

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0052924 (43) 공개일자 2009년05월27일
(51) Int. Cl. <i>C07K 14/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/10</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0119490 (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	

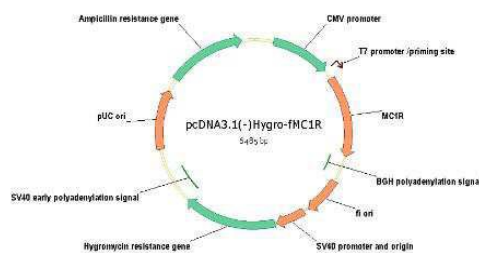
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 양식납치의 멜라노코르틴 수용체 1 유전자

(57) 요약

본 발명은 양식납치의 멜라노코르틴 수용체 1 유전자에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 색소형성과 스트레스 해소 유전자와 결합하여 색소조절과 스트레스 조절에 이용될 수 있는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1(MC1R)의 특성을 지닌 유전자와 이와 같은 특성의 유전자 활성을 위한 동물세포주의 발현벡터의 형질전환체의 구성 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도8



특허청구의 범위

청구항 1

양식 낚치에서 분리된 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 (fMC1R) 유전자는 906개의 염기서열로 구성되어 있고, 301개의 아미노산으로 구성됨을 특징으로 하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 (fMC1R)은, 유전자가 pcDNA3.1(-)Hygro에 DNA 합성효소(ligase)로 재조합되어 발현 가능한 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC1R 발현백터임을 특징으로 하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자.

청구항 3

제 1항에 있어서, 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자는, pcDNA3.1(-)Hygro 백터와의 재조합을 통한 유전자의 형질전환체로 포유동물의 피부색 조절 기작에 관여하는 기질이 결합하는 수용체로 작용하는 것을 특징으로 하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <10> 본 발명은 양식낚치의 멜라노코르틴 수용체 1 유전자에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 색소형성과 스트레스 해소 유전자와 결합하여 색소조절과 스트레스 조절에 이용될 수 있는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 (MC1R)의 특성을 지닌 유전자와 이와 같은 특성의 유전자 활성을 위한 동물세포주의 발현백터의 형질전환체의 구성 방법에 관한 것이다.
- <11> 멜라노코르틴 수용체 (Melanocortin receptor) 단백질은 머리카락과 피부의 색깔을 조절하는 단백질이다. 색소의 색깔조절능을 지닌 MSH (Melanocyte-stimulating hormone)와 부신피질 호르몬의 분비 자극능을 지닌 ACTH(AdrenoCorticoTropic Hormone)가 세포막의 수용체 단백질에 결합하여 adenylyl cyclase를 활성화하여 기능을 나타낸다고 알려져 있으며 (Chhajlani and Wikberg, 1992), 주로 포유류에서 세포 표면의 색소생성 세포 (melanocyte)의 색소체생성(pmelanogenesis)을 조절하는 기작을 지니고 있는 것으로 밝혀졌다. 이들 수용체 단백질은 317개의 아미노산을 지정하는 유전자로 구성되어 있으며 human melanoma cell(인간 멜라닌 세포주)에서 처음으로 분리, 확인되었다.
- <12> 인간과 더불어 쥐에서도 수용체 단백질을 구성하는 유전자가 분리되었으며, G protein coupled protein gene (GPCR)으로 확인되었다 (Mountjoy *et al.*, 1992). 이들 유전자의 분리와 더불어 다양한 동종체(subfamily)가 존재한다는 것이 확인되어 분리되었고, 특히 alpha-MSH 수용체 유전자로 밝혀진 색소 조절에 관여하는 melanocortin-1(MC1R; Melanocortin receptor 1) 수용체 유전자의 확인이 이루어졌으며, 많은 포유동물에서 모색 발현에 관여하는 MC1R 유전자의 역할에 대해 보고되었다 (Robbins *et al.*, 1993; Valverde *et al.*, 1995; Klunghand *et al.*, 1995; Joerg *et al.*, 1996; Marklund *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996a, 1996b; Koppula *et al.*, 1997; Kijas *et al.*, 1998; Vage *et al.*, 1999a, 1999b). 포유동물의 모색은 두 가지의 색소, 즉 pheomelanin(red/yellow)과 eumelanin(brown/black)의 분포에 따라 결정되는데 이들의 색소 세포내의 상대적 양은 2개의 좌위, 즉 Extention(E)과 Agouti(A) 좌위에 의해 주로 조절된다(Jackson, 1993). 최근 마우스에서 E 좌위는 MSH receptor(MC1R)를 부호화하고, 마우스에서 나타나는 E 좌위에 출현하는 여러 종류 대립유전자(allele)는 MSH 수용체의 기능을 변경시키는 point mutation(점돌연변이)에 기인된다고 보고된 바 있다(Robbins *et al.*, 1993). 그리고 A 좌위의 Agouti protein은 MSH 수용체의 경쟁적 길항제(competitive antagonist)로 MSH와 그 수용체와의 결합을 방해함으로써 모색 발현에 관여한다는 보고를 하였다(Lu *et al.*, 1994). 또한 마우스의 흑색(black)과 황색(yellow)의 모색은 E 좌위의 MSH 수용체와 A 좌위의 Agouti protein에 의해 발현이 결정된다는 분자생물학적 모델을 제시하였다 (Jackson *et al.*, 1993; 1994). 그리고 또한 사람의 MSH receptor 유전자 분석에서 사람의 MC1R 유전자는 색소 표현형의 조절에 있어서 다른 포유동물과 마찬가지로 중요한 요인

일 수 있다고 하였고, 총 9개의 MC1R 유전자의 염기 변이와 모색 및 피부색별 빈도를 보고하였다 (Valverde *et al.*, 1995; Frandberg *et al.*, 1998). 또한 그들은 MC1R 유전자 염기 변이는 사람의 적색 모발과 피부의 일광 반응에 약한 증상(poor tanning response)와도 관련있다고 보고하였다.

