



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0052928  
(43) 공개일자 2009년05월27일

(51) Int. Cl.

*C12N 15/12* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0119495

(22) 출원일자 2007년11월22일

심사청구일자 2007년11월22일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

송영환

부산 해운대구 좌동 대원아파트 102동 702호

전정민

부산 금정구 남산동 972-22 삼성빌리지 301호

정인영

부산 해운대구 반여4동 신동타워 102동 1206호

(74) 대리인

김일성

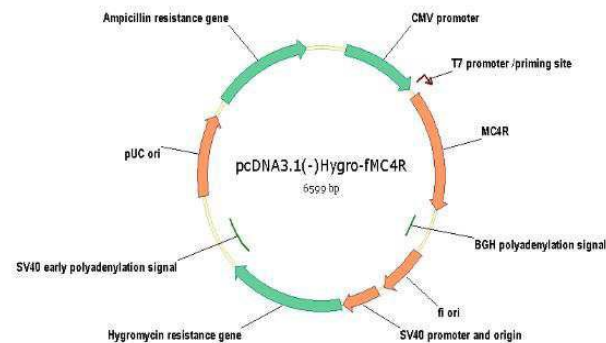
전체 청구항 수 : 총 3 항

#### (54) 양식납치의 멜라노코르틴 수용체 4 유전자

##### (57) 요약

본 발명은 양식납치의 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH; Melanocyte -Stimulating Hormone)과 결합하여 먹이섭취 조절과 식욕저하를 일으켜 비만과 체중조절에 이용할 수 있는 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 (Melanocortin receptor 4; MC4R)의 특성을 지닌 유전자와 이들 특성의 유전자 활성을 위한 동물세포주의 발현벡터의 구성 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도8



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

양식 넙치에서 분리되어 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 (fMC4R) 유전자는 978개의 염기서열로 구성되어 있고, 325개의 아미노산으로 구성됨을 특징으로 하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 (fMC4R) 유전자.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 (fMC4R) 유전자는,

유전자가 pcDNA3.1(-)Hygro에 DNA 합성효소(ligase)로 재조합되어 발현 가능한 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC1R 발현벡터임을 특징으로하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 (fMC4R) 유전자.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 (fMC4R) 유전자는, pcDNA3.1(-)Hygro 벡터와의 재조합을 통한 유전자의 형질전환체로 포유동물의 섭식조절과 먹이섭취에 따른 체중조절 기작에 관여하는 기질이 결합하는 수용체로 작용하는 것을 특징으로 하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 (fMC4R) 유전자.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <10> 본 발명은 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH; Melanocyte-Stimulating Hormone)과 결합하여 먹이섭취 조절과 식욕저하를 일으켜 비만과 체중조절에 이용할 수 있는 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 (Melanocortin receptor 4; MC4R)의 특성을 지닌 유전자와 이들 특성의 유전자 활성을 위한 동물세포주의 발현벡터의 구성 방법에 관한 것이다.
- <11> 멜라닌세포 자극 호르몬이 결합하는 수용체 단백질로서의 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 유전자는 melanocortin receptor 족으로서 4가지의 형을 지니고 있으며 이들 중 뇌에 주된 발현 양상은 보이는 특이적인 4번째 형의 멜라노코르틴 수용체 4 유전자(MC4R; Melanocortin receptor 4)가 확인되었으며, 동물세포주에서도 색소조절에 관여하지 않는 다른 기작으로 지닌 것으로 확인되었다 (Gantz *et al.*, 1993). 또한 MC4R 유전자는 인트론을 가지지 않으며 생물종간에 매우 높은 유사성을 지니고 있는 것으로 파악되었다.
- <12> 비만과 관련된 MC4R 유전자의 특성으로는 비만 어린이와 어른 중에서 열성 유전자의 형태로 이 유전자의 변이에 의해 것이 보고되기도 하였다 (Yeo *et al.*, 1998; Vaisse *et al.*, 1998). 또한 다음 세대의 비만의 원인을 제공하는데 기여한 최초 세대의 사람들에게서도 MC4R 유전자의 변이가 확인이 되어 열성으로의 유전에 의한 질병으로 인식되기도 하였으며 (Hinney *et al.*, 1999), MC4R 유전자의 변이와 더불어 이 유전자의 근처(flanking region)의 변이 또한 비만에 연관이 있는 것으로 조사되었다 (Jacobson *et al.*, 2002). 최근의 연구에서는 MC4R의 유전적인 변이의 원인은 특정 아미노산이 대체되는 missense mutation(대치 돌연변이)에 의한 것으로 심하면 병인원적인 변이를 유발하는 것으로 알려졌다 (Santini *et al.*, 2004)
- <13> 실험동물을 통한 실험에서는 MC4R 유전자가 실활된 생쥐의 경우 과식증, 고혈당증, 그리고 고글리신증을 유발하는 것을 확인하였으며 이것은 MSH의 기능부족으로 인해 agouti 단백질의 특이적인 발현에 의한 것으로 확인되었다 (huszar *et al.*, 1997). 또한 MC4R과 더불어 MC3R은 먹이섭취와 에너지 항상성에서 MC4R과 연관된 기능성을 가지고 있다는 것이 확인되어 4가지 형의 MCR에서 2가지 형의 유전자가 비만과 섭식과 관련된 기작이 있음이 생쥐의 실험에서 연구 확인되었으며 (Chen *et al.*, 2000), 먹이섭취 뿐만 아니라 에너지소비 성적인 발기력 그리고 성행동의 조절에도 MC4R의 기능성이 확인되었다 (Van der Ploeg *et al.*, 2002).
- <14> 다른 뇌 활성 유전자와의 상호관련성에서 보면, MC4R의 결실은 먹이섭취를 조절하는 활성물질인 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor, 식욕감퇴인자)의 발현을 감소시켜 비만의 상승작용을 유도하는 것으로 확인되었다 (Xu *et al.*, 2003).

