



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월13일

(11) 등록번호 10-2133179

(24) 등록일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)

C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/85 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0276 (2013.01)

C12N 15/102 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0073429

(22) 출원일자 2018년06월26일

심사청구일자 2018년06월26일

(65) 공개번호 10-2020-0001022

(43) 공개일자 2020년01월06일

(56) 선행기술조사문헌

JP2011217667 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

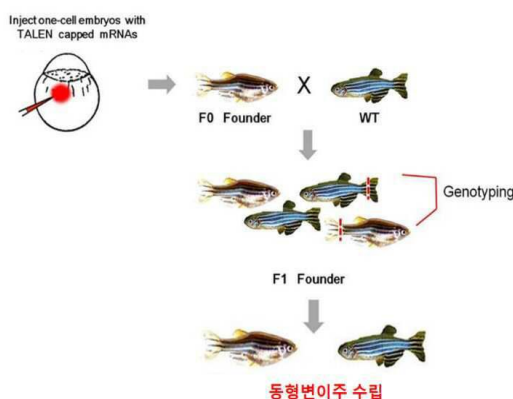
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 IRX1 유전자-녹아웃 형질전환 제브라피쉬 모델 및 이의 용도

## (57) 요약

본 발명은 IRX1 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 제브라피쉬(zebrafish) 모델 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 *Irx1a* 및 *Irx1b* 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬, 상기 제브라피쉬의 제조방법, 상기 제브라피쉬를 이용한 암 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법 및 암 치료제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 *Irx1a* 및 *Irx1b*가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬는 *Irx1a* 및 *Irx1b* 기능이 결핍되어 인간 종양과 매우 유사한 종양 생물학적 특성을 갖는 종양이 생성된다. 따라서, 본 발명의 제브라피쉬 암 모델은 인 비보에서 종양의 생성, 전이, 증식 등을 연구하기 위한 우수한 동물 모델로서, 암 치료제의 효율적인 스크리닝 및 암 치료제의 암에 대한 치료 효과 예측을 통한 환자 맞춤형 치료전략의 수립에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1c

Irx1a<sup>-/-</sup>/Irx1b<sup>-/+</sup> 유전자 녹아웃

(52) CPC특허분류

**C12N 15/113** (2013.01)  
**C12N 15/8509** (2013.01)  
**C12N 9/22** (2013.01)  
**A01K 2217/075** (2013.01)  
**A01K 2227/40** (2013.01)  
**A01K 2267/0331** (2013.01)  
**C12N 2310/20** (2017.05)

(56) 선행기술조사문헌

KR101750893 B1  
 KR1020160129568 A  
 김은지, DACT2 유전자 녹아웃 제브라피쉬 모델에서의 종양형성과 재상피화의 촉진, 연세대학교 석사학위논문(2017.06.30.)  
 Zhang P 등, The Genomic Organization and Function of IRX1 in Tumorigenesis and Development, Cancer Translational Medicine vol.3 no.1 pp.29-33 2017(2017.03.31.)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711053448  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 개인기초연구(미래부)  
 연구과제명 녹아웃 제브라피쉬 모델을 이용한 Irx1 종양 억제 유전자의 기능 규명  
 기 여 율 1/3  
 주관기관 연세대학교  
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345269929  
 부처명 교육부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 개인기초연구(교육부)  
 연구과제명 제브라피쉬에서 녹아웃과 형질전환에 의한 소화기 발암 모델의 개발과 기전 규명(후속연구)

기 여 율 1/3  
 주관기관 연세대학교  
 연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465025818  
 부처명 보건복지부  
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원  
 연구사업명 연구중심병원육성(R&D)  
 연구과제명 제1 유닛(5세부) : 환자유래 암이식 in vivo 제브라피쉬 및 in vitro 복제종양 플랫폼 개발  
 기 여 율 1/3  
 주관기관 연세대학교 세브란스병원  
 연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

공지예외적용 : 있음

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1로 표시되는 Irx1a (Iroquois related homeobox 1a) 유전자 및 서열번호 5로 표시되는 Irx1b (Iroquois related homeobox 1b) 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 제브라피쉬(Danio rerio) 암 모델.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제브라피쉬 암 모델은 다음 단계를 포함하는 방법으로 제작되는 것을 특징으로 하는, 제브라피쉬 암 모델:

- (a) 유전자 가위(engineered nuclease)를 이용하여 서열번호 1로 표시되는 Irx1a(Iroquois related homeobox 1a) 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1a<sup>-/-</sup>)를 제작하는 단계;
- (b) 유전자 가위(engineered nuclease)를 이용하여 서열번호 5로 표시되는 Irx1b(Iroquois related homeobox 1b)가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1b<sup>-/-</sup>)를 제작하는 단계; 및
- (c) 상기 (a) 단계의 Irx1a 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1a<sup>-/-</sup>)와 상기 (b) 단계의 Irx1b 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1b<sup>-/-</sup>)를 교배하여 Irx1a 및 Irx1b 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1a<sup>-/-</sup>/Irx1b<sup>-/-</sup>)를 제작하는 단계.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유전자 가위는 TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 및 RGEN(RNA-guided engineered nuclease)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 제브라피쉬 암 모델.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 TALEN은 Irx1a 유전자에 결합하는 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인(Transcription activator-like effector DNA binding domain) 및 DNA 절단 도메인(DNA cleavage domain)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제브라피쉬 암 모델.

#### 청구항 5

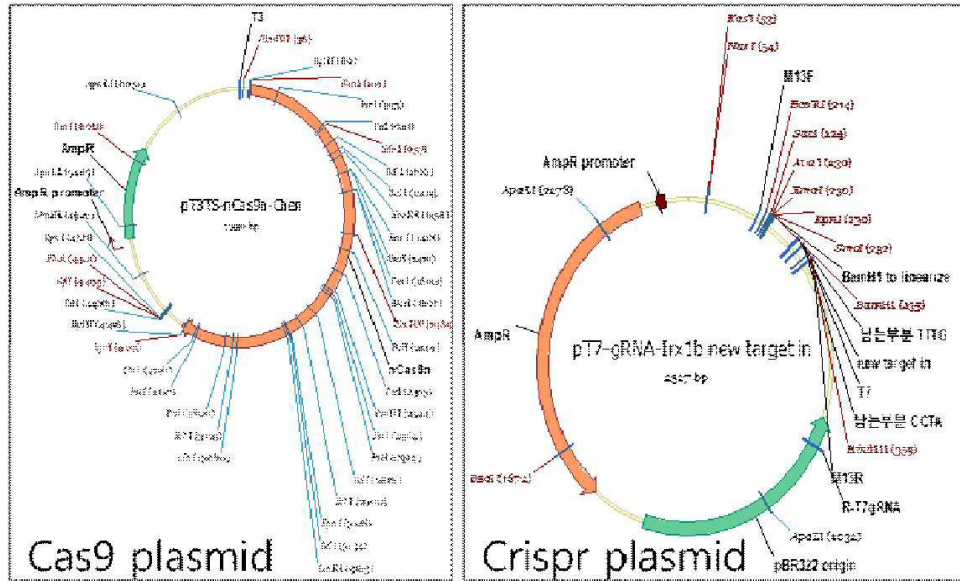
제4항에 있어서,

상기 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인은 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열에 결합하는 것을 특징으로 하는, 제브라피쉬 암 모델.

#### 청구항 6



[도 1b]



## Irx1b 녹아웃용 Crispr/Cas9 콘스트럭트

### 청구항 10

다음 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법:

- (a) 제1항의 제브라피쉬 암 모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 제브라피쉬 암 모델의 세포에서 종양의 정도를 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 세포에서의 종양의 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

### 청구항 11

다음 단계를 포함하는 암 치료제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법:

- (a) 제1항의 제브라피쉬 암 모델에 암 치료제를 처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 제브라피쉬 암 모델에 암의 진행 여부를 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서, 제브라피쉬 모델의 암이 진행된 경우, 암 치료제의 암 치료 효과가 존재하지 않은 것으로 예측하고, 제브라피쉬 모델의 암이 진행되지 않은 경우, 암 치료제의 암 치료 효과가 존재하는 것으로 예측하는 단계.

## 발명의 설명

## 기술 분야

본 발명은 IRX1 유전자-녹아웃 형질전환 제브라피쉬(zebrafish) 모델 및 이의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

위, 대장, 간, 대장, 췌장, 담도를 포함하는 소화기 계통의 악성 종양은 암 전체의 50%를 차지하여 암으로 인한 사망의 주요 원인이 되고 있다. 최근 검진을 통한 조기 발견에 의해 생존율이 크게 향상되어 위, 대장암은 5년 생존율이 65%에 이르지만, 간암은 10% 안팎, 췌장 담도암은 5%에 미치지 못하는 5년 생존율을 보이고 있다.

