(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월07일
(11) 등록번호 10-0820095
(24) 등록일자 2008년04월01일

(51) Int. Cl.
C12N 15/64 (2006.01) *C12N 15/66* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0127595
(22) 출원일자 2006년12월14일
심사청구일자 2006년12월14일
(56) 선행기술조사문헌
JP2005229804 A
US6593108 B1
US20040132045 A1
US6723552 B2

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
송영환
부산 해운대구 좌동 대원아파트 102-702
전정민
부산 해운대구 반여4동 692-6 신동타워맨션 102동 1206호
정인영
부산 금정구 남산동 972-22 삼성빌리지 301호
(74) 대리인
김일성

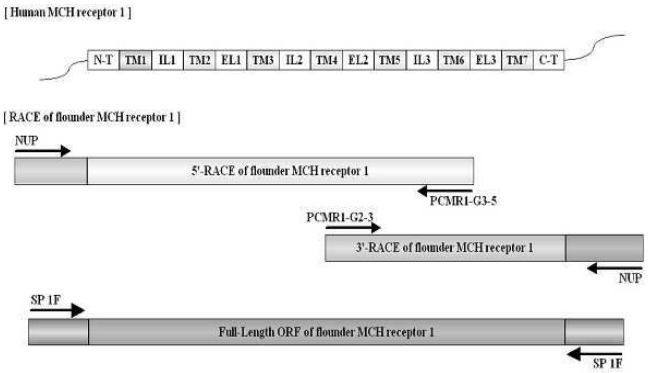
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 김지윤

(54) 양식 넙치의 멜라닌 농축 호르몬 수용체

(57) 요 약

본 발명은 경골어류인 양식넙치에서 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1과 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2를 생산할 수 있는 유전자와 발현벡터의 구성과 인간 배아 신장세포에 감염을 통해 넙치 멜라닌 농축호르몬과 결합능을 지닌 수용체의 특성에 대한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열 1의 염기서열이 포함된 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1(fMCHR1) 유전자 가 pcDNA3.1(-)Hygro에 DNA합성효소(ligase)로 재조합하여 발현 가능한 특징을 가진 발현벡터

청구항 2

서열 3의 염기서열이 포함된 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2(fMCHR2) 유전자 가 pcDNA3.1(-)Hygro에 DNA합성효소(ligase)로 재조합하여 발현 가능한 특징을 가진 발현벡터

청구항 3

제 1항 또는 제 2항의 발현벡터는 넙치 멜라닌 농축호르몬 수용체의 특징을 가진 발현벡터

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 경골어류인 양식넙치에서 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1과 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2를 생산할 수 있는 유전자와 발현벡터의 구성과 인간 배아 신장세포에 감염을 통해 넙치 멜라닌 농축호르몬과 결합능을 지닌 수용체의 특성에 대한 것이다.

<10> 일반적으로 멜라닌 농축 호르몬은 연어에서 처음으로 펩티드가 분리되어 구조가 17개의 아미노산으로 구성 NH_2-Asp-Thr-Met-Arg-Cys-Met-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-

<11> Trp-Glu-Val-COOH의 환형(cyclic)의 펩티드로 알려졌다 (Kawauchi *et al.*, 1983). 또한 연어의 멜라닌 농축 호르몬 펩티드를 이용한 틸라피아 표피의 체외 생물학적 분석에서 틸라피아 멜라닌 보유세포의 멜라닌 과립이 농축되는 현상이 확인되었다. 이후 취의 시상하부에서 산 추출, 면역친화성 크로마토그래피와 아미노산 서열분석기를 이용하여 포유동물 처음으로 쥐에서 멜라닌 농축 호르몬이 분리 및 아미노산 서열이 분석되었으며 연어에서 밝혀진 멜라닌 농축 호르몬 펩티드 구조와 매우 유사한 19개 아미노산으로 된 구조를 보여주었다.

<12> NH_2-Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro -Cys-Trp-Gln-Val-COOH (Vaughan *et al.*, 1989).

<13> 포유동물에서 분리된 쥐의 멜라닌 농축 호르몬은 다양한 멜라닌 농축 호르몬 연구를 가능하게 하였으며, 어류의 멜라닌 농축 호르몬에서 나타난 피부색의 변화와는 별개의 기능, 즉 신경전달물질 및 신경조절물질로서 기능성이 제시되었다.