<15>

<16>

이와 같이 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 4 유전자의 경우 인간의 비만에 직접적인 관련성을 가지고 있으며, 쥐나 돼지 등의 모델 동물을 통한 실험에서 섭식과 체중조절에 관여하는 것으로 파악되었다. 하지만 어류의 경우 다양한 모델 동물의 부족과 해당 유전자의 정보부족으로 인해 양식산업과 포유류에 활용할 수 있는 MC4R의 연구가 미진하다. 이것으로 보아 양식업의 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 4 유전자의 기능과 구성 특성 및 재조합 발현체의 확립과 구성이 절실할 것으로 보인다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<17>

따라서 본 발명은 상기 유전자의 특성에 해당하는 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH; Melanocyte -Stimulating Hormone)와 결합하여 먹이섭취 감소와 식욕저하를 통해 체중조절과 비만해소 관여하는 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자 (MC4R)를 제공하기 위한 것으로, 실제로 도 1에 기재되어 있는 염기서열을 지니는 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자를 제공한다.

<18>

그리고, 먹이섭취 감소와 식욕저하를 통해 체중조절과 비만해소에 이용할 수 있는 상기 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자의 아미노산 지정 부분 (ORF)를 포함하는 동물세포주에서 발현 가능한 재조합 벡터를 제공하며, 이들 재조합 벡터에 의한 형질전환체는 멜라닌세포 자극호르몬과 결합하여 EC50의 값으로 정의되는 효과반응에 이용할 수 있는 특성을 지닌다.

### 발명의 구성 및 작용

<19>

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 국내 양식업의 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자(fMC4R)와 인간과 쥐 등의 포유동물 세포주에서 발현시켜 수용체로서의 기능을 확인할 수 있도록 재조합 벡터를 제공한다.

<20>

본 발명은 멜라닌세포 자극호르몬을 기질(리간드, ligand)로 이용하는 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 단백질을 코딩하는 핵산 염기서열을 나타내는 도 1과 도 1로부터 해독되는 단백질의 아미노산 서열을 나타내는 도 2를 제공한다.

<21>

본 발명의 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자는 도 1에서 보는 바와 같이 978개의 염기서열을 나타내며, 325개의 아미노산 서열(도 2)을 지니는 수용체 단백질을 구성하고 있다. 또한 Clustal W 1.83 프로그램에 의해 양식업의 아미노산서열을 인간을 포함한 다른 동물과 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 아미노산 서열의 유사성을 조사한 결과를 도 3에서 제공하고 있는 것으로, 이는

<22>

양식업의 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 (fMC4R)의 아미노산 서열을 복어, 얼룩말고기(zebrafish), 생쥐, 그리고 인간의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 의 서열과 상동성을 비교한 결과는 복어(Fr)와는 89%의 상동성, 얼룩말고기(Dr)와는 82% 상동성, 생쥐(Mm)와는 68% 상동성, 인간과는 67%의 상동성을 나타내 보였다.

<23>

본 발명의 유전자 염기서열 및 이것으로부터 코딩되는 단백질에 대하여 하기 [표 1]에 기재하였다.

표 1. fMC4R 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질

| 유전자 | 유전자명  | 단백질                                                                       | 단백질의<br>아미노산 서열 |
|-----|-------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 도 1 | fMC4R | 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4<br>(Melanocyte-stimulating hormone receptor 4) | 도 2             |

<24>

<25>

본 발명에 의거 제공되는 유전자는 다양한 숙주세포에 도입되어 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4를 발현 후 먹이섭취와 체중조절 등에 관여하는 신호전달의 반응에 이용할 수 있다.

<26>

### [실시예 1] 양식업 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자의 클로닝

<27>

양식업의 뇌에서 분리된 전체 RNA로부터 cDNA를 구축하고 이들 cDNA에서 5' - and 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA ends)를 실시하였다. 많은 동물 유래의 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자의 상동성이 높고 보존성이 높은 유전자 서열 부위(표 2)를 fMC4R 유전자의 프라이머로 이용하여 도 4의 그림

과 같이 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 상위 부위와 하위 부위를 각각 클로닝하였다.

<28> 도 4는 본 발명의 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자 (fMC4R)의 5' -RACE와 3' -RACE PCR 수행 결과와 구성의 도시화와 젤 사진을 표시한 것으로,

<29> 인간의 MC4R 유전자와 비교하여 증폭된 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자의 클로닝 실험 방법의 모식도와 클로닝에 의해 확보된 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자 증폭과정의 결과를 나타내는 것이다.

<30> 먼저 표 2의 Mc4-GSPR 프라이머와 일반 프라이머를 이용하여 fMC4R 유전자의 상위부위(5' 부분)을 증폭시켜 도 4의 젤 사진과 같이 5' -RACE fragment(5' 급속 증폭 부분)을 클로닝하였으며, 표 2의 Mc4-GSPF를 일반 프라이머를 이용하여 fMC1R 유전자의 하위부위(3' 부분)을 증폭시켜 도 4의 젤 사진과 같이 3' -RACE fragment(3' 급속 증폭 부분)을 클로닝하였다.

