



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월13일

(11) 등록번호 10-2178751

(24) 등록일자 2020년11월09일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0276 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0070514</p> <p>(22) 출원일자 2019년06월14일
심사청구일자 2019년06월14일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Genetics., 189:665-673(2011.10.)*
Nat Genet., 30(4):401-405(2002.4.)*
CN105624796 A
JP2010207097 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자
김철훈
경기도 성남시 분당구 내정로 151-1
복진웅
경기도 부천시 평천로 616, 2116동 0503호(상동, 다정한마을 삼성래미안아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인충현</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

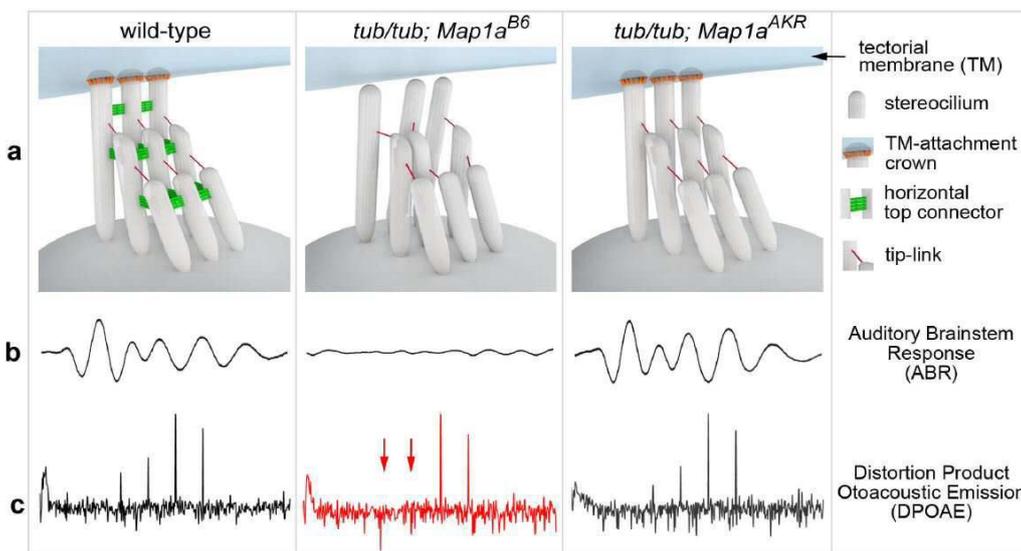
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 신규한 부분적 청각 손상 동물 모델 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 부분적 청각 손상 포유류 동물모델, 구체적으로는 외유모세포에서 부동섬모의 팁-링크(tip link) 및 달개막-부착 크라운(TM-attachment crown)은 존재하고, 수평상단커넥터(horizontal top connector)만이 선택적으로 소실된 포유류 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 특유의 표현형을 가져 소음성 난청 및 노인성 난청과 같이 소음자극에 대한 복원력이 소실된 다양한 난청질환에 대해 높은 재연성을 가지는 우수한 동물모델로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도14



(52) CPC특허분류

A01K 2217/075 (2013.01)
 A01K 2227/105 (2013.01)
 A01K 2267/03 (2013.01)
 C12N 2015/8527 (2013.01)

마지현

서울특별시 서대문구 연세로7길 42(창천동)

민혜현

경기도 수원시 영통구 동탄원천로881번길 35, 502동 303호(매탄동, 주공그린빌)

(72) 발명자

한용수

서울특별시 성북구 아리랑로5길 85, 107동 701호(돈암동, 돈암동더샵아파트)

신정오

서울특별시 마포구 신수로 15, 105동 302호(현석동, 강변힐스테이트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109899
과제번호	2019R1A2C3002354
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	PCDH19 돌연변이에 의한 뇌질환 프로세스 규명
기여율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711064723
과제번호	2016M3C7A1913844
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발사업
연구과제명	뇌미세순환 장애 조기진단 및 극복기술개발
기여율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2016.07.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711021913
과제번호	2014M3A9D5A01073865
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	국가마우스표현형분석사업
연구과제명	청각기2차 표현형 분석기반 구축 및 서비스 제공
기여율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.02 ~ 2023.11.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110514
과제번호	2017R1A2B3009133
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	청각 감각기관 형성과 퇴화 기전 규명 및 제어 연구
기여율	25/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2017.03.02 ~ 2022.02.08

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 유전자 서열을 발현하는, 외유모세포에서 부동섬모의 팁-링크(tip link) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)은 존재하고, 수평상단커넥터(horizontal top connector)는 소실된 부분적 청각 손상 포유류 동물모델:

(i) tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이를 포함하는 *tubby* 유전자 서열; 및

(ii) 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 *tubby* 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이를 포함하는 *tubby* 유전자 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 동물모델.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 GCTCCA 반복서열은 GCTCCA가 10회 반복되는 서열인 것을 특징으로 하는 동물모델.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 상기 나열된 변형 중 최소 5개 이상의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 동물모델.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 동물모델.

청구항 6

삭제

청구항 7

tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자를 가지는 포유류 동물과, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 가지는 포유류 동물을 교배하는 단계를 포함하는, 외유모세포에서 부동섬모의 팁-링크(tip link) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)은 존재하고, 수평상단커넥터(horizontal top connector)는 소실된 부분적 청각 손상 포유류 동물모델의 제조방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 GCTCCA 반복서열은 GCTCCA가 10회 반복되는 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 상기 나열된 변형 중 최소 5개 이상의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

다음 중 어느 하나의 단계를 포함하는, 외유모세포에서 부동섬모의 팁-링크(tip link) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)은 존재하고, 수평상단커넥터(horizontal top connector)는 소실된 부분적 청각 손상 포유류 동물모델의 제조방법:

tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자를 가지는 포유류 동물에서 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900 번째 염기와 6901 번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 발현시키는 단계;

서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900 번째 염기와 6901 번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 발현하는 포유류 동물에서 tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자 서열을 발현시키는 단계; 또는

야생형 포유류 동물에서 tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자 서열 및 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900 번째 염기와 6901 번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 발현시키는 단계.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 tubby 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 GCTCCA 반복서열은 GCTCCA가 10회 반복되는 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 상기 나열된 변형 중 최소 5개 이상의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부분적 청각 손상 동물 모델, 구체적으로는 외유모세포에서 수평상단커넥터(horizontal top connector)만이 선택적으로 제거되어 청력이 완전히 상실되지는 않으나 소음에 노출된 이후의 청력의 회복 정도가 야생형 동물에 비해 떨어지는 동물 모델 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 1977년 발견된 자발적 돌연변이인 *tubby* 마우스는 비만, 망막변성 및 청력 상실¹⁻³을 나타낸다. *tubby*는 전사인자⁴, GPCR 신호 매개체⁵, 시냅스후 조절인자⁶를 포함하는 몇몇 기능을 가진다고 제안되어 왔다. 그러나, 이 중 어느 것도 *tubby* 마우스의 기저 감각 및 대사 결함의 메커니즘을 명확하게 설명하지 못한다. 본 발명자들은 어떻게 *tubby* 돌연변이가 청력 상실을 유발하는지에 관하여 직접적인 인 *비보* 증거를 제시한다. 본 발명자들은 *tubby* 마우스 외유모세포에서 2개의 부동섬모 링크, 즉 수평상단커넥터(horizontal top connector) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)이 소실되었음을 발견하였다. 이 소실은 변조이음향방사(DPOAE) 생성 불능을 수반한다. 이 표현형들은 인간난청 DFNB16에 대한 마우스 모델인 *스테레오실린(Strc)* 녹아웃 마우스의 표현형과 유사하다. 또한 본 발명자들은 양측 부동섬모 링크^{7,8}에 존재하며 없어서는 안되는 스테레오실린이 *tubby* 마우스 외유모세포의 부동섬모에서 사라졌음을 관찰했다. 면역형광 분석 결과 뜻밖에도 *tubby*가 외유모세포 부동섬모의 팁(tip)에 위치함이 밝혀져, 부동섬모가 *tubby*가 작용하는 부위임을 확인하였다. 두 번째 돌연변이인 *moth1(modifier of tubby hearing 1)*^{6,9}를 추가하자 덮개막-부착 크라운 및 관련 스테레오실린이 선택적으로 복구됨으로써 *tubby* 마우스에서 청각과 DPOAE가 회복되었다.

[0004] 이런 특유의 결과로부터, 본 발명자들은 스테레오실린을 청각에서 *tubby* 기능의 증추적 매개자로, 덮개막-부착 크라운을 달팽이관 비틀림에 필요한 구조적 요건으로 정의한다. *moth1*에 의해 복구된 부동섬모들은 소음에 의한 청력 상실에 취약하며, 이는 수평상단커넥터가 부동섬모에게 청각 손상에 견뎌낼 수 있는 구조적 지지를 제공한다는 것을 보여준다.

[0005] 종합하면, 이들 데이터는 *tubby*가 외유모세포 기능에 필수적인 부동섬모 단백질이라는 것을 암시하며, 각각의 *tubby*-의존성 세포의 링크들은 외유모세포 기능 획득 및 유지에 있어서 자신의 독특한 역할들을 가지고 있다는 개념을 뒷받침한다.

[0006] *tubby* 유전자의 자발적 돌연변이가 마우스에서 비만, 망막변성, 청력 상실을 일으킨다는 것이 40년 전에 발견되

었다. Tubby 단백질은 포스파티딜이노시톨 4,5-비스포스페이트(PIP2)-결합 부위와 DNA 결합 도메인^{10,11} 추정 부위를 포함하는 보존적 C-말단 tubby 부위를 가지고 있다. Tubby 마우스는 *tubby* 유전자에서 기능상실 돌연변이를 가지고 있는데, 이는 스플라이싱 도너 부위(splicing donor site)에서 자발적인 G에서 T로의 변환이 일어나 *tubby* 단백질 C-말단의 44개 아미노산들이 24개의 인트론-인코딩된 아미노산으로 대체되는 결과를 가져온다¹⁻³. 그러나 *tubby*의 기능상실이 이런 표현형들을 만드는 메커니즘은 아직 불확실하다^{10,11}. Tubby가 가지는 것으로 제안된 기능에는 전사인자⁴, GPCR 신호⁵, 시냅스후 신호⁶, 포식작용¹², 인슐린 신호¹³, 엔도사이토시스¹⁴ 및 섬모 수송이 있으나^{15,16}, 이들 중 어느 것도 *tubby* 표현형의 발생기전을 충분히 설명하지 못한다. 특히, *tubby* 마우스에서 청각유모세포들의 퇴행되기 수개월 전에 이미 명확한 난청 증상이 나타난다¹⁷⁻¹⁹.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Verpy, E. et al. Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J Comp Neurol* 519, 194-210, doi:10.1002/cne.22509 (2011).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 내이(inner ear)의 다양한 소기관들의 기능 및 형태학적 변화가 청력에 미치는 영향을 연구하고, 다양한 난청 질환의 치료제 후보물질을 탐색하거나 평가하는 도구로 사용될 수 있는 효율적인 동물모델을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 포유류 동물에 *tubby* 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 *tubby* 유전자와, *Map1a*-B6 유전자를 기준으로 상기 나열된 변형 중의 하나 이상의 변형을 포함하는 유전자를 동시에 발현시킬 경우, 청력을 완전히 상실하지는 않으나 완전히 회복되지도 않은 부분적 청각 손상 포유류 동물 모델을 획득할 수 있다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 부분적 청각 손상 포유류 동물모델을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 부분적 청각 손상 포유류 동물모델의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 유전자 서열을 포함하는 부분적 청각 손상 포유류 동물모델을 제공한다:

[0017] (i) *tubby* 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이를 포함하는 *tubby* 유전자 서열; 및

[0018] (ii) 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열.

[0019] 본 발명자들은 내이(inner ear)의 다양한 소기관들의 기능 및 형태학적 변화가 청력에 미치는 영향을 연구하고, 다양한 난청 질환의 치료제 후보물질을 탐색하거나 평가하는 도구로 사용될 수 있는 효율적인 동물모델을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 포유류 동물에 *tubby* 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 *tubby* 유전자와, *Map1a*-B6 유전자를 기준으로 상기 나열된 변형 중의 하나 이상의 변형을 포함하는 유전자를 동시에 발현시킬 경우, 청력을 완전히 상실하지는 않으나 완전히 회복되지도 않은 부분적 청각 손상 포유류 동물 모델을 획득할 수 있다는 사실을 발견하였다.

- [0020] 본 명세서에서 용어 “부분적 청각손실”은 *tubby* 유전자의 기능상실 돌연변이를 가지는 포유동물(예를 들어 *tubby* 마우스)이 나타내는 완전한 청력 상실에 비해 개선된 청각 반응을 보이지만, 소음 외상(noise trauma)에 노출된 이후의 청력의 회복 정도가 야생형 동물에 비해 떨어지는 상태를 의미한다.
- [0021] 본 발명에 따르면, 본 발명의 동물모델은 평소에 ABR(청성뇌간반응) 역치와 DPOAE 진폭이 야생형과 유사한 수준을 보이면서도, 일정 수준의 소음에 노출된 후의 ABR 역치 증가와 DPOAE 진폭 감소가 야생형과 달리 회복되지 못했다. 이러한 특유의 표현형은 소음성 난청 및 노인성 난청과 같이 소음자극에 대한 복원력이 소실된 다양한 난청질환에 대한 높은 재연성을 가지는 우수한 동물모델로 이용될 수 있다. 따라서, 본 명세서의 용어 “부분적 청각손실”은 “불완전 청각회복”과 동일한 의미를 가진다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “뉴클레오타이드”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0023] 본 명세서에서 용어 “포유류 동물”은 포유류에 속하는 인간 이외의 동물을 의미하며, 예를 들어 마우스, 랫트, 기니피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 상기 포유류 동물은 마우스, 랫트 또는 기니피그이며, 가장 구체적으로는 마우스이다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “기능이상”은 유전자의 뉴클레오타이드 서열 변이가 아미노산 서열의 변화를 가져와 해당 유전자가 코딩하는 단백질이 야생형에서 보이는 분자적 기능이 저하되거나 상실된 것을 의미하며, 예를 들어 아미노산 서열 변화로 인한 단백질의 3차원 구조 이상, 종결 코돈(stop codon)의 생성, 리딩-프레임쉬프트(Reading-Frame Shift)를 포함한다. 따라서, 용어 “기능이상(abnormal function)”은 “기능상실(loss-of-function)”을 포함하는 의미이다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 *tubby* 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이를 포함하는 *tubby* 유전자 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드는 기능상실 돌연변이를 가지는 *tubby* 유전자 서열(Chr 7, NC_000073.6, 1090,10,880-109,034,459)의 일부로서 109,029,706 내지 109,029,746 번째까지의 연속된 41개 염기에 해당하는 뉴클레오타이드 서열이다. 상기 뉴클레오타이드는 야생형 유전자에 비해 스플라이싱 도너 부위(splicing donor site)에서 G에서 T로의 변환이 일어나(Chr7 109,029,726 번째 염기로서 서열목록 제1서열의 21번째 염기에 해당) *tubby* 단백질 C-말단의 44개 아미노산들이 24개의 인트론-인코딩된 아미노산으로 대체된다. 이러한 유전자 변이를 가지는 *tubby* 마우스는 1977년 발견된 자발적 돌연변이로서, 비만, 망막변성 및 청력 상실의 표현형을 보인다. 본 발명자들은 이전의 연구에서 *tubby* 마우스 외유모세포에서 2개의 부동섬모 링크, 즉 수평상단커넥터(horizontal top connector) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)이 소실되었음을 발견한 바 있다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 GCTCCA 반복서열은 GCTCCA가 10회 반복된다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 변형된 *Map1a* 유전자 서열은 상기 나열된 변형 중 최소 5개 이상의 변형을 포함한다.
- [0029] 보다 구체적으로는, 상기 *Map1a* 유전자 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0030] 본 발명에 따르면, 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드는 상기 나열된 11가지 변이를 모두 포함하면서, 아울러 삽입되는 GCTCCA 반복서열은 GCTCCA가 10회 반복되는 뉴클레오타이드 서열이다. 구체적으로, 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드는 AKR 동물주(strain)의 *Map1a* 유전자(*Map1a^{AKR}*) 서열이다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 부분적 청각 손상 포유류 동물은 외유모세포에서 부동섬모의 팁-링크(tip link) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)은 존재하고, 수평상단커넥터(horizontal top connector)는 소실되어 있다. 즉, 본 발명의 동물 모델은 내이(inner ear)의 외유모세포 내 수평상단커넥터만이 선택적으로 소실된 특유의 구조를 재연함으로써, 이를 이용하여 수평상단커넥터의 역할, 이것이 부동섬모의 정렬 및 청각 반응에 미치는 영향을 심도 있게 연구할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *tubby* 단백질의 기능 이상을 유발하는 돌연변이 유전자를 가지는 포유

류 동물과, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 가지는 포유류 동물을 교배하는 단계를 포함하는 부분적 청각 손상 포유류 동물모델의 제조방법을 제공한다.

