



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0122460
(43) 공개일자 2021년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/073 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0604 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0039615

(22) 출원일자 2020년04월01일

심사청구일자 2020년04월01일

기술이전 회차 : 기술양도

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

공일근

경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 1802호(이현동, 이현하이클래스웰가아파트)

(74) 대리인

위병갑

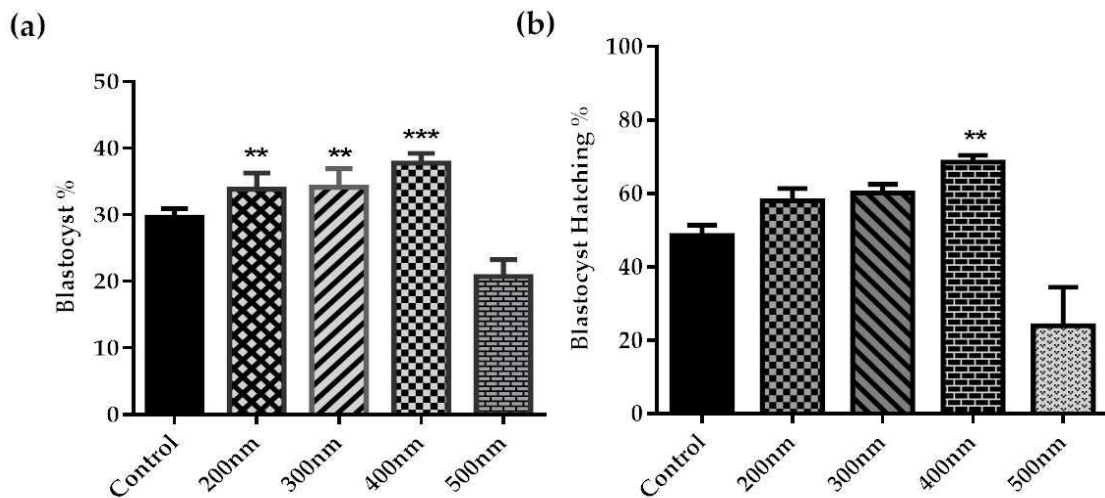
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 6-Bio를 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 신호전달물질인 Wnt/ β -카테닌을 활성화시키는 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime, 6-Bio)을 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법에 관한 것으로, 본 발명의 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물은 포유동물 배아의 Wnt/ β -카테닌 신호 전달 경로를 활성화를 통해 PPAR δ 의 발현을 증가시키고 β -카테닌과의 PPAR δ 결합을 촉진하여 배아의 배반포 단계로의 발달 및 부화율을 향상시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545019709
과제번호	117029033SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발
연구과제명	산업화 적용위한 OPU유래 전주기 관련기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106452
과제번호	2020R1A2C2006614
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구
연구과제명	항노화 유전자치료를 통한 노령의 공란우에서 효과적인 수정란 생산체계의 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함 시 Wnt 활성을 자극하는 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)의 농도는 200 내지 400 nM 인 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 배지는 IVM (in-vitro maturation) 배지 및 SOF (Synthetic Oviductal Fluid) 배지 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 배아 발달은 체외 성숙 단계에서 Wnt/ β -카테닌 경로의 활성화에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 부화율 향상은 체외 배양 단계에서 Wnt/ β -카테닌 경로의 활성화에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 β -카테닌 (β -catenin) 및 PPAR δ 의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 Oct4, c-Myc, Cox-2, Cpt1a 및 Pdk4의 발현을 증가시키고 Cdx2의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 배지 조성물은 영양막세포 (trophoblast)의 침투 능력을 향상 및 배아의 세포질 내 지질 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물.

청구항 10

난자를 준비하는 단계;

6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함하는 체외성숙용 배지에서 상기 난자를 체외성숙시키는 단계;

상기 성숙된 난자를 정자와 수정시키는 단계; 및

6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함하는 체외배양용 배지에서 상기 수정란을 체외배양시키는 단계;를 포함하는, 수정란 체외배양 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 6-Bio를 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 신호전달물질인 Wnt/ β -카테닌을 활성화시키는 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime, 6-Bio)을 포함하는 포유동물 배아 발달 향상용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 축산업 분야에서 in vitro 배아 생산과 결합된 OPU (Ovum pick-up) 기술은 점점 더 상업화가 이루어져 가고 있다. 따라서 OPU-유래 배아의 착상율을 증가시키는 것은 성공적인 보조생식기술 (assisted reproductive technology, ART)의 중요한 목표이다. 태반 발달 (placental development)의 최초 단계는 착상 (implantation) 과정에서 태아의 배반포의 영양외배엽 (trophectoderm, TE) 세포가 수용적인 모계의 자궁벽에 붙어서 침입할 때 일어난다. TE 세포가 모계의 자궁벽을 완전히 침입할 수 있는 능력에 결함이 발생한 것을 착상 실패의 주된 이유로 보고 있다.