<14> 최근의 멜라닌 농축 호르몬 연구는 포유동물에 적용되어 쥐의 경우 멜라닌 농축 호르몬이 시상하부 후엽에서 주로 발현되고 특히 비만 유전자의구성이 *ob/ob*인 쥐의 경우 시상하부에서 대량 발현되는 것이 알려졌다 (Qu *et al.*, 1996). 또한 정상의 쥐와 비만의 쥐를 대상으로 금식을 시킨 경우 멜라닌 농축 호르몬의 발현이 증가되는 현상이 관찰되었고, 특히 뇌실로 멜라닌 농축 호르몬을 주사하였을 경우 음식물의 섭취가 증가되었음이 확인되어 멜라닌 농축 호르몬이 포유동물에서는 에너지 항상성과 섭식 행동에 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다. 그러나 이러한 연구 동향은 멜라닌 농축 호르몬 수용체에 대한 인식이 이루어지지 않은 상태에서 이루어 졌으나, 이후 멜라닌 농축 호르몬 수용체를 유전자를 확인함으로서 연계를 통한 연구가 이루어졌다.

<15> 멜라닌 농축 호르몬 수용체는 처음 SLC-1이라는 알려지지 않은 G 단백질 쌍을 이루는 수용체의 한 종류로 5개의 성장호르몬분비 억제 호르몬 수용체와 40% 이상의 유사성을 나타내었고 인간의 게놈에서 유전자 증폭기술을 이용하여 SLC-1 수용체의 유전자를 확보하였다 (Kolakowski, Jr. *et al.*, 1983).

<16> SLC-1 수용체의 리간드를 천연물질에서 찾는 과정에서 해당 리간드로서 멜라닌 농축 호르몬이라는 것을 확인하게 되었고 이후에 멜라닌 농축 호르몬 수용체로 명명되었다 (Bachner *et al.*, 1999). 2001년에는 인간 게놈과

cDNA로부터 멜라닌 농축 호르몬을 리간드로 하는 두 번째 멜라닌 농축 호르몬 수용체를 확보하였다 (Rodriguez *et al.*, 2001; Sailer *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2001).

<17> 멜라닌 농축 호르몬 수용체는 현재까지 두 종류가 보고되어 있다. 그 중에서 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1은 인간, 침팬지, 원숭이, 쥐, 소, 개, 복어, 제브라피쉬, 등에서 유전자 염기 서열이 밝혀져 있고, 쥐에서 멜라닌 농축 호르몬 수용체 기능에 대한 연구가 이루어지고 있다. 주로 연구되고 있는 것은 비만에 대한 연구가 주를 이루고 있으며 멜라닌 농축 호르몬과 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1의 구조-활성 관계 연구를 통하여 아고니스트와 길항제 펩티드가 발견되었다 (Bednarek *et al.*, 2002; Bednarek *et al.*, 2001).

<18> 이 외에 뇌의 뉴런에서 폭넓게 발현되는 것으로 나타나고 있는데, 이것은 습성과 후각 작용, 기억 등과 관련한 뇌 활성 조절에 대해서 멜라닌 농축 호르몬과 함께 뇌에서 다양한 기능적 역할을 할 것으로 추측되고 있다 (Monzon *et al.*, 1999; Monzon and De, Sr., 1999; Varas *et al.*, 2002).

<19> 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2의 경우는 그 기능에 대한 연구가 미비하다. 그것은 인간에 대한 대표적 실험동물인 쥐에서는 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2가 존재하지 않기 때문이며 다른 실험동물에서도 아직 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2의 기능에 대한 보고가 현재까지 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<20> 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 멜라닌 농축 호르몬 수용체 유전자를 제공하기 위한 것으로, 구체적으로는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 유전자와 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 갖는 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 유전자를 제공한다.

<21> 또한, 본 발명은 상기 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 유전자를 포함하는 재조합 벡터와 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하며, 발현벡터를 인간 배아신장세포에 일시적으로 감염시켜 넙치 멜라닌 농축호르몬과의 결합능을 확인하여 작용기가 결합하는 수용체로서의 특성을 제공한다. 일반적으로 넙치의 멜라닌 농축호르몬은 멜라닌 농축호르몬 수용체에 결합하여 나타내는 효과반응이 EC50의 값으로 정의되며, 이 값이 10nM 이하의 값이 나오면 작용기-수용체 결합 이론에 의거 의미있는 작용기(멜라닌 농축호르몬)로서의 가능성을 지닌다. 또한 이때 수용체는 중요한 결합 특성을 지닌 수용체로서의 특성이 유지된다고 볼 수 있다.

발명의 구성 및 작용

<22> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1과 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 유전자를 제공한다.

<23> 또한 인간이나 쥐와 같은 포유동물의 세포에서 양식넙치의 멜라닌 농축 호르몬 수용체 유전자를 발현시키고, 세포에서 수용체로서 기능을 확인할 수 있도록 재조합 벡터를 제공한다.