- [0004] 과거 수십 년간, 백서 모델을 이용한 종양생물학 연구를 통하여 암화 과정에 관련된 다양한 종양유전자가 발견되었고 그 분자생물학적 기전과 신호전달 경로가 상당 부분 밝혀졌다. 이를 통해 종양의 진행 과정을 규명함을 물론 새로운 치료 약물의 표적을 제공하였다. 실제로, 종양유전자 또는 종양과 관련된 단백질을 표적으로 하는 치료제가 다수 개발되어 탁월한 항암 효과를 보이고 있으며, 부수적으로 막대한 부가 가치를 창출하고 있다. 보다 구체적으로, 췌장암의 경우 EGFR(epidermal growth factor receptor)의 변이가 30~60%로 보고되고 있으며, EGFR의 활성화가 췌장암의 발생에 중요한 역할을 한다는 점이 밝혀지면서 이를 억제하는 소분자 약물(Erlotinib)이 개발되어 임상에 이용되고 있다. 간암에서도 다양한 종양유전자가 발견되고 관련 신호전달 체계에 대한 연구 결과로서 새로운 치료 표적들이 개발되고 있으며, 다중-인산화효소 억제제(multi-kinase inhibitor)인 소라페닙(sorafenib)이 진행성 간암환자에서 우수한 치료 효과를 보이고 있다.
- [0005] 그러나, 형질전환 백서모델은 초기 비용, 유지 비용 및 시간이 많이 소요되는 문제가 있다. 이러한 문제들로 인하여 암과 관련된 연구들이 많은 제한을 받고 있으며, 관련 치료제 개발도 지연되고 있다. 특히, 국내 형질전환 백서 모델의 제조 및 연구는 초보적인 단계에 머물러 있으며, 선진국과의 격차도 상당하다.
- [0006] 한편, 제브라피쉬(*Danio rerio*)는 3년생 열대담수어로, 25쌍의 염색체를 지니며, 진화상으로 3억년 전에 인류의 공통 조상에서 분리되었음에도 유전자가 보존되어 있어 인간이 가지는 거의 모든 유전자를 보유하고 있다. 이러한 특징으로 인해 제브라피쉬는 1980년대 발생생물학 모델로 이용되기 시작하였고, 2000년대부터 종양생물학 모델로서의 가치가 부각되었다.
- [0007] 제브라피쉬는 다른 동물 모델에 비해 적은 비용이 들고, 척추동물로서 유전적으로 초파리나 선형 동물에 비해 인간에 매우 가깝다. 또한 다수의 수정란을 생산하여 고효율적인 연구가 가능하며, 배아가 투명하고 48시간의 짧은 발생기간을 가져 실시간 관찰이 가능하다. 특히, 기관 특이적으로 형광단백질과 같은 생물표지자를 발현시키면 생체에서 실시간으로 특정기관의 관찰이 가능하고 배아 단계에서는 세포 수준의 추적이 가능한 장점이 있다. 더불어, 체외수정을 하기 때문에 수정란의 난황으로 손쉽게 유전 물질을 주입하여 유전자를 조작하는 것이 용이하다.
- [0008] 이러한 제브라피쉬의 생물학적 특징을 이용하여 제브라피쉬를 실험 모델로 많이 활용하고 있으며, 2000년 이후부터 종양생물학 관련 논문이 다수 발표되고 있다.
- [0009] 한편, 유전체 교정(Genome Editing)이란 생명체의 유전정보를 자유롭게 교정하는 기술이다. 생명과학분야의 진보와 유전체 서열 분석 기술의 발전을 통해 우리는 다양한 유전정보에 대해 폭넓게 이해할 수 있게 되었다. 예를 들어 동식물의 번식, 질병과 성장, 다양한 인간 유전질환을 일으키는 유전자 변이, 바이오연료의 생산 등을 위한 유전자에 대한 이해는 이미 확보된 상황이지만 이를 직접적으로 활용하여 생명체를 개선하고, 인간 질병을 치료하는 수준에까지 이르기 위해서는 그 이상의 기술 진보가 필수적이다. 유전체 교정 기술은 인간을 포함하여 동물, 식물, 미생물의 유전정보를 변화시켜 그 활용범위를 획기적으로 확장시킬 수 있다. 유전자 가위는 원하는 유전정보를 정확히 자를 수 있도록 설계되어 만들어지는 분자 도구로 유전체 교정 기술에서 핵심 역할을 하고 있다. 유전자 서열분석 분야를 한 차원 발전시켰던 차세대 시퀀싱(Next generation sequencing) 기술과 같이, 유전자 가위는 유전정보 활용의 속도와 그 범위를 확장시키고 새로운 산업 분야를 창출해 내는 핵심 기술이 되고 있다.
- [0010] 지금까지 개발된 유전자 가위는 그 순서에 따라 3세대로 나눌 수 있다. 1세대 유전자 가위는 ZFN(Zinc Finger Nuclease), 2세대 유전자 가위는 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease), 가장 최근에 연구된 CRISPR(크리스퍼, Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9 (CRISPR-associated)은 3세대 유전자 가위(Crispr/Cas9, RGEN)다.
- [0011] 그러나, 상기 유전자 가위를 이용하여 실용적 약물 스크리닝을 위한 도구로서 암 억제와 관련된 특정 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 종양 모델의 최적화 및 유효성을 설명하고 있는 광범위한 연구는 현재까지 이루어지지 않고 있다.
- [0012] 따라서, 보다 효율적인 발암 모델을 확립하여 종래의 동물모델을 실질적으로 대체하기 위해서는 유전자 가위-기반 제브라피쉬 암 모델의 개발이 중요한 과제로 떠오르고 있다.

## 발명의 내용

## 해결하려는 과제



[0014] 이에 본 발명자들은 암 치료제 스크리닝에 사용하기 위한 동물 모델로서, 종래의 포유류 동물 모델을 대체하는 보다 효율적이고 경제적이며 제작이 용이한 동물 모델을 개발하기 위해 예의 연구노력하였다. 그 결과, 유전자 가위(TALEN 및 Crispr/Cas9 시스템)를 이용하여, 종양 억제 유전자로 알려진 *Irx1a*(Iroquois related homeobox 1a) 및 *Irx1b* 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 제브라피쉬를 제조하였고, 상기 *Irx1a* 및 *Irx1b* 유전자의 결핍으로 형질전환 제브라피쉬에게서 암종이 유발되며, 상기 암종의 종양생물학적 성질이 인간과 매우 유사할 뿐만 아니라 다양한 인간-유사 종양이 발생된다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명의 일 목적은 *Irx1a* 및 *Irx1b* 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 제브라피쉬(*Danio rerio*) 암 모델을 제공하는 데 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 제브라피쉬 암 모델을 이용한 암의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제브라피쉬 암 모델을 이용한 암 치료제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0019] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0021] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 *Irx1a*(Iroquois related homeobox 1a) 및 *Irx1b*(Iroquois related homeobox 1b) 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 제브라피쉬(*Danio rerio*) 암 모델을 제공한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 제브라피쉬 암 모델은 다음 단계를 포함하는 방법으로 제작된다:

[0023] (a) 유전자 가위(engineered nuclease)를 이용하여 *Irx1a*(Iroquois related homeobox 1a) 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(*Irx1a*<sup>-/-</sup>)를 제작하는 단계;

[0024] (b) 유전자 가위(engineered nuclease)를 이용하여 *Irx1b*(Iroquois related homeobox 1b)가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(*Irx1b*<sup>-/-</sup>)를 제작하는 단계; 및

[0025] (c) 상기 (a) 단계의 *Irx1a* 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(*Irx1a*<sup>-/-</sup>)와 상기 (b) 단계의 *Irx1b* 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(*Irx1b*<sup>-/-</sup>)를 교배하여 *Irx1a* 및 *Irx1b* 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(*Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup>)를 제작하는 단계.

[0026] 즉, 본 발명은 *Irx1a* 및 *Irx1b* 유전자의 결손 또는 변형을 통하여 암이 발생하는 제브라피쉬 모델을 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명에 있어서 "제브라피쉬 모델" 또는 "동물모델"이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물, 즉, 제브라피쉬를 말한다. 인간의 질병 연구에 있어 질환모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주며, 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내어, 이들 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 유전자교정 (gene editing), 유전체 교정 (genome editing) 혹은 유전체공학 (genome engineering) 기술이라고 불리는 방법을 이용하여 제브라피쉬 암 모델을 제조하는 방법을 개발하였다.

[0029] 본 발명에서, 이러한 유전자교정 대상인 유전자는 *Irx1*(Iroquois related homeobox 1)이다.

[0030] *Irx1* 유전자는 1990년대 초반 초파리에서 발견된 homeobox 유전자로 발생시 패턴 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. *Irx1a* 유전자는 사람 염색체 3.p25에 위치하며 213개의 아미노산으로 된 단백질을 만들어내며, 제브라피쉬에서는 *Irx1a* 및 *b*로 나뉘어져 (duplication) 있다.

[0031] 상기 유전자 교정 기술은 표적 특이적 뉴클레아제를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 명세서에서 용어, "표적 특이적 뉴클레아제"란 목적하는 게놈상의 DNA의 특정 위치를 인식하여 절단할 수 있

는 뉴클레아제일 수 있다. 상기 뉴클레아제는 게놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인과 절단하는 도메인이 융합된 뉴클레아제가 포함될 수 있다.

