



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0052929
(43) 공개일자 2009년05월27일

(51) Int. Cl.

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

(21) 출원번호 10-2007-0119496

(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

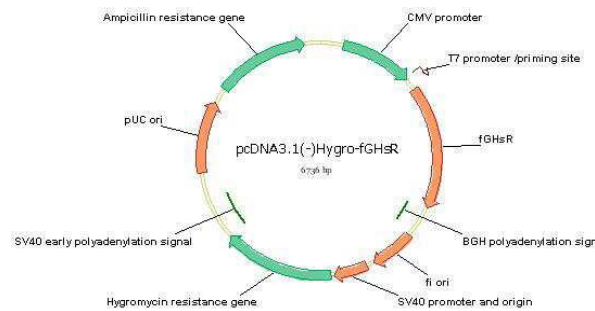
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 양식 넓치의 그렐린 수용체 유전자 클로닝

(57) 요약

본 발명은 양식 넓치의 그렐린 수용체 유전자 클로닝에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 경골어류인 양식넓치에서 그렐린 수용체를 생산할 수 있는 유전자와 발현 벡터의 구성에 대한 것을 특징으로하는 그렐린 수용체 유전자 클로닝에 관한 것이다.

대표도 - 도10



특허청구의 범위

청구항 1

양식 낚치의 뇌에서 분리된 그렐린 수용체 (fGHSR) 유전자는 1152의 염기로 구성되어 있고, 383개의 아미노산으로 구성되며, 게놈 DNA상에서 그렐린 수용체 유전자의 구조는 2개의 엑손(Exon)과 1개의 인트론(Intron)으로 구성됨을 특징으로 하는 그렐린 수용체 (fGHSR) 유전자

청구항 2

제 1항에 있어서, 양식 낚치 그렐린 수용체 (fGHSR) 유전자는, 유전자가 pcDNA3.1(-)Hygro에 DNA 합성효소 (ligase)로 재조합되어 발현 가능한 pcDNA3.1(-)Hygro-fGHSR 발현벡터임을 특징으로 하는 그렐린 수용체 (fGHSR) 유전자

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <11> 본 발명은 양식 낚치의 그렐린 수용체 유전자 클로닝에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 경골어류인 양식낚치에서 그렐린 수용체를 생산할 수 있는 유전자와 발현 벡터의 구성에 대한 것을 특징으로 하는 그렐린 수용체 유전자 클로닝에 관한 것이다. 그렐린은 쥐와 인간에서 처음으로 성장 호르몬 분비촉진제 수용체의 내생적 리간드로 분리되었으며(Kojima *et al.*, 1999a) 척추동물에서 성장호르몬 분비를 포함한 다양한 생리학적 기능을 조절한다(Gualillo *et al.*, 2003).
- <12> 인간에서 분리된 그렐린은 28개의 아미노산으로 구성된 NH₂-Gly-Ser-Ser-Phe-Leu -Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg-COOH의 선형 펩티드로서 3번째 Ser에 옥타노일 그룹(n-octanoyl group)의 잔기가 존재하였다(Kojima *et al.*, 1999b;Kojima *et al.*, 2001).
- <13> 이후 다른 생물종인 황소개구리(Kaiya *et al.*, 2001;Kaiya *et al.*, 2006b), 닭(Kaiya *et al.*, 2002a), 차벌메기(Kaiya *et al.*, 2005), 뱀장어(Kaiya *et al.*, 2003c), 틸라피아(Kaiya *et al.*, 2003d), 무지개송어(Kaiya *et al.*, 2003b), 등에서 분리되었다.
- <14> 성장호르몬 분비촉진제 수용체, 그렐린 수용체(GHSR)는 G 단백질 쌍을 이루는 수용체의 한 종류로서 7개의 막관통 도메인 (transmembrane, TM)으로 구성되어 있고, 처음 발견 되었을 때 합성된 성장호르몬 분비촉진제의 수용체 이었으나, 최근 연구에서 그렐린이 포유동물이 아닌 척추동물 중에서도 성장호르몬 분비촉진제(GHS) 수용체의 내생적 리간드임이 밝혀졌다(Unniappan *et al.*, 2002;Kaiya *et al.*, 2002b;Kaiya *et al.*, 2003a;Kaiya *et al.*, 2003e;Kaiya *et al.*, 2006a;Kaiya *et al.*, 2006c).
- <15> 그렐린 수용체(GHSR)는 뇌하수체에서 발현되며, 이 유전자는 2개의 엑손으로 구성되어 있고, 유전자의 선택적 전사과정에 의하여 GHS-R1a와 GHS-R1b의 두 종류의 수용체 유전자형이 존재한다(Howard *et al.*, 1996). GHS-R1a의 경우는 GHS-R의 기능을 가지고 있지만 GHS-R1b는 TM6과 TM7 도메인의 결실로 GHS-R의 기능을 가지지 못한다. 어류에서의 그렐린 수용체는 복어에서 처음 확인되었고(Palyha *et al.*, 2000), 복어의 그렐린 수용체 유전자는 인간의 그렐린 수용체 유전자와 58%의 상동성을 나타내었고, 복어 그렐린 수용체가 발현하는 인간배아신장(HEK) 세포주에 인간 그렐린을 처리하였을 때 그렐린 수용체가 활성화됨을 확인하였는데, 이로서 그렐린 수용체의 구조가 어류에서 포유동물에 이르기까지 보존되어 있을 것으로 예상된다.
- <16> 그렐린 수용체는 성장호르몬 분비와 관련이 있다(Kojima *et al.*, 1999c;Peterseim *et al.*, 2001). 그러나 그렐린 수용체는 NPY(neuropeptide Y)와 AGRP(aguti-related protein)와 더불어 신경메커니즘에서 에너지 항상성과 섭식을 조절하는 것이 가장 대표적인 생리학적 역할인 것으로 보인다(Tschop *et al.*, 2000;Nakazato *et al.*, 2001;Asakawa *et al.*, 2003;Cummings and Schwartz, 2003;Sun *et al.*, 2004). 그렐린은 대표적 식욕증진 호르몬으로서 중요한 역할을 한다.
- <17> 상기 언급된 생물학적 활성 이외에도 그렐린은 그렐린 수용체를 매개하여 여러 가지 생물학적 활성을 나타내는

