(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0015024
(43) 공개일자 2014년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/12 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0082665
(22) 출원일자 2012년07월27일
심사청구일자 2012년07월27일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김양하
서울 강남구 영동대로114길 56, 301동 405호 (삼성동, 래미안삼성1차아파트)
이막순
경기 군포시 산본로 299, 217동 1106호 (금정동, 충무1차아파트)
주현진
서울 광진구 동일로78길 36-8 (중곡동)
(74) 대리인
이원희

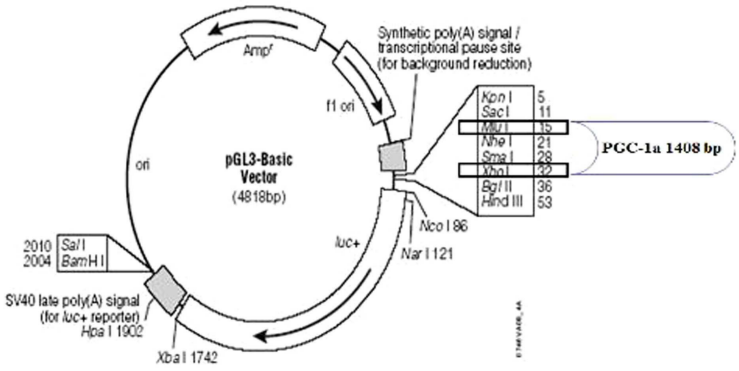
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1 알파 프로모터 및 리포터 유전자가 형질도입된 형질전환 동물**

(57) 요 약

본 발명은 질환이 없는 정상 대사 상태에서 기능성 식품의 효능을 평가하기 위한 형질전환동물에 관한 것이고, 구체적으로 에너지 대사 조절에 중추적인 역할을 하는 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 유전자의 프로모터와 리포터 유전자 루시퍼라아제가 삽입된 형질전환 생쥐를 제작하였으며, 상기 형질전환 생쥐의 대사 상태가 정상 생쥐와 유사한 것을 확인하였고, 항비만 기능성 식품/소재를 상기 형질전환 생쥐에 처리하였을 때, PGC-1α 프로모터가 발현하면 연이어 작동가능하도록 연결된 루시퍼라아제가 발현하는 것을 확인하여, PGC-1α의 발현 증가를 간접적으로 측정함으로써 비만과 에너지 대사와 관련된 기능성 식품/소재의 유효성 평가에 유용한 형질전환 동물 모델인 것을 확인하였으므로, 이를 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가에 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2005-2000418
부처명	교육과학기술부
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	바이오식품의 건강유지 기능평가를 위한 동물 모델 개발
기 여 율	1/2
주관기관	한국식품연구원
연구기간	2008.04.01 ~ 2011.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0023066
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	녹차 카테킨에 의하여 PGC-1a 유전자 전사 조절 기전 연구
기 여 율	1/2
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 프로모터 및 상기 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트(construct)가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 PGC-1α 프로모터는 인간 게놈 DNA 유래 PGC-1α 프로모터인 것을 특징으로 하는 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 생물발광 반응을 나타내는 루시퍼라아제(luciferase); 형광 반응을 나타내는 녹색 형광성 단백질(green fluorescent protein, GFP), 증강된 녹색 형광성 단백질(enhanced green fluorescent protein, EGFP), 적색 형광성 단백질(red fluorescent protein, RFP), 증강된 적색 형광성 단백질(enhanced red fluorescent protein, ERFP), 청색 형광성 단백질(blue fluorescence protein, BFP), 증강된 청색 형광성 단백질(enhanced blue fluorescence protein, EBFP), 황색 형광성 단백질(yellow fluorescence protein, YFP), 증강된 황색 형광성 단백질(enhanced yellow fluorescence protein, EYFP), 남색 형광성 단백질(cyan fluorescence protein, CFP) 및 증강된 남색 형광성 단백질(enhanced cyan fluorescence protein, ECFP)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 루시퍼라아제를 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 하는 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물.

청구항 5

1) PGC-1α 프로모터 및 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 벡터를 생쥐의 수정란에 형질도입하는 단계;

3) 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 새끼를 생산시키는 단계;및

4) 단계 3)에서 태어난 생쥐 중 PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 게놈 DNA에 도입된 개체를 선별하는 단계를 포함하는 C57BL/6J 계통의 PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물을 생산하는 방법.

청구항 6

제 1항의 형질전환 동물로부터 유래한, PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 형질도입된 형질전환 수정란.

청구항 7

제 6항에 있어서, 기탁번호 KCTC12186BP로 기탁된 것을 특징으로 하는 형질전환 수정란.

청구항 8

1) 제 1항의 형질전환 동물에 비만 식이를 급여하여 비만을 유도하는 단계;

2) 단계 1)의 비만 유도된 형질전환 동물에 항비만 효능 평가 대상 식품/소재를 포함하는 식이를 급여하여 사육하는 단계;

3) 단계 2)의 형질전환 동물의 리포터 유전자로부터 발현한 리포터 단백질의 활성을 측정한 후, 대조군인 항비만 효능 평가 대상 식품/소재를 포함하는 식이를 섭취하지 않은 비만 유도된 형질전환 동물에서의 활성과 비교하는 단계를 포함하는 상기 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 단계 2)의 항비만 효능 평가 대상 식품/소재는 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 리포터 단백질은 생물발광 반응을 나타내는 루시퍼라아제; 형광 반응을 나타내는 녹색 형광성 단백질, 증강된 녹색 형광성 단백질, 적색 형광성 단백질, 증강된 적색 형광성 단백질, 청색 형광성 단백질, 증강된 청색 형광성 단백질, 황색 형광성 단백질, 증강된 황색 형광성 단백질, 남색 형광성 단백질, 및 증강된 남색 형광성 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 리포터 단백질은 루시퍼라아제인 것을 특징으로 하는 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법.