<31> 클로닝된 상위 부위 증폭부분과 하위 부위의 증폭 부분을 도 4와 같이 서로 중복이 되는 부분을 연결하여 양식넙치의 fMC4R 유전자의 완전부분을 완성하여 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자에 해당하는 염기서열을 확보하였으며, 이 유전자의 염기서열 확인결과 도 1의 DNA 염기서열을 지닌 fMC4R로 파악되었다. fMC4R 유전자의 아미노산 서열이 도 2에 부호화되었으며, 이것은 다시 도 3의 상동성 비교 분석에 의해 복어(Fr)와는 89%의 상동성, 얼룩말고기(Dr)와는 82% 상동성, 생쥐(Mm)와는 68% 상동성, 인간과는 67%의 상동성으로 높은 상동성을 띄어 다른 생물에서 확인된 MC4R과 동일한 유전자로 확인되었다. 또한 상동성의 비교를 통해 fMC4R은 세포막에 피부색 조절과 같은 기능을 가지며 도 5의 구성으로 세포의 부분과 세포막 부분 및 세포내 부분에 걸쳐 위치함을 알 수 있었다.

표 2. 5'- and 3'-RACE를 위한 특이적인 염기서열

| 프라이머     | 염기 서열                                       | 비 고                             |
|----------|---------------------------------------------|---------------------------------|
| Mc4-GSPR | 5'-TGG TGC TCT CGG AGT AGA TGA TGA AGA G-3' | fMC4R 5'-RACE PCR을 위한 특이적인 프라이머 |
| Mc4-GSPF | 5'-TGA CTC TAT GAT CTG CAG CTC CCT GCT-3'   | fMC4R 3'-RACE PCR을 위한 특이적인 프라이머 |

<32>

<33> [실시 예 2] 양식 넙치의 게놈 DNA에서 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 1(fMC4R) 유전자의 구조 분석

<34> 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 4 유전자의 유전체 구성의 특징을 파악하기 위하여 PCR 기법을 이용하여 엑손(exon)과 인트론(Intron)의 구성을 파악하였다. 양식넙치의 게놈 DNA를 주형으로 하여 양식넙치의 유전자의 전체 부분에 해당하는 프라이머 (표 3; mc4R-ge1F, mc4R-ge1R)와 fMC4R 유전자의 상위부분에 해당하는 프라이머(mc4R-ge2R)와 fMC4R 유전자의 하위부위에 해당하는 프라이머(mc4-ge3F)를 이용하여 fMC4R 유전자의 모든 부분에 해당하는 부분을 도 6의 방법과 동일하게 PCR(중합효소연쇄반응) 방법으로 증폭하여 증폭산물의 염기서열 분석을 통해 양식넙치의 fMC4R의 유전체 구성을 확인하였다. 증폭 산물의 크기와 염기서열 결과를 살펴보면, 도 6은 양식넙치의 게놈 DNA에서 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자 (fMC4R)의 유전체 구성에 대한 젤 사진과 구조를 도시화한 것으로, 윗부분은 게놈 DNA에서 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자의 증폭결과를 나타낸 것이고, 아랫부분은 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자 구조를 분석하기 위한 실험 전략의 모식도를 나타낸 것으로, 도 6의 젤 사진의 결과와 같이 fMC4R의 유전자의 크기와 증폭산물의 산물의 염기서열 크기를 비교할 시에 fMC4R 게놈 구조는 fMC4R 유전자의 cDNA의 염기서열과 크기가 나지 않음을 알 수 있었으며, 염기서열의 결과 동일한 염기서열을 지닌 인트론을 지니지 않는 유전자의 유전체 구조를 지님을 알 수 있었다.

표 3. fMC4R 유전체 구조 파악을 위한 2 쌍의 프라이머

| 프라이머      | 염기 서열                             | 비 고                                      |
|-----------|-----------------------------------|------------------------------------------|
| mc4R-ge1F | 5'-GACGGATCATCCTTGGCTGAGAGAAAC-3' | fMC4R ORF의 5' 상위부분                       |
| mc4R-ge1R | 5'-TGCTGACGCTCTCACACACAGCAGA-3'   | fMC4R ORF의 3' 하위부분                       |
| mc4R-ge2R | 5'-GAACATGGTGATGAGGCAGATGAGCAC-3' | fMC4R ORF의 4TM domain 윗부분과 5TM domain 부분 |
| mc4R-ge3F | 5'-ATCACCATCTTCTACGCGCTGCGATAC-3' | fMC4R ORF의 3TM domain과 4TM domain 사이의 부분 |

<35>

[실시 예 3] 클로닝된 fMC4R 유전자 ORF 부위의 pcDNA3.1(-)Hygro와의 재조합에 의한 포유동물 세포주에 발현 가능한 발현벡터 클로닝 완성

도 7은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro 발현벡터의 지도를 나타낸 것으로, 동물 세포주에서 외래 유전자를 안정적으로 발현시키고 선별하기 위하여 사용되는 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

RACE 클로닝을 통해 완성된 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자 부위를 동물세포주에 발현 가능한 발현벡터로 완성하기 위하여, 도 7는 pcDNA3.1(-)Hygro 발현벡터의 지도를 나타낸 것으로, 동물 세포주에서 외래 유전자를 안정적으로 발현시키고 선별하기 위하여 사용되는 벡터의 구조를 나타낸 것이며, 동물세포주에서 안정적인 발현벡터인 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터의 제한효소(Xho I, Hind III) 절단부위에 클로닝을 하였다.