- [0033] 본 발명에서 상기 표적 특이적 뉴클레아제는 유전자 가위(engineered nuclease)이다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 유전자 가위는 ZFN(Zinc finger nuclease), TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 및 RGEN(RNA-guided engineered nuclease)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0035] 즉, 게놈상의 특정 표적 서열을 인식하는 도메인인 식물 병원성 유전자에서 유래한 TAL 작동자(transcription activator-like effector) 도메인과 절단 도메인이 융합된 TALEN(transcription activator like effector nuclease), 징크-핑거 뉴클레아제 (zinc-finger nuclease), 또는 미생물 면역체계인 CRISPR에서 유래한 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated)을 포함하는 RGEN (RNA-guided engineered nuclease) 또는 Crispr/Cas9이 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 목적상 TALEN 및/또는 Crispr/Cas9을 이용한 방법은 간단하면서도 보다 바람직한 결과를 수행할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형질전환"은 플라스미드 형태의 DNA를 세포에 물리화학적으로 직접 도입하거나 바이러스를 숙주세포에 감염시켜 외래 유전자를 발현시키는 것을 말하며, 본 발명에서 용어, "형질전환 제브라피쉬"은 목적 뉴클레오타이드 서열의 통합에 의하여 유전체(genome)가 변형된 제브라피쉬를 말한다.
- [0038] 본 명세서에서 용어, "TALEN(Transcription activator-like effector nuclease)"은 DNA의 타겟 영역을 인식 및 절단할 수 있는 뉴클레아제를 의미하며, TAL 이펙터 DNA 결합 도메인 및 DNA 절단 도메인을 서로 융합하여 제조한 인공의 제한효소이다. 또한, 본 발명에서 상기 TALEN은 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인과 DNA 절단 도메인이 링커를 통하여 연결된 형태도 포함한다. 여기서, TAL 이펙터 DNA 결합 도메인은 어떠한 원하는 DNA 서열에도 빠르게 결합하도록 엔지니어링된 것으로, 이를 DNA 절단 도메인과 결합시키는 경우, 원하는 DNA 서열에 특이적으로 결합하여 원하는 DNA 부위를 절단하는 효과를 가져온다.
- [0039] 본 발명에서, "TAL 이펙터 뉴클레아제" 및 "TALEN"이라는 용어는 호환이 가능하다. TAL 이펙터는 크산토모나스(Xanthomonas) 박테리아가 다양한 식물중에 감염될 때 이들의 타입 III 분비 시스템을 통해 분비되는 단백질로 알려져 있다. 상기 단백질은 숙주 식물내의 프로모터 서열과 결합하여 박테리아 감염을 돕는 식물 유전자의 발현을 활성화시킬 수 있다. 상기 단백질은 34개 이하의 다양한 수의 아미노산 반복으로 구성된 중심 반복 도메인을 통해 식물 DNA 서열을 인식한다. 따라서, TALE는 게놈 엔지니어링의 도구를 위한 신규 플랫폼이 될 수 있을 것으로 여겨진다. 다만 게놈-교정 활성을 갖는 기능 TALEN을 제작하기 위해서 다음과 같이 현재까지 알려지지 않았던 소수의 주요 매개변수가 정의되어야 한다. i) TALE의 최소 DNA-결합 도메인, ii) 하나의 타겟 영역을 구성하는 2 개의 절반-자리 사이의 스페이서의 길이, 및 iii) FokI 뉴클레아제 도메인을 dTALE에 연결하는 링커 또는 융합 접합 (fusion junction).
- [0040] 본 발명의 TALE 도메인은 하나 이상의 TALE-반복 모듈을 통해 서열-특이적 방식으로 뉴클레오타이드에 결합하는 단백질 도메인을 가리킨다. 상기 TALE 도메인은 적어도 하나의 TALE-반복 모듈, 보다 구체적으로는 1 내지 30개의 TALE-반복 모듈을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, "TAL 이펙터 도메인" 및 "TALE 도메인"이라는 용어는 호환가능하다. 상기 TALE 도메인은 TALE-반복 모듈의 절반을 포함할 수 있다. 상기 TALEN과 관련하여 국제공개특허 WO/2012/093833호 또는 미국공개특허 2013-0217131호에 개시된 내용 전문이 본 명세서에 참고자료로서 포함된다.
- [0041] 본 명세서에서 Irx1a 및 Irx1b 유전자를 타겟으로 한 녹아웃과 관련하여 사용되는 용어, "Irx1a 유전자를 타겟팅하는 TALEN"은 Irx1a 유전자의 특정 서열에 결합하여 Irx1a 유전자의 절단을 가져오는 방법을 의미한다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 Irx1a 유전자를 타겟팅할 때 TALEN은 바람직하게는 Irx1a 유전자의 엑손 1을 특이적으로 절단하는 것이며, 더욱 바람직하게는 Irx1a 유전자의 엑손 1에 위치한 서열번호 3의 염기서열에 결합하는 제1 TALEN 및 서열번호 4의 염기서열에 결합하는 제2 TALEN이며, 보다 바람직하게는 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인이 결합할 수 있는 엑손 1 내 염기서열 부위(서열번호 2)를 절단하는 것이다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에서는 Irx1a 유전자의 경우 서열번호 1로 표시되는 Irx1a cDNA 전체 염기서열이고, 서열번호 3의 핵산 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인을 가지는 제1 TALEN 및 서열번호 4의 핵산 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인을 가지는 제2 TALEN을 모두 이용하여 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인이 결합할 수 있는 엑손 1 내 염



기서열 부위(서열번호 2)를 절단하였다.

- [0044] 상기 세포 내로 본 발명의 TALEN을 도입하는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하기 위한 공지의 방법을 이용할 수 있으며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술, 예컨대 전기천공법(electroporation), 칼슘 포스페이트 공동-침전(calcium phosphate co-precipitation), 레트로바이러스 감염(retroviral infection), 미세주입법(microinjection), DEAE 텍스트란(DEAE-dextran) 및 양이온 리포솜(cationic liposome)법 등을 이용할 수 있으며, 이로 제한되지 않는다. 이때 원형의 벡터를 적절한 제한효소로 절단하여 선형의 벡터 형태로 도입할 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 용어, "RGEN"은 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 구성요소로 포함하는 뉴클레아제를 의미한다.
- [0046] 본 명세서에서 Irx1a 및 Irx1b 유전자를 타겟으로 한 녹아웃과 관련하여 사용되는 용어, "Irx1b 유전자를 타겟팅하는 RGEN(또는 Crispr/Cas9)"은 Irx1b 유전자의 특정 서열에 결합하여 Irx1b 유전자의 절단을 가져오는 방법을 의미한다.
- [0047] 또한, 본 발명에서, Irx1b 유전자의 경우 서열번호 5로 표시되는 Irx1b cDNA 전체 염기서열이고, 상기 Irx1b 유전자를 타겟팅할 때 RGEN(Crisper/Cas9)은 바람직하게는 Irx1b 유전자의 엑손 2를 특이적으로 절단하는 것이며, 더욱 바람직하게는 Irx1b 유전자의 엑손 2에 위치한 5' -CCAAGAGCGCTACCAGAGAAA-3'(서열번호 6)에 결합하는 가이드 RNA일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 상기 Crispr/Cas9 (RGEN)은 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA; 및 분리된 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 세포에 적용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 보다 구체적인 양태로서, 본 발명에서 상기 Crispr/Cas9은 1) 표적 DNA 특이적 가이드 RNA 및 분리된 Cas9 단백질, 2) 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA 및 Cas9 단백질을 코딩하는 핵산의 형태로 세포에 적용될 수 있다.
- [0050] 상기 1)의 형태로 세포에 전달하는 것을, RNP delivery로도 명명하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 분리된 가이드 RNA 형태로 적용할 경우, 상기 가이드 RNA는 생체 외 (in vitro) 전사된(transcribed) 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 또한, 상기 가이드 RNA를 코딩하는 DNA 및 Cas9 단백질을 코딩하는 핵산은 분리된 핵산 자체로 이용될 수도 있으며, 상기 가이드 RNA, 또는/및 Cas9 단백질을 발현하기 위한 발현 카세트를 포함하는 벡터 형태로 존재할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 상기 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 또는 아그로박테리움 벡터일 수 있으며, 상기 바이러스 벡터의 종류로는 AAV (Adeno-associated virus)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산은 개별적인 벡터에 각각 존재하거나, 하나의 벡터에 존재할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 상기에서 기술된 각 적용 양태는 명세서에 기술된 보다 구체적인 양태에 대해서도 모두 적용될 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서 상기 Crispr/Cas9 (RGEN)은 Irx1b 유전자의 특정 서열에 특이적으로 결합하는 가이드(guide) RNA 또는 이를 코딩하는 DNA, 및 Cas9 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 용어, "Cas9 단백질"은 CRISPR/Cas9 시스템의 주요 단백질 구성 요소로, 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 nickase를 형성할 수 있는 단백질이다.
- [0057] 상기 Cas9 단백질은 crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)와 복합체를 형성하여 이의 활성을 나타낼 수 있다.
- [0058] 상기 가이드 RNA는 서열번호 6으로 표시되는 표적서열에 특이적으로 결합하는 crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 포함하는 이중 RNA (dualRNA) 또는 단일-사슬 가이드 RNA (sgRNA) 형태일 수 있다.
- [0059] Cas9 단백질 또는 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있다. 또한, 상기 Cas 단백질은 스트렙토코커스 (Streptococcus) 속, 보다 구체적으로 스트렙토코커스 피요젠스 (Streptococcus pyogens) 유래의 Cas 단백질, 보다 구체적으로 Cas9 단백질

일 수 있다. 또한, 상기 Cas 단백질은 캄필로박터 속(Campylobacter) 속, 보다 구체적으로 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni) 유래의 Cas 단백질, 보다 구체적으로 Cas9 단백질일 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

