

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

등록특허공모(B1) (24) 등록일자

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) *C12N* 15/85 (2006.01) *G08B* 25/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0275 (2013.01) C12N 15/8509 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2016-0016473**

(22) 출원일자 **2016년02월12일**

심사청구일자 2016년02월12일

(65) 공개번호10-2017-0095456(43) 공개일자2017년08월23일

(56) 선행기술조사문헌 US08906360 B2*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 17 항

(73) 특허권자

(45) 공고일자

(11) 등록번호

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

2018년08월10일

2018년08월03일

10-1887051

(72) 발명자

김대수

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동,한국과학 기술원)

박세근

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동,한국과학 기술원)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한윤호

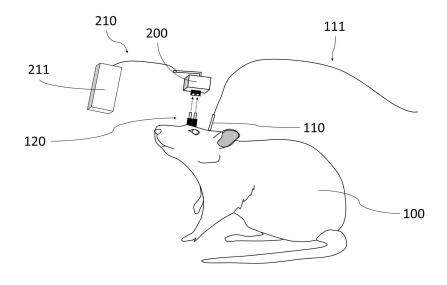
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 오브젝트 탐닉행동을 활용한 동물행동 조절 방법

(57) 요 약

본 발명은 빛에 의해 그 행동이 조절 가능한 동물 및 그의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 내측 시삭 전야(medial preoptic area, MPA) 특이적으로 채널로돕신 유전자가 형질도입되어, 상기 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질(ventral periaqueductal gray, vPAG)에 광조사시 상기 내측 시삭전야 또는 상기 복측 중뇌수도주변회백질 내의 신경을 활성화시킬 수 있는, 형질전환 비인간 포유동물 및 그를 포함하는 행동조절이 가능한 비인간 포유동물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

G08B 25/00 (2013.01) A01K 2227/10 (2013.01)

(72) 발명자

정용철

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동,한국과학기 술원)

이필승

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동,한국과학기 술원)

조성호

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동,한국과학기 술원)

이건재

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동,한국과학기 술원)

(56) 선행기술조사문헌

US20030199944 A1

US20150047061 A1

KR101446388 B1

KR1020150125659 A

JP2012061198 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

내측 시삭전야(medial preoptic area, MPA)에서 채널로돕신 유전자가 발현되도록 형질도입되어, 상기 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질(ventral periaqueductal gray, vPAG)에 광조사시 상기 내측 시삭전야 또는 상기 복측 중뇌수도주변회백질 내의 신경을 활성화시킬 수 있는, 형질전환 비인간 포유동물;

상기 포유동물의 내측 시삭전야(MPA) 또는 복측 중뇌수도주변회백질(vPAG)에 광조사를 가능하게 하기 위해 삽입된 광섬유관(optic fiber cannula);

상기 광섬유관에 빛을 조사하기 위한 광원;

상기 포유동물의 두부에 장착되고, 상기 포유동물의 정면 방향을 기준으로 일정한 각도로 좌우로 회전이 가능한 서보모터; 및

상기 서보모터의 회전축에 연결되어 상기 포유동물의 이목을 끌 수 있는 유도사물(inducing object)을 포함하는, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 2

제1항에 있어서.

비인간 포유동물은 인간을 제외한 영장목, 설치목, 토끼목, 식충목, 식육목, 기제목 또는 우제목에 속한 포유동물인, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 채널로돕신은 클라미도모나스 채널로돕신 1(Chlamydomonas channel rhodopsin 1, ChR1), 클라미도모나스 채널로돕신 2(Chlamydomonas channel rhodopsin 2, ChR2), ChR2/H134R, ChR2/E123T(ChETA), ChR2/C128X/D156A, ChD, ChEF, ChIEF, 볼복스 채널로돕신 1(Volvox channel rhodopsin, VChR1), 볼복스 채널로 돕신 2(VChR2), 상기 ChR1 및 VChR1의 키메라인 C1V1, SSFO(stabilized step function opsin), 또는 ArchT3.0 인, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 채널로돕신 유전자는 바이러스성 벡터 또는 비바이러스성 벡터에 의해서 운반되는, 행동조절이 가능한 비 인간 포유동물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 바이러스성 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, 단순포진바이러스 또는 아데노 수반 바이러스 벡터인, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 비바이러스성 벡터는 플라스미드 벡터, 또는 리포좀인, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 포유동물의 전방을 촬영할 수 있는 카메라를 추가적으로 포함하는, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 카메라는 상기 서보모터 또는 유도사물에 부착되는, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 카메라로부터 촬영된 영상 및 동물 행동 조작자에 의한 서보모터 조작 신호를 송수신할 수 있는 통신모듈을 추가로 포함하는, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 통신모듈은 유선모듈 또는 무선모듈인, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 통신모듈은 상기 서보모터 또는 유도사물에 부착되거나 상기 포유동물의 몸체에 부착되는, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 포유동물은 두부에 전방을 조명할 수 있는 전조등을 추가로 구비하는, 행동조절이 가능한 비인간 포유동물.

청구항 14

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항의 행동조절이 가능한 비인간 포유동물 및 상기 비인간 포유동물에 장착된 서보모터의 구동을 제어할 수 있는 리모트콘트롤러를 포함하는 동물의 행동제어 시스템.

청구항 15

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항의 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 탐색을 필요로 하는 장소에 위치시키는 동물 투입단계; 및

상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물의 이동경로를 조절하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항의 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 재난현장에 투 입하는 동물 투입단계; 및

상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물을 이용한 재난현장의 조난자 탐색방법.

청구항 17

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항의 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 위험물의 존재 가 의심되는 장소에 투입하는 동물 투입단계; 및

상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물을 이용한 위험물 탐색방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 위험물은 폭탄 또는 지뢰인, 탐색방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 동물 및 그의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 빛에 의해 그 행동이 조절 가능한 동물 및 상기 동물의 오브젝트 탐닉행동을 활용한 동물행동 조절 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 동물들은 자연적인 인지기능들을 대상으로 다양하게 단순한 놀이에서부터 운반, 탐닉, 적응의 목적들을 제공하는 본능적인 반응들을 보인다(Dunbar, R. I., Behav. Process 8: 98-101, 1983; Wallace, R. J., Experientia 41: 1479-1482, 1985; Sanz et al., D. Biol. Lett. 5: 293-296, 2009). 탐닉본능의 동기를 강조하는 뇌신경물질의 확인은 오랫동안 찾아온 목표이다. 1969년에 상기 기능이 처음으로 보고되었고, 시상하부를 가로지른 전기자극은 마우스에서 사물운반행위를 유도하였다(Phillips, A. G. et al., Science 166: 903-905, 1969). 그러나, 시상하부핵의 서로 얽힌 복잡성 때문에 전기자극의 크기는 제한되고 정밀한 뇌신경물질은 명확하지 않은 채로 남아왔다(Luiten, P. G. et al., Prog. Neurobiol., 28: 1-54, 1987; Aravanis, A. M. et al., J. Neural Eng. 4: S143-S156, 2007).
- [0003] 2002년 뉴욕 다운스테이트 메디칼 센터의 Sanjiv Talwar 및 John Chapin가 Roborat을 개발하였는데, 상기 Roborat은 전국이 내측전뇌다발(medial forebrain bundle, MFB) 및 감각운동피질(sensorimotor cortex)에 삽입이 되어 있는 랫트(rat)로 일종의 보상을 통한 학습 전략으로 랫트의 움직임을 제어할 수 있는 기술이다 (US7970476).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 그러나, 상기 선행기술을 포함한 종래기술은 재현성이 부족하고 행동지속성이 떨어지는 단점이 있어서 실용화되기 어렵다는 단점을 가지고 있다.
- [0005] 본 발명의 목적은 상기 문제점을 포함한 다양한 문제점을 해결하기 위하여, 동물의 본능적인 장애물 극복 능력과 인위적 움직임 조종 기술이 복합적으로 사용되는 동물 모델을 제공하는 것이다.
- [0006] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 동물 모델의 재난 현장 탐색 등 다양한 용도를 제공하는 것이다.
- [0007] 그러나, 본 발명의 권리범위가 상기 목적에 의해 제한되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일 관점에 따르면, 내측 시삭전야(medial preoptic area, MPA) 특이적으로 채널로돕신 유전자가 형질 도입되어, 상기 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질(ventral periaqueductal gray, vPAG)에 광조사시 상기 내측 시삭전야 또는 상기 복측 중뇌수도주변회백질 내의 신경을 활성화시킬 수 있는, 형질전환 비인간 포유동물이 제공된다.
- [0009] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 형질전환 비인간 포유동물; 상기 포유동물의 MPA 또는 vPAG에 광조사를 가능하게 하기 위해 삽입된 광섬유관(fiber optic cannula); 및 상기 광섬유관에 빛을 조사하기 위한 광원; 상기 포유동물의 두부에 장착되고, 상기 포유동물의 정면 방향을 기준으로 일정한 각도로 좌우로 회전이 가능한

서보모터; 및 상기 서보모터의 회전축에 연결되어 상기 포유동물의 이목을 끌 수 있는 유도사물(inducing object)을 포함하는 행동조절이 가능한 비인간 포유동물이 제공된다.

