



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월13일
(11) 등록번호 10-1154538
(24) 등록일자 2012년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/465 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0077979
(22) 출원일자 2009년08월24일
심사청구일자 2009년08월24일
(65) 공개번호 10-2011-0020387
(43) 공개일자 2011년03월03일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Neuroscience Research, Vol. 80, pp. 424-433, 2005
BMC Evolutionary Biology, Vol. 8, article No. 72, pp. 1-10, 2008
Neurochemical Research, Vol. 15, No. 9, pp. 933-936, 1990
KR1020090083532 A

(73) 특허권자
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(72) 발명자
이창준
서울특별시 성북구 화랑로14길 5, KIST 과학자 아파트 A-304 (하월곡동)
이수정
서울 양천구 신정동
윤보은
경기도 용인시 수지구 성북2로 158, LG6차 빌리지 607동 603호 (성북동)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

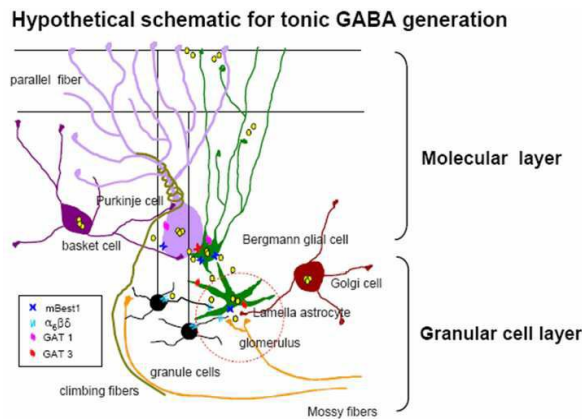
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **소뇌에서의 GABA 방출 조절제**

(57) 요약

베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 억제제를 유효성분으로 함유하는 소뇌에서의 GABA(gamma-aminobutyric acid) 방출 억제제 및 GABA 과다방출에 의한 병적 증상 치료용 조성물; 베스트로핀 1 채널 활성화제를 유효성분으로 함유하는 소뇌에서의 GABA 방출 촉진제 및 GABA 부족에 의한 병적 증상 치료용 조성물; 및 소뇌의 베스트로핀 1 채널을 타겟으로 하는 소뇌에서의 GABA 방출 조절제 스크리닝 방법이 제공된다.

대표도 - 도4f



특허청구의 범위

청구항 1

니플루믹산, 5-니트로-2(3-페닐프로필아미노)-벤조산 [5-nitro-2(3-phenylpropylamino)-benzoic acid, NPPB], 4,4'-디이소티오시아네이토스티븐-2,2'-디설포산 (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS), 베스트로핀 1 채널 코딩 뉴클레오타이드 서열에 대한 안티센스 RNA 및 shRNA (small hairpin RNA)로 이루어진 군에서 선택되는 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 억제제를 유효성분으로 함유하고, 소뇌에서의 GABA(gamma-aminobutyric acid) 방출을 억제하는,

수면장애, 운동장애, 알코올 중독, 및 운동실조증(ataxia)으로 이루어진 군에서 선택되는 GABA 과방출에 의한 질병의 예방 또는 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 베스트로핀 1 채널 코딩 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열인, GABA 과방출에 의한 질병의 예방 또는 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 shRNA는 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 GABA 과방출에 의한 질병의 예방 또는 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

소뇌 샘플을 준비하는 단계,

후보 물질을 상기 샘플과 접촉시키는 단계, 및

상기 소뇌 샘플에서의 베스트로핀 1 채널의 활성화 여부를 확인하는 단계

를 포함하고,

베스트로핀 1 채널이 활성화된 경우 상기 후보 물질을 GABA 방출 촉진제로서 결정하고, 베스트로핀 1 채널이

불활성화된 경우 상기 후보물질을 GABA 방출 억제제로 결정하는 것을 특징으로 하는, 소뇌에서의 GABA 방출 조절제의 스크리닝 방법

청구항 11

제10항에 있어서,
소뇌 교세포에서의 베스트로핀 1 채널의 활성화 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,
베스트로핀 1 채널의 활성화 여부를 스니퍼 패치법에 의한 내향 전류 변화 측정에 의하여 확인하는, 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 억제제를 유효성분으로 함유하는 소뇌에서의 GABA(gamma-aminobutyric acid) 방출 억제제 및 GABA 과다방출에 의한 병적 증상 치료용 조성물; 베스트로핀 1 채널 활성화제를 유효성분으로 함유하는 소뇌에서의 GABA 방출 촉진제 및 GABA 부족에 의한 병적 증상 치료용 조성물; 및 소뇌의 베스트로핀 1 채널을 타겟으로 하는 소뇌에서의 GABA 방출 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] GABA(gamma-aminobutyric acid)는 포유류 중추신경계의 대표적인 억제성 신경전달물질 중 하나이다.
[0003] GABA는 다음과 같은 두 가지의 작용 모드로 작용하는 것으로 알려져 있다: 긴장성(tonic) 및 위상성(phasic) 모드. GABA의 위상성 분비(phasic release) 메커니즘은 Ca²⁺ 의존적 낭포성 분비(Ca²⁺ dependent vesicular release)인 것으로 명확하게 정립되어 있지만, GABA의 긴장성 분비(tonic release)의 소스 및 메커니즘은 좀 더 많은 연구가 필요한 상황이다.
[0004] 이에 본 발명자들은 GABA의 긴장성 분비 메커니즘을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하고자하는 과제

[0005] 본 발명의 일례는 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 활성화 조절제를 유효성분으로 포함하는 소뇌에서의 GABA 방출 조절제를 제공한다.
[0006] 구체적으로, 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 차단제를 유효성분으로 포함하는 소뇌에서의 GABA 방출 억제제를 제공한다.
[0007] 또한, 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 활성화제를 유효성분으로 포함하는 소뇌에서의 GABA 방출 촉진제를 제공한다.
[0008] 또 다른 예는 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 활성화 조절제를 유효성분으로 포함하는 GABA 과방출 또는 부족에 의하여 발생하는 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
[0009] 구체적으로, 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 차단제를 유효성분으로 포함하는 GABA 과방출에 의한 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
[0010] 또한, 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 활성화제를 유효성분으로 포함하는 GABA 부족에 의한 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 또 다른 예는 후보물질을 소뇌 샘플과 접촉시키고 소뇌의 베스트로핀 1 채널 활성화 여부를 확인하여 소뇌에서의 GABA 방출 조절제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명자들은 긴장성 GABA 억제기가 소뇌 내의 교세포(glial cells)로부터의 GABA 분비에 기인하고, 이러한 GABA의 분비는 최근 특성이 밝혀진 음이온 채널인 베스트로핀 1(Bestrophin 1, Best1) 채널을 직접적으로 통과하여 일어남을 밝혔다. 우선, 2-세포 스니퍼 패치 기법(two-cell sniffer patch technique)을 이용하여, Best1 채널이 GABA를 직접 통과시킬 수 있음을 보였다. 두 번째로, 세포 유형 특이적 유전자 스플라이싱 기술과 성체 마우스에서의 긴장성 GABA 분비를 측정하기 위한 통상적인 전자생리학적 접근뿐 아니라 최근의 광유전학적 방법(optogenetic tool)을 이용하여, 교세포가 Best1 채널을 통하여 분비 가능한 GABA를 포함하고 그 분비는 다양한 음이온 채널의 차단제에 의하여 억제됨을 확인하였다.

[0013] 이러한 GABA 분비는 Best1-shRNA 렌티바이러스(1etivirus)를 소뇌 부위에 주입한 후 표적 유전자인 Best1 유전자의 녹다운에 의하여 현저하게 감소하였다. 최종적으로, Cre-lox 조절 shRNA 시스템과 hGFAP-CreERT2 형질전환 마우스의 조합에 의하여, 유전자 침묵에 의한 긴장성 GABA 전류의 감쇠(attenuation)가 완전히 회복됨을 확인하였고, 이는 교세포에서 분비된 GABA가 ambient GABA를 담당함을 의미한다. 본 발명자들의 이러한 발견은 비소포성(non-vesicular) GABA 분비에 있어서의 교세포 기능과 채널 매개 방출 메커니즘과 관련된 개념을 최초로 제시하고, 또한 뉴런 프로세싱의 교세포 통합(glial integration)의 중요성을 강조하는 것이다.

[0014] 긴장성 GABA 전류는 치아이랑 과립 세포에서 처음 관찰되었기 때문에, 긴장성 억제(Tonic inhibition)는 소뇌, 해마, 시상, 피질, 뇌간 등을 포함하는 중추신경계에 걸쳐 상이하게 분포하는 것으로 보고되어 있다. 긴장성 억제는 흥분성(excitability)의 일반적 긴장도(general tone) 조절에 있어서 위상성 억제(phasic inhibition)보다 우세하며, 뉴런 출력(neuronal output)의 정보 처리(information processing)에 있어서 중요한 역할을 한다. 긴장성 억제의 다양한 기능적 역할은 간질(epilepsy), 수면, 기억 및 인지와 관련되어 있다 (Walker and Semyanov, 2008). 소뇌에서, 주요한 흥분성 입력(excitatory input)을 푸르키니에 세포(Purkinje cells)에 제공하는 과립 세포는 시냅스의 고친화성 서브유닛 함유 GABA_A 수용체에 의하여 매개되는 지속적인 긴장성 GABA 억제에 의하여 강력하게 억제된다 (Hamann et al., 2002; Rossi et al., 2003). 소뇌의 긴장성 GABA 억제는 운동 행동을 손상시키는 저용량 알코올 중독(low dose alcohol intoxication)의 중요한 표적인 것으로 보고되어 있다 (Hanchar et al., 2005). 그러나, 그 기능성 중요성에 대한 연구는 매우 미미하고, 방출 메커니즘에 대한 이해 부족에 의하여 부분적일 수 밖에 없는 실정이다.

[0015] 소뇌 과립 세포는 타입 II 사구체(type II glomerulus)라 불리는 독특한 형상을 형성하며, 이는 세포외 ambient GABA가 glutamatergic 이끼섬유(mossy fiber), 골지세포의 액손, 과립세포돌기 및 교세포초(glial sheaths)와 함께 축적되도록 한다; 사구체는 방출된 GABA를 유지시키는 층상 교세포초(lamella glial sheaths)로 완벽하게 둘러싸여 있다. 소뇌의 정상교세포의 다른 독특한 유형인 베르그만 교세포(Bergmann glial cells)는 푸르키니에 세포(Purkinje cells) 가까운 쪽에 위치하며 (도 1a), 생후 과립세포 이동과 푸르키니에 세포 돌기 성숙을 위한 스캐폴드를 제공하는 발생상 중요한 역할을 한다. 성인에서, 베르그만 교세포는 과립세포로부터의 여기성 시냅스 말단(synaptic termination)과 함께 바스켓 세포로부터의 GABAergic 시냅스 말단을 포함하는 교세포초로 자신의 몸통 (somata)와 시냅스를 단단히 감싸므로써, 푸르키니에 세포에 대하여 밀접한 해부학적 및 기능적 파트너로서 남아있게 된다.

[0016] 성인 뇌에서, 뉴런이 독점적으로 GABA를 합성하고 함유하고 방출하는 것으로 생각되지만, 일각에서는 뇌간과 소뇌의 정상교세포가 GABA를 포함한다고 보기도 한다. 성인 소뇌에서 GABA가 교세포에 포함되어 있음을 확인하기 위하여, 하기의 실시예에서 GFAP 양성 정상교세포 세포체(somata)와 미세 돌기가 GFP로 표지되어 있는 GFAP-GFP 트랜스제닉 마우스에 대하여 면역조직화학적 실험을 수행하였다. 그 결과, 과립세포층 내의 층상 정상교세포 뿐 아니라 모든 GFP-양성 베르그만 교세포의 세포체와 돌기에서 강력한 면역반응성을 갖는 GABA에 대한 항체가 발견되었다 (도 5의 a 및 b 참조). 특히, 교세포 GABA 면역반응성의 세기는 이웃하는 뉴런과 비교하여 동등 이상인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 GABA의 교세포 방출에 대한 잠재적 근원을 제공한다.

[0017] 기존에 성체 래트의 소뇌 과립세포의 GABA_A 수용체의 긴장성 활성화는 GABA의 활동전위 독립적(action-potential-independent) 비소포성(non-vesicular) 방출로부터 기인하는 것으로 알려져 있다. 이러한 발견은 ambient GABA의 소스가 교세포일 수 있다는 가설과 부합되는 것이다. 더욱이, 타입-2 정상교세포에서 유래하는 세포주에 있어서, 퓨린성 수용체 P2X₇의 활성화가 [³H]-GABA의 방출을 유도하고, 이는 클로라이드 채널 억

제제인 DIDS(4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid)와 SITS(4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulphonic acid)와 같은 $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 교환체 또는 부피 조절 음이온 채널의 억제제에 대하여 예측불가능할 정도로 민감하다. 따라서, 본 발명자들은 이어서 GABA 방출의 분자적 표적이 될 수 있는 음이온 채널을 탐색하였다.

[0018] 음이온 채널 중 베스트로핀 1(Bestrophin 1, Best1) 채널의 중복되는 특유한 특징에 근거하여, Best1을 후보 음이온 채널로 채택하였다. 베스트로핀 중에서 인간 베스트로핀1 (hBest1)을 클로닝하여 상염색체 우성 Best 난황상 황반 이상증(vitelliform macular dystrophy)에서의 돌연변이를 확인하고, hBest1이 부피 변화뿐 아니라 Ca^{2+} 에 의하여 활성화되고, 니플루믹산(NFA), 5-니트로-2(3-페닐프로필아미노)-벤조산 [5-nitro-2(3-phenylpropylamino)-benzoic acid, NPPB], 및 4,4'-다이소티오시아네이토스틸벤-2,2'-디설포산 (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS)에 의하여 용이하게 차단되는 Cl^- 채널을 구성함을 입증하였다. 또한, hBest1는 Cl^- 보다 SCN^- 와 같은 거대 음이온에 대하여 보다 높은 투과성을 가지며, Cl^- 에 비하여 HCO_3^- 에 대하여 현저한 투과율을 나타낸다 ($P_{\text{HCO}_3^-}/P_{\text{Cl}^-}=0.44$).

[0019] 상기한 바와 같이, 본 발명에서는 소뇌 교세포에서 베스트로핀 1 채널을 통하여 GABA의 방출이 이루어짐을 발견하였으며, 이러한 발견에 기초하여 베스트로핀 1 채널을 조절하여 GABA 방출을 조절함으로써 방출의 과다방출 또는 부족에 의하여 유발되는 질병 또는 증상을 예방, 개선, 완화 및/또는 치료할 수 있음을 제안한다.

[0020] 이에, 본 발명의 일례는 베스트로핀 1(Bestrophin 1) 채널 활성 조절제를 유효성분으로 포함하는 소뇌에서의 GABA 방출 조절제를 제공한다.

[0021] 구체적으로, 본 발명의 구체예는 베스트로핀 1 채널 차단제를 유효성분으로 포함하는 소뇌에서의 GABA 방출 억제제, 및/또는 베스트로핀 1 채널 활성화제를 유효성분으로 포함하는 소뇌에서의 GABA 방출 촉진제를 제공한다.

[0022] 또 다른 예는 베스트로핀 1 채널 활성 조절제를 유효성분으로 포함하는 GABA 과방출 또는 부족에 의하여 발생하는 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0023] 구체적으로, 본 발명의 구체예는 베스트로핀 1 채널 차단제를 유효성분으로 포함하는 GABA 과방출에 의한 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물 및/또는 베스트로핀 1 채널 활성화제를 유효성분으로 포함하는 GABA 부족에 의한 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 베스트로핀 1은 클로라이드 이온 채널의 일종으로, 본 발명에서 클로라이드 이온 채널이 GABA에 대하여 투과성을 갖는다는 것을 보여주는 대표적인 예로서 사용되었다. 상기 베스트로핀 1 유전자는 포유류 유래, 바람직하게는 설치류 유래 또는 영장류 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, 마우스 베스트로핀 1 (mBest1) 유전자 (NM_011913, 서열번호 1) 또는 인간 베스트로핀 1 (hBest1) 유전자 (NM_004183, 서열번호 2)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 베스트로핀 1 채널 억제제는 베스트로핀 1 채널의 발현을 억제하거나 발현된 베스트로핀 1의 활성을 직접 간접적으로 방해 및/또는 차단하는 활성을 갖는 모든 물질을 포함하는 것으로, 예컨대, 음이온 채널 차단제, 베스트로핀 1 채널 코딩 뉴클레오타이드 서열에 대한 안티센스 RNA 또는 shRNA 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 음이온 채널 차단제는 니플루믹산, 플루메나믹산, 5-니트로-2(3-페닐프로필아미노)-벤조산 [5-nitro-2(3-phenylpropylamino)-benzoic acid, NPPB], 4,4'-다이소티오시아네이토스틸벤-2,2'-디설포산 (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나 이에 제한 되는 것은 아니다. 상기 안티센스 RNA는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열에 대한 안티센스 RNA일 수 있다. 또한, 상기 shRNA는 cDNA 서열로 나타낼 때, 다음의 서열번호 3, 서열번호 4, 및 서열번호 7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0027] 5'-GATCCCCCTTGCCAACCTGTCAATGAATCAAGAGATTCATTGACAAGTTGGCAATTTTGA-3' (서열번호 3),

[0028] 3'-GGGAACGGTTGAACAGTTACTTAAGTTCTCTAAGTAACTGTTCAACCGTTAAAAATTCGA-5' (서열번호 4),

[0029] 5'-CGCTGCAGTTGCCAACCTGTCAATGAATCAAGAGATTCATTGACAAGTTGGCAATTTTGTATCTAGACA-3' (서열번호 7).