[0003] 배아 냉동보존은 ART의 중요한 측면이며, 해동 (thawing) 이후 배아의 높은 생존율을 보장하는 것을 목표로 한다. 배아 냉동보존 기술의 3개의 주요 카테고리 는 완만동결 (slow freezing), 급속동결 (ultra-rapid freezing), 및 유리화 (vitrification)이다. 완만동결은 세포 외부 및 내부 공간 사이의 유체의 교환으로 인해 평형동결 (equilibrium freezing)로 알려져 있으며, 세포에 심각한 삼투 현상이나 변형을 일으키지 않는 안전한 방법이다. In vivo-유래 및 In vitro-유래 소 배아 모두에서 세포내 지질 함량은 낮은 해동 후 (post-thaw) 생존율의 원인이 되기 때문에 냉동보존의 성공률은 세포질의 지질 함량과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 보인다.

[0004] 한편, Wnt는 세포확산, 세포극성, 세포운명 결정 등 수많은 생물학적 기능을 조절하는 분비된 당단백질이다. Wnt 리간드 (ligand)는 서로 다른 생물학적 반응을 시작하는 세 개의 세포 내 신호전달 캐스케이드 (signalling cascade)들을 작동시킬 수 있다. 표준 Wnt 경로는 전사 보조활성인자 β -카테닌 (β -catenin)에 의해 매개된다.

Wnt 경로에서 β -카테닌은 핵심 전사 보조활성인자이다. Wnt-off 상태 동안, 세포질 β -카테닌은 β -카테닌 파괴 복합체 (β -catenin destruction complex)에 의한 인산화와 유비퀴틴화로 인해 분해된다. 이러한 분해는 세포질 β -카테닌의 감소로 이어진다. Wnt-on 상태 동안, Wnt는 β -카테닌 파괴 복합체 (β -catenin destruction complex)의 분리를 촉진하고 β -카테닌의 분해를 방지한다. 결과적으로, β -카테닌의 안정화와 핵으로의 전이로 이어진다. 핵에서 β -카테닌은 TCF/LEF 전사 인자와 결합하고 Wnt 표적 유전자의 발현을 조절한다(도 22 참조).

[0005] 초기 배아 발달 기간 동안 Wnt 신호 전달의 정확한 역할에 대해서는 연구된 바가 없다. 이에 본 발명자는 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로의 강력한 작용제인 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime, 6-Bio)을 배지에 첨가하여 그것들이 포유동물 배아 발달에 미치는 유용한 효과를 in vitro로 실험하였다. 그 결과, 초기 배아에서 Wnt 활성의 외인성 자극은 PPAR δ 발현을 상향 조절하고 β -카테닌과의 PPAR δ 결합을 촉진시켰다. 이러한 결합은 여러 하류영역의 Wnt 표적 유전자 발현을 조절하여 배반포 발달 및 부화를 증가시킨다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 포유동물의 배아 발달 또는 부화를 향상용 배지 조성물을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 포유동물의 배아 발달 또는 부화를 향상시키는 수정란 체외배양 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 포유동물의 배아 발달 또는 부화를 향상용 배지 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)은 IVM (in vitro maturation) 배지 또는 SOF (Synthetic Oviductal Fluid) 배지에 추가되는 것일 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)은 Wnt 활성을 자극하는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 배지 조성물은 영양막세포 (trophoblast)의 침투 능력을 향상시키고, 배아의 세포질 내 지질 함량을 감소시키는 것일 수 있다.

[0012] 이어서, 본 발명은 난자를 준비하는 단계; 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 체외 성숙용 배지에서 상기 난자를 체외성숙 시키는 단계; 상기 성숙된 난자를 정자와 수정시키는 단계; 및, 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 체외배양용 배지에서 상기 수정란을 체외배양 시키는 단계;를 포함하는 수정란 체외배양 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 포유동물의 배아 발달 또는 부화를 향상용 배지 조성물은 포유동물 배아의 Wnt/ β -카테닌 신호 전달 경로를 활성화를 통해 PPAR δ 의 발현을 증가시키고 β -카테닌과의 PPAR δ 결합을 촉진하여 배아의 배반포 단계로의 발달 및 부화를 향상시키는 효과가 있다. 이러한 효과는 OPU 유래 우량한우 수정란 대량생산에 의한 우량한우 개량기술로 적용될 수 있다.

[0014] 이상에서의 본 발명에 따른 효과는 상기에 한정되는 것은 아니며, 기타 본 발명의 효과들은 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1A, B는 6-Bio 처리 농도에 따른 소 배반포 발달을 및 부화를 나타낸 그래프이다. ** p < 0.01; *** p < 0.001

도 2는 6-Bio 처리 농도에 따른 Wnt 관련 유전자의 qRT-PCR 분석결과를 나타낸 그래프이다. ** p < 0.01; ***

$p < 0.001$

도 3A, B는 착상 전 단계 동안 6-Bio 처리 유무에 따른 활성화된 β -카테닌의 면역형광염색결과를 나타낸 사진이다. 빨간색은 β -카테닌, 파란색은 핵을 나타냄.

