

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0164679
(43) 공개일자 2024년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2024.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0061389
(22) 출원일자 2023년05월11일
심사청구일자 2023년05월11일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김철희
대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트
최태익
대전광역시 서구 도림6길 80
이유리
충청남도 논산시 양촌면 바랑산길 121
(74) 대리인
이원희

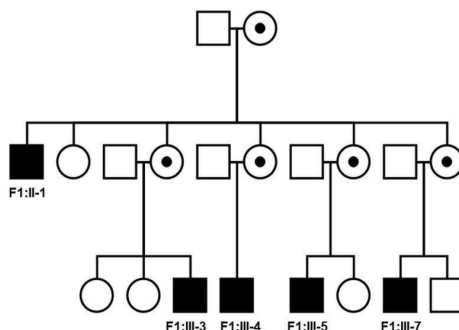
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 SRPK3 유전자를 결손시킨 제브라피쉬 모델 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 SRPK3 유전자를 결손(knock-out)시킨 제브라피쉬 모델에 관한 것으로, 지적 장애 특히, X 염색체 연관 지적 장애(X-linked intellectual disability, XLID) 환자에게서 관찰되는 비정상적인 자발적 안구 운동 및 시각 반응, 사회적 상호작용 저하 및 소뇌 크기 감소 등의 증상이 SRPK3 결손 제브라피쉬에서도 확인되어 SRPK3 유전자가 실제 XLID의 원인 유전자라는 것을 규명함과 동시에 XLID 증상을 발현하는 제브라피쉬 모델을 제조하였다. 따라서 본 발명의 제브라피쉬 모델을 이용하여 지적 장애 질환 관련 치료제 스크리닝 방법에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2227/40 (2013.01)
A01K 2267/0356 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711185722
과제번호	2020R1A5A8017671
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업-선도연구센터-지역혁신성장분야
연구과제명	마이크로바이옴 - 뇌신경질환 융합연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

SRPK3 유전자가 결손(knock-out)된 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SRPK3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제브라피쉬 모델은 지적 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 지적 장애 관련 질환은 X-염색체 연관 지적 장애(X-linked intellectual disability, XLID)인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 XLID는 SRPK3 단백질의 트레오닌(threonine, T) 458번이 아르기닌(arginine, N)으로 치환된 돌연변이에 의한 것인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 XLID는 SRPK3 단백질의 글루타민산(glutamate, E) 529번이 리신(lysine, K)으로 치환된 돌연변이에 의한 것인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제브라피쉬 모델은 비정상적인 시각 반응 및 안구 운동을 나타내는 것인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제브라피쉬 모델은 사회적 상호작용이 저하된 것인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제브라피쉬 모델은 소뇌핵의 크기가 감소하는 것인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델.

청구항 10

- 1) SRPK3 유전자 결손을 위한 콘스트럭트(construct)를 제조하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계를 포함하는 제브라피쉬 모델의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 단계 1)의 SRPK3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 제브라피쉬 모델은 지적 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 하는 제브라피쉬 모델의 제조방법.

청구항 13

1) 제1항의 제브라피쉬 모델에 피검물질을 처리하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제브라피쉬 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복 여부를 판단하는 단계를 포함하는 지적 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 증상은 비정상적인 자발적 안구 운동 또는 사회적 상호작용 저하인 것을 특징으로 하는 지적 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 지적 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 지적 장애 관련 질환은 XLID인 것을 특징으로 하는 지적 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 SRPK3 유전자를 결손시킨 지적 장애 제브라피쉬 모델에 관한 것이다.

배경 기술

전체 인구의 1 내지 3%가 발달 장애, 지적 장애를 앓고 있다고 알려져 있다(Baird and Sadovnick, 1985; Maulik et al., 2011; Wallin, 1985). 특히, 지적 장애를 가지는 환자 중 남성의 비율이 매우 높게 나타나는데 이것은 지적 장애에 관련한 주요 유전자들이 X 염색체 상에 다수 존재하고 있기 때문이다(Morton et al., 1977; Penrose, 1938; Stevenson and Schroer, 1996). X 염색체 상에 존재하는 유전자의 열성 돌연변이는 남성 지적 장애에 크게 기여하고(Lubs et al., 2012), X 염색체에 존재하는 유전자의 열성 돌연변이 유전에 의해 발생하는 지적 장애는 X 염색체 연관 지적 장애(X-linked intellectual disability, XLID)라고 알려져 있다. 현재까지의 연구결과에 따르면, 114가지 XLID 증후군에 기여하는 145개 유전자를 동정하였고, 지난 10년간 엑솜시퀀싱

(exome sequencing)으로 145개의 XLID 증후군과 관련된 28개의 유전자를 밝혀냈다(Neri et al., 2018).

[0003] SRPK(SRSF 단백질 인산화효소)는 연구 초기에는 RNA 스플라이싱(splicing)에 관여한다고 알려졌으나, 이후 SRPK가 E3 유비퀴틴 연결효소(ubiquitin ligase)인 RNF12를 인산화하고, 이러한 인산화를 통해 RNF12가 활성화되어 핵으로 이동한다는 사실이 밝혀져 최근에는 RNF12의 인산화 효소로도 알려지게 되었다. SRPK에 의한 RNF12의 인산화는 RNF12의 기질의 유비퀴틴화(ubiquitylation)를 조절하고 결과적으로 신경발달 유전자의 발현을 조절한다(Bustos, et al., 2020). 그리고 지적 장애 환자에서 SRPK 단백질인 SRPK2와 SRPK3의 유전자 돌연변이가 일부 발견되었기 때문에 SRPK2와 SRPK3를 비롯한 SRPK 단백질이 지적 장애와 관련이 있을 것이라고 유추해왔다(Bustos, et al., 2022). 하지만 직접적으로 실험 동물에서 SRPK3 유전자를 돌연변이시키거나 결손시켜 SRPK3가 실제 지적 장애의 원인 유전자라고 밝힌 연구는 현재까지 세계적으로 전혀 없었다.

[0004] 제브라피쉬 (zebrafish)는 체외 수정을 하고, 발생배가 투명하며, 대량의 수정란을 쉽게 확보할 수 있고, 초기 발생이 매우 빨라 대부분의 조직 및 장기가 하루 만에 형성된다. 제브라피쉬 전체 유전체 정보는 현재 모두 공개되어 있어 게놈(genome) 데이터베이스를 통해 검색이 가능하고, 척추동물로서 유전체 구성이 인간과 매우 비슷하다. 상기의 특징으로 형질전환 제브라피쉬에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔고, 이전 연구에서 제브라피쉬는 뇌 발달과 신경 발생을 연구하기 위한 유용한 척추동물모델임을 보여주었다(Itoh et al., 2003; Kim et al., 2000). 또한, 동물모델로써 뇌발달의 소두증, 지적 장애, 자폐증과 관련된 인간 후보 유전자의 기능 검증에 사용되었다(Brooks et al., 2014; Choi et al., 2018; Frosk et al., 2017; Khan et al., 2019; Kim et al., 2012; Kim et al., 2017; May et al., 2015; McCammon et al., 2017; Stankiewicz et al., 2017). 특히 최근에는 CRISPR-Cas9 유전자 가위를 활용한 유전자 녹아웃 제브라피쉬의 제조가 매우 활발히 진행되고 있다. 인위적으로 외부의 유전자를 삽입한 형질전환 동물(transgenic animals) 또는 유전자를 제거한 녹아웃(결손) 동물(knock-out animals)은, 생명체에서의 특정 유전자의 역할을 규명하는 기초연구에 유용하게 쓰일 수 있다. 특히, 특정 질병의 원인이 되는 유전자를 삽입 또는 결손시킨 형질전환 동물 또는 유전자 녹아웃 동물은 인간의 질병을 모델링하는 모델동물로서 사용할 수 있다. 즉, 특정 질병의 발병 기전을 파악하거나, 치료제 후보물질의 치료제 스크리닝 기술 및 도구로서 매우 유용하다.

[0005] 본 발명자들은 XLID 원인의 후보유전자인 SRPK3가 실제 XLID의 원인인지 확인함과 동시에 XLID의 증상을 모방할 수 있는 동물 모델을 개발하고자 제브라피쉬에서 SRPK3 유전자를 결손시켰고 제브라피쉬에서 SRPK3 유전자가 결손되면 시각 정보처리 및 안구 운동 조절에 이상이 발생하고 사회적 상호작용이 저하되며 소뇌의 크기가 감소하는 등의 XLID의 증상을 제브라피쉬에서 관찰하여 SRPK3 결손을 통해 인간의 XLID 검증을 위한 질환모델동물을 제조할 수 있음을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 SRPK3 유전자를 결손시킨 제브라피쉬 모델 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SRPK3 유전자를 결손시킨 제브라피쉬 모델을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은

[0009] 1) SRPK3 유전자 결손 콘스트럭트(construct)를 제조하는 단계; 및

[0010] 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계를 포함하는 제브라피쉬 모델의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은

[0012] 1) 상기 제브라피쉬 모델에 피검물질을 처리하는 단계; 및

[0013] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제브라피쉬 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복 여부를 판단하는 단계를 포함하는 지적 장애 관련 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 SRPK3를 결손시킨 제브라피쉬 모델에 관한 것으로, XLID 환자의 원인 후보 유전자인 SRPK3를 결손시킨 제브라피쉬 모델을 제조하고, 상기 제브라피쉬 모델에서 지적 장애와 관련이 있는 증상인 시각 반응 및 안구

운동 조절 결함과 사회적 상호작용 저하, 소뇌의 크기 감소 등을 확인함으로써 SRPK3가 XLID의 원인임을 입증하였으며 동시에 XLID 제브라피쉬 모델을 제조하였다. 따라서 SRPK3 유전자의 결손을 통한 XLID 제브라피쉬 모델을 이용하면 XLID 치료제의 스크리닝 기술로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015]

도 1은 XLID 환자 가족 1의 가계도이다. 사각형은 남성, 원형은 여성, 검은색은 XLID 환자이자 SRPK3 돌연변이의 동형접합체 보유자, 원형에 점을 포함한 도형은 여성이되, SRPK3 돌연변이를 이형접합체로 보유하고 있는 보균자를 의미한다.