- [0030] 이와 같은 베스트로핀 1 채널 활성 억제에 의하여 소뇌 교세포에서의 GABA 방출이 억제되면, GABA에 의한 신경 억제 작용, 예컨대 긴장성 억제 작용이 감소하여, GABA 과다방출에 의하여 야기되는 질병 또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료 효과를 가져올 수 있다. GABA 과다방출에 의하여 야기되는 질병 또는 증상에는 간질(epilepsy), 수면장애, 기억장애, 지각장애, 인지장애, 운동장애, 학습장애, 알코올 중독, 예컨대, 저용량 알코올 중독(low dose alcohol intoxication), 운동실조증(ataxia) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 따라서, 베스트로핀 1 채널 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 GABA 과다방출에 의하여 야기되는 질병 또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물은 간질(epilepsy), 수면장애, 기억장애, 지각장애, 인지장애, 운동장애, 학습장애, 알코올 중독, 운동실조증(ataxia) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 질병 또는 증상에 대하여 예방, 개선, 완화 및/또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있다.
- [0032] 또 다른 측면에 있어서, 베스트로핀 1 채널 활성화제를 통하여 소뇌에서의 GABA 방출을 촉진함으로써, GABA에 의한 신경 억제, 예컨대 긴장성 억제를 증가시켜, 예컨대 흥분성 신경전달물질의 과다방출에 의한 과다한 신경 흥분 효과를 상쇄시킬 수 있다. 이와 같은 베스트로핀 1 채널 활성화제는 베스트로핀 1 채널을 직접 또는 간접적으로 활성화시키는 작용을 갖는 모든 물질을 포함하며, 예컨대, 펩타이드 TFLLR, 브래디키닌(Bradykinin) 등과 같은 G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor; GPCR) 아고니스트 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 이와 같은 베스트로핀 1 채널 활성화는 GABA 방출을 촉진시키고, 방출된 GABA의 신경억제, 예컨대 긴장성 억제작용에 의하여 신경의 과다 흥분에 의한 병적 증상, 예컨대, 기억과 관련된 질병(알츠하이머, 노화성 기억 감퇴, 등), 발작(epileptic seizures), 신경전달물질 유발 흥분 독성(excitotoxicity), 허혈(ischemia), 뇌졸중, 뇌출혈, 간질, 뇌 외상, 저산소증(hypoxia) 등의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료 효과를 보일 수 있다. 따라서, 베스트로핀 1 채널 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 GABA 부족에 의하여 야기되는 질병 또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물은 기억과 관련된 질병(알츠하이머, 노화성 기억 감퇴, 등), 발작(epileptic seizures), 신경전달물질 유발 흥분 독성(excitotoxicity), 허혈(ischemia), 뇌졸중, 뇌출혈, 간질, 뇌 외상, 저산소증(hypoxia) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 GABA 방출 조절제, GABA 과방출 또는 부족에 의하여 발생하는 질병 및/또는 증상의 예방, 개선, 완화 및/또는 치료용 조성물은 포유류, 바람직하게는 인간을 대상으로 투여하기 위한 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 예는 소뇌, 보다 구체적으로 소뇌 교세포 상의 베스트로핀 1 채널을 타겟으로 하여 신규한 소뇌에서의 GABA 방출 조절제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0035] 상기 스크리닝 방법은
- [0036] 소뇌 샘플을 준비하는 단계;
- [0037] 후보 물질을 상기 샘플과 접촉시키는 단계, 및
- [0038] 상기 소뇌 샘플에서의 베스트로핀 1 채널의 활성화 여부를 확인하는 단계
- [0039] 를 포함할 수 있다.
- [0040] 이 때, 베스트로핀 1 채널이 활성화된 경우 상기 후보 물질을 GABA 방출 촉진제로서 결정하고, 베스트로핀 1 채널이 불활성화된 경우 상기 후보물질을 GABA 방출 억제제로 결정하는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 상기 베스트로핀 1 채널의 활성화 여부는 이 발명이 속하는 기술분야에 알려진 모든 방법에 의하여 측정 가능하며, 예컨대, 소뇌 교세포 상의 베스트로핀 1 채널을 제외한 다른 채널 및 수용체를 불활성화 시킨 후 세포 내향 전류 변화를 측정하여 결정할 수 있다. 예컨대, 후보 물질 처리 후 세포 내향 전류값이 증가하면 베스트로핀 1 채널이 활성화되었음을 의미하는 것이고, 세포 내향 전류값이 감소하면 베스트로핀 1 채널이 불활성화되었음을 의미하는 것이다. 상기 다른 채널 및 수용체의 불활성화 및 내향 전류값 측정은 이 발명이 속하는 기술분야에 널리 알려진 기술로서, 이 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 용이하게 실시할 수 있다. 예컨대, 세포 내향 전류값 측정은 스니퍼 패치 방법을 이용하여 수행할 수 있다(Lee, C. J. et al. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol* **581**, 1057-81 (2007) 참조, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함됨).
- [0042] 본 발명에 따른 스크리닝 방법에 있어서, 상기 소뇌 샘플은 포유류 유래의 것, 바람직하게는 설치류 또는 영장류 유래의 것일 수 있다.

효 과

[0043] 본 발명에서 소뇌에서의 베스트로핀 1 채널을 통한 긴장성 GABA의 방출 메커니즘이 규명됨에 따라서, GABA 방출 조절 및 이를 통한 GABA 관련 병적 증상에 대하여 보다 효과적이고 다각적인 치료가 가능할 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1: 유전자 클로닝 및 shRNA 바이러스 벡터 구축**

[0046] **1.1: Best1의 클로닝**

[0047] 전장 마우스 베스트로핀1(mBest1) cDNA를 클로닝하기 위하여, 생후 P0-P3 마우스(C57BL/6, 대뇌 피질, SPF room, Center for Neural Science, KIST, Seoul, Korea)로부터 얻은 배양 정상교세포 또는 성체 수컷 마우스(C57BL/6)로부터 얻은 정소로부터 전체 RNA를 정제하고, Super Script III 역전사효소(Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. NCBI 데이터베이스 cDNA [GenBank accession numbers NM_011913 XM_129203]를 기초한 오픈 리딩 프레임에 부합하는 21 염기 프라이머쌍 (mBest1-F: 5'-aggacgatgatgattttgag-3' (서열번호 5), mBest1-R: 5'-ctttctggtttttctggttg-3' (서열번호 6))을 사용하여 PCR을 수행하여 mBest1의 전장 오픈리딩프레임(ORF)을 얻었다. 얻어진 PCR 산물을 pGEM-T 이지 벡터(Promega) 내로 클로닝하고 서열을 분석하였다.

[0048] **1.2: Best1의 플라스미드 구축 및 발현**

[0049] 포유류 세포에서 mBest1을 발현시키기 위하여, pGEM-T easy 플라스미드 (6.65 kb, Promega)로부터 얻은 mBest1 전장 단편을 HindIII(NEB) 및 NotI(NEB) 인식부위를 이용하여 pcDNA 3.1 (Invitrogen) 내로 서브클로닝하거나, XbaI(NEB) 및 XmaI(NEB) 인식부위를 이용하여 pIRES2-dsRED (Invitrogen) 내로 서브클로닝하였다. 상기 얻어진 pIRES2-dsRED 또는 pcDNA3.1 벡터를 HEK293T 세포(ATCC) 내로 형질감염시켜, mBest1을 발현하는 세포를 선별하였다. pcDNA3.1-mBest1 플라스미드의 경우, 이펙텐 형질감염 시약 (Effectene transfection reagent, Qiagen)를 사용하여 1/10 양의 pEGFP-N1 플라스미드(Invitrogen)와 함께 HEK293T 세포(ATCC) 내로 형질감염시켜, mBest1을 발현하는 세포를 선별하였다. 상기 선별은 pcDNA3.1-mBest1과 pEGFP-N1의 동시형질감염의 경우 녹색형광을 띠는 세포를 선별하고, pIRES dsRED 벡터 플라스미드인 경우 적색형광을 내는 세포를 선별하여 수행하였다. 전자생리학적 기록을 위하여 상기 세포들을 글래스-커버슬립 위에 리플레이팅하였다. 상기 형질감염된 세포들은 24-36시간 내에 패치클램프 실험에 사용하였다.

[0050] **1.3: Best1 shRNA 및 렌티바이러스 생산**

[0051] 플라스미드 기제 shRNA 발현을 위하여, 다음과 같은 상보적 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하고 pSUPER-GFP 벡터(Oligo Engine)의 HindIII/BglIII 부위에 삽입하였다

[0052] 5'-GATCCCCTTGCCAACCTGTCAATGAATCAAGAGATTCATTGACAAGTTGGCAATTTTGA-3' (서열번호 3);

[0053] 3'-GGGAACGGTTGAACAGTTACTTAAGTTCTCTAAGTAACTGTCAACCGTTAAAAATTCGA-5' (서열번호 4),

[0054] (mBest1의 뉴클레오타이드 서열 중 563-582 서열 해당 부위 포함, 나머지는 구조적 (헤어핀 구조) 및 클로닝을 위한 필요에 의하여 포함됨).

[0055] 렌티바이러스 기제 shRNA 발현을 위하여, 합성 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 5'-CGCTGCAGTTGCCAACCTGTCAATGAATCAAGAGATTCATTGACAAGTTGGCAATTTTGTATCTAGACA-3' (서열번호 7)를 shLenti2.4 CMV 렌티바이러스 벡터(Macrogen)의 pstI-XbaI 제한효소부위에 삽입하여 mBest1 유전자를 포함하는 렌티바이

러스 벡터를 구축하고 서열분석하여 확인하였다. scrambled 올리고뉴클레오타이드-포함-shLenti 구조체(특정 염기서열을 인식하여 mRNA를 분해하는 표적 shRNA의 control 개념으로 사용된 것으로, cellular mRNA를 degradation하지 않는 염기서열로 구성, Macrogen)를 대조군으로 사용하였다. 렌티바이러스 생산은 Macrogen Inc에 의뢰하여 수행하였다 (Dull, T. et al., A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol 72, 8463-71 (1998) 참조, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함됨).

[0056] 아래 실시예에서는 Best1 표적 shRNA 렌티바이러스로서 서열번호 7을 삽입한 렌티바이러스를 사용하였다.

[0057] **실시예 2: 면역화학적 시험: GABA와 Best1의 공동 발현 확인**

[0058] Best1이 소뇌에서 발현하는지 여부를 확인하기 위하여, GFAP-GFP 트랜스제닉 마우스에서 Best1과 GABA에 대하여 생성된 항체를 사용하여 면역조직화화법을 수행하였다 (도 5c 참조).

[0059] 성체 GFAP-GFP 마우스(SPF room, Center for Neural Science, KIST, Seoul, Korea) 또는 렌티바이러스(아래 실시예 4의 Best1 표적 shRNA 렌티바이러스) 주입된 GFAP-GFP 마우스를 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 소뇌의 30 μ m 두께의 시상 초냉동 박절 박편(sagittal cryostat sections)을 PBS로 3회 행구고, 블로킹 용액 (0.3% Triton-X, 2% normal serum in 0.1M PBS, sigma)에서 1시간동안 인큐베이팅시켰다. 래빗 항혈청 베스트로핀 항체(1:100, Soria et al, 2006)와 닭 항-GFP 항체(1:1,000, abcam) 및 기니아피그 항 GABA 항체 (1:1,000, Chemicon)의 혼합물과 함께 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 진탕배양하였다. PBS로 3회 세척하고, 이어서 대응하는 이차항체 콘쥬게이션된 Alexa 488, 555 및 647, Invitrogen)로 세척하였다. PHS로 3회 세척하고, 형광물질 탐재 배지(Dako, S3023)로 마운팅하였다. FV1000 공초점 현미경(Olympus)을 사용하여 일련의 공초점 형광 이미지를 얻었다. 상기 이미지는 Olympus FLUOVIEW software ver.1.7로 가공하였다.

[0060] 상기에서 얻어진 GFAP-GFP 트랜스제닉 마우스 소뇌에서의 GFP, Best1, 및 GABA에 대한 항체를 이용한 면역조직화화 공초점 이미지를 도 1a에 나타내었다.

[0061] 도 1a의 맨 좌측은 GFAP-베르그만 교세포(화살표)와 층상 성상교세포(lamella astrocytes, 하늘색 화살표 머리)를 표지하는 GFP 염색의 공초점 이미지(녹색)이다. 푸르키니에 세포(Purkinje cell, 별표)는 GFAP-GFP 염색이 관찰되지 않았다. 중간 좌측은 Best1 염색(붉은색)과 GFAP-GFP를 함께 보여주는 공초점 이미지이다. Best1은 푸르키니에 세포(별표)와 다른 뉴런들(화살표머리)에서뿐 아니라 과립층의 교세포(하늘색 화살표 머리)와 분자층의 베르그만 교세포(화살표)에서 많이 발현되었다. 중간 우측은 GFAP-GFP와 GABA(자홍색)를 함께 보여주는 공초점 이미지. GABA는 GABAergic 뉴런 이외에도 층상 성상교세포(하늘색 화살표머리)와 베르그만 교세포(화살표)에서 GFAP-GFP와 함께 강력하게 공동발현된다. 맨 우측은 GFAP-GFP, mBest1 및 GABA를 함께 보여주는 공초점 이미지이다. 도 1a에 따르면, 베르그만 교세포(화살표), 층상 성상교세포(하늘색 화살표 머리) 및 GABAergic 뉴런(별표와 하얀색 화살표 머리)에서의 Best1 면역반응성 강도가 관찰되지만, 과립세포에서는 나타나지 않았다.

[0062] 또한, 도 5a-c는 성체 마우스 소뇌의 교세포에서 mBest1과 GABA이 강력하게 발현됨을 보여주는 면역조직화화 사진이다.

[0063] 5a는 마우스 소뇌에서의 GABA, Best1 및 GFAP-GFP의 면역조직화화적 공초점 이미지이다. GABA(첫 번째 패널)과 Best1(두 번째 패널)이 과립층보다 분자층에서 강력하게 발현되는 것으로 나타났다. 세 번째 패널은 베르그만 교세포 돌기가 분자층의 대부분을 차지함을 보여준다. 마지막 패널은 GABA, Best1 및 GFAP-GFP이 합쳐진 공초점 이미지를 보여준다.

[0064] 도 5b는 소뇌의 GABA 및 GFAP-GFP 염색의 고배율 이미지를 보여준다. GABA는 분자층의 Purkinje 세포와 GABAergic 인터뉴런에서 진하게 염색되었다. 그러나, 베르그만 세포(별표) 또한 세포체와 돌기(작은 검정색 화살표 머리)에서 강력한 GABA 면역반응성을 나타내었다. 과립층(화살표) 내의 과립세포를 밝은 세기를 갖는 GABA로 염색되고, 과립세포 돌기를 또한 GABA(작은 흰색 화살표)로 염색되었다.

[0065] 도 5c는 Best1와 GFAP 염색의 고배율 (X60) 이미지를 보여준다. mBest1은 분자층 내의 베르그만 교세포 (별표)와 과립층 내의 교세포 (화살표)에서 많이 발현되었다. 큰 화살표 머리는 mBest1을 발현하지만 GFAP로 염색되지 않은 Purkinje 세포를 나타낸다. 작은 화살표 머리는 과립층의 성상교세포 돌기를 나타낸다. 성상교세포 돌기 또한 mBest1을 발현하였다. 맨 오른쪽 패널은 DAPI로 진하게 염색된 과립세포를 나타내는데, mBest1과 GFAP 면역반응성은 관찰되지 않았다.