<13> 최근의 연구로는 MC1R 유전자의 4개의 새로운 변이 유전자가 유럽인의 조상이라고 알려진 남아프리카인에서 발견되었다는 보고가 있다 (John and Ramsay, 2002). 이것은 MC1R 유전자의 변이에 의한 결과로서 인간의 모발색의 다양성을 보여주고 있었다(King *et al.*, 2003; Rees, 2004; Nakayama *et al.*, 2006; Gerstenblith *et al.*, 2007).

<14> 동물모델을 대상으로 한 실험에서 MSH 수용체가 결실된 생쥐에서는 밝은 색의 털색깔을 유지하였으며, 이들 수용체 유전자의 변이에 의한 생쥐의 모델은 어두운 털 색깔을 나타내는 것을 확인하였다 (Robbins *et al.*, 1993). 또한 케라티노사이트(keratinocyte)를 자외선 빛에 노출시켰을 때 MSH의 발현을 유도하여 색소침착에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 동물모델에서 MSH 수용체의 변이를 통해 빨간색/황금색 모발을 지닌 MC1R이 결실된 쥐에서는 색소침착이 이루어지지 않는 것으로 확인되어 수용체의 발현 유무에 의해 모발의 색깔정이 이루어짐을 확인할 수 있었다. 한편 국내의 연구로는 소 모색관련 유전자 MC1R을 이용하여 한우와 젖소 등의 선별과 다형성 연구에 이용하여 한우와 젖소 등의 외래종의 소를 구분하는 방법이 시도되어 많은 결과를 얻고 있는 실정이다.

<15> 포유류를 비롯한 다양한 동물에서 모발이나 모색과 관련된 유전자인 MC1R은 종의 다형성 및 종 구분에 있어 많은 결과와 실험적인 과제를 제공해주고 있었다. 하지만 아직까지 어류에 있어서 MC1R의 유전자의 특성 및 이용성은 크게 낮아 주로 어류 종간의 유사성 및 상동성에 이용되고 있으며, 복어, 얼룩말고기(Zebrafish) 등의 일부 종에서만 확인이 되고 있는 실정이다. 이에 대표적인 양식종으로서의 활용성을 지닌 양식 넙치에서의 MC1R 유전자의 구조와 발현 특성은 어류에서 색소침착 등에 관한 중요한 연구소재가 될 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 따라서 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 색소침착과 피부색 조절에 이용할 수 있는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (fMC1R)를 제공하기 위한 것으로, 실제로도 도 1에 기재되어 있는 염기서열을 갖는 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (fMC1R)를 제공한다. 그리고, 피부색 조절에 이용할 수 있는 상기 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 아미노산 지정 부분 (ORF)를 포함하는 동물세포주에서 발현되는 재조합 벡터를 제공하며, 이들 재조합 벡터에 의한 형질전환체는 멜라닌세포 자극호르몬과 결합하여 EC50의 값으로 정의되는 효과반응에 이용할 수 있는 특성을 지닌다.

발명의 구성 및 작용

<17> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 국내 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자(fMC1R)와 인간과 쥐 등의 포유동물 세포주에서 발현시켜 수용체로서의 기능을 확인할 수 있도록 재조합 벡터를 제공한다.

<18> 본 발명은 멜라닌세포 자극호르몬을 기질(리간드, ligand)로 감는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 단백질을 코딩하는 핵산 염기서열을 나타내는 도 1과 도 1로부터 해독되는 단백질의 아미노산 서열을 나타내는 도 2를 제공한다.

<19> 본 발명의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자는 도 1에서 보는 바와 같이, 906개의 DNA 염기서열로 구성된 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자(fMC1R)의 서열을 나타낸 것이며, 도 2는 도 1의 DNA 염기서열을 부호화하여 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 301개의 아미노산 서열을 지니는 수용체 단백질을 구성하고 있다.

<20> 또한 Clustal W 1.83 프로그램에 의해 양식넙치의 아미노산서열을 인간을 포함한 다른 동물과 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 아미노산 서열의 유사성을 조사한 결과를 도 3에서 제공하고 있는 것으로, 이는 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 아미노산 서열을 복어, 얼룩말고기(zebrafish), 생쥐, 그리고 인간의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 서열과 상동성을 비교한 결과는 복어(Fr)와는 91%의 상동성, 얼룩말고기(Dr)와는 82% 상동성, 생쥐(Mm)와는 56% 상동성, 인간과는 55%의 상동성을 나타내 보였다.