먼저, 표 4의 fMC4R 유전자의 상위부분과 하위부분에 해당하는 프라이머를 제작하였으며, 이들 프라이머의 상위부위에는 제한효소(프라이머 1; Xho I, 프라이머 2; Hind III) 절단부위에 해당하는 염기서열을 지니고 있다. 프라이머 1과 프라이머 2를 이용하여 fMC4R 유전자를 증폭하고, 증폭된 fMC1R 유전자와 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터를 제한효소(Xho I, Hind III)로 처리하여 각각 제한효소 절단부위가 노출되게 하였다.

도 8은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC4R 발현벡터의 지도를 나타낸 것으로, 동물 세포주에서 양식 넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자를 안정적으로 발현시키고 선별할 수 있는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자 재조합 벡터의 구조를 나타낸다.

그리고 노출된 fMC4R 유전자와 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 끼리 DNA ligase(DNA 라이게즈)라는 효소를 이용하여 연결하여 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 내에 fMC4R 유전자가 삽입되게 하여 도 8에서 처럼 재조합 발현벡터인 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC4R 을 클로닝 하였다.

표 4. pcDNA3.1(-)Hygro-fMC4R 벡터 구성을 위한 프라이머 구성

|        | 염기 서열                               | 비 고                       |
|--------|-------------------------------------|---------------------------|
| 프라이머 1 | 5'-AACTCGAGGGAGACATTATGAACGCTACA-3' | fMC4R 앞부분에 Xho I 부위 첨가    |
| 프라이머 2 | 5'-ACAAGCTTAGCTCGAAACATCAAAGTCC-3'  | fMC4R 뒷부분에 Hind III 부위 첨가 |

[실시예 4] 양식넙치 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 발현 특성

양식넙치의 뇌에서 분리된 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 발현양상은 Qiagen의 2xQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 양식넙치의 각각의 조직에서 분리된 RNA에서 cDNA를 합성하여 분석이 되었다.

먼저 기존의 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자에 대해 하기 표 4의 프라이머를 이용하여 정량중합효소연쇄반응(real time PCR)을 수행하여 하기의 프라이머에 대한 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 PCR 사이클 수에 나타난 발색 정도에 대한 검량선을 작성하여 정량화를 시도한다.

그리고 양식넙치의 각각의 조직 (간, 신장, 근육, 난소, 정소, 아가미, 뇌, 표피, 심장, 대장 등)에서 분리한 RNA의 cDNA를 주형으로 하기의 프라이머를 이용하여 real time PCR을 수행하여 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 발현 양상을 정량화한다. 정량중합효소연쇄반응(real time PCR)을 수행하여 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자의 발현 양상을 정량화하였다.

도 9는 본 발명의 주체가 되는 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자(fMC4R)가 양식넙치의 조직내에서의 발현 양상을 나타낸 그래프이며, 양식넙치의 다양한 조직에서 발현되는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자의 발현량을 정량화한 그래프로서 다양한 조직에서 전체 RNA를 추출하고, 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자의 특이적인 프라이머를 사용하여 정량 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 그 결과는 양식넙치의 fMC4R 유전자의 발현이 위장(stomach), 장(intestine), 섭식활동을 제어하는 부분인 뇌(brain)에서 뚜렷하게 발현됨을 알 수 있었고, 상대적으로 피부에서 발현되지 않음으로 해서 피부색 조절과는 다른 기능성을 지닌다는 특성을 파악하였다. 그리고, 도 3의 다른 생물의 MC4R과 비교시 높은 상동성을 나타내는 것과 도 9의 결과를 통해 fMC4R 유전자의 특징적인 기능인 섭식조절과 체중조절에 관련된 유전자임을 알 수 있었으며, 이것은 동물세포주의 발현실험을 통해 섭식조절과 먹이섭취에 따른 체중조절에 이용할 수 있는 수용체로서 다양한 기질의 이용성을 제시하였다.

표 5. fMC4R 유전자 발현 양상을 확인하기 위한 Real Time-PCR 용 특이적 프라이머

| 프라이머    | 염기 서열                                     | 비 고                        |
|---------|-------------------------------------------|----------------------------|
| forward | 5'-GCC TCA TCA CCA TGT TCT TCA CCA TGC-3' | fMC4R 321bp product를 증폭시키는 |
| reverse | 5'-CGT AAA TGA TGG GGT CGA TGA CGG AGT-3' | fMC4R 유전자의 특이적인 염기서열       |

<48>

<49>

상기의 실험 예를 종합하여 그 결과를 종합해보면,

<50>

도 1의 서열을 지닌 fMC4R 유전자는 도 4의 클로닝 방법과 도 6의 유전체 구성 확인을 통해 도 1의 978개의 DNA 염기서열을 지닌 유전자로서 도 2의 325개의 아미노산 서열을 부호화하고 있으며, 도 3과 도 4의 결과로서 일반적으로 다른 생물에서 확인 가능한 섭식조절과 먹이섭취에 따른 체중조절에 관여하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4(fMC4R) 기능을 지닌 유전자로 확인되었다. 또한 도 4의 다른 생물과의 상동성 비교를 통해 도 5에서 처럼 세포막내의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4의 세포막내의 구성을 파악하였고, 도 9의 결과로서 먹이섭취와 관련된 조직, 위장, 장, 뇌에서의 fMC4R 유전자의 발현유무를 확인함으로써 섭식조절과 먹이섭취에 따른 체중조절에 관여하는 수용체임을 알 수 있었다. 이를 통해 동물 세포주에서 발현가능한 도 8의 재조합 발현벡터를 완성하여 어류에서 섭식조절 및 나아가 인간의 섭식행동과 체중조절에 이용할 수 있는 연구가 가능하게 되었다. 상기와 같이 본 발명은 비록 상기의 실시 예에 한하여 설명하였지만 여기에만 국한된 것은 아니며 본 발명의 범주를 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능하다.