데 세포증식, 포도당 신생합성, 세포분화, 혈관신생 등에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Camina, 2006).

<18> 본 발명은 그렐린을 기질로 삼는 수용체를 탐색하였다. 현재 알려진 그렐린 수용체는 1가지 종류만 알려져 있으며 양식넙치에서는 아직 보고되지 않았다. 다른 생물종에서도 멜라닌 농축 호르몬 수용체의 염기서열이나 기능연구가 진행되고 있으나 아직 미흡한 단계이며 염기서열 분석이 적은 중 범위에서 이루어진 상태이다.

<19> 이에, 본 발명자들은 양식 넙치의 그렐린 수용체에 대한 연구를 진행하면서 그렐린 수용체를 클로닝하여 그의 염기서열을 규명하고, 인간 및 쥐와 같은 포유동물에서 발현할 수 있도록 발현벡터에 그렐린 수용체를 재조합함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<20> 따라서 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 그렐린 수용체 유전자를 제공하는 것으로, 이를 구체적으로 설명하면, 도 1로 기재되는 염기서열을 갖는 그렐린 수용체 유전자를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 그렐린 수용체 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 제공된 재조합 벡터를 동물 세포주에 감염시켜 그렐린과 그렐린 수용체의 특성을 알아볼 수 있고, 그렐린 수용체의 또 다른 작용기를 찾을 수 있다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 그렐린 수용체 유전자를 제공한다.

<22> 또한 인간이나 쥐와 같은 포유동물의 세포에서 양식넙치의 그렐린 수용체 유전자를 발현시키고, 세포에서 수용체로서 기능을 확인할 수 있도록 재조합 벡터를 제공한다.

<23> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<24> 본 발명은 그렐린을 기질로 삼는 수용체 단백질을 코딩하는 도 1로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 유전자를 제공한다.

<25> 본 발명의 1개의 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질, 유전자의 게놈 DNA 서열에 대하여 하기 표 1에 기재하였다.

표 1. 그렐린 수용체 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질

유전자 염기서열	유전자명	단백질	단백질의 아미노산 서열	유전자의 게놈 DNA 염기서열
도 1	fGHSR	그렐린 수용체 (Ghrelin receptor)	도 2	도 3

<26>

<27> 본 발명에 따라 제공되는 유전자들은 다양한 숙주세포에 도입되어 그렐린 수용체를 발현하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<28> 본 발명의 그렐린 수용체 유전자는 도 1에서 보는 바와 같이 1152의 염기서열로 구성되어 있으며, 도 2는 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 아미노산 서열을 표시한 것으로, 383개의 아미노산으로 구성되며, 또한, 본 발명은 상기 그렐린 수용체 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 그리고, 도 3은 양식넙치의 게놈 DNA에서 그렐린 수용체 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.

<29> 본 발명의 재조합 벡터는 그렐린 수용체 기본 벡터에 삽입하여 제조한 것이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터는 유전자의 클로닝 또는 포유동물 세포주에 형질 도입하여 발현할 수 있는 벡터가 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 pcDNA3.1(-)Hygro (Invitrogen, USA) 벡터를 사용하여 fGHSR 유전자를 포함하는 각각의 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 'pcDNA3.1(-)Hygro-fGHSR'이라 명명하였다. 또한, 본 발명은 상기 그렐린 수용체 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포에 형질 도입한 균주를 제공한다.