청구항 12

제 8항에 있어서, 단계 3)의 리포터 단백질 활성은 형질전환 동물의 장기를 적출한 후 측정하는 방법 또는 살아있는 상태로 측정하는 방법으로 수행될 수 있는 것을 특징으로 하는 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 프로모터 및 리포터 유전자가 형질 도입된 형질전환 동물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만은 당뇨, 동맥경화, 고혈압, 고지질증 등 심각한 대사질환의 직접적인 원인이 되며, 현재 전 세계적으로 2억 5,000만 명에 달하고, 2025년에 이르면 3억명 이상이 될 것으로 예측된다. 우리나라도 19세 이상 성인의 비만 유병률[비만 : BMI(kg/m^2) ≥ 25, 세계보건기구 아시아태평양지부 기준]이 1998년 26.3%에서 2010년 30.8%로 비만인구가 증가 추세에 있다(국민건강영양조사). 비만으로 얻게 되는 비만합병질환, 삶의 질 하락, 생산성 저하 등 엄청난 사회적 경제적 비용을 치러야하며, 우리나라의 경우 보건의료체계 내외부에서 지출된 총 비만의 사회경제적 비용은 1998년 기준 약 1조 17억 원 정도로 추산되며 이는 1998년 GDP의 0.25%, 전체 국민 의료비의 4.9% 이고, 2005년에는 약 1조 8천억 원으로 증가하였으며, 현재 비만의 유병율이 계속 증가하고 있는 상황이다. 이러한 비만 문제 치료는 종래의 합성의약품의 개발이 심각한 부작용으로 인해 한계성을 나타내면서 천연물 유래 식의약 소재에 대한 관심이 집중되고 있다. 이와 같이 비만과 에너지 대사에 관련된 생리활성을 가지는 기능성 식품/소재에 대한 관심이 고조되고 있으나, 현재까지 그 유효성을 과학적으로 평가할 수 있는 형질전환 동물모델은 없는 실정이다.

[0003] 형질전환 마우스는 특정 DNA를 생쥐에 삽입, 제거, 과발현(over-expression)시켜 생체 내 유전자 기능 연구 및 질환동물 모델 제작에 이용되는 기술이다. 형질전환 생쥐 생산 기술은 의학계만 편중되어 있으며 주로 질환 동물 모델 개발을 위한 형질전환 마우스 개발 연구가 이루어지고 있다. 현재 비만, 내분비 교란, 당뇨병, 지질대사, 근육대사 및 성장 연구 등을 위한 다양한 종류의 질환모델 형질전환 동물들이 개발된 바 있다. 그러나 기능성 식품의 효능 평가는 약물의 효능 평가와는 달리 질환이 없는 건강한 상태에서 그 효능이 평가되어야 하므로 현재 다양하게 개발된 질환모델 형질전환 마우스를 일방적으로 사용할 수 없다.

[0004] 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 유전자는 세포 에너지 대사의 중심적인 역할을 하는 유전자 전사 보조인자(transcription coactivator)의 하나로, 열 생산과 미토콘드리아 합성, 포도당 지질대사에 관여하는 전사조절인자이다(Knutti D and Kralli A, 2001; Puigserver P and Spiegelman BM, 2003). PGC-1α는 질병과 건강한 상태 모두에서 에너지 대사에 관여하는 것으로 알려져 있고, 갈색지방, 간과 근육조직에서 다양한 경로(multiple pathways)를 통해 세포 내 에너지 대사를 조절하는 것이 밝혀진 바 있다(Finck BN and Kelly DP, 2006). 포유류의 갈색 지방 조직에서 PGC-1α는 발열 반응에 필수적인 uncoupling protein 1(UCP1) 유전자를 강력하게 활성화시킬 수 있는 유일한 단백질이며, 백색지방조직에서는 UCP1 유전자 발현과 미토콘드리아 생합성을 유도한다(Wu Z *et al.*, 1999). 또한, 근육세포에서 PGC-1α는 NRF-1, NRF-2, mTFA의 유전자 발현을 강하게 유도하여 미토콘드리아 호흡쇄(mitochondria respiratory chain)의 발현과 미토콘드리아 DNA의 복제와 전사 등에 영향을 미친다. 간에서는 공복 상태에서 PGC-1α 발현이 증가되고, 이로 인해 포도당 신생과 배출이 증가되는 생리적인 스위치 역할을 한다(Andersson U and Scarpulla RC, 2001). 이와 같이, PGC-1α 유전자에 대한 선행연구가 진행되었으나, PGC-1α 프로모터(promoter)와 리포터 유전자 루시퍼라아제(luciferase)를 도입하여 형질전환 생쥐를 제작하고, 항비만 기능성 식품/소재를 상기 형질전환 생쥐에 처리하였을 때, PGC-1α 프로모터가 발현하면 연이어 작동가능하도록 연결된 루시퍼라아제가 발현하는 것을 확인하여, PGC-1α 유전자 발현 증가를 간접적으로 측정함으로써, 이를 기능성 식품/소재의 항비만 유효성 평가에 사용한 바 없다.

[0005]

[0006] 본 발명자들은 질환이 없는 정상 대사 상태에서 기능성 식품의 효능을 평가하기 위한 형질전환동물을 제작하였고, 구체적으로 에너지 대사 조절에 중추적인 역할을 하는 PGC-1α 유전자의 프로모터와 리포터 유전자 루시퍼라아제가 삽입된 형질전환 생쥐를 제작하였으며, 상기 형질전환 생쥐의 대사 상태가 정상 생쥐와 유사한 것을 확인하였고, 항비만 기능성 식품/소재를 상기 형질전환 생쥐에 처리하였을 때, PGC-1α 프로모터가 발현하면 연이어 작동가능하도록 연결된 루시퍼라아제가 발현하는 것을 확인하여, PGC-1α의 발현 증가를 간접적으로 측정함으로써 비만과 에너지 대사와 관련된 기능성 식품/소재의 유효성 평가에 유용한 형질전환 동물모델인 것을 확인하였으므로, 이를 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가에 유용하게 활용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated

receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 프로모터 및 상기 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트(construct)가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 형질전환 동물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 방법으로 제조된 형질전환 동물로부터 유래한 형질전환 수정란을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 목적은 상기 형질전환 동물을 이용한 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 프로모터 및 상기 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트(construct)가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은

[0013] 1) PGC-1α 프로모터 및 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

[0014] 2) 상기 벡터를 생쥐의 수정란에 형질도입하는 단계;

[0015] 3) 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 새끼를 생산시키는 단계;및

[0016] 4) 단계 3)에서 태어난 생쥐 중 PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 게놈 DNA에 도입된 개체를 선별하는 단계를 포함하는 C57BL/6J 계통의 PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 형질전환 동물로부터 유래한 형질전환 수정란을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 상기 형질전환 동물을 이용한 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 질환이 없는 정상 대사 상태에서 기능성 식품의 효능을 평가하기 위한 형질전환동물에 관한 것이고, 구체적으로 에너지 대사 조절에 중추적인 역할을 하는 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 유전자의 프로모터와 리포터 유전자 루시퍼라아제가 삽입된 형질전환 생쥐를 제작하였으며, 상기 형질전환 생쥐의 대사 상태가 정상 생쥐와 유사한 것을 확인하였고, 항비만 기능성 식품/소재를 상기 형질전환 생쥐에 처리하였을 때, PGC-1α 프로모터가 발현하면 연이어 작동가능하도록 연결된 루시퍼라아제가 발현하는 것을 확인하여, PGC-1α의 발현 증가를 간접적으로 측정함으로써 비만과 에너지 대사와 관련된 기능성 식품/소재의 유효성 평가에 유용한 형질전환 동물모델인 것을 확인하였으므로, 이를 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 프로모터-Luc 재조합 유전자를 포함하는 벡터의 개열 지도 및 전기영동 결과를 나타낸 도이다:

a: 개열 지도; 및,

b: 전기영동.