<21> 본 발명의 유전자 염기서열 및 이것으로부터 코딩되는 단백질에 대하여 하기 표 1에 기재하였다.

표 1. fMC1R 유전자 및 이로부터 코딩되는 단백질

유전자	유전자명	단백질	단백질의 아미노산 서열
도 1	fMC1R	멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 (Melanocortin receptor 1 : MC1R)	도 2

<22>

<23> 본 발명에 의거 제공되는 유전자는 다양한 숙주세포에 도입되어 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1을 발현 후 색소의 색 조절 및 주위환경의 색변화에 반응하는 반응에 이용할 수 있다.

<24> [실시예 1] 양식넙치 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 (fMC1R) 유전자의 클로닝

<25> 양식넙치의 뇌에서 분리된 전체 RNA로부터 cDNA를 구축하고 이들 cDNA에서 5' - and 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA ends; cDNA 급속증폭법)를 실시하였다. 많은 동물 유래의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 상동성이 높고 보존성이 높은 유전자 서열 부위 (표 2)를 fMC1R 유전자의 프라이머로 이용하여 도 4의 그림과 같이 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 상위 부위와 하위 부위를 중합효소연쇄 반응(PCR)으로 각각 클로닝하였다.

<26> 도 4는 본 발명의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (fMC1R)의 5' -RACE와 3' -RACE PCR 수행 결과와 구성의 도시화와 젤 사진을 표시한 것이며, 인간의 MC1R 유전자와 비교하여 증폭된 양식넙치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 클로닝 실험 방법의 모식도와 클로닝에 의해 확보된 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 증폭과정의 결과를 나타내는 것이다.

<27> 먼저 표 2의 Mc1-GSPR 프라이머와 일반 프라이머를 이용하여 fMC1R 유전자의 상위부위(5' 부분)을 증폭시켜 도 4의 젤 사진과 같이 5' -RACE fragment(5' 급속 증폭 부분)을 클로닝 하였으며, 표 2의 Mc1-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.

<28> 클로닝된 상위 부위 증폭부분과 하위 부위의 증폭 부분을 도 4와 같이 서로 중복이 되는 부분을 연결하여 양식넙치의 fMC1R 유전자의 완전부분을 완성하여 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자에 해당하는 염기서열을 확보하였으며, 이 유전자의 염기서열 확인결과 도 1의 DNA 염기서열을 지닌 fMC1R로 파악되었다. fMC1R 유전자의 아미노산 서열이 도 2에 부호화되었으며, 이것은 다시 도 3의 상동성 비교 분석에 의해 복어(Fr)와는 91%의 상동성, 얼룩말고기(Dr)와는 82% 상동성, 생쥐(Mm)와는 56% 상동성, 인간과는 55%의 상동성으로 높은 상동성을 띄어 다른 생물에서 확인된 MC1R과 동일한 유전자로 확인되었다.

<29> 또한 상동성의 비교를 통해 fMC1R은 세포막에 피부색 조절과 같은 기능을 가지며 도 5의 구성으로 세포외 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
Mc1-GSPR	5'-CCA GGA GGA ACA TGT GCA GAT ACA ACA C-3'	fMC1R 5'-RACE PCR을 위한 특이적인 프라이머
Mc1-GSPF	5'-GGA CCG CTA CAT CAC CAT CCT TTA CGC-3'	fMC1R 3'-RACE PCR을 위한 특이적인 프라이머

<30>

<31> [실시 예2] 양식 넙치의 계놈 DNA에서 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 1(fMC1R) 유전자의 구조 분석

<32> 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체 1 유전자의 유전체 구성의 특징을 파악하기 위하여 PCR 기법을 이용하여 엑손(exon)과 인트론(Intron)의 구성을 파악하였다. 양식넙치의 계놈 DNA를 주형으로 하여 양식넙치의 유전자의 전체 부분에 해당하는 프라이머 (표 3; mc1R-ge1F, mc1R-ge1R)와 fMC1R 유전자의 상위부분에 해당하는 프라이머(mc1R-ge2R)와 fMC1R 유전자의 하위부위에 해당하는 프라이머(mc1-ge3F)를 이용하여 fMC1R 유전자의 모든 부분에 해당하는 부분을 도 6의 방법과 동일하게 PCR(중합효소연쇄반응) 방법으로 증폭하여 증폭산물의 염기서열 분석을 통해 양식넙치의 fMC1R의 유전체 구성을 확인하였다. 증폭 산물의 크기와 염기서열 결과를 살펴보면, 도 6은 양식넙치의 계놈 DNA에서 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 유전체 구조의 특성에 대한 젤 사

진과 구조를 도시화한 것으로, 윗부분은 게놈 DNA에서 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 증폭결과를 나타낸 것이고, 아랫부분은 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 구조를 분석하기 위한 실험 전략의 모식도를 나타낸 것으로, 도 6의 젤 사진의 결과와 같이, fMC1R의 유전자의 크기와 증폭산물의 산물의 염기서열 크기를 비교할 시에 fMC1R 게놈 구조는 fMC1R 유전자의 cDNA에 해당되는 염기서열의 크기와 차이가 나지 않음을 알 수 있었으며, 염기서열의 결과 동일한 염기서열을 지닌 인트론을 지니지 않는 유전자의 유전체 구조를 지닐 수 있었다.