<30> 상기에서 숙주세포로 대장균을 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 도 1로 기재되는 fGHSR 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pcDNA3.1(-)Hygro-fGHSR를 대장균인 DH5 α에 형질 도입한 균주를 제조하였다.

<31> 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.

<32> 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

<33> [실시 예 1] 그렐린 수용체 유전자의 재조합에 의한 포유동물 세포주에 발현 유전자 클로닝

<34> 도 4는 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 5'- and 3'-RACE PCR 수행 결과를 아가로스 겔 전기영동 사진이며, 양식넙치 뇌에서 확보된 상보적 DNA로부터 그렐린 수용체 유전자 증폭과정의 결과를 나타낸 것이며, 도 5는 그렐린 수용체 유전자의 5'- and 3'-RACE PCR 수행 결과와 구성 즉, 인간 그렐린 수용체 유전자와 비교하여, 증폭된 양식넙치의 그렐린 수용체 유전자의 실험 방법의 모식도를 나타내며.

<35> 양식 넙치의 뇌에서 분리된 전체 RNA로부터 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)를 사용하여 5'- and 3'-RACE(Rapid amplification of cDNA ends) 실험을 실시하여 fGHSR 유전자의 완전한 ORF(open reading frame) 부분을 증폭하였다.

<36> 도 9는 본 발명에 사용된 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 DNA의 유전자 지도를 나타낸 것으로, 동물 세포주에서 외래 유전자를 안정적으로 발현시키고 선별하기 위하여 사용되는 벡터의 구조이며, 도 10은 본 발명의 pcDNA3.1(-)-fGHSR 벡터 DNA의 유전자 지도를 나타낸 것으로, 동물 세포주에서 양식 넙치의 그렐린 수용체 유전자를 안정적으로 발현시키고 선별할 수 있는 양식넙치 그렐린 수용체 유전자 재조합 벡터의 구조를 나타낸 것이다.

<37> 따라서, 증폭된 fGHSR 유전자를 동물 세포주에서 발현할 수 있게 하는 pcDNA3.1(-)Hygro vector에 클로닝을 하기 위하여 pcDNA3.1(-)Hygro vector에 포함된 제한효소(BamH I, Hind III) 부위를 선별하였다. 선별된 제한효소(BamH I, Hind III) 부위를 가지는 한 쌍의 프라이머(표 2 참조)를 제작하여 fGHSR 유전자 부위만을 증폭시키고, 증폭된 fGHSR 유전자 ORF 바깥부분을 제한효소(BamH I, Hind III) 처리하여 제거하고, pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 DNA에도 동일한 제한효소(BamH I, Hind III) 처리하였다. 삽입 부분인 fGHSR 유전자 부분과 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터를 DNA ligase를 사용하여 pcDNA3.1(-)Hygro-fGHSR 재조합 DNA를 클로닝 하였다(도 9, 도 10 참조).

표 2. pcDNA3.1(-)Hygro 벡터에 클로닝 하기 위해 사용된 프라이머 쌍

	염기서열	비고
pcGHSR-F-BamH I	5'-AAG GAT CCA TGC CCA CTT GGC CCA ATC AC-3'	fGHSR 앞부분에 BamH I 첨가
pcGHSR-R-Hind III	5'-AAA AGC TTT CAG AAG CTG ACT GAA GAC-3'	fGHSR 뒷부분에 Hind III 첨가

<38>

<39> [실시 예 2] 양식 넙치의 게놈 DNA에서 그렐린 수용체 유전자구조 분석

<40> 도 7은 본 발명의 그렐린 수용체의 유전자 구조를 두 개의 엑손과 하나의 인트론으로 구성되어있음을 도시화한 것으로, 이를 상세하게 설명하면, 양식넙치의 게놈 DNA에서 그렐린 수용체의 유전자의 엑손과 인트론의 구조를 보인 것이며, (A) 양식넙치의 게놈 DNA에서 그렐린 수용체 유전자의 구조를 분석하기 위한 실험 전략의 모식도이고, (B) 그렐린 수용체 유전자 구조 분석 실험결과를 분석한 모식도를 나타낸 것이다. 그 결과, 그렐린 수용체의 게놈 DNA에서 유전자의 구조를 파악하기 위하여 PCR기법과 염기서열 분석을 이용하여 그렐린 수용체 유전자가 2개의 엑손(Exon)과 1개의 인트론(Intron)의 구성되어 있음을 파악하였다(도 7 참조). 2쌍의 프라이머(표 3 참조)를 이용하여 4가지 PCR 반응 조합을 구성하여 그렐린 수용체 유전자의 각 부분을 증폭하였다. cDNA에서 확보된 그렐린 수용체 유전자의 각 부분을 증폭을 실시하고, 동일한 프라이머 조합을 사용하여 게놈 DNA에서 그렐린 수용체 유전자의 각 부분을 증폭을 실시하여 비교분석 하였다(도 6 참조).