- [0010] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물 및 상기 비인간 포유동물에 장착된 서보모터의 구동을 제어할 수 있는 리모트콘트롤러를 포함하는 동물의 행동제어 시스템이 제공된다.
- [0011] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 탐색을 필요로 하는 장소에 위치 시키는 동물 투입단계; 및 상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물의 이동경로를 조절하는 방법이 제공된다.
- [0012] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 재난현장에 투입하는 동물 투입 단계; 및 상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물을 이용한 재난현장의 조난자 또는 희생자의 유체 탐색방법이 제공된다.
- [0013] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 위험물의 존재가 의심되는 장소에 투입하는 동물 투입단계; 및 상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물을 이용한위험물 탐색방법이 제공된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환 비인간 포유동물이나 상기 형질전환 비인간 포유동물을 이용하여 제조된 행동조절이 가능한 비인간 포유동물은 자유롭게 그리고 재현성 있게 행동 및 진로를 조절할 수 있기 때문에, 사람이 접근하기 어려운 현장 예컨대, 지진 등의 원인으로 건물이 붕괴된 재난현장, 폭발물 등 위험물이 존재하는 것으로 의심이 되는 공공장소, 지뢰가 매설된 것으로 예상되는 군사지역 등에서 인명의 피해 없이 안전하게 조난자 또는 희생자의 유체의 수색이나 위험물의 탐색에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 행동조절 및 사물탐색이 가능한 비인간 포유동물을 개략적으로 도시한 개요도이다.

도 2는 마우스의 적출된 뇌를 두부 상부에서 내려다본 평면도(좌측) 및 상기 평면도에서 각각 ① 및 ②번 선을 기준으로 마우스의 뇌(1)를 절단한 횡단면도(우측)를 나타낸다. 상기 평면도에서 위쪽은 앞쪽(anterior)에 해당되고, 아래쪽은 뒤쪽(posterior)에 해당된다. 적색점(2)은 바이러스 감염부위인 내측 시삭전야(MPA)의 위치를 나타내고, 청색점(3)은 광조사 부위인 복측 중뇌수도주변회백질(vPAG)의 위치를 나타낸다.

도 3은 일반적인 실험용 마우스가 광조사가 없는 상태에서 유도사물과 상호작용하는 동안 MPA 뉴런들이 활성화됨을 나타내는 것으로서, a는 상기 마우스를 유도사물로 자극하지 않거나(대조군, 좌측), 1시간 동안 자극한 경우, dIMPA 및 MPN을 포함하는 뇌의 박편에 대하여 cFos 양성세포를 염색한 면역조직화학 분석 결과를 나타내는 현미경 사진이고, b는 대조군 및 유도사물로 자극한 마우스의 MPA, 측면 시삭전영역(lateral preoptic area, LPO) 등의 다양한 시상하부 영역에서의 cFos 양성 세포의 수를 나타내는 그래프이며, c는 대조군 및 유도사물로 자극한 마우스의 MPA 내에 하위 핵(sub-nuclei)인 MPN 및 dIMPA에서의 cFos 양성 세포의 수를 나타내는 그래프이며, d는 사물과의 상호작용 전후의 MPA 주변의 시상하부 하위핵(sub-nuclei)에서의 cFos 양성 세포를 염색한 면역조직화학 분석 결과를 나타내는 현미경 사진이고, e는 다른 시상하부 하위핵에서의 cFos 양성 세포를 염색한 면역조직화학 분석 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

마우스 및 $ChR2^{MPA}$ 마우스에서의 사물의 분당 이동거리를 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, f 및 g는 각각 광조사 후 $eYFP^{MPA}$ 마우스 및 $ChR2^{MPA}$ 마우스의 암컷 탐닉율 및 사료 섭취 량을 측정한 결과를 나타내는 그래프들이며, h는 ChR2MPA 마우스에서 광조사후 시간의 경과에 따라 사물(탁구공)를 추적하는 행동을 촬영한 일련의 비디오 스틸 사진으로 노란색 화살표는 사물의 이탈방향을 나타내고, i는 ChR2MPA 마우스에서 면봉, 검은색 고무, 탁구공, BNC 커넥터 및 종이 큐브와 같은 다양한 사물의 이탈을 정량화한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조된 마우스에서 MPA-vPAG 회로가 사물을 향한 강한 동기유발에 충분함을 보여주는 것으로, a는 MPA에 ChR2를 발현하는 AAV2/9가 주입되고, 473 nm의 레이저광 자극을 전달하기 위해 vPAG에 광섬유관(optic fiber cannula)가 삽입된 마우스의 뇌 구조를 개략적으로 나타내내 개요도(좌측) 및 상기 마우스의 vPAG에 ChR2가 풍부하게 발현되고 있음을 보여주는 신경 투사도(우측)이고, b는 시험관 내에서 광조사시 vPAG 뉴런으로부터 측정된 전기생리학적 기록을 나타내는 그래프(좌측) 및 이 경우 발생한 피크의 진폭을 전세포 패치-클램프로 측정한 결과를 나타내는 그래프(우측)이며, c는 수컷 ChR2 마우스의 사물과 암컷을 향한 동시 상호작용 행위를 나타내는 대표적인 라스터 플랏(raster plot)이고, d는 광자극에 의해 유의하게 변화된 ChR2 마우스의 검사 인덱스이며(n = 4, P < 0.01), e는 움직이는 사물 향한 MPA-vPAG 광유도 사물 -추적 행동을 나타내는 것으로서 상단은 실험 트로토콜에 대한 개요도이고, 중단은 10마리의 마우스의 이동 궤적을 중첩시킨 것이고, 하단은 10개의 움직이는 사물의 궤적을 중첩한 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 ChR2 PA-vPAG 마우스에서 MPA-vPAG 회로의 광자극에 의해 사물 탐닉 행동이 유도되나 이성 탐닉 행동이나 먹이 활동은 감소한 결과를 나타내는 것으로, a는 ChR2 PA-vPAG 마우스(상단) 및 대조군으로서 eYFP PA-vPAG 마우스(하단)에서의 광조사시 사물의 이탈 경로를 나타낸 추적도이고, b는 ChR2 PA-vPAG 마우스에서 광조사 전후의 사물의 이탈 거리의 변화를 기록한 그래프이고, c는 ChR2 PA-vPAG 마우스(ChR2) 및 대조군으로서 eYFP PA-vPAG 마우스(eYFP)의 사물 탐닉율을 비교한 그래프이며, d는 ChR2 PA-vPAG 마우스 및 ChR2 PA-vPAG 마우스의 사물 이탈 거리를 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, e는 ChR2 PA-vPAG 마우스 및 대조군으로서 eYFP PA-vPAG 마우스의 암컷 탐닉율을 나타낸 그래프이며, f는 ChR2 PA-vPAG 마우스 및 대조군으로서 eYFP PA-vPAG 마우스의 암컷 탐닉율을 나타낸 그래프이며, f는 ChR2 PA-vPAG 마우스 및 대조군으로서 eYFP PA-vPAG 마우스의 암컷 탐닉율을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG} 마우스에서 MPA-vPAG 회로의 광저해에 의해 사물 탐닉 행동이 감소됨을 나타내는 것으로서, a는 양쪽 MPA에 eYFP에 연결된 eNpHR3.0를 발현하도록 제조된 AAV2/5를 주입하고, vPAG에 광섬유 사이의 거리가 0.7 mm인 이중 광섬유관(dual fiber optic cannula)을 삽입하여 제조된 마우스(eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG})의 제조 및 광조사를 개략적으로 도시한 개요도(좌측) 및 MPA 및 vPAG에서 eNpHR3.0의 발현이 정상적으로 이루어지고 있음을 보여주는 투사도(중앙 및 우측)이고, b는 상기 eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG} 마우스및 대조군 마우스(eYFP ^{MPA-vPAG})에서의 각각 암컷을 찾는데 소비한 시간의 차이가 유의하지 않음을 보여주는 그래프이며, c는 상기 eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG} 마우스 및 대조군 마우스(eYFP ^{MPA-vPAG})에서 섭취한 사료의 양의 차이가 유의하지 않음을 보여주는 그래프이고, d는 상기 eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG} 마우스 및 대조군 마우스(eYFP ^{MPA-vPAG})에서 사물을 탐닉하는데 소비한 시간의 백분율을 보여주는 그래프이며, e는 대조군 대비 상기 eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG} 마우스의 대상 이탈의 감소를 나타내는 그래프이고, f는 상기 eNpHR3.0 ^{MPA-vPAG} 마우스 및 대조군에서의 구체적인 사물 탐닉 행동을 나타 낸 것이다(접근: P > 0.05, 코로 찌르기: P < 0.05, 활동적인 조작: P < 0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 용어의 정의:

- [0017] 본 문서에서 사용되는 용어 "형질전환 동물(transgenic animal)"은 전신적으로(systemically) 또는 신체의 일부 기관 또는 조직에 국소적으로(locally) 외래유전자가 형질도입되거나 특정 내재적 유전자의 기능이 결핍된 유전 자 조작된(genetically modified) 동물을 의미한다. 형질도입된 외래유전자의 발현 또는 그 기능이 결핍된 내재 적 유전자의 기능 저해는 항구적(permanant)일 수 있고, 일시적(temporal)일 수도 있다.
- [0018] 본 문서에서 사용되는 용어 "채널로돕신"은 광-개폐 이온채널로 작동하는 레티닐리덴(retinylidene) 단백질(로

돕신) 계열의 단백질로서, 빛에 대한 반응성 움직임인 주광성(phototaxis)을 조절하는 단세포성 녹조류에서 감각 광수용체로 작용한다. 채널로돕신이 다른 종류의 생체에서 외래적으로 발현될 경우 빛을 이용하여 전기적 흥분성, 세포내 산성도, 칼슘 흡수 및 다른 세포 반응을 조절하는 것이 가능하다.