도 2는 SRPK3 단백질에 대한 인간과 제브라피쉬의 아미노산 서열의 정렬 배열 결과이다. 검정색 음영은 동일한 아미노산을 의미하여 보존성이 높다는 것을 알 수 있고 붉은색 화살표는 XLID 환자에게서 발견된 돌연변이의 위치를 의미한다. 각 돌연변이의 위치도 보존성이 높음을 알 수 있다.

도 3a는 인간 배아 발달 단계의 해부학적 기준인 카네기 단계 15의 인간에서의 SRPK3 발현 양상을 나타내는 것으로 나중에 소뇌로 발생하는 후뇌(hindbrain, hb)에 SRPK3 발현이 높은 것을 확인할 수 있다.

도 3b는 카네기 단계 19의 인간에서의 SRPK3 발현 양상을 나타내는 것으로 전뇌(forebrain, fb), 소뇌(cerebellum, cb) 및 연수(medulla, m)에 발현되는 것을 확인할 수 있다.

도 3c는 도 3b의 확대 이미지로서 맥락막 신경총 상피 세포(choroid epithelium, cp)에서의 SRPK3 발현이 높은 것을 알 수 있다.

도 3d는 카네기 단계 23의 인간에서의 SRPK3 발현 양상을 나타내는 것으로 소뇌와 안구에서의 발현이 강하게 나타난다.

도 4는 제브라피쉬 배아의 발달 과정에서 SRPK3 유전자의 발현 양상을 확인한 것으로 수정 24시간 후(24 hours post fertilization, hpf)에는 뇌, 심장 및 근육에서의 발현이 높고 수정 72시간 후(72 hpf)에는 뇌와 안구에서의 발현이 높은 것을 알 수 있다.

도 5는 SRPK3 단백질의 구조를 모델링한 결과로서 각각의 유전자 돌연변이에 의하여 단백질 구조 및 기능에 영향을 미칠 수 있음을 제시한다.

도 5a는 SRPK3 구조 상에서 His159, Thr458 및 Glu529의 위치를 확인할 수 있다.

도 5b는 SRPK3의 첫번째 돌연변이인 H159D와 야생형(WT)인 H159의 곁사슬(side chain)을 비교한 그림이다.

도 5c는 SRPK3의 두번째 돌연변이인 T458N과 야생형인 T458의 곁사슬을 비교한 그림이다.

도 5d는 SRPK3의 세번째 돌연변이인 E529K와 야생형인 E529의 곁사슬 및 전하(charge)를 비교한 그림이다. 붉은색은 음전하, 푸른색은 양전하를 의미한다.

도 6은 야생형 SRPK3와 SRPK3 결손(KO) 단백질의 구조를 도식화한 것이다.

도 7은 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 부레(붉은색 화살표로 표시)를 비교한 것으로, 야생형 제브라피쉬의 부레는 공기가 유입되어 부풀어 있으나 KO 제브라피쉬는 공기가 유입되지 않아 부레가 부풀지 않았다. 제브라피쉬의 부레 형성은 중력 감지에 따른 방향성 이동, 정상적인 시각 기능, 공기 방울 삼킴 작용 등, 복잡한 신경발달의 지표로서 사용된다.

도 8은 신경계 마커인 neurog1, her 4, islet 1 및 th의 발현을 확인한 결과이다.

도 9a는 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 신경계 시각 반응 및 안구의 움직임을 기록한 그래프이다.

도 9b는 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 신경계 시각 반응에 따른 안구 운동의 빈도를 분석한 그래프이다. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

도 9c는 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 시각 반응의 안각을 측정된 결과이다. $**p < 0.01$.

도 9d는 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 시각 반응성 실험에서 안구가 제자리로 돌아오기까지 걸리는 시간(리셋 타임)을 측정하여 분석한 결과이다. $**p < 0.01$. 시각 반응의 리셋 타임은 동물에서

움직이는 물체를 파악, 인식하는 데 매우 중요하고, 사람의 경우에는 난독증, 학습 장애, 지적 장애 검사의 주요 지표로 활용하고 있다.

도 10은 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 색상 선호도를 측정하기 위해 파란색 또는 노란색 챔버(chamber)에 머문 시간을 기록하여 분석한 그래프이다.

도 11a는 사회적 상호작용을 확인하기 위해 10분에서 15분 사이의 5분 간의 야생형 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 움직임을 기록한 사진이다.

도 11b는 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬가 각각 존 1, 2, 3 및 4에서 머문 시간을 기록한 그래프이다. *p < 0.05.

도 12a는 야생형(WT) 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 뇌를 비교한 사진으로 외형적으로는 전체적인 뇌의 크기 및 구조에는 차이가 없다.

도 12b는 야생형 제브라피쉬와 SRPK3 결손(KO) 제브라피쉬의 안구의 뇌의 박편을 헤마토자일린 & 에오신(haematoxylin& eosin, H&E) 염색한 것으로, 판막 소뇌(valvular cerebelli)가 작아진 것을 확인할 수 있다. 판막 소뇌는 인간에서 소뇌핵의 기능에 상응하며, 이러한 소뇌핵에서 소뇌의 신경섬유들이 뿔어나오는 데 이는 소뇌로부터 뇌 전체 신경계의 다른 부분에 정보를 전달하며, 감각신경계 조절, 상황 인식 등 신경계 작용에서 중요한 위치를 차지한다. Val: 판막 소뇌의 가쪽지역(lateral division of valvular cerebelli); Vam: 판막 소뇌의 안쪽지역(medial division of valvular cerebelli); NLV: 가쪽 판막핵(nucleus lateralis valvulae).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 SRPK3 유전자를 결손(knock-out)시킨 제브라피쉬 모델을 제공한다.

상기 SRPK3 유전자는 표 1의 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진다.

표 1

명칭	서열	서열번호
제브라피쉬 SRPK3 cDNA	ATGTCCTCGTGCAGTCGGTCCCATTTCAACCGCACGAGCTGCTGTCAATACAGCGCTGAGCCTCAGTGCGCATGCTCAGAACCAACTGAGGCGAATGTGCGTGAGGTGACAGCTGTCCCGATGATATCGATGAACGTATCCAGCAGTGATAACAACCTTCCCCAGAACAGCCACGGCAAAAAGCAGAGAAGAAAAACAAGAAGCACCAGCAAGCAGCAGTAGCAGCGGCAGTGGAGATCTCTAGTTTGGAGCTGGGACCCCAATCCCTCCTCAGATGAACTGTGCCACATCTCCACCATCCACAGATCCCGCCACCCTCCAGAGTCTGTCCTCCCAACGCTCCCAAGTCCCGCAGACCTGCGAGCTCCTGCCCCATCCCACTCCATTCCCATCACAGTGGTTCTTCACTGTGCTGCTGCTGCTCCAGAAACCCCTTCAACACCTATAGCACCTTCACTGGGCTGCCTTCCATTCTCTTTCGACCCCTCCTACTCCACAGGCTCCGTCCAATCAGCGACACCACCAAGCTCTAAGCCCGCCCGCGGACTTTTCCCGCCCGCAGCAGAATTACTCGGGTCAAGATGATGAGGAGCAGGAGAATCCGTACAGTTACTGTAAAGGAGGGTATTATCCAGTGAAGATCGGAGACTTGTTAATGGCAGATATCAGTTGTGTCAGGAACTGGGATGGGGTCAATTTCTCCACTGTATGGCTGTGCTGGGATCTACAACGGAAACGGTTTGTGGCACTGAAAGTGGTTAAAGTGCCAGCACTACACTGAGACTGCACTGGACGAAATTAACCTACTGAAATGTGTGCGAGACAGCCACCCACAGACAGCAAGCGAGAGAGGCTAGTACAGCTTATCGACGATTTTAAATCTCTGCGGTCAATGGTGTTCATGTGTATGGTTCTTGAGGTTCTCGGTACACAGCTGTTAAATGGATCATCAATCCAATTACATGGGTCTGCCTCTGATCTGTGTGAAAAGCATTTCTCGACAGGTTCTGGAGGGCTGGATTACTTGCACACGAAATGCAAGATCATCCATACAGACATAAAGCCAGAGAATATCCTTCTGGAGGTGAACGAGGTGATGTGAGACGGCTAGCGGCAGAGGCCACGATATGGCAGAAGGCCGAGCTCCGCCTCCCTCTGGATCCTCTGTTAGCACGGCCCCAAGGGAAGAACAGATGGGAAAAATGTCAAAGAATAAGAAGAAGATTGAAGAGGAAGGCCAAACGGCAGCAGCAACTGCTGGATGAGAGGTAAATTGACCTGCAGAGGATGGAGGAGCTGGACGGGGTTTGGCATCGGATGCTTCTGGAAACACACGAGCACTCTGGAGACTCAGTGAGGATGAGGAGGACAACGTCAAACACGCACAAACGAATGGTAACGGAGCTCTGAATAAACAAAGTCCAGAATCTGGCTCGTCTGGCTGGAGGAGAGCTGTAAACGGCTACGGCCCGCTGCGTTTCTCCAGTCTGGATCGGGGCTGTGGGCTCTCTGGATCCATCTGTGCTAGCTACCTCTGAGTGGCTCTGTCCACATTGTCTGGATCTCTACAGAGCGATCGTGCTTTCTCCAACTCTTACTCTGCTGCTGATTTCTTAGTGAATCTCTAGAAATCTCAGAACGAGATAAAATAAGCATCAAGATTGCAGACCTGGGCAATGCATGCTGGGTGCACAAGCACTTTACTGAGGACATCCAGACGCGTCAGTACAGAGCTCTGGAGGTGCTGATCGGAGCTGAATACGGCCCGCTGCTGACATATGGAGCACTGCGTGTATGGCGTTTGAAGTGGCGACTGGAGATTATCTGTTGAGCCTCACTCAGGAGAGGACTACACTCGAGATGAAGATCACATAGCTCACATATTGAGCTGTTGGGTGCCATTCTCCACACTTCGCTCTGTCAGGCAGATACTCCAGAGAATACTTCAACCGGAGAGGTGAGCTGAGGCACATCGCTAACCTGAAGCCATGGGGTTGTTCGAGGTGCTGCTGAAAAATACGAGTGGCTCTGGATCAGGCAGCTCAGTTCAGTGATTTCTGCTCACCATGCTGGAGTTCATCCCGAGAAAGCGAGCCACGGCCGCAATGTCTGCAACACCCCTGGATCAACTCTTAA	1