도 4A, B는 6-Bio 처리 유무에 따른 전분화능 마커 및 계통 지정 마커의 발현을 나타낸 사진이다.

도 5는 6-Bio 처리 유무에 따른 전분화능 마커 및 계통 지정 마커의 면역유도 분석 qRT-PCR 결과를 나타낸 그래프이다. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 6은 PPAPs 패밀리의 6-Bio 처리 유무에 따른 mRNA 발현 분석 결과를 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 7은 PPAR δ 의 소 배아 발달단계 별 RT-PCR 분석 결과를 나타낸 사진이다.

도 8A, B는 소 배아 발달단계에서 6-Bio 처리 유무에 따른 PPAR δ 의 면역형광염색결과를 나타낸 사진이다.

도 9A, B는 소 배반포 발달 단계에서 6-Bio, GSK3787 처리에 따른 배반포 발달 및 부화율을 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 10는 PPAR δ 억제에 따른 c-Myc 및 CyclinD1의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$

도 11는 PPAR δ 억제에 따른 c-Myc, CyclinD1의 면역형광염색 결과를 나타낸 사진이다. 초록색은 PPAR δ , 빨간색은 c-Myc를 나타냄.

도 12A, B는 c-Myc와 PPAR δ 의 공국재화(co-localize) 비율과 면역형광염색 강도를 정량화하여 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 13A, B는 Wnt 활성화에 따른 Cpt1의 mRNA 발현 분석 결과를 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 14는 Wnt 활성화에 따른 Cpt1의 면역형광염색 결과를 나타낸 사진이다.

도 15는 Wnt 활성화에 따른 Cpt1의 면역형광염색 강도를 정량화 하여 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 16은 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 나일 레드(Nile Red) 염색 결과를 나타낸 사진이다.

도 17은 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 나일 레드(Nile Red) 염색 강도를 정량화 하여 나타낸 그래프이다. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 18은 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 명시야상 관찰결과를 나타낸 사진이다.

도 19A, B는 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 평균 침윤 영역 및 이주된 세포의 수를 나타낸 그래프이다. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 20은 β -카테닌과 PPAR δ 의 공국재화(co-localize)를 확인하기 위한 면역형광염색 분석 결과를 나타낸 사진이다. 녹색은 PPAR δ , 붉은색은 β -카테닌, 노란색은 공국재화(co-localize)된 것을 나타냄. 핵은 DAPI로 염색함(파란색). 하단의 magnified는 상단의 박스영역을 확대한 것임.

도 21A, B는 β -카테닌과 PPAR δ 의 평균 형광 강도를 정량화하여 나타낸 그래프이다. * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

도 22는 6-Bio에 의해 활성화되는 Wnt/ β -카테닌 경로를 도식화하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0017] 본 발명은 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)을 포함하는 포유동물의 배아 발달 또는 부화율 향상용 배지 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 “6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime)”은 Wnt 활성을 자극하는 Wnt 작용제를 의미한다. Wnt/ β -카테닌 신호전달은 기관의 발달이나 세포 증식, 형태, 운동성과 세포운명 결

정 등과 같은 다양한 발달 과정을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 세포 증식, 이동, 줄기 세포 재생 및 유전자 안정성의 조절에 중요한 역할을 한다. 본 발명에서는 상기 Wnt/ β -카테닌 경로는 배아 발달의 착상 전 기간 동안 초기 발달 과정에서 매우 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다(도 22 참조).