- [0060] 또한, 상기 Cas 단백질은 천연형 단백질 외에도 가이드 RNA와 협동하여 활성화된 엔도뉴클레아제 또는 nickase로 작용할 수 있는 변이체를 모두 포함하는 개념으로 본 발명에서 사용된다. 상기 Cas9 단백질의 변이체는 촉매적 아스파라긴산 잔기 (catalytic aspartate residue)가 임의의 다른 아미노산으로 변경된 Cas9의 돌연변이 형태일 수 있다. 구체적으로, 다른 아미노산은 알라닌 (alanine)일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 본 발명에서 상기 Cas 단백질은 재조합 단백질일 수 있다.
- [0062] 상기 용어 "재조합"은, 예컨대 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터 등을 언급하며 사용될 때, 이종 (heterologous) 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연형 (native) 핵산 또는 단백질의 변경, 또는 변형된 세포로부터 유래한 세포에 의해 변형된 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터를 나타낸다. 따라서, 예컨대, 재조합 Cas 단백질은 인간 코돈표 (human codon table)를 이용하여 Cas 단백질을 암호화하는 서열을 재구성함으로써 만들 수 있다.
- [0063] 상기 Cas 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산은 Cas 단백질이 핵 내에서 작용할 수 있게 하는 형태일 수 있다.
- [0064] 상기 분리된 Cas 단백질은 또한 세포 내로 도입되기에 용이한 형태일 수 있다. 그 예로 Cas 단백질은 세포 침투 펩타이드 또는 단백질 전달 도메인 (protein transduction domain)과 연결될 수 있다. 상기 단백질 전달 도메인은 폴리-아르기닌 또는 HIV 유래의 TAT 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 세포 침투 펩타이드 또는 단백질 전달 도메인은 상기 기술된 예 외에도 다양한 종류가 당업계에 공지되어 있으므로, 당업자는 상기 예에 제한되지 않고 다양한 예를 본 발명에 적용할 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 Cas 단백질을 코딩하는 핵산은 추가적으로 핵 위치 신호 (nuclear localization signal, NLS) 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 Cas 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트는 상기 Cas 단백질을 발현시키기 위한 프로모터 서열 등 조절 서열 외에도 NLS 서열을 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] Cas 단백질은 분리 및/또는 정제에 유리한 태그와 연결될 수 있다. 그 예로, His 태그, Flag 태그, S 태그 등과 같은 작은 펩타이드 태그, 또는 GST (Glutathione S-transferase) 태그, MBP (Maltose binding protein) 태그 등을 목적에 따라 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에서 용어, "가이드 RNA (guide RNA)"는 표적 DNA 특이적인 RNA를 의미하며, Cas 단백질과 결합하여 Cas 단백질을 표적 DNA로 인도할 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)를 구성요소로 포함하는 이중 RNA (dual RNA); 또는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열을 포함하는 제1 부위 및 Cas 단백질과 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 형태, 보다 구체적으로 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분이 융합된 형태인 sgRNA (single-chain RNA)일 수 있다.
- [0069] 상기 sgRNA는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열 부분(이를 Spacer region, Target DNA recognition sequence, base pairing region 등으로도 명명함) 및 Cas 단백질 결합을 위한 hairpin 구조를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열을 가지는 부분, Cas 단백질 결합을 위한 hairpin 구조 및 Terminator 서열을 포함할 수 있다. 상기 기술된 구조는 5' 에서 3' 순으로 순차적으로 존재하는 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 상기 가이드 RNA가 crRNA 및 tracrRNA의 주요 부분 및 표적 DNA의 상보적인 부분과 염기 쌍을 형성할 수 있는 부분을 포함하는 경우라면 어떠한 형태의 가이드 RNA도 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0071] 상기 crRNA는 표적 DNA와 혼성화된 것일 수 있다.
- [0072] RGEN은 Cas 단백질 및 dual RNA로 구성되거나, Cas 단백질 및 sgRNA로 구성될 수 있다. 또한, 상기 RGEN은 Cas 단백질을 코딩하는 핵산 및 dual RNA를 코딩하는 핵산; 또는 Cas 단백질을 코딩하는 핵산 및 sg RNA를 코딩하는 핵산을 구성요소로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 상기 가이드 RNA, 구체적으로 crRNA 또는 sgRNA는 표적 DNA 내 서열과 상보적인 서열과 염기 쌍을 형성할 수 있는 서열을 포함하며, crRNA 또는 sgRNA의 업스트림 부위, 구체적으로 sgRNA 또는 dualRNA의 crRNA의 5'-말단에 하나 이상의 추가의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 추가의 뉴클레오티드는 구아닌 (guanine, G)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0074] 보다 구체적으로, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 유전자 교정은 Irx1b 유전자의 특정 서열에 특이적으로 결합하는 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas9 단백질을 세포에 도입하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0075] 상기 RGEN 방법으로 Irx1b 유전자의 녹아웃을 위해 사용할 수 있는 표적 서열(target sequence)은 Irx1b 엑손 2에 존재하는 5'-CCAAGAGCGCTACCAGAGAAA-3' 서열(서열번호 6)일 수 있으나, 반드시 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명의 실시예에서는, 교정하고자 하는 목적 유전자 표적 서열인 Irx1a 및 Irx1b 유전자들을 녹아웃시키기 위해, 뉴클레아제 중 하나인 TALEN 시스템을 기반으로 한 방법을 이용하여 Irx1a 유전자를 제거하고, 뉴클레아제 중 하나인 CRISPR/Cas9 시스템을 기반으로 한 RGEN 방법을 이용하여 Irx1b 유전자를 제거함으로써, 최종적으로 Irx1a 및 Irx1b 유전자-결실 모델을 구축하였다.
- [0077] 즉, Irx1a 유전자 표적 서열을 인지하는 TALEN 콘스트럭트에서 생성된 mRNA 및 Irx1b 유전자 표적 서열을 인지하는 Crispr/Cas9 시스템에서 생성된 Cas9 mRNA와 gRNA를 세포 안에 전달하는 방법을 사용하였다.
- [0078] 상기 방법은 (1) 박테리아에서 과발현시킨 후 정제한 Cas9 단백질과 Irx1b의 엑손 2 내 타겟 서열을 인지하는 gRNA (single guided RNA)를 in vitro 전사에 의해 제조하여 전달해주는 방법 일 수도 있다. (2) 또는 이들 Cas9 단백질과 gRNA를 발현시키는 플라스미드 DNA들을 세포 안에 전달하여 세포 내에서 발현 하도록 하는 방법을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0079] 또한, 본 발명에 필요한 단백질, RNA, 혹은 플라스미드 DNA들의 세포 내 전달방법은 전기천공법(electroporation), 리포솜, 바이러스벡터, 나노파티클(nanoparticles) 뿐만 아니라 PTD (Protein translocation domain) 융합 단백질 방법 등 당업계에 공지된 다양한 방법들을 사용할 수 있으며, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Irx1a 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1a<sup>-/-</sup>)는 도 1a에 기재된 개열 지도를 갖는 재조합 벡터로 형질전환되고, Irx1b 유전자가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬(Irx1b<sup>-/-</sup>)는 도 1b에 기재된 개열 지도를 갖는 재조합 벡터로 형질전환된다.
- [0081] 본 발명에서, 본 발명의 제브라피쉬 암 모델은 도 1a에 기재된 개열 지도를 갖는 재조합 벡터, 즉, Irx1a 유전자 녹아웃을 위한 TALEN 콘스트럭트; 또는 도 1b에 기재된 개열 지도를 갖는 재조합 벡터, 즉, Irx1b 유전자 녹아웃을 위한 Crispr/Cas9 콘스트럭트로 형질전환된다.
- [0082] 본 발명에서, 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 포함하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 벡터는 세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않고 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있으며, 예컨대 플라스미드, 코즈미드, 파지 입자, 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0083] 본 발명에서, 용어 "재조합 벡터"는, 발현시키고자 하는 목적 폴리펩타이드의 암호화 유전자가 작동 가능하게 연결될 경우, 적절한 숙주 세포에서 상기 목적 폴리펩타이드를 높은 효율로 발현시킬 수 있는 목적 폴리펩타이드의 발현 벡터로 사용될 수 있으며, 상기 재조합 벡터는 숙주 세포에서 발현 가능할 수 있다. 숙주 세포는 바람직하게는 진핵세포일 수 있으며, 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현 조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.
- [0084] 상기 재조합 벡터는 각각 Irx1a 및 Irx1b 유전자의 염기서열을 타겟으로 하여 염기서열을 변형 즉, 삽입 또는 결실시키는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 Irx1a 유전자의 경우 엑손 1에 존재하는 표적 염기서열에서 변형 즉, 삽입 또는 결실이 발생할 수 있고, Irx1b 유전자의 경우 엑손 2에 존재하는 표적 염기서열에서 변형 즉, 삽입 또는 결실이 발생할 수 있다.
- [0085] 본 발명에서 Irx1a 및 Irx1b 유전자를 녹아웃하기 위한 것이라면 본 발명에 제한없이 포함되면, 바람직하게는 상기 재조합 벡터는 도 1a 및 도 1b에 기재된 개열 지도를 갖는 것으로, 본 발명의 Irx1a 및 Irx1b 유전자의 녹아웃을 달성할 수 있는 벡터의 구성이라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 제브라피쉬 암 모델은 간암, 위암, 췌장암, 담낭암, 대장암,

난소암, 유방암, 폐암, 소세포폐암, 혈액암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장암, 수노관 암, CNS 종양, CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암이 발병하며, 보다 바람직하게는 간암, 위암, 췌장암, 담낭암, 대장암 및 난소암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암이 발병한다.

- [0087] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 방법은 상기 제브라피쉬 수정란으로부터 수득한 이형접합체 변이 제브라피쉬를 서로 교배하여 동형접합체 변이 제브라피쉬를 수득하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0088] 본 발명에 따르면, 본 발명은 동형접합체 변이 제브라피쉬를 수득하기 위하여 이형접합체 변이 제브라피쉬 간 교배를 수행할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 유전자 가위 시스템을 주입한 제브라피쉬 수정란(F0)을 성어로 사육한 뒤 수득된 이형접합체 변이 자손(F1)과 야생형과 교배하여 이형접합체 변이 자손(F2)을 수득하고, 이들 이형접합체끼리 교배하여 동형접합체 변이 자손(F3)을 수득할 수 있다.
- [0089] 상기 수정란 도입은 미세주입법, 줄기세포 삽입방법, 레트로바이러스를 이용한 삽입 방법 및 정자-매개 유전자 전달 방법 등을 포함하며, 바람직하게는 미세주입법일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0090] 상기 수정란은 수컷과 암컷 제브라피쉬의 교배를 통해 생성된 수정란으로서, 바람직하게는 1-2 세포기의 수정란일 수 있다.
- [0091] 즉, 본 발명자들은 유전자 가위 시스템을 이용함으로써 보다 간단한 방법으로 유전자 변형 동물을 제작하고, *Irx1* 유전자의 결핍으로 유발되는 암 발생 형질전환 제브라피쉬 모델을 효과적으로 제조하였다.
- [0093] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0094] (a) 상술한 제브라피쉬 암 모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0095] (b) 상기 (a) 단계의 제브라피쉬 암 모델의 세포에서 종양의 정도를 측정하는 단계; 및
- [0096] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 세포에서의 종양의 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.
- [0097] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 피검물질은 암 치료에 효과가 있는지 여부를 확인하기 위해 처리하는 물질로서, 화합물, 펩티드, 펩티도모방체, 기질유사체, 앵타머, 항체 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0098] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (b) 단계의 세포에서의 종양의 정도를 측정하는 것은 제브라피쉬의 세포에서 종양이 형성되었는지, 형성되었다면 그 특징이 어떠한지를 분석하는 것을 의미한다.
- [0099] 보다 구체적으로, 클리어 세포체(clear cell body), 호산구(eosinophilic), 호염기성 세포체(pasophilic cell body), LCC(large cell change), 유리질체(hyaline body), 호산구성 과립 세포질(eosinophilic granular cytoplasm), 매끈한 핵(rounded nuclei), 돌출된 인(prominent nucleoli), 다면 발현 증식소(dysplastic foci) 등을 포함하는 종양 형성의 특징이 나타나는지 분석하는 것일 수 있으며, 종양 형성과 관련된 유전자의 발현 정도를 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯(Northern blot), cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 및 생체 내(in situ) 혼성화 반응 등의 방법을 통해 측정하는 것일 수 있으며, 종양 형과 관련된 단백질의 활성 정도를 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학법(immunohistochemistry), 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS) 등의 방법을 통해 측정하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0100] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 (c) 단계의 선별 단계는 상기 (b) 단계의 측정 결과를 정량적 또는 정성적으로 분석하여 피검물질을 처리한 제브라피쉬 암 모델과 피검물질을 처리하지 않은 대조군의 세포의 종양 정도 비교를 통해 대조군에 비해 종양 정도가 감소한 피검물질을 선별하는 것일 수 있다.
- [0101] 본 발명의 일 실시예에 따르면, *Irx1a* 및 *Irx1b*가 녹아웃된 형질전환 제브라피쉬는 간, 소장, 췌장 및 난소 조직에서 종양이 형성된다.
- [0102] 따라서, 종양 발생 및 정도를 관찰함으로써, 암 치료 물질 자체 및 이의 개발에 관한 연구에 유용하게 사용될



수 있다.