- [0033] 본 발명의 *tubby* 단백질 기능이상을 유발 돌연변이 유전자와 변형된 *Map1a* 유전자 서열에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “교배”는 특정 유전자형의 동물을 수득하기 위해 상이한 유전적 배경을 가지는 생물의 암수를 인위적으로 수정시키는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 중 어느 하나의 단계를 포함하는 부분적 청각 손상 포유류 동물모델의 제조방법을 제공한다:
- [0036] *tubby* 단백질의 기능이상을 유발하는 돌연변이 유전자를 가지는 포유류 동물에서 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 발현시키는 단계;
- [0037] 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 발현하는 포유류 동물에서 *tubby* 단백질의 기능이상을 유발하는 돌연변이 유전자 서열을 발현시키는 단계; 또는
- [0038] 야생형 포유류 동물에서 *tubby* 단백질의 기능이상을 유발하는 돌연변이 유전자 서열 및 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열에서 A2020G, C2795T, G2890T, C4093G, T4301C, G4771A, G5772C, C5854T, G5971C, C5994A 및 6900번째 염기와 6901번째 염기 사이의 GCTCCA 반복서열의 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 *Map1a* 유전자 서열을 발현시키는 단계.
- [0039] 본 발명의 *tubby* 단백질 기능이상을 유발 돌연변이 유전자와 변형된 *Map1a* 유전자 서열에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0040] 본 발명에 따르면, 본 발명의 부분적 청각 손상 포유류 동물모델은 *tubby* 돌연변이 동물과 *Map1a*^{AKR} 유전자를 가지는 동물의 교배를 통해서 뿐 아니라, (i) *tubby* 마우스에서 *Map1a*^{AKR} 유전자를 발현시키거나; (ii) AKR 마우스주(strain)에서 *tubby* 돌연변이 유전자를 발현시키거나, 또는 (iii) *tubby* 돌연변이 유전자와 *Map1a*^{AKR} 유전자를 B6 정상 마우스주에서 공발현시킴으로써 수득할 수도 있다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 “발현시키다”는 대상체가 내인적으로 발현하지 않는 외래(exogenous) 유전자를 대상체 내에서 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “발현”은 “형질전환(transformation)”, “형질감염(transfection)” 또는 “형질도입(transduction)”과 동일한 의미이다.
- [0042] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달체(gene carrier)”는 유전자를 세포 내로 운반하는 모든 수단을 의미하며, 유전자 전달은 유전자의 세포내 침투와 동일한 의미를 가지고, 조직 수준에서 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 유전자 침투 시스템 또는 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 유전자 전달체는 도입하고자 하는 유전자를 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 구조체인 발현카세트의 형태로 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 유전자에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터, 전사종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 이용되는 유전자 전달체는 통상적인 유전자 삽입에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템이 적용될 수 있으며, 예를 들어 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아 바이러스, 리보솜 및 니오솜을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 유전자 전달체를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포로는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용될 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주, CHO(Chinese hamster ovary)세포, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 유전자 전달체를 포유동물의 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 예를 들어 미세 주입법(Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099 (1985)), 칼슘포스페이트 침전법(Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752 (1987)), 전기천공법(Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법(Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990))가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049] (a) 본 발명은 부분적 청각 손상 포유류 동물모델, 구체적으로는 외유모세포에서 부동섬모의 팁-링크(tip link) 및 덮개막-부착 크라운(TM-attachment crown)은 존재하고, 수평상단커넥터(horizontal top connector)만이 선택적으로 소실된 포유류 동물모델 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0050] (b) 본 발명은 특유의 표현형을 가져 소음성 난청 및 노인성 난청과 같이 소음자극에 대한 복원력이 소실된 다양한 난청질환에 대한 높은 재연성을 가지는 우수한 동물모델로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 외유모세포(OHC) 결손으로 인한 *Tubby* 마우스의 청력상실을 보여주는 그림이다. 도 1a는 3주령 *+/+* 및 *tub/tub* 마우스들에서 ABR(청성뇌간반응) 역치 및 변조이음향방사(DPOAE) 진폭값($n=5$)을 보여준다. 측정값과 에러바(error bar)는 평균±표준편차를 반영하며, n 은 생물학적으로 독립적인 실험횟수이다. 통계적 비교는 다중 비교를 위해 이원분산분석(two-way ANOVA)과, 본페로니 사후검정을 통해 수행되었다(*** 은 *+/+* 와 *tub/tub* 마우스들 사이에서 각각의 주파수별 통계적 유의성($P < 0.001$)을 가리킨다). 도 1b는 P21 *+/+* 및 *tub/tub* 마우스의 내외 유모세포의 주사전자현미경 이미지를 나타낸다. 도 1c는 P21 *+/+* 및 *tub/tub* 마우스들에서 외유모세포 부동섬모의 헬름이온 현미경(**g, h**) 및 투과전자현미경(**i, j**) 이미지, 그리고 내유모세포의 주사전자현미경 이미지(**k, l**)를 각각 나타낸다. $g\sim j$ 패널에서, 수평상단커넥터의 유무는 각각 흰색과 적색 화살표머리로 표시하고, 팁-링크(Tip-link)들은 검은 화살표로 표시하였다. 스케일바, 5 μm (**c, d**), 1 μm (**e, f, k, l**), 0.2 μm (**g-j**). 각 이미지들은 3개의 생물학적으로 독립적인 실험을 대표한다.

도 2는 스테레오실린이 외유모세포 부동섬모 팁(tip)에 위치하기 위해 *Tubby*가 필요함을 보여주는 그림이다. 도 2a의 **a, b**는 P21 *+/+*(**a**)와 *tub/tub*(**b**) 마우스에서 *tubby* 항체(녹색)와 팔로이딘(적색)으로 표시된 코르티 기관의 면역형광이미지들이다. 도 2a의 **c-e**는 P5(**c**), P9(**d**), P21(**e**)에서의 외유모세포 부동섬모에서 *tubby* 위치를 나타낸다. 도 2a의 **f-h**는 내유모세포(**f**)와 크리스타(crista)의 유모세포(**g**), 구형낭(**h**)에서 *tubby*가 면역 반응을 보이지 않음을 나타낸다. **f**의 내유모세포 이미지는 올바른 방향을 나타내기 위해 **a** 이미지로부터 확대 후 180도 회전시켰다. 도 2b의 **i, j**는 P21 *+/+*(**i**) 와 *tub/tub*(**j**) 마우스에서 스테레오실린 항체(녹색)와 팔로이딘(적색)으로 표시된 코르티 기관의 면역형광 이미지를 보여준다. 도 2b의 **k-p**는 P5(**k,n**), P9(**l,o**), P21(**m,p**)의 *+/+* (**k-m**)와 *tub/tub* (**n-p**) 마우스에서의 외유모세포 부동섬모에서 *tubby* 위치를 나타낸다. 흰색 화살표는 가장 긴 부동섬모를, 흰색과 푸른 화살표머리들은 각각 부동섬모의 2열과 3열을 가리킨다. 노란 화살표는 운동섬모(**k,n**)를 가리킨다. 가장 긴 부동섬모에서 스테레오실린의 부재를 적색 화살표로 표시하였다(**o,p**). 도 2c의 **q-u**는 P5(**q-s**)와 P9(**t,u**)의 *+/+* (**q,r,t**) 및 *tub/tub* (**s,u**) 마우스의 코르티 기관에서 *Strc* mRNA 발현부위를 보여주는 인 시투 혼성화 이미지들이다. 각 이미지들은 3개의 생물학적으로 독립적인 실험을 대표한다. 도 2d는 P0($n=4$), P8($n=5$)의 *+/+* 및 *tub/tub* 마우스에서 *Strc* mRNA의 상대적 발현량을 보여주는 정량적 실시간 PCR 분석결과를 보여주는 그림이다. 개개의 점들은 각각의 데이터값을, 수평선들은 평균±표준편차를 나타낸다. n 은 생물학적으로 독립적인 실험횟수이다. 통계적 유의성은 양측 꼬리 스튜던트 t -검정을 통해 결정하였다($n.s.$: 유의성 없음, $P>0.05$). OHC, 외유모세포; IHC, 내유모세포; SL, 나선연(spiral limbus); SGNs, 나선 신경절 신경세포(spiral ganglion neurons); OoC, 코르티 기관. 스케일바, 5 μm (**a, b, g-j**), 1 μm

m(c-f, k-p), 100 μm (q), 20 μm(r-u).

도 3은 덮개막-부착 크라운의 선택적인 복구로 인해 *tub/tub;Map1a^{AKR}* 마우스의 청력이 회복됨을 보여주는 그림이다. 도 3a는 C57BL/6 주의 *tub/tub* 마우스를 *Map1a* 대립형질(*Map1a^{AKR}*)을 가진 AKR 주와 교배시킨 자손에서 청력이 회복됨을 보여주는 모식도이다. *+/+; Map1a^{B6}* 와 *+/+; Map1a^{AKR}* 마우스는 모두 정상 청력을 보여, 이들 유전형을 “야생형”으로 하였다. 도 3b는 3주령 야생형(n=32), *tub/tub; Map1a^{B6}* (n=12) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* (n=18) 마우스의 ABR 역치(b)와 DPOAE 진폭값(c)을 각각 나타낸다. 측정값과 에러바는 평균±표준편차를 반영하며, n은 생물학적으로 독립적인 실험횟수이다. 통계적 비교는 다중비교를 위한 본페로니 사후검정을 이용한 이원분산분석(two-way ANOVA)으로 수행하였다(**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, n.s.: 유의성 없음(*P*>0.05)). 흑색 및 적색 표시는 각각 야생형과 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스 간, *tub/tub; Map1a^{B6}*과 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스 간 각 주파수별 통계적 유의성을 가리킨다. 도 3c는 1차 신호 *f1*과 *f2*, 그리고 *2f1-f2* 와 *3f1-2f2* 주파수에서의 DPOAE를 보여주는 바깥귀길(ear canal) 신호의 대표적인 주파수 스펙트럼을 나타낸다. 도 3d의 e, f, k, l, q, r은 3주령 야생형, *tub/tub; Map1a^{B6}* 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스에서 외유모세포 부동섬모의 주사전자현미경 이미지들이다. 덮개막-부착 크라운의 유무는 각각 흰색 및 적색 화살표로 표시되어 있다. 수평상단커넥터의 유무는 각각 흰색, 적색 화살표머리로 표시되어 있다. 도 3d의 g, m, s는 야생형(g), *tub/tub; Map1a^{B6}* 마우스(m) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* (s) 마우스에서 덮개막 하면에 눌린 자국을 보여주는 주사전자현미경 이미지들이다. 도 3d의 h, n, t는 P21에 스테레오실린 항체(녹색)와 팔로이딘(적색)으로 표지된 외유모세포 부동섬모의 면역형광 이미지들이다. 가장 긴 부동섬모에서 스테레오실린 유무가 각각 흰색, 적색화살표로 표시되었다. 가장 낮은 부동섬모열에서 스테레오실린의 유무는 각각 흰색, 적색 화살표머리로 표시되었다. 도 3d의 i, j, o, p, u, v는 외유모세포 부동섬모(i, o, u)와 TM의 눌린 자국(j, p, v)에서 스테레오실린 위치를 보여주는 면역금 주사전자현미경 이미지이다. 스케일바, 0.2 μm(e-f, k-l, q-r, i-j, o-p, u-v) 및 1 μm(g-h, m-n, s-t). 각 이미지들은 3개의 생물학적으로 독립적인 실험들을 대표한다.

도 4는 수평상단커넥터가 청각적 외상으로부터 청력을 회복하는 데에 중요한 요소임을 보여주는 그림이다. 도 4a의 a는 야생형(n=6), *tub/tub; Map1a^{B6}* 마우스(n=6), 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* (n=6)에서 2시간 동안 105 dB SPL의 소음에 노출되기 전, 2시간 후, 14일 후 클릭자극에 대한 ABR 역치를 나타낸다. 도 4a의 b는 야생형(n=6), *tub/tub; Map1a^{B6}* 마우스(n=6) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* (n=6)에서 2시간동안 105 dB SPL의 소음에 노출되기 전, 2시간 후, 14일 후 *2f1-f2* 주파수에서의 DPOAE 진폭값이다. ABR과 DPOAE 데이터는 상호배치(interleaved) 산포도 그래프로 나타내었으며, 각각의 점들은 각 데이터값을, 수평선들은 평균 ± 표준편차를 나타낸다. n은 생물학적으로 독립적인 실험횟수이다. 통계적 비교는 다중비교를 위한 본페로니 사후검정을 이용한 이원분산분석(two-way ANOVA)으로 수행하였다(****P* < 0.001, n.s.: 유의성 없음 (*P* > 0.05)). 도 4b의 c, d, g, h, k, l은 소음노출 7일 뒤 외유모세포 부동섬모의 주사전자현미경 이미지들이다. 덮개막-부착 크라운의 존재 유무는 각각 흰색과 적색 화살표로 표시되었다. 도 4b의 e, f, i, j, m, n은 소음노출 7일 뒤 덮개막 하면에 각인된 눌린 자국들의 주사 전자현미경 이미지들이다. 뚜렷한 자국과 덜 뚜렷한 자국들을 각각 흰색과 적색 화살표로 표시하였다. 스케일바, 0.2 μm (c, d, g, h, k, l) 및 2 μm(e, f, i, j, m, n). 이미지들은 3개의 생물학적으로 독립적인 실험들을 대표한다.

도 5는 *tub/tub* 마우스 외유모세포 부동섬모가 P16에 명백히 결실되는 것을 보여주는 그림으로, P5(a,b)와 P16(c-f)의 *+/+* (a,c,e)와 *tub/tub*(b,d,f) 마우스에서 외유모세포의 주사전자현미경 이미지들 나타낸다. 수평상단커넥터의 존재 유무는 각각 흰색과 적색 화살표머리로 표시하였다. 스케일바, 1 μm(a-d) 및 0.5 μm(e-f).

도 6은 *tub/tub* 마우스와 *+/+* 마우스 간 코르티 기관의 전체적인 구조가 유사함으로 보여주는 그림으로, 툴루딘 블루로 염색한 P21 *+/+*와 *tub/tub* 마우스 코르티 기관의 절단면을 나타낸다. LZ, limbal zone); MB, marginal band; HS, Hensen's stripe; KM, 기무라 막; OHC, 외유모세포. 스케일바, 20 μm.

도 7은 부동섬모 팀에 Tubby가 위치하는 것이 PIP₂에 의존적임을 보여주는 그림으로, DMSO(a) 및 페닐알라신 옥사이드(b)를 처리한 야생형 전체 와우이식편에서 분리된 코르티 기관의 면역형광 이미지들이며 tubby 항체(녹색)와 팔로이딘(적색)으로 표지하였다. 스케일바, 2 μm.

도 8은 신생아 마우스의 와우(cochlear) 발달 단계에서 tubby와 스테레오실린 발현의 비교한 그림으로, P5(a-

f), P7(g-1), P9(m-r)의 같은 동물에서 절개한 좌우 와우 각각에서 tubby(녹색) 또는 스테레오실린(녹색)에 대한 면역형광과 액틴(적색)의 팔로이딘 염색을 수행한 결과를 보여준다. 모든 패널의 스케일바, 5 μ m

도 9는 스테레오실린이 전정유모세포의 운동섬모(kinocilia)에 위치하는 것은 *tub/tub* 마우스에서 영향을 받지 않음을 보여주는 그림이다. +/(a,c,e)와 *tub/tub*(b,d,f) 마우스에서 스테레오실린 항체(녹색), 아세틸화 튜블린 항체(푸른색), 팔로이딘(적색)으로 표지된 크리스타(crista)(a,b), 난형낭(c,d), 구형낭(e,f)의 면역형광 이미지를 각각 보여준다.

