg tttacgagta 240 aacatattta gttgtataca tcctactgag cacattttga tgtatgaaat aacattacaa 300 gctttaccca aattaagcca ttttaaaaca ctgccaattg aaaatacaaa tcctggaaaa 360 aatcgtcttt agcgcagtca tttgagccat cctaatccgt tacctcagac cataataaga 420 agggataaca ctagctgtag caatggaaca catctgtttc acacaatcat atctcctgcg 480 ccggtgctaa gcagattcag cgtgatcata acatgctttc cactcataaa tgtaaattta 540 caatttgcac atgtaaaaca gacacttttg agatattgga taaaaaaaca agagtatatt 600 gcttagtttc atccaccagt catccccaca gcgtttggaa ggccataaaa agtgtctaaa 660 atcaatgatc attgaaagag cacaagagag actcttacgc tgtaatgcca ctggggacaa 720 aagtgacagt ctcttaatgg gctcttctgg aggggctcct gaacattaaa aattatcagc 780 gaaattaccg aaagagcttc aagcaactgg catgcttgat cctctgcgtc ggggcggtga 840 ataggtgctt cagatgccct cttacccacg ggctggattc agctgccccg ctaccagcgg 900 agacccccta atgagcctct gcaattaagt ttattcatgt taagtgtgaa cggggtgcgt 960 gcggaactgt gggcagctaa cagacctggg ttctttgtgc cacaagtgct gcctttattc 1020 ggctcacaaa gcagaaaaca acacccgcac ctataatggc gccctcggct gggtctaaga 1080 aacgtggcga gttgacagag cagagtgggc ggggttaaga cagactgaca gcgggacccca 1140 tctccatcct cttattaacg cttaacgagt gccttcctca tgcaatattc atcgccacta 1200 atatcatcca agctctgagc tgagctggcc acttatgtaa ggcaattatg taaaatatca 1260 gacagggccc acactcagaa tctgactggg gtagagacgc gggacgagaa ccgagagcaa 1320 gaactgaaag tgaaagtgac cactaaaggg aggagaggac agaggggcag gatgtgtcaa 1380 gattaccaga gaacacttgg ccagaaatgc gcaaccattg gagctctccg gattacccaa 1440 aggttaacga gtttgaacgc ctctgcccac tcgccatctc tgatggtttc ccaagaactc 1500 ctcaagcaaa atatatataa ttgtgtgtat tatgcacaga cacgagaaaa tgctgttttt 1560 ctgatctgca ttacagcaca tttgcccgcc aacgacaata ccacccactc ggtacctcgc 1620 tgactcctga tgcctgatac ctgcgcggtg actgtctaca atctgcataa tcaagagaag 1680 ttgtgttgaa gacgagcgcc acacaaccgt ttccacaagg tcacccaagg ccggtgcaga 1740 tgtaggtgag gtctccataa acagactgaa ataaacacat cctccgctgg gaacaacaac 1800 cccctcacgc ctcatgcatt ccataagcct acatgcatct cttccaactt atggagactc 1860 gcacctacca acatccgcac aacaaagata tacagagcgc gctccctcag gtcaaggcct 1920 gtgggggtct gtgcagaaat aggtcatttg tcacacatca agtcctgggg

caggagatgc 1980 attatagatg agaccaaaca gcctgtctcg gtgagctcta cccactccct gagactagaa 2040 atgggggaag ggagcttgag ataacaaccg ctgcaatcac tgtgtcgatg ttaatatcag 2100 caccaaccgg gaacaataag gagatggatg cattcatgtt cacatcttac cagtcaagta 2160 tcatcgaacc ggcttgataa ccacacctcg tgtaatagct gagcagatag ttgtcatttt 2220 aaagcgttgg cctttgtcga ttatgtaatg cgcacattca acacatggta atatagaaac 2280 ggttatgtcg aggttgtttt gtccagagat gaccttcaca cagttacagc cgctctgcat 2340 ccacacaaat ggaggactta atcgtggact gcattcttag aaatgatcta caaagacaaa 2400 taatgtgaaa tcaagaaagg acaaaattta agtaagggga tgagggagag agagaacgag 2460 gggcaaggag aaagcatggc tcctgtcttt ttctgcaccc atctgttcgg agtgcaggtg 2520 gagctctatt cactcagctc tgcatgtgtg tttgggggggg gcaggaagaa agggagggca 2580 aaaggaagag tggagagatg gtgggggctg gagggatggg gggttctcgg tgatctctcc 2640 tgaaggggat aatgggagag cagcgctttg caatggctgc catgtagtac cctccctgca 2700 caattagcca atcagcagca actctgccag ccagaaggac acataaagaa gaacattgca 2760 gcagaggcac agaaggagcc tgcgaggagc tgggaaatac acacacaaca gcagaaccac 2820 aacaccctcc cctggacaca ccctactggg gatcactgct tttctttttt tctgaaccat 2880 cgcccacgcc acacggagag aaatctctct ctcatcatca tcctgaagaa aacccccctta 2940 tcctcatttt cacactgctg aggaaaacct acaatcgcac gggctgagat ttcctggcga 3000 agactgtcct ttttccttt tctttttttt tcttttcctt tggaaactga catttgcatt 3060 tctccattcc aagccacggc gtaataatat ctgcaatcca gcctgaagac tgcaaatcga 3120 aggactagat catatcatct ttgtacgtca agaatggtta ctgtacgtat aacctttctt 3180 tcttttgctc tgaccaatat gaaacactaa aatcgattcg agcagcctct cagcatcaat 3240 tacagtgcgt gaaaaacatt caaatagagg cagcaaatat tacatgtgaa aatacaggct 3300 ggctaaatcc aagctaattt agaaatgtgg tcaaaacgca tactggcacg tctaatcgcg 3360 gattcagtaa acaagattaa cgattagccc agtgtataag tcatatgata cagcatgcgc 3420 gagagcatcg ctacacccga gctggcttca ttttcggagg aaaatcaaaa cattgctttc 3480 tcctgccgtg cgaaccattc gtcataaacc gtaatacgca acatacattt attactacat 3540 ccgttaatta gcgataatta gccgttatta acaaagagcg ctgaggaatt c 3591 <210> 2 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 2 cctcagcagt gtgaaaatga ggat 24 <210> 3 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 3 tagcccatca gcagcaactc tgcc 24