- [0019] 또한, 상기 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)은 Wnt 활성을 자극하여 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 델타 (peroxisome proliferator-activated receptor-delta, PPAR δ)의 발현을 유도하는 것 일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 델타 (peroxisome proliferator-activated receptor-delta, PPAR δ)는 β -카테닌과 함께 국부화되어 TCF/LEF 전사 인자와 복합체를 형성할 수 있다. 또한, 상기 복합체는 초기 배아 발생을 조절하는 몇몇 Wnt 지정 유전자 발현을 강화시키는 것일 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)의 농도는 200 내지 400 nM일 수 있으며, 바람직하게는 400 nM 일 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)은 IVM (in-vitro maturation) 배지 또는 체외배양용 SOF (Synthetic Oviductal Fluid) 배지에 추가되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 “배아 발달”이란 수정란이 2세포기, 4세포기를 거쳐 배반포 단계에 이르는 것을 의미한다. 상기 배반포는 수정란이 난황을 거둬서 자라는 과정에서 치밀화된 상질배 이후에 배반포강을 형성하여 태아로 분화할 내세포괴 (inner cell mass)와 태반으로 분화할 영양막세포 (trophectoderm)로 구분이 될 정도로 발육된 상태의 수정란을 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 “체외배양”이란 수정란이 체내에서 자라는 상태와 구분되는 방법으로 실험실의 인큐베이터 (incubator)에서 체내 자궁의 환경과 유사한 조건으로 배양하는 일련의 실험실 과정을 의미하는 것으로, 본 발명의 배지 조성물은 이러한 체외배양에 최적화된 배지 조성물이다.
- [0025] 본 발명의 배지 조성물을 적용시킬 수 있는 포유동물 수정란은 인간을 제외한 포유동물의 수정란, 바람직하게는 가축, 더욱 바람직하게는 소의 수정란이다.
- [0026] 또한, 체외에서 배양될 수 있는 수정란이라면, 특별히 제한되지 않으나, 체외배양 시 배발생정지현상을 보이는 수정란을 대상으로 할 수 있으며, 체외수정란 또는 복제수정란 모두에 적용이 가능하고, 바람직하게는 초기 성숙란을 수정시켜 만든 체외수정란을 대상으로 할 수 있다. 여기서 “체외 수정란”이란 난자와 정자를 채취하여 체외에서 수정시킨 것을 말하고, “복제 수정란”은 체세포 공여핵을 유전물질이 제거된 수핵 난자에 주입한 후 물리적 또는 화학적 방법으로 융합시킨 것을 의미한다.
- [0027] 또한, 상기 배아 발달 또는 부화율 향상은 체외 성숙 단계 또는 체외배양 단계에서 Wnt/ β -카테닌 경로의 활성화에 의해 이루어지는 것일 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 배지 조성물은 β -카테닌 (β -catenin) 및 PPAR δ 의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 배지 조성물은 전분화능 마커 (pluripotency maker)와 계통 지정마커 (lineage specification maker)인 Oct4, c-Myc 및 Cox2의 발현을 증가시키고 Cdx2의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 배지 조성물은 지방산 산화 대사의 조절인자인 Cpt1a 및 Pdk4의 발현을 증가시켜 지방산 산화 대사를 촉진하는 것일 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 배지 조성물은 상기 배지 조성물은 영양막세포 (trophoblast)의 침투 능력을 향상시키고, 배아의 세포질 내 지질 함량을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 배지 조성물은 배반포의 착상 잠재력을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0033] 이어서, 본 발명은 난자를 준비하는 단계; 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함하는 체외성숙용 배지에서 상기 난자를 체외성숙 시키는 단계; 상기 성숙된 난자를 정자와 수정시키는 단계; 및, 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함하는 체외배양용 배지에서 상기 수정란을 체외배양 시키는 단계;를 포함하는 수정란 체외배양 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 수정란 체외배양 방법은 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3' -oxime)을 포함하는 배지에서 포유동물의 난자를 성숙시키고, 수정란을 배양시켜 수정란의 배반포 발달률을 향상시키고 부화율을 증가시킴으로써, 수정란 이식이 용이하도록 개선시키는 것일 수 있다. 본 발명의 체외배양 방법을 통해 배양될 수 있는

포유동물 수정란은 체외배양에서 배양될 수 있는 수정란이라면, 특별히 제한되지 않으나, 체외배양 시 배발생정지현상을 보이는 수정란을 대상으로 할 수 있으며, 체외수정란 또는 복제수정란 모두 가능하다. 또한, 이러한 체외배양 방법은 특히 체외수정란의 대량생산에 이용될 수 있다.

[0035] 결론적으로, 본 발명은 Wnt 작용제인 6-브로모인디루빈-3'-옥심(6-bromoindirubin-3'-oxime)의 첨가가 PPAR δ 발현을 증가시키고 표준 Wnt 경로에서 수정란 배반포 (blastocyst) 형성 및 부화 능력을 향상 시키는 것을 확인하였다. 특히, Wnt 자극에 의한 PPAR δ 발현의 활성화는 세포 발달 및 지방산 산화(FAO) 대사를 향상시켜 배아 발달 및 부화를 개선시키는 것을 확인하였다.

[0037] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화 하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0039] <실시예 1> 실험 재료 및 방법