- [0103] 본 발명의 방법은 상술한 *Irx1a* 및 *Irx1b*가 녹아아웃된 형질전환 제브라피쉬 암 모델을 이용하므로, 이와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0105] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 암 치료제의 암에 대한 치료 효과 예측 방법을 제공한다:
- [0106] (a) 상술한 제브라피쉬 암 모델에 암 치료제를 처리하는 단계;
- [0107] (b) 상기 (a) 단계의 제브라피쉬 암 모델에 암의 진행 여부를 측정하는 단계; 및
- [0108] (c) 상기 (b) 단계에서, 제브라피쉬 모델의 암이 진행된 경우, 암 치료제의 암 치료 효과가 존재하지 않은 것으로 예측하고, 제브라피쉬 모델의 암이 진행되지 않은 경우, 암 치료제의 암 치료 효과가 존재하는 것으로 예측하는 단계.
- [0109] 상기 치료 효과 예측 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 암 치료제는 암 치료에 효과가 있다고 알려져 있거나 새로 개발된 치료제로서, 바람직하게는 화합물, 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 앵타머, 항체 등을 포함한다.
- [0110] 상기 치료 효과 예측 방법에 있어서, 상기 (b) 단계의 간암의 진행 여부를 측정하는 단계는 종양 형성과 관련된 유전자의 발현 정도를 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), 노던 블롯(Northern blot), cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 및 생체 내(in situ) 혼성화 반응 등의 방법을 통해 측정하는 것일 수 있으며, 종양 형성과 관련된 단백질의 활성 정도를 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학법(immunohistochemistry), 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS) 등의 방법을 통해 측정하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0111] 본 발명의 방법은 상술한 *Irx1a* 및 *Irx1b*가 녹아아웃된 형질전환 제브라피쉬 암 모델을 이용하므로, 이와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

### 발명의 효과

- [0113] 본 발명에 따른 *Irx1a* 및 *Irx1b*가 녹아아웃된 형질전환 제브라피쉬는 *Irx1a* 및 *Irx1b* 기능이 결핍되어 인간 종양과 매우 유사한 종양 생물학적 특성을 갖는 종양이 생성된다. 따라서, 본 발명의 제브라피쉬 암 모델은 인 비보에서 종양의 생성, 전이, 증식 등을 연구하기 위한 우수한 동물 모델로서, 암 치료제의 효율적인 스크리닝 및 암 치료제의 암에 대한 치료 효과 예측을 통한 환자 맞춤형 치료전략의 수립에 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0115] 도 1은 본 발명의 TALEN을 이용한 *Irx1a/b* 녹아아웃 제브라피쉬 모델 제작 방법을 보여준다.
- 도 2는 본 발명의 생후 12개월령 형질전환 제브라피쉬 동형변이주의 간, 소장, 췌장 및 난소 조직에서의 표현형 및 병리학적 상태를 보여준다.
- 도 3은 본 발명의 생후 19개월령 형질전환 제브라피쉬 동형변이주 장조직 표피에서의 과증식(Hyperplasia of intestinal epithelium) 발생을 보여준다.
- 도 4는 본 발명의 생후 12-18개월령 형질전환 제브라피쉬 동형변이주 간조직 표피에서의 간내담관세포암(intrahepatic cholangiocarcinoma) 발생을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0116] 이하, 본 발명의 내용을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0118] **실시예**
- [0120] **실시예 1. *Irx1a/b* 유전자를 녹아아웃(knock-out)시킨 형질전환 제브라피쉬의 제조**
- [0121] 본 발명자들은 *Irx1* (Iroquois related homeobox 1) 유전자를 암 발생에 중요한 역할을 하는 유전자로 선정하였고, 하기와 같이 유전자 가위 기법들을 이용하여 제브라피쉬 *Irx1a/b* 유전자를 타겟팅하여 녹아아웃-형질전환 제브라피쉬 모델을 생산하였고 계대사육을 통하여 동형변이주를 수립하였다.

- [0122] 이 때, 상기 제브라피쉬 모델은 하기 도 1a 및 도 1b에 기재된 개열 지도를 갖는 재조합 벡터로 형질전환된다.
- [0124] **1-1. 제브라피쉬의 사육 및 교배**
- [0125] 제브라피쉬는 인도원산으로 28.5℃의 온도와 30~70%의 습도를 유지하는 폐쇄 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였다. 하루 14시간은 명처리, 10시간은 암처리를 하여 주광주기를 맞춰주었다. 성숙한 제브라피쉬는 Freshwater Aquarium Flakefood(Tetra Werke, Melle, Germany)와 살아있는 브라인 쉬림프(brine shrimp)(San Francisco Bay Brand, Inc., Newark, CA, USA)를 섞어서 하루에 2번 급이하였다. 약 2~3달이 되면 교배를 할 수 있는 성체가 되고, 교배 전날 오후에 암컷과 수컷을 전용 교미 상자(mating cage)에 넣고, 다음날 아침의 산란을 유도하기 위해 빛을 주었다. 그 후, 수컷과 암컷이 교미를 하여 암컷이 수백 개의 수정란을 산란하였다. 수집된 수정란을 링거 용액(Ringer's solution)(116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.2)으로 씻어 페트리디쉬에 옮기고 28.5℃의 배양기에서 발생시켰다. 해부현미경을 이용하여 각 발생단계의 수정란을 시간별, 형태학적 변화에 따라 선별하여 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하였다.
- [0127] **1-2. TALEN을 이용한 Irx1a 녹아웃 제브라피쉬 모델 제작**
- [0128] 본 발명자들은 도 1a의 벡터를 이용하여 제브라피쉬 Irx1a 유전자를 타겟팅하여 녹아웃시킨 제브라피쉬를 생산하였고 계대사육을 통하여 동형변이주를 수립하였다(도 1c).
- [0129] 먼저, 본 발명자들은 TALEN 콘스트럭트를 제작한 후 in vitro transcription을 통하여 mRNA를 제작후 제브라피쉬 수정란에 미세주입을 통하여 mRNA를 주입하였다. 성어로 사육한 다음 자손을 생산하여 Irx1a 유전자의 germline 변이가 있는 개체를 염기서열 분석을 통하여 확인하였다.
- [0130] Irx1a 유전자가 녹아웃된 제브라피쉬를 제조하기 위해서는, 녹아웃시킬 유전자로서 Irx1a(Iroquois related homeobox 1a)(서열번호 1)의 엑손 1을 선택하였다. 제브라피쉬의 Irx1a 유전자의 엑손 1의 전체 염기서열을 분석하여, TAL 이펙터 DNA 결합 도메인이 결합할 수 있는 엑손 1 내 염기서열 부위를 결정하고(서열번호 2; 5'-TCCCCAGCTGGGCTACCCGCAGTATTTAAGTGCCTCCACGCGGTGTACGGAGGCGACCGACCGGGA-3'), 이를 바탕으로 제1 TALEN(좌측 TALEN 밑줄, 서열번호 3) 및 제2 TALEN(우측 TALEN 밑줄, 서열번호 4)을 제작하였다.
- [0131] 즉, 후보 결합부위 탐색을 통한 TALEN의 설계는 Bogdanove laboratory(<https://boglab.plp.iastate.edu/node/add/talen>) 소프트웨어 프로그램을 이용하였으며, Irx1a 유전자의 엑손 1을 타겟팅하는 TALEN 콘스트럭트를 제작하였다. TALEN이 인식하는 상위 염기서열(left)인 제1 TALEN은 엑손 1에 존재하는 TCCCCAGCTGGGCTACCCG(서열번호 3)이고, 하위 염기서열(right)인 제2 TALEN은 CGGAGGCGACCGACCGGGA(서열번호 4)이다. 두 염기서열 사이에는 29 bp의 스페이서를 두었다. 콘스트럭트는 Feng Zhang 방법을 이용하여 제작하였으며, 제작된 콘스트럭트 플라스미드의 염기서열을 분석하여 확인하였다.
- [0132] 이어서, 상기 실시예 1-1에서 수득한 1-2 세포기 수정란의 난황에 상기 실시예 1-2에서 제조한 제브라피쉬의 형질전환 유전자를 미세주입(microinjection)하였다. 그 후, 어버이 세대의 제브라피쉬(F0 founder fish)를 성어로 사육한 다음 수정란을 생산하여 Irx1a 유전자의 변이가 있는 제브라피쉬(transgenic F1 founder fish) 모델을 염기서열 분석을 통하여 확인한 다음 계대사육을 통하여 동형변이주를 수립하였다.
- [0133] 한편, 상기 녹아웃 제브라피쉬(knockout F3 zebrafish)의 유전자형(genotype)을 확인한 결과, Irx1a 유전자가 녹아웃된 Irx1a<sup>-/-</sup> 녹아웃주는 타겟 서열 부위인 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인이 결합할 수 있는 엑손 1의 염기서열 부위 중 ATG 시작 코돈부터 40번 째 염기 뒤에 C가 삽입된 프레임쉬프트(frameshift) 변이(밑줄친 굵은 글씨체)가 발생한 것을 하기와 같이 확인하였다(Irx1a cDNA 전체 염기서열은 서열번호 1로 표시하였다):
- [0134] 5'-ATGTCCTTTCCCCAGCTGGGCTACCCGCAGTATTTAAGTGCCTCCACGCGGTGTACGGAGGCGACCGACCGGGA-3' →
- [0135] 5'-ATGTCCTTTCCCCAGCTGGGCTACCCGCAGTATTTAAGTGCCTCCACGCGGTGTACGGAGGCGACCGACCGGGA-3'.
- [0136] (TALEN이 인식하는 제1 TALEN(서열번호 3) 및 제2 TALEN(서열번호 4)은 각각 좌측 및 우측에 밑줄로 표시하였다)
- [0138] **1-3. RGEN(Crispr/Cas9)을 이용한 Irx1b 녹아웃 제브라피쉬 모델 제작**
- [0139] 본 발명자들은 도 1b의 벡터를 이용하여 제브라피쉬 Irx1b 유전자를 타겟팅하여 녹아웃시킨 제브라피쉬를 생산하였고 계대사육을 통하여 동형변이주를 수립하였다(도 1c).
- [0140] 먼저, 본 발명자들은 Crispr/Cas9을 이용하여 guide-RNA를 제작한 후 Cas9 mRNA와 함께 제브라피쉬 수정란에 미