<41> 도 6은 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 단백질의 모형도로 나타낸 것으로, 선행 연구에서 알려진 그렐린 수용체 단백질 구조를 비교하여, 확보된 양식넙치의 염기서열을 이용하여 추론되는 아미노산 서열을 세포막에서의 그렐린 수용체 단백질의 모형도로 표시 하였다.

표 3. 양식 납치의 게놈 DNA에서 그렐린 수용체 유전자 구조를 분석하기 위해 사용된 프라이머 쌍

	염기서열	비고
ghsr-ge1F	5'-AAC TCG GAC AGT GAT AAT GGC AGG GAG-3'	fGHSR ORF의 5' 바깥쪽
ghsr-ge2F	5'-GCT CTC ATT CTT CTG CTG TGG ACA GTG-3'	fGHSR ORF의 TM2 domain
ghsr-ge1R	5'-TCA GAA GCT GAC TGA AGA CAC CGT CCA-3'	fGHSR ORF의 3' 바깥쪽
ghsr-ge2R	5'-GCA CAG TGA GAC AGA ACA CTG GCA TGA-3'	fGHSR ORF의 EL2 domain

[실시 예 3] 다양한 조직에서 그렐린 수용체 유전자의 발현 양상

도 8은 본 발명의 그렐린 수용체의 조직별 발현 패턴을 도시화 한 것으로, 양식납치의 다양한 조직에서 발현되는 그렐린 수용체 유전자의 발현량 정량화한 그래프하여 다양한 조직에서 전체 RNA를 추출하고, 그렐린 수용체 유전자의 특이적인 프라이머를 사용하여 실시간 정량 PCR을 실시하였다. 즉, 그렐린 수용체 유전자의 조직별 분포를 알아보기 위하여 양식납치의 GHsR mRNA를 실시간 정량 PCR법을 이용하였다. 실험에 사용된 조직은 생식선, 꼬리지느러미, 배지느러미, 소장, 비장, 심장, 표피, 위장, 눈, 뇌, 아가미, 난소, 근육, 신장, 간에 사용되었고, 각각의 조직에서 전체 RNA를 분리하여 실험에 사용하였다. 분리된 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 주형으로 사용하고, 엑손 1의 부위를 증폭할 수 있는 한 쌍의 프라이머(표 4 참조)를 제작하여 실시간 정량 PCR을 수행하였고, 이를 GHsR 유전자 복제수로 환산하여 정리하였다(도 8 참조).

표 4. 그렐린 수용체 유전자의 조직별 발현량을 실시간 정량 PCR법에 의한 분석에 사용되는 프라이머 쌍

	염기서열	비고
RT-fGHSR-F	5'-CCT CTA CCT GTG CAG CAT GGC TGT GTC-3'	Real-time PCR forward
RT-fGHSR-R	5'-CCC TCC AAG GAG AGG CCA GTC TCA TTC-3'	Real-time PCR reverse

상기의 실험 예를 종합하여 그 결과를 종합해보면,

본 발명의 그렐린 수용체 유전자는 1152의 염기로 구성되어 있고, 383개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 게놈 DNA상에서 그렐린 수용체 유전자의 구조는 2개의 엑손과 하나의 인트론으로 구성되어 있음을 확인하였다(도 6 참조).

또한, 본 발명은 그렐린 수용체 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하고, 제공된 재조합 벡터를 동물 세포주에 감염시켜 안정적인 발현을 유도할 수 있으며, 안정적인 그렐린 수용체 유전자 발현 세포주를 이용하여 그렐린과 그렐린 수용체의 특성을 알아보고, 그렐린 수용체의 또 다른 작용기를 확보할 수 있을 것이다.

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

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 양식납치의 뇌에서 분리된 그렐린 수용체 유전자를 포유동물 세포주에 형질전환 할 수 있는 벡터에 재조합하여 발현을 유도할 수 있다. 그렐린 수용체 유전자는 먹이 섭식 조절과 위장관 기능의 조절과 더불어 생물종의 에너지 항상성에 관여하게 되는데 이는 그렐린 수용체가 관련된 섭식의 조절, 위장관 기능 및 에너지 항상성에 관여하여 비만 해결에 유용한 새로운 약제 선발에 유용한 체계를 확립할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 염기서열을 표시한 것이다.

도 2 는 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 아미노산 서열을 표시한 것이다.

도 3 은 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 게놈 DNA 염기서열을 표시한 것이다.

도 4는 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 5'- and 3'-RACE PCR 수행 결과를 아가로스 겔 전기영동 사진으로 구

성 한 것이다.