제브라 피쉬 SRPK3 단백질	MSSCSRSHFNRTSCCQYSAEPQCACSEPTAEANVRETVAPMISMNVSSDNNLPQNSHGKKQKKKKKHKRKAATAA AVEISSLELGPQIPSSDELCHILTIHRSATPPESPPTPLNLSQSPDLQPPAPIPHSIPITVVPSPVVSSPETP STPIAPSLGLPSILSSTPTTPQAPSNTPTPPQALSPPPDFSPPPAELLGSDDEEQENPSDYCKGGYYPVKIGDLF NGRYHVVRKLGWGHFSTVWLCWDLQRKRFVALKVVKSAQHYTETALDEIKLLKCVRSDPTDSKRERLVQLIDDFK ISGVNGVHVMVLEVLGHQLLKWIKSNYMGPLICVKSLRQVLEGLDYLHTKCKIHTDIKPENILLEVNEVYV RRLAEEATIWQKAGAPPPSGSSVSTAPREKQMGKMSKNKKKKLKRKAKRQQQLDERLIDLQRMELDGVLPDAS GNTRALWRLSEDEEDNVKHAQTNGNGALNKQSPESGSSWLEESCNGYGLRFSPPGSGLSGLSGSILSATSESALS TLSGYSTERLLSPNSYSAADFLVNPLESQNADKISIKIADLGNACWVHKHFTEDIQTRQYRALEVLIGAEYGPPA DIWSTACMAFELATGDYLFEPHSGEDYTRDEDHIAHIELLGAIPPHFALSGRYSREYFNRRGELRHIANLKPWGL FEVLLEKYEWPLDQAAQFSDFLLTMLEFIPEKRATAAQCLQHPWINS	2
------------------------	--	---

- [0021] 상기 SRPK3는 세린/아르기닌-풍부한 단백질 인산화효소 3(serine/arginine-rich protein kinase 3), SRSF 단백질 인산화효소 3(SRSF protein kinase 3), 근육 특이적 세린 인산화효소 1(muscle-specific serine kinase 1, MSSK1) 또는 STK23으로도 불리는 단백질이다.
- [0022] 상기 SRPK3는 발견 초기에는 근육에 특이적인 단백질 인산화효소로 알려졌고 SRPK3를 결손시킨 마우스에서는 중심핵성근증(centronuclear myopathy)이 발생하고 SRPK3를 과발현시킨 마우스에서는 근섬유 변성(myofiber degeneration)이 발생한다고 알려져(Nakagawa et al., 2005) 근육에 중요한 단백질이라고 생각되었으나 최근 진행된 대규모 분석을 통해 SRPK3는 근육 관련 질환과 관련이 없다고 밝혀졌다(Vogel et al., 2021).
- [0023] 상기 SRPK3는 E3 유비퀴틴 연결효소(ubiquitin ligase)인 RNF12를 인산화하는 효소이고, SRPK에 의한 RNF12의 인산화는 RNF12의 기질의 유비퀴틴화(ubiquitylation)을 조절하여 신경발달 유전자를 조절한다고 알려져 있고 (Bustos, et al., 2020) 지적 장애 환자에게서 SRPK3의 유전자 돌연변이가 다수 발견되었기 때문에 SRPK3 단백질이 지적 장애와 관련이 있을 것이라고 추측해왔다(Bustos, et al., 2022). 하지만 SRPK3 결손을 통해 직접적으로 지적 장애와 SRPK3 단백질 간의 연관성을 입증한 연구는 없다.
- [0024] 상기 제브라피쉬 모델은 학습 장애, 지적 장애 관련 질환의 질병 모델일 수 있다.
- [0025] 상기 지적 장애는 X 염색체 연관 지적 장애(X-linked intellectual disability, XLID)일 수 있다.
- [0026] 상기 XLID는 SRPK3 단백질의 트레오닌(threonine, T) 458번이 아르기닌(arginine, N)으로 치환된 돌연변이에 의한 것일 수 있다.
- [0027] 상기 XLID는 SRPK3 단백질의 글루타민산(glutamate, E) 529번이 리신(lysine, K)으로 치환된 돌연변이에 의한 것일 수 있다.
- [0028] 상기 제브라피쉬 모델은 비정상적인 시각 반응 및 안구 운동을 나타낼 수 있다.
- [0029] 상기 제브라피쉬 모델은 사회적 상호 작용이 저하된 것일 수 있다.
- [0030] 상기 제브라피쉬 모델은 소뇌핵의 크기가 감소한 것일 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은
- [0033] 1) SRPK3 유전자 결손 콘스트럭트(construct)를 제조하는 단계; 및
- [0034] 2) 상기 단계 1의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계를 포함하는 제브라피쉬 모델의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 상기 SRPK3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0036] 상기 단계 1)의 결손 콘스트럭트는 유전자 가위를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 유전자 가위는 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9), ZFN(zinc-finger nuclease) 및 TALEN(transcription activator-like effector nuclease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 유전자 가위를 포함하는 콘스트럭트는 SRPK3를 결손시키는 것이 바람직하나, SRPK3 서열 전체뿐만 아니라 서열의 일부만 결손된 경우도 모두 포함한다.
- [0037] 상기 제브라피쉬 모델은 비정상적인 시각 반응 및 안구 운동을 나타낼 수 있다.

- [0038] 상기 제브라피쉬 모델은 사회적 상호 작용이 저하된 것일 수 있다.
- [0039] 상기 제브라피쉬 모델은 소뇌핵의 크기가 감소한 것일 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은
- [0042] 1) 제1항의 제브라피쉬 모델에 피검물질을 처리하는 단계; 및
- [0043] 2) 상기 단계 1의 피검물질이 처리된 제브라피쉬 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복 여부를 판단하는 단계를 포함하는 지적 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.
- [0044] 상기 증상은 비정상적인 시각 반응 및 자발적 안구 운동 또는 사회적 상호작용 저하일 수 있다.
- [0045] 상기 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질,
- [0046] 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0047] 상기 지적 장애 관련 질환은 X 염색체 연관 지적 장애(X-linked intellectual disease, XLID)일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 XLID 환자 가족에서 SRPK3 유전자의 돌연변이를 발견하였고(도 1 참조), SRPK3는 인간과 제브라피쉬 간의 서열 보존성이 높고 망막과 뇌에 발현이 많이 되는 것을 확인하였다(도 2, 3 및 4 참조). 또한, SRPK3의 구조를 분석한 결과 XLID 환자 가족에게서 발견된 SRPK3 돌연변이는 SRPK3 단백질의 구조에 영향을 미치거나 SRPK3 단백질의 단백질 간 상호작용에 영향을 미칠 것으로 유추하였다(도 5 참조).
- [0050] 이에 본 발명자들은 SRPK3 유전자가 결손된 제브라피쉬를 제조하였고(도 6 참조), SRPK3 결손 제브라피쉬는 탄생 후 신경발달 및 기능부전에 따른 부레가 정상적으로 부풀지 않아 사망하는 개체가 많았으나(도 7 참조) 신경계 마커인 neurog1, her4, th의 발현에는 야생형과 차이가 없었다(도 8 참조).
- [0051] 이러한 SRPK3 결손 제브라피쉬는 기본적인 시력 자체에는 이상이 없었으나 자발적 안구 운동 및 시각 반응성에 이상이 생기는 것을 관찰하였고(도 9 및 10 참조) 사회적 상호 작용이 감소하는 경향이 있었으며 특히 시간이 경과할수록 사회적 상호 작용이 감소하는 경향이 있었다(도 11 참조).
- [0052] 그리고 SRPK3 결손 제브라피쉬의 전체적인 뇌의 구조 및 크기는 야생형 뇌와 크게 차이가 없었으나 감각계 정보 처리 및 반응에 중요한 소뇌핵의 크기가 작은 것을 관찰할 수 있었다(도 12 참조).
- [0053] 자발적 안구 운동 및 시각 반응의 이상, 사회적 상호 작용의 저하 및 소뇌핵의 이상은 모두 학습 장애, 지적 장애 환자에게서 관찰된 증상과 유사하여 SRPK3가 XLID의 원인 유전자이며 SRPK3 결손 제브라피쉬는 XLID 동물 모델로 적합하다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0054] 따라서 본 발명의 SRPK3 결손 제브라피쉬는 XLID 연구를 위한 동물모델 및 XLID 치료제 스크리닝 방법에 매우 유용하게 활용될 수 있다.
- [0056] 이하에서는, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0057] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0059] <실험예 1> XLID의 원인 유전자 후보인 SRPK3의 돌연변이 확인
- [0060] <1-1> 가족 1에서의 돌연변이 확인
- [0061] XLID 환자와 대조군 남성을 미국 그린우드 유전자 센터(Greenwood Genetic Center, GGC)에서 모집하였다. 그리고 XLID 가족의 발단자에게 X 염색체 엑솜 시퀀싱(exome sequencing)을 수행하였다. 엑솜 시퀀싱은 TruSeq Genomic DNA Library preparation kit, SureSelect Target Enrichment kit 및 HiSeq2000을 이용하여 수행하였

다. 유전자 정렬, 베이스 재교정 및 변이체 검출을 위해 Bowtie2와 Unified Genotyper를 이용하였다. 생어 시퀀싱(Sanger sequencing)은 검증, 분리 분석 및 다형성(polymorphism) 연구를 위해 이용하였다.

[0062] 그 결과, 첫번째 돌연변이인 H159D를 발견하였고 이 돌연변이는 모계 유전되는 것을 확인하였다(도 1 참조).

[0064] <1-2> 가족 2에서의 돌연변이 확인

[0065] 첫 돌연변이 발견 후, 미국 국립보건원(National Institutes of Health, NIH)에서 진행한 미진단 프로그램(Undiagnosed Disease Program, UDP)을 통해 두번째 돌연변이가 발견되었다는 것을 알게 되었고 이 정보를 제공받아 분석하였다. 분석 결과 T458N 돌연변이가 발견되었다.