<24> 본 발명은 멜라닌 농축 호르몬을 기질로 삼는 수용체 단백질을 코딩하는 서열번호 1, 서열번호 3으로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 유전자를 제공한다.

<25> 본 발명의 2개의 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질에 대하여 하기 [표 1]에 기재하였다.

<26> 표 1. 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질

<27>

유전자	유전자명	단백질	단백질의 아미노산 서열
서열번호 1	fMCHR1	멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 (Melanin-concentrating hormone receptor 1)	서열번호 2
서열번호 3	fMCHR2	멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 (Melanin-concentrating hormone receptor 2)	서열번호 4

<28> 본 발명에 따라 제공되는 유전자들은 다양한 숙주세포에 도입되어 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 및 2를 발현하는데 유용하게 사용될 수 있다.

<29> 본 발명의 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 유전자는 서열번호 1에서 보는 바와 같이 1077 bp의 크기이며, 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 유전자는 서열번호 3에서 보는 바와 같이 1032 bp 크기이다.

<30> 또한, 본 발명은 상기 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 및 2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

<31> 본 발명의 재조합 벡터는 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 및 2 각각을 기본 벡터에 삽입하여 제조한 것으로, 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터는 유전자의 클로닝 또는 포유동물 세포 주에 형질 도입하여 발현할 수 있는 벡터가 사용될 수 있다.

<32> 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 pcDNA3.1(-)Hygro (Invitrogen, USA) 벡터를 사용하여 fMCHR1 및 fMCHR2 유전자를 포함하는 각각의 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 'pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR1' 및 'pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR2'이라 명명하였다.

<33> 또한, 본 발명은 상기 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 및 2 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포에 형질 도입한 균주를 제공한다.

<34> 상기에서 숙주세포에 대장균을 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 예에서는 [서열번호 1]로 기재되는 fMCHR1 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pcDNA3.1(-) Hygro-fMCHR1 및 [서열번호 3]로 기재되는 fMCHR2 유전자를 포함하는 재조합 pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR2를 대장균인 DH5α에 형질도입한 균주를 제조하였다.

<35> 이하, 본 발명의 구성에 대하여 아래 실시에를 통하여 더욱 상세히 설명하나, 본 발명의 권리범위가 아래 실시예에 만 한정되어지는 것은 아니며, 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능하다.

<36> **[실시예 1] 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 및 2 유전자의 클로닝과 pcDNA3.1(-) Hygro와의 재조합에 의한 포유동물 세포주에 발현 가능한 발현벡터 클로닝**

<37> 양식 넙치의 뇌에서 분리된 전체 RNA로부터 5'- and 3'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)를 실시하여 확보한 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 (fMCHR1) 유전자 및 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 (fMCHR2) 유전자 중에서 ORF (open reading frame) 부분을 증폭하고 제한효소(Xho I, Hind III) 부위를 가지는 두 쌍의 프라이머(표 2 참조)를 제작하여 각각의 유전자 부위를 증폭시키고, 증폭된 각각의 ORF 바깥부분을 제거하고, pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 DNA에도 제한효소(Xho I, Hind III) 처리하여 fMCHR1 유전자 및 fMCHR2 유전자 각각을 pcDNA3.1(-)Hygro에 DNA ligase로 재조합하여 pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR1 및 pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR2를 클로닝 하였다.

<38> 표 2, fMCHR1 유전자 및 fMCHR2 유전자 프라이머

<39>

	염기 서열	비 고
프라이머 1	5'-TTCTCGAGGGCACTTCTTAACTTGGATACACC-3'	fMCHR1 앞부분에 Xho I부위 첨가
프라이머 2	5'-AAAAGCTTGTGCAGATAAGATGGTGATGGAGT-3'	fMCHR1 뒷부분에 Hind Ⅲ부위 첨가
프라이머 3	5'-TTCTCGAGCTGAGAAGAACTCCAGGAAGAAAG-3'	fMCHR2 앞부분에 Xho I 부위 첨가
프라이머 4	5'-AAAAGCTTCCCAGGTTCAATTGTACAGTATCC-3'	fMCHR2 뒷부분에 Hind Ⅲ 부위 첨가