- <5> 도 5는 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 5'- and 3'-RACE PCR 수행 결과와 구성
- <6> 도 6은 본 발명의 그렐린 수용체 유전자의 단백질의 모형도로 나타내었다
- <7> 도 7은 본 발명의 그렐린 수용체의 유전자 구조를 두 개의 엑손과 하나의 인트론으로 구성되어있음을 도시화 한 것이다.
- <8> 도 8은 본 발명의 그렐린 수용체의 조직별 발현 패턴을 도시화 한 것이다.
- <9> 도 9는 본 발명에 사용된 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 DNA의 유전자 지도를 나타낸 것이다.
- <10> 도 10은 본 발명의 pcDNA3.1(-)-fGHsR 벡터 DNA의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도면

도면1

ATGCCACATT GGCCTAATCA CTCGGAGTGC TTCTCCACA ACTGCAGCTG GGAGAAGATC	60
CACAAAGCCA CATGGAATGA TGACTACGTT CTGCTCTCTC TCAATTACTA CTCAATCCCT	120
CTCCTCACGG CCATCACCGT CGCCTGCACG CTGCTCTTTC TGGTCGGGAT GGCCGGTAAT	180
GTGATGACCA TTTTGGCGGT CAGTAAGTAC CGGGACATGC GCACCAACAC CAACCTCTAC	240
CTGTGCAGCA TGGCTGTGTC AGACCTGCTC ATCTTCCTCT GTATGCCTCT GGACCTGTAC	300
CGCATGTGGA GGTACAGGCC CTGGCGCTTT GGGGACGTGC TCTGTAAGCT CTTTCAGTTC	360
GTGTGAGAAI CGAGCACITA CTCACCATC CTGAGCATCA CTGCGCTCTC AGTGGAGCGC	420
TACCTGGCGA TCTGCTTCCC GTTACGCGCA AAGGCTCTGG TTACAAAGAG GCGGGTGCSC	480
GCTCTCATTC TTCTGCTGTG GACAGTGTCT CCCCTGAGCG CCGGACCTGT GTTTGTATG	540
GTGGGAGTGG AGCGGGGCGAG CATGGGACCA TTCAGCTCGG ACATGAATGA GACTGGCCTC	600
TCCTTGGAGG GCGGGGGGGA CACCGGGGAG TGTAAAGATGA CGCATTACGC CGTGGAGTCA	660
GGTCTGATGG GTGCCATGGT GTGGCTGAGC TCCGCTTCTT TCTTCATGCC AGTGTTCCTG	720
CTCACTGTGC TCTACAGCCT CATAGGCCGT CGACTGTGGC AGAGACACCG AGAGACAAGC	780
ATCAGCTCCC GCGTGGCTCA CAGGGACAAG AGCGACAGAC AGACCATCAA GATGCTGGTG	840
GTGGTGGTGC TGGCTTCTGT CCTCTGCTGG TTGCCGTTCC ACGTGGGTGC CTACCTGCAG	900
TTCCGCTCAC TGGAGCTCC GTCTCCTCTG CTCTCGGTGT TGTGAGATA TTGACGCTTG	960
GTGTGCGTGG TTCTCTCTTA CCTGAGCGCC GCCATCAACC CCATCCTCTA CAACACAATG	1020
TCCTGGAAGT ACCGGGGGGC AGCGGCTCGC CTCTTCGGCC TCGCCGACAG CCAGCCCCCT	1080
CGAGGACSCA CAGCCAGCAC CATGAAGGGA GACGGCTCGA ACGGCTGGAC GGTGTCTTCA	1140
GTGAGCTTCT GA	1152