- [0019] 본 문서에서 사용되는 용어 "내측 시삭전야(medial preoptic area, MPA)"은 시상하부의 시삭전야(preoptic area)의 하부핵(subnuclei) 중의 하나를 의미하며, 부모행동이나 성적 행동과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 본 문서에서 사용되는 용어 "복측 중뇌수도주변회백질(ventral periaqueductal gray, vPAG)"는 중뇌수도주변회백질(periaqueductal gray)의 배쪽 일부분을 의미하며, 상기 중뇌수도주변회백질은 중뇌피개(tegmentum mesencephali) 내의 대뇌수도(cerebral aqueduct)를 둘러싸고 있는 회색질로 통증 조절을 위한 주요 제어중추인 것으로 알려지고 있다.
- [0021] 본 문서에서 사용되는 용어 "서보모터(servomotor)"는 모터와 제어구동보드를 포함하는 것으로, 명령에 따라 정확한 위치와 속도를 맞출 수 있는 모터를 의미한다.
- [0022] 발명의 상세한 설명:
- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명의 일 관점에 따르면, 내측 시삭전야(medial preoptic area, MPA) 특이적으로 채널로돕신 유전자가 형질 도입되어, 상기 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질(ventral periaqueductal gray, vPAG)에 광조사시 상기 내측 시삭전야 또는 상기 복측 중뇌수도주변회백질 내의 신경을 활성화시킬 수 있는, 형질전환 비인간 포유동물이 제공된다.
- [0025] 상기 형질전환 비인간 포유동물은 인간을 제외한 영장목, 설치목, 토끼목, 식충목, 식육목, 기제목 또는 우제목 에 속할 수 있다.
- [0026] 상기 형질전환 비인간 포유동물에 있어서, 상기 채널로돕신은, 클라미도모나스 채널로돕신 1(Chlamydomonas channel rhodopsin 1, ChR1), 클라미도모나스 채널로돕신 2(Chlamydomonas channel rhodopsin 2, ChR2), ChR2/H134R, ChR2/E123T(ChETA), ChR2/C128X/D156A, ChD, ChEF, ChIEF, 볼복스 채널로돕신 1(Volvox channel rhodopsin, VChR1), VChR2, 상기 ChR1 및 VChR1의 키메라인 C1V1, SSFO(stabilized step function opsin), 또는 ArchT3.0일 수 있다.
- [0027] 상기 형질전환 비인간 포유동물에 있어서, 상기 채널로돕신 유전자는 바이러스성 벡터 또는 비바이러스성 벡터에 의해서 운반될 수 있고, 상기 바이러스성 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 백시니아바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, 단순포진바이러스 또는 아데노 수반 바이러스 벡터일 수 있으며, 상기 비바이러스성 벡터는, 플라스미드 벡터, 또는 리포좀일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 형질전환 비인간 포유동물; 상기 포유동물의 MPA 또는 vPAG에 광조사를 가능하게 하기 위해 삽입된 광섬유관(fiber optic cannula); 및 상기 광섬유관에 빛을 조사하기 위한 광원; 상기 포유동물의 두부에 장착되고, 상기 포유동물의 정면 방향을 기준으로 일정한 각도로 좌우로 회전이 가능한 서보모터; 및 상기 서보모터의 회전축에 연결되어 상기 포유동물의 이목을 끌 수 있는 유도사물(inducing object)을 포함하는 행동조절이 가능한 비인간 포유동물이 제공된다.
- [0029] 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물에 있어서, 상기 서보보터는 상기 포유동물의 두부에 직접 장착이 될 수도 있고, 두부에 고정된 소켓에 체결되는 방식으로 장착될 수 있다.
- [0030] 아울러, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물은 상기 서보모터 및/또는 광원에 전력을 공급할 수 있는 전원을 추가로 장착할 수 있으며, 상기 전원은 상기 포유동물의 몸체에 장착이 되거나 상기 포유동물의 몸체 외에 구비되어 상기 포유동물과 유선으로 연결될 수도 있다.
- [0031] 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물은 동물의 전방을 촬영할 수 있는 카메라를 추가로 장착할 수 있으며, 상기 카메라는 상기 소켓, 서보모터 또는 유도사물에 부착될 수 있다.
- [0032] 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물은 상기 카메라로부터 촬영된 영상 및 동물 행동 조작자에 의한 서보모 터 조작 신호를 송수신할 수 있는 통신모듈을 추가로 장착할 수 있고, 상기 통신모듈은 유선 또는 무선 모듈일 수 있으나, 무선 모듈인 것이 바람직하며, 상기 통신 모듈은 상기 소켓, 서보모터 또는 유도사물에 부착되거나 동물의 몸체에 부착될 수 있다.

- [0033] 아울러, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물은 두부에 전방을 조명할 수 있는 전조등을 추가로 구비할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물 및 상기 비인간 포유동물에 장착된 서보모터의 구동을 제어할 수 있는 리모트콘트롤러를 포함하는 동물의 행동제어 시스템이 제공된다.
- [0035] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 탐색을 필요로 하는 장소에 위치시키는 동물 투입단계; 및 상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물의 이동경로를 조절하는 방법이 제공된다.
- [0036] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 재난현장에 투입하는 동물 투입 단계; 및 상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한 후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물을 이용한 재난현장의 조난자 탐색방법이 제공된다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 행동조절이 가능한 비인간 포유동물을 위험물의 존재가 의심되는 장소에 투입하는 동물 투입단계; 및 상기 동물의 뇌의 내측 시삭전야 또는 복측 중뇌수도주변회백질에 광조사를 한후, 서보모터를 조절하여 상기 동물의 이동경로를 조절하는 이동경로 조절 단계를 포함하는 상기 동물을 이용한위험물 탐색방법이 제공된다.
- [0038] 상기 탐색방법에 있어서, 상기 위험물은 폭탄 또는 지뢰일 수 있다.
- [0039] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 여러 실시예들을 상세히 설명하기로 한다.
- [0040] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려 이들 실시예들은 본 개시를 더욱 충실하고 완전하게 하고, 당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다. 또한, 도면에서 각 층의 두께나 크기는 설명의 편의 및 명확성을 위하여 과장된 것이다.
- [0041] 명세서 전체에 걸쳐서, 막, 영역 또는 기판과 같은 하나의 구성요소가 다른 구성요소 "상에", "연결되어", "구비되어", "장착되어" 또는 "커플링되어" 위치한다고 언급할 때는, 상기 하나의 구성요소가 직접적으로 다른 구성요소 "상에", "연결되어", ""구비되어", "장착되어" 또는 "커플링되어" 접촉하거나, 그 사이에 개재되는 또다른 구성요소들이 존재할 수 있다고 해석될 수 있다. 반면에, 하나의 구성요소가 다른 구성요소 "직접적으로 상에", "직접 연결되어", 또는 "직접 커플링되어" 위치한다고 언급할 때는, 그 사이에 개재되는 다른 구성요소들이 존재하지 않는다고 해석된다. 균일한 부호는 균일한 요소를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이,용어 "및/또는"은 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 제1, 제2 등의 용어가 다양한 부재, 부품, 영역, 충들 및/또는 부분들을 설명하기 위하여 사용되지만, 이들 부재, 부품, 영역, 충들 및/또는 부분들은 이들 용어에 의해 한정되어서는 안됨은 자명하다. 이들 용어는 하나의 부재, 부품, 영역, 충 또는 부분을 다른 영역, 충 또는 부분과 구별하기 위하여만 사용된다. 따라서, 이하 상술할 제1 부재, 부품, 영역, 충 또는 부분은 본 발명의 가르침으로부터 벗어나지 않고서도 제2 부재, 부품, 영역, 충 또는 부분을 지칭할 수 있다.
- [0043] 또한, "상의" 또는 "위의" 및 "하의" 또는 "아래의"와 같은 상대적인 용어들은 도면들에서 도해되는 것처럼 다른 요소들에 대한 어떤 요소들의 관계를 기술하기 위해 여기에서 사용될 수 있다. 상대적 용어들은 도면들에서 묘사되는 방향에 추가하여 소자의 다른 방향들을 포함하는 것을 의도한다고 이해될 수 있다. 예를 들어, 도면들에서 소자가 뒤집어 진다면(turned over), 다른 요소들의 상부의 면 상에 존재하는 것으로 묘사되는 요소들은 상기 다른 요소들의 하부의 면 상에 방향을 가지게 된다. 그러므로, 예로써 든 "상의"라는 용어는, 도면의 특정한 방향에 의존하여 "하의" 및 "상의" 방향 모두를 포함할 수 있다. 소자가 다른 방향으로 향한다면(다른 방향에 대하여 90도 회전), 본 명세서에 사용되는 상대적인 설명들은 이에 따라 해석될 수 있다.
- [0044] 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형 태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는 (comprising)"은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며,

하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.