<40> **[서열 번호 1] *flo*under MCHR1 gene**

<41> **atggatttcc ataacgattc aaatttttct gtctcacaca ctaattcaac aacaacagct** 60

<42> **gtatatgggg cccttcattc cagtgccatc ctccctgtca tcttcggcat catctgtttt** 120

<43> **cttggtatct tggggaactg catcgttatg tacaccatca taaagaagac caagtgccgc** 180

<44> **gccaagcaga ctgttccgga catctttatc ttaaacgtgt cgattgttga cctcctcttt** 240

<45> **ctccttggga tgccgttcct catccaccag ttgctgggca atggcagttg gcactttgga** 300

<46> gccacaatgt gtacagtcat cactgcgctc gactccaaca gccagatagt cagtacttac 360

<47> atcctcactg ctatgaccct tgaccgttac ttggctacgg tccatcccat ccgctttaac 420

<48> tatgtccgca caccctgtgt agcagcgctg gtcatcgtca ttgtgtgggg tctgtctttc 480

<49> ctcaccatta tccctgtgtg gatgtatgcg ggcctgatgc ctcttccaga tggactggtt 540

<50> gcttgtgcgc tcctcctgcc tgacccaatt accgacacat attggtttac actttaccag 600

<51> ttctttttgg ccttcgccat gcccttggtt ataatctgcc tggtgttctt caagatgctc 660

<52> caacacatgt ccagcagtgt ggcaccgctg cctccacgga gtctgagggt gcgaaccagg 720

<53> aaggtgaccc ggatggcggt ggccatctgc cttgcgttct tcatctgctg ggctccttac 780

<54> tacatccttc agctgatcca ccttggggtg cagaagccaa cccttgcgtt ctcctatgcg 840

<55> tacaacatag ccattagcat gggctacgct aacagttgca tcaacccatt tctctacatc 900

<56> atcctcagtg agactttcaa gaggcagttt ctcagagccg tacgtccggt caacagaaag 960

<57> ttccgcgtga acccgagcac cacggatggt ggcagcgtga gcatgcgaat ggacctgaag 1020

<58> ggggctcggc aggagccggc ccctcgggag atgataccat ccaatgtggc gccacaa 1077

<59> [서열 번호 2] *flo*under MCHR1 amino acid

<60>

Met Asp Phe His Asn Asp Ser Asn Phe Ser Val Ser His Thr Asn Ser Thr	17
Thr Thr Ala Val Tyr Gly Ala Thr His Ser Ser Ala Ile Thr Pro Val Ile	34
Phe Gly Ile Ile Cys Phe Thr Gly Ile Leu Gly Asn Cys Ile Val Met Tyr	51
Thr Ile Met Lys Lys Thr Lys Cys Arg Ala Lys Gln Thr Val Pro Asp Ile	68
Phe Ile Leu Asn Val Ser Ile Val Asp Thr Thr Phe Thr Thr Gly Met Pro	85
Phe Thr Ile His Gln Leu Thr Gly Asn Gly Ser Trp His Phe Gly Ala Thr	102
Met Arg Thr Val Ile Thr Ala Thr Asp Ser Asn Ser Gln Met Val Ser Thr	119
Tyr Ile Thr Thr Ala Met Thr Thr Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Val His Pro	136
Ile Arg Phe Asn Tyr Val Arg Thr Pro Cys Val Ala Ala Thr Val Ile Val	153
Ile Val Trp Gly Thr Ser Phe Thr Thr Ile Ile Pro Val Trp Met Tyr Ala	170
Gly Thr Met Pro Thr Pro Asp Gly Thr Val Ala Cys Ala Thr Thr Thr Pro	187
Asp Pro Ile Thr Asp Thr Tyr Trp Phe Thr Thr Tyr Gln Phe Phe Leu Ala	204
Phe Ala Met Pro Leu Val Met Ile Cys Thr Val Phe Phe Lys Met Thr Gln	221
His Met Ser Ser Ser Val Ala Pro Thr Pro Pro Arg Ser Thr Arg Val Arg	238
Thr Arg Lys Val Thr Arg Met Ala Val Ala Ile Cys Thr Ala Phe Phe Ile	255
Cys Trp Ala Pro Tyr Tyr Ile Thr Gln Thr Ile His Thr Gly Val Gln Lys	272
Pro Thr Thr Ala Phe Ser Tyr Ala Tyr Asn Met Ala Ile Ser Met Gly Tyr	289
Ala Asn Ser Cys Ile Asn Pro Phe Thr Tyr Ile Ile Thr Ser Glu Thr Phe	306
Lys Arg Gln Phe Thr Arg Ala Val Arg Pro Val Asn Arg Lys Phe Arg Val	323
Asn Pro Ser Thr Thr Asp Gly Gly Ser Val Ser Met Arg Met Val Pro Glu	340
Gly Ala Arg Gln Glu Pro Ala Pro Arg Glu Met Met Pro Ser Asn Val Ala	357
Pro Gln Trp	360