- [0066] 상기 도 5a 내지 5c에 나타낸 바와 같이, 평행섬유(parallel fibers)와 상행섬유(climbing fibers)가 접해있고 밀접하게 상호작용하는 분자층 내의 푸르키니에 세포(Purkinje cell) 세포체와 수상돌기(dendritic tree s)를 따라서 위치하는 베르그만 교세포 돌기들이 Best1와 GABA를 공동발현시킨다. 이러한 결과는 Best1이 소뇌의 교세포에서의 GABA 방출의 분자적 표적으로서 작용할 수 있다는 가능성을 제안한다고 할 수 있다.
- [0067] **실시예 3: 2-세포 스니퍼 패치(Two-cell sniffer patch) - Best1 채널 매개 GABA 방출 확인**
- [0068] Best1 채널이 GABA 방출을 매개하기 위하여, 채널 개방시에 GABA가 투과가능하여야 하므로, Best1이 GABA 방출 통로임을 확인하기 위하여 Best1의 GABA 투과성을 시험하는 것이 중요하다. Best1 채널의 GABA 투과성을 시험하기 위하여, 2-세포 스니퍼 패치법(two-cell sniffer patch technique)을 이용하여, GABAc를 발현하는 센서 HEK293T 세포에서의 Best1 채널과 소스 HEK293T 세포에서 발현되는 다른 채널을 통한 GABA 방출을 직접적으로 측정하였다 (도 1b 참조).
- [0069] pIRES-Best1-dsRED 플라스미드(Invitrogen으로부터 구입한 pIRES-dsRED vector에 Best1을 cloning 한 것)와 GFP를 갖는 GABAc(Invitrogen으로부터 구입한 pcDNA3.1 vector에 GABAc을 cloning 한 것)를 이펙텐 형질감염 시약(Effectene transfection reagent, Qiagen)을 사용하여 각각 HEK 293T 세포(ATCC) 내로 형질감염시켰다. 형질감염 18 내지 24 시간 후, 전자생리학적 기록을 위하여 세포들을 함께 글래스 커버슬립 상에 리플레이팅 하고, 상기 세포들을 24 내지 36시간 이내에 패치 클램프 실험에 사용하였다. 기록을 위하여, 하나는 dsRED를 포함하고 다른 하나는 GFP를 포함하는 인접한 두 개의 세포를 선택하여 패치하였다. 이 때, 상기 인접한 두 개의 세포의 선택은, 하나는 GABAc를 가지고 있는 녹색형광을 띠는 세포, 다른 하나는 pIRES-Best1-dsRED가 형질감염된 적색형광을 내는 세포를 선별하여 수행하였다.
- [0070] 패치 피펫용 내부 용액으로는 다음과 같이 GABA 방출의 소스로서의 3 mM 또는 140mM GABA와 Best1 채널을 활성화시키기 위한 생리학적 범위의 마이크로몰 농도의 유리 Ca^{2+} (~4.5 μ M)를 포함하는 것을 사용하였다. 도 1b는 2-세포 스니퍼 패치(two-cell sniffer patch)의 개략도로서, 표시된 구조체 Best1(dsRed 공동발현) 또는 GABAc (GFP 공동발현)를 발현하는 HEK 세포를 보여준다. 3 mM 또는 145mM GABA 및 0 또는 4.5 μ M Ca^{2+} 를 소스 내로 세포내 피펫팅하는 모습을 보여준다. 소스와 센서 세포의 밝은 부분과 형광 이미지는 아래 부분에 나타나 있다.
- [0071] GABA 방출의 소스용으로, 3 mM GABA(Tocris) 146 mM CsCl, 5 mM (Ca^{2+}) -EGTA[ethylene glycol bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid]-NMDG(N-methyl-D-glucamine), 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM 수크로오스, 4 mM Mg-ATP 및 0.3 mM Na_2 -GTP (pH; 7.3)를 포함하는 피펫 용액을 사용하였다. 센서용으로, 110 mM D-글루코네이트, 110 mM CsOH, 30 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM NaCl, 5 mM EGTA(ethylene glycol bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 4 mM Mg-ATP, 및 0.3 mM Na_2 -GTP (pH;7.3)를 포함하는 피펫 용액을 사용하였다. 3mM GABA Zero Ca^{2+} 실험을 위하여, 5 mM (Ca^{2+}) -EGTA-NMDG를 5 mM EGTA-NMDG로 대체하여 사용하였다. 140mM GABA 실험을 위하여, 3mM GABA 및 146 mM CsCl를 140mM GABA로 대체하였다. pH는 CsCl로 조정하고, 삼투압은 290 mOsmol로 조절하였다.
- [0072] 내부용액으로 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 및 5.5 mM 글루코오스를 포함하는 용액을 사용하였다. 소스 채널이 GABA를 통과시킬 수 있다면, 이웃하는 세포 상의 GABAc 수용체는 방출된 GABA와 결합하고, Cl^- 내부 전류가 유도된다. 100 μ M GABA의 bath 적용에 의하여 GABA 전류의 전체적인 활성화가 얻어졌으며, 비교를 위하여 이를 표준화하였다.
- [0073] 소스 세포에서의 전세포 컨피규레이션을 조사하기 위한 멤브레인 패치의 break-through에 의하여 GABA 방출이 유도되었고, 이러한 GABA 방출은 인접한 센서 세포에 의하여 모니터하고 탐지하였다. GABA 전류는 100 μ M GABA의 bath application에 의하여 완전히 활성화되었으며, 완전한 활성화 정도(percentage)를 계산하여 도 1c 및 1d에 나타내었다.
- [0074] 도 1c는 GABA의 투과 정도의 시험 결과를 보여준다. 투과된 GABA는 센서에서의 내향 전류로서 측정하였다 (아래쪽 트레이스). 전세포 모드로 진입하는 멤브레인 관류(break-through) 시점을 소스 트레이스(위쪽 트레이스) 상에 검은색 화살표머리로 표시하였다. NPPB는 100 μ M 농도로 사용하였다. Best1* (B1*)는 Best1-

W93C의 pore 변이체(Qu et al, 2006)를 나타낸다. 상기 변이체의 GABA 투과정도는 HEK293T 세포(ATCC)에 상기 변이체를 형질전환시켜 얻어진 세포를 사용하여 실험하였다. ANO1는 최근 알려진 TMEM16A Ca²⁺ 활성화 클로라이드 채널이다 (Yang et al., 2008, Caputo et al., 2008, 경상대, 박재용 교수님 실험실). 상기 ANO1의 GABA 투과정도는 HEK293T 세포(ATCC)를 상기 채널로 형질전환시켜 얻어진 세포를 사용하여 실험하였다.

[0075] 도 1d는 다양한 조건에서의 GABA 방출 정도를 요약적으로 보여준다. 센서 세포 내의 내향전류로서 측정된 GABA 방출을 100 μM GABA를 이용한 완전한 활성화로 표준화하여 완전한 활성화에 대한 %로 나타내었다. NPPB와 NFA는 100 μM 농도로 사용하였다. SK1은 전도도가 낮은 Ca²⁺ 활성화 K⁺ 채널(small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel, Dr. Adelman Lab)이다. 상기 SK1의 GABA 투과정도는 HEK293T 세포(ATCC)를 상기 채널로 형질전환시켜 얻어진 세포를 사용하여 실험하였다. 평균값을 mean ± SEM (standard error of the mean)로 표시하였다. 전체적으로 Student's t-test를 사용하였다(unpaired, 2-tailed).

[0076] 도 1b, 1c 및 1d에 나타낸 바와 같이, Best1 채널만이 GABA에 대하여 현저한 투과성을 나타낸 반면, 최근에 특성이 밝혀진 Ano1(또는 TMEM-16A, Yang et al, 2008, Caputo et al, 2008) 또는 Ca²⁺ 활성화 칼륨 채널인 SK1는 GABA에 대하여 투과성을 보이지 않았다. 이와 같은 Best1을 통한 GABA의 방출은 NFA와 NPPB와 같은 음이온 채널 차단제에 의하여 완벽하게 억제되었으며, 세포내 Ca²⁺ 및 GABA 농도에 의존적이었다. 또한, 도 1d에 나타낸 바와 같이, 공지된 Best1의 기공 변이체인 Best1-W93C (Qu et al, 2006)는 GABA 투과성을 전혀 보이지 않았으며, 이는 Best1 채널의 기공을 통하여 GABA가 통과함을 지지하는 것이다.

[0077] 또한 도 7은 NFA 및 NPPB에 의한 GABA 방출 억제는 상기 화합물이 GABA 수용체에 직접적으로 작용함으로써 얻어지는 것이 아님을 보여준다. 도 7a 및 7b는 GABA를 발현하는 HEK293 세포를 100 μM NFA와 100 μM NPPB의 부재(a) 또는 존재(b)하에서 패치 클램핑하고 100 μM GABA로 감염 (challenge)시킨 결과를 보여주는 것이다. 도 7a와 7b에서 알 수 있는 바와 같이, GABA를 발현하는 HEK293 세포에서는 GABA 방출이 NFA 또는 NPPB 처리 여부와 큰 상관없이 나타났다.

[0078] 이러한 결과는 Best1 채널이 본래의(native) 세포에서 직접 투과를 통한 GABA 방출을 매개한다는 가능성을 제안하는 것이다.

[0079] **실시예 4: 트랜스제닉 마우스 시험 - Best1 채널 매개 GABA 방출 확인**

[0080] **4.1: 트랜스제닉 마우스 제작**

[0081] 본래(naive)의 베르그만 교세포가 GABA를 투과시킬 수 있는 기능적 Best1 채널을 발현하고 Best1 채널을 분자 수준에서 조작할 수 있는지 시험하기 위하여, Cre-loxP 조합의 조절하에 있고 Cre-발현 트랜스제닉 마우스와 조합시 세포 유형 특이적 유전자 침묵을 유도하는 mCherry-tagged shRNAi(small hairpin-forming interference RNA)를 운반하는 렌티바이러스를 구축하였다 (도 2a 참조, Ventura et al., 2004). 도 2a는 Cre-lox 조절 pSicoR-shRNA 렌티바이러스 구조체(Add gene으로부터 구입한 pSicoR vector에 Best1-shRNA를 cloning 한 것) 모습을 보여주는 것이다. 상기 mCherry-tagged shRNAi(small hairpin-forming interference RNA)를 운반하는 렌티바이러스는 Cre-lox 조절 pSicoR-shRNA 렌티바이러스 구조체에 mCherry를 붙인 것이다. 두 개의 loxP 부위가 U6 프로모터 하의 shRNA와 CMV 프로모터 하의 mCherry를 포함하는 부위 내에 위치한다. Cre 리컴비네이즈가 발현시, 이 효소는 상기 카세트 제거하여 shRNA를 불활성화시킨다.

[0082] Best1 표적 shRNA 렌티바이러스 (실시예 1.3에서 제작)를 6-7 주령의 GFAP-GFP 마우스(SPF room, Center for Neural Science, KIST, Seoul, Korea)의 소뇌 피질 내로 정위(stereotactically) 주입하였다 (도 2b 참조). 도 2b는 B6 야생형(SPF room, Center for Neural Science, KIST, Seoul, Korea) 또는 GFAP-GFP 마우스를 사용하는 실험 일정을 보여주는 것이다. 6-7 주령 마우스의 소뇌에 상기 제작된 렌티바이러스를 주입하였다. 소뇌로의 렌티바이러스 주입 7일 후, 면역조직화학법 또는 전세포 패치 클램프 기록을 수행하였다.

[0083] **4.2: 트랜스제닉 마우스를 이용한 면역조직화학적 분석**

[0084] 상기 렌티바이러스 감염된 세포는 과립세포층뿐 아니라 분자층 내에 광범위하게 분포하였다 (도 2c, 오른쪽 그림 및 도 8a 참조). 도 2c는 GFAP-GFP 염색(녹색), Best1 (자홍색), 및 mCherry (붉은색)을 포함하는 B1-

shRNA 렌티바이러스의 모습이다. Best1 면역반응성은 바이러스가 주입된 부위에서 바이러스가 주입되지 않은 부위와 비교하여 현저하게 감소된 것을 알 수 있다. 반면 두 부위에서의 GFAP-GFP 세기는 상대적으로 큰 차이가 없었다. 가장 오른쪽 그림에서, 녹다운 효과를 GFAP-GFP로 thresholding 후 GFAP-GFP 세기에 의하여 표준화된 Best1 세기로서 나타내었다. mBest1-shRNA 발현 부위가 감염된 부위에서의 Best1의 면역반응성은 비감염 부위와 비교하여 현저하게 감소하였다 (도 2c 가장 오른쪽 그래프 참조). 이러한 결과는 Best1-shRNA의 고효율과 Best1 항체의 높은 특이성을 확인시켜주는 것이다.

[0085] **4.3: 트랜스제닉 마우스를 이용한 전세포 패치 클램프 기록**

[0086] **4.3.1: 소뇌 박편 제작**

[0087] 뇌 박편을 Rossi et al., 2003에 기재된 바와 같이 제작하였다. 즉, 박편 기록을 위하여, 약 P28일된 마우스 또는 8주령 이상인 마우스를 사용하였다. 동물들을 할로탄(halothane)으로 깊게 마취시켰다. 머리를 자른 후, 두개골로부터 뇌를 신속하게 절제하고, 절단 용액(ice-cold cutting solution)에 침지시켰다: 상기 용액은 250 mM 슈크로오스, 26 mM NaHCO₃, 10 mM D(+)-글루코오스, 4 mM MgCl₂, 3 mM myo-inositol, 2.5 mM KCl, 2 mM Sodium pyruvate, 1.25 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM Ascorbic acid, 0.1 mM CaCl₂, 및 1 mM Kynurenic acid (pH 7.4) 포함. 모든 용액을 95% O₂-5% CO₂로 가스처리하였다. 충부(vermis) 양쪽의 트리밍 후, 소뇌엽(cerebellar lobes)을 포함하는 250 μm 두께의 몇몇 시상 주위 박편을 마이크로톰(Leica VT 1000)으로 절단하고, 세포의 ACSF 용액으로 옮겼다; 상기 용액은 126 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 및 10 mM D(+)-Glucose (pH 7.4)를 포함. 박편들을 적어도 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0088] **4.3.2: 전세포 패치 기록**

[0089] 기록을 위하여, 박편들을 flower controller (Synaptosoft)와 진공펌프 (Charles Austen, model Capex 8C)에 의하여 조절되는 ASCF (artificial cerebrospinal fluid, sigma) 용액으로 계속적으로 과냉각하는 (superfusing, flow rate: 2ml/min) 전자생리학적 기록 챔버(RC-26G, Warner Instruments)로 옮겼다. 슬라이스 챔버를 정립현미경 (upright microscope, Olympus, Japan)의 재물대 위에 올려놓고, 미분간섭대비 (differential interference contrast) 및 적외선 옵틱으로 X60 수침체 (water immersion objective)로 관찰하였다. 세포 형태를 Imaging Workbench 6.0 (INDEC Systems, Inc), camera controller (Hamamatsu, C4742-95), 및 light microscope controller (Olympus, TH4-200)를 통하여 시각적으로 확인하였다. 수은 램프 (Olympus, U-RFL-T)를 이용하여 형광이미지를 관찰하였다. 대부분 2-5 소뇌 소엽에 위치하는 베르그만 교세포 또는 과립세포 몸체(somata)로부터 전세포 전압-클램프 기록을 얻었다.

[0090] 베르그만 교세포 기록을 위하여, 후벽 보로실리케이트 유리 모세관(thick-walled borosilicate glass capillaries, SC150F-10, Warner instrument Corp)으로부터 패치 피펫(8-10 MΩ)을 만들었다. GABA를 사용하지 않는 대조 실험을 위하여, 피펫을 다음의 조성을 포함하는 내부 용액으로 충전시켰다; 146 mM CsCl, 5 mM (Ca²⁺)-EGTA-NMDG, 2 mM MgCl₂, 8 mM HEPES, 10 mM 슈크로오스, 4 mM Mg-ATP, 및 0.3 mM Na₂-GTP (pH; 7.3).

[0091] 140 mM GABA 사용하는 실험을 위하여, 다음의 조정을 갖는 내부 용액을 사용하였다; 140 mM GABA, 5 mM (Ca²⁺)-EGTA-NMDG, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM 슈크로오스, 4 mM Mg-ATP, 및 0.3 mM Na₂-GTP (pH; 7.3, CsOH로 조정). 삼투압은 297 및 290 mOsmol로 조정하였다. GFP 형광 이미지를 통하여 베르그만 교세포를 확인하였다. 베르그만 교세포의 전압 클램핑을 위한 유지전위(Holding potential)를 -70 mV로 하였다.

[0092] 과립세포를 위한 피펫 저항을 전형적으로 10-12 MΩ으로 하고, 피펫을 다음의 조성을 갖는 내부 용액으로 충전시켰다: 135 mM CsCl, 4 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na₂-GTP 및 10 mM QX-314, CsOH로 pH 7.2로 조정 (278-285 mOsmol) (Rossi, et al., 2003). 이와 같은 내부 용액, 전압 클램프 E_{cl}=0 mV, 및 유지전위 -60 mV로 내향전류(inward current)가 유도되었다.

[0093] 베르그만 교세포 기록을 위한 전극 접점 전위 (electrode junction potentials)를 보정하였으나, 과립세포 기

록에서는 점점 전위를 보정하지 않았다. 점점 전위는 GABA 무처리 실험 및 140 mM GABA 처리 실험에서 각각 +3.5 mV 및 -9.7 mV로 하였다.

[0094] 퍼핑 (puffing) 실험을 위하여, 100mM GABA로 충전된 유리 전극(5-6 MΩ)을 패치된 과립세포 인접하게 두고, MiniDigi (Molecular Device)와 연결된 Picospritzer III (Parker instrumentation)에 의하여 500 ms동안 간단하게 퍼핑시켰다.

[0095] 푸르키니에 세포 (Purkinje cell) 기록을 위하여, 패치 피펫 (2-3 MΩ)을 다음의 조성을 갖는 내부 용액으로 충전시켰다: 140 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.02 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP 및 0.4 mM Na₂-GTP, KOH로 pH 7.35로 조정 (Osmol: 278-285). 상기 세포로부터 기록된 데이터 중 30MΩ 이상의 액세스 저항 (access resistance)으로 기록된 데이터는 폐기하였다.

[0096] 상기 얻어진 신호를 계수화하고, pCLAMP 10.2 software (Molecular Devices)를 사용하여 Digidata 1440A (Molecular Devices) 및 Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices)으로 50 μs 간격으로 샘플링하였다. Clampfit 10.2 (Molecular Devices), Minianalysis (Synaptosoft, USA), SigmaPlot 10.0 (SPSS) 및 Excel 2003 (Microsoft)를 이용하여 오프라인 분석을 수행하였다.