도 10은 *tub/tub* 마우스에서 외유모세포에서의 프레스틴(Prestin) 발현은 변화하지 않음을 보여주는 그림으로, +/(a,b)와 *tub/tub*(c,d) 마우스에서 프레스틴 항체(적색), 팔로이딘(녹색), DAPI(푸른색)로 표지된 외유모세포의 면역형광 이미지를 보여준다.

도 11은 P15에서 ABR과 DPOAE 측정된 결과를 보여주는 그림이다. P15의 야생형, *tub/tub; Map1a^{B6}* 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스의 ABR 역치(도 11a의 a)와 2f₁-f₂ DPOAE 레벨(도 11b의 b)이다. P15에서의 f₂=12kHz(도 11b의 c) 및 f₂=24 kHz(도 11b의 d)에서 2f₁-f₂ DPOAE 레벨의 DPOAE 입력/출력 함수를 나타낸다. 야생형(n=6), *tub/tub; Map1a^{B6}*(n=7) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}*(n=6) 마우스 간 ABR 진폭값과 DPOAE 값의 통계적 비교는 다중비교를 위한 본페로니 사후검정을 이용한 이원분산분석(two-way ANOVA)으로 수행하였다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n.s.: 유의성 없음, 적색 표시는 *tub/tub; Map1a^{B6}* 과 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스 간 통계적 유의성을 나타내며, 흑색 표시는 야생형과 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스 간의 통계적 유의성을 나타낸다)

도 12는 스테레오실린의 위치가 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스에서 가장 긴 열의 부동섬모에서만 회복됨을 보여주는 그림으로, 야생형(a-c), *tub/tub; Map1a^{B6}* (d-f) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스(g-i)에서 스테레오실린 항체(녹색)과 팔로이딘(적색)으로 표지된 외유모세포 부동섬모의 면역형광 이미지를 나타낸다. 모든 패널의 스케일바, 5 μ m

도 13은 소음 노출 후의 ABR 역치와 DPOAE 레벨을 나타내는 그림이다. 도 13a는 5주령 야생형(n=6), *tub/tub; Map1a^{B6}* (n=6) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* (n=6) 마우스에서 2시간 동안 105 db SPL의 소음에 노출되기 전, 2시간 후, 14일 후의 6, 12, 18, 24, 30 kHz 주파수별 광대역클릭과 순음 신호에 대한 ABR 역치를 보여준다. 도 13b는 5주령 야생형(n=6), *tub/tub; Map1a^{B6}* (n=6) 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* (n=6) 마우스에서 2시간 동안 105 db SPL의 소음에 노출되기 전, 2시간 후, 14일 후의 2f₁-f₂에서 DPOAE 레벨을 각각 나타낸다. 통계적 비교는 다중비교를 위한 본페로니 사후검정을 이용한 이원분산분석(two-way ANOVA)으로 수행하였다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n.s.: 유의성 없음, 적색 표시는 *tub/tub; Map1a^{B6}* 와 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스 간의 통계적 유의성을, 흑색 표시는 야생형과 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스 간의 통계적 유의성을 각각 나타낸다.)

도 14는 야생형, *tub/tub; Map1a^{B6}* 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스의 외유모세포에서 유전형-표현형 특성에 대한 모식도이다. 각 유전형에서 부동섬모 구조(a), 각 유전형에서 청성뇌간반응(ABR) 존재 유무를 설명하는 대표적인 ABR 파형(b) 및 각 유전형에서 DPOAE 피크(c)를 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055] 실시예

[0056] 실험방법

[0057] 마우스

[0058] C57BL/6J 배경(B6(AU)-Tub^{tub}/J)의 *Tubby* 마우스는 Jackson Laboratory(Cat. # 000562; Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. 동계 교배한 야생형 AKR/N 마우스는 Japan SLC, Inc(Cat. # SLC-M-0248; Shizuoka, Japan)

에서 구입하였다. *tubby* 마우스의 유전형은 *tubby* 돌연변이를 포함하는 유전자 부위의 PCR 증폭 및 뒤이은 생어(Sanger) 시퀀싱으로 결정하였다. 본 명세서에서, *Tub*^{+/+} 대립형질은 +/+로, *Tub*^{tub/tub} 대립형질은 *tub/tub*로 표시하였다. C57BL/6 배경의 *Tubby* 마우스(*tub/tub*)를 야생형(+/+) AKR 마우스와 교배하여 AKR 주(*Map1a*^{AKR}) 및 C57BL/6 주 (*Map1a*^{B6})로부터 받은 *Map1a* 대립형질을 가지는 *tub/+; Map1a*^{AKR/B6} 마우스를 수득하였다. 이들 마우스를 서로 교배하여 야생형(+/+; *Map1a*^{B6/B6}, +/+; *Map1a*^{AKR/B6} 또는 +/+; *Map1a*^{AKR/AKR}), *tub/tub; Map1a*^{B6} (*tub/tub; Map1a*^{B6/B6}) 및 *tub/tub; Map1a*^{AKR} (*tub/tub; Map1a*^{AKR/B6} 또는 *tub/tub; Map1a*^{AKR/AKR}) 마우스를 수득하였다. *Map1a*^{B6} 또는 *Map1a*^{AKR} 대립형질의 존재는 *Map1a* 유전자에서 Ala-Pro 반복부위를 포함하는 C-말단을 인코딩하는 부위를 PCR-증폭함으로써 조사하였다. 이를 통해 동물주에 따라 상이한 길이의 절편이 얻어진다⁶. 지노타이핑에 사용된 모든 프라이머는 표 1에 표시하였다. 마우스는 12시간/12시간 명/암 사이클이 유지되고 온도와 습도가 조절된 무균 환경에서 자랐다. 모든 동물실험은 연세대학교 의과대학 동물실험윤리위원회의 승인(No. 2015-0021 및 2017-0281)을 받았으며 NIH 가이드라인을 준수하였다.

표 1

지노타이핑 및 정량적 실시간 PCR에 사용된 프라이머

용도	프라이머	서열 (5 '→3')
지노타이핑	<i>Tub</i> -forward	tccctaaagaagcctcat t cctgg
	<i>Tub</i> -reverse	gggtattccaagccccaga
	<i>Tub</i> -sequencing	acacccaccaggaacatga
	<i>Map1a</i> -forward	ctctgagccccagccccttta
	<i>Map1a</i> -reverse	aaggctggtttctcctgggc
정량적 실시간 PCR	<i>Strc</i> -forward	tgctccttctcctgtcgctc
	<i>Strc</i> -reverse	gagcttggtccagagtggct
	<i>Actb</i> -forward	gaccagatcatgtttgagacc
	<i>Actb</i> -reverse	ggccatctcttgctcgaagtc

[0061] 항체

[0062] 랫트 *tubby* 단백질의 1-189 아미노산을 포함하는 His-태그된 융합 단백질을 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현시킨 뒤, 정제한 후 래빗에 주사하여 *tubby* 단백질에 대한 다클론 항체를 생성하였다. 스테레오실린 항체는 종래에 보고된 방법⁷대로 마우스 스테레오실린 단백질의 970-985 아미노산에 해당하는 합성 펩타이드인 CFLSPEELQSLVPLSD를 래빗에 주사하여 생성하였다. 생성된 *tubby* 및 스테레오실린 항체는 친화도 정제과정을 거친 후 *tubby* 마우스와 스테레오실린 마우스에서 각각 웨스턴 블롯 및 면역염색을 이용하여 항원 특이성을 검증하였다. 프레스틴(*prest*) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA; sc-22692)에서 구입하였으며 아세틸화된 튜불린 항체는 Sigma(St. Louis, MO, USA; T6793)에서 구입하였다.

[0064] 면역형광 염색

[0065] 달팽이관 또는 전정의 면역형광 염색은 종래 보고된 방법을 조금 변형하여 수행하였다⁷. 마우스 내이를 신속하게 절개하고 PBS에 용해된 4% 파라포름알데하이드로 즉시 상온에서 30분 간 부드럽게 흔들면서 고정하였다. 달팽이관 또는 전정감각상피를 고정된 내이로부터 미세 절개하고 PBS에 용해된 4% 파라포름알데하이드에서 30분 간 상온에서 다시 고정하였다. 고정된 달팽이관 또는 전정 상피는 PBS에 용해된 20% 고트 혈청에서 1시간 동안 상온에서 블로킹하고 PBS에 용해된 0.5% Triton X-100으로 30분 동안 투과처리하였다. 이들 시료를 PBS에 용해된 1% BSA로 희석한 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양한 후, Alexa Fluor 488- 또는 568-접합 2차 항체(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 및 PBS에 용해된 1% BSA로 희석한 팔로이딘(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)과 함께 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 이들 시료를 세척하고 ProLong Gold 안티페이드 시약(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)과 함께 슬라이드 글래스에 마운팅한 뒤 에어리 스캔(*airy-scan*) 검출기가 장착된 LSM880 또는 LSM 780 공초점 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 이미지를 얻었다.

[0067] 실시간 PCR

- [0068] 야생형 및 *tub/tub* 마우스에서 분리한 달팽이관은 DEPC-처리 PBS에서 신속하게 절개하고, 곧바로 Trizol 시약 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)에 담긴 뒤, Precellys 24 조직 균질기(Bertin Instruments, Rockville, MD, USA)로 균질화하였다. 총 RNA를 Trizol RNA 분리 프로토콜을 이용하여 분리하였다. cDNA 합성은 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 올리고(dT) 프라이머를 가지고 수행하였다. 정량적 실시간 PCR은 SYBR® Premix Ex Taq(Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 및 ABI7500 실시간 PCR 장비 시스템(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 이용하여 수행하였다. qRT-256 PCR 프라이머의 서열은 표 1에 나열하였다.
- [0070] *페닐아르신 옥사이드 처리 분석*
- [0071] 야생형 C57BL/6J 마우스의 내이(inner ear)를 5mM HEPES를 포함하는 차가운 HBSS에서 신속하게 절개하였다. 절개된 내이를 10% FBS(fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM에서 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 희석된 500 μM 페닐아르신옥사이드(PAO; Sigma, St. Louis, MO, USA; P3075)와 함께, 또는 DMSO만 보충하여 1시간 동안 37°C에서 부드럽게 흔들면서 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 내이는 이후 PBS에 용해된 4% 파라포름알데하이드로 4°C에서 밤새 고정하였다. 달팽이관 상피를 분리하여 면역형광 분석을 위해 tubby 항체 및 팔로이딘으로 염색하였다.
- [0073] *주사전자현미경 (SEM)*
- [0074] SEM 분석을 위해 내이 시료를 종래에 보고된 방법에 따라 제작하였다²⁷. P5, P16 또는 P21 마우스로부터 내이를 절개하고, 2% 파라포름알데하이드, 0.1 M 카코딜산 나트륨 완충액(pH7.4)에 용해된 2.5% 글루타르알데히드에서 2시간 동안 상온에서 고정하였다. 고정 후, 달팽이관 상피 및 덮개막을 분리한 다음 2 mM 염화 칼슘 및 3.5% 수크로스를 함유하는 0.1M 카코딜산 나트륨 완충액(pH7.4)에 용해된 2.5% 글루타르알데히드로 4°C에서 밤새 고정하였다. 고정된 시료를 0.1 M 카코딜산 나트륨 완충액 및 2 mM 염화 칼슘으로 4°C에서 각 20분간 3회 세척하고, 시료를 오스뮴 테트라옥사이드(OsO₄)/티오카보하이드라자이드(OTOTO) 프로토콜을 이용하여 고정하였다. 표본을 순차적 에탄올로 탈수시키고, 임계점 건조기(Leica EM CPD300, Wetzlar, Germany)를 이용하여 건조한 뒤, 스텝에 붙인 다음 20-30nm 두께로 스퍼터 코팅기(ACE600; Leica Microsystems)를 이용하여 백금 코팅하였다. 백금-코팅된 표본을 스텝 홀더에 마운팅하고 Schottky 방사주사전자 현미경(JSM 7001F, JEOL, Tokyo, Japan)으로 이미지를 획득하였다.
- [0076] *투과전자현미경 (TEM) 및 광학현미경*
- [0077] 내이를 3주령 야생형 및 *tub/tub* 마우스로부터 분리하고 2.5% 글루타르알데히드 및 0.1 M 카코딜산 나트륨 완충액에 용해된 2% 파라포름알데하이드(pH7.4)로 4°C에서 밤새 고정하였다. 표본을 0.1 M 카코딜산 나트륨 완충액(pH7.4)으로 각 30분씩 3회 세척하고, 0.1 M 카코딜산 나트륨 완충액(pH7.4)에 용해된 1% 오스뮴 테트라옥사이드로 2시간 동안 고정하고 순차적 에탄올로 탈수시킨 뒤 프로펠렌 옥사이드로 침윤시켰다. 표본을 포매 몰드로 옮겨 Poly/Bed 812 키트(Polysciences, Warrington, PA, USA)를 이용하여 순수 레진에서 포매하였다. 레진을 전자현미경 오븐(TD-700, DOSAKA, Kyoto, Japan)에서 24시간 동안 60°C로 중합화하였다. TEM 이미지를 위해 표본을 Leica EM UC-7 Ultra-마이크로톰(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 80 nm 두께로 자르고 명암 대조를 위해 7% 우라닐 아세테이트 및 시트르산 납(lead citrate)으로 염색하였다. 단면은 투과 전자 현미경(JEM-1011, JEOL)을 이용하여 80kV의 가속 전압으로 이미지화하였다. 광학 현미경 관찰을 위해, 표본을 LEICA EM UC-7 Ultra-마이크로톰(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 150nm 두께로 자르고 1% 툴루이딘 블루로 염색하였다. 단면은 광학현미경(DM2500, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 이미지화하였다.
- [0079] *헬륨이온 microscopy (HIM)*
- [0080] 달팽이관을 마우스 내이로부터 분리하고 2% 파라포름알데하이드 및 0.1 M 카코딜산 나트륨 완충액에 용해된 2.5% 글루타르알데히드(pH 7.4)로 상온에서 2시간 동안 고정하였다. 코르티 기관을 분리한 뒤에, 시료를 2.5% 글루타르알데히드 및 2 mM 염화칼슘과 3.5% 수크로스를 포함하는 0.1M 카코딜산 나트륨 완충액(pH 7.4)으로 4°C에서 밤새 고정하였다. 차가운 세척-완충액으로 각 20분 간 3회 세척한 뒤, OTOTO 프로토콜을 이용하여 고정하였다. 조직을 에탄올로 탈수시키고 CPD300 임계점 건조기(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하여 건조한 후 스텝 홀더에 마운팅하였다. ORION NanoFab 헬륨이온 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 시료를 이미지화하였다.