[0040] 1-1 난모세포의 수집

[0041] 모든 수술 절차 및 실험은 경상대학교 동물 윤리 위원회가 승인한 규칙과 법령에 따라 실시되었다 (승인 ID: GAR-110502-x0017; 날짜: 02-05-2011). 한우 (대한민국 경상남도 진주시)의 난소를 지방 도축장에서 입수하였다. 난소를 37.5 °C에서 생리 식염수 (0.9% NaCl)에 넣고, 도살 후 2시간 이내에 실험실로 옮겼다. 난소를 신선한 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)로 세척하고 진공 펌프에 부착된 18-게이지 바늘을 사용하여 직경 2-8 mm의 여포로부터 난구-난모세포 복합체 (cumulus-oocyte complexes, COCs)를 회수하였다. 흡입된 난구-난모세포 복합체 (COCs)를 TL-HEPES 배지 (6.662 g/L 염화나트륨, 0.238 g/L 염화칼륨, 0.168 g/L 중탄산 나트륨, 0.040 g/L 중인산 나트륨, 0.85 g/L 락트산 나트륨, 0.101 g/L 염화 마그네슘, 0.101 g/L 염화칼슘, 2.383 g/L HEPES, 1 μ L/mL 페놀레드, 100 IU/mL 페니실린 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신)을 함유하는 dish로 배출시켰다. 그 후, 밀집 난구세포 (compact cumulus cells)층을 갖는 난모세포를 임체 현미경을 사용하여 수집하고, 선별된 난구-난모세포 복합체 (COCs)를 TL-HEPES 배지에서 3회 세척하였다.

[0043] 1-2 체외성숙

[0044] 상기 실시예 1-1의 세척된 난구-난모세포 복합체 (COCs)를 10% (v/v) 소 태아 혈청 (FBS), 1 μ g/mL 에스트라디올-17 β , 10 μ g/mL 여포 자극 호르몬, 0.6 mM 시스테인 및 0.2 mM 피루브산 나트륨을 포함하는 tissue culture media-199로 구성된 700 μ L의 체외성숙용 IVM (in-vitro maturation) 배지로 세척하였다. 세척된 난구-난모세포 복합체 (COCs)를 IVM (in-vitro maturation) 배지를 포함하는 NUNC 4-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)로 옮겨 38.5 °C에서 22 내지 24시간 동안 5% CO₂의 가습 조건에서 배양하였다.

[0046] 1-3 체외수정

[0047] 체외성숙 22시간 후, 성숙한 난구-난모세포 복합체는 한우 불스 (KPN-917, NongHyup, Agribusiness Group Inc, South Korea)에서 냉동 후 해동된 (frozen-thawed) 정자로 수정시켰다. 먼저 소의 정액 빨대를 38°C에서 1분간 물에 녹이고 10 mL DPBS에서 세척한 후 원심분리 (750 $\times$ g, 5분간)하였다. 튜브 바닥에 형성된 펠렛은 IVF (in vitro fertilization) 배지 (6 mg/mL BSA, 22 mg/mL 피루브산나트륨, 페니실린 100 IU/mL 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 티로이드락테이트 (Tyrode lactate)용액)를 준비된 10% (w/v) 헤파린 (heparin)에 재현탁 (re-suspended) 한 후, 15분 동안 5% CO₂를 함유한 가습한 대기에서 38 °C로 배양하였다. 정자는 IVF 배지에 희석시켜 최종 농도를 1 mL 당 1-2 $\times 10^6$ 의 최종 농도로 만들었다. 50~55 개의 그룹을 이룬 성숙 난구-난모세포 복합체 (COCs)를 4-well dish로 옮기고 700 μ L의 IVF 배지에서 수정시켰다. 각 dish는 5% CO₂ 및 38 °C의 가습 조건에서 18 내지 20 시간 동안 배양하였다.

[0049] 1-4 체외배양

[0050] 수정 후, 반복 파이펫팅 (pipetting)으로 난구세포를 제거하여 접합자 (presumptive zygotes)를 8일간 배양하였다. 배반포는 44 $\mu\text{g/mL}$ 피루브산 나트륨 ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$), 14.6 $\mu\text{g/mL}$ 글루타민, 10 IU/mL 페니실린, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신, 3 mg/mL FBS 및 310 $\mu\text{g/mL}$ 글루타티온이 보충된 SOF (Synthetic Oviductal Fluid) 배지에서 배양하였다. 8 일째에, 배반포를 1X PBS에서 3 회 세척하고 4 % 파라포름알데히드에 고정한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다. 유전자 발현 분석을 위해, 배반포를 nuclease free water로 세척 한 후, 액체 질소에 동결 (snap-frozen)시키고 1.5 mL 에펜도르프 (eppendorf) 튜브에서 -80°C 에 보관하였다.

[0052] 1-5 RNA 추출 및 (q)RT-PCR 분석

[0053] 8일째의 냉동 후 해동된 배반포 (frozen-thawed blastocysts) ($n = 5$)에서 RNA 분리 키트 (PicoPure, ThermoFisher)를 사용하여 전체 RNA를 분리했다. RNA 농도 및 순도는 NANO DROP 2000c machine (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 확인하였다. 이후 cDNA 합성과 (q)RT-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction)은 각각 iScript Reverse transcriptase (BioRad, Cat # 1708891)와 SYBR Green master mix (BioRad, Cat # 170-8882AP)를 사용하여 수행했다. PCR 증폭은 5분 동안 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 초기 변성 후 30초 동안 94 $^{\circ}\text{C}$, 30초 동안 58 $^{\circ}\text{C}$, 30초 동안 72 $^{\circ}\text{C}$ 의 40 cycle로 수행하였다. 모든 유전자의 상대적 mRNA 표현은 GAPDH로 정규화 (normalization)하였다. qRT-PCR에 사용한 프라이머는 표 1에 나타내었다.