[0097] **4.3.3: 약물 적용**

[0098] 본 실시예에서 사용된 모든 약물과 화학물질은 다음과 같은 별도의 언급이 없는 한 Sigma-Aldrich사로부터 구입한 것이다: 리도카인 N-에틸 브로마이드 (QX-314, Sigma), SR95531 하이드로브로마이드 (GABA_Azine, Tocris), 콘카나마이신 A (concanamycin A) (Tocris), BAPTA-AM (1,2-비스(2-아미노페녹시)에탄-N,N',N'-테트라 아세트산 테트라키스 (아세트옥시메틸 에스테르), Tocris), Fluronic[®] F-127 (invitrogen), 니플루믹산 (Sigma), NPPB (5-니트로-2-(3-페놀프로필아미노)벤조익산, Tocris), DIDS (4,4'-디이소티오시아나토스틸 벤-2,2'-디설포닉산 디소듐염 하이드레이트, Sigma).

[0099] **4.4.4: 데이터 분석 및 통계 분석**

[0100] 수치 데이터는 means ± S.E.M로 나타내었다. 비교용 데이터의 유의성은 Student's two-tailed unpaired *t* test에 의하여 구하였고, 유의수준은 * (p < 0.05), ** (p < 0.01), 및 *** (p < 0.001)로 나타내었다. 데이터는 2kHz에서 필터링하였다.

[0101] Goldman-Hodgkin-Katz 방정식을 다음과 같이 계산하고 P_x/P_{Cl⁻}를 계산하였다.

[0102]
$$E_{rev} = RT/F \ln \{ P_{Cl^-} [Cl^-]_i + P_x [X]_i \} / \{ P_{Cl^-} [Cl^-]_o + P_x [X]_o \}$$

[0103] **4.4.5: 결과**

[0104] 천연 (naive) 마우스와 렌티바이러스 주입된 성체 마우스의 소뇌 내의 베르그만 교세포로부터 전세포 패치 클램프 기록을 수행하여 Best1의 기능적 발현을 탐색하였다. 내부용액으로, 상기한 바와 같이 음이온으로 주로 Cl⁻ 또는 GABA를 포함하고, 여기에 더하여 내재 Best1 채널 활성화를 위한 4.5 μM 유리 Ca²⁺를 포함하는 것을 사용하였다. 50 μM NPPB 적용 동안의 램프 전류 트레이스 (ramp current trace, 2초 후에 100mV 내지 -100mV)를 NPPB 적용 전 기초 조건의 램프전류 트레이스에서 공제하여 음이온 전류를 분리하였다 (도 2d 참조). 램프 트레이스의 시간을 전압으로 변환하여 각 세포에 대한 NPPB-민감성 음이온 전류의 전류-전압 관계를 얻었다 (Fig. 2d, 2e, 및 2f 참조). 도 2d는 램프 프로토콜 (ramp protocol, V_h= -70mV)을 사용한 교세포 패치 기록 결과를 보여준다. 음이온 전류는 naive GFAP-GFP 마우스에서 음이온 채널 차단제 NPPB (50 μM)에 의하여 감소하였다. GABA 및 Cl⁻의 내부용액 조성물은 상술한 바와 같다. 전류-전압 트레이스가 각각의 램프 트레이스로부터 발생하였다. 공제된 전류는 NPPB 민감성 전류를 나타낸다. 한편, 도 2e와 2f는 각각 scrambled shRNA 주입된 GFAP-GFP 마우스(2e)와 Best1-shRNA 주입된 GFAP-GFP 마우스(2f)에서의 전류-전압 트레이스를 보여준다.

[0105] 도 2g는 각각의 조건에 대한 NPPB 민감성 전류의 전류-전압 트레이스의 평균을 구하여 플로팅한 것을 보여준다. 역전전위(reversal potential)와 Goldman-Hodgkin-Huxley 방정식을 이용하여 GABA 투과성을 계산하였다. 천연 (naive) 베르그만 교세포에서의 Cl^- 내부 용액 하에서의 NPPB-민감성 음이온 전류는 -6.9mV의 역전전위를 나타내었다 (도 2g 참조, 검정색 트레이스, -3.5mV 접촉전위(junction potential)에 대하여 보정). 이는 바이카보네이트의 기여를 가정하여 ($P_{HCO_3}/P_{Cl}=0.44$; Qu and Hartzell, 2008), Goldman-Hodgkin-Huxley 방정식을 사용하여 +1mV의 역전전위로부터 계산한 값과 크게 다르지 않았다. 유사한 방법으로 GABA 내부용액 하에서의 NPPB-민감성 음이온 전류의 GABA 투과율을 측정하여 $P_{GABA}/P_{Cl}=0.19$ 를 얻었다(도 2g, 녹색 트레이스). 천연 (naive) 세포에서 얻은 GABA 투과율은 scrambled-shRNA 발현 베르그만 교세포의 GABA 투과율과 유의미한 차이가 없었다 (도 2g, 청색 트레이스). NPPB-민감성 전류를 Best1-shRNA 발현 베르그만 교세포로부터 분리시, 전류-전압 트레이스 기울기로 표시되는 나타나는 전도도는 역전전위 변화없이 매우 감소하였다 (도 2g, 적색 트레이스).

[0106] Cl^- 의 유입을 나타내는 100mV에서 측정된 외향전류는 Cl^- 내부용액과 GABA 내부용액 간 유의미한 차이를 보이지 않았으며 ($212.23 \pm 49.52pA$ (n=9), $112.52 \pm 20.93pA$ (n=8), $p=0.1$), 이는 Cl^- 의 유입이 내부적으로 Cl^- 를 GABA로 치환하는 것에 크게 영향을 받지 않는다는 것을 보여준다. GABA의 유출을 나타내는 -80mV에서 측정된 내향전류와 GABA 내부 용액 하에서 Cl^- 의 유입을 나타내는 100mV에서 측정된 외향전류는 모두 scrambled 및 Best1-shRNA 세포 간 상당한 차이를 나타내었다 (내향전류: $-44.62 \pm 5.01pA$ (n=10), $-12.99 \pm 5.92pA$ (n=9), $p<0.001$, 도 2h; 외향전류: $110.26 \pm 23.25pA$ (n=10), $38.31 \pm 12.02pA$ (n=9), $p=0.02$). 도 2h는 Cl^- 와 GABA의 유출을 비교하기 위하여 상기 도 2g에서 얻은 -80mV에서의 전류 크기를 보여준다. B1-shRNA 주입에 의한 베스트로핀 채널의 녹다운에 의하여 GABA 전류가 현저하게 감소하였음을 알 수 있다.

[0107] 이러한 결과는 베르그만 교세포에서 관찰되는 NPPB-민감성 음이온 전류가 대부분 휴지막전위(resting membrane potential)에서 GABA에 대한 상당한 투과성을 나타내는 Best1 채널에 의하여 매개됨을 나타내는 것이다.

[0108] **실시예 5: Best1 침묵에 의한 GABA 방출 억제 확인**

[0109] **5.1: 바이러스 주입**

[0110] B6 야생형, GFAP-GFP 및 hGFAP-CreERT2 트랜스제닉 마우스 (SPF room, Center for Neural Science, KIST, Seoul, Korea)에 2% 아베틴(avertin, 20 $\mu l/g$, sigma)을 복막내 주사하여 마취시키고, 입체정위 고정대 (stereotaxic frame, David Kopf instrument)에 놓았다. pSicoR-b1shRNA-mCherry 바이러스- (Macrogen) 또는 scrambled 바이러스(Macrogen)를 주사기펌프 (Harvard apparatus)와 25 μl 주사기 (Hamilton company)를 사용하여 0.2 $\mu l/min$ (총 2 μl)의 속도로 소뇌 피질에 스테레오 주입하였다. 주사 부위의 코오디네이션 (coordination)은 람다(lambda)로부터 1.7mm이고, 깊이는 두개골로부터 1.5-1.7mm로 하였다.

[0111] **5.2: 클로멜레온 이미징(Clomeleon imaging)**

[0112] Best1 채널이 소뇌에서의 긴장성 GABA 방출을 담당한다는 것을 시험하기 위하여, 소뇌의 과립세포에서의 독점적 발현을 갖는 Clomeleon 트랜스제닉 마우스의 Thy1::CLM1 라인(Department of Neurobiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA)을 사용하여 과립세포에서의 GABA_A 수용체 매개 $[Cl^-]_i$ 거동을 광유전학적 (optogenetic) 접근을 통하여 측정하였다 (도 3a 및 Berglund and Augustine 2008 참조).

[0113] 도 3a는, Clomeleon 이미징 전, 반투명 푸르키니에 세포 층(translucent Purkinje cell layer, 검은색 화살표)에 의하여 분리된, 밝은 형광색의 과립세포층의 과립세포체와 분자층 내에 위치하는 평행섬유를 나타내는 CLM1 clomeleon 마우스의 소뇌 절편의 CFP-YFP FRET imaging 기법을 통하여 세포내 Cl^- 농도의 변화를 측정된 결과를 보여주는 것이다. 녹색과 붉은색 사각형은 분자층(녹색)과 과립세포층(붉은색)의 목적 부위를 나타낸다.

- [0114] Clomeleon은 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기초하는 유전적으로 코딩된 Cl^- 에 대한 형광 지시제로서, 가변 펩타이드 링커(flexible peptide linker)를 통하여 클로라이드-무감응성 시안 형광 단백질과 융합된 클로라이드-민감성 황색 형광 단백질을 포함한다 (Kuner and Augustine, 2000). Clomeleon 마우스는 추가된 공간 정보와 함께 소뇌 과립세포에서의 긴장성 GABA 방출을 측정하는데 유용하다 (Berglund et al, submitted).
- [0115] 상기 Clomeleon 트랜스제닉 마우스에 pSicoR-b1shRNA-mCherry 바이러스(Macrogrn)를 주입한 후, 7-10일 후에 상기 바이러스 주입된 Clomeleon 트랜스제닉 마우스로부터 통상적인 방법으로 소뇌 박편을 제작하였다. 약술하면, 이소플루란으로 마취 후 머리를 자른 마우스로부터 뇌를 절제하고, 차가운 ACSF (artificial cerebrospinal fluid, 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM $NaHCO_3$, 20 mM d(+)-glucose, 2 mM $CaCl_2$ 및 1.3 mM $MgCl_2$ 포함, 95% O_2 /5% CO_2 , v/v로 버블링 후 pH 7.4로 조정)에 넣었다. 비브라툼(vibratome, LEICA)를 사용하여 200 μ m 두께의 sagittal section을 얻었다. 상기 박편을 사용전까지 36°C에서 30분동안 인큐베이팅하였다.
- [0116] 이미징을 위하여, 과립세포층과 분자층을 커버하는 두 개의 ROIs (Regions of Interest)를 drawn하였다. 여기필터 (440±10 nm)와 방출필터(CFP용: 485±15 nm, YFP용: 530±15 nm) (Cameleons 2 필터 세트 71007, Chroma Technologies, Rockingham, VT)를 사용하였다. 0.5 Hz에서의 200 내지 500 ms 동안의 연속적인 두 번의 긴 광펄스에 의하여 형광여기를 발생시키고, 형광방출은 온-칩 멀티플리케이션 게인 콘트롤(Cascade 512B, Photometrics)을 장착한 배면조사(back-illuminated) 냉각 CCD 카메라로 각 과장에서 번갈아 수집하였다. 이미지 획득은 RatioTool software (ISee Imaging Systems, Raleigh, NC) 및 PowerMac G4 (Apple Computer)로 조절하였다.
- [0117] 예상되는 바와 같이, 시냅스와 $GABA_A$ 수용체의 차단이 Cl^- 의 내향 거동을 감소시킴에 따라서, 10 μ M GABA_A (SR95531)의 bath 적용에 의하여 분자층 내의 평행섬유(도 3b, 녹색 트레이스)와 과립세포체 (도 3b, 적색 트레이스) 내의 $[Cl^-]_i$ 가 현저하게 감소하였다. 흥미롭게도, $[Cl^-]_i$ 의 감소는 과립세포와 분자층의 평행섬유에서 동등한 정도로 현저하게 나타났다. 10 μ M NPPB를 적용하는 경우 역시 두 층 모두에서 $[Cl^-]_i$ 를 감소시켰다 (도 3b). 이는 긴장성 GABA의 감소를 의미한다. 도 3b는 clomeleon의 비율이미지(ratiometric imaging)로서, 시간에 따른 $[Cl^-]_i$ 변화를 보여준다. 10 μ M SR (SR95531, 또는 GABA_A)와 음이온 채널 차단제, NPPB (10 μ M)는 $[Cl^-]_i$ 를 감소시키는 것으로 나타났다.
- [0118] NPPB에 의한 $[Cl^-]_i$ 변화 정도는 GABA_A (SR)에 의한 $[Cl^-]_i$ 의 변화와 밀접한 관련이 있다 (도 3c, r=0.96). 도 3c는 NPPB에 의한 $[Cl^-]_i$ 변화와 SR에 의한 $[Cl^-]_i$ 변화의 상관관계를 나타내는 그래프로, NPPB에 의한 $[Cl^-]_i$ 변화는 SR에 의한 $[Cl^-]_i$ 변화와 밀접한 상관관계가 있음을 보여준다.
- [0119] 이러한 $GABA_A$ 수용체 활성화 유도 $[Cl^-]_i$ 변화가 Best1 채널 의존적인지 여부를 시험하기 위하여, Best1 유전자 침묵을 갖는 Clomeleon 마우스의 과립세포의 $[Cl^-]_i$ 농도를 측정하였다. GABA_A에 의한 $[Cl^-]_i$ 농도 변화는, scrambled shRNA 주입된 소뇌 절편(4.29±0.91mM, 3.84±0.82mM, (n=8), 도 3d)과 비교하여, Best1-shRNA 주입된 소뇌 절편(molecular layer: 10.63±1.45mM, granule cell layer: 11.44 ±1.5mM, (n=8), 도 3e)에서 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 상기 도 3d 및 3e에 나타난 scrambled shRNA 주입된 소뇌 절편과 Best1-shRNA 주입된 소뇌 절편에서의 SR에 의한 $[Cl^-]_i$ 변화를 정리하여 도 3f에 나타내었다 (p< 0.005). 이러한 결과는 Best1 채널의 유전자 침묵이 과립세포의 평행섬유에서만 아니라 soma에서도 긴장성 GABA 방출을 감소시킴을 나타낸다.
- [0120] 5.3: 전세포 패치 클램프 기록

- [0121] Clomeleon 마우스로부터 얻은 결과를 Best1-shRNA 렌티바이러스가 주입된 성체 마우스의 과립세포에서의 전세포 패치 클램프 기록에 의하여 확인하였다. GABA_A-민감성 전류는, 비변형(naive) 마우스 (35.68 ± 4.05 pA (n=8), $p \ll 0.001$, 도 3g 위쪽 패널) 또는 scrambled 마우스(26.62 ± 2.85 pA (n=13), $p \ll 0.001$, 도 3g 가운데 패널)의 경우와 비교하여, Best1-shRNA 렌티바이러스 주입된 마우스에서 현저하게 감소하였다 (도 3g 아래쪽 패널, 8.28 ± 0.57 pA, n=14). 도 3g의 위쪽 트레이스는 8주령 B6 마우스의 소뇌 박편 (유지전위(holding potential): -60mV)의 과립세포로부터 얻은 긴장성 GABA 전류의 가공전 트레이스를 보여준다. 긴장성 GABA 전류는 $50 \mu\text{M}$ NPPB의 bath 적용에 의하여 감소하였다. 파란색 화살표는 GABA_A (SR) 민감성 긴장성 GABA 전류를 나타내고, 주황색 화살표는 NPPB-민감성 긴장성 GABA 전류를 나타낸다. 가운데 트레이스는 scrambled shRNA 렌티바이러스 주입된 마우스에 대한 것이고, 아래 트레이스는 B1-shRNA 렌티바이러스 주입된 마우스에 대한 것이다.
- [0122] 반면, GABA_A-민감성 전류는 비변형 마우스와 scrambled 마우스 간에 큰 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.09$, 도 3h). 도 3h는 naive, scrambled, 및 B1-shRNA 주입된 마우스로부터 얻은 GABA_A-민감성 전류를 요약한 것이다. Best1 채널의 유전자 침묵은 Best1-shRNA 주입된 마우스에서의 긴장성 GABA 전류의 NPPB-민감성 성분을 사실상 제거하며(-1.23 ± 3.08 pA, n=4), 이는 비변형 마우스(18.95 ± 2.47 pA (n=8), $p < 0.002$) 또는 scrambled 마우스 (12.98 ± 2.57 pA (n=4), $p < 0.02$, n=4)와 비교할 때 현저한 차이를 보이는 것이다 (도 3i 참조). 도 3i는 NPPB 민감성 전류에 대한 요약을 보여준다.
- [0123] NPPB는 GABA-유도 전세포 전류에 직접적인 영향을 미치지 않기 때문에(도 7c 및 7d 참조), NPPB에 의한 긴장성 GABA 전류의 차단은 과립세포에서 발견되는 GABA_A 수용체 상의 이 화합물의 직접적 작용에 기인하는 것은 아니라고 생각한다. 도 7c와 7d는 야생형 B6 마우스에 NPPB 적용이 소뇌 과립세포 내의 GABA 수용체에 영향을 미치지 않음을 보여주는 것으로, NPPB 적용(2분 및 5분)에 따른 GABA 유도 전류 크기를 보여주는 그래프이다.
- [0124] 또 다른 음이온 차단제인, NFA와 DIDS 역시 GABA_A-민감성 전류를 현저하게 차단하는 것으로 나타났다 (도 6b 및 6g 참조). 도 5b는 과립세포에서의 $100 \mu\text{M}$ 니플루믹산 처리에 따른 긴장성 GABA 전류를 보여주는 것이고, 도 5g는 Ca^{2+} 민감성 Cl^- 채널 차단제에 의한 긴장성 전류의 억제율 (%)를 나타낸다 (사용된 마우스의 연령: 29.5 ± 0.79 , 27 ± 0 , 27.5 ± 0.87 , 28 ± 0.71 , 및 74일 (DIDS)).
- [0125] 이러한 결과는 NPPB-민감성 긴장성 GABA 방출이 소뇌의 Best1 채널에 의하여 매개된다는 것과, 긴장성 GABA 전류는 음이온 채널 차단제에 의하여 억제되고 베스트로핀 채널의 유전자 침묵에 의하여 감소한다는 것을 보여준다.
- [0126] **실시예 6: 교세포 특이적 Best1 채널 구조(rescue)에 의한 긴장성 GABA 전류의 회복 시험**
- [0127] 교세포 특이적으로 Best1 유전자 침묵이 일어나지 않도록 하기 위하여, 타모시펜(tamoxifen)과 Best1-shRNA 렌티바이러스가 함께 주입된 hGFAP-CreERT2 마우스를 이용하여 긴장성 GABA 방출이 교세포 Best1에 의한 것인지 여부를 시험하였다 (도 4a 및 4b 참조).
- [0128] 렌티바이러스 주입 전에 5일 동안 타모시펜을 복막내 주입하여 교세포 특이적 CreERT 활성화를 개시시켰다 (Fig. 4a,b). 도 4a는 hGFAP-CreERT 마우스에 대한 시험 설계를 개략적으로 보여주는 것이다. Tamoxifen 또는 해바라기 오일을 렌티바이러스 주입 전에 5일 동안 하루에 한번씩 복막내 주입하였다. 이러한 시험 설계 하에서, 상기 발견된 CreERT는 핵으로 이동되어 Best1-shRNA 포함 카세트를 제거하여 Best1-shRNA를 불활성화시킨다 (도 4b 참조). 도 4b는 교세포 특이적 구조(rescue)를 모식적으로 보여주는 것으로, Cre-ERT는 GFAP 프로모터 하에서 교세포 특이적으로 발현하고, tamoxifen 주입에 의하여 활성화되고, shRNA에 의하여 불활성화된다.
- [0129] Best1의 교세포 특이적 구조(rescue)의 효과를 타모시펜 또는 해바라기 오일 주입된 hGFAP-CreERT2 마우스 중 하나에서 Best1 항체를 사용하는 면역조직화학적 방법으로 확인하였다 (도 8b 참조). 한편, 도 4c는 교세포에서의 전세포 패치 클램프 기록을 보여준다. 위쪽 트레이스는 해바라기 오일 처리 후 B1-shRNA 렌티바이러스 주입된 hGFAP-CreERT 마우스에서의 긴장성 GABA 전류를 보여준다. 아래 왼쪽은 tamoxifen 처리 후 B1-shRNA 렌티바이러스 주입된 hGFAP-CreERT에서의 긴장성 GABA 전류의 가공전 트레이스를 보여준다. Best1-shRNA 렌티바이러스 주입되고 해바라기 오일 처리된 hGFAP-CreERT2 마우스에서, GABA_A-민감성 전류가 동일한 렌티바이러스 주입된 야생형 B6 마우스(도 3b 참조)와 유사한 수준까지 현저하게 감소하였다(도 4c, 위쪽