- [0082] 면역금(Immunogold) SEM
- [0083] 달팽이관 시료를 마우스 내이로부터 분리하고 2% 파라포름알데하이드 및 1X HBSS에 용해된 0.01% 글루타르알데하이드(pH 7.4)에서 2시간 동안 상온에서 고정하였다. 고정된 시료를 10분간 상온에서 1X HBSS 완충액으로 3회 세척하였다. 시료를 1X HBSS에 용해된 10% 고트 혈청으로 40분간 블로킹하고 1차 항체와 함께 상온에서 밤새 배양하였다. 시료를 다시 1X HBSS로 10분간 5회 세척하고 2일간 4℃에서 8 nm 콜로이드성 금-접합 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, 1:10로 희석)와 함께 배양하였다. 배양 후, 시료를 1X HBSS로 20분간 3회 세척하고 OTOTO 프로토콜을 이용하여 고정하였다. 시료를 순차적 에탄올 용액을 이용하여 탈수시키고 CPD300 임계점 건조기(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)로 건조시킨 후, 20 nm의 두께로 탄소 코팅하였다. 장방출 주사 전자 현미경(MERLIN, Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 시료를 이미지화하였다.
- [0085] 인 시투 혼성화
- [0086] P5 또는 P9의 마우스로부터 내이를 절개하고 4% 파라포름알데하이드로 밤새 고정하였다. 내이 시료를 Tissue-Tek 최적절개온도(OCT) 컴파운드에서 포매하고 저온유지장치(HM 525, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 12 μm 두께로 잘랐다. Strc(+3626-+5103, NM_080459.2)에 대한 안티센스 RNA 프로브를 디곡시게닌(digoxigenin, Roche, Mannheim, Germany)으로 표지하였다. 인 시투 혼성화는 종래에 보고된 방법에 따라 수행하였다²⁸. 각 유전자 발현 패턴은 미분간섭 현미경(DM2500, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 조사하였다.
- [0088] 청성 뇌간 반응 (ABR)
- [0089] 방음 챔버에서 Tucker-Davis Technologies (TDT) RZ6 디지털 신호 프로세싱 하드웨어 및 BioSigRZ 소프트웨어 패키지(Alachua, FL, USA)를 이용하여 ABR 역치를 측정하였다. 피하주사(전극)를 마취된 마우스의 오른쪽 및 왼쪽 귀의 두정부 및 복외측에 위치시켰다. SigGenRZ 소프트웨어 패키지 및 RZ6 디지털 신호 프로세서를 이용하여 교정 클릭음 자극(calibrated click stimulus)(10 μs 지속) 또는 신호 버스트(tone burst) 자극(5 ms 지속)을 6, 12, 18, 24 및 30 kHz로 생성하고 MF1(multi-field 1) 자성 스피커(TDT)를 통해 바깥귀길(ear cana 1)로 전달하였다. 자극 강도는 10에서 90 dB SPL까지 5dB씩 증가시켰다. 청성 뇌간 반응(auditory brainstem response) 신호를 저-임피던스 Medusa Biological Amplifier System(RA4LI, TDT)에 입력하고, 신호를 RZ6 디지털 신호 프로세싱 하드웨어에 전달하였다. 기록된 신호는 0.5-1 kHz 대역 필터를 이용하여 여과하였으며, 신호 버스트에 대응한 ABR 파형에 대해 평균을 구하였다. 각 주파수의 ABR 역치는 BioSigRZ 소프트웨어 패키지를 이용하여 측정하였다.
- [0091] 변조이음향방사 (DPOAE)
- [0092] DPOAE는 복합 TDT 마이크로폰-스피커 시스템을 이용하여 측정하였다. 1차 자극 신호는 RZ6 디지털 신호 프로세서 및 SigGenRZ 소프트웨어 패키지를 이용하여 생성하였으며 이를 ER 10B+ 마이크로폰(Etymotic, Elk Grove Village, IL, USA) 및 MF1 스피커를 포함하는 커스텀 프로브를 통해 전달하였다. 1차 신호는 목표 주파수를 6, 12, 16, 18, 22 및 24 kHz로 하여 주파수 비율(f_2/f_1)을 1.2로 세팅하였다. f_2 강도 수준은 f_1 강도 수준($L_1 = 65$ dB SPL, $L_2 = 55$ dB SPL)보다 10 dB SPL 낮게 세팅하였다. 1차 신호에 대응한 소리는 커스텀 프로브 내의 ER 10B+ 마이크로폰으로 수신하고 RZ6 디지털 신호 프로세서를 이용하여 기록하였다. DPOAE에 대한 입력/출력(I/O) 함수는 1.2의 주파수 비율(f_2/f_1) 및 동일 강도 수준($L_1 = L_2$)으로 두 개의 특정 주파수(12 및 24 kHz)에서 측정하였다. 1차 신호의 강도 수준은 20에서 80 dB SPL로 증가하였다. DP 그래프에 대한 각 1차 신호 및 I/O 함수의 각 강도마다 BioSigRZ 소프트웨어 패키지를 이용한 FFT(Fast Fourier Transform)를 수행하여 2f1-f2 변조(distortion product) 및 바닥잡음(noise floor)의 평균 스펙트럼을 결정하였다.
- [0094] 소음 노출
- [0095] 마우스를 방음 챔버 안에서 8구획의 원형 와이어-메쉬 노출 케이지에 넣었다. 소리전달 확성기(JBL-2446L, JBL Professional 8500, Northridge, CA, USA)의 경적을 케이지 60cm 위에 위치시켰다. 105 dB SPL의 광대역 백색 잡음(주파수 범위: 2-20 kHz)을 2시간 동안 마우스에게 가하여 소음-유도된 청력 상실 모델을 만들었다.
- [0097] 통계적 분석
- [0098] 모든 그래프 결과들은 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 통계적 비교는 ABR 및 DPOAE의 다중 비교에 대한 분포론 교정을 적용한 이원 분산분석(ANOVA)과, Prism 8.0(GraphPad, San Diego, CA, USA)을 이용한 정량적 RT-PCR에 대한 스튜던트 t -검정(양쪽꼬리 검정)을 이용하여 수행하였다. 도면에서 통계적 유의성은 n.s., 유의성

없음($P>0.05$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 로 표시하였다.

[0100] 실험결과

[0101] 이전의 보고와 일치하여¹⁷, 우리는 3주령 *tubby* 동형접합 마우스에서 청각뇌간유발 반응(ABR) 역치가 모든 주파수에서 40-50dB 음압 레벨(SPL)만큼 증가함을 발견했다(도 1a). 이는 외유모세포 기능 상실에 따라 청력이 유의하게 저하되었음을 보여준다. 본 발명자들은 *tubby* 마우스에서 변조이음향방사(DPOAE)를 측정함으로써 이를 테스트했다. DPOAE는 외유모세포 기능의 비선형적, 활동적인 특성을 보여주는데, 이는 달팽이관이 높은 민감도와 정확도를 가지고 소리를 감지하는 데에 필수적이다²⁰. DPOAE는 *tubby* 마우스에서 완전히 소실되어, 외유모세포 기능 이상이 청력 상실의 주요 원인임을 알 수 있었다.

[0102] 이 가설과 일치하여, 출생 후 21일(P21)된 *tubby* 마우스의 외유모세포에서 3줄 부동섬모의 계단형성에 현저한 정렬오류가 있음을 스캐닝전자현미경(SEM)으로 확인하였다(도 1c-f). 이 부동섬모 정렬 오류는 p16에서 이미 명확히 나타났다(도 5). 고배율 SEM 이미지와 헬륨 이온 현미경(HIM) 이미지를 통해, 인접한 부동섬모 번들과 연결된 수평상단커넥터(horizontal top connector)가 상실되었음을 발견했다(도 1g, h 및 도 5의 e, f 패널). 반면, 소리 자극에 반응하여 기계전기적 전달(MET) 채널을 개방하는 데에 필수적인 팁-링크(tip-link)는 *tubby* 마우스에서 보존되어 있었다(도 1h). 투과전자현미경을 통해 *tubby* 마우스에서 수평상단커넥터는 결실되고 팁-링크는 존재함을 확인하였다(도 1i, j). 그러나, 본 발명자들은 *tubby* 마우스에서 내이 유모세포의 부동섬모 구조에 어떠한 결함이나(도 1k, l) 코르티 기관의 어떠한 구조 이상도 관찰할 수 없었다(도 1c, d 및 도 6). 이러한 결과를 통해 *tubby*가 부동섬모 구조 및 외유모세포의 기능에 필수적인 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0103] *tubby* 마우스의 청력결함 부위에 대한 이러한 발견(도 1)은 코르티 기관 내 *tubby* 단백질의 위치를 조사할 필요성을 시사한다. 그 결과, 본 발명자들은 *tubby* 특이적 다클론 항체를 이용하여 *tubby* 단백질의 세포 내 위치 및 아세포성 위치를 시각화하였다.

[0104] 외유모세포, 내유모세포, 디터(Deiter) 세포 및 외지절골세포에서 *tubby*의 면역반응성이 보고된 바 있다⁹. 그러나, 본 발명자들은 P21의 야생형 마우스에서, *tubby* 면역반응성이 외유모세포 부동섬모의 팁(tip) 부분으로 제한되고(도 2a, e), *tubby* 돌연변이 마우스에선 완전히 사라짐을 발견하였다(도 2b). 내유모세포(도 2a, f) 또는 전정유모세포(도 2g, h)에선 *tubby* 단백질이 검출되지 않았다. *Tubby* 면역반응성은 P5의 가장 긴 부동섬모 열(row)에서 처음 검출되었으나, 중간열 또는 가장 짧은 열로 확산되는 것은 P21에서였다(도 2c-e). *tubby*의 C-말단의 PIP2-결합 도메인은 *tubby*가 표면 막에 위치하도록 한다^{5,11}. 야생형 달팽이관 외식편에 PIP2 합성 억제제인 페닐알라신 옥사이드를 처리하면 외유모세포의 부동섬모 팁(tip)으로부터 *tubby* 단백질이 사라진다(도 7). 이는 부동섬모의 팁에 위치하도록 하는 것이 복잡하면서 PIP2-의존적인 과정임을 보여준다.

[0105] 스테레오실린은 인간 유전성 난청인 DFNB16에서 변이가 발생하는 부동섬모 단백질이며, 스테레오실린이 결실된 마우스는 귀가 들리지 않는다^{7,21}. 스테레오실린은 외유모세포 부동섬모의 팁(tip)에 위치하며 수평상단커넥터의 필수 구성일 뿐 아니라 가장 긴 외유모세포 부동섬모와 결합하는 덮개막-부착 크라운의 필수 구성요소이다^{7,8}. 흥미롭게도, *Strc* 녹아웃 마우스의 표현형은 몇가지 점에서 *tubby* 마우스와 매우 유사하다: 두 마우스 모두 1) 수평상단커넥터 및 덮개막-부착 크라운이 소실되었고, 2) 팁-링크가 보존되어 있으며, 3) DPOAE를 생산하지 못한다(도 1 및 도 3k, l, m)^{7,8}. 이러한 결과와 일치하여, 본 발명자들은 P21의 야생형 마우스에서 *tubby*와 스테레오실린 단백질 모두 외유모세포 부동섬모의 팁에 위치함을 발견하였다(도 2a, e, i, m). *tubby*와 유사하게, 스테레오실린은 P5 야생형 마우스에서 처음에는 외유모세포의 가장 긴 부동섬모의 팁에 위치하고(도 2k), 이후 P21에 중간 길이 또는 짧은 부동섬모로 확산된다(도 2k-m). 본 발명자들은 아울러 동일한 마우스에서 분리한 우측 및 좌측 달팽이관을 조사한 결과 스테레오실린 단백질의 출현 및 발현 패턴에 있어 거의 동일한 시간적 과정을 거침을 관찰하였다(도 8). 놀랍게도, P5의 *tubby* 마우스에서 스테레오실린이 초기에 가장 긴 부동섬모에 위치함에도(도 2n), 이는 P9까지 외유모세포 부동섬모에서 완전히 사라져 P21에는 완전히 검출이 불가능해진다(도 2j, o, p). 반면, 외유모세포의 운동섬모(도 2n) 및 전정유모세포(도 9)에서의 스테레오실린의 위치는 *tubby* 돌연변이에 의해 영향을 받지 않는다. 이는 외유모세포 부동섬모 팁에서의 스테레오실린의 유지는 *tubby*의 기능에 좌우되며 스테레오실린의 위치 결정에 *tubby*가 필요한 것은 외유모세포 부동섬모에만 특이적임을 말해준다. 본 발명자들은 인 시투 혼성화를 이용하여 *Strc* mRNA가 야생형 및 *tubby* 마우스 모두의 유모세포에서 특이적으로 발현됨을 관찰하였다(도 2q-u). 나아가, 달팽이관에서 *Strc* mRNA에 대한 qRT-PCR 분석결과 야생형과 *tubby* 마우스 간 차이가 발견되지 않아, *Strc* 전사가 *tubby*에 의해 조절되는 것이 아님을 알 수 있었다(도

2v). 외유모세포의 전기운동성이 필수적인 프레스틴(*prestin*)²²의 위치 역시 *tubby* 마우스에서 정상으로 나타났다. 이들 데이터는 *tubby* 마우스의 청력 상실은 스테레오실린이 외유모세포 부동섬모의 틱에 위치하지 못하여 부동섬모의 구조 및 기능에 결함이 생김으로써 발생하는 것임을 보여준다.

[0106] C57BL/6J의 유전적 배경으로부터 발생하는 *tubby* 돌연변이를 가지는 마우스의 청력 상실은 이들 마우스를 AKR/J, CAST/Ei 또는 129/O1a 마우스주⁹와 교배함으로써 회복될 수 있다(도 3a). 이들 동물주는 *Map1a* 유전자에 “*moth1 (modifier of tubby hearing 1)*”이라 불리는 서열 다형성을 가진다⁶. *moth1*의 존재로 인해 *tubby* 마우스의 청력 상실이 알려지지 않은 메카니즘에 의해 회복된다. 본 발명자들은 이러한 독특한 현상을 이용하여 스테레오실린이 어떻게 외유모세포에서 *tubby*의 기능을 매개하는지를 밝히고자 하였다.

[0107] 본 발명자들은 C57BL/6J(*tub/tub*; *Map1a*^{B6}) 배경의 *tubby* 마우스를 AKR/N 마우스와 교배하여 *tubby* 돌연변이와 *Map1a* 대립인자를 모두 가지는 마우스(*tub/tub*; *Map1a*^{AKR})를 제작하였다. 종래에 보고된 바와 같이^{6,9}, *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스의 ABR 역치는 30 kHz를 제외한 모든 실험 주파수에서 *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 마우스에 비해 유의하게 개선되어 있었다(도 3b). 본 발명자들은 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스의 DPOAE 진폭도 높은 주파수에서 제외하고 *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 마우스에 비해 유의하게 증가되었음을 발견하였다(도 3c, d). 청력이 발생하는 P15의 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스에 대해서도 분석을 수행한 결과, ABR 역치 및 DPOAE 진폭이 모든 주파수에서 야생형 마우스와 유사하였다(도 11a, b). 이는 초기에 높은 주파수에서도 ABR 및 DPOAE가 온전하게 존재함을 보여준다. 낮은 주파수(12 kHz) *f2* 및 높은 주파수(24 kHz) *f2*에서의 DPOAE 진폭의 입력/출력 함수도 모든 자극 수준에서 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 및 야생형 마우스 간 유의한 차이를 보이지 않았다(도 11b의 c, d 패널). 이를 종합하면, *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스의 청력 회복은 외유모세포 기능의 회복을 수반함을 알 수 있다.

[0108] 이에, 본 발명자들은 *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 마우스 및 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스의 외유모세포 부동섬모 구조를 비교하였다. 그 결과 *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 마우스는 수평상단커넥터가 소실되었을 뿐 아니라(도 1g-j 및 도 5의 e, f 패널) 가장 긴 외유모세포 부동섬모 틱에서 덮개막-부착 크라운도 소실되었음을 확인하였다(도 3e, f, k, l). 추정컨데, 이는 덮개막-부착 크라운 및 수평상단커넥터의 형성이 스테레오실린에 의존적이기 때문일 것이다^{7,8}. 또한, 가장 긴 부동섬모와 TM 간의 물리적 접촉을 반영하는 TM 하면의 눌린 자국이 *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 마우스에는 없었다(도 3g, m). 흥미롭게도, *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스에서, 부동섬모에서의 덮개막-부착 크라운과 TM의 눌린 자국이 회복되지만, 수평상단커넥터는 여전히 소실되어 있다(도 3q, r, s). 면역형광 분석을 이용하여, 부동섬모의 가장 긴 열에서만 스테레오실린 위치가 회복되고 중간이나 짧은 열에서는 그렇지 않음을 확인하였다(도 3h, n, t 및 도 12). 면역금(immunogold) 분석을 통해 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스에서 스테레오실린 위치가 가장 긴 부동섬모 틱(도 3i, o, u) 및 TM 하단의 눌린 자국에서 회복됨을 확인하였다(도 3j, p, v). 이러한 결과는 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스에서의 청력 회복이 가장 긴 부동섬모에서만 스테레오실린이 선택적으로 회복되어 부동섬모와 TM의 커플링이 가능해지기 때문임을 알 수 있다.

[0109] 상단 커넥터(top connector)가 정상적인 청력에 필수적이라 여겨졌기 때문에, 수평상단커넥터가 없는 상황에서 이러한 청력회복(도 3)은 놀라운 일이다. 상단커넥터는 MET 채널의 일치된 출력을 가능하게 하는 외유모세포 부동섬모 다발의 통일된 움직임을 관장하고^{23,24} DPOAE 생산을 위한 구조적 기반을 제공한다⁷. 본 발명자들의 연구 결과는 수평상단커넥터가 외유모세포 기능 및 DPOAE 생산에 필수적 요소는 아님을 제안한다.

[0110] 수평상단커넥터는 소음 외상으로부터 부동섬모 다발의 기계적 안정성을 유지시키는 것으로 생각되었다^{5,26}. 그러나 이러한 가설은 수평상단커넥터만이 선택적으로 소실된 적절한 동물모델이 없어 실험적으로 확인되지 못했다. 이에, 본 발명자들은 이러한 가능성을 소음에 노출된 야생형, *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 및 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스를 이용하여 시험하였다.