도 2는 생쥐 게놈 내에 PGC-1α 프로모터-Luc 재조합 유전자가 삽입된 Founder(F0) 형질전환 생쥐를 선별하기 위한 PCR 결과를 나타낸 도이다:

Marker: 100 bp 사이즈 마커;

NC1: 음성 대조군 1(negative control) 증류수;

NC2: 음성 대조군 2 C57BL/6J 정상 생쥐 게놈 DNA; 및,

PC: 양성 대조군(positive control) PGC-1α 프로모터-Luc 플라스미드 DNA 1 pg.

도 3는 마늘 식이를 섭취한 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 몸무게 증가량과 에너지 섭취량 변화를 나타낸 도이다:

a: 몸무게 증가량; 및,

b: 에너지 섭취량 변화.

도 4는 마늘 식이를 섭취한 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 부고환지방조직 무게와 간 무게 변화를 나타낸 도이다:

a: 부고환지방조직 무게; 및,

b: 간 무게 변화.

도 5는 마늘 식이를 섭취한 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 간 기능 지표 변화를 나타낸 도이다.

도 6은 마늘 식이를 섭취한 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 혈장 내 중성지방, 총 콜레스테롤과 렙틴 변화를 나타낸 도이다:

a: 혈장 내 중성지방;

b: 총 콜레스테롤; 및,

c: 렙틴 변화.

도 7는 마늘 식이를 섭취한 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 조직별 루시퍼라아제 활성도 변화를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 과산화소체 증식제-활성화 수용체-감마 보조인자-1알파(peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha, PGC-1α) 프로모터 및 상기 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트(construct)가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물을 제공한다.

[0023] 상기 PGC-1α 프로모터는 인간 게놈 DNA 유래 PGC-1α 프로모터인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0024] 상기 리포터 유전자는 생물발광 반응을 나타내는 루시퍼라아제(luciferase); 형광 반응을 나타내는 녹색 형광성 단백질(green fluorescent protein, GFP), 증강된 녹색 형광성 단백질(enhanced green fluorescent protein, EGFP), 적색 형광성 단백질(red fluorescent protein, RFP), 증강된 적색 형광성 단백질(enhanced red fluorescent protein, ERFP), 청색 형광성 단백질(blue fluorescence protein, BFP), 증강된 청색 형광성 단백질(enhanced blue fluorescence protein, EBFP), 황색 형광성 단백질(yellow fluorescence protein, YFP), 증강된 황색 형광성 단백질(enhanced yellow fluorescence protein, EYFP), 남색 형광성 단백질(cyan fluorescence protein, CFP) 및 증강된 남색 형광성 단백질(enhanced cyan fluorescence protein, ECFP)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 암호화하는 유전자인 것일 수 있고, 구체적으로 상기 리포터 유전자는 루시퍼라아제를 암호화하는 유전자인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0025] 또한, 본 발명은

[0026] 1) PGC-1α 프로모터 및 PGC-1α 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

[0027] 2) 상기 벡터를 생쥐의 수정란에 형질도입하는 단계;

[0028] 3) 상기 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 새끼를 생산시키는 단계;및

[0029] 4) 단계 3)에서 태어난 생쥐 중 PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 게놈 DNA에 도입된 개체를 선별하는 단계를 포함하는 C57BL/6J 계통의 PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 형질도입된 항비만 기능성 식품/소재의 유효성 평가용 형질전환 동물을 생산하는 방법을 제공한다.

[0030] 상기 단계 2)의 형질도입 방법은 당업계에 주지된 각종 형질도입 방법에 따라 동물 세포의 크로모좀 내로 삽입시킬 수 있다. 이러한 형질도입 방법의 예를 들면, 동물의 수정란에 융합 유전자를 미세주입하는 방법 또는 레트로바이러스 벡터를 이용하는 방법 등을 들 수 있으며, 벡터를 선형화하여 미세주입하는 것이 바람직하다. 아울러, 상기 단계 4)의 개체 선별은 꼬리 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR을 통해 수행될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 형질전환 동물로부터 유래한, PGC-1α 프로모터 및 리포터 유전자가 형질도입된 형질전환 수정란을 제공한다.

[0032] 상기 형질전환 수정란은 기탁번호 KCTC12186BP로 기탁된 것이다.

[0033] 아울러, 본 발명은

[0034] 1) 제 1항의 형질전환 동물에 비만 식이를 급여하여 비만을 유도하는 단계;

[0035] 2) 단계 1)의 비만 유도된 형질전환 동물에 항비만 효능 평가 대상 식품/소재를 포함하는 식이를 급여하여 사육하는 단계;

[0036] 3) 단계 2)의 형질전환 동물의 리포터 유전자로부터 발현한 리포터 단백질의 활성을 측정한 후, 대조군인 항비만 효능 평가 대상 식품/소재를 포함하는 식이를 섭취하지 않은 비만 유도된 형질전환 동물에서의 활성과 비교하는 단계를 포함하는 상기 항비만 효능 평가 대상 식품/소재의 유효성 평가 방법을 제공한다.