표 3. fMC1R 유전체 구조 파악을 위한 2 쌍의 프라이머

프라이머	염기 서열	비 고
mc1R-ge1F	5'-CCCAGAAGTTACACCCGTCAGAGAAA-3'	fMC1R ORF의 5' 상위부분
mc1R-ge1R	5'-TATATGTCAGACGCCGAGCAACCAAGA-3'	fMC1R ORF의 3' 하위부분
mc1R-ge2R	5'-GCAGCGCGTAAAGATGGTGATGTAGC-3'	fMC1R ORF의 3TM domain과 4TM domain 사이의 부분
mc1R-ge3F	5'-GACAACGTCATCGATGTGATGATCTGC-3'	fMC1R ORF의 3TM domain 부분

<33>

<34>

[실시 예 3] 클로닝된 fMC1R 유전자 ORF 부위의 pcDNA3.1(-)Hygro와의 재조합에 의한 포유동물 세포주에 발현 가능한 발현벡터 클로닝 완성

<35>

RACE 클로닝을 통해 완성된 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 부위를 동물세포주에 발현 가능한 발현벡터로 완성하기 위하여 도 7에 나타난 구조의 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터의 제한효소(Xho I, Hind III) 절단부위에 클로닝을 하였다. 먼저, 표 4의 fMC1R 유전자의 상위부분과 하위부분에 해당하는 프라이머를 제작하였으며, 이들 프라이머의 상위부위에는 제한효소(프라이머 1; Xho I, 프라이머 2; Hind III) 절단부위에 해당하는 염기서열을 지니고 있다.

<36>

프라이머 1과 프라이머 2를 이용하여 fMC1R 유전자를 증폭하고, 증폭된 fMC1R 유전자와 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터를 제한효소(Xho I, Hind III)로 처리하여 각각 제한효소 절단부위가 노출되게 하였다.

<37>

도 8은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC1R 발현벡터의 지도를 나타낸 것으로, 동물 세포주에서 양식 넓치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자를 안정적으로 발현시키고 선별할 수 있는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 재조합 벡터의 구조를 나타낸다. 그리고 노출된 fMC1R 유전자와 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 끼리 DNA ligase(DNA 라이게즈)라는 효소를 이용하여 연결하여 pcDNA3.1(-)Hygro 벡터 내에 fMC1R 유전자가 삽입되게 하여 도 8에서 처럼 재조합 발현벡터인 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC1R 을 클로닝 하였다.

표 4. pcDNA3.1(-)Hygro-fMC1R 벡터 구성을 위한 프라이머 구성

	염기 서열	비 고
프라이머 1	5'-AACTCGAGCACATTCCTCCATCCT-3'	fMC1R 앞부분에 Xho I부위 첨가
프라이머 2	5'-AAAGCTTATGTGACAGCGCCGAAGCA-3'	fMC1R 뒷부분에 Hind III부위 첨가

<38>

<39>

[실시예 4] 양식넓치 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 발현 특성

<40>

양식넓치의 뇌에서 분리된 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 발현양상은 Qiagen의 2xQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 양식넓치의 각각의 조직에서 분리된 RNA에서 cDNA를 합성하여 분석이 되었다.

<41>

먼저 기존의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자에 대하여, 하기 표 5의 프라이머를 이용하여 정량중합효소연쇄반응(real time PCR)을 수행하여, 하기의 프라이머에 대한 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 PCR 사이클 수에 나타난 발색 정도에 대한 검량선을 작성하여 정량화를 시도한다.

<42>

그리고 양식넓치의 각각의 조직 (간, 신장, 근육, 난소, 정소, 아가미, 뇌, 표피, 심장, 대장 등)에서 분리한 RNA의 cDNA를 주형으로 하기의 프라이머를 이용하여 정량중합효소연쇄반응(real time PCR)을 수행하여 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 발현 양상을 정량화하였다.

<43>

도 9는 본 발명의 주체가 되는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자(fMC1R)가 양식넓치의 조직내에서의 발현 양상을 그래프로 나타낸 결과와 같이, 양식넓치의 fMC1R 유전자의 발현은 근육을 제외한 거의 대부분의

조직에서 발현이 되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 fMC1R 유전자의 특징적인 기능인 피부색조절과 관련하여 지느러미를 포함한 표피에서 fMC1R의 발현 양상을 확인할 수 있었으며, 이것은 fMC1R의 기능에 일치하는 유전자임을 나타내며 이 유전자를 이용하여 모색이나 피부색 조절기작에 이용할 수 있는 근거를 마련하였다.

표 5. fMC1R 유전자 발현 양상을 확인하기 위한 Real Time-PCR 용 특이적 프라이머

프라이머	염기 서열	비 고
forward	5'-GGT GGA GAA CAT CCT GGT GAT TCT GGC-3'	fMC1R 395bp product를 증폭시키는 fMC1R 유전자의 특이적인 염기서열
reverse	5'-CGG TGT GGT ACA CGA TGA AGA GGA TGC-3'	

<44>

<45> 상기와 같이 본 발명은 비록 상기의 실시 예에 한하여 설명하였지만 여기에만 국한된 것은 아니며 본 발명의 범주를 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능하다.