트레이스, $35.68 \pm 4.05 \text{pA}$ (naive, n=8), $11.27 \pm 1.22 \text{pA}$ (해바라기 오일 처리, n=9), $p < 0.003$). 그러나, 타모시펜 처리되고 Best1-shRNA 렌티바이러스 주입된 hGFAP-CreERT2 마우스에서, GABA_A 수용체 전류는 비변형 수준으로 완전히 회복되었다(도 4c, 아래쪽 트레이스, Tamoxifen 처리: $31.31 \pm 2.19 \text{pA}$ (n=8), naive: $35.68 \pm 4.05 \text{pA}$ (n=12), $p=0.36$).

[0130] 도 4d는 타모시펜 처리되거나 처리되지 않은 경우의 GABA_A 수용체 전류를 나타내는 것이다. 도 4d에 나타난 바와 같이, 타모시펜 처리되거나 처리되지 않은 경우의 GABA_A 수용체 전류는 상당한 차이를 보였다 ($p < 0.001$). 도 4e는 타모시펜 처리되거나 처리되지 않은 경우의 NPPB-민감성 전류를 나타내는 것이다. 도 4e에서 알 수 있는 바와 같이, NPPB-민감성 전류는 또한 타모시펜 처리된 마우스에서 완전히 회복되었다 (naive: $18.95 \pm 2.47 \text{pA}$, n=8; with Tamoxifen: $19.27 \pm 2.2 \text{pA}$ n=9, $p=0.93$; without Tamoxifen: $1.93 \pm 1.56 \text{pA}$, n=4, $p=0.00005$). 이러한 결과는 교세포 Best1 채널이 소뇌 과립세포에서 검출되는 대부분의 긴장성 GABA 방출을 담당함을 나타내는 것이다.

[0131] NPPB 민감성 및 Best1-매개 긴장성 GABA 방출량은 전체 GABA_A 수용체 전류의 약 70% 정도이다. 잔존하는 GABA_A 수용체 민감성, NPPB-무감응성, 및 Best1-독립적 전류의 소스가 현재까지 알려지지 않은 상태이고 이에 대한 추가적 연구가 필요하다. 클로닝된 베스트로핀 채널은 ~200nM 범위에서 Ca^{2+} 에 의한 활성화를 위한 걸보기 Kd를 갖는 낮은 Ca^{2+} 농도 범위에서 활성화되는 것으로 알려져있다 (Hartzell, et al, 2008). 천연(naive) Best1 채널이 동일한 Ca^{2+} 민감성을 갖는다면, 기저 유리 세포질 Ca^{2+} 이 통상적으로 약 100nm이기 때문에, Best1 채널은 언제나 부분적으로 활성화되어야 하며, 이는 상기 채널을 통한 GABA의 구성적 방출(constitutive release)을 유발하게 된다. 이러한 제안에 부합하여, 25 min BAPTA-AM 처리에 의한 유리 세포질 Ca^{2+} 의 킬레이팅에 의하여 GABA_A 수용체 전류가 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(도 6c, 6d, 6f, 및 6g 참조). 도 6c는 과립세포에서의 150 μM BAPTA-AM과 함께 인큐베이팅한 경우의 긴장성 GABA 전류를 나타낸 것이고, 도 6d는 0.5 μM 콘카나마이신 A(concanamycin A)와 함께 인큐베이팅한 경우의 긴장성 GABA 전류를 나타낸 것으로, 상기 도 6c와 6d에서 알 수 있는 바와 같이, BAPTA-AM 처리시에는 긴장성 GABA 전류가 현저하게 감소한 반면, 콘카나마이신 A 처리시에는 그렇지 않았다. 도 6f는 무처리, 콘카나마이신 A 처리 및 BAPTA-AM 처리시의 GABA_A 수용체 전류를 보여준다.

[0132] Clomeleon 이미징으로부터 얻어진 이러한 결과는 긴장성 GABA가 분자층의 평행 섬유로부터 검출될 수 있고, 이렇게 베르그만 세포의 줄기로부터 방출된 이러한 GABA는 강력한 억제성 역할을 할 수 있으며, 나아가 푸르키니에 세포의 덴드라이트 상의 글루타메이트의 시냅스 방출과 평행섬유의 국부적 흥분도에 깊은 영향을 미친다는 것을 제안한다(도 4f). 도 4f는 소뇌에서의 긴장성 GABA 방출의 제안 모델이다.

[0133] 요컨대, 본 발명은 최근에 특징이 밝혀진 소뇌 교세포의 베스트로핀 채널을 통한 긴장성 GABA 방출의 메커니즘, 직접적 투과에 의한 전달물질의 채널 매개 방출에서의 특유한 역할, 및 뉴런 흥분성을 조절하는 주요 억제성 전달물질 GABA를 방출하는데 있어서의 교세포의 신규한 기능을 처음 제안하는 것이다. 이러한 억제성 교세포 전달물질(gliotransmitter)의 채널 매개 방출의 중요성은 뇌 기능에서의 교세포의 아직 밝혀지지 않은 많은 생리학적 역할에 대한 이해를 제공할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0134] 도 1a 내지 1d는 소뇌 교세포는 GABA를 포함하며, 직접 투과에 의하여 GABA를 방출하는 베스트로핀1 (Best1) 채널을 발현함을 보여주기 위한 것으로,

[0135] 1a는 GFAP-GFP 트랜스제닉 마우스 소뇌에서의 GFP, Best1, 및 GABA에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 공초점 이미징이고,

[0136] 1b는 2-세포 스니퍼 패치(two-cell sniffer patch)의 개략도이고,

[0137] 1c는 GABA의 투과 정도를 보여주는 결과이고,

[0138] 1d는 기재된 조건 하에서의 GABA 방출 활성화 정도를 보여주는 것이다.

[0139] 도 2a는 Cre-lox 조절 pSicoR-shRNA 렌티바이러스 구조체 모습을 보여주는 개략도이고,

[0140] 2b는 B6 또는 GFAP-GFP 마우스를 사용하는 실험 일정을 보여주는 것이고,

[0141] 2c는 GFAP-GFP (녹색) 염색, Best1 (자홍색), 및 mCherry (붉은색)를 포함하는 B1-shRNA 렌티바이러스의 모습

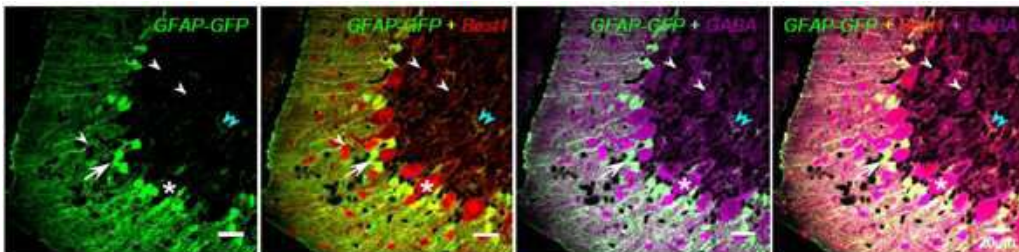
을 보여주는 것이고,

- [0142] 2d는 램프 프로토콜 (ramp protocol, $V_h = -70\text{mV}$)을 사용한 교세포 패치 기록 결과를 보여주는 것이고,
- [0143] 2e 및 2f는 각각 scrambled shRNA 주입된 GFAP-GFP 마우스(e)와 Best1-shRNA 주입된 GFAP-GFP 마우스(f)에서의 전류-전압 트레이스를 보여주는 것이고,
- [0144] 2g는 기재된 조건에 대한 NPPB 민감성 전류의 전류-전압 트레이스의 평균을 구하여 플로팅한 것을 보여주는 것이고,
- [0145] 2h는 Cl^- 와 GABA의 유출을 비교하기 위하여 g에서 얻은 -80mV 에서의 전류 크기를 보여주는 것이다.
- [0146] 도 3a 내지 3i는 긴장성 GABA 전류는 음이온 채널 차단제에 의하여 억제되고 베스트로핀 채널의 유전자 침묵에 의하여 감소함을 보여주는 것으로,
- [0147] 3a는 반투명 푸르키니에 세포 층(translucent Purkinje cell layer, 검은색 화살표)에 의하여 분리된, 밝은 형광색의 과립세포층의 과립세포체와 분자층 내에 위치하는 평행섬유를 나타내는 CLM1 clomeleon 마우스의 소뇌 절편의 모습을 보여주는 것이고,
- [0148] 3b는 clomeleon의 비율이미지(ratiometric imaging)로서, 시간에 따른 $[\text{Cl}^-]_i$ 변화를 보여주는 것이고,
- [0149] 3c는 NPPB에 의한 $[\text{Cl}^-]_i$ 변화는 SR에 의한 $[\text{Cl}^-]_i$ 변화와의 상관관계를 보여주는 그래프이고,
- [0150] 3d는 scrambled-shRNA 렌티바이러스 주입된 마우스로부터 얻은 Colmeleon 이미징 결과이고,
- [0151] 3e는 B1-shRNA 주입된 마우스로부터 얻은 Clomeleon 이미징 결과이고,
- [0152] 3는 각각의 바이러스 타입과 각각의 층에서의 clomeleon 이미징 결과를 요약한 것이고,
- [0153] 3g는 8주령 B6 마우스의 소뇌 슬라이스(유지전위(holding potential): -60mV)의 과립세포로부터 얻은 긴장성 GABA 전류의 가공된 트레이스를 보여주는 것이고,
- [0154] 3h는 naive, scrambled, 및 B1-shRNA 주입된 마우스로부터 얻은 GABA_{zine}-민감성 전류를 요약한 것이고,
- [0155] 3i는 NPPB 민감성 전류를 요약한 것이다.
- [0156] 도 4a 내지 4f는 Best1 채널의 교세포 특이적 구조(rescue)가 긴장성 GABA 전류를 회복시킴을 보여주는 것으로,
- [0157] 4a는 hGFAP-CreERT 마우스에 대한 시험 일정을 나타낸 것이고,
- [0158] 4b는 교세포 특이적 구조(rescue) 메커니즘을 모식적으로 보여주는 것이고,
- [0159] 4c는 교세포에서의 전세포 패치 클램프 기록을 보여주는 것이고,
- [0160] 4d는 naive, shRNA 및 shRNA+Tamoxifen 경우의 GABA_{zine}-민감성 긴장성 GABA 전류를 보여주고,
- [0161] 4e는 naive, shRNA 및 shRNA+Tamoxifen 경우의 NPPB-민감성 긴장성 GABA 전류를 보여주고,
- [0162] 4f는 소뇌에서의 긴장성 GABA 방출의 제안 모델이다.
- [0163] 도 5는 성체 마우스 소뇌의 교세포에서 mBest1과 GABA가 강력하게 발현됨을 보여주는 것으로,
- [0164] a는 마우스 소뇌에서의 GABA, Best1 및 GFAP-GFP의 면역조직화학적 공초점 이미지이고,
- [0165] b는 소뇌의 GABA 및 GFAP-GFP 염색의 고배율 이미지이고,
- [0166] c는 Best1와 GFAP 염색의 고배율 (X60) 이미지이다.
- [0167] 도 6a 내지 6g는 소뇌 과립세포층에서의 긴장성 GABA 방출은 Ca^{2+} 의존적이고, 비소포성(non-vesicular)이며, 음이온 차단제에 의하여 억제됨을 보여주는 것으로,
- [0168] 6a는 아래의 6a-6g의 결과를 얻는데 사용된 시편 과립 세포 및 분자 세포 층의 현미경 관찰 사진을 보여주는 것이고 (upper panel;X40, lower panel;X600),

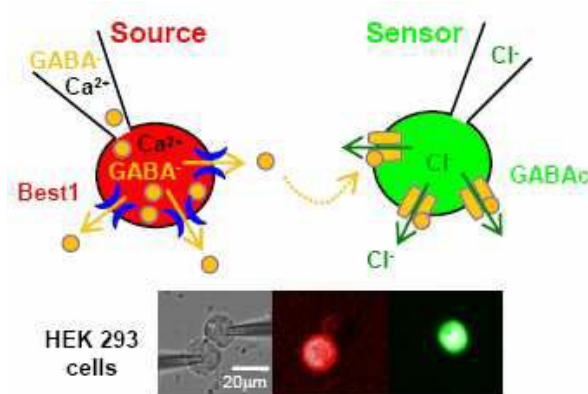
- [0169] 6b 내지 6e는 각각 100 μM 니플루믹산 처리한 경우, 150 μM BAPTA-AM과 함께 인큐베이팅하는 경우, 0.5 μM 콘카나마이신 A(concanamycin A)와 함께 인큐베이팅하는 경우 및 30 μM NPPB 처리한 경우의 긴장성 GABA 전류 기록을 나타낸 것이고,
- [0170] 6f는 무처리, 콘카나마이신 A BAPTA-AM 처리시의 GABA_A 민감성 전류 결과를 요약한 것이고,
- [0171] 6g는 Ca²⁺ 민감성 Cl⁻ 채널 차단제에 의한 긴장성 전류의 억제율 (%)를 나타낸다.
- [0172] 도 7a 내지 7d는 NPPB는 GABA 수용체에 직접 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 것으로,
- [0173] 7a와 7b는 GABA_A를 발현하는 HEK293 세포를 100 μM NFA(a)와 100 μM NPPB(b)의 부재 또는 존재 하에서 패치 클램핑하고 100 μM GABA로 감염 (challenge)시킨 결과를 보여주는 것이고,
- [0174] 7c와 7d는 NPPB의 적용이 소뇌 과립 세포 상의 GABA 수용체에는 영향을 미치지 않음을 보여주는 것으로, NPPB 처리 (2분 및 5분)시의 GABA 유도 전류를 baseline과 비교하여 나타낸 것이다.
- [0175] 도 8a는 shRNA 및 scrambled RNA 주입된 마우스에서의 mCherry 신호의 형광이미지를 보여주는 것이고 (Scale bars; 200 μm (X10) and 50 μm (X40)),
- [0176] 8b는 hGFAP-Cre 마우스에서의 유전자 침묵에 의한 Best1 녹다운 실험을 보여주는 것으로, 왼쪽 패널은 타모시펜 주입된 hGFAP-Cre 마우스에 주입된 B1-shRNA 렌티바이러스 모습을 나타내고 (붉은색), 가운데 패널은 동일한 부위 에서 Best1 염색된 이미지이며, 오른쪽 패널은 교세포(Glial cell)의 마커인 GFAP를 염색한 이미지와 함께 왼쪽 패널과 가운데 패널 이미지를 병합시킨 이미지이고, Best1(자홍색)은 렌티바이러스 감염 부위와 비감염 부위에서 유사하게 염색됨을 보여준다. Scale bar; 100 μm