[0037] 상기 단계 2)의 항비만 효능 평가 대상 식품/소재는 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0038] 상기 리포터 단백질은 생물발광 반응을 나타내는 루시퍼라아제; 형광 반응을 나타내는 녹색 형광성 단백질, 증강된 녹색 형광성 단백질, 적색 형광성 단백질, 증강된 적색 형광성 단백질, 청색 형광성 단백질, 증강된 청색 형광성 단백질, 황색 형광성 단백질, 증강된 황색 형광성 단백질, 남색 형광성 단백질, 및 증강된 남색 형광성 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 리포터 단백질은 루시퍼라아제인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0039] 또한, 단계 3)의 리포터 단백질 활성은 형질전환 동물의 장기를 적출한 후 측정하는 방법 또는 살아있는 상태로 측정하는 방법으로 수행될 수 있다. 장기를 적출한 후 측정하는 방법은 1) 생물발광 반응의 경우 루시노미터기(lucinometer)를 이용하여 측정될 수 있고, 2) 형광 반응의 경우 형광 현미경을 이용하여 측정될 수 있다. 또한, 살아있는 상태로 측정하는 방법은 1) 생물발광 반응의 경우 CCD 카메라가 장착된 IVIS Bioluminescence and Fluorescence Imaging System(발광형광 이미징 시스템; Xenogen, 미국)을 이용하여 측정될 수 있고, 2) 형광 반응의 경우 CCD 카메라가 장착된 Fiber Based Flourescene Optical Animal Image System(화이버 형광 실험동물 영상분석기; Benjamin A Flusberg et al., NATURE METHODS, 2(12): 941-950, 2005)을 이용하여 측정될 수 있다.

[0040] 상기 단계 3)의 리포터 단백질 활성은 형질전환 동물의 장기를 적출한 후 측정하는 방법 또는 살아있는 상태로 측정하는 방법으로 수행될 수 있는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0041] 본 발명자들은 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐를 이용한 기능성 식품/소재의 항비만 유효성을 평가하기 위

해, PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐를 제작하였고, 이를 1주간 예비 사육한 후 고지방 식이(45% fat diet)를 주어 8주간 비만을 유도하였다. 비만 유도한 다음 2% 혹은 5% 마늘이 첨가된 실험식이를 8주간 공급하였다. 마늘식이를 섭취한 실험동물의 체중변화는 대조군(마늘을 섭취하지 않은 형질전환 생쥐)에 비하여 2% 마늘에서 13%, 5% 마늘을 섭취한 형질전환 생쥐에서 19% 감소하였다(도 3a 참조). 이에 대한 에너지 섭취량은 모든 실험군간 유의적인 차이가 없었다(도 3b 참조). 혈장 내 간독성 지표인 AST와 ALT 효소의 활성을 조사한 결과 아무런 변화가 없어 마늘에 의해 간세포가 손상되지 않음을 보여주었다(도 5 참조). 또한, 혈장 내 중성지방, 총 콜레스테롤과 렙틴(leptin) 함량은 대조군에 비해 마늘 섭취군에서 유의적인 감소를 보였다(도 6 참조).

[0042] 루시퍼라아제 활성 측정 결과, PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 루시퍼라아제 활성은 간, 비장, 신장, 심장, 폐, 백색지방(WAT), 갈색지방(BAT), 근육과 뇌 등 여러 조직에서 분석하였을 때, 루시퍼라아제 활성은 2%와 5% 마늘 섭취한 실험동물의 간(1.7배와 2.7배), 백색지방(1.7배와 2.9배), 갈색지방(2.5배와 4.8배)에서 각각 증가하였으며, 비장, 신장, 폐, 근육 및 뇌에서는 유의적인 차이가 없었다(도 7 참조).

[0043] 따라서, 마늘 소재를 섭취한 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 간, 지방 및 골격근조직에서 PGC-1α 유전자 발현 증가를 루시퍼라아제 활성도 측정을 통하여 검증하였으며, 생리활성을 가지는 기능성 식품 및 소재의 항비만 유효성 평가를 하기 위한 적절한 형질전환 동물모델임을 입증하였으므로, 본 발명의 질환 상태가 아닌 정상대사 상태의 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 동물모델을 기능성 식품/소재의 항비만 및 에너지 대사와 관련된 유효성 평가에 유용하게 이용할 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0045] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] **<실시예 1> PGC-1α 프로모터-Luc 유전자 재조합**

[0047] **<1-1> PGC-1α 프로모터(human PGC-1α promoter) 유전자 수득 및 PGC-1α 프로모터-Luc 재조합 벡터 제작**

[0048] -991/+417bp 크기의 인간 PGC-1α 프로모터는 human genomic DNA(Clontech, USA)를 주형으로 이용하였고, 양 끝에 MluⅠ과 XhoⅠ의 효소 부위(enzyme site)를 인식하는 프라이머(primer)를 제작하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. 프라이머의 설계는 정방향(forward) 5'-NNN NAC GCG TCC CTC AGT TCA CAG ACA TTC T3'(서열번호 1), 역방향(reverse) 5 '-NNN NCT CGA GAC AGT GCC AAA GTC ACA TGG A-3' (서열번호 2)로 하였고 PCR 반응의 조건은 변성(denaturation) 95℃ 1분, 어닐링(annealing) 64℃ 1분, 연장(extension) 70℃ 2분으로 30 사이클(cycle)로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 1.4kb DNA를 gel extraction kit(Qiagen, USA)를 사용하여 회수하였다. PCR을 통해 얻은 상기 PGC-1α의 프로모터는 pGEM-T easy vector(Promega, USA)와 3:1의 비율로 T4 DNA ligase(Promega, USA)를 이용하여 서브클로닝(subcloning)한 후 (주)코스모진텍(한국) 유전자 해석 센터에 서열분석(sequencing)을 의뢰하였다. 서열분석을 확인한 후 재조합된 pGEM-T easy vector는 제한효소 XhoⅠ과 MluⅠ으로 처리 후 전기영동하여 PGC-1a의 프로모터 부분인 1.4kb만 pGL3-basic vector를 T4 DNA ligase를 이용하여 약 16℃에서 14시간 동안 배양시켜 두 유전자를 재조합시켰다.

[0049] 그 결과, -991/+417 bp 크기의 PGC-1α 프로모터 5 ' 말단에 XhoⅠ과 MluⅠ 제한효소 인식배열을 부가하여 PCR로 증폭시킨 다음, 이것을 pGEM-T easy vector에 라이게이션(ligation)시킨 것을 제한효소 XhoⅠ과 MluⅠ을 처리하여(3.0 kb, 1.4 kb) 크기를 확인하였다. pGL3-basic vector(4.8 kb)는 제한효소 XhoⅠ과 MluⅠ으로 처리하고 알카라인 포스파타제(alkaline phosphatase)에 의해 탈 인산화하여 젤 추출(gel extraction) 한 후 크기를 확인하였다. 재조합 PGC-1α 프로모터 유전자의 구조는 (도 1a)에서 보여주고 있다. pGL3-basic vector와 PGC-1α 프로모터를 라이게이션한 재조합 DNA는 제한효소 Sal Ⅰ과 Xba Ⅰ으로 처리하여 6.2kb로 크기를 확인하였고, XhoⅠ과 MluⅠ처리를 통해서 4.8kb 벡터와 1.4kb의 삽입 크기(insert size)를 확인하였다(도 1b).