### 발명의 효과

<51>

이상에서 보여준 바와 같이 본 발명은 멜라닌세포 자극호르몬과 결합하여 먹이섭취 감소와 식욕저하를 통해 체중조절과 비만해소 등의 효과를 지닌 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자는 동물에서는 다양하게 분리 확인되었으나 어류에서 많은 종들에 있어서 확인이 되지 않고 있어 본 발명의 양식업치의 멜라노코르틴(Melanocortin) 수용체 4 유전자 (MC4R)의 확인과 구성은 어류에 있어서 먹이섭취 및 체중조절에 대한 활성을 지닌 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 구성을 확인할 수 있었다. pcDNA3.1(-)Hygro 벡터와의 재조합을 통한 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자의 형질전환체의 구성은 다양한 동물세포주에서 먹이섭취와 관련된 신호전달 기능을 확인할 수 있으며, 체중조절과 관련된 새로운 기질의 탐색에 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

<1>

도 1 은 978개의 DNA 염기서열로 구성된 양식업치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4 유전자(fMC4R)의 서열을 나타낸 것이다.

<2>

도 2 는 도 1의 DNA 염기서열을 부호화하여 양식업치의 멜라노코르틴 수용체 4의 325 개의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

<3>

도 3 은 양식업치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4의 아미노산 서열을 복어, 얼룩말고기(zebrafish), 생쥐, 그리고 인간의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 4의 서열과 상동성을 비교한 것이다.

<4>

도 4는 본 발명의 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자 (fMC4R)의 5' -RACE와 3' -RACE PCR 수행 결과와 구성의 도시화와 젤 사진을 표시한 것이다.

<5>

도 5는 본 발명의 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자 (fMC4R)의 세포막내 구성도를 도시화 한 것이다.

<6>

도 6은 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자 (fMC4R)의 유전체 구성에 대한 젤 사진과 구조를 도시화 한 것이다.

<7>

도 7은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.

<8>

도 8은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC4R 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.

<9>

도 9는 본 발명의 주체가 되는 멜라노코르틴 (Melanocortin) 수용체 4 유전자(fMC4R)가 양식업치의 조직내에서 발현 양상을 나타낸 그래프이다.

도면

도면1

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ATGAACGCTA CAGAACATCC TGGACTGATC CAAGGCTTCC ACAACCGGAG CCAGACCACG CCGTCACCGA  | 70  |
| ACGAGGACTT TTCGCCCCAG GACAAGGACT CGTACGCAGG ATGCTACGAG CAGCTGCTGA TCTCCACCGA  | 140 |
| GGTCTTCCTC ACTCTGGGCA TCGTCAGCCT GCTGGAGAAC ATCCTGGTGG TCGCTGCCAT AATCAAGAAC  | 210 |
| AAGAACCTTC ACTCGCCGAT GTACTTCTTC ATCTGCAGCC TTGCCGTTGC TGACATGCTC GTCAGCGTCT  | 280 |
| CCAACGCCCTC TGAGACCATC GTCATCGCGC TCATCAACGG AGGAAACCTG ACCATCCCCG TCACGTGTAT | 350 |
| TAAAAGCATG GACAACGTGT TTGACTCTAT GATCTGCAGC TCCCTGCTGG CGTCCATCTG CAGCCTGCTC  | 420 |
| GCCATCGCAG TCGACCGCTA CATCACCATC TTCTACGCGC TCGGATACCA CAACATCGTC ACGCTGCGGC  | 490 |
| GGCGCATGCT GGTTCATCAGC AGCATCTGGA CGTCTGCTAT CGTCTCGGGC ATCCTCTTCA TCATCTACTC | 560 |
| GGAGAGCACC ACGGTGCTCA TCTGCTCTAT CACCATGTTT TTCACCATGC TGGTGTCTAT GGTGTGCTG   | 630 |
| TACGTGCACA TGTTCTGTCT GCGCGCTTG CACATGAAGC GCATCGCGGC GCTGCGGGC AACGCGCCCA    | 700 |
| TCCAACAGCG AGCCAACATG AAGGGCGCCA TCACCCTCAC CATCTCTCTC GGGGTGTTGG TGGTGTGCTG  | 770 |
| GGCGCGCTTT TTCCTCCACC TCATCTCTAT GATCAGTGC CCGAGGAACC CGTACTGCAC CTGCTTCATG   | 840 |
| TCCCACTTCA ACATGTACCT CATCTCATC ATGTGCAACT CCGTCATCGA CCCCATCATT TACGCTTCC    | 910 |
| GCAGCCAGGA AATGAGGAAA ACCTTCAAGG AGATTITCTG CTGCTCAAAC GCTCTGCTGT GTGTGTGA    | 978 |