표 1

Gene Name	Forward	Reverse
GAPDH	TTCAACGGCACAGTCAAGG	ACATACTCAGCACCAGCATCAC
GSK3 β	AGTATACACCAACTGCCCGACT	TGAAGTTGAAGAGTGCAGGTGT
β -catenin	AATCCGAGCTGGACCTCAATGACA	TATCATGTCCAAGCAGCCCGAGAA
Axin2	TGCTTATCTCTCCGGACTTTC	CGCTTTGGCTACTCGTAAAGTT
c-Myc	TTTTCTCCGTCCTCTGACTCTC	TTCTCATCCTCTGTGTCTTCC
CyclinD1	TGAAGGAGACCATTCCCTTG	CCACTTGAGCTTGTTACCA
PPAR α	ATATTTCCCTCTTTGTGGCTGC	ATGGTTGTTCTGTAGGTGGAGT
PPAR γ	GACTTCTCCAGCATTTCCACTC	ATACAGGCTCCACTTTGATTGC
PPAR δ	AGAGCACTCACTTCCTTCCAG	GTGCGGTTCTTCTCTGGATT
Cpt1a	GAGGGAGACTTTACACGGATGA	AGATGTATTCTCCACCAGTC
Pdk4	GGTGATTGTGTCTTGGGGAAA	AATTATCCATCACAGGCGTTGG

[0055]

[0057] 1-6 면역형광분석

[0058] 먼저, 다른 발달 단계 배아와 배반포 세포는 4 % (w/v) PFA (paraformaldehyde) 용액으로 고정시키고, 고정된 배아와 배반포 세포를 PBS/PVP로 세척한 다음 10 분 동안 프로테이나아제K (1:1000)를 처리하였다. PBS/PVP로 세척한 후, 배아와 배반포 세포를 0.5 % 트리톤 X-100으로 15분 동안 투과시켰다. 차단 용액 (3 % 혈청 알부민 + 10 % FBS)에서 RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 차단 후, 배반포를 1 차 항체와 함께 실온에서 밤새 인큐베이션 하였다. PBS/PVP로 세척 한 후, 이들은 FITC 또는 TRIC와 접합된 2 차 항체와 함께 RT에서 1 시간 동안 배양

되었다. 배반포를 PBS/PVP로 광범위하게 세척하고 실온에서 5 분 동안 DAPI로 핵을 대조 염색 하였다. 공 초점 레이저 현미경 (Olympus, FV1000, Tokyo, Japan)으로 이미지를 관찰 하였다.

[0060] 1-7 세포질 내 지질 함량 분석

[0061] 지방 방울 (lipid droplet) 축적을 분석하기 위해 세포내 지질 전용 형광 탐침인 나일레드 (Nile red, 9-diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazine-5-one)를 사용하여 배양 8일 제에 수득한 고정된 배반포의 지질 함량을 측정하였다. 나일 레드 스톡 용액 (stock solution)은 실온의 암실에 저장된 DMSO에 1 mg/mL를 용해하여 제조하였다. 배양 8일 제에 수득한 배반포는 4 % (w/v) PFA 용액으로 고정되었다. 배반포는 실온의 암실에서 10 mg/mL NR 용액을 함유한 PBS/PVP로 3시간 동안 배양하였으며, 염색된 배반포는 PBS/PVP 용액으로 3회 세척한 후, PBS/PVP에서 DAPI (1:100 (v/v))와 함께 5 분 동안 배양하였다. 배반포는 PBS로 3회 세척한 후 유리 슬라이드에 오버레이드 커버 슬립 (overlaid cover slip)으로 마운팅하였다. 그 후, 공초점 레이저 현미경 Olympus Fluoview FV1000을 이용하여 나일 레드 친유성 형광 염료 (485 nm)를 활성화 시켰다. 적색 형광 (지질) 강도는 ImageJ software를 사용하여 측정하였다. 각 배반포의 이미지에서 배경 강도를 감산하여 정규화를 수행하였다. 각 그룹의 지질 함량이 평균 형광 강도로 제시되었다.

[0063] 1-8 침윤 분석

[0064] Wnt 자극이 배반포 착상 잠재력에 미치는 영향을 정량화하기 위해 배양 후 8일 제에 수득한 배반포의 확산 및 침윤 영역을 정량화하였다.