[0050] **<1-2> PGC-1α 프로모터-Luc 선형 DNA 제작**

[0051] 형질전환 생쥐 제작을 위한 재조합 PGC-1α-Luc DNA는 Mlu Ⅰ과 Sal Ⅰ으로 처리하여 2.8kb와 3.4kb를 자른 다음

항생제 저항성 염기서열 (Amp^r) 부위 2.8kb를 제외한 PGC-1α 프로모터와 루시퍼라아제 부위가 포함된 3.4kb를 선형(linear) DNA를 대량생산하여 형질전환 생쥐 제작을 위한 미세주입(microinjection)에 사용하였다. 상기 선형 DNA를 0.7-1% 아가로스 젤에서 전기영동을 실시한 후 필요로 하는 DNA 절편을 gel extraction kit로 회수하였다. 회수된 DNA를 1/2 부피의 페놀(phenol)과 1/2 부피의 CIAA로 섞어주고 30초간 볼텍스(vortex) 해준 후, 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리한 다음, DNA가 용해되어 있는 상층액을 회수하였다. 이러한 페놀 추출법을 3회 실시 후 에탄올로 DNA를 침전시켜 순수한 DNA를 회수하였다. 이때 회수된 DNA가 2-10 ㎍ 정도가 되면 미세주입 실험에 충분한 양이 된다. 순수 분리한 DNA를 농도가 2-4 ng/㎕가 되도록 미세주입용 용액(10 mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)으로 조정한 다음, DNA용액을 각각의 1.5 ml 튜브에 50 ㎕씩 분주하여 -20℃에 보관하여 사용하였다.

[0052] **<실시예 2> 형질전환 생쥐 생산**

[0053] **<2-1> 수정란의 준비**

[0054] 다배란 유기를 위하여 PMSG(Prenant Mares Serum Gonadotropin; Serotropin, Japan)와 HCG(Human Chorionic Gonadotropin : Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5 IU씩 교잡종 자성생쥐의 복강 내에 주사한 다음, 동일계통의 웅성생쥐(Charls River, Japan)와 1:2로 합사시켜 자연교미를 유도하였다. 다음날 아침, 질전의 유무를 확인하여 질전이 있는 개체만을 골라서 경추 탈구법 (cervical dislocaton method)으로 도살한 다음 난관을 절취하였다. 절취된 난관의 팽대부를 주사바늘로 터트려 난구세포괴(cumulus cell mass)를 회수하며, 회수된 난구세포괴를 300 unit/ml의 hyaluronidase (Sigma, USA) 용액에 2-3분 처리한 후 15,000 rpm으로 약 3분간 원심처리 함으로 핵막의 관찰을 용이하게 하였다.

[0055] **<2-2> 재조합 유전자의 미세 주입**

[0056] 실시예 1-3에서 준비한 선형 외래 유전자를 미세주입에 이용하였다. 미세 주입할 DNA에 사용되는 시료 및 기구는 모두 멸균하여 사용하였다. 외래 유전자의 미세주입은 미세조작기(micromanipulator : Leitz, Germany)를 이용하여 수정란의 웅성 전핵에 주입하였는데, 이때 핵막의 용이한 관찰과 실험의 편리함을 도모하기 위하여 DIC system(Leitz, Germany)을 갖춘 도립현미경 하에서 실험을 수행하였다. 외래유전자가 핵 내에 주입되는지의 여부는 웅성전핵의 팽창(swelling)으로 확인하였다. 상기 방법으로 준비한 외래유전자가 주입된 수정란들은 CO_2 배양기 내에서 2 세포기(2 cell)까지 배양한 후 건강한 상태의 수정란을 선별하여 한국생명공학연구원에 2012년 04월 16일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC12186BP).

[0057] **<2-3> 수정란 이식**

[0058] 외래 유전자가 주입된 수정란들은 CO_2 배양기 내에서 2 세포기(2 cell)까지 배양한 후 건강한 상태의 수정란을 선별하여 이식하였다. 먼저 마취제(Avertin; Aldrich, USA)를 생쥐 체중의 10 g당 0.5 mg의 양으로 복강내에 주사(IP)하여 전신 마취를 실시하였다. 이때, 마취가 확실히 이루어지지 않았을 경우에는 0.1 cc를 더 투여하는데, 대리모의 상태를 철저히 고려한 후 사용하였다. 마취가 확실히 이루어지고 난 뒤, 가친의 배측 정중선을 약 1 cm정도 절개하고 난소, 난관을 들어내어 각각의 난관에 수정란을 이식한 후 난관의 팽대부가 약간 부풀어 오른 것을 확인하였다. 그 후 복강 내에 난관과 난소를 다치지 않게 잘 넣고 근육층과 표피를 봉합하였다.

[0059] **<2-4> 형질전환 생쥐 선별**

[0060] 대리모에서 태어난 산자의 외래유전자 발현 여부는 삽입된 루시퍼라아제(luciferase) 외래유전자에서 만든 PCR 프라이머를 이용하여 실시하였다. 키메라(Chimera)의 꼬리를 약 0.5 cm 정도 잘라내어 단백질 가수 분해 효소(proteinase K)가 함유된 lysis buffer(Puregene, USA)를 이용하여 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하여 PCR을 실시하여 외래 유전자의 생식선 전달(germline transmission) 여부를 판별하였다. PCR은 10 pmol/㎕의 루시퍼라아제 프라이머(5'-TGTACACGTTCGTCACATCT-3'(서열번호 3) 과 5'-GCAGACCAGTAGATCCAGAG-3'(서열번호 4))를 이용하여 1X PCR 완충액(buffer), 200μM dNTPs 및 1U Hotstart taq polymerase(바이오니아, 한국)의 조건에서

수행하였다. PCR 반응의 사이클 조건은 시작은 95℃에서 15 분 배양 후 95℃에서 1분, 55℃에서 30 초, 72℃에서 1분씩 25 사이클(cycles) 진행하였고, 마지막 증폭단계는 72℃에서 10분으로 설정하였다. PCR 생성물의 크기는 420 bp이며, PCR 결과 분석은 1.5%의 아가로스 젤을 통하여 전기영동한 후, 브롬화에티듐(ethidiumbromide, EtBr)로 염색하고, UV를 조사하여 확인하였다.