<46> 상기의 실험 예를 종합하여 그 결과를 종합해보면,

<47> 도 1의 서열을 지닌 fMC1R 유전자는 도 4의 클로닝 방법과 도 6의 유전체 구성 확인을 통해 도 1의 906개의 DNA 염기서열을 지닌 유전자로서 도 2의 301개의 아미노산 서열을 부호화하고 있으며, 도 3과 도 4의 결과로서 일반적으로 다른 생물에서 확인 가능한 피부색 조절에 관여하는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1(fMC1R) 기능을 지닌 유전자로 확인되었다.

<48> 또한 도 4의 다른 생물과의 상동성 비교를 통해 도 5에서 처럼 세포막내의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 세포막내의 구성을 파악하였고, 도 9의 결과로서 피부에서의 fMC1R 유전자의 발현유무를 확인함으로써 피부 색조절에 관여하는 수용체임을 알 수 있었다. 이를 통해 동물 세포주에서 발현가능한 도 8의 재조합 발현백터를 완성하여 어류에서 피부색조절과 스트레스 해소에 관한 연구가 가능하게 되었다.

<49> 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

<50> 이상에서 보여준 바와 같이 본 발명은 멜라닌세포 자극호르몬과 결합하여 색소 세포내에서 색소 침착 및 색 조절 효과를 지니는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자는 동물에서는 다양하게 분리 확인되었으나 어류에서 많은 종들에 있어서 확인이 되지 않고 있어 본 발명의 양식업치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (MC1R)의 확인과 구성은 어류에 있어서 색소 조절기작에 중요한 기능을 가지고 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 구성을 확인할 수 있었다. pcDNA3.1(-)Hygro 벡터와의 재조합을 통한 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자의 형질 전환체의 구성은 다양한 동물 세포주에서 표피색조절과 더불어 다양한 신호전달 기능을 확인할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1 은 906개의 DNA 염기서열로 구성된 양식납치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자(fMC1R)의 서열을 나타낸 것이다.

<2> 도 2 는 도 1 의 DNA 염기서열을 부호화하여 양식납치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 301개의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

<3> 도 3 은 양식납치의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 아미노산 서열을 복어, 얼룩말고기(zebrafish), 생쥐, 그리고 인간의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1의 서열과 상동성을 비교한 것이다.

<4> 도 4 는 본 발명의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (fMC1R)의 5' -RACE와 3' -RACE PCR 수행 결과와 구성의 도시화와 젤 사진을 표시한 것이다.

<5> 도 5 는 본 발명의 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (fMC1R)의 세포막내 구성도를 도시화 한 것이다.

<6> 도 6 은 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자 (fMC1R)의 유전체 구성에 대한 젤 사진과 구조를 도시화 한 것이다.

- <7> 도 7 은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.
- <8> 도 8 은 본 발명의 pcDNA3.1(-)Hygro-fMC1R 발현벡터의 지도를 나타낸 것이다.
- <9> 도 9 는 본 발명의 주체가 되는 멜라노코르틴(melanocortin) 수용체 1 유전자(fMC1R)가 양식넙치의 조직내에서의 발현 양상을 나타낸 그래프이다.

도면

도면1

```

ATGGACGACA ACGACACGAA CTCTACCGGC GGTGAGCGAT ACTCTCTGGG CTGCGTGCAG ATCCGCATCC      70
CGCAGGAGCT CTTCCTGGCG CTGGGGCTCA TCAGCCTGGT GGAGAACATC CTGGTGATTC TGGCCATCAT      140
CAAGAACCAG AACCTGCACT CGCCCATGTA CTACTTCATC TGCTGCCTCG CCGTGTCCGA CATGCTCGTC      210
AGCGTCAGTA ACGTGGTGGA GACCAAGTTC ATGCTTCTCC ACGACCACGG CCTGCTGGAC GTGCACCCAG      280
GTATGCTGCG CCACCTGGAC AACGTCATCG ATGTGATGAT CTGCAGCTCC GTGGTGTCTT CGCTCTCTCT      350
CTTGTGCACC ATCGCCGCGG ACCGCTACAT CACCATCTTT TACGCGCTGC GCTACCACAG CATCATGACC      420
ACGCAGCGCG CCATCGCCAT CATCGTGGTG GTGTGGCTGG CCAGCCTCGC CTCCAGCATC CTCTTCATCG      490
TGTACCACAC CGATAACGCG GTCATCGTGT GCCTCGTGAC CTCTTCTGCG ACCACGCTGG TGTTCACGCG      560
CGTGTGTGAT CTGCACATGT TCCTCCTGGC GCACGTGCAC TCGCGACGCA TCATGGCAAT CCATAAAAGC      630
AGGCGCCAGA CCACGAGCAT GAAGGGGCGG ATCACCCTCA CCATCTTGCT CGGGGTCTTC ATTTTATGCT      700
GGGGCCCATTT CTTCCTCCAT CTCATCCTCA TCCTCACCTG TCCACCTGCG CCCTTCTGCA ATTGTTTCTT      770
CCGAAACTTTT AACCTTTTCC TCATCCTCAT CATCTGCAAC TCCCTCATCG ACCCGCTCAT CTACGCGTAC      840
CGGAGCCAGG AGCTGCGTAA AACGCTCCAG GAGTTGGTCC TGTGTTCTTG GTGCTTCGGC GTCTGA      906