<61> [서열 번호 3] *flo*under MCHR2 gene

<62>

atgggcgaca cgggcacatt ctgcaaccaa acagccaacc tgacagaccc ggcgtgtctg	60
aactcaaccc gcccgtcgta cagccacata gacatcacca cgttcatgca catattcccc	120
accatctacg gcatcctgtg ctcggttgga gttattgcca acggactggt catctacgcg	180
gtggcggcat gcaaaaagaa aatggtctcc gacatctacg tgctgaactt ggccatagcg	240
gacatgctct tcctgctggt gatgcccttc aacatccacc agctggtcag agacagacag	300
tgggtgttcg ggaactttat gtgcaaagcg gtggtggtgg acgtgagcaa ccagttcacc	360
acagtaggga ttgttactgt gctgtgcatt gaccggtaca tagccatagt ccaccccacc	420
tcggagaaaa ggaccatcca ctggaccatc atgatcaaca tactagtgtg gttgggcagc	480
ttcctcctca ccgtccctgt catgatgtac gccaaggttg agcgcaggca gcgtttggag	540
gtctgcatga tgaacctgga tgggcctgag gacatgtact ggtacacttt ctaccagtcc	600
atccttggct acatcatccc cttcatcatc atcagcacct tttactcgct caccctctac	660
cacgtcttca gctccatccg ccgggtaaaa cgcaagcagt ccgtctgggc taaaagagcc	720
accaagatgg tgctgatggt catcgcattg ttcctgatct gctggtcacc ctaccacgtc	780
atccaggtga tcaacctgag caacaacacg ccgaccatca ccttcgtcta tgcctaccac	840
atcagcatct gtctcagcta ctctcacagc tgcatcaacc cactcatgct gctcatcttc	900
gcccagaact atcgcgaccg cctttgccgc agaaatatgc tcaacagttc ccagcattca	960
tccaagctca cagtcgtcaa aacagatggt tccagtataa ccaataaccc caactaccgc	1020
tgtactgtcg ta	1032

<63> [서열 번호 4] *flo*under MCHR2 amino acid

<64>

Met Gly Asp Thr Gly Thr Phe Cys Asn Gln Thr Ala Asn Thr Thr Asp Pro	17
Ala Cys Thr Asn Ser Thr Arg Pro Ser Tyr Ser His Met Asp Ile Thr Thr	34
Phe Met His Met Phe Pro Thr Ile Tyr Gly Ile Thr Cys Ser Val Gly Val	51
Ile Ala Asn Gly Thr Val Ile Tyr Ala Val Ala Ala Cys Lys Lys Lys Met	68
Val Ser Asp Ile Tyr Val Thr Asn Leu Ala Met Ala Asp Met Thr Phe Thr	85
Thr Val Met Pro Phe Asn Ile His Gln Thr Val Arg Asp Arg Gln Trp Val	102
Phe Gly Asn Phe Met Cys Lys Ala Val Val Val Asp Val Ser Asn Gln Phe	119
Thr Thr Val Gly Ile Val Thr Val Thr Cys Ile Asp Arg Tyr Met Ala Met	136
Val His Pro Thr Ser Glu Lys Arg Thr Ile His Trp Thr Ile Met Ile Asn	153
Met Thr Val Trp Leu Gly Ser Phe Thr Thr Thr Val Pro Val Met Met Tyr	170
Ala Lys Val Glu Arg Arg Gln Arg Leu Glu Val Cys Met Met Asn Thr Asp	187
Gly Pro Glu Asp Met Tyr Trp Tyr Thr Phe Tyr Gln Ser Ile Thr Gly Tyr	204
Ile Ile Pro Phe Ile Ile Ile Ser Thr Phe Tyr Ser Thr Thr Thr Tyr His	221
Val Phe Ser Ser Ile Arg Arg Val Lys Arg Lys Gln Ser Val Trp Ala Lys	238
Arg Ala Thr Lys Met Val Thr Met Val Ile Ala Leu Phe Thr Ile Cys Trp	255
Ser Pro Tyr His Val Ile Gln Val Ile Asn Thr Ser Asn Asn Thr Pro Thr	272
Ile Thr Phe Val Tyr Ala Tyr His Ile Ser Ile Cys Thr Ser Tyr Ser His	289
Ser Cys Ile Asn Pro Thr Met Thr Thr Ile Phe Ala Gln Asn Tyr Arg Asp	306
Arg Thr Cys Arg Arg Asn Met Thr Asn Ser Ser Gln His Ser Ser Lys Thr	323
Thr Val Val Lys Thr Asp Gly Ser Ser Met Thr Asn Asn Pro Asn Tyr Arg	340
Cys Thr Val Val	344

<65> **[실시예 2] 두 종류의 발현벡터의 세포주 일시감염과 형광 영상 프레이트 인식 장치(FLIPR)를 이용한 효과농도 (EC_{50})의 측정**

<66> [실시예 1]에서 준비된 멜라닌 농축 호르몬 유전자의 프로모터 영역을 포함한 재조합 DNA를 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)에 일시감염 시키기 위하여 감염용 시약으로 리포펙타민 (Lipofectamine™ Reagent, Invitrogen, USA)을 사용하였다.