[0061] 루시퍼라아제 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 도입된 외래 유전자가 생쥐의 염색체 내에 삽입되어 있는지의 여부를 조사하였으며, 외래 유전자가 발현되는 총 3마리의 founder 생쥐를 얻었다(도 2).

[0062] **<실시예 3> PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐를 이용한 기능성 식품/소재의 항비만 유효성 평가**

[0063] **<3-1> 형질전환 생쥐 사육 및 식이**

[0064] PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐를 이용하여 마늘(*Allium sativum*) 소재의 항비만 효능평가를 수행하였다. 마늘(garlic)의 생리활성은 항균작용(Kim YS *et al.*, 1996; Lim SW *et al.*, 1997), 항암(Kim ES *et al.*, 1997), 콜레스테롤 저하 효과(Chi MS, 1982; Qureshi AA *et al.*, 1983) 등이 있는 것으로 이미 알려져 있다. 최근 연구에서는 고지방식이로 비만을 유도한 동물모델에서 마늘이 체중 및 지방조직 감소와 혈중지질 저하 효과가 있음을 보고하였다(Kang SA *et al.*, 2006). 본 연구에서의 실험동물은 생후 4-6 주령된 F3 세대 PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환(C57BL/6J) 수컷 생쥐와 정상 수컷 생쥐(C57BL/6J)를 사용하였다. 실험동물은 온도 20±2℃, 습도 60±5%로 유지되는 동물 사육실에서 사육하였다. 생후 약 4-6주령의 PGC-1α 프로모터-Luc 수컷 형질전환 생쥐를 1주간 예비 사육한 후 고지방 식이(45% fat diet)를 주어 8주간 비만을 유도하였다. 비만 유도 후 난괴법에 의하여 3-4마리씩 정상 생쥐 대조군, 형질전환 대조군, 형질전환-2% 마늘군, 형질전환-5% 마늘군의 4그룹으로 나누어 8주간 실험식이를 공급하였다.

[0065] 그 결과, 1주일간 적응시킨 후 8주간 고지방식이로 비만 유도한 후 약 2배 정도 체중이 증가하였다. 비만 유도한 다음 2% 혹은 5% 마늘이 첨가된 실험식이를 8주간 공급하였다. 마늘식이를 섭취한 실험동물의 체중변화는 대조군(마늘을 섭취하지 않은 형질전환 생쥐)에 비하여 2% 마늘에서 13%, 5% 마늘을 섭취한 형질전환 생쥐에서 19% 감소하였다(도 3a). 이에 대한 에너지 섭취량은 모든 실험군간 유의적인 차이가 없었다(도 3b).

[0066] **<3-2> 형질전환 생쥐의 장기 채취**

[0067] PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐를 이용한 식품소재 효능평가 실험이 끝난 형질전환 생쥐는 12시간 절식시킨 다음 마취제로 주사하여 마취시켰다. 부고환 지방, 간, 비장, 콩팥, 심장, 폐, 갈색 지방, 뇌 및 근육조직을 적출한 후 무게를 측정한 후 액체질소에 담가 급속 동결시킨 후 -70℃의 냉동고에 보관하였다.

[0068] **<3-3> 간 독성 측정**

[0069] 혈장내 간 손상 지표인 알라닌 아미노트랜스퍼라제(alanine aminotranferease, AST)와 아스파르트산염 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferas, ALT)는 상업용 키트(아산 제약, 한국)를 이용하여 측정하였다. 효소적 비색반응에 의한 흡광도를 측정한 뒤 표준곡선에 대입하여 각 수치를 계산하였다.

[0070] 그 결과, 간의 무게를 측정하였을 때, 변화하지 않았으며(도 4b), 혈장 내 간독성 지표인 AST와 ALT 효소의 활성을 조사한 결과 아무런 변화가 없어 마늘에 의해 간세포가 손상되지 않음을 보여주었다(도 5).

[0071] **<3-4> 혈중 지질지표 측정**

[0072] 혈장의 중성 지방 농도는 글리세폴 포스페이트 산화효소(glycerol phosphate oxidase)효소법을 이용한 분석 Kit(아산 제약, 한국)로 550 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 혈장 렙틴(leptin) 농도는 렙틴 효소면역정량(enzyme-linked immunosorbent assay) kit(R&D Systems, UK)를 이용하여 측정하였다.

[0073] 그 결과, 혈장 내 중성지방, 총 콜레스테롤과 렙틴(leptin) 함량은 대조군에 비해 마늘 섭취군에서 유의적인 감소를 보였다(도 6).

[0074] **<3-5> 루시퍼라아제 활성 측정**

[0075] 적출한 각각의 조직을 용해 완충용액(promega, USA)을 사용하여 적출한 조직을 용해한 후, 제조사의 방법에 따라 단백질을 추출하여 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 루시퍼라아제 활성은 Luciferase Reporter Assay System(promega, USA)을 이용하여 Turner Designs TD 20/20 luminometer(Turner Designs, USA)에서 측정하였다. 각 조직 양의 표준화를 위한 단백질 함량은 BCA protein assay(Pierce, USA)로 측정하였다.

[0076] 그 결과, PGC-1α 프로모터-Luc 형질전환 생쥐의 루시퍼라아제 활성은 간, 비장, 신장, 심장, 폐, 백색지방(WAT), 갈색지방(BAT), 근육과 뇌 등 여러 조직에서 분석하였을 때, 루시퍼라아제 활성은 2%와 5% 마늘 섭취한 실험동물의 간(1.7배와 2.7배), 백색지방(1.7배와 2.9배), 갈색지방(2.5배와 4.8배)에서 각각 증가하였으며, 비장, 신장, 폐, 근육 및 뇌에서는 유의적인 차이가 없었다(도 7).

[0077] **<3-6> 통계분석**

[0078] 모든 실험결과는 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS 17.0; Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계 분석하였다. 분석수치는 실험군당 평균과 표준오차로 나타내었고, 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 Tukey's multiple range test에 의하여 $P<0.05$수준에서 유의성을 검증하였다.