```

도면2

```

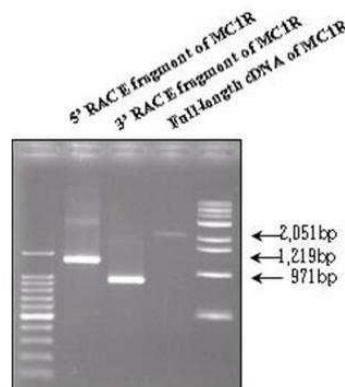
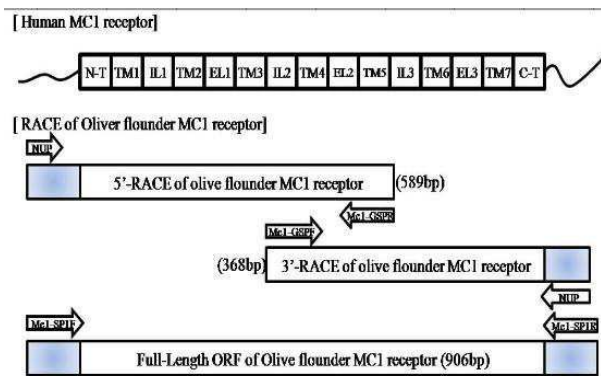
MET Asp Asp Asn Asp Thr Asn Ser Thr Gly Gly Glu Arg Tyr Ser Leu Gly Cys Val Gln 20
Ile Arg Ile Pro Gln Glu Leu Phe Leu Ala Leu Gly Leu Ile Ser Leu Val Glu Asn Ile 40
Leu Val Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Arg Asn Leu His Ser Pro MET Tyr Tyr Phe Ile 60
Cys Cys Leu Ala MET Ser Asp MET Leu Val Ser Val Ser Asn Val Val Glu Thr MET Phe 80
MET Leu Leu His Asp His Gly Leu Leu Asp Val His Pro Gly MET Leu Arg His Leu Asp 100
Asn Val Ile Asp Val MET Ile Cys Ser Ser Val Val Ser Ser Leu Ser Phe Leu Cys Thr 120
Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Arg Tyr His Ser Ile MET Thr 140
Thr Gln Arg Ala Ile Ala Ile Ile Val Val Val Trp Leu Ala Ser Leu Ala Ser Ser Ile 160
Leu Phe Ile Val Tyr His Thr Asp Asn Ala Val Ile Val Cys Leu Val Thr Phe Phe Cys 180
Thr Thr Leu Val Phe Asn Ala Val Leu Tyr Leu His MET Phe Leu Leu Ala His Val His 200
Ser Arg Arg Ile Met ala Phe His Lys Ser Arg Arg Gln Thr Thr Ser MET Lys Gly Ala 220
Ile Thr Leu Thr Ile Leu Leu Gly Val Phe Ile Leu Cys Trp Gly Pro Phe Phe Leu His 240
Leu Ile Leu Ile Leu Thr Cys Pro Thr Ser Pro Phe Cys Asn Cys Phe Phe Arg Asn Phe 260
Asn Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ile Cys Asn Ser Leu Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr 280
Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Leu Gln Glu Leu Val Leu Cys Ser Trp Cys Phe Gly 300
Val                                                                                   301