도면2

Met Pro Thr Trp Pro Asn His Ser Glu Cys Phe Ser His Asn Cys Ser Trp Glu	18
Lys Ile His Asn Ala Thr Trp Asn Asp Asp Tyr Val Leu Pro Pro Leu Asn Tyr	36
Tyr Ser Ile Pro Leu Leu Thr Ala Ile Thr Val Ala Cys Thr Leu Leu Phe Leu	54
Val Gly Met Ala Gly Asn Val Met Thr Ile Leu Ala Val Ser Lys Tyr Arg Asp	72
Met Arg Thr Thr Thr Asn Leu Tyr Leu Cys Ser Met Ala Val Ser Asp Leu Leu	90
Ile Phe Leu Cys Met Pro Leu Asp Leu Tyr Arg Met Trp Arg Tyr Arg Pro Trp	108
Arg Phe Gly Asp Val Leu Cys Lys Leu Phe Gln Phe Val Ser Glu Ser Ser Thr	126
Tyr Ser Thr Ile Leu Ser Ile Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile	144
Cys Phe Pro Leu Arg Ala Lys Ala Leu Val Thr Lys Arg Arg Val Arg Ala Leu	162
Ile Leu Leu Leu Trp Thr Val Ser Pro Leu Ser Ala Gly Pro Val Phe Val Met	180
Val Gly Val Glu Arg Gly Ser Met Gly Pro Phe Ser Ser Asp Met Asn Glu Thr	198
Gly Leu Ser Leu Glu Gly Gly Gly Asp Thr Arg Glu Cys Lys Met Thr His Tyr	216
Ala Val Glu Ser Gly Leu Met Gly Ala Met Val Trp Leu Ser Ser Val Phe Phe	234
Phe Met Pro Val Phe Cys Leu Thr Val Leu Tyr Ser Leu Ile Gly Arg Arg Leu	252
Trp Gln Arg His Arg Glu Thr Ser Ile Ser Ser Arg Val Ala His Arg Asp Lys	270
Ser Asp Arg Gln Thr Ile Lys Met Leu Val Val Val Val Leu Ala Phe Val Leu	288
Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Tyr Leu Gln Phe Arg Ser Leu Asp Ala	306
Pro Ser Pro Leu Leu Ser Val Leu Ser Glu Tyr Cys Ser Leu Val Ser Val Val	324
Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ala Ile Asn Pro Ile Leu Tyr Asn Thr Met Ser Trp	342
Lys Tyr Arg Gly Ala Ala Ala Arg Leu Phe Gly Leu Ala Asp Ser Gln Pro Pro	360
Arg Gly Arg Thr Ala Ser Thr Met Lys Gly Asp Gly Ser Asn Gly Trp Thr Val	378
Ser Ser Val Ser Phe ***	383

도면3

actcggacagtgataatggcagggagggcgcagcggccacggggcttgatgagtcacagaccagggtgccatcatcactc

ghsr-gefF primer

agggccaggcgcggccccgtgaat aaccgcgcggcgacagc

ATGCCACTTGGCCAATCACTCGGAGTGTTTCTCCACAACCTGCAGCTGGGAGAAGATCCACAACGCCACATGGAATGA 80

TGACTACGTTCTGCTCTCTCAATTACTACTCAATCCTCTCCTCAGGCCATCACCCTGCCTGCACGCTGCTCTTTC 160

TGTCGGGATGCCCGTAATGTCATGACCATTTTGGCGTCAGTAAGTACCGGACATGCGCACCACCACCAACCTCTAC 240

CTGTGAGCAATGGCTGTCTCAGACCTGCTCATCTTCTCTGTATGCGCTCTGGACCTGTACCGCATGTGGAGCTACAGGCC 320

RT-PCR primer

CTGGCGCTTTGGGACGTGCTCTGTAGCTCTTTCAGTTCGTGTCAGATCGAGCACTTACTCCACCATCCTGAGCATCA 400

CTGGCCTCTCAGTGGAGCGCTACCTGGCGATCTGCTTCCCGTTACGGCGAAGGCTCTGTTACAAAGAGCGCGGTCCGC 480

GCTCTCATTCTCTGCTGTGGACAGTGCTCCCTGAGCCCGGACCTGTGTTTGCATGGTGGAGTGGAGCCGGCCAG 560

gnsr-ge2F primer

CATGGGACCATTCAGCTCGGACATGAATGAGACTGGCCTCTCCTTGGAGGCGGGGGGACACCCGGCAGTGTAAATGA 640

RT-qPCR primer

CGCATTACGCCGTGGAGTCAGGTCTGATGGGTGCCATGGTGTGGCTGAGCTCCGTCTTCTTCTTGATGCCAGTGTCTGT 720

ghsr-ge2 primer

CTCACTGTGCTCTACAGCCTCATAGCCGTCGACTGTGGCAGACACCCAGAGACAAGCATCAGCTCCCGCTGGCTCA 800

CAGGCACAAGAGCCACAGACAGACCATCAAGATGCTGG 838

gtgagtttggagagagagcaaatcgcacggctcatattgtggttcagagaagaaatatcagctaataaatgaatgatt

gtctggtttttagcttaagcatcaagccacatctttaaaatcacaatttacatttagctctgagccctttgtcttagct **Intro**

tggtccactttcatccaattatttatttaccocctctctccacttcaccacctccctttcctcctcctcctcttcatcatt [312b]