- [0045] 이하, 본 발명의 실시예들은 본 발명의 이상적인 실시예들을 개략적으로 도시하는 도면들을 참조하여 설명한다. 도면들에 있어서, 예를 들면, 제조 기술 및/또는 공차(tolerance)에 따라, 도시된 형상의 변형들이 예상될 수 있다. 따라서, 본 발명 사상의 실시예는 본 명세서에 도시된 영역의 특정 형상에 제한된 것으로 해석되어서는 아니 되며, 예를 들면 제조상 초래되는 형상의 변화를 포함하여야 한다.
- [0046] 도 1은 본 발명의 행동조절 및 사물탐닉이 가능한 비인간 포유동물을 개략적으로 도시한 개요도이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명의 행동조절 및 사물탐닉이 가능한 비인간 포유동물(100)은 뇌의 내측 시삭전야(medial preoptic area, MPA, 도 2의 좌측 및 우상귀 참조)에 채널로돕신-2(ChR2)을 암호화하는 유전자가 포함된 아데노부속 바이러스를 주입하고, 상기 MPA 뉴런이 연접하고 있는 복측 중뇌수도주변회백질(ventral periaqueductal gray, vPAG, 도 2의 좌측 및 우하귀 참조)에 상기 채널로돕신-2를 활성화시킬 수 있는 과장(473 nm)의 빛을 공급할 수 있는 광섬유(111)를 삽입할 수 있는 광섬유관(110)이 삽입되어 있고, 두부에 동물(100)의 정면을 기준으로 -90° ~ +90°까지 각도 조절이 가능한 서보모터(200)가 소켓(120)에 의해 고정되어 있으며, 서보모터(200)의 회전축(미도시)에 일 말단이 연결되고 타 말단에 동물(100)의 이목을 끄는 유도사물(211)이 연결된 링커(210)가 연결되어 있다. 서보모터(200)의 조작은 리모트콘트롤러에 의해 조작자에 의해 이루어 질 수 있다. 아울러, 상기 동물(100)은 전방을 촬영할 수 있는 카메라와 카메라에서 촬영된 영상 및 리모트콘트롤러에 의해 생성된 서보모터 조작신호를 송수신할 수 있는 통신모듈을 추가로 구비할 수 있고, 더 나가 캄캄한 곳을 탐닉하기 위해 두부에 전방을 조명할 수 있는 전조등을 추가로 구비할 수 있다(미도시).
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따른 행동조절이 가능한 비인간 포유동물은 두부의 전방에 연결되어 있으나 동물이 직접 접촉할 수 없는 유도사물이 달려 있고 이를 서보모터를 통해 좌우로 회전시킬 수 있기 때문에, 해당 포유동물의 사물 탐닉 증상에 따라 당해 동물을 진로를 자유자재로 변경할 수 있다. 특히 쥐나 마우스와 같은 소동물을 사용할 경우, 사람이 지나가기 힘든 좁은 틈을 자유자재로 통과할 수 있기 때문에, 건물 붕괴현장 등에서 조난자나 희생자의 유체를 탐색하는데 유용하게 사용될 수 있고, 더 나아가 무게가 가벼워서 대인지뢰 위에 올라가도지뢰가 폭파되지 않기 때문에 군사지역에서 유실된 지뢰 등을 탐색하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0048] 도 2는 마우스의 적출된 뇌를 두부 상부에서 내려다본 평면도(좌측) 및 상기 평면도에서 각각 ① 및 ②번 선을 기준으로 마우스의 뇌(1)를 절단한 단면도(우측)를 나타낸다. 적색점(2)은 바이러스 감염부위인 내측 시삭전야 (MPA)의 위치를 나타내고, 청색점(3)은 광조사 부위인 복측 중뇌수도주변회백질(vPAG)의 위치를 나타낸다.
- [0049] 본 발명의 발명자들은 동물의 사물 탐닉을 관장하는 시상하부의 결정핵을 확인하기 위해, 사물 탐닉과정에서 활성화되는 뉴런이 cFos 단백질로 표지될 수 있도록 실험절차를 고안하였다(도 3a 참조). 사물 회피를 감소시키기위하여 모든 마우스들을 사물(종이로 덮여진 스티로폼 큐브)에 대하여 하루에 한 번씩 3일간 사전에 노출시켰다(Kim, D. et al., Genes Brain Behav. 4: 302-306, 2005). 4일째에 대조군은 사물 없이 1시간을 소모하게 한반면, 시험군은 1시간 동안 사물을 탐닉하도록 허용하였다(도 3a 참조). 면역조직화학 분석을 수행한 결과, 내측 시삭전야(MPA)에서 사물에 노출된 마우스에서 cFos-양성 뉴런들의 수가 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었다(P<0.01; 도 3b 참조). cFos-양성 뉴런들은 MPA 내에서 MPA의 핵심 지역인 내측 시상전야핵(medial preoptic nuclei, MPN) 주변에 집중적으로 위치하고 있었다. 상기 부분은 특별한 이름이 없기 때문에 본 발명자들은 이를 배측면(背側面) MPA(dorsolateral MPA, d1MPA, P<0.01; 도 3c 참조)라고 명명하였다. 대조적으로, 측면 시삭전영역(lateral preoptic area, LPO), 복부핵선말단(ventral bed nucleus of stria terminalis, vBNST), 중격시상하부핵(septohypothalamic nucleus, SHy), 복내측 시상하부(ventromedial hypothalamus, VMH), 실방핵(paraventricular nucleus, PVN) 및 궁상핵(arcuate nucleus, Arc)을 포함하는 다른 시상하부 영 역들은 대조군과 비슷한 cFos 활성 나타냈다(도 3b, 3d 및 3e 참조).
- [0050] 본 발명자들은 상기 결과를 바탕으로 MPA 뉴런들의 역할을 고찰하기 위해, CamKII 프로모터에 의해 발현이 유도되는 채널로돕신-2(ChR2, Zhang, F. et al., Nat. Methods 3: 785-792, 2006) 유전자를 포함하는 아데노 부속 바이러스 유형 2/9(AAV2/9)를 다른 마우스 계통에 비해 사물에 대한 집착이 최소인 것으로 알려진 C57BL 마우스(Kim, D. et al., Genes Brain Behav. 4: 302-306, 2005)의 MPA에 주입하여 감염시켰다. 그런 다음, 본 발명자들은 상기 마우스(ChR2 MPA)의 등쪽 MPA(dorsal MPA)에 473 nm 파장의 빛을 조사하였다(도 4a 및 4b 참조). 그러자 상기 마우스는 궁극적으로 사물의 유의한 이탈을 야기하는, 물기 및 소지하기와 같은 증가된 조작에 의해 측정되는 사물에 대한 활동적인 집착을 보였다(도 4c 및 4d 참조). 반면, MPA에 대조군 바이러스를 감염시킨마우스(eYFP PPA)는 사물에 대한 활동적인 반응을 보이지 않았다(P < 0.01, 도 4e). 상기의 결과들은 MPA에서 흥

분한 뉴런들이 사물 탐닉 행동을 매개한다는 것을 시사하는 것이다.