도면

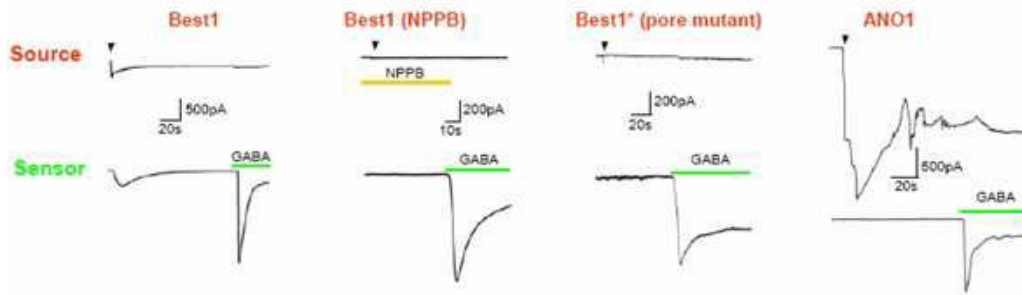
도면1a



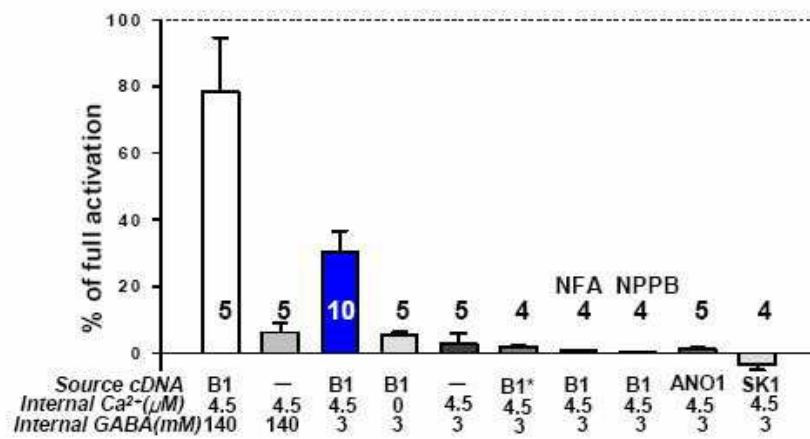
도면1b



도면1c



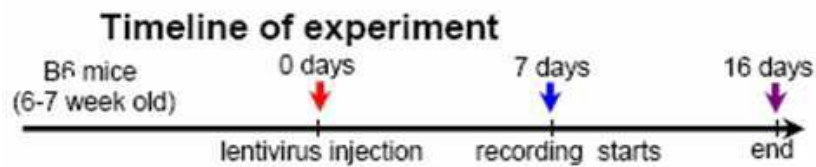
도면1d



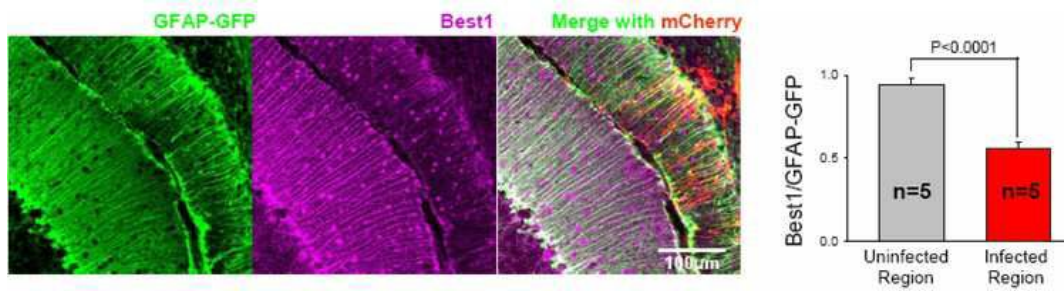
도면2a



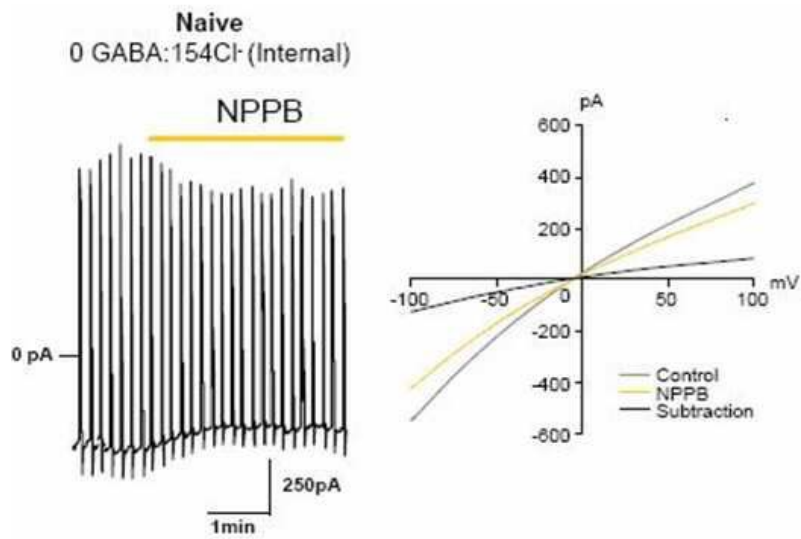
도면2b



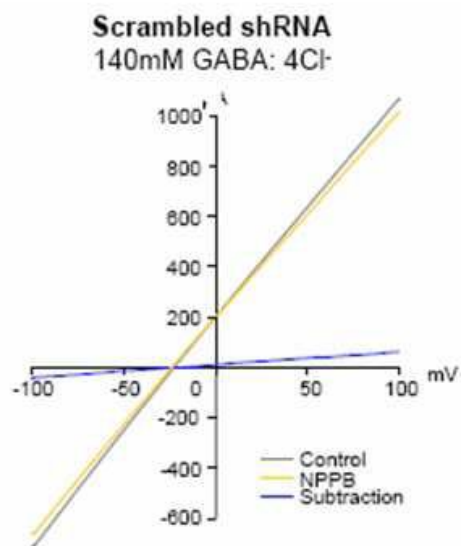
도면2c



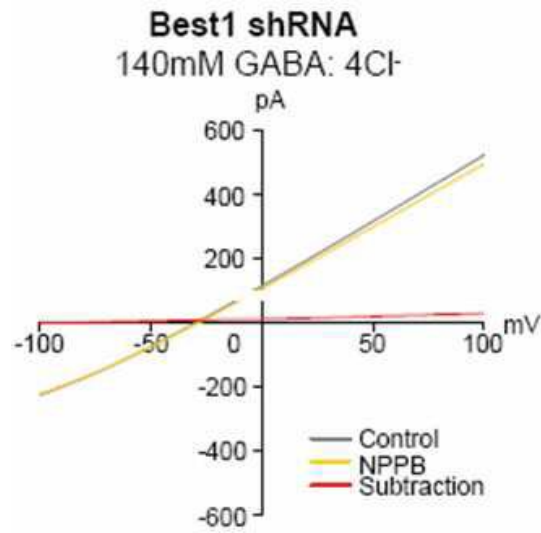
도면2d



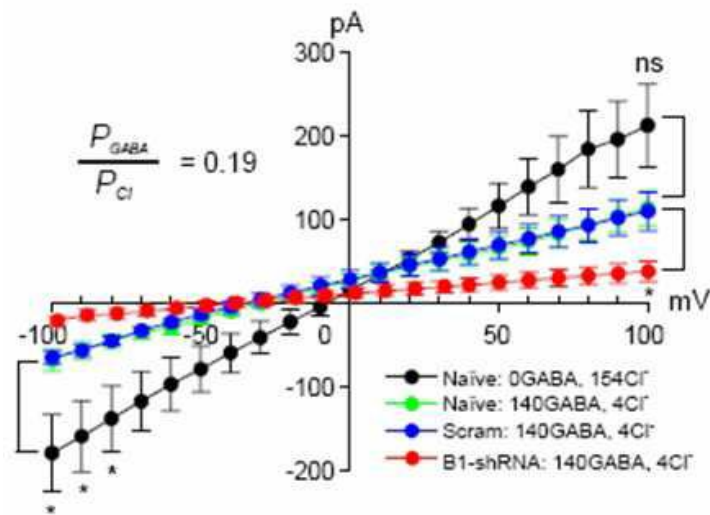
도면2e



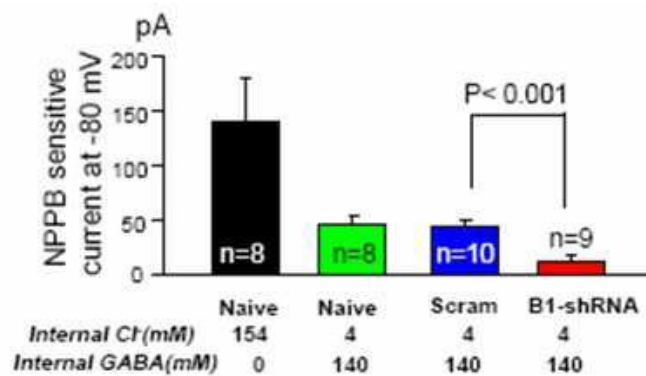
도면2f



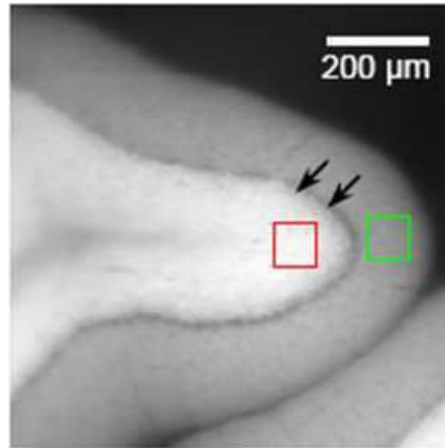
도면2g



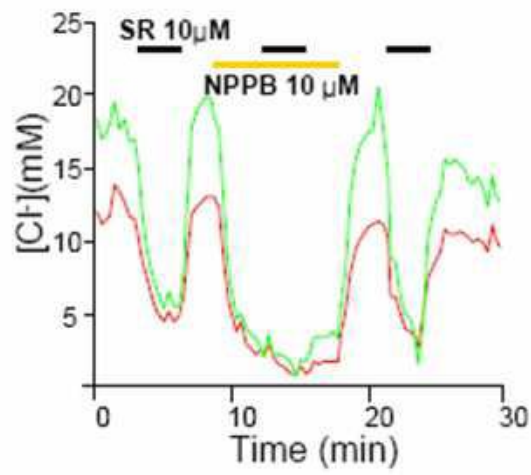
도면2h



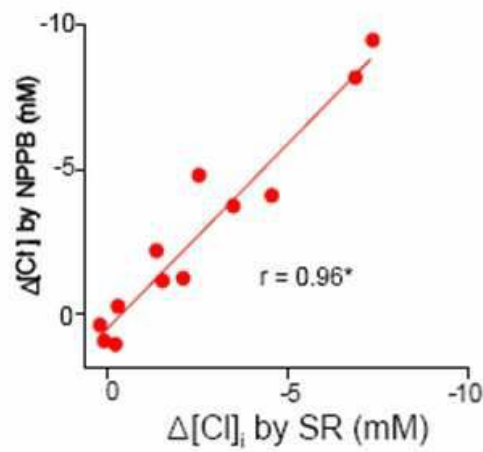
도면3a



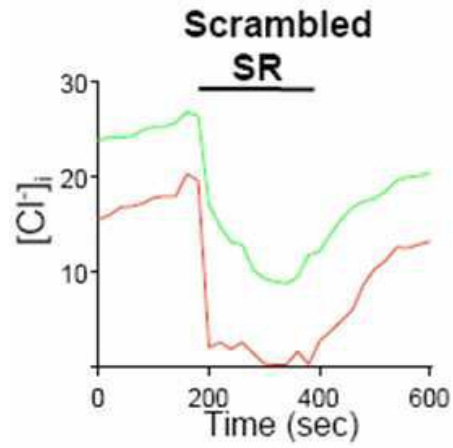
도면3b