[0111] 모든 유전형에서 소음에 노출시키자 ABR 역치가 극적으로 증가하였음을 확인하였다. 14일 동안 야생형 마우스에서 ABR 역치가 유의하게 개선되는 반면 *tub/tub*; *Map1a*^{B6} 및 *tub/tub*; *Map1a*^{AKR} 마우스에서는 개선이 관찰되지

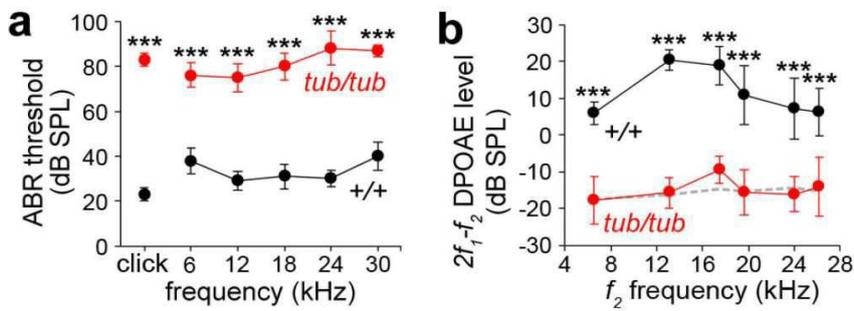
않았다(도 4a 및 도 13a). 유사하게, 소음으로 유도된 DPOAE 진폭의 감소는 야생형에서 14일 뒤 역전되었으나, *tub/tub; Map1a^{B6}* 및 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스에서는 그렇지 않았다(도 4b 및 도 13b). 마찬가지로, 덮개막-부착 크라운 및 TM의 눌린 자국이 야생형 마우스에서는 소음 노출 후 보존되었지만 *tub/tub; Map1a^{AKR}* 마우스에서는 사라지거나 희미해졌다(도 4c-n). 이러한 결과로부터 수평상단커넥터가 부동섬모에 영구적인 외유모세포 손상에 대한 복원력을 부여함을 알 수 있다.

- [0112] 요약하면, *tubby* 단백질은 스테레오실린 위치 및 스테레오실린-의존적인 세포 표면의 특수화-수평상단커넥터 및 덮개막-부착 크라운-를 유지함으로써 외유모세포 기능에 있어 중요한 역할을 함을 알 수 있다(도 14). 이들 두 가지 결합은 틱-링크와 함께 유모세포 부동섬모의 핵심적인 세가지 구조적 결합을 구성한다. TM과 가장 긴 부동섬모간의 결합이 달팽이관 비틀림에 필수적인 반면 수평상단커넥터는 필수적이지 않다는 사실은 의외였다(도 14). 그러나, 수평상단커넥터도 부동섬모가 마모되거나 손상받는 것을 방지하기 위한 기계적인 지지를 제공하는 것으로 보인다. 외유모세포 기능의 기초가 되는 분자적 및 구조적 골격에 대한 위와 같은 발견으로 인해 외유모세포가 넘감하고 정확함 청력을 매개하는 메카니즘 뿐 아니라 유전적 및 환경적 요인에 의한 청력 소실 질환에서의 부동섬모 링크의 중요성을 이해하는 데 도움이 될 것이다.
- [0114] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0116] 참고문헌
- [0117] 1. Kleyn, P. W. *et al. Cell* **85**, 281-290 (1996).
- [0118] 2. Noben-Trauth, K. *et al. Nature* **380**, 534-538, doi:10.1038/380534a0 (1996).
- [0119] 3. Stubdal, H. *et al. Mol Cell Biol* **20**, 878-882 (2000).
- [0120] 4. Boggon, T. J. *et al. Science* **286**, 2119-2125, doi:8081 [pii] (1999).
- [0121] 5. Santagata, S. *et al. Science* **292**, 2041-2050, doi:10.1126/science. 1061233 (2001).
- [0122] 6. Ikeda, A. *et al. Nat Genet* **30**, 401-405, doi:10.1038/ng838 (2002).
- [0123] 7. Verpy, E. *et al. Nature* **456**, 255-258, doi:10.1038/nature07380 (2008).
- [0124] 8. Verpy, E. *et al. J Comp Neurol* **519**, 194-210, doi:10.1002/cne.22509 (2011).
- [0125] 9. Ikeda, A. *et al. Hum Mol Genet* **8**, 1761-1767 (1999).
- [0126] 10. Carroll, K. *et al. Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 55-63, doi:10.1038/nrm1278 (2004).
- [0127] 11. Mukhopadhyay, S. & Jackson, P. K. *Genome Biol* **12**, 225, doi:10.1186/gb-2011-12-6-225 (2011).
- [0128] 12. Caberoy, N. B., Zhou, Y. & Li, W. *The EMBO journal* **29**, 3898-3910, doi:10.1038/emboj.2010.265 (2010).
- [0129] 13. Kapeller, R. *et al. J Biol Chem* **274**, 24980-24986 (1999).
- [0130] 14. Mukhopadhyay, A. *et al. EMBO Rep* **8**, 931-938, doi:10.1038/sj.embor. 7401055 (2007).
- [0131] 15. Badgandi, H. B. *et al. J Cell Biol* **216**, 743-760, doi:10.1083/ jcb.201607095 (2017).
- [0132] 16. Park, J. *et al. PLoS Genet* **9**, e1003814, doi:10.1371/journal. pgen.1003814 (2013).
- [0133] 17. Heckenlively, J. R. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11100- 11104 (1995).
- [0134] 18. Ohlemiller, K. K. *et al. Neuroreport* **6**, 845-849 (1995).
- [0135] 19. Ohlemiller, K. K. *et al. Audiol Neurootol* **2**, 175-185, doi:10.1159/000259242 (1997).
- [0136] 20. Avan, P., Buki, B. & Petit, C. *Physiol Rev* **93**, 1563-1619, doi:10.1152/physrev.00029.2012 (2013).
- [0137] 21. Verpy, E. *et al. Nat Genet* **29**, 345-349, doi:10.1038/ng726 (2001).

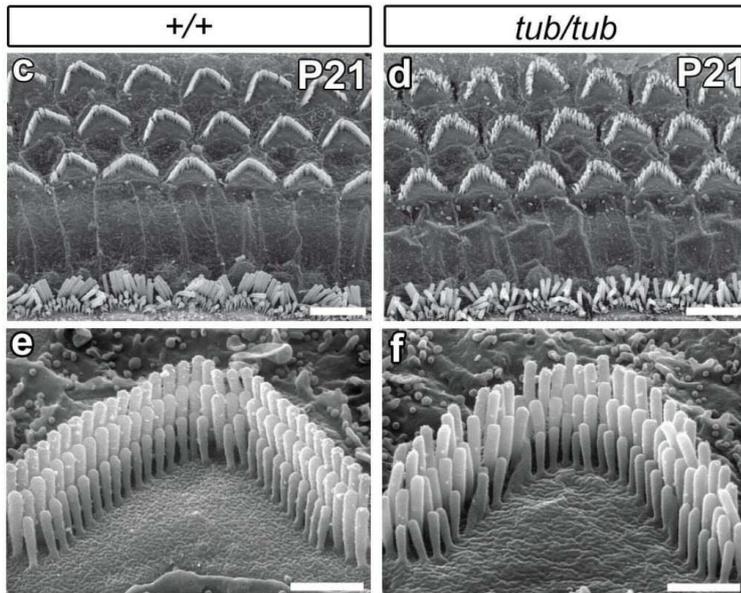
- [0138] 22. Zheng, J. *et al. Nature* **405**, 149-155, doi:10.1038/35012009 (2000).
- [0139] 23. Karavitaki, K. D. & Corey, D. P. *J Neurosci* **30**, 9051-9063, doi:10.1523/JNEUROSCI.4864-09.2010 (2010).
- [0140] 24. Kozlov, A. S. *et al. Nature* **474**, 376-379, doi:10.1038/nature10073 (2011).
- [0141] 25. Clark, J. A. & Pickles, J. O. *Hear Res* **99**, 119-128 (1996).
- [0142] 26. Tsuprun, V. *et al. J Neurocytol* **32**, 1117-1128, doi:10.1023/B:NEUR.0000021906.08847.d2 (2003).
- [0143] 27. Son, E. J. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 3746-3751, doi:10.1073/pnas.1417856112 (2015).
- [0144] 28. Morsli, H. *et al. J Neurosci* **18**, 3327-3335 (1998).