- [0051] 선행 연구들에서는 MPA는 수컷의 성적 행동(Malsbury, Physiol. Behav., 7: 797-805, 1971), 먹이활동 조절 (Vaccarino et al., Regul. Peptides, 21: 21-28, 1988), 및 부모성향(Numan et al., Brain Res., 792: 348-352, 1998; Kirkapatrick et al., Brain Res., 658: 112-118, 1994)과 관련된 것으로 보고한 바 있다. 부모성 향은 억제성 MPA 뉴런들에 의존적이기 때문에 본 발명자들은 전자의 두 가지 행위를 분석하였다. 사용한 조건 하에서 MPA의 광자극들은 수컷 마우스가 암컷의 발정(P>0.05; 도 4f 참조)이나 배고픈 상태(P>0,05; 도 4g 참조)에서 사료에 대한 반응을 촉진하지 않았다. 이는, 자극된 MPA 뉴런이 사물 탐닉을 특이적으로 조절함을 시 사하는 것이다. 뿐만 아니라, 이러한 사물 탐닉 현상이 특정 사물에 의해서만 유발되는 것인지 확인하기 위해 다양한 사물을 이용하여 행동을 분석한 결과, 다양한 사물에 대하여도 정도의 차이만 있을 뿐, MPA에 대한 광자 극시 사물에 대한 탐닉현상이 유발됨을 확인하였다(도 4h 및 4i).
- [0052] 복측 중뇌수도주변회백질(vPAG)은 MPA의 주요한 신호 수용부위 중의 하나이므로 MPA의 축색말단의 표적-특이적 활성화는 세포체 영역(soma area)의 활성화보다 좀더 특이적인 행동상의 변화를 야기하기 때문에, 본 발명자들은 MPA-vPAG 시냅스의 자극을 추구하였다. 실제로 MPA에 형질도입된 ChR2 단백질은 활발하게 vPAG에 위치한 축색돌기말단에 도달하였다(도 5a 참조). 상기 축색돌기 말단에 대한 광자극은 vPAG 뉴런들에서 촉발된 흥분성 후시냅스 전류(evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSCs)를 유발시키고, 상기 eEPSCs는 AMPA 수용체 길항제인 CNOX 및 NMDA 수용체들의 길항제인 D-AP5에 의해 소멸함을 관찰하였다(P > 0.05, 도 5b 참조). 상기의결과들은 MPA-vPAG 시냅스를 통한 흥분성 신경전달을 시사하는 것이다. vPAG에 위치하는 MPA 축색돌기 말단에 대한 광자극(20 Hz, 5 ms 펄스 폭)에 반응하여, ChR2 MPA-vPAG 마우스는 대조군인 eYFP MPA-vPAG 마우스와 비교하여 사물 탐닉에 더 많은 시간을 소비하였고 더 큰 정도의 사물 이탈을 유도하였다(도 6a-6c 참조). ChR2 MPA-vPAG에 의한 사물 이탈정도는 상술한 ChR2 MPA-vPAG 회로의 광자극은 대조군(도 6e 및 6f 참조)과 비교하여 암컷 발정(P<0.001)과 사료(P<0.01)에 반응들을 유의하게 감소시키므로 본 발명의 일 실시예에 따른 MPA-vPAG 회로의 활성화는 사물에 대한 특이하고 더 강력한 반응들을 유도한다는 것을 시사한다.
- [0053] 아울러, 본 발명자들은 상기 사물 특이성을 확인하기 위하여, 마우스를 발정암컷과 사물 둘 모두에 동시에 노출시키는 경쟁분석을 고안하였다. 빛을 차단한 상태에서는, ChR2 마우스가 암컷을 향해 쫓아가고, 냄새를 맡고, 때로는 올라타는 구혼의 행위에 가장 많은 시간을 소비하였다(도 5c 참조). 빛을 켠 상태에서는, 마우스가 사물과 상호작용하기 시작하여 근처의 암컷에 주위를 덜 기울였다(P<0.01; 도 5d 참조). 상기 암컷에서 사물로 상호작용하는 파트너의 이동은 본 발명의 MPA-vPAG 회로가 다른 동기적인 행위들에 우선하여 탐닉 본능을 특이적으로 유도한다는 것을 시사한다.
- [0054] 광자극을 주는 동안, ChR2 PA-PAG 마우스는 영어 알파벳 'B'와 'G'(도 5e 상단 참조)의 외곽을 따라 움직이는 사물에 대한 추적행위를 보여주어서 두 알파벳들(도 5e 중단 및 하단 좌측 참조)의 윤곽을 명백히 추적하게 되었다. 빛이 알파벳 'G'에서 꺼졌을 때 마우스는 대상을 따르는 행위는 중단하고 트랙으로부터 이동해 나갔다(도 5e의 중단 및 하단 우측 참조). 따라서, MPA는 vPAG로의 신경전달을 통하여 사물을 향한 강한 움직임을 유도한다.
- [0055] 상기 회로가 사물 탐닉 행위의 유도에 충분한 것 같으나, 본 발명자들은 정상적인 사물 탐닉 행위들에 MPA-vPAG 회로가 필수적인지를 확인하기 위하여 분석을 수행하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 DBA2 마우스가 다른 근친 교배 마우스 계통들에서보다 태생적으로 사물에 대한 집착 정도가 더 크다는 것이 알려져 있기 때문에 상기 마우스 계통에서 MPA-vPAG 회로의 저해효과를 시험하였다. 상기 DBA2 마우스의 MPA의 양측에 광조사시 해당 뉴런을 탈분극시킴으로써 불활성화시키는 기능을 갖는 광활성 염소이온 채널(할로로돕신; eNpHR3.0)을 포함하는 AAV2/5 바이러스를 주입하여 vPAG의 양반구를 광자극하였다(532 nm, 도 7a 참조). 상기 광자극에 반응하여, eNpHR3.0 마우스는 eYFP 마우스와 비교하여 사물 탐닉(도 7d 및 7f 참조)과 이탈(P<0.05; 도 7e 참조) 행위가 감소하는 것을 보여주었다. 그러나, MPA-vPAG 회로의 광자극은 암컷 발정(P> 0.05; 도 7b 참조)이나 사료(P> 0.05; 도 7c 참조)에 대한 반응을 변경시키지 않았다.
- [0056] 상기 결과들에 따라서, MPA-vPAG 회로는 사물 탐닉 행위들을 특이적으로 유도하는 데에 필수적이라는 것을 시사한다.
- [0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는

것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0058] 일반적 방법:

[0059] 시험동물:

[0060] 7 ~ 8 주령(실험초기에)되는 C57BL/6J 수컷 마우스 및 DBA2 마우스를 한국과학기술원(Korea Advanced Institute of Science and Technology, KAIST)의 실험동물운영위원회 규정(프로토콜 번호 KA2014-05)에 따라 마우스를 사육 및 취급하였다. 마우스는 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있는 상태로 유지되었으며, 명암 주기는 12시간이었다. 행동시험에 사용한 모든 마우스는 정상적으로 그룹화하고 성적 행동 및 cFos 유도시험 전에는 분리하였다. 행동시험들은 바이러스 발현제작을 한 날로부터 4주 후에 실행하였다.

[0061] 면역조직화학 분석

[0062] 3,3'-다이아미노벤자이딘(DAB) 면역염색을 위하여, 마우스를 마취하여 인산완충염액(PBS)에 있는 해파린 소디움 염을 먼저 관류하고 난 다음 PBS에 용해된 4% 포름알데히드로 재관류하였다. 그런 다음 뇌를 마우스로부터 제거하여 4% 포름알데히드로 밤새 고정하고 PBS에 용해된 30% 슈크로즈에서 밤새 정치시켰다. 고정 후, 뇌를 냉각유지장치(Leica, Germany) 위에서 박편화(40 μm 두께)하여 박편들을 PBS로 세척한 다음, 0.3% 퍼옥시다아제와 0.3% 트리톤 X-100으로 처리하여 침투하게 하고 3% 정상토끼 혈청(Vector Laboratories, 영국)을 처리함으로써 차단하였다. 박편들은 상온에서 1일 동안 염소 항-cFos 항체(1:500으로 희석; Santa Cruz, USA)를 처리한 다음, 비오틴화된 토끼 항-염소 IgG(1:200으로 희석; Vector Laboratories, 영국)을 상온에서 1.5 시간 동안, DAB용액을 2.5분 동안 처리함으로써 염색하였다. 그런 다음 염색된 박편들을 ImageScope 소프트웨어(Leica, 독일)가 장착된 Aperio Scanscope CS(Leica, Germany)를 사용하여 촬영하였다.

<u>공초점 영상 촬영을 통한 바이러스 발현 분석</u>

[0064] 바이러스가 감염된 마우스들을 마취시킨 후, 처음에는 PBS에 용해된 혜파린 소디움염으로 재관류한 후, 이어서 PBS에 용해된 4% 포름알데히드로 재관류하였다. 뇌를 적출한 후 적출된 뇌를 4% 포름알데히드 용액으로 밤새 고 정하였다. 고정 후, 뇌를 진동식 박편기(vibrating microtome, Leica, Germany) 상에서 40 μm 두께로 박편화하였다. 뇌에 대한 영상은 LSM 780 공초점 현미경(Zeiss, Germany)를 이용하여 수득하였고, ZEN 2009 광 편집소프트웨어(Zeiss, Germany)로 분석하였다.