수탁번호

[0079]

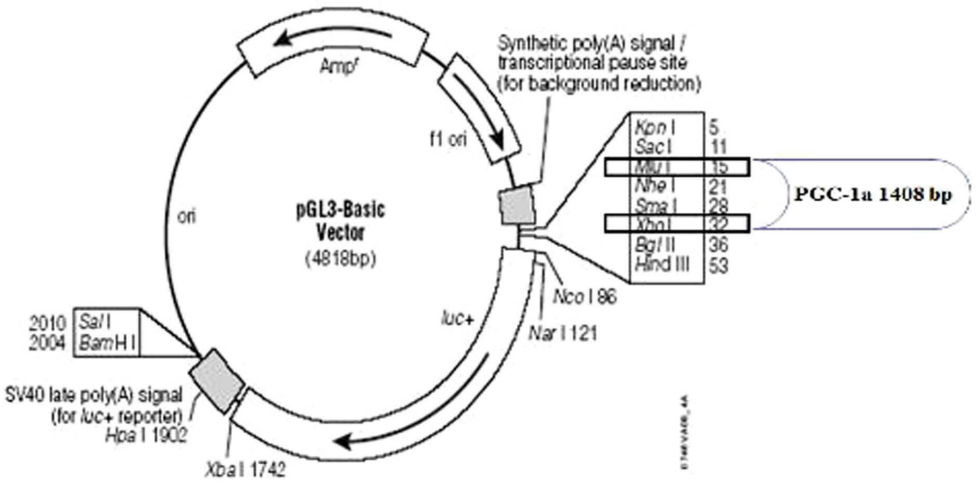
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12186BP