세주입을 통하여 mRNA를 주입하였다. 성어로 사육하여 다음 자손(F1)을 생산한 후 *Irx1b* 유전자의 염기서열을 분석하여 변이가 있는 개체를 확인하였다. 이후 계대사육을 통하여 동형변이주를 수립하였다.

[0141] *Irx1b* 유전자가 녹아웃된 제브라피쉬를 제조하기 위해서는, 녹아웃시킬 유전자로서 *Irx1b*(Iroquois related homeobox 1b)(서열번호 5)의 엑손 2를 선택하였다. 제브라피쉬의 *Irx1b* 유전자의 엑손 2의 전체 염기서열을 분석하여, 이를 바탕으로 표적 서열 (target sequence)로서 서열번호 6(5' -CCAAGAGCGCTACCAGAGAAA-3')을 제작하였다.

[0142] 이어서, 상기 실시예 1-1에서 수득한 1-2 세포기 수정란의 난황에 상기 실시예 1-3에서 제조한 제브라피쉬의 형질전환 유전자를 미세주입(microinjection)하였다. 그 후, 어버이 세대의 제브라피쉬(F0 founder fish)를 성어로 사육한 다음 수정란을 생산하여 *Irx1b* 유전자의 변이가 있는 제브라피쉬(transgenic F1 founder fish) 모델을 염기서열 분석을 통하여 확인한 다음 계대사육을 통하여 동형변이주를 수립하였다.

[0143] 한편, 상기 녹아웃 제브라피쉬(knockout F3 zebrafish)의 유전자형(genotype)을 확인한 결과, *Irx1b* 유전자가 녹아웃된 *Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃주는 ATG 시작 코돈부터 368번 째 염기 이후 CG가 결손되고 TTT가 삽입된 프레임쉬프트(frameshift) 변이(밑줄친 굵은 글씨체)가 발생한 것을 하기와 같이 확인하였다(*Irx1b* full cDNA 서열은 서열번호 5로 표시하였다):

[0144] 5'-CCAAGAGCGCTACCAGAGAAA-3' →

[0145] 5'-CCAAGAG**TTT**CTACCAGAGAAA-3'

#### [0147] 1-4. *Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃 제브라피쉬 모델 제작

[0148] 본 발명자들은 프레임쉬프트(Frameshift) 돌연변이가 있는 F1 이형변이 제브라피쉬(heterozygote)를 자연형과 교배하여 다수의 자손(F2)을 생산한 다음 변이가 있는 개체를 확인하여 암수 각각 확보한 다음 교배를 통하여 F3 자손을 생산하였고 F3 자손에서 염기서열 분석을 통하여 *Irx1a*, *Irx1b* 각각 동형변이 *Irx1a*<sup>-/-</sup>, *Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃 제브라피쉬주를 수립하였다.

[0149] 즉, *Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃 주는 *Irx1a* 및 *Irx1b* 동형변이주를 교배하여 자손을 생산한 다음 계대사육을 통하여 최종적으로 *Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup> 변이주를 수립하였다. 상기 수립된 *Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃주의 동계교배(inbreeding)을 통하여 *Irx1a* 및 *Irx1b* 두 유전자가 완전히 녹아웃된 *Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup> 주를 사육을 통하여 안정적인 개체수를 확보하였다.

#### [0151] 실시예 2. *Irx1a*<sup>-/-</sup>, *Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃 제브라피쉬의 종양 형성 검증

[0152] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제작된 *Irx1a*<sup>-/-</sup> 및 *Irx1b*<sup>-/-</sup> 형질전환 제브라피쉬 동형변이주(homozygote)를 사육하여 상기 형질전환 제브라피쉬에서의 종양 형성 여부를 확인하기 위해, 생후 12-18개월령 *Irx1a*<sup>-/-</sup>/*Irx1b*<sup>-/-</sup> 형질전환 제브라피쉬 동형변이주로부터 간, 소장, 췌장 및 난소 조직을 획득하여 H&E 염색 및 면역조직화학법(IHC; immunohistochemistry, immunostaining)을 통해 종양 발생 양상 및 수준을 확인하였다.

[0153] 상기 *Irx1a*<sup>-/-</sup>, *Irx1b*<sup>-/-</sup> 녹아웃 제브라피쉬의 종양 형성 여부를 확인한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0154] [표 1] Irx1 유전자 변이주에서 종양 표현형

	6 month		12 month		18 month	
	Irx1a <sup>+/+</sup>	Irx1b <sup>+/+</sup>	Irx1a <sup>+/+</sup>	Irx1b <sup>+/+</sup>	Irx1a <sup>+/+</sup>	Irx1b <sup>+/+</sup>
Intestinal hyperplasia	8.3 % {2/24}	4.2 % {1/24}	37.5 % {9/24}	25.0 % {6/24}	54.2 % {13/24}	33.3 % {8/24}
Testicular hyperplasia	0% {0/13}	0 % {0/12}	25.0 % {3/12}	8.3 % {1/12}	54.5 % {6/11}	18.2 % {6/11}
Testicular tumor	0% {0/13}	0 % {0/12}	8.3 % {1/12}	0 % {0/12}	9.1 % {1/11}	0 % {0/11}
Ovarian hyperplasia	0% {0/11}	0 % {0/12}	8.3 % {1/12}	8.3 % {1/12}	30.8 % {4/13}	15.4 % {2/13}
Ovarian tumor	0% {0/11}	0 % {0/12}	8.3 % {1/12}	0 % {0/12}	7.7 % {1/13}	7.7 % {1/13}
Renal hyperplasia	8.3 % {2/24}	4.2 % {1/24}	20.8 % {5/24}	12.5 % {3/24}	37.5 % {9/24}	16.7 % {4/24}
Renal tumor	0 % {0/24}	0% {0/24}	0 % {0/24}	0 % {0/24}	4.2 % {1/24}	0 % {0/24}
Bile duct hyperplasia	50.0 % {12/24}	25.0 % {6/24}	70.8 % {17/24}	37.5 % {9/24}	87.5 % {21/24}	66.7 % {16/24}
Bile duct tumor	25.0 % {6/24}	4.2 % {1/24}	45.8 % {11/24}	12.5 % {3/24}	66.7 % {16/24}	50.0 % {12/24}

[0155]

[0156]

보다 구체적으로, 4  $\mu$ m로 박절된 조직을 자일렌(xylene)을 이용하여 탈 파라핀 후 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올을 이용하여 탈수하였다. 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 20분 동안 담근 후 15분 동안 반응시키고 1X PBST로 5분씩 3번 세척하였다. 블로킹 용액(10% 정상 염소 혈청)으로 한 시간 동안 처리한 후 1X PBST로 5분씩 3번 세척하고, 일차 항체는 anti-PCNA으로서, 상기 일차 항체를 한 시간 동안 상온에서 처리하였다. 1X PBST로 5분씩 3번 세척한 후 2차 항체인 anti-mouse Ab을 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. ABC 용액(Vector Laboratories)을 실온에서 1시간 동안 처리한 후, 1X PBST에 10분씩 2번 세척하고 3'-다이아미노벤지딘 테트라클로라이드(diaminobenzidine tetrachloride) (DAB, peroxidase substrate kit DAB(Vector Laboratories))를 처리하고, 1차 증류수로 10분씩 3번 세척하였다. 세척 후 각 2분씩 85%, 90%, 100% 에탄올을 처리한 후 자일렌(xylene, Sigma)을 5분 동안 처리하고, 이후 자일렌이 마르면 봉입하여 형광현미경(Olympus BX51, Japan)으로 관찰하였다.

[0157]

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 생후 12개월령 형질전환 제브라피쉬 동형변이주의 간, 소장, 췌장 및 난소 조직에서의 표현형 및 병리학적 상태를 관찰했을 때, 위장관의 과증식(과증식(hyperplasia)뿐만 아니라, 간내담관세포암(intrahepatic cholangiocarcinoma) 및 점액성 난소암(mucinous cystadenocarcinoma) 등이 발생한 것을 확인하였다. 또한, 발생한 암종은 인간에서 발생하는 담관세포암 및 난소암과 조직 병리수준에서 거의 동일한 소견을 나타냈다.

[0158]

또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 생후 19개월령 형질전환 제브라피쉬 동형변이주의 장조직 표피에서 위장관상피세포과증식(Hyperplasia of intestinal epithelium)이 발생한 것을 확인하였다. 대조군에 비하여 위장관 상피세포층이 두터우며 증식의 마커인 PCNA 및 mitotic 마커인 pHH3 면역염색상 양성 세포의 수가 현저하게 증가되어 있다.