[0065] 사물 이탈 실험:

[0063]

[0066] 마우스는 실험 챔버에서 불안감을 감소시키기 위해, 실험 전에 챔버에서 5일동안 순화시켰다. 시험이 시작되면 종이로 덮여진 스티로폼 정육면체를 상기 챔버에 넣고 상기 마우스를 자유롭게 탐험하도록 하였다. 레이져 자극 (광자극; 473 nm, 광저해 532 nm)은 마우스가 탐험하는 동안 인가되었다.

[0067] 모든 마우스는 불안을 최소화하기 위하여 5일 동안 시험챔버에 길들이도록 했다. 상기 시험들은 표준 깔짚 (P.W.I. Industries, 캐나다)을 가진 아크릴 시험 챔버(25x25x40 cm)에서 각 마우스에 수행하였다. 마우스는 패 치 코드에 연결하여 불안을 최소화시키기 위하여 5분 동안 대기시켰다가 20분 동안 시험 챔버 내에서 순화시켰 다. 순화 기간 종료 후 종이(2x2x2 cm)로 덮은 스티로폼 사물을 시험 챔버 중간으로 조심스럽게 위치시켰다. 광 자극을 위해서는 473 nm의 레이저(Shanghai Laser, 중국 및 Crystalaser, 미국)를 MPA 및 MPA-vPAG(20 Hz, 5 ms 펄스 폭)에 인가하였다. 3분간의 OFF, ON과 OFF의 계속적인 세션이 기록되었고, 빛의 세기는 실험 전에 광섬 유의 말단에서 1 mW(ChR2^{MPA} 및 eYFP^{MPA}) 또는 3 mW(ChR2^{MPA-vPAG} 및 eYFP^{MPA-vPAG})로 조정하였다. MPA-vPAG 광저해를 위해서는, 532 nm의 레이저자극(Shanghai Laser, 중국)을 20분 동안 연속적으로 인가하였다. 빛의 세기는 각 광 섬유의 끝에서 10 mW로 조정하였다. 광조사를 하지 않는 OFF 시도는 사물에 대한 습관화 효과를 최소화시키기 위하여 ON 시도 7일 후에 수행하였다. 마우스의 트랙은 비디오 기록으로 모니터링하였고, 사물의 이탈은 색깔추 적방법(Noldus, 영국)을 사용하여 EthoVision XT 8.5 소프트웨어로 분석하였다. 이탈시험들에 대해서는 다양한 사물들로 수행하였고. ChR2 마우스는 20분 동안 시험 챔버에서 순화시켰다. 처음 사물이 도입되어 동시 광자극 (1 mW, 20 Hz, 5 ms 펄스 폭)을 5분 동안 인가하였다. 5분 후, 다음 사물이 도입되었는데, 시험에 사용한 사물 들은 면봉, 검은 고무조각, 탁구공, BNC 커넥터 및 종이로 덮인 스티로폼 큐브이다. 사물들은 무작위 순서로 도 입되었다.

[0068] 사물-추적 행동 실험:

[0069] ChR2 PPA-VPAG 마우스를 행동유전학 연구실의 영어명의 약자인 'BG'라고 표기된 바닥 위에 놓인 시험 챔버(90x60x15 cm)에서 20분간 순화시켰다. 그런 다음, 상기 챔버의 좌측 하단으로부터 시작하여, 광자극된 마우스들은 철제막대기 상에 고정된 사물(탁구공)을 추적하도록 유도되었다. 챔버의 좌측코너의 마우스로 50 cm 전선에 연결한 사물(탁구공)을 영어 알파벳 'B'의 시작점에 가볍게 두고 광자극(473 nm, 20 Hz, 5 ms 펄스-폭)을 인가하였다. 빛의 세기는 실험전 광섬유의 말단에 3 mW로 조정하였다. 마우스가 공을 만졌을 때 사물은 'BG' 트랙을 통해 움직이기 시작하였다. 마우스가 공위로 뛰어 오르는 것을 방지하기 위하여 공의 속도를 조정하였다. 사물이 알파벳 'G'의 끝점에 도달한 후 시험은 광자극을 차단함으로써 종결시켰다. 각 마우스는 비디오로 기록하면서 10회시도를 수행하였다. 사물 추적 행동의 급성 일시적 제어를 평가하기 위해 사물 추적 시험에 사용한 같은 마우스로 추가적인 시험을 수행하였다. 공이 'B' 트랙에 있을 때 광자극이 인가되었으나, 'G' 트랙에서 시작하기 직전에 자극을 차단하였다. 마우스 및 사물의 트랙은 EthoVision XT 8.5 software(Noldus, 영국)를 사용하여 시각화하였고, 그들 사이의 거리는 MATLAB codes (Mathworks, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0070] 섭식행동 시험

[0071] 시험 전 24시간 동안 정상적인 사료를 제거하였다. 마우스는 표준분리 케이지(14x21x13 cm)에서 깔개 없이 30분 동안 순화시켰다. 20개의 사료 펠렛(각 20 mg; Bio-Serve, 미국)을 광자극 또는 광저해와 동시에 공급하였다. 마우스는 30분 동안 사료를 섭취하도록 하였고, 그런 다음 갑자기 챔버로부터 빼냈다. 남아 있는 사료 펠렛의 무게는 전자저울을 사용하여 측정하였다.

[0072] 성적행동 시험

[0076]

[0073] 모든 마우스는 시험 전 3일 동안 분리하였다. 시험일에, 패치 코드를 수컷 시험 마우스에 연결하고 이어서 10분 동안 방에서 순화시켰다. 암컷 마우스는 광자극 또는 방해와 동시에 수컷 마우스와 합사하였다. 암컷의 발정 여부는 질에 대한 육안검사로 확인하였으며, 발정이 확인된 암컷들만 상기 시험에 이용하였다. 수컷 마우스는 5분 동안 암컷을 탐색하도록 하였으며, 이에 대한 비디오 기록을 수행하였다.

[0074] 전세포 패치-클램프 기록:

[0075] ChR2^{MPA} 마우스로부터 정밀하게 준비된 슬라이스를 패치-클램프 기록에 사용하였다. 전세포 패치-클램프는 MPA 또는 vPAG 뉴런으로부터 수득되었으며, 광 펄스(473 nm)가 관상면(coronal section) 위에 위치한 광섬유를 통해 상기 관상면 상에 전달되었다. 피크로톡신(picrotoxin, 100 μM)이 CNQX(25 μM)의 저해효과를 제거하기 위해 배치 방식으로 처리되었고 D-AP5(50 μM)가 vPAG 뉴런에서 광-촉발 eEPSC를 차단하기 위해 배치 방식으로 처리되었다.

마우스의 뇌박편은 AAV2/9-CaMKIIα-ChR2-mCherry를 MPA로 주입한 후 적어도 2주에 제조하였다. 마우스를 아버 틴(0.6 mg/g)의 복강주사로 마취하여 뇌를 분리하였다. 빙냉의 인공 뇌척수액(ACSF; 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 25 mM d(+)-글루코즈, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 3 mM 소디움-피루베이트, 및 1 mM 아스코르빈산)에 담긴 분리된 뇌를 95% O₂/5% CO₂ 가스로 채워서 pH 7.4로 유지하며, 진동박편기(Leica, 독 일)를 사용하여 300-350 μm 두께의 관상 절단면으로 박편을 제조하였다. 절단 후, 박편들을 36℃에서 10-15분 동안 93 mM NMDG, 93 mM HCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃, 25 mM d(+)-글루코즈, 20 mM HEPES, 5 mM 소디움 아스코르브산, 3 mM 소디움 피루브산, 2 mM 티오유레아, 10 mM 산화마그네슘, 0.5 mM 염화칼슘을 포함하는 산소화 회복액을 채운 배양챔버로 옮긴 다음, 상온에서 사용하기전 적어도 1시간 동안 ACSF로 채운 배 양챔버로 이동시켰다. 박편들은 시냅스 GABA 효과를 제거하기 위하여 100 μM 피크로독소(picrotoxin)를 포함하 는 ACSF로 관류시켰다. 뉴런들의 전기생리학적 변화는 28-30℃에서 기록하였고, 정립현미경(Olympus, Japan) 위 에서 적외선 차별화 간섭증강(IR-DIC) 현미경 또는 적색형광단백질(RFP) 필터를 이용하여 영상화하였다. 전세포 패치-클램기록은 130 mM K-gluconate, 2 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM MHEPES, 4 mM MgATP, 0.4 mM Na₃GTP, 및 0.5 mM EGTA(1 M KOH로 pH를 7.25로 조정)를 포함하는 내부용액으로 채운 유리 피펫(3-5 MΩ)을 사용하여 수득 하였다. MPA 뉴런의 전기생리학적 변화의 기록을 위해서, 473 nm 레이저 자극(20 Hz 와 5 ms 펄스 폭)을 광섬유 (200 μm 직경; Doric Lens, 캐나다)를 통해 전달하고 상기 박편 위에 위치시켜 광-촉발 활동전위(3 마리의 마 우스로부터 수득된 총세포 수는 9)을 유도했다. 뉴런들의 활동전위는 약 -50 mV의 조정한 변압을 사용하여 전류 -클램프 모드에서 기록하였다. PAG 뉴런 기록들을 위해서는 473 nm 레이저 자극(5 ms)을 광섬유를 통해 전달하 여 약 -70 mV의 유지전위(holding potential)를 이용하여 전위-클램프 모드로 PAG 뉴런에서 광-촉발 EPSCs를 유도하였다. 광섬유를 기록챔버 위에 위치시키고 자극부위를 조정하여 PAG 영역으로 한정하였다. 광-촉발 EPSCs는 매 $5 \pm (30 \text{ J} \text{ N} \text{ N} \text{ N})$ 마다 기록하였다. 그런 후, $25 \, \mu \text{ M} \, \text{CNQX} \, \text{ Q} \, 50 \, \mu \text{ M} \, \text{ D-AP5} = 10 분동안 배치 방식으로 처리하여 광-촉발 EPSCs(30회 시도)의 진폭을 비교하였다(5 마리의 마우스로부터 수득한 총 세포수 8).$