도면

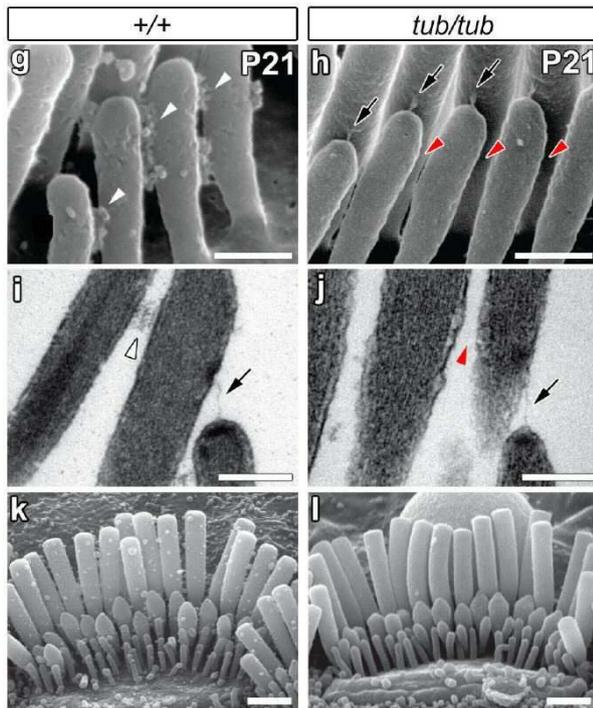
도면1a



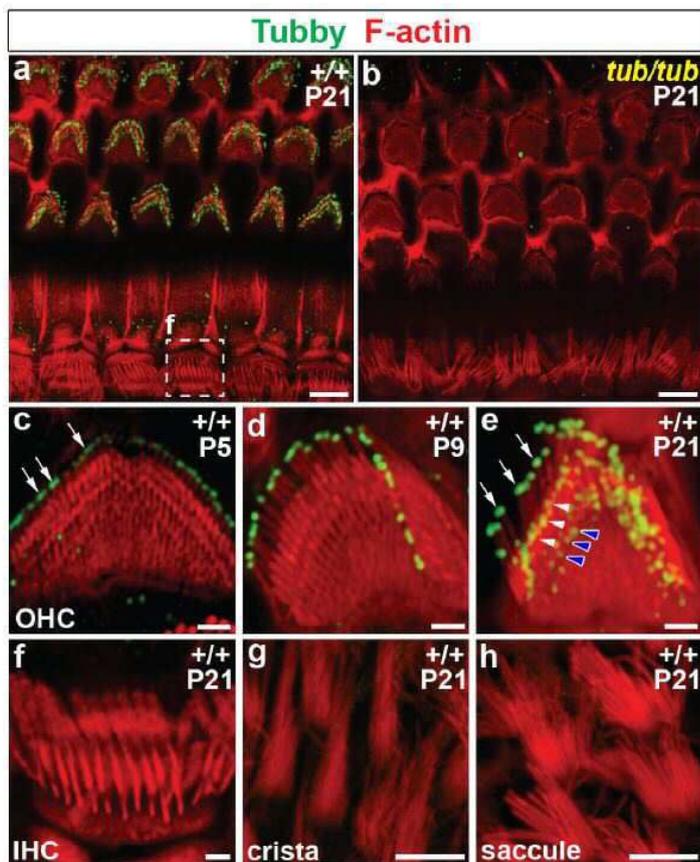
도면1b



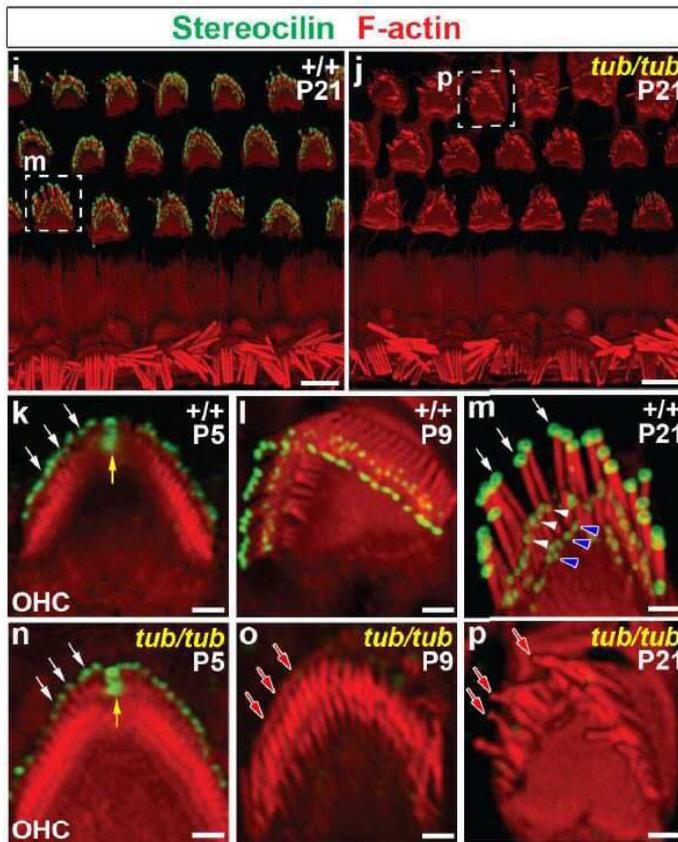
도면1c



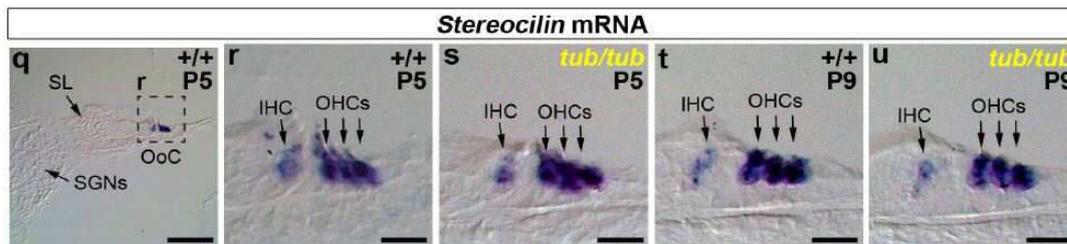
도면2a



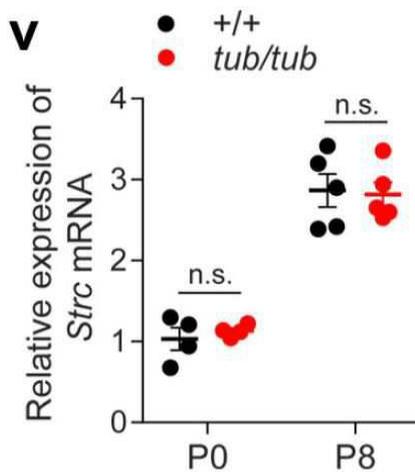
도면2b



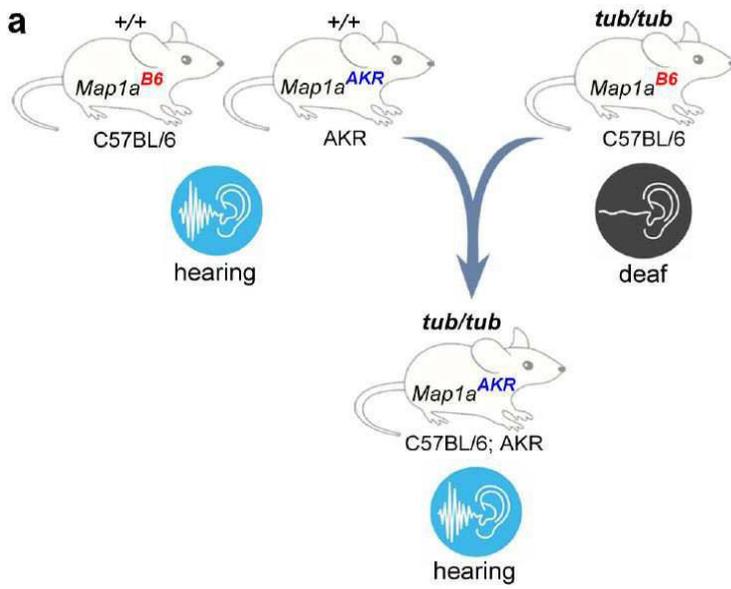
도면2c



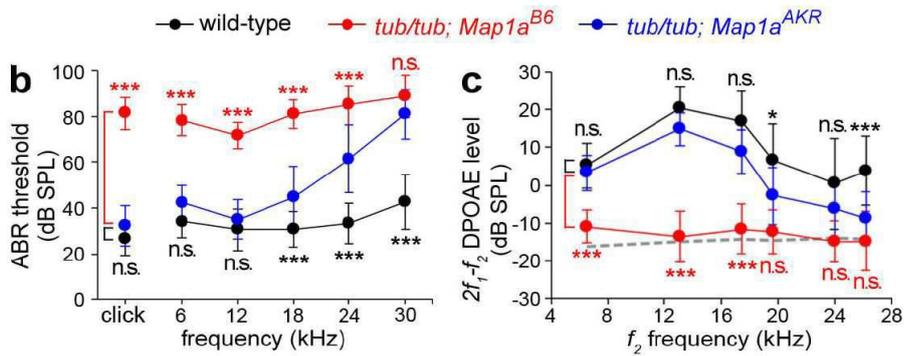
도면2d



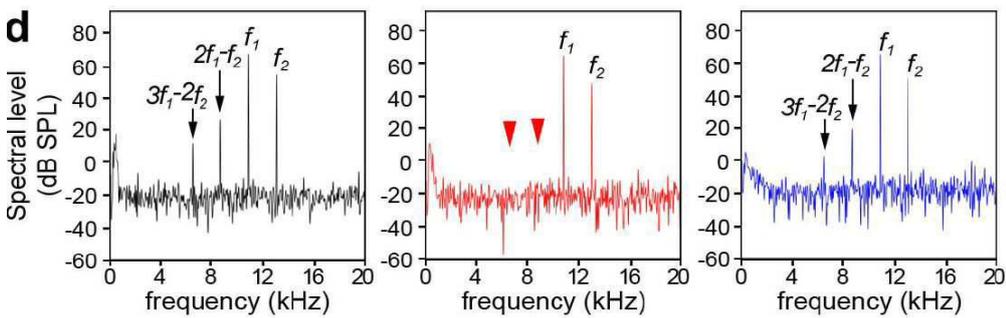
도면3a



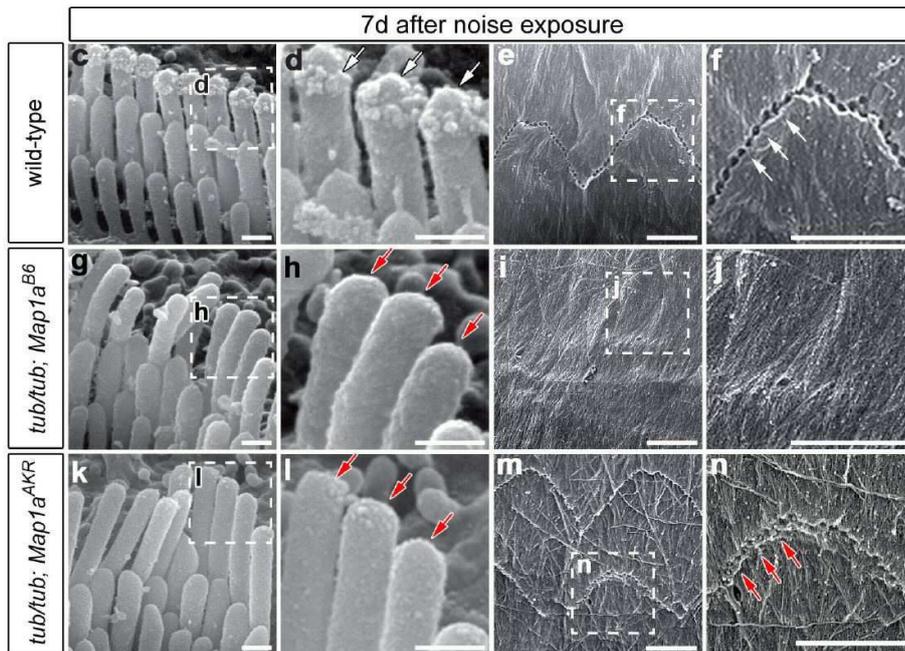
도면3b



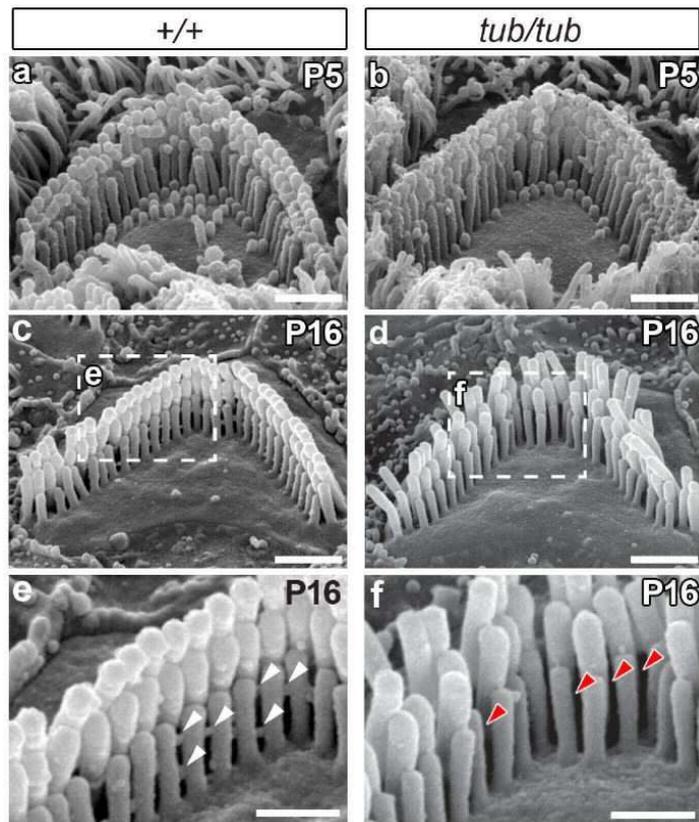
도면3c



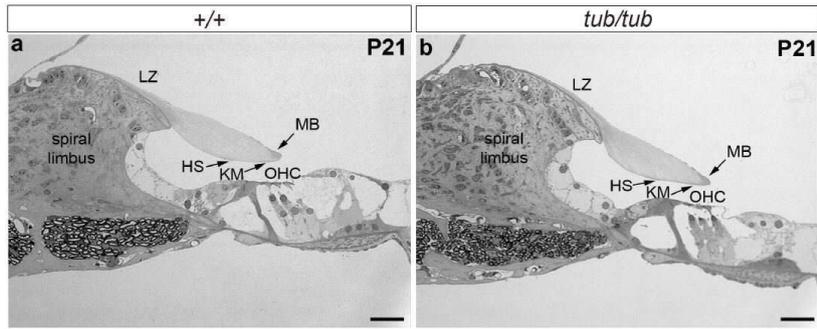
도면4b



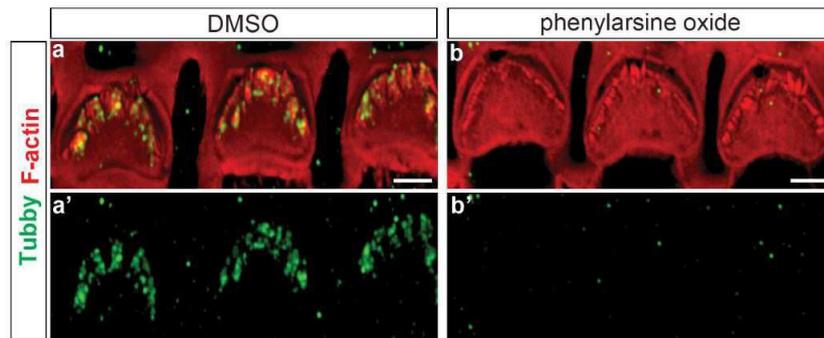
도면5



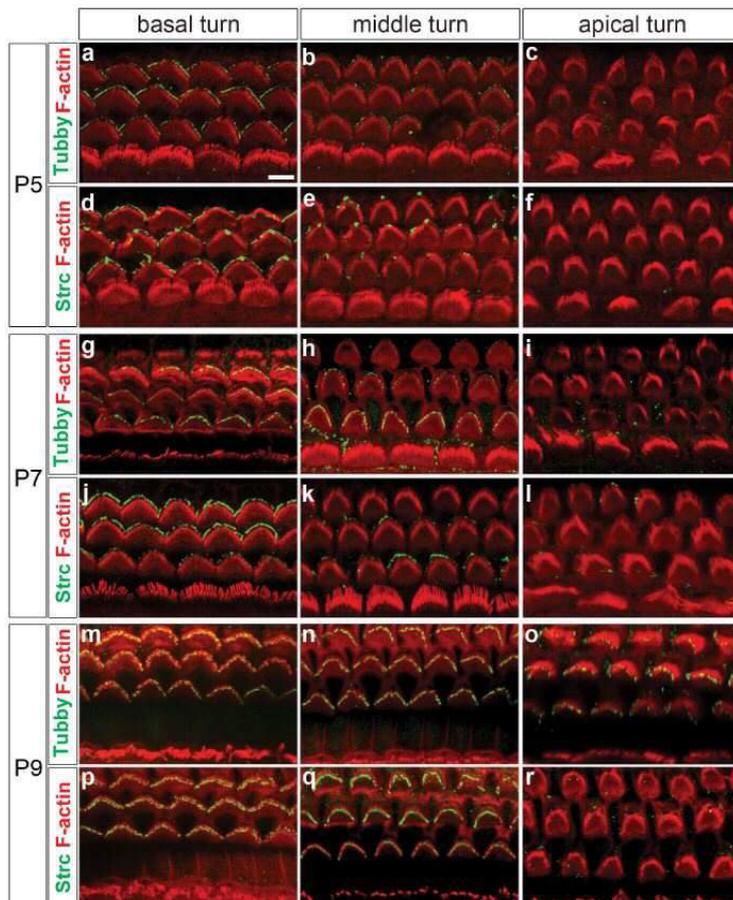
도면6



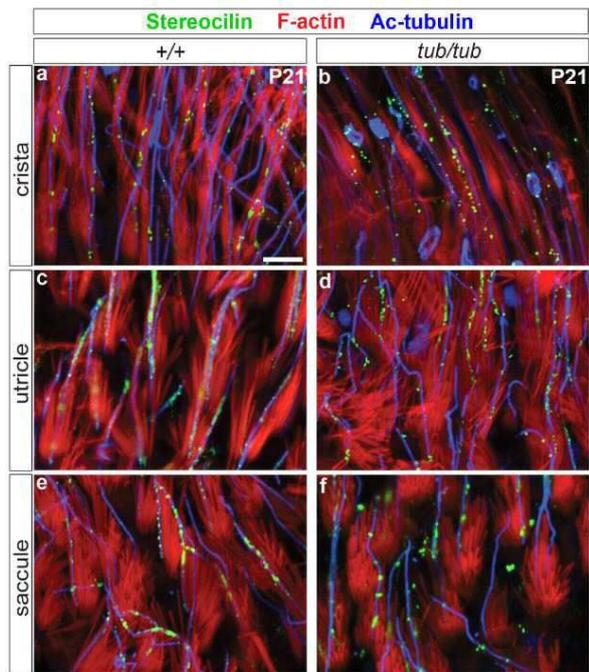
도면7



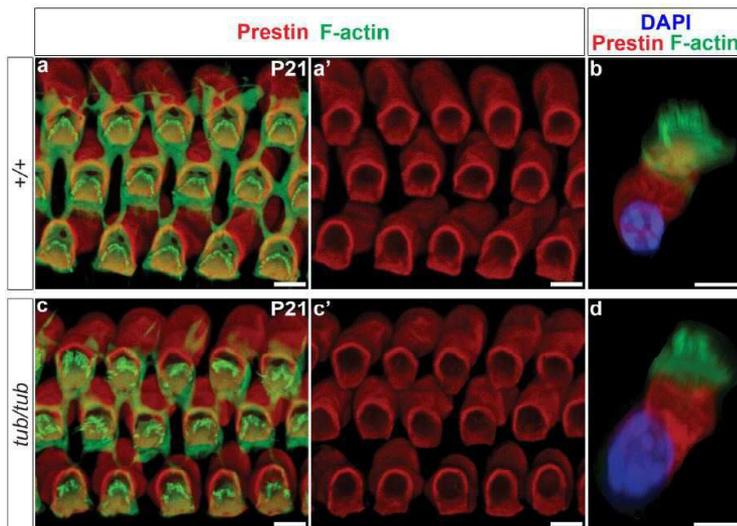
도면8



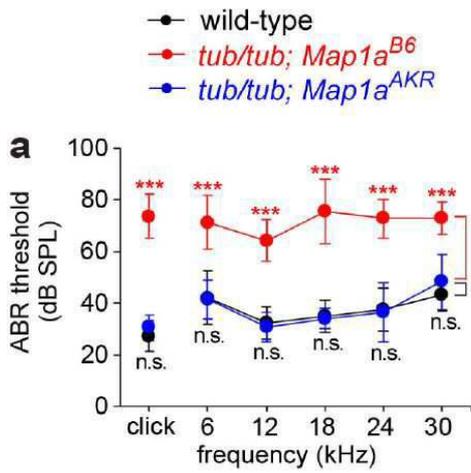
도면9



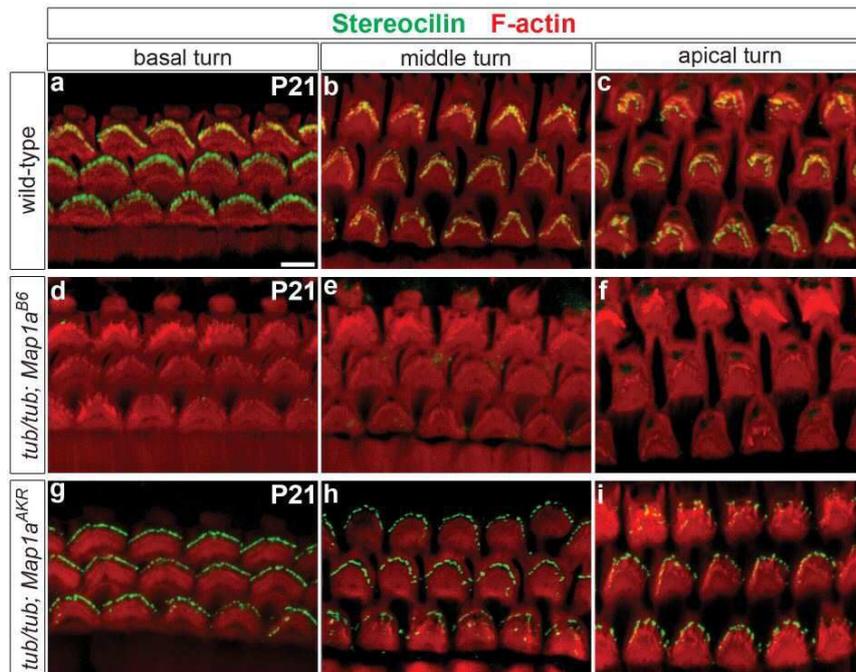
도면10



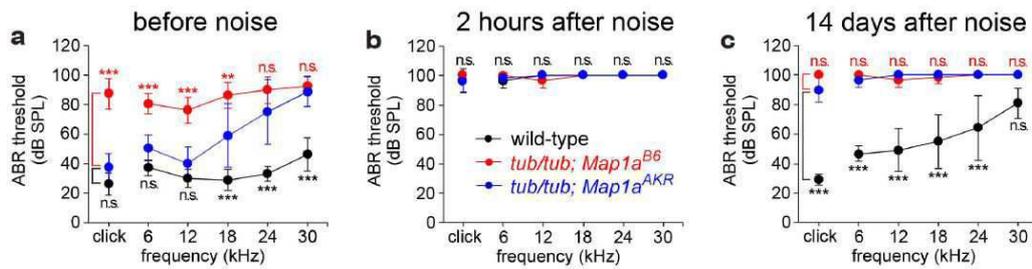
도면11



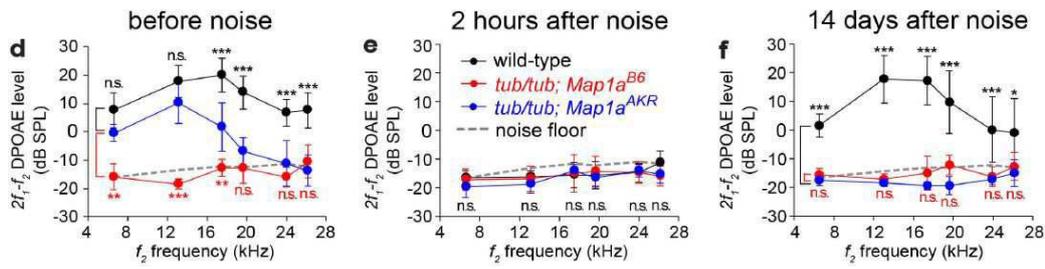
도면12



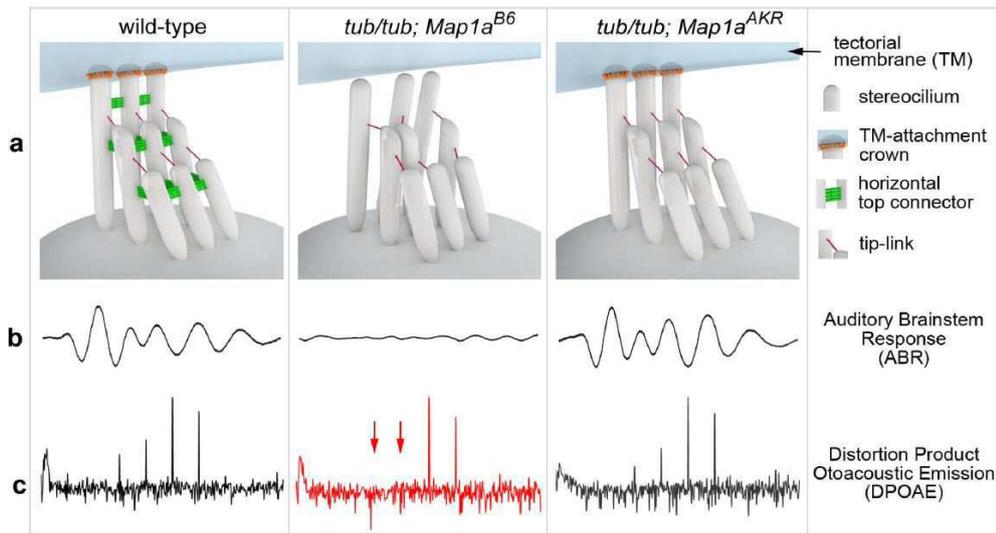
도면13a



도면13b



도면14



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION YONSEI UNIVERSITY
 - <120> A Novel Animal Model with Partial Hearing Loss and Methods for Preparing the Same
 - <130> HPC-8738
 - <160> 3
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 41
 - <212> DNA
 - <213> Mus musculus
 - <400> 1
- gatcatccac ggcaatgacc gtgagtgttg ccactccctg t
- <210> 2
 - <211> 8331

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atggatggag tggccgagtt ctccgagtat gtctctgaga cggatggatgt gccgtccccc 60

tttgacctgc ttgagccccc cacctcagga ggcttctctca agctctccaa gccttgcctgt 120

tacatcttcc ctggtggccg tggggactct gctctctttg ctgtcaatgg ctttaacatc 180

ctggtggacg gcggttctga cgcgaagtcc tgcttctgga agctgggtgc gcacctggac 240

cgcatctgact cggctgctct caccgacatt ggggctgaca atctgccagg catcaatggg 300

ctcctgcagc gcaaggtggc agagctagag gaggagcagt cccagggctc cagcagctac 360

agcgactggg tgaagaacct catctcccct gagctcggag tcgtgttctt caatgtgcct 420

gataagctcc ggcctgccga cgcctcccgc aaggccaagc gcagcatcga ggaggcctgt 480

ctcaccttc agcacctgaa ccgcctcggc atccaagccg agcctctgta ccgagtggtc 540

agcaacacca tcgagccgtt gacctcttc cacaaaatgg gtgtggggag gctggacatg 600

tatgtcctca accctgtcaa ggacagtaag gagatgcagt tcctcatgca gaagtgggca 660

ggcaatagta aagccaagac aggcatagtg ctggccaatg ggaaggaggc agagatctcc 720

gtcccctacc tgacctcat cactgccttg gtggtatggc tcccagccaa cctactgag 780

aagattgtgc gactgctttt cccgggaaat gctcccaga acaagatctt ggagggcctg 840

gaaaagctgc ggcacctgga cttcctgcgc tctcctgtgg cgacacagaa ggacctggct 900

gctggggccg tgctgccaa cttgaaacct agcaaaatca aacatcgggc cgacagcaag 960

gagagcctca aagctgcccc caagacagca atgagcaagc tagccaaacg ggaggaggtg 1020

ttagaagagg gagccaagga ggccccctca gagctggcca aggagttagc caagtcaaaa 1080

aagaaagcaa aagagccgtc cgagaagccc ccagaaaaac cctccaagcc agagagggtg 1140

aggacagagt ccagcgaagc actgaaggct gagaagcggg agctgatcaa ggataaagtg 1200

ggcaagaagc acctgaagga aaagatttca aagctggagg agaagaggga caaggagaag 1260

aaggagatca agaaggaaag gaaggaactc aagaaggagg agggaaggaa ggaggagaaa 1320

aaggaccca agaaggatga aaagaggaaa gataccaagc cggaactcaa gaaattctct 1380

aaaccagacc tgaagccttt taccctgag gtccgtaaga cctctacaa agccaaggcc 1440

cctggaagc tcaaggtgga caaaggccga gctgccctg gggaaaaaga attgtcttct 1500

gagccccgga cccccccagc ccagaagggg gctgcaccgc ctctgctgc cagtgggcac 1560

agagattgg ccttgtcttc accagaggac ctcacacagg actttgagga gttgaagcgt 1620

gaggagagag gtttgtggc tgaaccaagg gacacggaac tgggtgagaa accgctccct 1680

gcagatgcct ccgagcaggg acgccaagc acagccatcc aggtgacca acccctgct 1740

tcagtgttg agcaagaaca ggtagaaagg gagaaagg ttgtcccaga ctttcccag 1800

gataaaggga gcaagaacag agccccagac tcaggtgctg aggtagagag agagaaagaa 1860

acctgggagg aaaggaagcc gagagaagca gagctgacc cagagaacat tgctgcggcc 1920

agggaggaga gtgaacctga ggtaaaggag gatgtgatag aaaaggctga gttagaggag 1980

atggaggagg tccatcctc agatgaggaa gaggaagaga caaaggctga gagttttat 2040

caaaaacata tgcaggaagc cttaaaggta atccaaaag gcagagagc tcttgccggc 2100

cggaactgg gattccagg caaggcgcct gaaaaggaga cagcatcctt cctgagcagc 2160

ttggccacgc ctgcaggagc cgctgagcat gtctcctaca ttcaggatga gacgatccct 2220

ggctactcag agactgagca gactatctca gacgaggaga ttcacgacga gccggacgaa 2280

cgcccagccc cacccecgatt ccccacgagt acctatgacc tctctgggcc tgaaggtcct 2340

ggtccctttg aagccagcca gtctgcagag agtgctgttc cagccagctc gagcaaaact 2400

tatggggcac ctgagactga actcacctac cctccaaca tggctcgtgc ccctctggct 2460

gaagaggaac atgtgtcctc agccacatca atcacggagt gtgacaaact ctctccttt 2520

gccacatcgg tggctgagga ccaatctgtg gcttcaactca cagctcccca gacggaggag 2580

acaggcaaga gtcctctgtt gctcgacact gtcaacaagta ttcctcttc ccgcactgaa 2640

gccactcagg gcttggacta tgtgccgtca gcaggcacca tctcaccac ctcttcctg 2700

gaagaagaca agggcttcaa gtcaccgcc tgtgaggatt tctctgtgac cggggagtcg 2760

gagaagaaag gagagtctgt ggggagaggt ttgaccgggg agaaggctgt aggaaaggaa 2820

gaaaagaatg taacaacgtc tgagaaactg tccagtcaat atgctgccgt gtttgggtgcc 2880

cctggacatg ccctacatcc gggggaaccg gccctcggag aagtggagga acggtgcctc 2940