[0159]

또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 생후 12-18개월령 형질전환 제브라피쉬 동형변이주의 간조직 표피에서 간내담관세포암(intrahepatic cholangiocarcinoma)이 발생한 것을 확인하였다. 담관세포암은 인간에서 발생하는 암종과 조직병리 수준에서 매우 유사한 소견을 나타냈다. 또한, 암종은 간은 물론 주변에 위치한 췌장으로 침윤성 증식을 보이며, PCNA 면역염색상 암세포의 양성율이 현저하게 증가되어 있었다.

[0160]

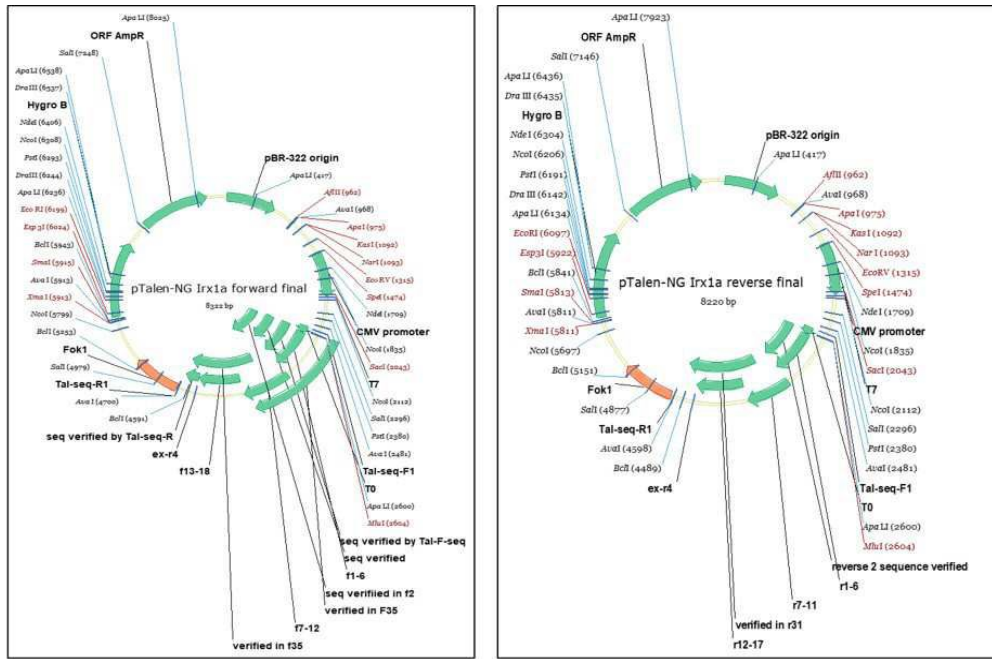
이는, Irx1 유전자가 다양한 암종의 발생 과정에서 종양억제유전자로 작용하며, Irx1a/b를 결실시킬 경우 발생된다는 것을 제시한다.

[0162]

종합적으로, 이상의 실험 결과를 통해 본 발명에 따른 Irx1a 및 Irx1b 유전자의 녹아웃을 위한 특이적 유전자 가위 방법을 이용하여 형질전환된 동물에서 Irx1a 및 Irx1b 유전자를 암호화하는 DNA 가닥을 녹아웃시켜 암 발생을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 Irx1a 및 Irx1b 유전자 녹아웃 제브라피쉬 암 모델은 관련 질환인 암의 기전의 규명, 치료물질의 탐색 및 진단법의 개발 등에 다양하게 활용될 수 있으므로 암 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면