[0067] <1-3> 가족 3에서의 돌연변이 확인

[0068] 미국 아리조나 유전체 코어 대학교로부터 가족 3의 남성의 임상 정보를 제공받았다. 가족으로부터 제공받은 4개의 샘플에 대해 전체 엑솜 시퀀싱을 2회 수행하였다. 남성 발단자의 유전형을 그의 부모의 유전형과 비교하여 X-염색체 연관 변이체를 발견하였다. 실제 X-염색체 연관 변이체를 식별하기 위해서 우선 순위 지정 시스템을 구현했고 가장 높은 순위에 있는 변이체는 생어 시퀀싱으로 검증하였고 그 결과 세번째 돌연변이인 E529K가 가족 3에서 발견되었다.

[0070] <실험예 2> XLID 환자에 대한 임상적 분석

[0071] H159D 및 E529K를 보유하고 있는 남성에 대한 임상적 정보는 소아과 및 아동 건강부(캐나다 매니토바 대학교)와 아리조나 대학교 유전체 코어(University of Arizona Genetics Core, UAGC, 미국)에서 각각 대규모 연구의 일부로 제공되었다.

[0072] 모든 환자에게서 학습 장애 및 지적 장애가 관찰되었고 H159D 및 T458N을 갖는 두 가족에게서는 뇌량의 무형성 및 소뇌 위축과 같은 뇌 이상을 확인하였다. 이러한 두 가족은 비정상적인 언어를 보이고 세 가족 모두 지적 장애를 보였다. 지적 장애와 관련된 특징인 학습 장애 및/또는 지연된 언어 능력이 모든 환자에게서 나타나고 4명의 환자에게서는 추적 안구 운동 이상, 주의력 장애와 같은 안구 운동과 관련된 표현형이 관찰되었다(표 2 참조).

표 2

[0073] 표 2. XLID 환자의 임상적 특징

환자	가족1: 2세대-1	가족1: 3세대-3	가족1: 3세대-4	가족1: 3세대-5	가족1: 3세대-7	가족2	가족3: 3세대-1
돌연변이	H159D	H159D	H159D	H159D	H159D	T458N	E529K
유전양상	모계	모계	모계	모계	모계	모계	모계
나이 (마지막 검진)	65	35	27	35	32	28	15
전체 발달 지연	있음	있음	있음	있음	있음	알려지지 않음	있음
지적 장애	경도	중등도(언어 능력 지연)	중등도(언어 능력 지연)	중등도(언어 능력 지연)	중등도(언어 능력 지연)	학습 장애; 경계	학습 장애
기형적 특징	이마 돌출, 대두증	없음	없음	없음	없음	없음	없음
신경계 특징	알 수 없음	알 수 없음	알 수 없음	알 수 없음	전정 자극의 불량한 통합으로 인한 불량한 균형 및 자세 반응	운동 실조 및 현기증	운동 실조; 근위 약화
정신과적 특징	알 수 없음	알 수 없음	주의력 부족	주의력 부족; 정서적 불안정	알 수 없음	알 수 없음	알 수 없음

시청각계	이상 없음	알 수 없음	이상 없음	이상 없음	알 수 없음	약시, 사시	비정상적인 추적 안구 운동, 눈모 음 부족
언어	있음	있음	있음	언어 지체	있음	언어 장애	알 수 없음
심장/신장/생식기	이상 없음	알 수 없음	알 수 없음	알 수 없음	알 수 없음	이상 없음	알 수 없음
근골격계	근위축	운동 지연	운동 지연	운동 지연	운동 지연	알 수 없음	경미한 근육 약화
신경계 영상 (엑스레이, MRI, CT PET)	측뇌실과 제3뇌실과 제4뇌실의 비대, 뇌량의 부분적 부재	불규칙하고 비대칭적으로 확장된 측뇌실, 백질 손실, 뇌량 및 질두의 부분적 무형성	불규칙하고 비대칭적으로 확장된 측뇌실, 백질 손실, 뇌량 및 질두의 무형성	알 수 없음	불규칙하고 비대칭적으로 확장된 측뇌실, 백질 손실, 뇌량 및 질두의 부분적 무형성	CT PET - 약간 감소된 소뇌 흡수	뇌량 후체부의 부피 손실

[0076] <실험예 3> 인간과 제브라피쉬의 SRPK3 아미노산 서열 비교

[0077] 인간과 제브라피쉬의 SRPK3 아미노산 서열을 ClustalX 2.1 프로그램을 이용하여 배열하고 비교하였다. 비교 결과 높은 수준의 보존성(conservation)을 확인할 수 있었고 XLID 환자에게서 돌연변이가 확인된 H159, E529 및 T458도 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 2 참조).

[0078] 높은 보존성을 통해 제브라피쉬 모델을 이용하여도 인간의 SRPK3 단백질의 기능을 연구할 수 있을 것이라고 유추할 수 있다.

실시예 1

[0080] <실시예 1> 제브라피쉬 사육 및 관리

[0081] 야생형(wild type) 제브라피쉬는 실험 동물 시설에서 유지 관리되었다. 제브라피쉬는 온도 28.5℃ 오전 9시부터 오후 11시까지 점등하고, 그 외 시간 소등 조건에서 사육하였다. 상기 제브라피쉬에서 수득된 수정란은 에그 워터(egg water, 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 0.1% Methylene Blue)에서 유지되었다. 제브라피쉬를 이용한 모든 실험은 충남대학교 동물실험윤리위원회 승인 하에 진행되었다.

[0084] <실험예 4> 인간과 제브라피쉬에서의 SRPK3 신경계 발현 확인

[0085] <4-1> 인간에서의 SRPK3 신경계 발현 확인

[0086] 일반적인 표현형과 형태를 갖는 인간 배아의 뇌와 심장에서 SRPK3 단백질이 발현되는지 확인하고자 카네기 단계(Carnegie stage) 15, 19 및 23의 배아 또는 태아를 이용하여 확인하였다. 인간 배아 또는 태아는 MRC/Wellcome 재단을 통해 제공받았다.

[0087] 파라핀 고정된 인간 또는 제브라피쉬의 조직의 섹션에서 파라핀을 제거하고 메탄올 퍼옥사이드(methanol peroxide) 용액을 이용하여 내재적인 과산화효소 활성을 억제하였다. 그리고 섹션은 TBS로 씻어낸 후 10% 일반 혈청이 섞인 TBS에서 방치한 후 SRPK3 항체를 일반 혈청이 섞인 용액에 1:50의 비율로 희석한 항체 용액을 섹션에 처리하여 하루동안 방치하였다. 그 후 섹션을 씻어내고 2차 항체를 일반 혈청이 섞인 용액에 1:500의 비율로 희석하여 실온에서 30분동안 섹션에 처리하였다. 섹션은 스탠다드 벡타스테인 엘리트 ABC 키트(standard VECTASTAIN Elite ABC kit)를 이용하여 2차 항체를 검출하여 DAB 키트(Sigma, D-4293)으로 현상하였다. 섹션은 헤마토자일린(haematoxylin)으로 대비 염색한 후, 세척하고 탈수하여 광학 현미경으로 관찰하기 위해 장착

(mount)되었다.

- [0088] 염색하여 관찰한 결과 카네기 단계 15일 때는 인간의 발달 중인 뇌, 망막, 척추, 심장 근육 및 사지(팔, 다리)에서 SRPK3의 발현이 확인되었고 나중에 소뇌로 발생하는 후뇌에서 SRPK3의 높은 발현이 확인되었다(도 3a 참조).
- [0089] 카네기 단계 19일 때는 SRPK3의 발현은 주로 전뇌, 소뇌와 연수에서 관찰이 되었고 후뇌 맥락막 신경총 상피세포(hindbrain choroid epithelium)에서 강하게 확인되었다(도 3b 및 3c 참조).
- [0090] 카네기 단계 23일 때는 맥락막 상피세포(choroid epithelium)에서 강하게 확인되고 소뇌와 안구에서의 발현이 강하게 확인되었으며, 상대적으로 뇌교 및 연수에서는 약하게 관찰되었다(도 3d 참조).
- [0092] <4-2> 제브라피쉬에서의 SRPK3의 신경계 발현 확인
- [0093] 홀-마운트 정위치 교잡법(whole-mount in situ hybridization)을 수행하여 제브라피쉬의 발생 과정 중의 SRPK3 유전자의 발현을 확인하였다. 홀-마운트 정위치 교잡법을 위해 고정된 배아를 메탄올을 이용하여 탈수시킨 후 프로테이나제 K(proteinase K)을 이용하여 투과성이 생기도록 하였다. 그 후 안티센스-디고옥시제닌 표지 RNA 프로브(antisense digoxigenin-labeled RNA probes)를 고정된 배아와 방치하여 RNA 프로브가 혼성화하도록 하였다. 그 후, 세척하여 혼성화하지 못한 프로브를 제거하고 알칼라인 인산화효소와 결합된 항-DIG Fab 단편 항체와 정지하였다.
- [0094] 그 결과, SRPK3 전사체는 24 hpf의 초기 단계에서 뇌, 심장 및 근육에 특이적으로 발현되고 72 hpf에는 뇌, 중추신경조직 및 망막에서 관찰되었다(도 4 참조).
- [0095] 인간과 제브라피쉬의 배아에서의 발현 패턴을 비교해보면 인간과 제브라피쉬의 발달 중인 망막에서 SRPK3가 높은 수준으로 발현되는 것을 알 수 있다.
- [0098] <실험예 5> XLID 환자에게서 발견된 돌연변이의 분자적 모델링
- [0099] 실험예 1에서 확인한 SRPK3의 돌연변이의 구조를 알파폴드(Alphafold, <http://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9UPE1>)를 이용하여 모델링 하여 돌연변이가 SRPK3 단백질의 구조에 미치는 영향을 확인하고자 하였다(도 5a 참조).
- [0100] SRPK3 정상형 단백질과 돌연변이 단백질의 구조를 모델링한 결과, 돌연변이로 인해 곁사슬(side chain)에 변화가 생겨 단백질 구조 형성에 영향을 주거나 아미노산의 전하(charge)에 변화가 생겨 단백질 간의 상호작용에 영향을 줄 수 있다고 사료된다.
- [0101] H159D의 경우, 히스티딘159(His159)의 이미다졸 링(imidazole ring)은 4.5Å의 거리로 원자-원자 간 접촉(atom-atom contact)이 72번 유지되지만 돌연변이로 인해 곁사슬이 카르복실기로 치환되면서 접촉이 39번으로 감소하였다(도 5b 참조).
- [0102] T458N의 경우, 주변의 페닐알라닌454(Phe454), 타이로신528(Tyr528) 및 트립토판530(Trp530)과 같은 크기가 큰 잔기로 인해 입체 장애가 발생할 수 있다(도 5c 참조).
- [0103] E529K의 경우, 단백질의 안정성에는 영향을 미치지 않지만 음전하인 글루타민산(Glu, E)이 양전하인 리신(Lys, K)으로 치환되면서 단백질의 모양과 외부 전하에 영향을 주어 단백질 간의 상호작용에 영향을 줄 수도 있다(도 5d 참조).
- [0104] 즉, 지적 장애 환자에게서 발견되는 SRPK3 단백질의 돌연변이는 SRPK3의 구조 또는 SRPK3와 결합하는 다른 단백질과의 결합에 영향을 주어 SRPK3가 정상적으로 기능하는 것을 저해할 것이라고 유추할 수 있다.