- [0077] 접근저항은 일상적으로 기록계를 통해서 모니터링하였으며, 만약 접근저항이 초기상태의 25% 보다 크게 변하거나 유지전류가 안정하지 않으면 제외하였다. 모든 자료를 수득하여 Multiclamp 700B(Molecular Devices, USA)으로 증폭하였고, 10 kHz에서 Digidata 1550(Molecular Devices, USA)로 수치화하였으며, Clampfit(Molecular Devices, USA)를 사용하여 분석하였다.
- [0078] 실시예 1: 사물 탐닉 관련 뇌 부위의 확인
- [0079] 본 발명자들은 사물에 대한 탐닉 활동을 활발히 할 때 뇌의 특정 부위가 활성화되고 그에 따른 해당 부위에서 사물에 대한 탐닉활동에 필요한 뉴런의 활성 증가를 위해 뉴런의 활성 증가와 관련된 전사인자인 cFos가 상기특정 부위에서 과발현될 것이라는 가설을 세웠다.
- [0080] 그에 따라 본 발명의 발명자들은 동물의 사물 탐닉을 관장하는 시상하부의 결정핵을 확인하기 위해, 사물 탐닉 과정에서 활성화되는 뉴런이 cFos 단백질로 표지될 수 있도록 실험절차를 고안하였다(도 3a 참조). 사물 회피를 감소시키기 위하여 모든 마우스들을 사물(종이로 덮여진 스티로폼 큐브)에 대하여 하루에 한 번씩 3일간 사전에 노출시켰다(Kim, D. et al., Genes Brain Behav., 4: 302-306, 2005). 4일째에 대조군은 사물 없이 1시간을 소모하게 한 반면, 시험군은 1시간 동안 사물을 탐닉하도록 허용하였다(도 3a 참조). 그런 다음, 상술한 바와 같이, 면역조직화학 분석을 수행한 결과, 내측 시삭전야(MPA)에서 사물에 노출된 마우스에서 cFos-양성 뉴런들의 수가 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었다(P<0.01; 도 3b 참조). cFos-양성 뉴런들은 MPA 내에서 MPA의 핵심지역인 내측 시상전야핵(medial preoptic nuclei, MPN) 주변에 집중적으로 위치하고 있었다. 상기 부분은 특별한 이름이 없기 때문에 본 발명자들은 이를 배측면(背側面) MPA(dorsolateral MPA, dlMPA, P<0.01; 도 3c 참조)라고 명명하였다. 대조적으로, 측면 시삭전영역(lateral preoptic area, LPO), 복부핵선말단(ventral bed nucleus of stria terminalis, vBNST), 중격시상하부핵(septohypothalamic nucleus, SHy), 복내측 시상하부 (ventromedial hypothalamus, VMH), 실방핵(paraventricular nucleus, PVN) 및 궁상핵(arcuate nucleus, Ar c)을 포함하는 다른 시상하부 영역들은 대조군과 비슷한 cFos 활성 나타냈다(도 3b, 3d 및 3e).

[0081] 실시예 2: 광유전학적 조절을 위한 바이러스 주입

[0082] 이어, 실제 상기 MPA 부위가 동물의 사물 탐닉에 관련되어 있는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 다른 마우스 계통에 비해 사물에 대한 집착이 최소인 것으로 알려진 C57BL 마우스(Kim, D. et al., Genes Brain Behav. 4: 302-306, 2005)를 마취시킨 후, 모터기동 정위장치 프레임(Neurostar, Germany)에 위치시킨 후, 정위장치 주입 기(stereotaxic injector)로 CamKII 프로모터에 의해 발현이 유도되는 채널로돕신-2(ChR2) 유전자를 포함하는 아데노 부속 바이러스 유형 2/9(AAV2/9)인 AAV2/9-CaMKII-ChR2(H134R)-mCherry(Addgene #26975, modified by University of Pennsylvania, USA) 0.5 µ1(1.0X10¹³ genomic copies/ml) 또는 대조군으로 AAV2/5-CaMKII α-eYFP(University of North Carolina Vector Core, USA) 각각 0.5 µ1(4.0X10¹² genomic copies/ml)를 내측 시 삭전야(medial preoptic area, MPA)로 주입하였다. 상기 마우스가 안정을 되찾은 후, 2.5% 트리브로모에탄올로 마취시키고, 모터기동 정위장치 프레임(Neurostar, Germany) 상에 위치시킨 후, 광섬유관(optic fiber cannula)을 MPA의 등부분에 삽입하였다. 상기 유전자의 발현은 mCherry의 형광을 통해 공촛점 현미경으로 확인 하였다. 그 결과, 도 4a의 좌측에서 확인되는 바와 같이 mCherry에 의한 적색형광이 MPA 부위에 나타남을 확인 하였다. 이는 본 발명에 의해 MPA에 주입된 아데노 부속 바이러스가 제 기능을 수행하고 있음을 입증하는 것이다.

실시예 3: MPA 광자극을 통한 사물 탐닉 핵동의 변화 관찰

[0083]

[0084] 본 발명자들은 MPA의 광활성화에 따라 동물의 사물 탐닉 현상에 변화가 일어나는지 확인하기 위해 상기 실시예 3에서 제조된 마우스(ChR2 PPA)에 대한 행동 실험을 수행하였다. 구체적으로 본 발명자들은 상기 마우스(ChR2 PPA)의 등쪽 MPA(dorsal MPA)에 채널로돕신 2를 활성화시킬 수 있는 473 nm 파장의 빛을 조사하였다(도 4a 및 4b 참조). 그러자 상기 마우스는 궁극적으로 사물의 유의한 이탈을 야기하는, 물기 및 소지하기와 같은 증가된 조작에 의해 측정되는 사물에 대한 활동적인 탐닉 증상을 보였다(도 4c 및 4d 참조). 반면, MPA에 대조군 바이러스를 감염시킨 마우스(eYFP PPA)는 사물에 대한 활동적인 반응을 보이지 않았다(P < 0.01, 도 4e). 상기의 결과들은

MPA에서 흥분한 뉴런들이 사물 탐닉 행동을 매개한다는 것을 시사하는 것이다. 아울러, 본 발명자들은 상기 종이로 둘러싸인 정육면체 외에 다른 사물에 대하여도 동일한 탐닉증상이 나타나는지 확인하기 위해, 사물의 종류를 탁구공, 면봉, 검은색 고무 조각, BNC 커넥터로 바꿔서 동일한 사물 탐닉 행동시험을 수행하였다. 그 결과, 도 4h 및 4i에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 마우스(ChR2^{MPA})는 정도의 차이는 있었으나, 사용한 모든 사물들에 대하여 탐닉 증상을 나타냈다. 따라서, 본 발명의 MPA 광자극 마우스는 광자극에 의해 가역적인 사물 탐닉 증상을 유발할 수 있는 모델 동물임이 입증되었다.