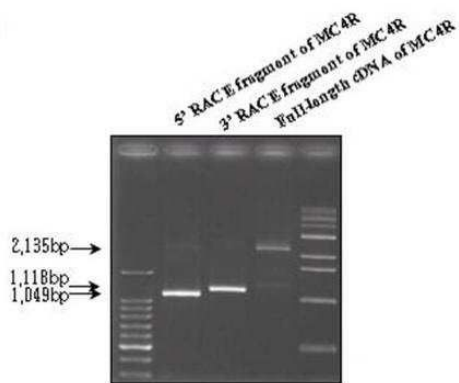
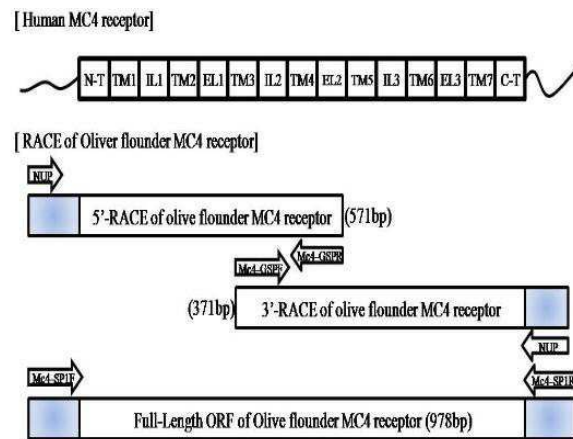
도면2

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| MET Asn Ala Thr Glu His Pro Gly Leu Ile Gln Gly Phe His Asn Arg Ser Gln Thr Thr | 20  |
| Pro Ser Pro Asn Glu Asp Phe Ser Ala Gln Asp Lys Asp Ser Ser Ala Gly Cys Tyr Glu | 40  |
| Gln Leu Leu Ile Ser Thr Glu Val Phe Leu Thr Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Glu Asn | 60  |
| Ile Leu Val Val Ala Ala Ile Ile Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro MET Tyr Phe Phe | 80  |
| Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp MET Leu Val Ser Val Ser Asn Ala Ser Glu Thr Ile | 100 |
| Val Ile Ala Leu Ile Asn Gly Gly Asn Leu Thr Ile Pro Val Thr Leu Ile Lys Ser MET | 120 |
| Asp Asn Val Phe Asp Ser MET Ile Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu | 140 |
| Ala Ile Ala Val Asp Arg Tyr Ile Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Arg Tyr His Asn Ile Val | 160 |
| Thr Leu Arg Arg Ala MET Leu Val Ile Ser Ser Ile Trp Thr Cys Cys Ile Val Ser Gly | 180 |
| Ile Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Glu Ser Thr Thr Val Leu Ile Cys Leu Ile Thr MET Phe | 200 |
| Phe Thr MET Leu Val Leu MET Val Ser Leu Tyr Val His MET Phe Leu Leu Ala Arg Leu | 220 |
| His MET Lys Arg Ile Ala Ala Leu Pro Gly Asn Ala Pro Ile Gln Gln Arg Ala Asn MET | 240 |
| Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Leu Gly Val Phe Val Val Cys Trp Ala Pro Phe | 260 |
| Phe Leu His Leu Ile Leu MET Ile Thr Cys Pro Arg Asn Pro Tyr Cys Thr Cys Phe MET | 280 |
| Ser His Phe Asn MET Tyr Leu Ile Leu Ile MET Cys Asn Ser Val Ile Asp Pro Ile Ile | 300 |
| Tyr Ala Phe Arg Ser Gln Glu MET Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Phe Cys Cys Ser Asn | 320 |
| Ala Leu Leu Cys Val                                                             | 325 |