표 3

[0105]

sgRNA 프라이머	서열(5' - 3')	서열번호
유니버설 프 라이머	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTCTAGCTCT AAAAC	3
srpk3 sgRNA 프라이머	TAATACGACTCACTATAGGCCCGATGATATCGATGAAGTTTAGAGCTAGAA	4

[0107]

단일 세포 단계의 제브라피쉬 배아에 sgRNA와 함께 주입되는 Cas9 mRNA를 합성하기 위해 Cas9 발현 벡터인 pT3TS-nCas9n이 이용되었고 Cas9 mRNA는 mMACHINE T3 kit 및 E. Coli 폴리(A) 폴리머레이즈(polymerase)로 테일링 된 폴리(A)로 합성되었다. Cas9 mRNA와 SRPK3의 sgRNA는 단일 세포 단계의 배아에 주입되었다. 돌연변이는 T7E1 분석을 통해 검증되었고 F0 세대 물고기를 성체까지 번육하여 생식선 돌연변이를 생성하기 위해 야생형과 교배하였다. F1 세대는 성체까지 번육하여 이형접합자(heterozygous) 유전형을 갖는 개체 간의 교배를 통해 SRPK3 결손 제브라피쉬(F2)를 제조하였다. SRPK3 유전자를 결손시킨 제브라피쉬는 SRPK3 유전자의 대부분이 결실된 형태를 보일 것으로 예측된다(도 6 참조).

[0110]

<실험예 6> SRPK3를 결손시킨 제브라피쉬의 초기 발달 단계에서의 형태학적 분석

[0111]

SRPK3 결손 제브라피쉬는 배아 초기 단계에서는 정상적인 발달 과정을 보였다.

[0112]

수정 후 5일째의 제브라피쉬 유생의 몸 길이, 무늬 패턴 및 눈의 크기 등의 형태학적인 결함은 확인할 수 없었다.

[0113]

하지만 다수의 결손 제브라피쉬는 탄생 후 부레가 부풀어 오르지 않는 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0114]

부레는 물고기가 수영을 하기 위해 필요한 부력을 조절하는 기관으로, 제브라피쉬를 비롯한 대다수의 물고기는 탄생 후 부레에 공기 방울이 유입되어 부풀어 오르는 현상(swim bladder inflation)이 관찰되고 이 상태를 생존에 대한 중요한 마커로 고려한다.

[0115]

결과적으로 73마리의 SRPK3 결손 제브라피쉬 중 6마리(8%)만이 성체기까지 생존할 수 있었다.

[0118]

<실험예 7> SRPK3 결손시킨 제브라피쉬에서 신경 마커 발현 확인

[0119]

부레가 부풀어 오르지 않는 현상은 중요한 특징으로 생각되어 홀-마운트 정위치 교잡법을 통해 분자 수준의 분석을 진행하였다.

[0120]

neurog1 및 her 4와 같은 초기 신경 마커, islet 1과 같은 운동 신경 마커 및 타이로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase, th)과 같은 도파민 뉴런 마커의 mRNA 발현을 관찰하였으나 차이가 없었다(도 8 참조).

[0121]

결과적으로 야생형과 결손 동물 간의 초기 발달 단계에서의 신경 마커 발현 수준 차이는 확인되지 않았다.

[0124]

<실험예 8> SRPK3 결손 제브라피쉬에서의 자발적 안구 운동 결함 확인

[0125]

척추 동물의 자발적인 안구 운동은 한 방향으로의 단속성 운동(saccade, 빠르게 움직임) 이후 고정 기간을 갖고 다시 반대 방향으로의 단속성 운동으로 규정된다.

[0126]

신경 발달 장애에서의 SRPK3 유전자의 역할을 확인하기 위해 제브라피쉬 유생(5 days post fertilization, dpf)을 저융점 아가로스(low melting agarose) 2%를 넣은 페트리디쉬에 놓고 현미경으로 녹화하였다. 그리고 녹

화한 영상은 MATLAB 소프트웨어를 이용하여 제브라피쉬의 자발적 안구 운동을 추적하고 분석하였다.

- [0127] 야생형 제브라피쉬의 경우, 두 눈의 안구 운동이 한 방향으로 동시에 일어나는 것을 확인할 수 있고 이는 시각적 스펙트럼에서 공간 연결을 유지하는 것에 중요하다.
- [0128] SRPK3 결손 제브라피쉬의 경우, 야생형 제브라피쉬와 비교하였을 때 안구 운동의 빈도가 유의미하게 감소하였고 안각이 감소하였으며, 안구가 제자리로 돌아오는 시간(리셋 타임)이 유의미한 수준으로 감소하였다(도 9 참조).
- [0129] 시력에 문제가 있는지 확인하기 위해 색상의 선호도 검사를 진행하였고 그 결과 SRPK3 결손 제브라피쉬는 야생형과 비교하여 시력에는 차이가 없는 것을 알 수 있었다(도 10 참조).
- [0130] 따라서 시력은 정상이지만 자발적인 안구 운동이 심각하게 저하되어 지적 장애와 학습 장애가 발생할 수 있다고 유추할 수 있다.

[0133] <실험예 9> SRPK3 결손 제브라피쉬의 사회적 상호 작용 확인

- [0134] 지적 장애의 주요 특징 중 하나는 사회적 상호 작용이고 실제로 실험예 2에서 임상적으로 관찰한 7명의 환자 중 4명의 환자는 주의력이 저하되어 있고 안구 운동에 결함이 있는 등의 사회적 상호 작용이 저하되어 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0135] 제브라피쉬를 이용하여 사회적 상호작용을 관찰하기 위해 탱크를 둘로 나누고 한 쪽에는 신호 물고기를 넣고 다른 한 쪽에는 실험 물고기를 넣었다. 두 공간 사이에는 투명한 아크릴판으로 막혀 있어 물고기들 간의 상호작용이 가능하도록 제작하였다. 실험 물고기가 들어가는 공간을 동일한 크기의 4개의 공간으로 나누어 신호 물고기가 있는 곳(social cue)에 가장 가까운 존(zone)을 존 1, 두번째로 가까운 존을 존 2, 세번째로 가까운 존을 존 3, 그리고 가장 먼 존을 존 4로 명명하였다. 실험을 진행하는 동안 3마리의 성체 제브라피쉬를 신호 물고기로 넣고 1마리의 SRPK3 결손 제브라피쉬를 실험 물고기로 넣어주었다. 그리고 15분 동안 영상을 촬영하여 Ethovision XT 소프트웨어로 행동을 분석하였다.
- [0136] SRPK3 결손 제브라피쉬는 야생형 제브라피쉬와 비교하여 사회적 상호 작용에 결함이 있는 것으로 관찰되었다. 특히, 이러한 경향은 10 내지 15분 시점에 확인되었다(도 11 참조).
- [0137] 제브라피쉬의 행동을 총 15분 중 초반(4 내지 5분)와 후반(10 내지 15분)으로 나누어 분석하였을 때 초반에는 야생형과 SRPK3 결손 제브라피쉬 모두 신호 물고기와 가까운 존 1에 머무르면서 사회적 상호 작용을 하는 경향이 있었으나 SRPK3 결손 제브라피쉬는 후반에 이르자 사회적 상호 작용이 감소하였다. 이는 환자에게서도 관찰되는 '주의력 저하'를 반영한다고 사료된다.
- [0138] 따라서 SRPK3 결손 제브라피쉬에서는 실제 환자의 주의력 저하와 유사하게 시간이 흐름에 따라 사회적 상호 작용이 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0141] <실험예 10> SRPK3 결손 제브라피쉬에서의 뇌의 크기 확인