```

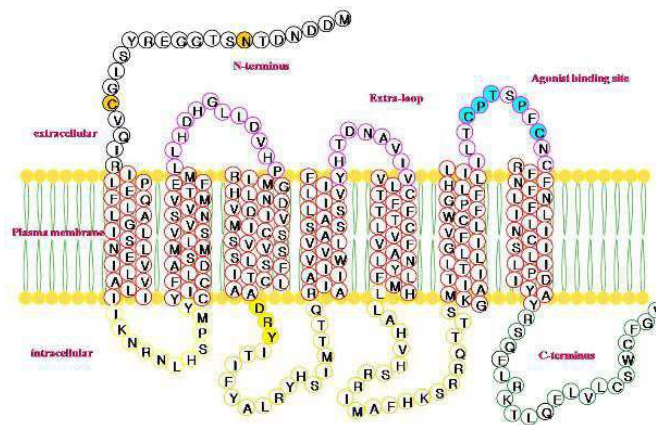
도면3

Fj	MC1R	MDDN-----DTNST-----GGERYSLGCYQIRIPQELFL	29
Fr	MC1R	MDDN-----ETNLT-----NGEQ-NLGCYQILIPQELFL	28
Dr	MC1R	MNDSSRHFFSMKHMDYMYNADNNITLNSNST-----ASDINYTGIAQIMIPQELFL	51
Mm	MC1R	MSTQEPQKSLLG-----SLNSN--ATSHLGLATNQSEPWCLYYSIPDGLFL	44
Hm	MC1R	MAYQGSQRRLG-----SLNSTPTAIPQLGLAANQTGARCLEVSI SDGLFL	46
* : * : *			
Fj	MC1R	ALGLISLVENILVILAIIKKNRNHSPMYFFICCLAMSDMLVSYSNVVETFMLLHDHGLL	89
Fr	MC1R	TLGLISLVENILVILAIIKKNRNHSPMYFFICCLALSDMLVSYSNVVETFMLLNDHGLM	88
Dr	MC1R	MLGLISLVENILVYVAIIKKNRNHSPMYFFICCLAYADMLVSYSNVVETFMLLTEHGLL	111
Mm	MC1R	SLGLYSLVENVLYVIAITKKNRNHSPMYFFICCLALSDLMVSYSIVLETTIILLLEVGI	104
Hm	MC1R	SLGLYSLVENALVYVIAITKKNRNHSPMYCFICCLALSDLLVSGSNVLETAYILLLEAGAL	106
** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
		TM1	TM2
Fj	MC1R	DVHPGMLRHLDNVIDVMICSSVYSSLSFLCTIAADRYITIFYALRYHSIMTTORAI	149
Fr	MC1R	DMYPGMLRHLDNVIDVMICSSVYSSLSFLCTIAADRYITIFYALRYHSIMTTPRAIT	148
Dr	MC1R	LYTAKMLQHLDNVIDIMICSSVYSSLSFLCTIAADRYITIFYALRYHSIMTTORAYGI	171
Mm	MC1R	YARYALVQQLDNLIDVLCGSMYSSLCFLGIIAIDRYISIFYALRYHSIVTLPRARRAY	164
Hm	MC1R	VARAAVLQQLDNVIDVITCSSLSSLCFLGAIAYDRYISIFYALRYHSIVTLPRARRAYA	166
: : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
		TM3	
Fj	MC1R	YVWLASLASSILFIVYHTDNAYIVCLVTFFCTTLVFNAVL YLHMFLLAHVHSRRI	209
Fr	MC1R	IVWCASIASLILFIVYHTDNAYIVCLVTFFCTTLVFNAVL YVHMFVLAHVHSRRI	208
Dr	MC1R	YVWLASITSSSLFIVYHTDNAYIACLVTFFGYTLVFTAYL YLHMFILAHVHSRRI	231
Mm	MC1R	GIHMYSIVSSTLFIYYKHTAYLLCLVTFFLAMLALMAILYAHMFTRACQHYQGI	224
Hm	MC1R	AIWYASYVFTLFIAYYDHYAVLLCLVYFFLAMLVLMAYL YVHMLARACQHAQGI	226
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
		TM4	TM5
Fj	MC1R	SRR---QTSMKGAITLTILLGVFICWGPFFLHLILILTCPTSPFCNCFRNFNLFLIL	266
Fr	MC1R	NRR---QSTSMKGAITLTILLGVFICWGPFFLHLILILTCPTSYFCNCYFRNFNLFLIL	265
Dr	MC1R	SRR---QTSMKGAITLTILLGVFICWGPFFLHLILILTCPTNPYCKCYFHFNLFLIL	288
Mm	MC1R	RRRSIRQGFCLKGAATLTILLGIFFLCWGPFFLHLLIVLCPQHPYCSCIFKNFNLFLIL	284
Hm	MC1R	RQRPVHQGFGLKGAYTLTILLGIFFLCWGPFFLHLTLIVLCPQHPYCSCIFKNFNLFLAL	286
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
		TM6	TM7
Fj	MC1R	IICNSLIDPLIYAYRSQELRKTQLQELVLCSWCFGY	301
Fr	MC1R	IICNSLIDPLIYAYRSQELRKTQLQELVLCSWCFGP	300
Dr	MC1R	IICNSLIDPLIYAYRSQELRKTKEIFCSWCFAY	323
Mm	MC1R	IVLSSYVDPLIYAFRSQELRMTLKEYLLCSW	315
Hm	MC1R	IICNAIIDPLIYAFHSQELRRTLKEYLTCW	317
* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			