agcccagatg atagcacctg gaagatggcg tctctccac catctggccc acccagtgt 3000

gcccacacgc ctttcatca gtccccgtg gaagaaaagt ctgacctca agacttcaa 3060

gaagattcct ggggagacac aaagcacct cctggtgtga gcaaggaaga tgctgaagag 3120

cagacagtta agccagggcc tgaggaggcc atgtcagaag agggcaaagt acctcttcc 3180

aggagcccc aagcccagga cacacttggg agccttctg ggggtcagac tggctgtact 3240

attcaactgt tgccagaaca agacaaagca gtagtgttt agactggaga ggcaggcgca 3300

gcttcaggag caggcagcct tcttgagaa gtgaggactc aggagcccc tgagcctcag 3360

aaagatgagc tgcttgggtt tactgatcaa agcttttccc ctgaagatgc agagtcctg 3420

tctgtcctca gtgtggcttc cccagacact gccaaacaag aggccacccc caggtctccc 3480

tgtaccccga aagagcagca gctacacaaa gacctttggc caatggtgtc cccagaagac 3540

accagtcac tttctttctc ggaagagagt cctagcaagg agacctctct ggatatctct 3600

tctaagcagc tcctccaga aagccttggc accctccagt ttggagaact aagcctagga 3660

aaggaagaaa aggggcctct ggtgaaggca gaagacaact cttgccacct agctcctgtg 3720

tctattccag agccccacac agccacagtg tcacctcca cagatgaggc tgctggagag 3780

gcaggctca cagatgagag ccctgctgga aatttacctg gcagctcttt ctctcactct 3840

gcactgtcag gtgacaggaa aactcacct ggagagatca cgggccctgg tggacacttt 3900

atgacatcgg atagctccct caccaagagt cccgagcttt tgtcaagtcc cgccatggag 3960

gacctggcca tggagtgggg gggtaagct cggggctcgg aagacagagc cactgaacag 4020

aaggagaagg aactcgagc aaagagtga accctacagc agaaggacca gattctgtcg 4080

gagaaggctg ctcttgtcca gcgggactca gtcatgcatc agaaggacga ggctctagat 4140

gaagagaaca agcctggagg acagcaggat aagacttcag aacagaaagg cagagacttg 4200

gacaaaaaag acacggctgt ggagctgggc aaaggcccag aacccaaagg caaagactta 4260

tatctggagg accagggcct ggcagagaag gacaaggcct tagaacaag ggggtgcagcc 4320

ctgcaacaga cccagggccc tgaaccaaga gccagagcac aagagcacag agatttagaa 4380

caaaaggagc agcatttaga gctgagagat aagactctg aagagaaaga taaagtgtta 4440

gtactggaag acagggctcc agagcacatc atccccaac caacacagac agacagagct 4500

ccagaacaca gaagcaaggt tgataaagaa cagaaggatg aggcctcgga agagaaagaa 4560

caggttttag aacaaaaaga ctggggcccga gaaaaagagg gtgctgcctt ggaccaagac 4620

aacagggctg ctggacagaa agatgggacc ctaaaagaag acaaaactca ggggcagaag 4680

agctctttcc tggaagataa aagtacaaca caaaagaga tgacccttga caaaagtct 4740

ccagaaaagg ccaaaggtgt ggagcagcag gatggagctg tcccggagaa gaccagagct 4800

ttggggctgg aagagagccc agaagaggag ggcaaggctc gagagcagga agagaaatac 4860

tggaaggagc aggatgtggt ccagggatgg cgagaaacat ctccaaccag aggagagcct 4920

gtccagcct gggagggcaa gtctcctgag caggaagtca ggtattggag agacagagac 4980

ataacctac agcaggatgc atactggaag gagctaagct gtgagaggaa ggtctggttc 5040

ccccatgagc tagatggaca aggagcccgt ccacggtact ctgaggaacg tgaaagtacg 5100

tttcttgatg aggggcaaaa tgaacaagaa ataaccacac tgcagcacac tccccggagt 5160

ccctgggcct cggatttcaa ggatttccag gagcccctgc cacagaaggg gctggaagta 5220

gagcgtggc ttctgagtc gccagttggc ttgccaccag aggaggagga caaactgact 5280

cgctctccct ttgagatcat ctcccctcca gcatccccac ctgagatgac tggacagagg 5340
gttcctcag ctccaggaca ggaaagcct gttccagaca ctaagtccac accaccacg 5400
aggaatgaac ctaccacccc atcatggcta gctgagatcc caccatgggt acctaaggac 5460
aggcccctgc ctctgcacc cctctctcca gctccagctc ccccgacccc ggccccagac 5520

ccacatgctc ctgcgccctt ctctggggc atcgtgaat atgacagtgt ggtggctgcg 5580
gtgcaggagg gggcagctga gttggaaggt ggtccatact ccccctagg gaaggactat 5640
cgcaaagctg aaggggaaag ggaaggagag ggtggggctg gagctcctga cagcagctcc 5700
ttcagttcaa aggtcccaga ggttacggag agtcacacca ccagggatgc tgacagact 5760
gagccagagc agagggagcc cacaccctat cccgacgaga ggagctttca gtatgcagac 5820
atctacgaac agatgatgct tactgggttg ggcctgctt gccccaccag ggagcctcca 5880
ctgggggcat ctggggattg gccccacac ctctcaacca aggaggaggc tgctggccgc 5940

aataagtctg cagagaagga gctttcatcc gctgtgctgc ccccaacct cactctgac 6000
actccaacgt ttagctatgc atctctggca ggaccacta tacctcccag gcaagaacct 6060
gagccagggc ccaatgtgga gccagcttc acccctctg cagtgcccc tegtgcctt 6120
atctcctga gccaagacc aagtcacct cttaatggaa gactacgag ctgtggcca 6180
gacaggagga ccccatcccc aaaggaagca ggccgaagtc actgggatga tggactaat 6240
gactcagacc tggagaaggg ggctcgggaa cagccggaga aagagacca gtcccgaagt 6300
ccccatcacc ccatgcctgt gggccacct tctgtggc ctgaaactga ggcgcatagc 6360

agcctttcct cagactetca cctaggacct gtccgaccaa gtttggactt cctgcttca 6420
gcctttggct tctctcctt gcagctgct cccctcagc tgcctctcc ggctgaacct 6480
cgctccgac ctgtggctc tcttgcttc tctggggacc gagctctgac cctggttcca 6540
ggaactcca ccagaaccg acatgatgag tacttggaa tgaccaagc acccagcctg 6600
gattcctcac tgcccact cccatcacc agctcgccag gggccctct tctctcaat 6660
ctaccggac ctgcctgcc agcctgtct gaagggtcct cttctgagc taccagcct 6720
gtgatttcaa gtgtggctga acgcttccct ccaggctag aggtggctga acagagtca 6780

ggagaattgg gccagggaa cgagccagct gccacagcc tctggacct cactcctctg 6840
agcccagccc ctttagctc cgggacttg gctccagctc cagctccagc tccagctcca 6900
agcctgcctg gaaacttggg tgacggtacc ctgtcctgcc gcccgagtg ctcaggggaa 6960
ctaccaaga agccaagccc cttctgagc cactctggag atcatgaagc taatggcca 7020
ggagaaacca gccttaatcc cccaggttt gccacagcca cagcagaaaa agaagagct 7080
gaagcccttc atgcttggga acgaggttc tggcccagg gagcgagag gagctccgg 7140