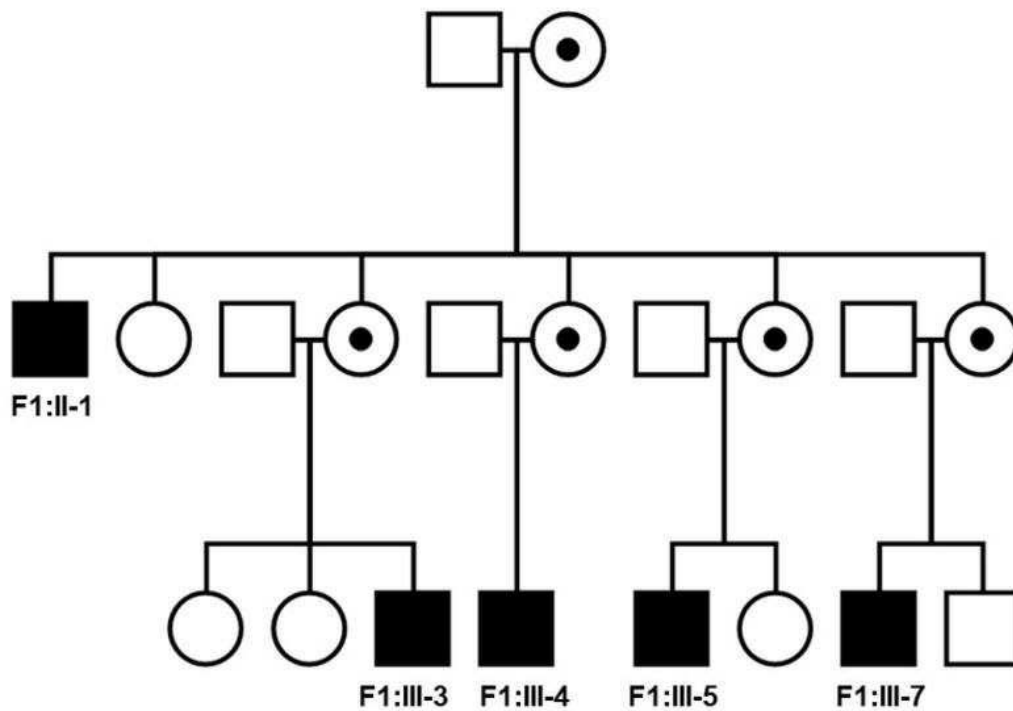
- [0142] SRPK3 결손 제브라피쉬의 비정상적인 자발적 안구 운동과 사회적 상호 작용의 저하를 확인하였으나 개체의 크기 및 성장에는 이상을 발견할 수 없었기에 뇌의 크기를 확인하고자 하였다.
- [0143] 성체 제브라피쉬의 뇌를 해부하여 관찰하였으나 전체적인 뇌의 크기는 야생형과 SRPK3 결손 제브라피쉬 간의 차이가 없었다(도 12a 참조).
- [0144] 따라서 뇌를 7 μ m 두께로 박편을 만들어 헤마토자일린 & 에오신 (Haematoxylin & Eosin, H&E) 염색을 수행하여 뇌의 구조별로 자세히 관찰하였다. 그 결과, 판막 소뇌(valvular cerebelli)라고 불리는 특정 부위의 크기가 40 내지 60% 정도 감소한 것을 확인하였다(도 12b 참조). 이 부위는 인간의 소뇌핵에 해당하며, 뇌량(corpus callosum)의 발달에 영향을 미치고, 뇌량은 지적 장애와 관련이 있다고 알려져 있다.
- [0145] 즉, SRPK3 유전자의 결손은 전체 뇌의 크기에는 영향을 주지 않지만 소뇌 부위의 크기를 감소시키는 것을 확인하였다.

[0146]

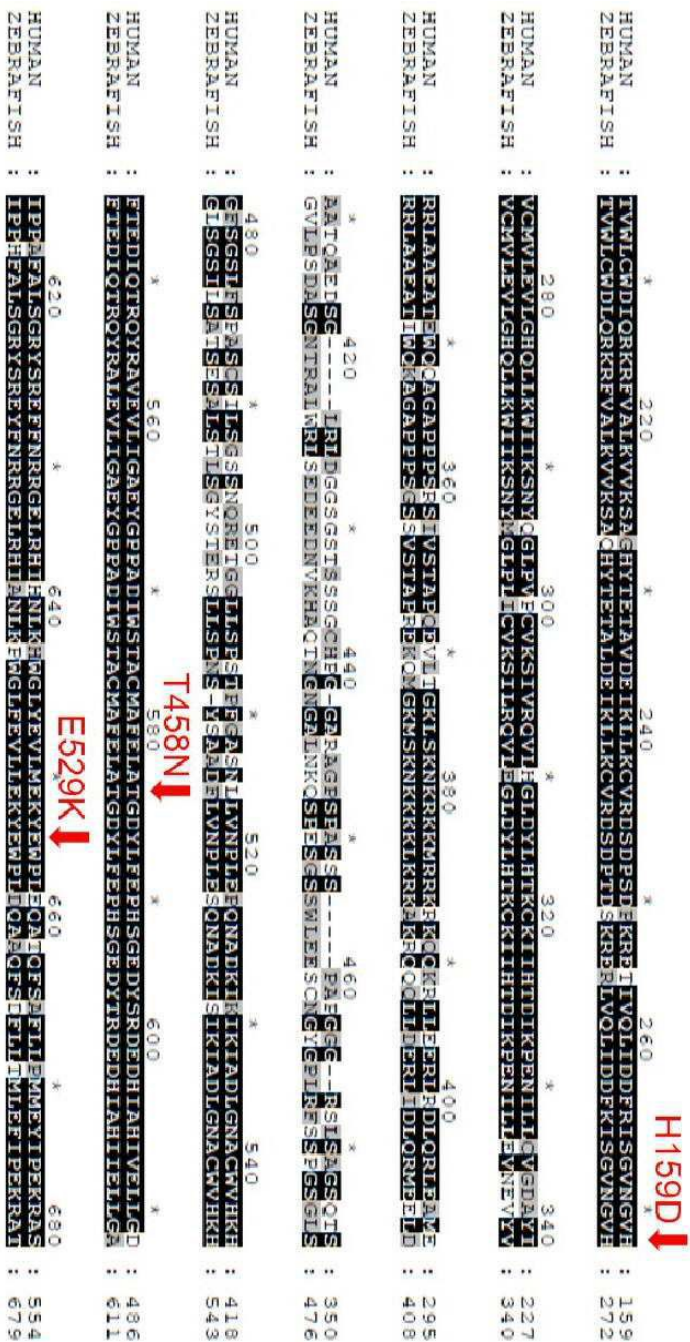
결론적으로 본 발명은 지적 장애 환자로부터 SRPK3 유전자의 돌연변이를 확인하고 돌연변이의 구조를 분석함으로써 돌연변이에 의해 SRPK3 단백질의 구조 또는 기능이 취약해질 수 있음을 밝혔다. 또한 SRPK3의 서열이 인간과 제브라피쉬 간의 보존성이 높았기에 제브라피쉬에서 SRPK3를 결손시켰고 SRPK3 결손 제브라피쉬에서 시각 반응 및 안구 운동에 이상이 발생하고 사회적 상호작용이 감소하며, 인간의 소뇌핵에 해당하는 소뇌가 감소함을 확인함으로써 SRPK3가 지적 장애에 관여하는 중요한 유전자임을 밝힘과 동시에 지적 장애, 특히 XLID에 대한 제브라피쉬 모델을 제공할 수 있었다.