- [0085] 한편, 선행 연구들에서 MPA가 수컷의 성적 행동(Malsbury, Physiol. Behav., 7: 797-805, 1971), 먹이활동 조절(Vaccarino et al., Regul. Peptides, 21: 21-28, 1988), 및 부모성향(Numan et al., Brain Res., 792: 348-352, 1998; Kirkapatrick et al., Brain Res., 658: 112-118, 1994)과 관련된 것으로 보고된 바 있다. 부모성향은 억제성 MPA 뉴런들에 의존적이기 때문에 본 발명자들은 전자의 두 가지 행위를 분석하였다. 그 결과, 사용한 조건 하에서 MPA의 광자극들은 수컷 마우스가 암컷의 발정(P > 0.05; 도 4f 참조)이나 배고픈 상태(P > 0.05; 도 4g 참조)에서 음식에 반응을 촉진하지 않았다. 이는, 자극된 MPA 뉴런이 사물 탐닉을 특이적으로 조절함을 시사하는 것이다.
- [0086] 실시예 4: MPA-vPAG 회로의 광자극을 통한 사물 탐닉 행동의 변화 관찰
- [0087] 복측 중뇌수도주변회백질(vPAG)은 MPA의 주요한 신호 수용부위 중의 하나이므로 MPA의 축삭말단의 표적-특이적활성화는 세포체 영역(soma area)의 활성화보다 좀더 특이적인 행동상의 변화를 야기하기 때문에, 본 발명자들은 MPA-vPAG 시냅스의 자극을 도모하였다. 본 발명자들은 이를 위해 우선 MPA에 형질도입된 ChR2 단백질이 vPAG에 위치한 축색돌기말단에 위치하는지 여부를 mCherry에 의한 형광 발현 분석을 통해 조사하였다. 그 결과 도5a에 나타난 바와 같이, MPA에 형질도입된 ChR2 단백질은 활발하게 vPAG에 위치한 축색돌기 말단에 도달하였다(도5a). 그런 다음, 상기 MPA 축색돌기 말단에 대한 광자극에 의해 실제 vPAG 뉴런의 자극이 가능한지 확인하기 위해 상술한 바와 같이 전세포 패치-클램프 분석을 수행하였다. 그 결과 상기 MPA 축색돌기 말단에 대한 광자극에 의해 vPAG 뉴런들에서 촉발된 홍분성 후시냅스 전류(evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSCs)를 유발시키고, 상기 eEPSCs는 AMPA 수용체 길항제인 CNOX 및 NMDA 수용체들의 길항제인 D-AP5에 의해소멸함을 관찰하였다(P > 0.05, 도 5b 참조). 상기의 결과들은 MPA-vPAG 시냅스를 통한 홍분성 신경전달을 시사하는 것이다.
- [0088] 이에 본 발명자들은 MAP에 상기 실시예 2에서 사용한 AAV2/9-CaMKII-ChR2(H134R)-mCherry 바이러스를 감염시키고, vPAG에 광자극을 위한 광섬유관(optic fiber cannula)를 삽입한 C57BL 마우스를 제작하였다. 이 경우도 마찬가지로 대조군으로 AAV2/5-CaMKII a -eYFP 바이러스를 MPA에 형질도입하고 vPAG에 광섬유관을 삽입한 C57BL 마우스를 사용하였다. 상기 마우스들에 대하여 상술한 바와 같은 행동학적 시험을 수행하였다.
- [0089] 그 결과, vPAG에 위치하는 MPA 축색돌기 말단에 대한 광자극(20 Hz, 5 ms 필스 폭)에 반응하여, ChR2 마우스는 대조군인 eYFP 마우스와 비교하여 사물 탐닉에 더 많은 시간을 소비하였고 더 큰 정도의 사물 이탈을 유도하였다(도 6a-6c). ChR2 마우스에 의한 사물 이탈정도는 상기 실시예 3에서 제조된 ChR2 마우스의 그것보다 더 컸다(도 6d 참조).
- [0090] 아울러 본 발명자들은 ChR2 PPA-vPAG 마우스에서의 MPA-vPAG 회로의 광자극에 의해 성적 행동 및 섭식행동에 있어서 어떠한 변화가 나타나는지 해당 행동 시험을 수행하였다. 그결과, ChR2 PPA 마우스로부터 얻은 결과들(도 4f 및 4g 참조)과는 대조적으로, MPA-vPAG 회로의 광자극은 대조군인 eYFP PPA-vPAG과 비교하여 암컷 발정(P<0.001)과 사료(P<0.01)에 반응들을 유의하게 감소켰는데(도 6e 및 6f 참조), 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 MPA-vPAG 회로의 활성화는 사물에 대한 특이하고 더 강력한 반응들을 유도한다는 것을 시사한다.
- [0091] 아울러, 본 발명자들은 상기 사물 특이성을 확인하기 위하여, 마우스를 발정암컷과 사물 둘 모두에 동시에 노출 시키는 경쟁분석을 고안하였다. 빛을 차단한 상태에서는, ChR2 마우스가 암컷을 향해 쫓아가고, 냄새를 맡고, 때로는 올라타는 구혼의 행위에 가장 많은 시간을 소비하였다(도 5c). 빛을 켠 상태에서는, 마우스가 사물과 상호작용하기 시작하여 근처의 암컷에 주위를 덜 기울였다(P<0.01; 도 5d). 상기 암컷에서 사물로 상호작용하는 파트너의 이동은 본 발명의 MPA-vPAG 회로가 다른 동기적인 행위들에 우선하여 탐닉 본능을 특이적으로 유도한다는 것을 시사한다.
- [0092] 아울러, 본 발명자들은 MPA-vPAG 회로에 대한 광자극이 실제 동물의 진로를 조절할 수 있는 지 확인하기 위해,

일정한 트랙을 따라 사물을 이동시키면서 사물의 경로와 실험 동물의 경로가 일치하는 여부를 확인하였다(도 5e 의 상단).

- [0093] 이를 위해 상술한 바와 같이, 시험 챔버 내에 사물을 영어 알파벳 'BG'로 이루어진 트랙을 따라 이동하도록 하고 알파벳 'B'의 시작점에 상기 ChR2 마우스를 가볍게 두고 473 nm 파장의 광자극을 인가한 후, 사물을 'BG' 트랙을 통해 움직이기 시작하자, 상기 마우스는 사물이 움직인 궤적과 일치하는 궤적으로 사물을 따라 상기 챔버를 돌아다녔다(도 5e의 중단 및 하단 좌측). 상기 시험은 사물이 알파벳 'G'의 끝점에 도달한 후 시험은 광자극을 차단함으로써 종결시켰다.
- [0094] 한편, 상기 행동의 변화가 실제 광자극에 의한 것인 확인하기 위해, 사물이 알파벳 'G'의 시작 위치에 도달했을 때, 광자극을 차단한 후 행동의 변화를 관찰하는 시험을 수행하였는데, 이 결과, 빛이 알파벳 'G'에서 꺼졌을 때 마우스는 대상을 따르는 행위는 중단하고 트랙으로부터 이동해 나갔다(도 5e의 중단 및 하단 우측). 이를 통해, 본 발명자들은 MPA는 vPAG로의 신경전달을 통하여 사물을 향한 강한 움직임을 유도함을 확인하였다.

[0095] 실시예 5: MPA-vPAG 회로의 광저해를 통한 사물 탐닉 행동의 변화 관찰

- [0096] 상기 MPA-vPAG 회로가 사물 탐닉 행위의 유도에 충분한 것 같으나, 본 발명자들은 정상적인 사물 탐닉 행위들에 MPA-vPAG 회로가 필수적인지를 확인하기 위하여 MPA-vPAG 회로를 빛을 이용하여 차단할 경우 행동의 변화를 분석하고자 하였다.
- [0097] 구체적으로, 본 발명자들은 DBA2 마우스가 다른 근친교배 마우스 계통들서보다 태생적으로 사물에 대한 집착 정도가 더 크다는 것이 알려져 왔기 때문에 상기 마우스 계통에서 MPA-vPAG 회로의 저해효과를 시험하였다. 상기 DBA2 마우스의 MPA의 양측에 광활성 클로라이드 채널(할로로돕신; eNpHR3.0)을 포함하는 AAV2/5 바이러스인 AAV2/5-CaMKII-eNPHR3.0-eYFP(Addgene #26971) 0.5 µ1(4.0X10¹² genomic copies/ml)또는 대조군 바이러스로 AAV2/5-CaMKII a -eYFP(University of North Carolina Vector Core, USA)를 0.5 µ1(4.0X10¹² genomic copies/ml)를 정위장치 주입기(stereotaxic injector)로 주입하였다. 그런 다음, 상기 AAV2/5-CaMKII-eNPHR3.0-eYFP 바이러스로 감염된 마우스의 뇌의 좌우반구에 존재하는 vPAG에 이중 광섬유관(광섬유 사이의 간격이 0.7 mm)을 삽입하였다. 그런 다음, 레이져광을 이용하여 vPAG의 양반구를 광저해하였다(532 mm, 도 7a 참조). 그 결과, 상기 광저해에 반응하여, eNpHR3.0 PPA-vPAG 마우스는 eYFP PPA-vPAG 마우스와 비교하여 사물 탐닉(도 7d 및 7f 참조)과 이탈(P < 0.05; 도 7e 참조) 행위가 감소하는 것을 보여주었다. 그러나, MPA-vPAG 회로의 광저해는 암컷 발정(P > 0.05; 도 7b)이나 사료(P > 0.05; 도 7c)에 대한 반응을 변경시키지 않았다.
- [0098] 상기 결과들에 따라서, MPA-vPAG 회로는 사물 탐닉 행위들을 특이적으로 유도하는 데에 필수적이라는 것을 시사한다.
- [0099] 본 발명은 도면 및 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면1