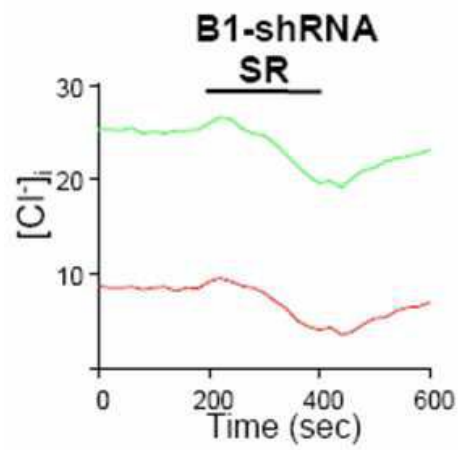
도면3c



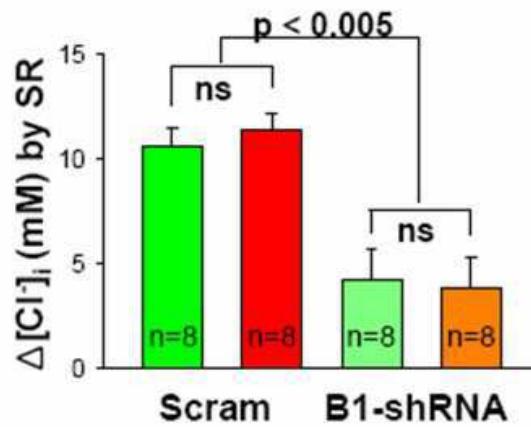
도면3d



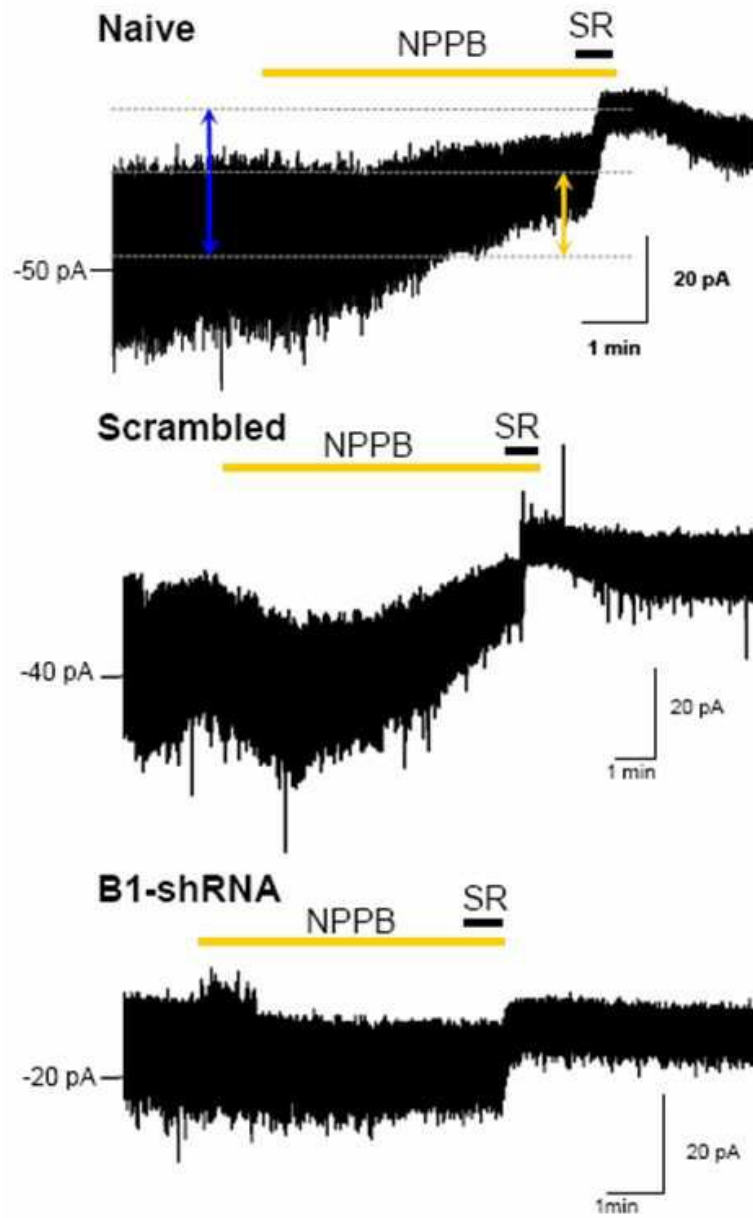
도면3e



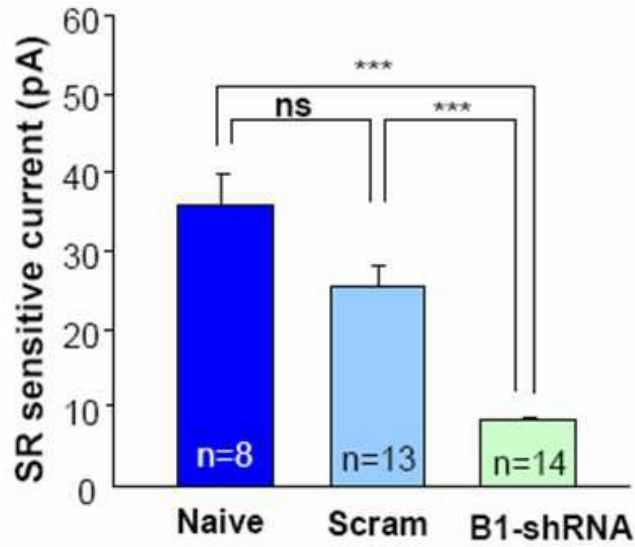
도면3f



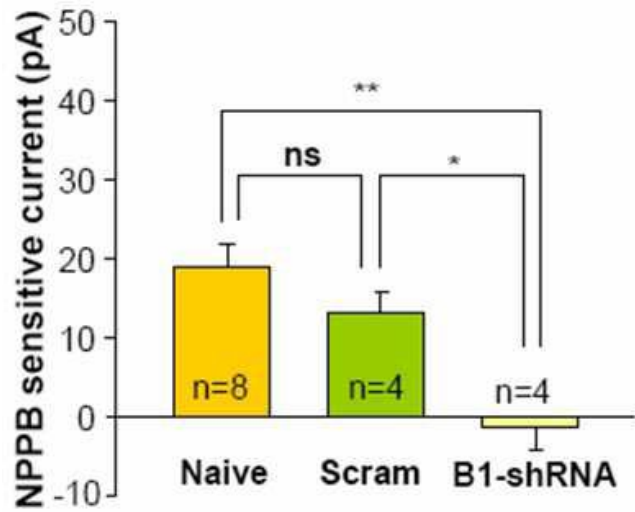
도면3g



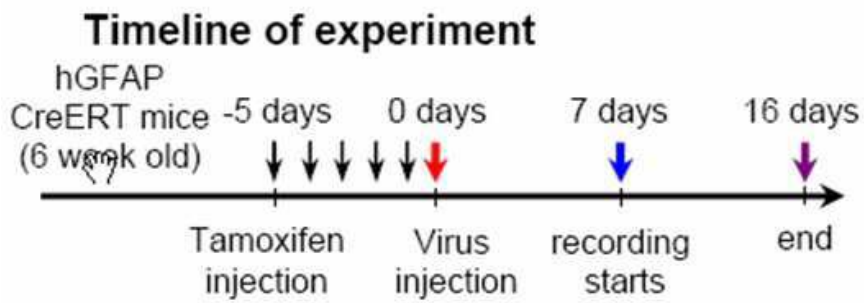
도면3h



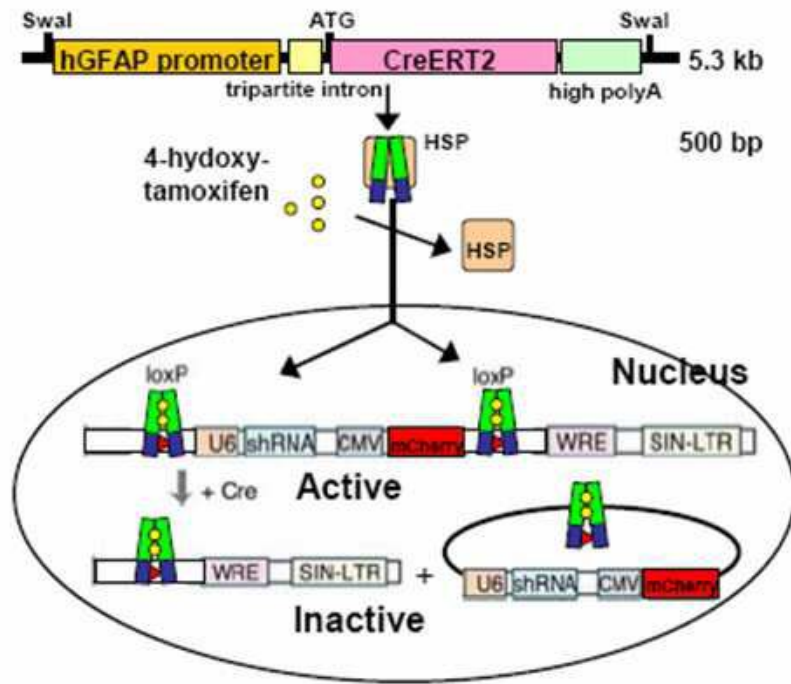
도면3i



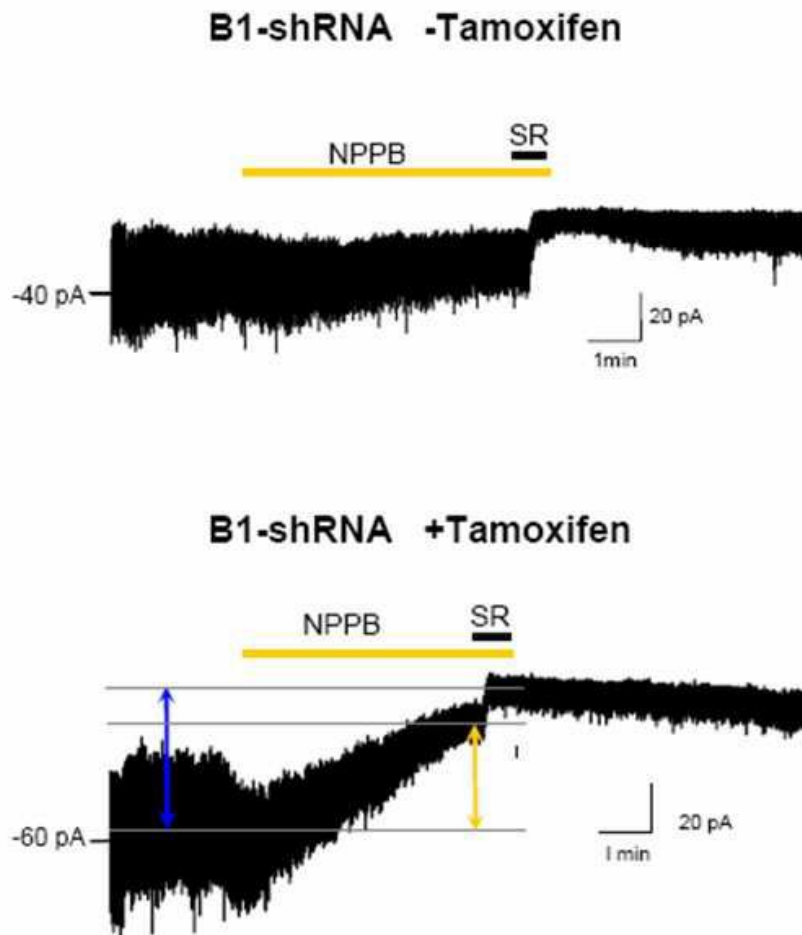
도면4a



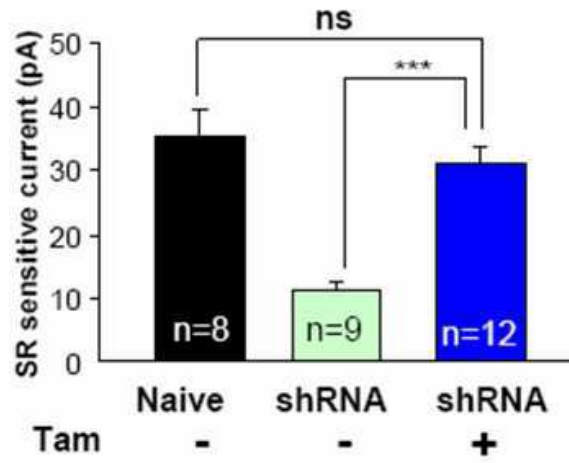
도면4b



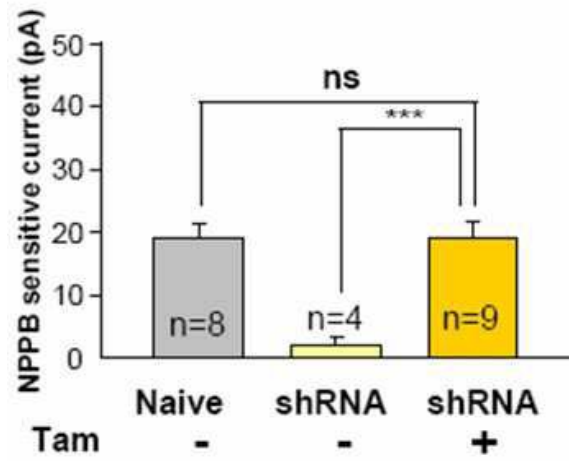
도면4c



도면4d

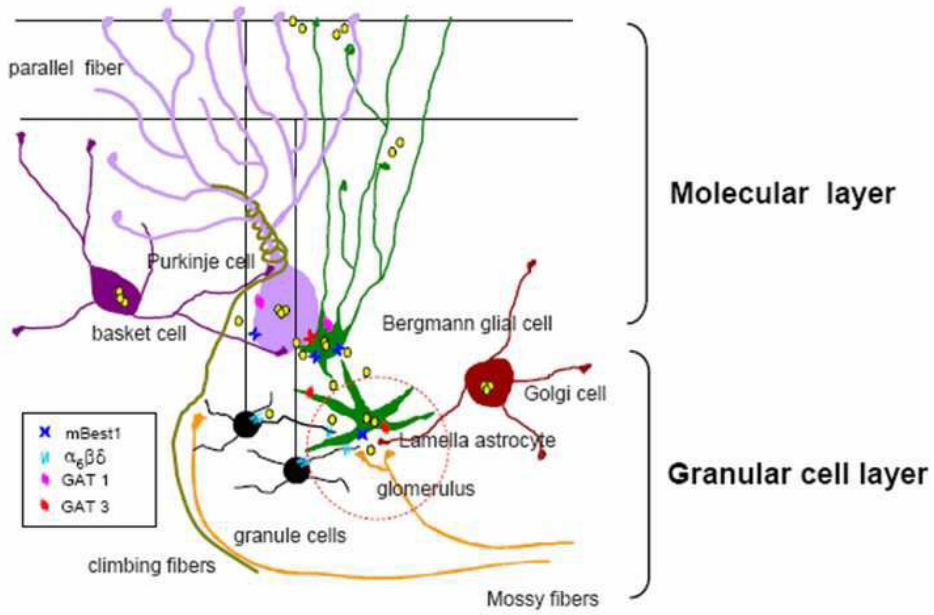


도면4e

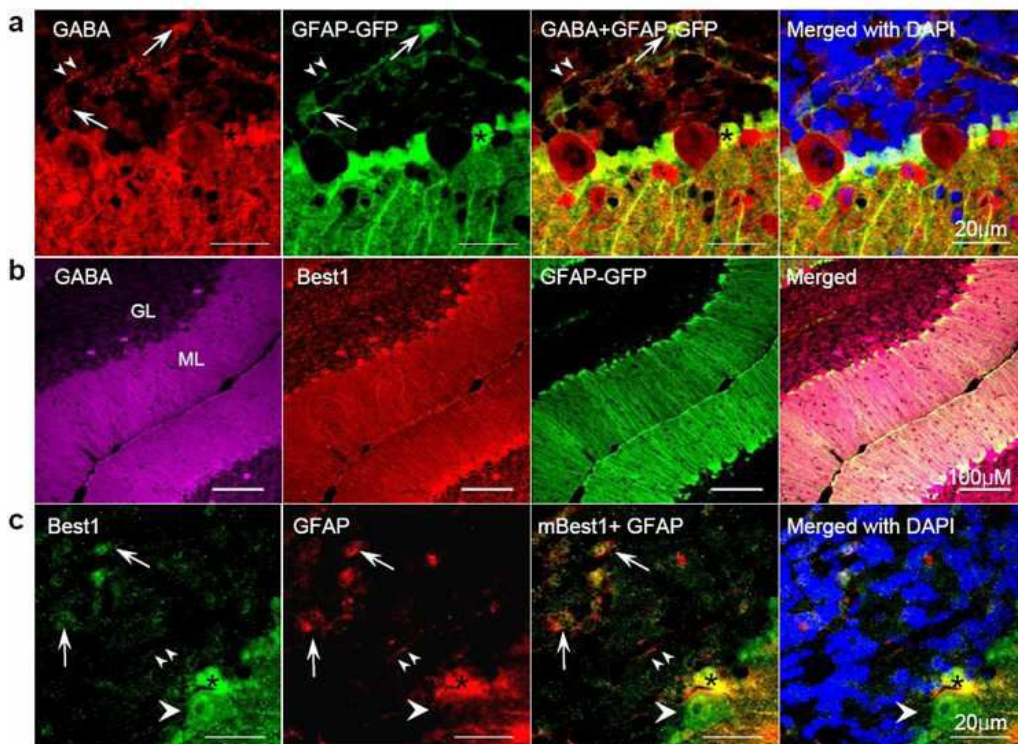


도면4f

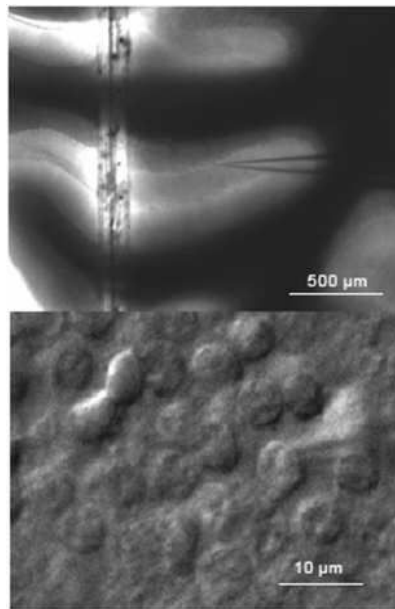
Hypothetical schematic for tonic GABA generation