도면

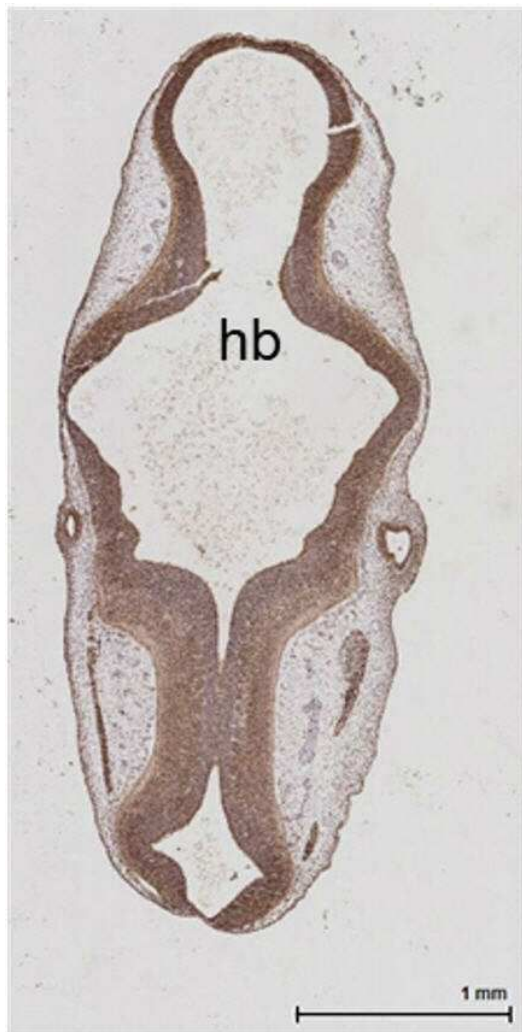
도면1



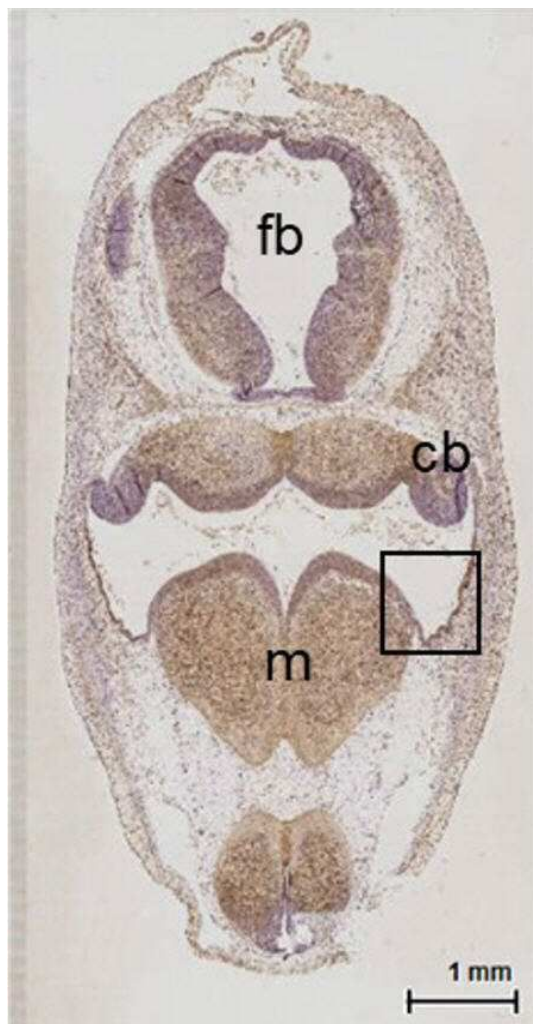
도면2



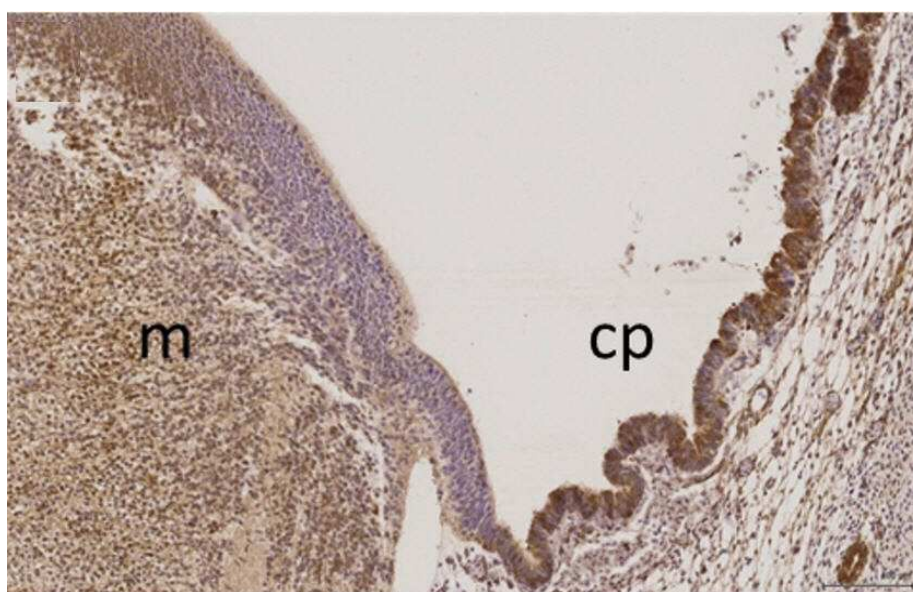
도면3a



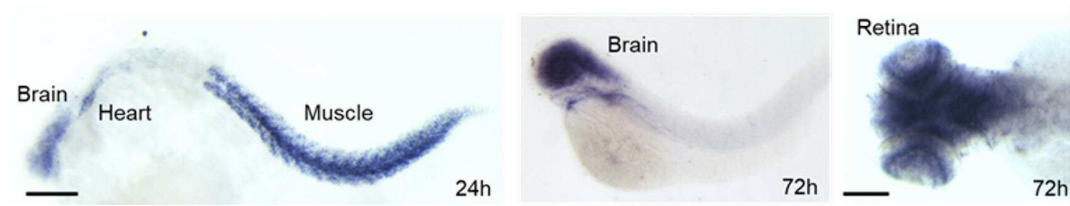
도면3b



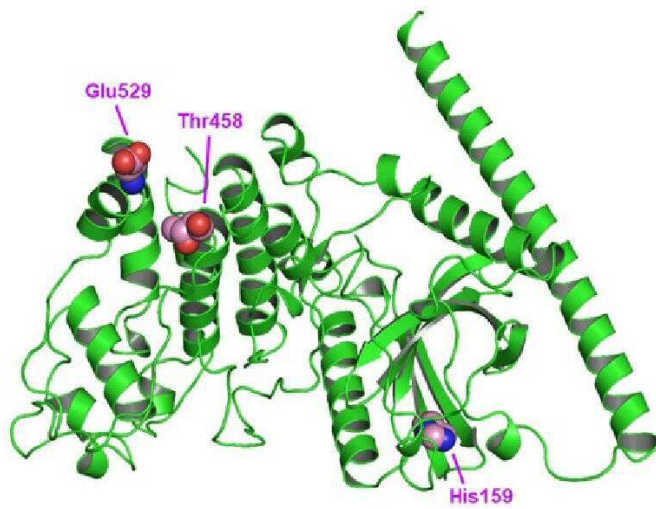
도면3c



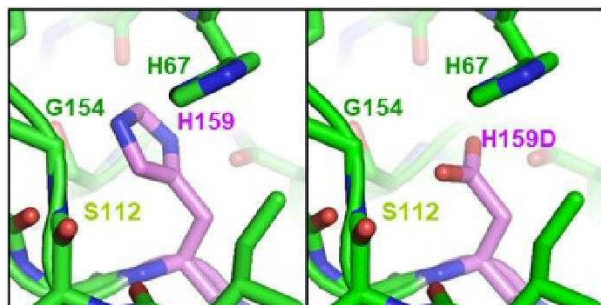
도면4



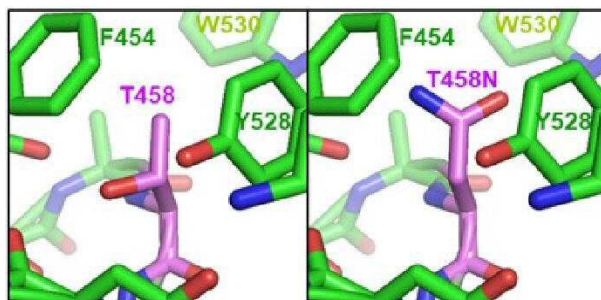
도면5a



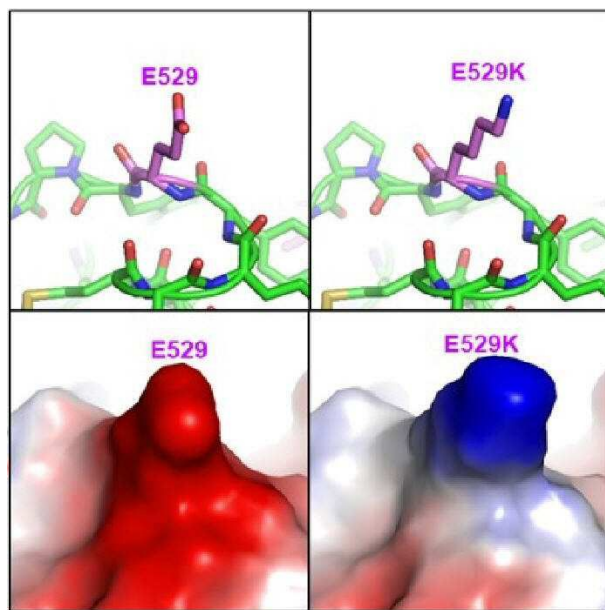
도면5b



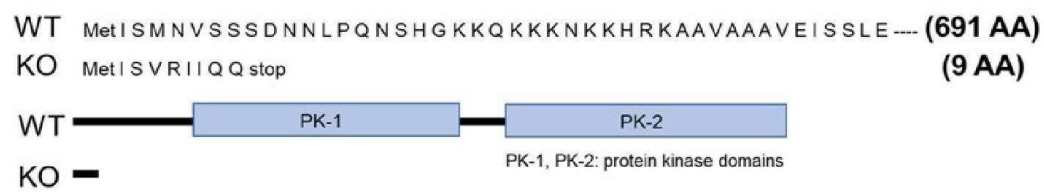
도면5c



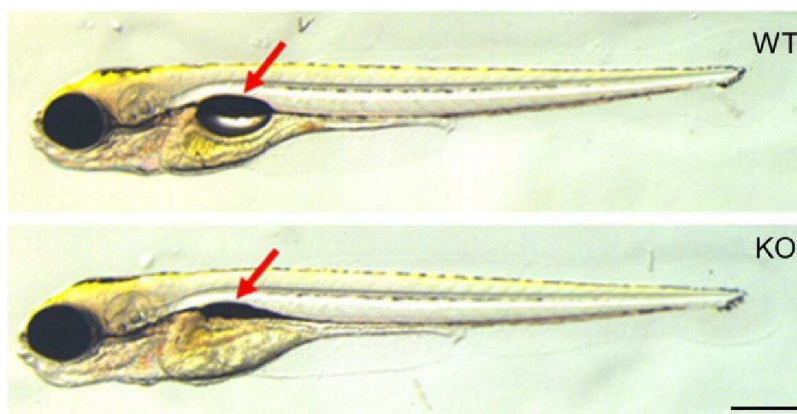
도면5d



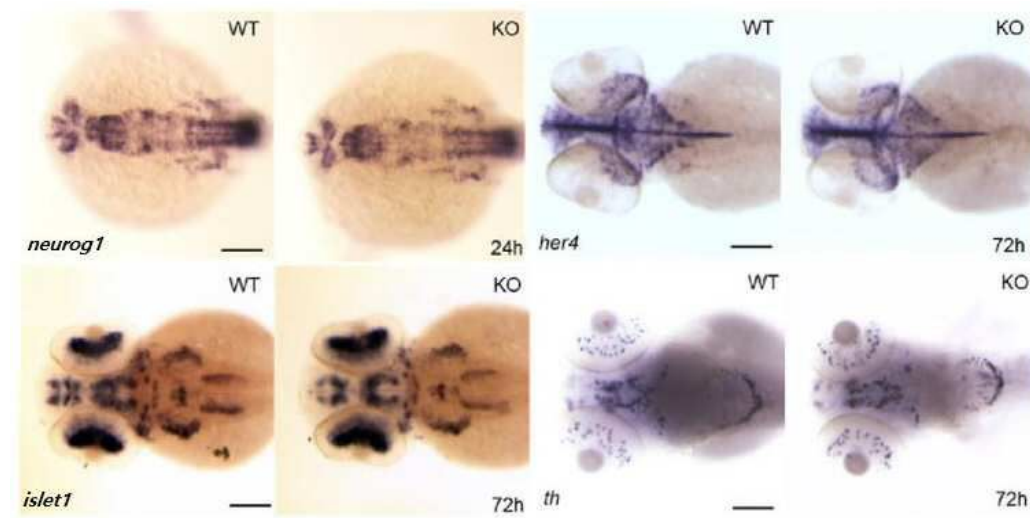