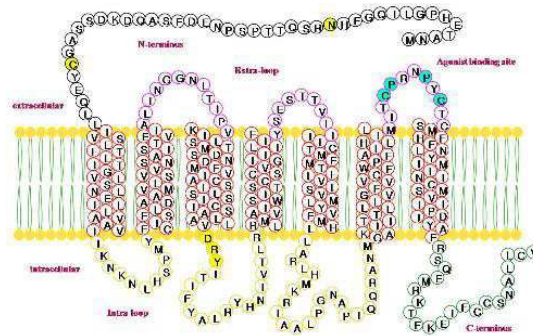
도면3

|                       |      |                                                                |     |
|-----------------------|------|----------------------------------------------------------------|-----|
| FJ                    | MC4R | MNATEHPGLIQGFH--NRSQTTSPNEDFSAQDKDSSAGCYEQLLISTEVFLTLGIYSLL    | 58  |
| Fr                    | MC4R | MNATDPPGRVQDFS--NGSQT--PETDFPNEEKESSTGCYEQMLISTEVFLTLGIISLL    | 55  |
| Dr                    | MC4R | MNTSHHHGLHHSFB--NHSQG-ALPVGKPSHGDRGASAGCYEQLLISTEVFLTLGLYSLL   | 57  |
| Mm                    | MC4R | MNSTHHHGMVTSLLHLINRSSVQLHSNASESLGKGHPDGGCYEQLFVSPEVFVTLGVISLL  | 60  |
| Hm                    | MC4R | MVNSTHRCMTLSLHLINRSSVQLHSNASESLGKGYSDDGGCYEQLFVSPEVFVTLGVISLL  | 60  |
| * : * * * * *         |      |                                                                |     |
| <b>TM1</b>            |      |                                                                |     |
| FJ                    | MC4R | ENILVVAAIKKNKLNHSPMYFFICSLAVADMLYSVSNASETIVIALINGGNLTIPVTLIK   | 118 |
| Fr                    | MC4R | ENILVVAIVKKNKLNHSPMYFFICSLAVADMLYSVSNASETIVIALINGGTLIPATLIK    | 115 |
| Dr                    | MC4R | ENILVIAAIKKNKLNHSPMYFFICSLAVADMLYSVSNASETVVMALITGGNLTNRESIK    | 117 |
| Mm                    | MC4R | ENILVIAIAKKNKLNHSPMYFFICSLAVADMLYSVSNASETIVITLLNS-TDDAQSETIV   | 119 |
| Hm                    | MC4R | ENILVIAIAKKNKLNHSPMYFFICSLAVADMLYSVSNASETIVITLLNS-TDDAQSETIV   | 119 |
| * : * * * * *         |      |                                                                |     |
| <b>TM2</b>            |      |                                                                |     |
| FJ                    | MC4R | SMONVFDSCISSLASI CSLLAIAVDRIITIFVALRYHNI VTLRRAMLVISIIWTCCIV   | 178 |
| Fr                    | MC4R | SMONVFDSCISSLASI CSLLAIAVDRIITIFVALRYHNI VTLRRASLVISIIWTCCIV   | 175 |
| Dr                    | MC4R | NMONVFDSCISSLASISLLAIAVDRIITIFVALRYHNI MTQRRAGTIIITCIWTFCIV    | 177 |
| Mm                    | MC4R | NIDNVIDSVICSSLASISLLSIAVDRIITIFVALQYHNI MTVRRVGIISCIWAACIV     | 179 |
| Hm                    | MC4R | NIDNVIDSVICSSLASISLLSIAVDRIITIFVALQYHNI MTVKRVGIISCIWAACIV     | 179 |
| * : * * * * *         |      |                                                                |     |
| <b>TM3</b>            |      |                                                                |     |
| FJ                    | MC4R | SGILFIIVSESTTVLIQLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRI AALPGNAPI QORA | 238 |
| Fr                    | MC4R | SGVLFIIVSESTTVLIQLITMFFTMLVLMASLYVHMFLLARLHMKRI AAMPGNAPI HORA | 235 |
| Dr                    | MC4R | SGVLFIIVSESTTVLIQLISNFFTMLALMASLYVHMFLLARLHMKRI AALPGNGPI WOA  | 237 |
| Mm                    | MC4R | SGVLFIIVSDSSAVIQLISNFFTMLVLMASLYVHMFLLARLH KRIAVLPGTGTIRQGT    | 239 |
| Hm                    | MC4R | SGILFIIVSDSSAVIQLITMFFTMLALMASLYVHMFLLARLH KRIAVLPGTGTIRQGA    | 239 |
| * : * * * * *         |      |                                                                |     |
| <b>TM4</b> <b>TM5</b> |      |                                                                |     |
| FJ                    | MC4R | NMKGAI TLTILLGVFVVCWAPFFLHLILNITCPKNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNVDP    | 298 |
| Fr                    | MC4R | NLKGAITLTILLGVFVVCWAPFFLHLILNITCPKNPYCTCFMSHFNMYLILIMCNVDP     | 295 |
| Dr                    | MC4R | NMKGAI TITILLGVFVVCWAPFFLHLILNITCPKNPYCVCFMSHFNMYLILIMCNVDP    | 297 |
| Mm                    | MC4R | NMKGAI TLTILLGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPQNPYCVCFMSHFNLYLILIMCNVDP    | 299 |
| Hm                    | MC4R | NMKGAI TLTILLGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPQNPYCVCFMSHFNLYLILIMCNVDP    | 299 |
| * : * * * * *         |      |                                                                |     |
| <b>TM6</b> <b>TM7</b> |      |                                                                |     |
| FJ                    | MC4R | LJYAFRSQEMRKTFKEIFCCS--NALLCV----                              | 325 |
| Fr                    | MC4R | LJYAFRSQEMRKTFKEIFCCS--QMLVCM----                              | 322 |
| Dr                    | MC4R | LJYAFRSQEMRKTFKEI CCCC--YGLASLCV--                             | 326 |
| Mm                    | MC4R | LIALRSQELRKTFKEIICFVPLGGICELSSRY                               | 332 |
| Hm                    | MC4R | LIALRSQELRKTFKEIICFVPLGGICOLSSRY                               | 332 |
| * : * * * * *         |      |                                                                |     |