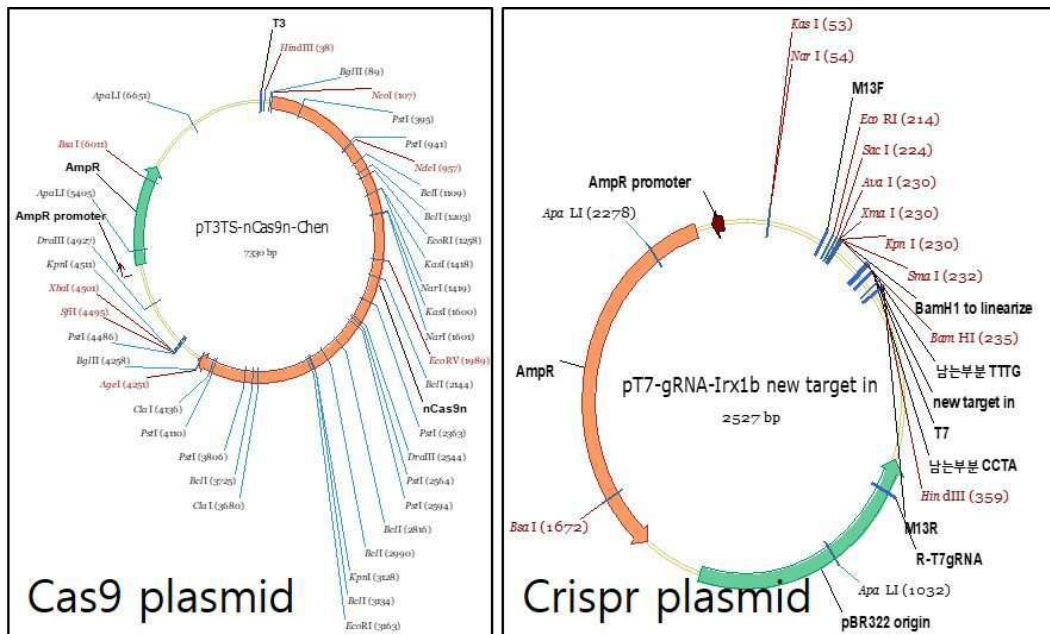
도면1a



Irx1a 녹아웃용 TALEN forward construct

TALEN reverse construct

도면1b



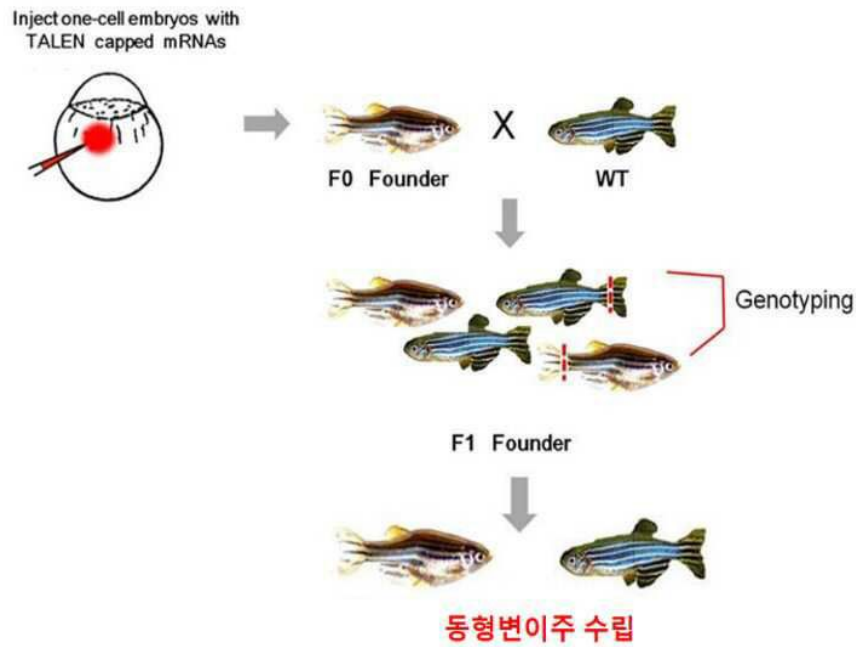
Cas9 plasmid

Crispr plasmid

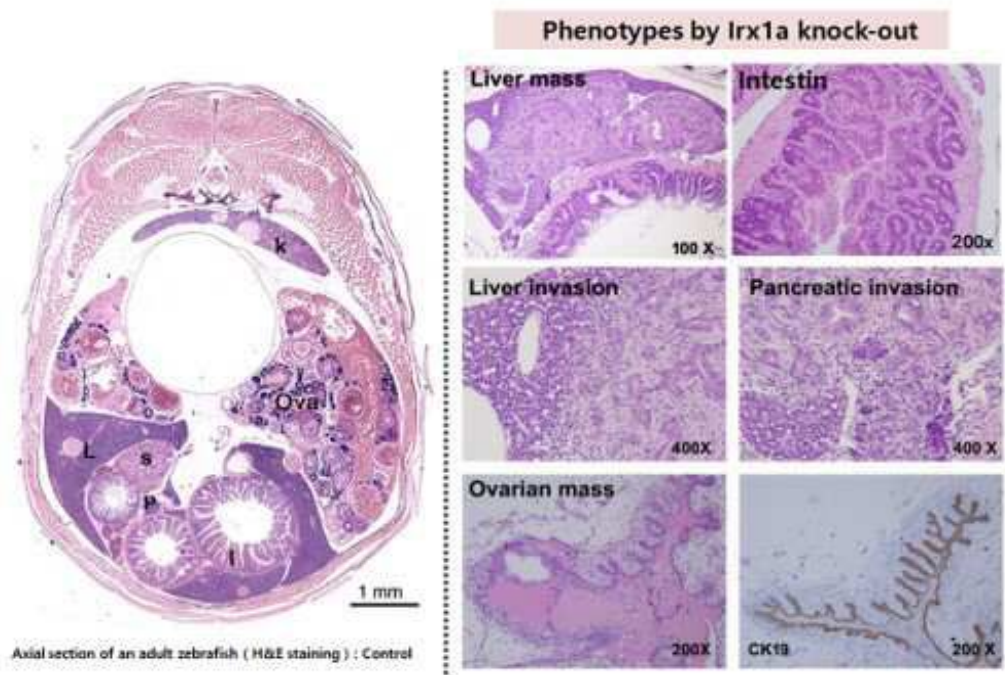
Irx1b 녹아웃용 Crispr/Cas9 콘스트럭트

도면1c

**$lrx1a^{-/-}/lrx1b^{-/+}$  유전자 녹아웃**

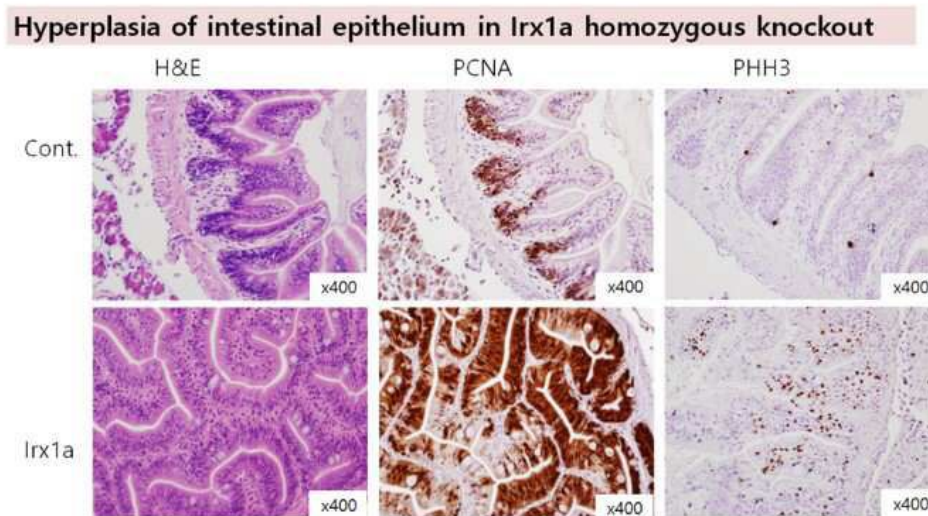


도면2

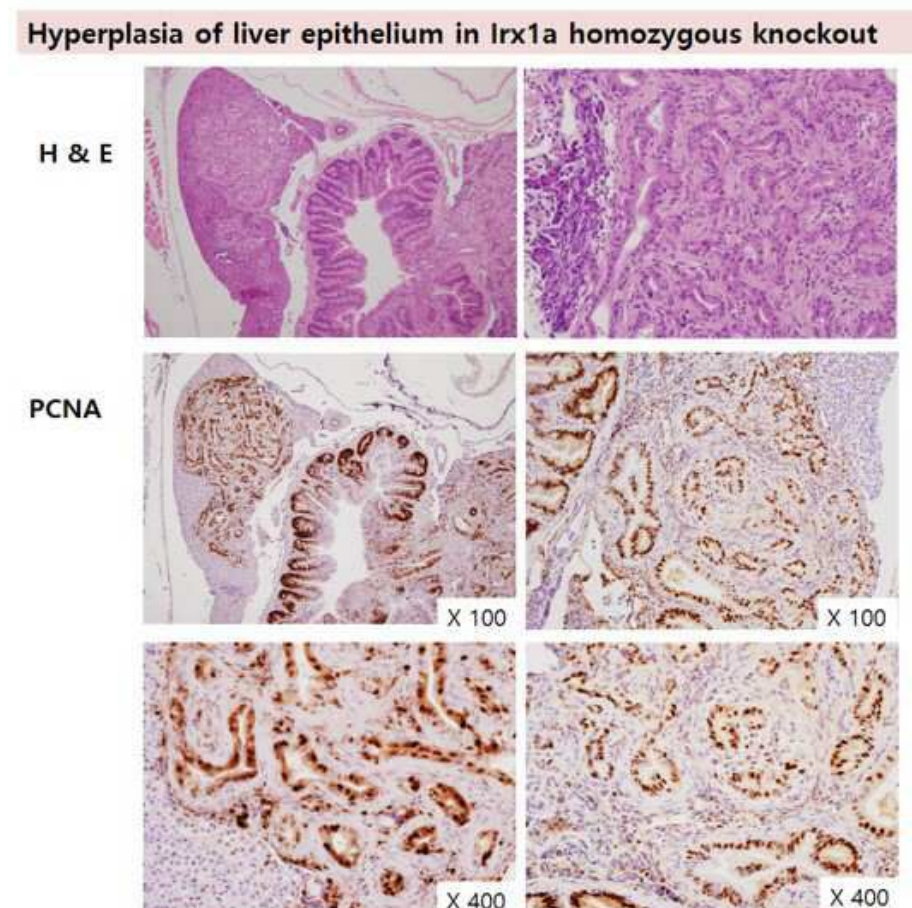




도면3



도면4



### 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> IRX1 Knock-out Transgenic Zebrafish Model and Method for Producing Thereof

<130> YSU1-25p  
 <160> 6  
 <170> KoPatent In 3.0  
 <210> 1  
 <211> 1281  
 <212> DNA  
 <213> Danio rerio  
 <400> 1

atgtctttcc cccagctggg ctaccgcag tatttaagtg cctcccaggc ggtgtacgga 60  
 ggcgaccgac cgggagttct gactccgtcg tcccgcgag ggagcgtga gatcgggggt 120  
 agcgcgtctg cggccgccc tgcggtgtcc tcggtgttgg gcatgtacc gtacgcacac 180

aactacagcg cttttctgcc ttaccaccg gccgatctgg ctcttttctc ccaaattgggc 240  
 tctcagtatg atctgaaaga cagccctgga gtccacctg ccagcttcgc tgccacacg 300  
 agtcctgcct tctacccta cggccagttc cagtacggag accccgccag gcccaaaaac 360  
 gccaccggg agagcaccag caccctgaag gcctggctga acgagcacag gaaaaacccc 420  
 tateccacca aaggagagaa gatcatgctg gccatcatca ccaagatgac cctcacgcaa 480  
 gtgtccacct gggtcgccaa cgctagaagg agactcaaga aggagaacaa ggtgacctgg 540  
 ggcgccagga gcaaggacga cgagaacatt ttggaagcg ataacgaagg agacgccgaa 600

aagaacgagg acgaagagga gatagatctg gagagcatag atatcgataa aatcgacgac 660  
 aacgatggcg atcagagcaa cgaggaggac gaggacaagc gcgcggagct ggagagcctc 720  
 caggagaagc gacacgcgtc caaagagccg tcggatggca acaacaacac cactagagta 780  
 ctgtcgcgcc gtcgacaggc cggttttcaa gttccggtta gcaataagcc caaatatgg 840  
 tcgttggcag aaacagcgac cagtccgat agcgcgcaga aacctacgtc accttccgtt 900  
 cccgtcagcc acccgccctt cctgcccagc cacggactgt acacgtgcca gatcggaag 960  
 ttccacaact ggacgaacgg cgcgtttctg ggacaaaact ctctgctaaa tgtgcgtctt 1020

ttcctgggcg tcaaccagca caaccacccg gcgcagcagc agcagcagca gacggggccc 1080  
 gcgtccctgc aggtgctgtc ggccgggaac acggacaaga tgccggagga cctgagtcca 1140  
 aaacacatag atcgggaaaa tgtcctcaga aatgaatcac caacgcaacc tttaaagtcg 1200  
 tcgtttcgtc ctcttcata cagtcccaga aaccagcagg aatcaacaca gagggtcctc 1260  
 acagcgtgt cctccgcttg a 1281

<210> 2  
 <211> 68



<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Irx1a target sequence	
<400>	2	
	tccccagct gggctaccg cagtatttaa gtgcctcca cgcggtgtac ggaggcgacc	60
	gaccggga	68
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Left binding site of TALEN targeting exon 1 of Irx1a	
<400>	3	
	tccccagct gggctaccg	20
<210>	4	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Right binding site of TALEN targeting exon 1 of Irx1a	
<400>	4	
	cggaggcgac cgaccggga	19
<210>	5	
<211>	1338	
<212>	DNA	
<213>	Danio rerio	
<400>	5	
	atgtcgttcc cccaactggg ttaccacag ttctaaacg cctccaaga ggtgtacgga	60
	gcggagcgca cgggtgtaat gccgtcctct ccacgcgagg gaagctcgga caacagcgca	120
	aatcccgca ctgcagcggc tgctatcacg ccgatgctcg gcatgtatgc gaatccgtgg	180
	accgtgcaaa attatagcgc cttcttacct tacaacagtg ccgagctggc cctgctctct	240
	cagatggggc cgcagtatga gctgaaggat aacccgggg ctcctcctcc aggatttgca	300
	gtgcacgctg cgcccggttt ttatccatac ggccagtatc agtacggtga tccggcccg	360
	gccaagagcg ctaccagaga aaccaccagc aactgaaag catggttgca ggaacacaaa	420

aagaacccgt atccaccaaa aggtgagaag atcatgctgg ccatcatcac gaagatgacc	480
cttacgcagg tgtccacctg gttcgccaac gcgcgccgga gactcaaaaa ggagaataaa	540
gtgacctgtt gtcgcagtgc cgaggacaga gacgggcgaa ttttcgacag cgacaacgag	600
gatgatgcgg acaaaaatga cgacgaggaa gaaatcgatc tggagacat cgatatggac	660
aaagcggagg agcccagagt ggaccagaac aaggaagcag cgaataaccc gcacgcgatt	720
gaaaacattg aaacaccgcg gatattatct tccccagcac ttaaaaacac ggacagtcct	780
atgtcagatg gtaatagaga acagaatgtg gtcaaaagcg ttggtgaggt gtctcctggt	840
ggagcagtgt gtcaaaagcc tggaaacagc aaacccaaaa tctggtcttt ggcggagacg	900
gcaacaagtc ctgataatac gcagaaactc agtatcccg tgcacgcctgc aggcctcagg	960
gcctcacctt caaccatcc tgcctttctc tccacaaacg gaatttatac ttgccagatt	1020
gggaaactac acaattgggc gagcgccgct ttccttagtg ctaattctct gatgggtgtg	1080
cgctcacttt tgagtcaaaa cagtaacttt ccaaaccaca gtcccgttac taaccccgaa	1140
aagaaacctt cgtctgcctc tggatctcca tgtcttgaca gcgacaactc atccgacagt	1200
ttcagtccea aacataatga tcaagagaac gttcagagaa ttgaatctcc aacacttgea	1260
tcaagatcac cgtttccagt catccatgac aggtctcatc atgaaacatc acaacgcgct	1320
ttgaagacaa tttcttga	1338
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Irx1b target sequence	
<400> 6	
ccaagagcgc taccagagaa a	21