<67> 세포주의 일시감염을 시키기 위해 먼저 각 세포주를 24 웰 프레이트에 세포개수를 맞추었다. 인간 배아 신장 세포주는 하나의 웰 당 1.2×10^5 세포 수로 맞추어 배양을 하였다. 배양조건은 37℃, 5% CO_2를 유지하며 24 시

간을 배양하였으며 각각 배양된 세포에 각각의 재조합 DNA를 24 웰 프레이트에 배양된 세포주에 일시감염을 실시하였다.

<68> 일시감염은 각 웰 당 OPTI-MEM I (Reduced Serum Medium Modification of MEM (Eagle's), GIBCO, USA) 배지 52 ㎕ 에 [실시예 1]에서 클로닝 된 재조합 DNA pGL2M-1487, pGL2M-865, pGL2M-500, pGL2M-115, pGL2M-95를 각각 1㎍, Lipofectamin™ Reagent 1.26 ㎕ 를 혼합하여 45 분간 상온에서 반응시켰다.

<69>

<70> 인간 배아 신장 세포주에 일시감염을 위하여 24 웰의 배양액을 제거하고 각 웰에 혈청(FBS)이 없는 배양액(DMEM, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.8% G 418 sulfate) 236 ㎕을 첨가하고 앞에서 상온에서 45 분간 반응시킨 반응액에 OPTI-MEM I 184㎕를 첨가하여 이를 다시 각 웰에 첨가한다. 24 웰 프레이트를 37℃, 5% CO_2 배양기에서 5 시간동안 배양한다. 5시간 배양 후 각 웰에 배양배지의 2배의 혈청이 포함된 배지(DMEM, 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.8% G 418 sulfate) 472 ㎕를 첨가하여 48 시간동안 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양 하였다.

<71> 배양된 각 세포주를 96 웰 프레이트에 인간 배아 신장세포(HEK cell)의 경우 웰당 90,000 개의 세포가 되도록 하여 100㎕ 씩 웰에 분주한다. 24시간 배양한 후 배양액을 완전히 제거한다. 배양액을 완전히 제거한 후, 50㎕의 완충용액 B를 첨가하고, 37℃에서 1시간 배양한다. 측정에 이용하는 넙치 멜라닌 농축호르몬은 10㎎/㎖의 싸이토크롬씨(cytochrome C) 용액 200㎕가 첨가된 각각의 20㎖의 완충용액 A에 2uM 0.02 nM까지의 농도로 희석되게 첨가하여, 인간 배아 신장세포(HEK cell)가 배양된 웰 프레이트의 웰에 농도별로 각각 웰 당 110 ㎕ 씩 분주하여 형광 영상 프레이트 인식 장치에서 분석한다. 효과농도(EC_{50})를 계산하기 위해서 형광영상 프레이트 인식장치에서 얻어진 결과를 프리즘(PRISM 4.0)(Graphpad, USA)를 이용하여 계산하였다.

<72> 상기 사용되는 완충용액의 조성은 다음과 같으며, 이를 자세히 설명하면,

<73> 먼저, 완충용액 A (FLIPR 완충용액)는 20㎖의 10X Hank's BSS, 4㎖의 HEPES(pH 7.4), 142㎎의 Probenocid 를 1N NaOH 1㎖ 에 녹인 후, 증류수를 첨가하여 200㎖이 되게 하고 pH 7.4로 맞춘다.

<74> 완충용액 B는 상기 완충용액 A 5.5 ㎖에, Pluronic acid 5.5 ㎕, Fluo-4 5.5 ㎕, FBS 55 ㎕를 첨가하여 완충용액 B가 만들어지게 된다.

<75> 이상에서와 같이 본 발명은 비록 상기의 실시예에 한하여 설명하였지만 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다.