[0065] 침윤 분석은 24-well 조직 배양 플레이트 (Corning Inc. Life Sciences)에 폴리에틸렌 테레프탈레이트 막 (직경 8mm)을 포함하는 침윤 챔버 (6.4 mm; Corning Inc. Life Sciences)를 사용하여 수행하였다. 배반포는 챔버 인서트 위에 배치시키고, 챔버 상부 표면은 매트리지 (Matrigel, Discovery Labware Inc.)로 코팅하고 37 °C에서 2시간 동안 배양하여 건조시켰다. 배반포 (인서트 당 3개)는 배아 배양에 사용되는 배지를 포함하는 매트리지로 코팅된 챔버에 놓고 37 °C에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양하는 동안 챔버 하부에 배지는 24 시간마다 교체하였다. 배양 10 일 후 영양막세포 (trophoblasts)의 침윤 및 확산 영역을 위상차 현미경 (Olympus IX71 microscope)하에 관찰하고 ImageJ 소프트웨어를 사용해 분석하였다. 그 후, 면봉으로 막의 상부에서 침윤되지 않은 세포들을 닦아내고, 막을 통과하여 침윤한 세포들은 4 % (w/v) 파라포름알데히드를 사용하여 상온에서 15 분 동안 고정시킨 후 핵은 DAPI로 5 분 동안 염색하였다. 염색된 세포들은 위상차 현미경 (Olympus IX71 microscope) 하에서 계수하였다.

[0067] 1-9 통계 분석

[0068] 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 버전 18.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 사용하여 수행하였다. 모든 백분율 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차 (SEM)로 표시하였다. 또한, 모든 이미지 데이터를 얻기 위해 실험을 3회 반복하였고, 단일 배반포 이미지를 개별 그룹의 대표적인 이미지로 나타내었다. 반면에 3 회의 실험에서 얻은 모든 그래픽 데이터는 평균 표준 오차 (SEM)로 제시되었다. 본 발명에서 제시된 모든 평균 형광 강도는 각 그룹의 배반포 (개별 그룹 당 20 개 배반포)로 정량화되었다. 형광 강도 히스토그램 값은 ImageJ software (USA)를 사용하여 측정하였다. 다양한 유전자의 표현 수준이나 형광 강도 비교에 대한 모든 결과는 시탁 다중 비교 시험 (Sidak's multiple comparisons test)을 따른 일원분산분석 (one-way ANOVA)에 의해 분석되었다. 분석을 위해 GraphPad Prism 6.0 software package (USA)를 사용하였다. 유의미한 차이는 *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001에서 고려되었다.

[0070] <실시예 2> Wnt 작용제 6-Bio(6-bromoindirubin-3'-oxime)의 첨가

[0071] Wnt / β -catenin 경로의 특정 작용제의 자극 효과를 평가하기 위해, 체외 성숙 및 소 배아 발달 배양 동안 6-Bio를 사용하였다. 먼저, Wnt 신호 전달 경로의 최대 활성화를 위한 6-Bio의 최적 용량을 결정 하였다.

[0072] 5 mg 6-브로모인디루빈-3'-옥심 (6-bromoindirubin-3'-oxime, 6-Bio, Sigma-Aldrich, Cat # B1686)을 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 2.8mM의 농도로 용해시키고 -20 °C 이하의 암실에 저장하였다. 연속 희석은 stock 용액

으로 수행되었다. 실시예 1-3의 체외성숙 (in-vitro maturation, IVM) 배지와 실시예 1-5의 체외배양용 SOF (Synthetic Oviductal Fluid) 배지에 6-Bio를 첨가하여 실시예 1-1 내지 1-5에 기재된 방법으로 소의 수정란을 배양하였다. 6-Bio는 700 μ L의 배양배지에 각각 그룹의 6-bio의 최종농도가 0, 200, 300, 400, 500 nM이 되도록 추가하였다.

[0073] 그 결과는 도 1 내지 3 및 표 2에 나타내었다.

[0074] 도 1은 6-Bio 처리 농도에 따른 소 배반포 발달율 및 부화율을 나타낸 그래프이며, 도 2는 6-Bio 처리 농도에 따른 Wnt 관련 유전자의 qRT-PCR 분석결과를 나타낸 그래프이고, 도 3은 착상 전 단계 동안 6-Bio 처리 유무에 따른 활성화된 β -카테닌의 면역형광염색결과를 나타낸 사진이다. 빨간색은 β -카테닌, 파란색은 핵을 나타낸다 (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). 6-Bio를 통한 Wnt 활성화의 외인성 자극은 소 배반포 형성 및 부화 속도를 개선시켰다 (표 2 참조). 특히, 400 nM 6-Bio를 첨가한 경우 가장 높은 배반포 발달 및 부화 속도를 보여 주었다 (도 1A, B). 소 배반포에서 잘 알려진 표준 Wnt 표적 유전자 (Gsk3 β , β -카테닌, Axin2, c-Myc)의 발현을 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과 표적 유전자들의 발현은 용량 의존적 방식으로 6-Bio의 첨가에 의해 증가되었다 (도 2). 6-Bio의 처리는 Wnt가 활성화되지 않은 조건에서 성장한 배아와 비교하여 착상 전 단계 동안 β -카테닌 발현을 유의하게 향상시켰다 (도 3). 이러한 결과는 6-Bio에 의한 표준 Wnt 경로의 외인성 활성화가 소 배아 발달에 크게 영향을 미친다는 것을 의미한다. 하기 실시예부터는 소 배반포 발달 및 수정란 부화율이 가장 좋은 400 nM 6-Bio 처리그룹을 사용하였다.