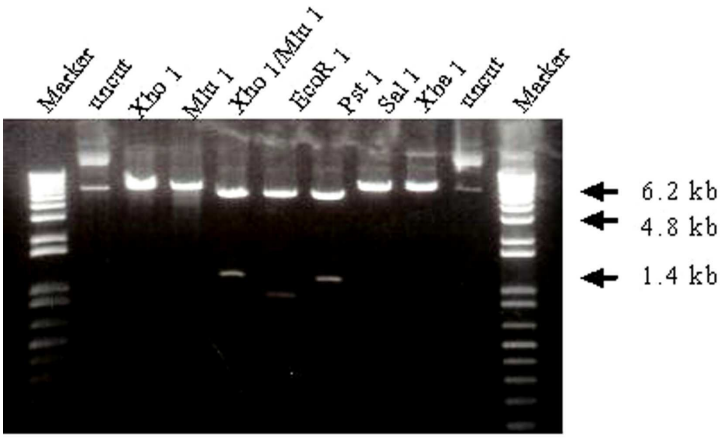
수탁일자 : 20120416

도면

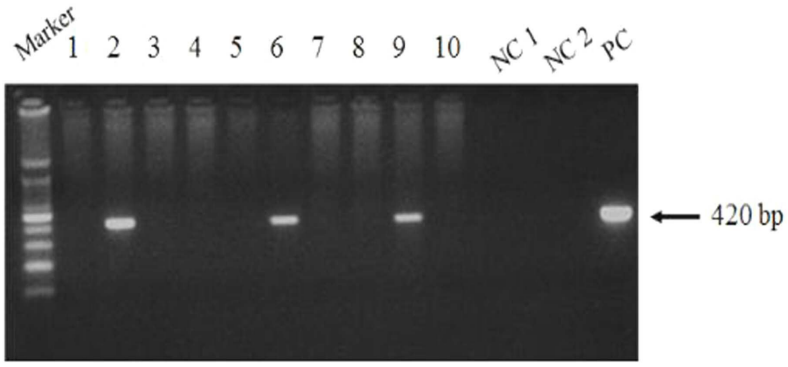
도면1a



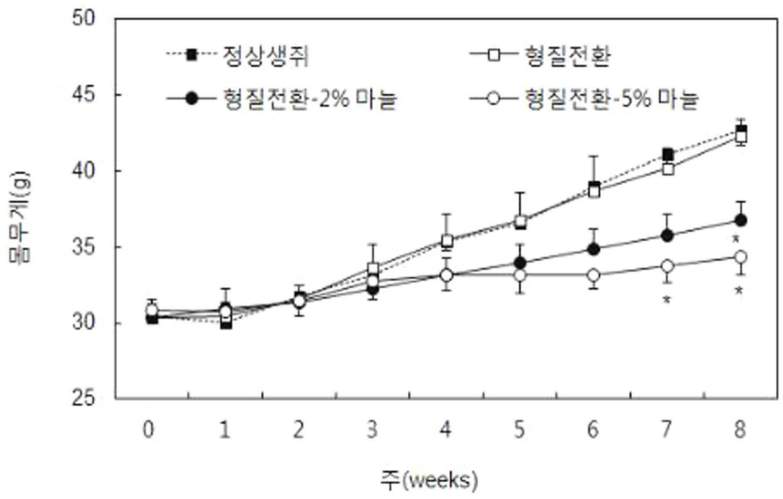
도면1b



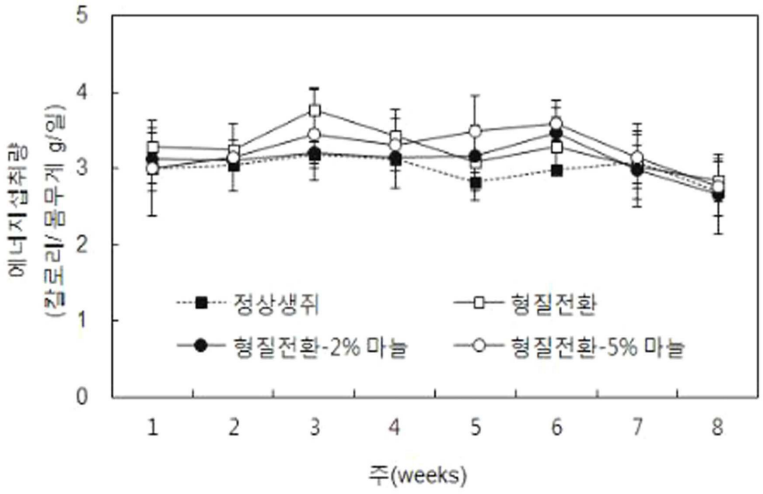
도면2



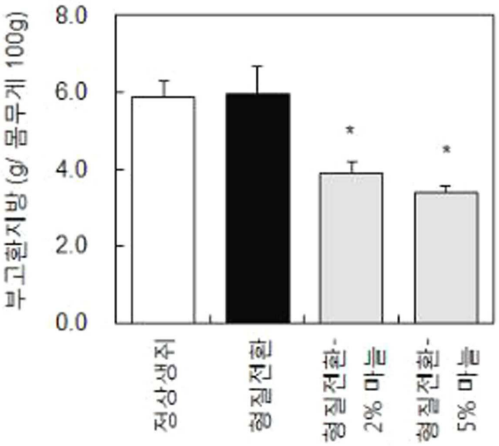
도면3a



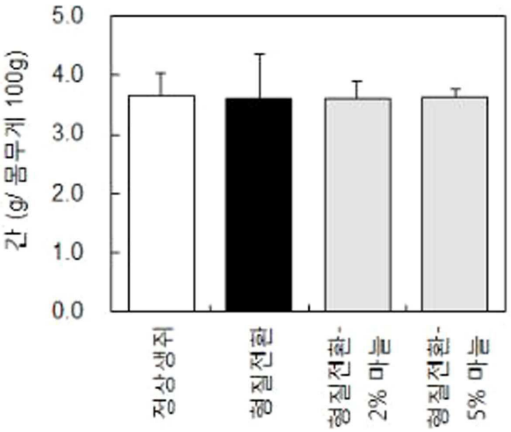
도면3b



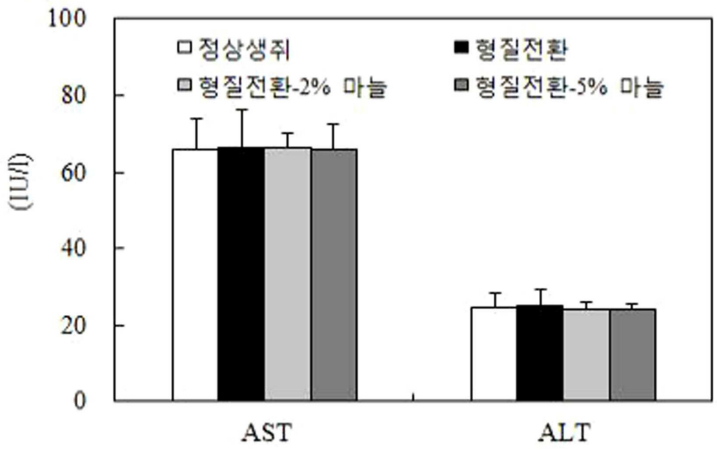
도면4a



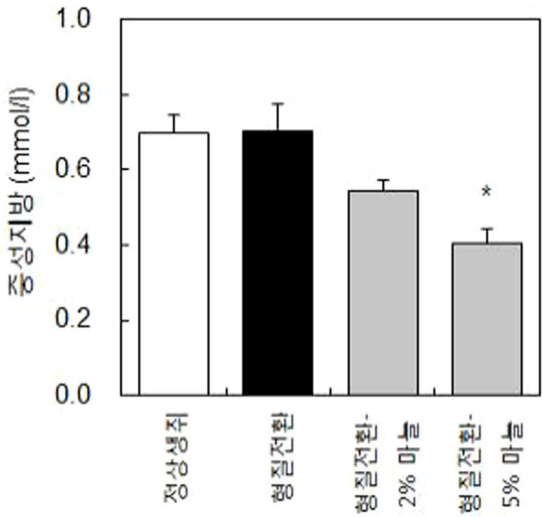
도면4b



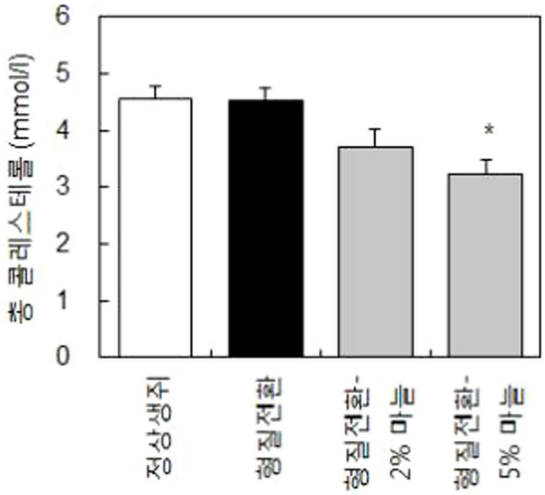
도면5



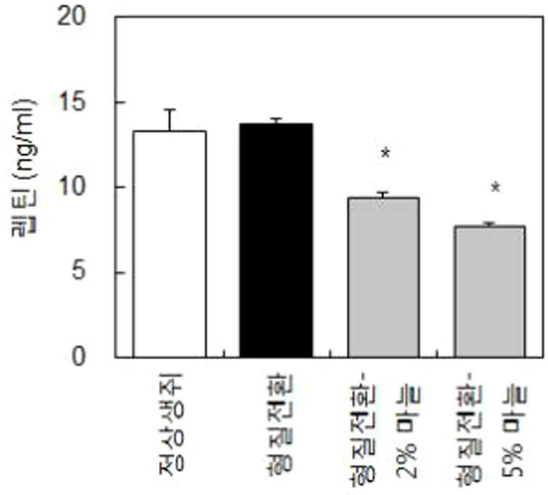
도면6a



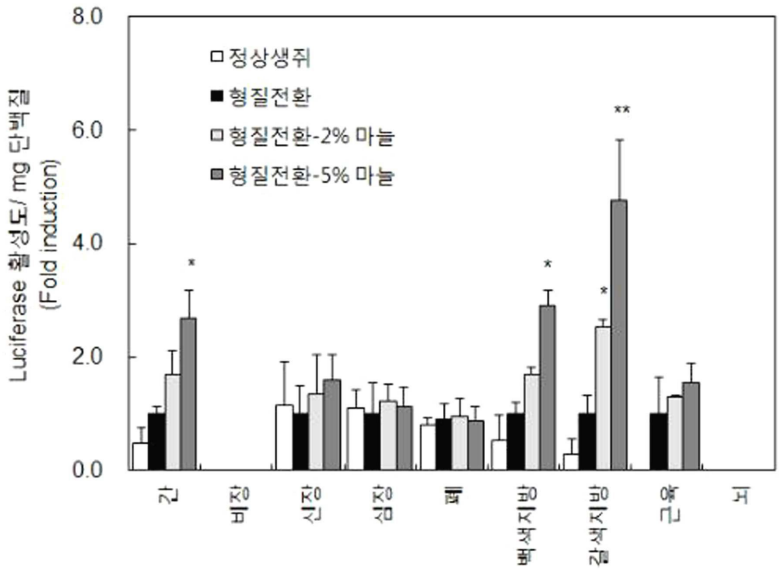
도면6b



도면6c



도면7



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Transgenic mouse model with peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) promoter-reporter

<130> 11p-11-049

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 1

nnnnacgcgt ccctcagttc acagacattc t 31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 2

nnnnctcgag acagtgccaa agtcacatgg a 31

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 3

tgtacacgtt cgtcacatct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 4

gcagaccagt agatccagag 20