ctcttcaacttgctccaccttcttccatctctctccctccag

TGGTGGTGGTGGCTTGGTCTCTGCTGGTTGCCGTTCCAGTGGGTGGTACCTGCAGTTCGGCTCACTGGACGCT 918

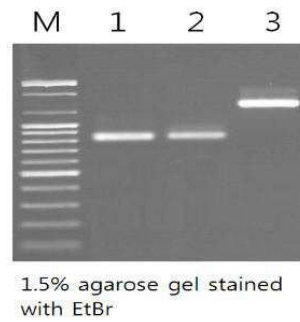
CCGTCCTCTGCTCTCGGTGTTGTCAGAGTATTGCAGCTTGGTGTGGTGTCTTCTACCTGAGCGCCGCCATCAA 998

CCCCATCCTCTACAACACAATGTCCTGGAAGTACCGGGGGCAGCGCTCGCCTCTTCGGCTCCCGACAGCCAGCCCC 1078

CTCAGGACGCACAGCCAGCACCATGAAGGGAGACGGCTCGAACGGCTGACGCTGTCTTCAGTCAGCTTCTGA 1152

ghsr-geIR primer

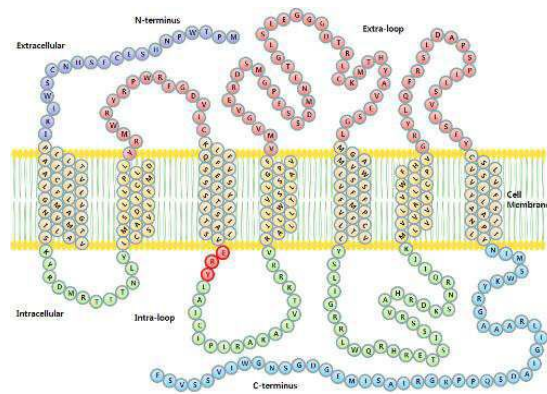
도면4



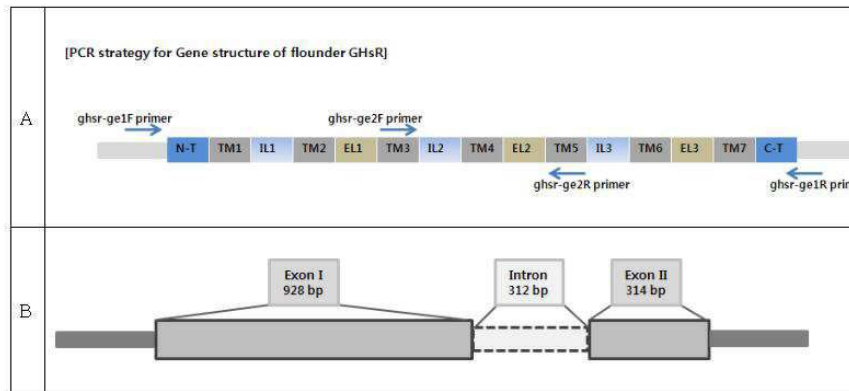
도면5



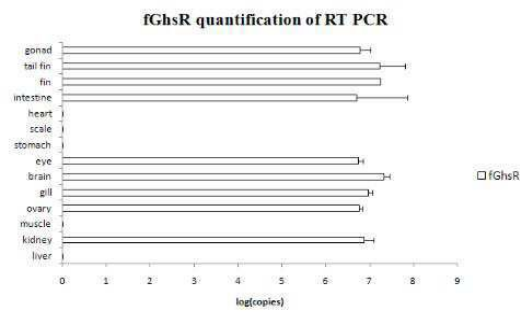
도면6



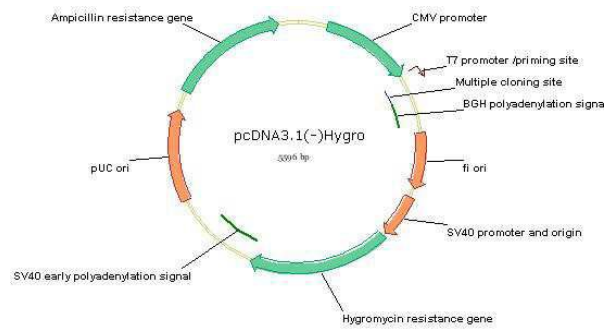
도면7



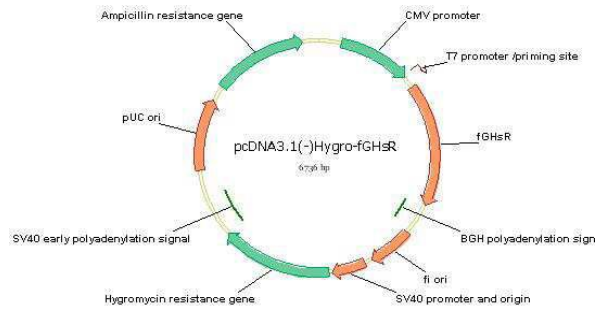
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
 <120> Cloning of the Ghrelin receptor genes from Olive flounder,
 Paralichthys olivaceus