발명의 효과

<76> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 양식넙치의 뇌에서 분리된 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 및 2의 유전자를 포유동물 세포주에 형질전환 할 수 있는 발현벡터에 재조합하여 발현을 유도하였으며, 인간 배아 신장세포에 일시적인 감염을 통해 넙치 멜라닌 농축호르몬과 결합하는 효과능을 확인하였다. 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1 유전자는 멜라닌 농축 호르몬과 더불어 생물종의 에너지 항상성에 관여하게 되는데 이는 비만과 연관하여 이용 가능할 것이고, 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2 유전자는 아직 그 기능이 밝혀져 있지 않으므로 해당 유전자의 기능을 규명하는데 이용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명의 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1(fMCHR1) 유전자의 5'- and 3'-RACE PCR 수행 결과와 구성을 도시화 한 것이다.

<2> 도 2는 본 발명의 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1(fMCHR1)의 세포막내 구성을 도시화 한 것이다.

<3> 도 3은 본 발명의 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2(MCHR2)유전자의 5'- and 3'-RACE PCR 수행 결과와 구성을 도식화 한 것이다.

<4> 도 4는 본 발명의 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2(MCHR2)의 세포막내 구성을 도시화 한 것이다.

<5> 도 5는 본 발명의 pcNDA3.1(-)Hygro 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.

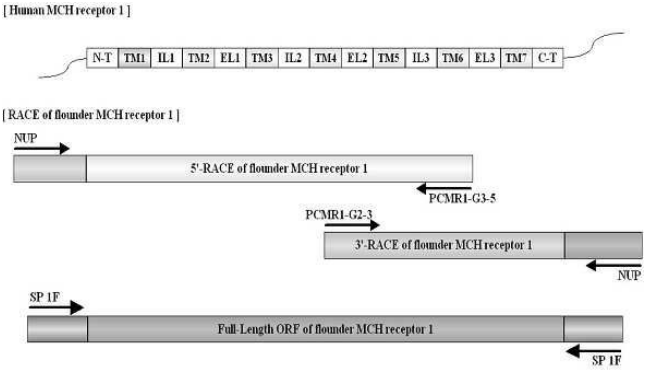
<6> 도 6은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR1 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.

<7> 도 7은 본 발명의 pcDNA3.1(-)-fMCHR2 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.

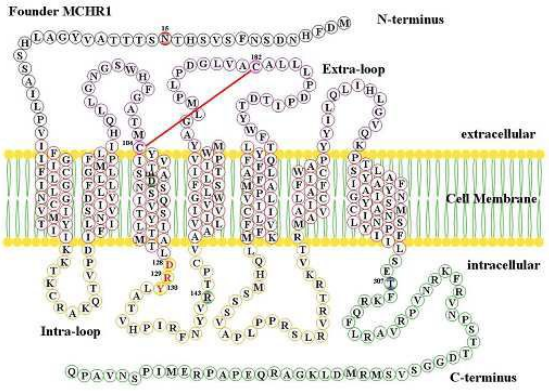
<8> 도 8은 두 종류의 발현벡터를 인간 배아 신장세포(HEK cell)에 일시적으로 감염시켜 두 종류의 멜라닌 농축호르몬 수용체에 넙치 멜라닌 농축호르몬의 결합을 통한 수용체의 특성을 나타낸 그래프이다.