ccggatacac ttctctcatc tgagcagcgt cctgggaaga gctccggggg tccacctgc 7200

agtccttctt ctgaagtcga ggctggacct cagggatgtg ctacagacce ccgccccac 7260

tgcgggggagc ttcccccttc attcctgaac cctcctttgc ccccatccac agatgacagt 7320

gacctttcaa cggaagaggc tccgctggca ggaaaaggag ggcggcgccg ggcaggagg 7380

ccaggggcca caggaggtcc atgcccctatg gctgatgaga cccccccac atcagccagc 7440

gactcaggct cctcacaatc agattctgat gtcccaccag aaactgagga gtgtccatcc 7500

atcacagctg aggcagccct tgactcagat gaagatgggg acttcttgcc tgtggacaaa 7560

gctggggggag ttagtggaac tcaccacccc agacctggcc atgaccacc cccagccccc 7620

ctaccggacc cccgcccacc ccctccccga ccggatgttt gcatggctga ccccaggggg 7680

ctcagctcag agtctgggag agttgagaga ctaccggaaa aggtgcaggg acgacctggc 7740

cgtaaggccc ctggacgggc caagcctgca tctcctgctc ggctctgga tattcgggga 7800

aaacggtcac ctactcctgg caaaggcct gtagatcga catcccgggc cctaccccga 7860

ccacggagca cccaagcca ggtcacctca gaagaaaagg atggtcacag ccccatgtct 7920

aaagccttag tcaatggcct caagcagga tccacagcct tgggttccaa gggtagctct 7980

ggccctcctg tglatgtgga tcttgccat atcccaatc actgcagcgg caagactgct 8040

gatcaggact tcttccgcg agtgctgca tcctactatg tggtcagtgg aatgacct 8100

gccaatggcg agccaagccg ggctgtgctg gatgccctgc tggaaaggcaa ggccaatgg 8160

ggggagaacc ttcaggtgac tctgattccc actcatgata cggaggtgac tctgagtgg 8220

tatcagcaga cacacgagca acagcagcaa ctgaactcc tggctctggc tagcagcagc 8280

actgtggtga tgcaggacga gtcctttcca gcctgcaaga ttgagttctg a 8331

<210> 3

<211> 8391

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atggatggag tggccgagtt ctccgagtat gtctctgaga cggatgatgt gccgtcccc 60

tttgacctgc ttgagccccc cacctcagga ggetttctca agctctccaa gccttctgtg 120

tacatcttc ctggtggccg tggggactct gctctctttg ctgtcaatgg cttaacatc 180

ctggtggacg gcggttctga ccgcaagtcc tgcttctgga agctggtgcg gcacctggac 240

cgcatgact cgggtctgct cagcaccatt ggggctgaca atctgccagg catcaatggg 300

ctcctgcagc gcaaggtggc agagctagag gaggagcagt cccagggtc cagcagctac 360

agcgactggg tgaagaacct catctcccct gagctcggag tcgtgttctt caatgtgcct 420
 gataagctcc ggctgcccga cgcctcccgc aaggccaagc gcagcatcga ggaggcctgt 480

 ctcacccttc agcacctgaa ccgctcggc atccaagccg agcctctgta ccgagtggtc 540
 agcaacacca tcgagccgct gaccctcttc cacaaaatgg gtgtggggag gctggacatg 600
 tatgtctca accctgtcaa ggacagtaag gagatgcagt tcctcatgca gaagtgggca 660
 ggcaatagta aagccaagac aggcatagtg ctggccaatg ggaaggaggc agagatctcc 720
 gtcccctacc tgacctccat cactgccttg gtggtatggc tcccagcaa ccctactgag 780
 aagattgtgc gagtgtcttt cccgggaaat gctcccaga acaagatctt ggagggcctg 840
 gaaaagctgc ggcacctgga cttctcgcgc tatcctgtgg cgacacagaa ggacctggct 900

 gctggggccg tgctgcca cttgaaacc agcaaatca aacatcgggc cgacagcaag 960
 gagagcctca aagctgcccc caagacagca atgagcaagc tagccaaacg ggaggaggtg 1020
 ttagaagagg gagccaagga ggcccgtca gagctggcca aggagttagc caagtcaaaa 1080
 aagaaagcaa aagagccgtc cgagaagccc ccagaaaaac cctccaagcc agagagggtg 1140
 aggacagagt ccagcgaagc actgaagctc gagaagcggg agctgatcaa ggataaagtg 1200
 ggcaagaagc acctgaagga aaagatttca aagctggagg agaagaggga caaggagaag 1260
 aaggagatca agaaggaaag gaaggaactc aagaaggagg agggaaggaa ggaggagaaa 1320

 aaggacgcca agaaggatga aaagaggaaa gataccaagc cggaactcaa gaaattctct 1380
 aaaccagacc tgaagctttt taccctgag gtcctgaaga cctctaca agccaaggcc 1440
 cctggaagge tcaaggtgga caaaggcga gctgcccgtg gggaaaaaga atgtcttct 1500
 gagccccgga cccccagc ccagaagggg gctgcaccgc ctctgtctgc cagtgggcac 1560
 agagagttag cttgtcttc accagaggac ctcacacagg actttgagga gttgaagcgt 1620
 gaggagagag gttgttggc tgaaccaagg gacacggaac tgggtgagaa accgctccct 1680
 gcagatgcct ccgagcaggg acgccaagc acagccatcc aggtgacca acccctgct 1740

 tcagtgttgg agcaagaaca ggtagaaagg gagaaagagg ttgtcccaga ctttcccag 1800
 gataaaggga gcaagaacag agccccagac tcaggtgctg aggtagagag agagaaagaa 1860
 acctgggagg aaaggaagcc gagagaagca gagctgacc cagagaacat tgctgcggcc 1920
 agggaggaga gtgaacctga ggtaaaggag gatgtgatag aaaaggctga gttagaggag 1980
 atggaggagg tccatccctc agatgaggaa gaggaaggag caaaggctga gagttttat 2040
 caaaaacata tgcaggaagc cttaaaggta atccaaaag gcagagaggc tcttgccggc 2100

cggaactgg gattccaggg caaggcgcct gaaaaggaga cagcatcctt cctgagcagc 2160

 ttggccacgc ctgcaggagc cgctgagcat gtctcctaca ttcaggatga gacgatccct 2220
 ggctactcag agactgagca gactatctca gacgaggaga ttcacgacga gccggacgaa 2280
 cccccagccc caccgccatt ccccacgagt acctatgacc tctctgggcc tgaaggtcct 2340
 ggtccctttg aagccagcca gtctgcagag agtgtctgtc cagccagctc gagcaaaact 2400
 tatggggcac ctgagactga actcacctac cctcccaaca tggctcgtgc cctctggtc 2460
 gaagaggaac atgtgtcctc agccacatca atcacggagt gtgacaaact ctctccttt 2520
 gccacatcgg tggctgagga ccaatctgtg gcttactca cagctccca gacggaggag 2580

 acaggcaaga gctccctgtt gctcgacct gtcacaagta ttcctcttc cgcactgaa 2640
 gccactcagg gcttggacta tgtgccgtca gcaggcacca tctcaccac ctcttcctg 2700
 gaagaagaca agggcttcaa gtcaccgcc tgtgaggatt tctctgtgac cggggagtcg 2760
 gagaagaaag gagagtctgt ggggagaggt ttgatcgggg agaaggctgt aggaaaggaa 2820
 gaaaagaatg taacaacgtc tgagaaactg tccagtcagt atgtgccgt gtttgggtgc 2880
 cctggacatt cctacatcc gggggaaccg gcctcggag aagtggagga acggtgcctc 2940
 agcccagatg atagcacctg gaagatggcg tctcctccac catctggccc acccagtgt 3000

 gccacacgc ctttcatca gtccccctg gaagaaaagt ctgacctca agacttcaa 3060
 gaagattcct ggggagacac aaagcacgct cctggtgtga gcaaggaaga tgctgaagag 3120
 cagacagtta agccagggcc tgaggaggcc atgtcagaag agggcaaagt acctcttcc 3180
 aggagcccc aagcccagga cacacttggg agccttctg ggggtcagac tggctgtact 3240
 attcaactgt tgccagaaca agacaaagca gtagtgtttg agactggaga ggcaggcgca 3300
 gcttcaggag caggcagcct tcttgagaa gtgaggactc aggagcccgc tgacctcag 3360
 aaagatgagc tgcctgggtt tactgateaa agcttttccc ctgaagatgc agagtccctg 3420

 tctgtcctca gtgtggtctc cccagacct gccaaacaag aggccacccc caggtctccc 3480
 tgtaccccg aagagcagca gctacacaaa gacctttggc caatggtgtc cccagaagac 3540
 acccagtcac tttctttctc ggaagagagt cctagcaagg agacctctct ggatatctct 3600
 tctaagcagc tctctccaga aagccttggc acctccagt ttggagaact aagcctagga 3660
 aaggaagaaa aggggcctct ggtgaaggca gaagacaact cttgccacct agctcctgtg 3720
 tctattccag agccccacac agccacagt tcacctcca cagatgaggc tgctggagag 3780
 gcaggtctca cagatgagag cctgtctgga aatttacctg gcagctcttt ctctactct 3840

gcactgtcag gtgacaggaa acactcacct ggagagatca cgggccctgg tggacacttt 3900
atgacatcgg atagctccct caccaagagt cccgagtctt tgtcaagtcc cgccatggag 3960
gacctggcca tggagtgggg gggtaaagct cgggggtcgg aagacagagc cactgaacag 4020
aaggagaagg aactcgagcg aaagagtgaa accctacagc agaaggacca gattctgtcg 4080
gagaaggctg ctgttgtcca gcgggactca gtcatgcatc agaaggacga ggctctagat 4140
gaagagaaca agcctggagg acagcaggat aagacttcag aacagaaaagg cagagacttg 4200
gacaaaaaag acacggctgt ggagctgggc aaaggcccag aacccaaagg caaagactta 4260

tatctggagg accagggcct ggcagagaag gacaaggcct cagaacaaag ggtgcagcc 4320
ctgcaacaga cccaggcccc tgaaccaaga gccagagcac aagagcacag agatttagaa 4380
caaaaggacg agcatttaga gctgagagat aagactcctg aagagaaaga taaagtgtta 4440
gtactggaag acagggctcc agagcacatc atccccaac caacacagac agacagagct 4500
ccagaacaca gaagcaaggt tgataaagaa cagaaggatg aggcctcgga agagaaagaa 4560
caggttttag aacaaaaaga ctgggcccga gaaaaagagg gtgctgcctt ggaccaagac 4620
aacagggctg ctggacagaa agatgggacc ctaaaagaag acaaaactca ggggcagaag 4680

agctctttcc tggaagataa aagtacaaca caaaagaga tgacccttga caaaagtct 4740
ccagaaaagg ccaaaggtgt ggagcagcag aatggagctg tcccggagaa gaccagagct 4800
ttggggctgg aagagagccc agaagaggag ggcaaggctc gagagcagga agagaaatac 4860
tggaggagc aggatgtggt ccagggatgg cgagaaacat ctccaaccag aggagagcct 4920
gttccagcct gggagggcaa gtctctgag caggaagtca ggtattggag agacagagac 4980
ataaccctac agcaggatgc atactggaag gagctaagct gtgagaggaa ggtctggttc 5040
ccccatgagc tagatggaca aggagcccgt ccacggtact ctgaggaacg taaaagtacg 5100

tttcttgatg aggggcca aa tgaacaagaa ataacceccac tgcagcacac tccccggagt 5160
ccctgggcct cggatttcaa ggatttccag gagcccctgc cacagaagg gctggaagta 5220
gagcgtggc ttgctgagtc gccagtggc ttgccaccag aggaggagga caaactgact 5280
cgctctccct ttgagatcat ctccccteca gcatcccac ctgagatgac tggacagagg 5340
gttccctcag ctccaggaca ggaaagccct gttccagaca ctaagtccac accaccacg 5400
aggaatgaac ctaccacccc atcatggcta gctgagatcc caccatgggt acctaaggac 5460
aggcccctgc ctctgcacc cctctctcca gctccagctc ccccgacccc ggccccagac 5520

ccacatgctc ctgcgcctt ctctggggc atcgctgaat atgacagtgt ggtggctgcg 5580
gtgcaggagg gggcagctga gttggaaggt ggtccatact ccccctagg gaaggactat 5640
cgcaaagctg aaggggaaag ggaaggagag ggtgggctg gagctcctga cagcagctcc 5700

ttcagttcaa aggtcccaga ggttacggag agtcacacca ccagggatgc tgagcagact 5760
 gagccagagc acagggagcc cacaccctat cccgacgaga ggagctttca gtatgcagac 5820
 atctacgaac agatgatgct tactgggttg ggctctgctt gccccaccag ggagcctcca 5880
 ctgggggcat ctggggattg gccccacac ctctcaacca aggaggaggc tgctggccgc 5940

 aataagtctg cagagaagga gctttcatcc cctgtgtcgc ccccaaact ccaatctgac 6000
 actccaacgt ttagctatgc atctctggca ggaccacta tacctcccag gcaagaacct 6060
 gagccagggc ccaatgtgga gccagcttc acccctctg cagtgcccc tcgtgccct 6120
 atctccctga gccaaagacc aagtccccct cttaatggaa gcaactacgag ctgtggccca 6180
 gacagaggga ccccatcccc aaaggaagca ggccgaagtc actgggatga tggactaat 6240
 gactcagacc tggagaaggg ggctcgggaa cagccggaga aagagacca gtccccagt 6300
 ccccatcacc ccatgcctgt gggccacct tcaactgtgc ctgaaactga ggcgcatagc 6360

 agcctttcct cagacttca cctaggacct gtccgaccaa gtttggactt cctgcttca 6420
 gcctttggct tctctctctt gcagcctgct cccctcagc tgcctctcc ggctgaacce 6480
 cgctccgca cctgtgctc tcttgccttc tctggggacc gagctctggc cctggttcca 6540
 ggaactccaa ccagaacccg acatgatgag tacttggag tgaccaaggc acccagcctg 6600
 gattcctcac tcccccaact cccatcacc agctcgcag gggccctct tctctccaat 6660
 ctaccccgac ctgcctcgc agccttgtct gaagggtcct cttctgaggc taccacgct 6720
 gtgatttcaa gtgtggctga acgcttcct ccaggtctag aggtggctga acagagtca 6780

 ggagaattgg gccagggaa cgagccagct gccacagcc tctgggacct cactcctctg 6840
 agcccagccc ctttagcttc ccgggacttg gctccagctc cagctccagc tccagctcca 6900
 gctccagctc cagctccagc tccagctcca gctccagctc cagctccagc tccagctcca 6960
 agcctgcctg gaaacttggg tgacggtacc ctgtcctgcc gcccgagtg ctcaggggaa 7020
 ctaccaaga agccaagccc ctttctgagc cactctggag atcatgaagc taatggcca 7080
 ggagaaacca gccttaatcc cccagggttt gccacagcca cagcagaaaa agaagaggct 7140
 gaagcccttc atgcttggga acgagggctc tggcccagg gagcggagag gagctccgg 7200

 ccgatacac ttctctcacc tgagcagcgt cctgggaaga gctccggggg tccaccctgc 7260
 agtctttctt ctgaagtca ggctggacct cagggatgtg ctacagacc cgcctccac 7320
 tgcggggagc ttccccctc attctgaac cctccttgc cccatccac agatgacagt 7380
 gaccttcaa cggaagaggc tcggctggca gaaaaaggag ggcgcgccg ggcagggagg 7440
 ccaggggcca caggaggtcc atgcccctatg gctgatgaga cccccccac atcagccagc 7500
 gactcaggct ctcacaatc agattctgat gtcccaccag aaactgagga gtgtccatcc 7560

atcacagctg aggcagccct tgactcagat gaagatgggg acttcttgcc tgtggacaaa	7620
gctgggggag ttagtggaac tcaccacccc agacctggcc atgaccacc cccagccccc	7680
ctaccggacc cccgcccacc ccctcccga cggatgttt gcatggctga ccccagggg	7740
ctcagctcag agtctgggag agttgagaga ctacgggaaa aggtgcagg acgacctggc	7800
cgtaaggccc ctggacgggc caagcctgca tctcctgctc ggcgtctgga tattcgggga	7860
aaacggtcac ctactcctgg caaaggcct gtagatcgaa catcccggc cctaccccga	7920
ccacggagca cccaagcca ggtcacctca gaagaaaagg atgtcacag ccccatgtct	7980
aaaggcttag tcaatggcct caaggcagga tccacagcct tggggtccaa gggtagctct	8040
ggcctcctg tgiatgtgga tcttgccat atcccaaatc actgcagcgg caagactgct	8100
gatcaggact tcttccgcc agtgctgca tctactatg tggtcagtgg aatgacct	8160
gccaatggcg agccaagccg ggctgtgctg gatgcctgc tggaaaggca ggccaatgg	8220
ggggagaacc ttcaggtag tctgattccc actcatgata cggaggtagc tcgtgagtgg	8280
tatcagcaga cacacgagca acagcagca ctgaacgtcc tggctctgac tagcagcagc	8340
actgtggtga tgcaggacga gtccttcca gctgcaaga ttgagttctg a	8391