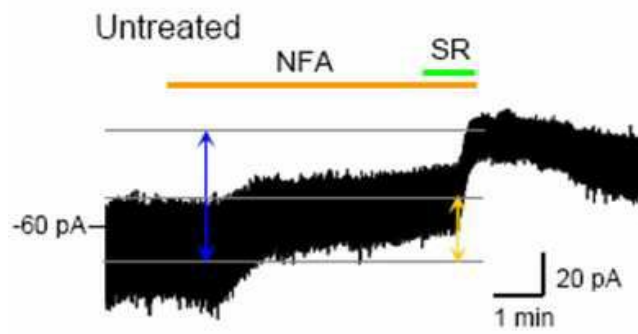
도면5



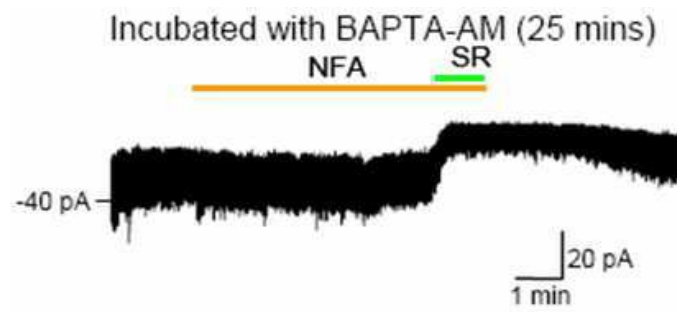
도면6a



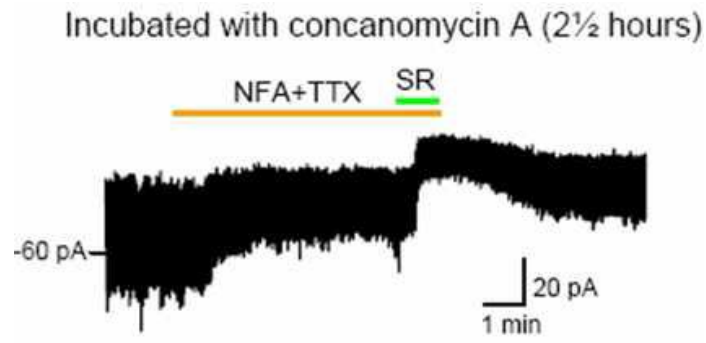
도면6b



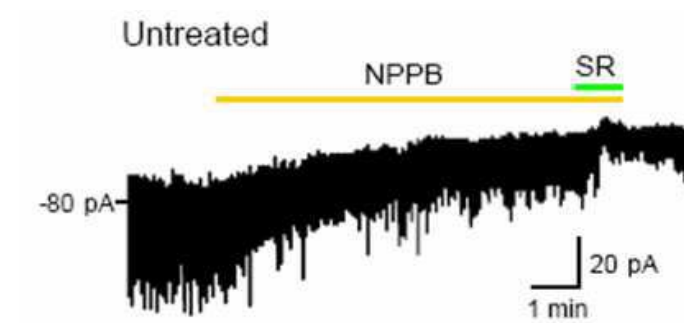
도면6c



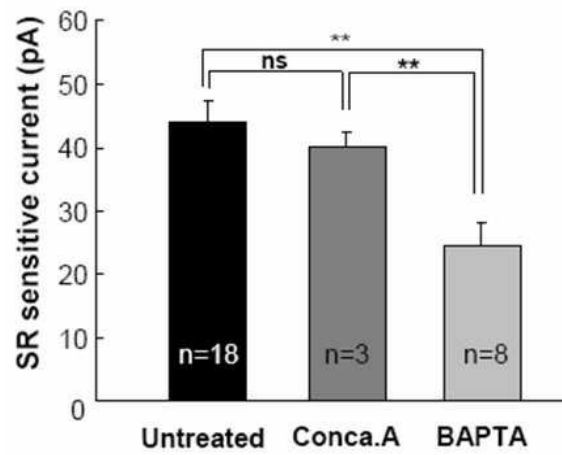
도면6d



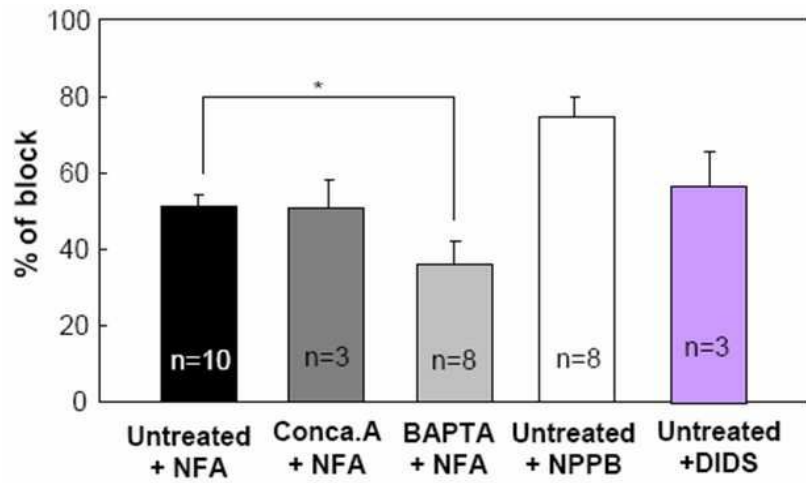
도면6e



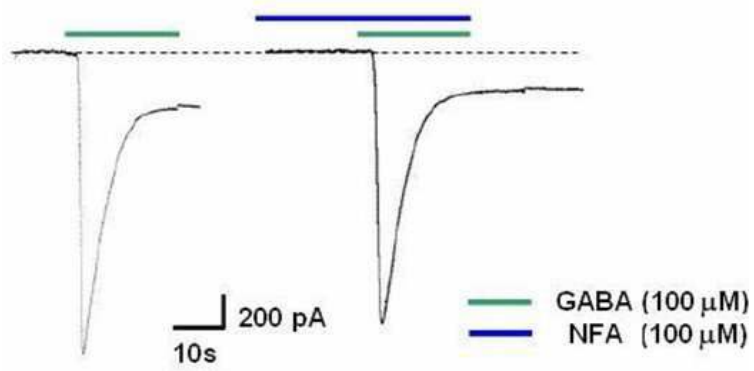
도면6f



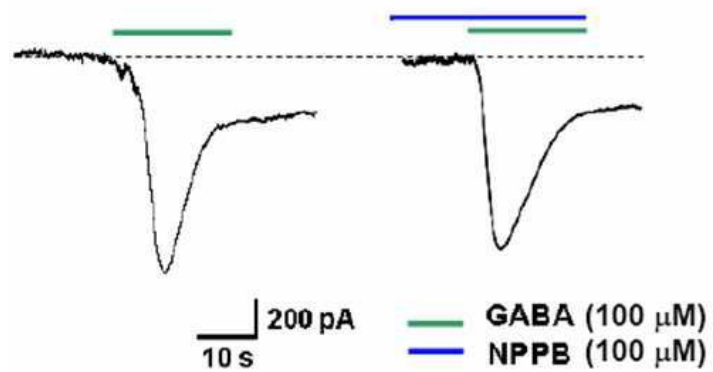
도면6g



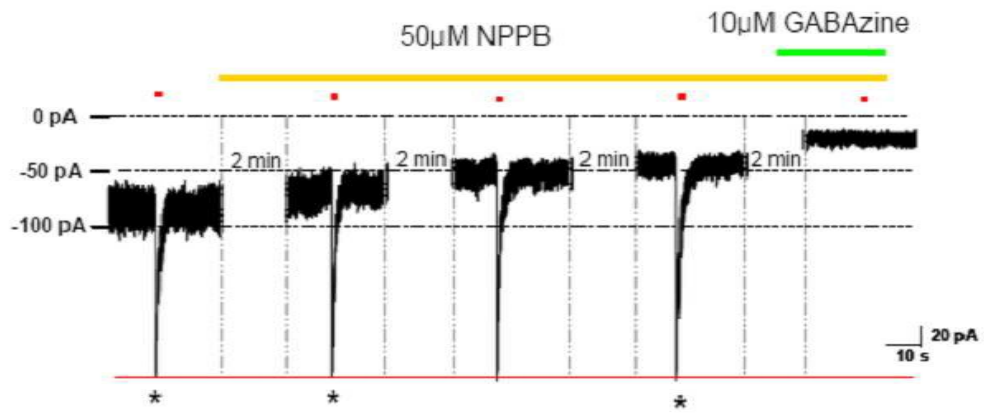
도면7a



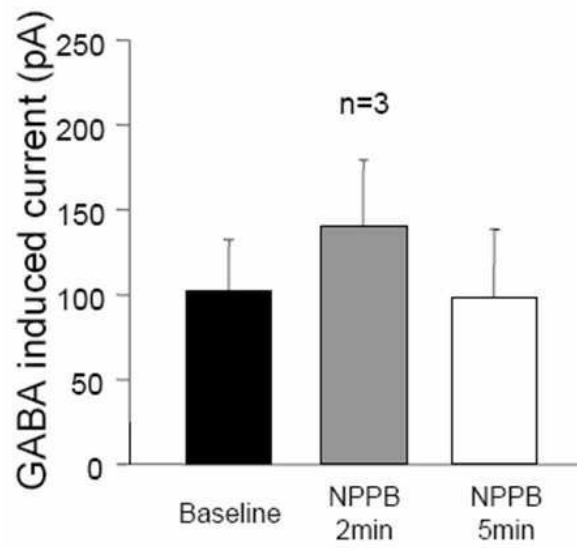
도면7b



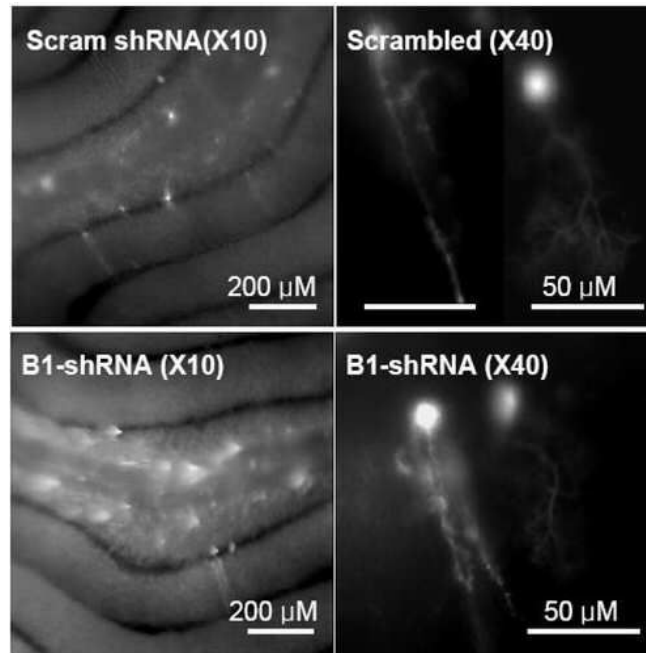
도면7c



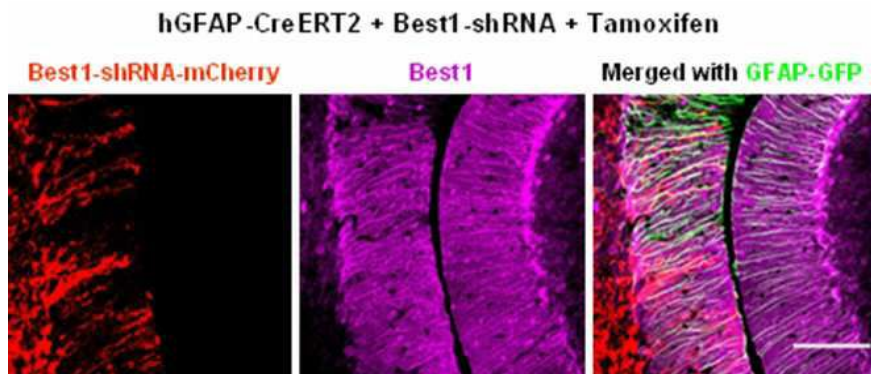
도면7d



도면8a



도면8b



서열 목록

<110> Korea Institute of Science and Technology
 <120> GABA release-regulating agent in cerebellum

<130> DPP-2009-2631-KR

<160> 7

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1904
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mouse Bestrophin 1 gene (NM_011913)

<400> 1
 gaccaagcc cactactgc tgcccagtgc caagccatga ctatcaccta cacaaacaaa 60
 gtagccaatg cccgcctcgg ttcgttctcg tcctctctcc tgtgctggcg aggcagcatc 120
 tacaagctgc tgiatggaga attccttgc ttcatttcc tctactattc catccgtgga 180
 ctctacagaa tggttctctc gagtgatcag cagctgttgt ttgagaagct ggctctgtac 240
 tggcacagct acatccagct catccctata tccttcgttc tgggtttcta tgttacattg 300
 gtggtgagcc gctggtggag ccagtacgag aacttgccgt ggcccagccg cctcatgatc 360
 caggtgtcta gcttcgtgga gggcaaggat gaggaaggcc gtttgcctgc gcgcacgctc 420
 atccgctacg ccacctctggg ccaagtgtc atcctgcga gcatcagcac ctcggtctac 480
 aagcgcttcc cactcttca ccacctggtg ctagcaggtt ttatgacca tggggaacat 540
 aagcagttgc agaagttggg cctaccacac aacacattct gggtgccctg ggtgtggttt 600
 gccacttgt caatgaaggc ctatcttga ggtcgaatcc gggacaccgt cctgctccag 660
 agcctgatga atgaggtgtg tactttgcgt actcagttgt gacagctgta tgcctacgac 720
 tggataagta tccatttggg gtacacacag gtggtgacag tggcagtata cagctttttc 780
 cttgcatgct tgatcgggaa gcagtttctg aaccctaaaca aggactacc caggccatgag 840
 atggatctgg ttgtgcctgt cttcacaatc ctgcaattct tattctacat gggctggctg 900
 aaggtggcag aacagctcat caacccttc ggggaggacg atgatgattt tgagactaac 960

tggatcattg acagaaacct gcaggtgtcc ctgttgccg tggatgggat gcaccagaac 1020

ttgcctccca tggaaactga catgtactgg aacgaggcag cgcctcagcc gccttacaca 1080

gctgcttctg ccaggtctcg ccggcattcc ttcattggct ccaccttcaa catcagccta 1140

aagaaagaag acttagagct ttggtcaaaa gaggaggctg acacggataa gaaagagagt 1200

ggctatagca gcacatagg ctgcttctta ggactgcaac ccaaaaaacta ccatcttccc 1260

ttgaaagact taaagaccaa actattgtgt tctaagaacc cctcctcga aggccagtgt 1320

aaggatgcca accagaaaa ccagaaagat gtctggaaat ttaagggtct ggacttcttg 1380

aatgtgttc caaggtttaa gaggagagc tccattgtg gccacagc acccagcagc 1440

cacctactg agcagtcagc accctccagt tcagacacag gtgatgggcc ttccacagat 1500

taccaagaaa tctgtcacat gaaaaagaaa actgtggagt ttaacttgaa cattccagag 1560

agccccacag aacatcttca acagcgccgt ttggaccaga tgtcaaccaa tatacaggct 1620

ctaatgaagg agcatgcaga gtcctatccc tacagggatg aagctggcac caaacctgtt 1680

ctctatgagt gatgcctcac agcctggccc tgacttgcaa ggatgcccag cagggcactg 1740

accagtcaa aggcacacaa gcagcgacac ccaggagtgt gttcccacga cagtctagca 1800

tgtaactcag aaccaagagt acttaatagt cctgcctgaa aacacctgta ttttacgatc 1860

tttcccaaac taaggagttt aataaacgtg aatattcttt tagg 1904

<210> 2
 <211> 2673
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Human bestrophin 1 gene (NM_004183)

<400> 2
cagggagtcc caccagccta gtcgccagac cttctgtggg atcatcggac ccacctggaa 60

ccccacctga cccaagccca cctgctgcag cccactgcct ggccatgacc atcaactaca 120

caagccaagt ggetaatgcc cgcttaggct ccttctcccg cctgctgctg tgctggcggg 180

gcagcatcta caagctgcta tatggcgagt tcttaatctt cctgctctgc tactacatca 240

tccgctttat ttataggctg gccctcacgg aagaacaaca gctgatgttt gagaaactga 300

ctctgtattg cgacagctac atccagctca tccccatttc cttcgtgctg ggcttctacg 360

tgacgtgggt cgtgaccgcg tgggtgaacc agtacgagaa cctgccgtgg cccgaccgcc 420

tcatgagcct ggigtcgggc ttcgtcgaag gcaaggacga gcaaggccgg ctgctgcggc 480

gcacgtcat ccgctacgcc aacctgggca acgtgctcat cctgctcagc gtcagaccg 540

cagtctacaa gccttcccc agcgcaccag acctggtgca agcaggcttt atgactccgg 600

cagaacacaa gcagttggag aaactgagcc taccacacaa catgttctgg gtgcctggg 660

tgtggtttgc caacctgtca atgaaggcgt ggcttggagg tcgaatccgg gaccctatcc 720

tgctccagag cctgctgaac gagatgaaca ccttgcgtac tcagtgtgga cacctgtatg 780

cctacgactg gattagtatc ccaactggtgt atacacaggt ggtgactgtg gcggtgtaca 840

gcttcttctt gacttgtcta gttgggcggc agtttctgaa cccagccaag gectaccctg 900

gccatgagct ggacctcgtt gtgccctctt tcacgttctt gcagttcttc ttctatgttg 960

gctggctgaa ggtggcagag cagctcatca acccctttgg agaggatgat gatgattttg 1020

agaccaactg gattgtcgac aggaatttgc aggtgtccct gttggctgtg gatgagatgc 1080

accaggacct gcctcggatg gagccggaca tgtactggaa taagccccgag ccacagcccc 1140

cctacacagc tgettcgcc cagttccgtc gagcctcctt tatgggtcc accttcaaca 1200

tcagcctgaa caaagaggag atggagtcc agcccaatca ggaggacgag gaggatgctc 1260

acgtggcat cattggccgc ttcctaggcc tgcagtcca tgatcacat cctcccaggg 1320

caaaactcaag gaccaaaacta ctgtggcca agaggaatc ctttctcac gagggcctgc 1380

ccaaaaacca caaggcagcc aaacagaacg ttaggggcca ggaagacaac aaggcctgga 1440

agcttaaggc tgggacgcc ttcaagtctg cccactgta tcagaggcca ggctactaca 1500

gtgcccaca gagcccctc agcccactc ccatgttctt cccctagaa ccatcagcgc 1560

cgtaaaagt tcacagtgc acaggcatag acaccaaga caaaagctta aagactgtga 1620

gttctggggc caagaaaagt tttgaattgc tctcagagag cgatggggcc ttgatggagc 1680

accagaagt atctcaagtg aggaggaaaa ctgtggagt taacctgacg gatatgccag 1740

agatccccga aaatcacctc aaagaacctt tggaacaatc accaaccaac atacacacta 1800

cactcaaaga tcacatggat cttattggg ccttgaaaa caggatgaa gcacattcct 1860

aacctgttc ctaatggga tgettcgcca gccaggctc cacctgtgtg tacaccagca 1920

ggacactgat ccagtcacag ccatacagct gtccacactg aagaacatgt cctacaacag 1980

cctgaatcaa atggtagct taatagataa aaatcccaga ctacttcagc cttaaatgcc 2040

ttttattcat aaaactgtg aaagctagac tgaaccattg gaaacattta actcagactc 2100

tggattcaga gtcgggaacc cttagtctta tctgaatcca agacagccac accttagtat 2160

actgccc aaa ctaatgagt taataaatac aaatactcgt tctttttga ttagtgtgat 2220

tagaactgaa caacggcact taaggaatct ggaagatagc ctggatagat ttctgattca 2280

tccaagacc tcaagacaa cacctgggta ccaaattct ttattgaag gaatgtaca 2340

aatcaaagaa cttaaagtga tgTTTTGGTA caacttatag aaaaggtaaa ggaaacccca 2400

aatgcatgc actgccttgg tgaccagga agtcaccca cggctatggg gaaattagcc 2460

cgaggcttag ctttcattat cactgtctcc cagggtgtgc ttgtcaaaga gatattccgc 2520

caagccagat tcgggcgctc ccatcttgcg caagttggtc acgtggtcac ccaattcttt 2580

gatggctttc acctgctcat tcagtaatg tgtctcaatg aagtcacaca actgcaaac 2640

aatggggaag acagttagtg ggcagctttc cca 2673

<210> 3
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cDNA for shRNA (5'→3') for Best1 gene

<400> 3
 gatcccttg ccaacttgc aatgaattca agagattcat tgacaagttg gcaattttta 60

60

<210> 4
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cDNA for shRNA (3'→5') against Best1 gene

<400> 4
 gggaacggtt gaacagttac ttaagttctc taagtaactg ttcaaccgtt aaaaattcga 60

60

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mBest1-F primer

<400> 5
 aggacgatga tgatTTTgag 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mBest1-R primer

<400> 6
 cTTTctggtt tTtctggtg 20

<210> 7
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial double-stranded oligonucleotide for lentivirus-based
 shRNA expression

<400> 7
 cgctgcagtt gccaaCTTgt caatgaattc aagagattca ttgacaagtt ggcaatTTTt 60

gatatctaga ca 72