도면6



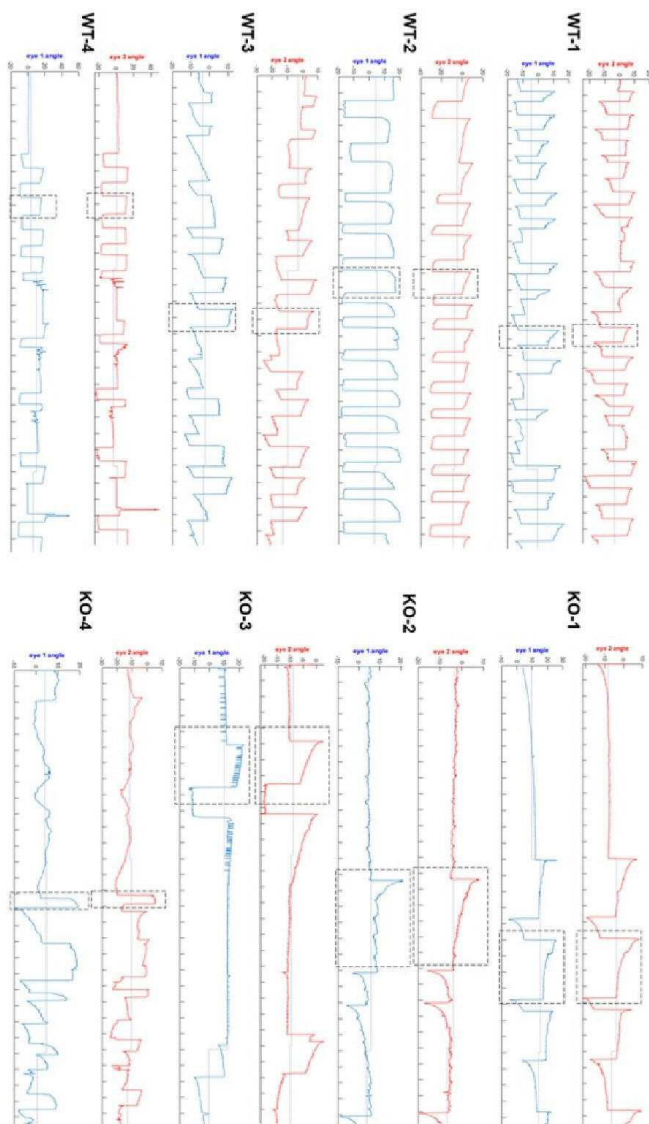
도면7



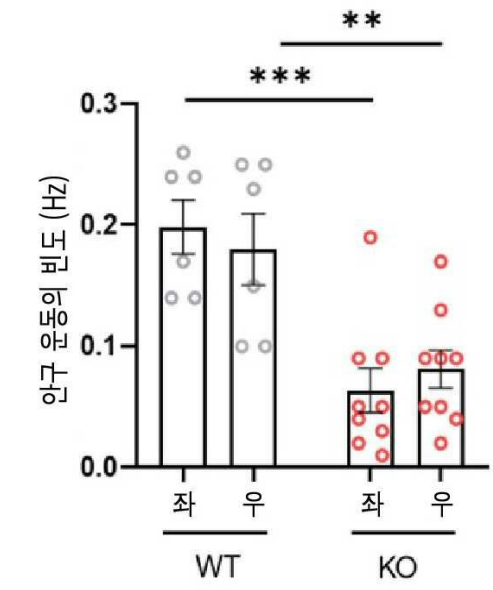
도면8



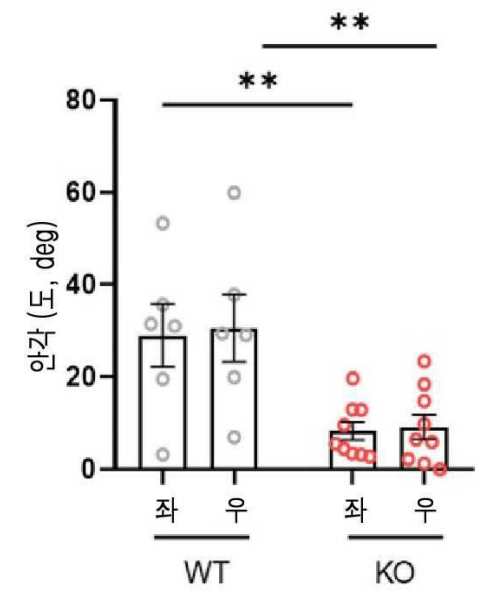
도면9a



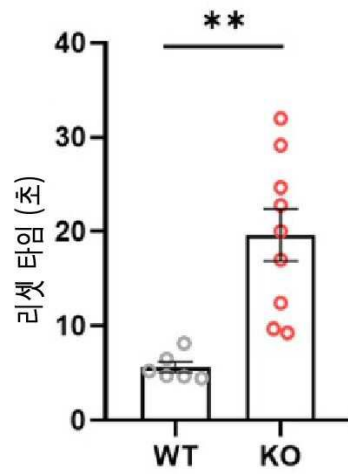
도면9b



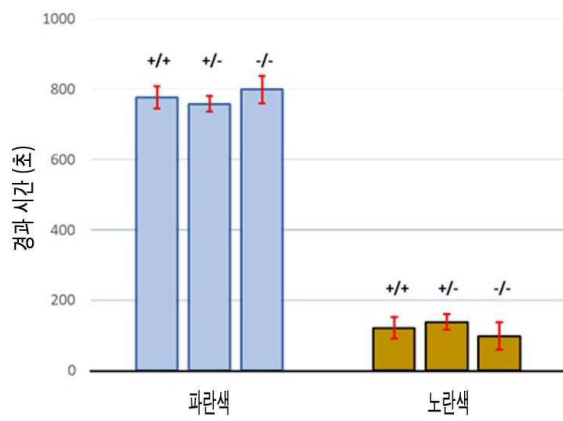
도면9c



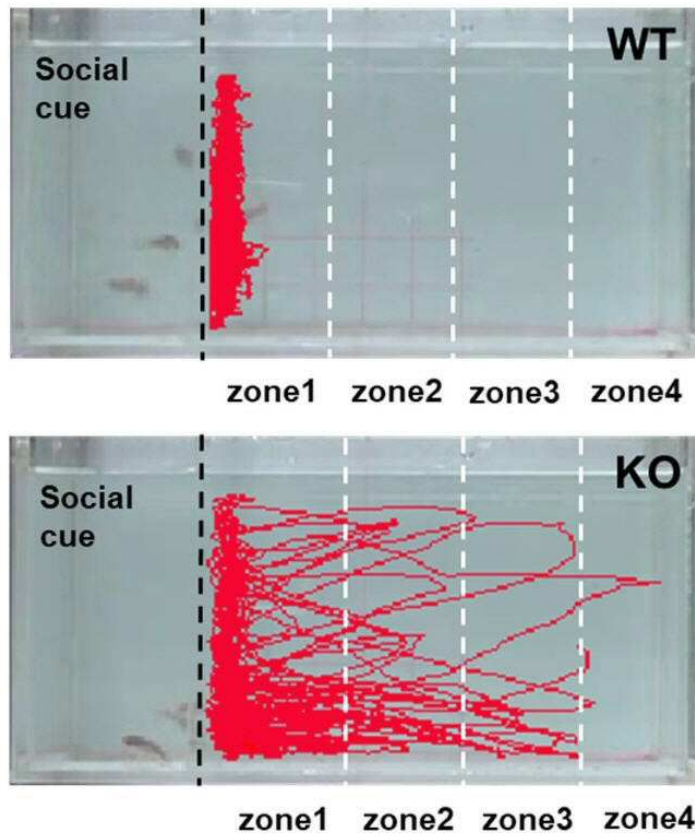
도면9d



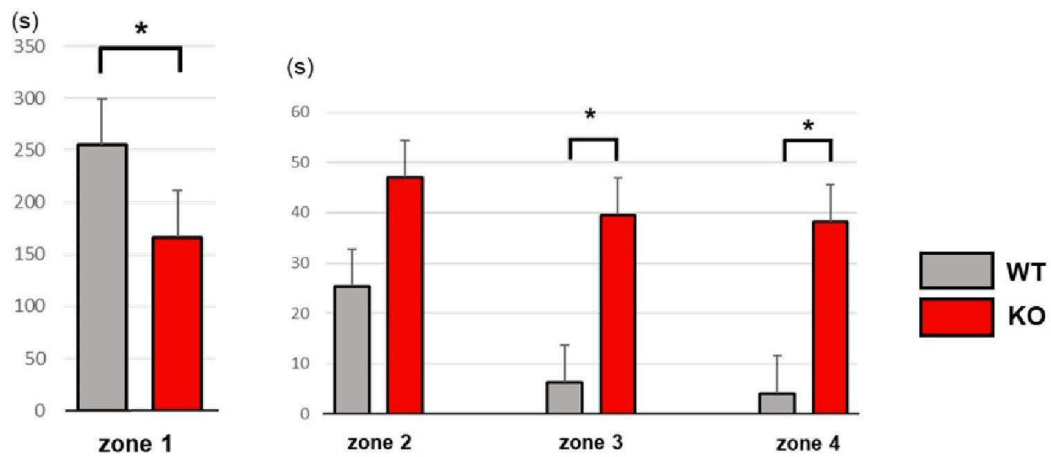
도면10



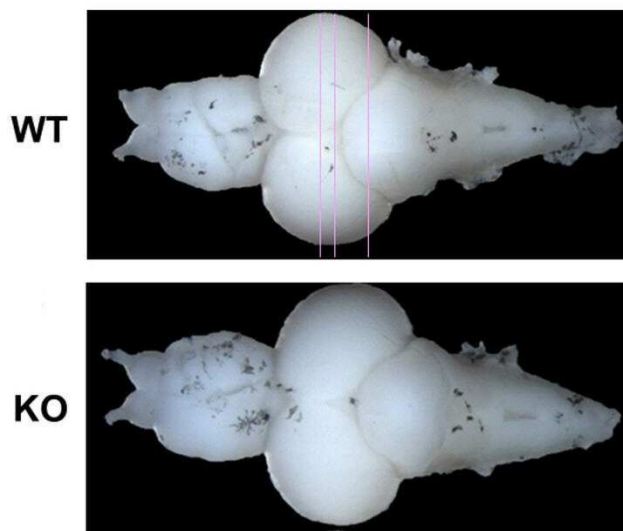
도면11a



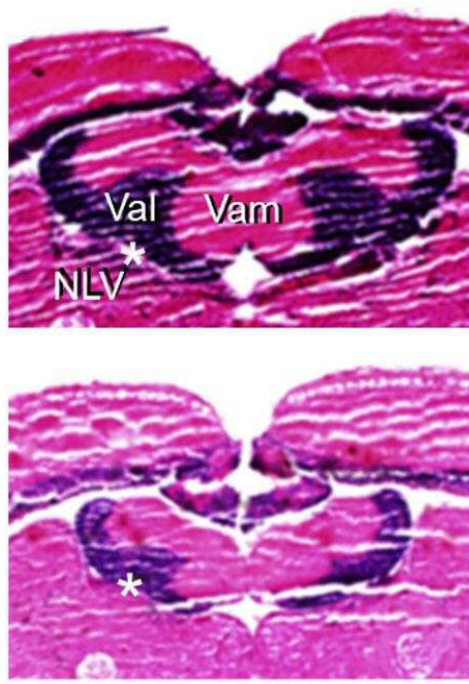
도면11b



도면12a



도면12b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.