도면

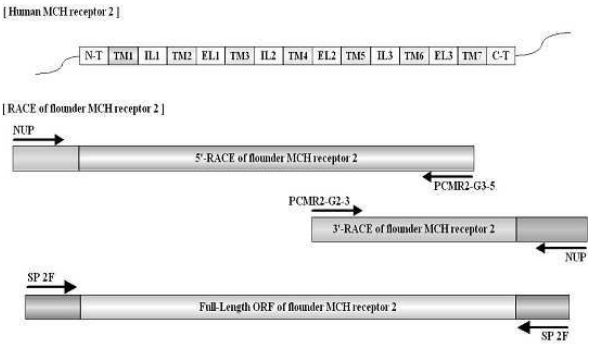
도면1



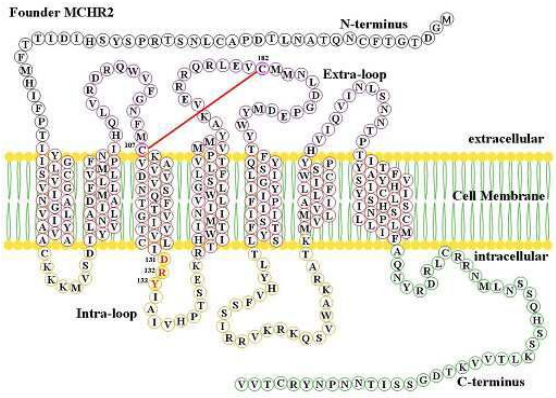
도면2



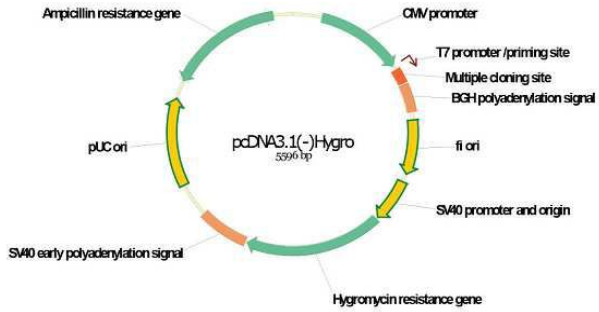
도면3



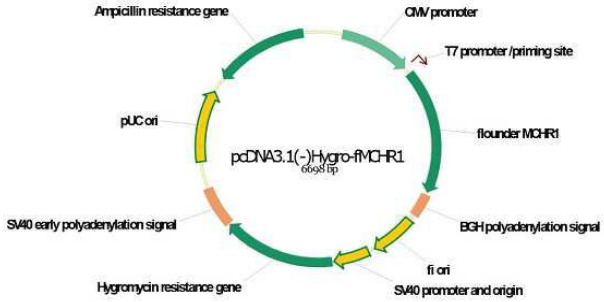
도면4


Founder MCHR2
N-terminus
Extra-loop
extracellular
Cell Membrane
intracellular
Intra-loop
C-terminus

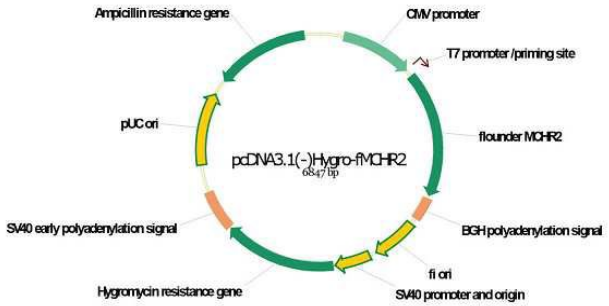
도면5


Ampicillin resistance gene
CMV promoter
T7 promoter /priming site
Multiple cloning site
BGH polyadenylation signal
pUC ori
pcDNA3.1(-)Hygro
5596 bp
f1 ori
SV40 promoter and origin
SV40 early polyadenylation signal
Hygromycin resistance gene

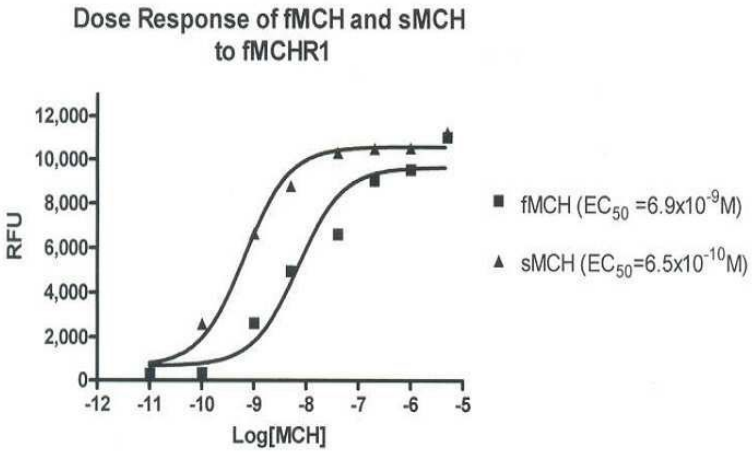
도면6

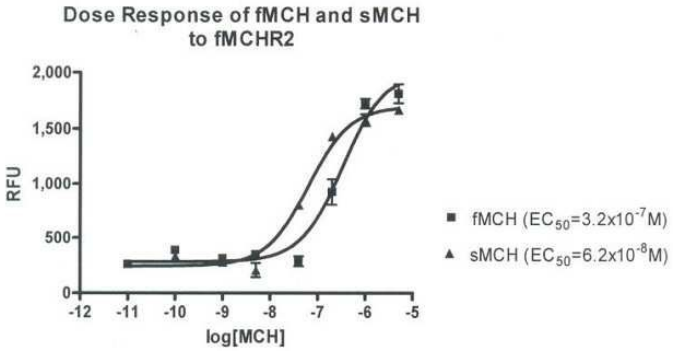

Ampicillin resistance gene
CMV promoter
T7 promoter /priming site
pUC ori
flounder MCHR1
pcDNA3.1(-)Hygro-fMCHR1
6698 bp
SV40 early polyadenylation signal
BGH polyadenylation signal
f1 ori
Hygromycin resistance gene
SV40 promoter and origin

도면7



도면8





서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부