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> fGHR

<400> 1

atgcccaatt ggccaatca ctggagtgct ttctccaca actgcagctg ggagaagatc 60

cacaacgcca catggaatga tgactacgtt ctgcctctc tcaattacta ctcaatccct 120

ctctcacgg ccatcacgt cgctgcacg ctgctcttc tggctgggat ggccggtaat 180

gtcatgacca ttttggcggc cagtaagtac cgggacatgc gcaccaccac caacctctac 240

ctgtgcagca tggctgtgtc agacctgtc atcttctct gtatgcctct ggacctgtac 300

cgcatgtgga ggtacaggcc ctggcgcttt ggggacgtgc tctgtaagct ctttcagttc 360

gtgtcagaat cgagcactta ctccaccatc ctgagcatca ctgcgtctc agtggagcgc 420

tacctggcga tctgcttccc gttacgcgca aaggctctgg ttacaaagag gcgggtgcgc 480

gtcttcattc ttctgctgtg gacagtgtct cccctgagcg ccggacctgt gtttgcacg 540

gtgggagtgg agcggggcag catgggacca ttcagctcgg acatgaatga gactggcctc 600

tccttggagg gcggggggga caccgggag tgtaaatga cgcattacgc cgtggagtca 660

ggtctgatgg gtgccatggt gtggctgagc tccgtcttct tcttcacgcc agtgttctgt 720

ctcactgtgc tctacagcct cataggccgt cgactgtggc agagacaccg agagacaagc 780

atcagctccc gcgtggctca cagggacaag agcgacagac agaccatcaa gatgctggtg 840

gtggtggtgc tggccttcgt cctctgctgg ttccgttcc acgtgggtcg ctacctgcag 900

ttccgctcac tggacgtcc gtctcctctg ctctcggtgt tgtcagagta ttgcagcttg 960

gtgtcggtgg ttctcttcta cctgagcgcc gccatcaacc ccatccteta caacacaatg 1020

tcctggaagt accggggggc agcggctcgc ctcttcggcc tcgccgacag ccageccctt 1080

cgaggacgca cagccagcac catgaaggga gacggctcga acggctggac ggtgtcttca 1140

gtcagcttct ga 1152

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Ghrelin receptor

<400> 2
 Met Pro Thr Trp Pro Asn His Ser Glu Cys Phe Ser His Asn Cys Ser
 1 5 10 15

Trp Glu Lys Ile His Asn Ala Thr Trp Asn Asp Asp Tyr Val Leu Pro
 20 25 30

Pro Leu Asn Tyr Tyr Ser Ile Pro Leu Leu Thr Ala Ile Thr Val Ala
 35 40 45

Cys Thr Leu Leu Phe Leu Val Gly Met Ala Gly Asn Val Met Thr Ile
50 55 60

Leu Ala Val Ser Lys Tyr Arg Asp Met Arg Thr Thr Thr Asn Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Cys Ser Met Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Phe Leu Cys Met Pro
85 90 95

Leu Asp Leu Tyr Arg Met Trp Arg Tyr Arg Pro Trp Arg Phe Gly Asp
100 105 110

Val Leu Cys Lys Leu Phe Gln Phe Val Ser Glu Ser Ser Thr Tyr Ser
115 120 125

Thr Ile Leu Ser Ile Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile
130 135 140

Cys Phe Pro Leu Arg Ala Lys Ala Leu Val Thr Lys Arg Arg Val Arg
145 150 155 160

Ala Leu Ile Leu Leu Leu Trp Thr Val Ser Pro Leu Ser Ala Gly Pro
165 170 175

Val Phe Val Met Val Gly Val Glu Arg Gly Ser Met Gly Pro Phe Ser
180 185 190

Ser Asp Met Asn Glu Thr Gly Leu Ser Leu Glu Gly Gly Gly Asp Thr
195 200 205

Arg Glu Cys Lys Met Thr His Tyr Ala Val Glu Ser Gly Leu Met Gly
210 215 220

Ala Met Val Trp Leu Ser Ser Val Phe Phe Phe Met Pro Val Phe Cys
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Tyr Ser Leu Ile Gly Arg Arg Leu Trp Gln Arg His
245 250 255

Arg Glu Thr Ser Ile Ser Ser Arg Val Ala His Arg Asp Lys Ser Asp
260 265 270

Arg Gln Thr Ile Lys Met Leu Val Val Val Val Leu Ala Phe Val Leu

275	280	285
Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Tyr Leu Gln Phe Arg Ser Leu		
290	295	300
Asp Ala Pro Ser Pro Leu Leu Ser Val Leu Ser Glu Tyr Cys Ser Leu		
305	310	315
Val Ser Val Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ala Ile Asn Pro Ile Leu		
325	330	335
Tyr Asn Thr Met Ser Trp Lys Tyr Arg Gly Ala Ala Ala Arg Leu Phe		
340	345	350
Gly Leu Ala Asp Ser Gln Pro Pro Arg Gly Arg Thr Ala Ser Thr Met		
355	360	365
Lys Gly Asp Gly Ser Asn Gly Trp Thr Val Ser Ser Val Ser Phe		
370	375	380