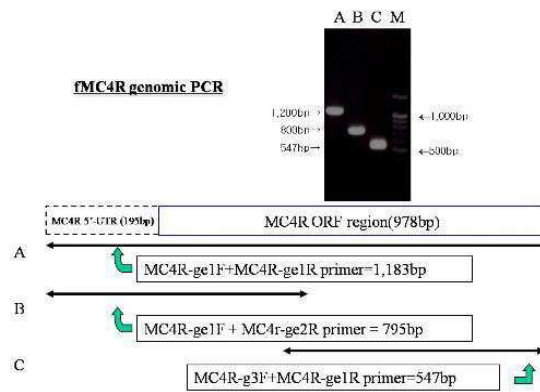
도면4



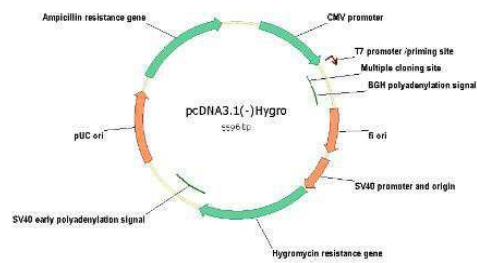
도면5



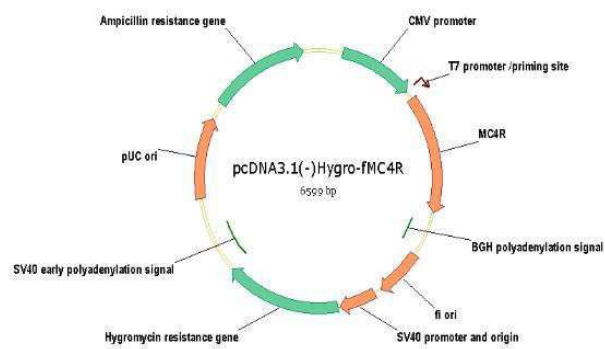
도면6



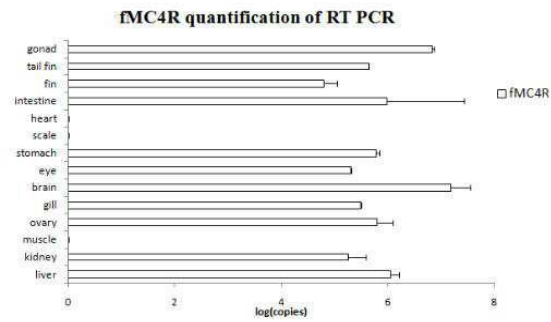
도면7



도면8



## 도면9



## 서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation  
 <120> Melanocortin receptor 4 gene of Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 978

<212> DNA

<213> fMC4R

<400> 1

atgaacgcta cagaacatcc tggactgac caaggcttcc acaaccggag ccagaccacg 60

ccgtcaccga acgaggactt ttccgccag gacaaggact cgtcagcagg atgctacgag 120

cagctgctga tctccaccga ggtcttctc actctgggca tcgtcagcct gctggagaac 180

atcctgggtg tcgtgcat aatcaagaac aagaaccttc actcgccgat gtacttcttc 240

atctgcagcc ttgccgttgc tgacatgctc gtcagcgtct ccaacgctc tgagaccatc 300

gtcatcgccg tcatcaacgg aggaaacctg accatccccg tcacgttgat taaaagcatg 360

gacaacgtgt ttgactctat gatctgcagc tcctgctgg cgtccatctg cagcctgctc 420

gccatcgag tcgaccgcta catcaccatc ttctacgcgc tgcgatacca caacatcgtc 480

acgctcgggc gggcgatgct ggtcatcagc agcatctgga cgtgctgcat cgtgtcgggc 540

atcctcttca tcattctact ggagagcacc acggtgtca tctgcctcat caccatgttc 600

ttcaccatgc tgggtgctcat ggtgtcgtcg tacgtgcaca tgttctgct ggcgcgcttg 660

cacatgaagc gcatcgcggc gctgccgggc aacgcgcca tccaacagcg agccaacatg 720

aaggcgcca tcacctcac catcctctc ggggtgttcg tgggtgtgct ggcgccgttt 780

ttctccacc tcattctcat gatcacgtgc ccgaggaacc cgtactgcac ctgcttcatg 840

tcccacttca acatgtacct catcctcatc atgtgcaact ccgtcatcga ccccatcatt 900

tacgccttcc gcagccagga aatgaggaaa accttcaagg agattttctg ctgctcaaac 960

gctctgctgt gtgtgtga 978

<210> 2  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Melanocyte-stimulating hormone receptor 4

<400> 2  
 Met Asn Ala Thr Glu His Pro Gly Leu Ile Gln Gly Phe His Asn Arg  
 1 5 10 15

Ser Gln Thr Thr Pro Ser Pro Asn Glu Asp Phe Ser Ala Gln Asp Lys  
 20 25 30

Asp Ser Ser Ala Gly Cys Tyr Glu Gln Leu Leu Ile Ser Thr Glu Val  
 35 40 45

Phe Leu Thr Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu Val Val  
 50 55 60

Ala Ala Ile Ile Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro Met Tyr Phe Phe  
 65 70 75 80

Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser Val Ser Asn Ala  
85 90 95

Ser Glu Thr Ile Val Ile Ala Leu Ile Asn Gly Gly Asn Leu Thr Ile  
100 105 110

Pro Val Thr Leu Ile Lys Ser Met Asp Asn Val Phe Asp Ser Met Ile  
115 120 125

Cys Ser Ser Leu Leu Ala Ser Ile Cys Ser Leu Leu Ala Ile Ala Val  
130 135 140

Asp Arg Tyr Ile Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Arg Tyr His Asn Ile Val  
145 150 155 160

Thr Leu Arg Arg Ala Met Leu Val Ile Ser Ser Ile Trp Thr Cys Cys  
165 170 175

Ile Val Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Tyr Ser Glu Ser Thr Thr Val  
180 185 190

Leu Ile Cys Leu Ile Thr Met Phe Phe Thr Met Leu Val Leu Met Val  
195 200 205

Ser Leu Tyr Val His Met Phe Leu Leu Ala Arg Leu His Met Lys Arg  
210 215 220

Ile Ala Ala Leu Pro Gly Asn Ala Pro Ile Gln Gln Arg Ala Asn Met  
225 230 235 240

Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu Leu Gly Val Phe Val Val Cys  
245 250 255

Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Ile Leu Met Ile Thr Cys Pro Arg  
260 265 270

Asn Pro Tyr Cys Thr Cys Phe Met Ser His Phe Asn Met Tyr Leu Ile  
275 280 285

Leu Ile Met Cys Asn Ser Val Ile Asp Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Arg  
290 295 300

Ser Gln Glu Met Arg Lys Thr Phe Lys Glu Ile Phe Cys Cys Ser Asn  
305 310 315 320

Ala Leu Leu Cys Val  
325