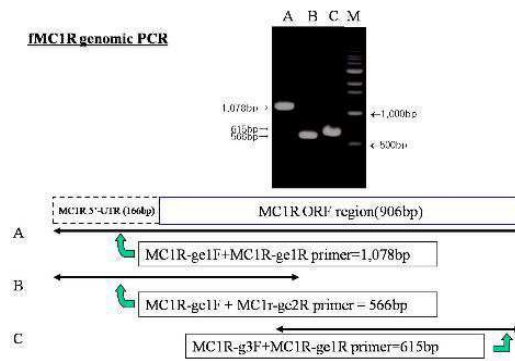
도면4



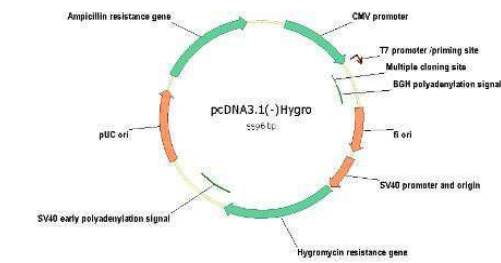
도면5



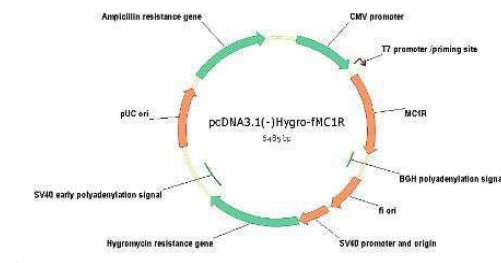
도면6



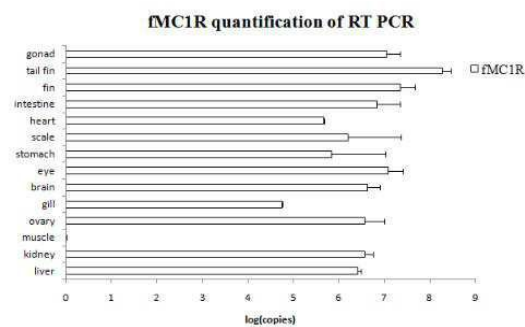
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
 <120> Melanocortin receptor 1 gene of Olive flounder , Paralichthys
 olivaceus

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 906
 <212> DNA
 <213> fMC1R

<400> 1
 atggacgaca acgacacgaa ctctaccggc ggtgagcgat actctctggg ctgcgtgcag 60
 atccgcatcc cgcaggagct ctctctggcg ctggggetca tcagcctggt ggagaacatc 120
 ctggtgattc tggccatcat caagaaccgc aacctgcact cgcccatgta ctacttcac 180
 tgctgcctcg ccgtgtccga catgctcgtc agcgtcagta acgtggtgga gaccaagttc 240
 atgctttccc acgaccacgg cctgctggac gtgcaccag gtatgctgcg ccacctggac 300
 aacgtcatcg atgtgatgat ctgcagctcc gtggtgtcct cgctctcctt cttgtgcacc 360
 atcgccgcgg accgctacat caccatcttt tacgcgtgc gctaccacag catcatgacc 420
 acgcagcgcg ccatcgccat catcgtggtg gtgtggctgg ccagcctcgc ctccagcatc 480
 ctcttcacg tgtaccacac cgataacgcg gtcacgtgt gctcgtgac ctctctctgc 540
 accacgtgg tgttcaacgc cgtgttgtat ctgcacatgt tctcctggc gcacgtgcac 600
 tcgcgacgca tcatggcatt ccataaaagc aggcgccaga ccacgagcat gaagggggcg 660
 atcacctca ccatcttgct cggggtcttc attttatgct ggggcccatt ctctctccat 720

ctcatctca tctcacctg tcccacctgc ccttctgca attgtttctt cggaaacttt 780
aaccttttcc tcatctcat catctgcaac tccctcatcg acccgctcat ctacgcgtac 840
cggagccagg agctgcgtaa aacgctccag gatttggtcc tgtgttcttg gtgcttcggc 900
gtctga 906

<210> 2
<211> 301
<212> PRT
<213> Melanocortin receptor 1 : MC1R

<400> 2
Met Asp Asp Asn Asp Thr Asn Ser Thr Gly Gly Glu Arg Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Gly Cys Val Gln Ile Arg Ile Pro Gln Glu Leu Phe Leu Ala Leu Gly
20 25 30

Leu Ile Ser Leu Val Glu Asn Ile Leu Val Ile Leu Ala Ile Ile Lys
35 40 45

Asn Arg Asn Leu His Ser Pro Met Tyr Tyr Phe Ile Cys Cys Leu Ala
50 55 60

Met Ser Asp Met Leu Val Ser Val Ser Asn Val Val Glu Thr Met Phe
65 70 75 80

Met Leu Leu His Asp His Gly Leu Leu Asp Val His Pro Gly Met Leu
85 90 95

Arg His Leu Asp Asn Val Ile Asp Val Met Ile Cys Ser Ser Val Val
100 105 110

Ser Ser Leu Ser Phe Leu Cys Thr Ile Ala Ala Asp Arg Tyr Ile Thr
115 120 125

Ile Phe Tyr Ala Leu Arg Tyr His Ser Ile Met Thr Thr Gln Arg Ala
130 135 140

Ile Ala Ile Ile Val Val Val Trp Leu Ala Ser Leu Ala Ser Ser Ile

145	150	155	160
Leu Phe Ile Val Tyr His Thr Asp Asn Ala Val Ile Val Cys Leu Val			
	165	170	175
Thr Phe Phe Cys Thr Thr Leu Val Phe Asn Ala Val Leu Tyr Leu His			
	180	185	190
Met Phe Leu Leu Ala His Val His Ser Arg Arg Ile Met Ala Phe His			
	195	200	205
Lys Ser Arg Arg Gln Thr Thr Ser Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr			
	210	215	220
Ile Leu Leu Gly Val Phe Ile Leu Cys Trp Gly Pro Phe Phe Leu His			
	225	230	235
Leu Ile Leu Ile Leu Thr Cys Pro Thr Ser Pro Phe Cys Asn Cys Phe			
	245	250	255
Phe Arg Asn Phe Asn Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ile Cys Asn Ser Leu			
	260	265	270
Ile Asp Pro Leu Ile Tyr Ala Tyr Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr			
	275	280	285
Leu Gln Glu Leu Val Leu Cys Ser Trp Cys Phe Gly Val			
	290	295	300