표 2

[0076]

Group(nM)	Oocyte	Speculated zygote	Cleaved embryo	Total blastocyst	Hatched blastocyst
Control(0)	340개	315개	245개 (77.8 $\pm$ 0.5) ^b	93% (29.6 $\pm$ 0.5) ^b	41% (44.9 $\pm$ 1.8) ^b
6-Bio(200)	295개	277개	217개 (78.3 $\pm$ 0.6) ^b	94% (33.9 $\pm$ 0.9) ^c	53% (55.9 $\pm$ 3.4) ^c
6-Bio(300)	313개	290개	227개 (78.3 $\pm$ 0.3) ^b	99% (34.1 $\pm$ 1.1) ^c	56% (55.9 $\pm$ 3.4) ^c
6-Bio(400)	346개	321개	254개 (78.9 $\pm$ 0.4) ^b	121% (37.8 $\pm$ 0.5) ^d	78% (64.3 $\pm$ 1.2) ^c
6-Bio(500)	165개	151개	83개 (55 $\pm$ 1.7) ^a	31% (20.8 $\pm$ 1.3) ^a	7% (22.5 $\pm$ 3.2) ^a

[0077] <실시예 3> 전분화능 및 계통 지정에 대한 Wnt의 역할

[0078] 8 일째 배반포 세포를 수득하여 Cox2, Cdx2, c-Myc, Oct4에 대하여 실시예 1-7 및 1-6의 방법으로 면역형광염색 분석 및 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 그 결과는 도 4 및 5에 나타내었다. 도 4는 6-Bio 처리 유무에 따른 전분화능 마커 및 계통 지정 마커의 발현을 나타낸 사진이며, 도 5는 6-Bio 처리 유무에 따른 전분화능 마커 및 계통 지정 마커의 면역유도 분석 qRT-PCR 결과를 나타낸 그래프이다.

[0079] 소 배아 발달 동안 Wnt 신호 전달 경로의 기능적 중요성은 몇 가지 다능성 및 계통 지정 마커를 분석함으로써 특성화되었다. 전분화능 마커 (pluripotency maker) Oct4의 발현은 6-Bio 처리 그룹에서 내부 세포 질량이 유의하게 증가하였다 (도 4A, B). 이와 유사하게, 소 배반포의 내부 세포 질량 및 영양 외배엽에서 Wnt 활성화 시 c-Myc의 발현도 증가하였다 (도 4A, B). 영양막 전사인자인 Cdx2의 발현은 내부 세포 질량 및 영양 외배엽 층 내에서 6-Bio 처리에 따른 배반포의 Wnt 활성화에 의해 감소된 것을 확인하였다. 배반포의 발달 및 부화를 촉진하는 Cox2는 6-Bio 처리에 의해 현저히 증가된 것을 확인할 수 있다 (도 4A, B). qRT-PCR 분석 결과도 면역형광염색 분석 결과와 동일하였다 (도 5). 이러한 결과는 소 배아의 발달 동안 Wnt 신호 전달의 중요성을 보여준다. 그것은 또한 Wnt 신호 전달의 활성화가 발달 초기 단계에서 도움을 줄 수 있는 전분화능 마커 유전자의 유지에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

[0081] <실시예 4> Wnt 활성화에 의한 PPAR δ 의 발현

[0082] Wnt/ β -카테닌 경로가 소의 배아 발달을 어떻게 조절하는지 더 자세히 연구하기 위해, 우리는 Wnt/ β -카테닌 경로의 영향을 받는 유전자의 발현 실시예 1-6의 방법으로 측정하였다. 그 결과는 도 6 내지 8에 나타내었다.

[0083] 도 6은 PPARs 패밀리의 6-Bio 처리 유무에 따른 mRNA 발현 분석 결과를 나타낸 그래프이며, 도 7은 PPAR δ 의 소 배아 발달단계 별 RT-PCR 분석 결과를 나타낸 사진이고, 도 8은 소 배아 발달단계에서 6-Bio 처리 유무에 따른 PPAR δ 의 면역형광염색결과를 나타낸 사진이다.

[0084] 도 6 내지 8에 나타낸 바와 같이, Wnt 활동의 외인성 자극이 Cox2의 발현을 현저히 증가 시켰다. Cox2는 프로스타글란딘을 생산하는데 필요한 핵심 효소로, 많은 생식 과정에 있어서 중요한 역할을 한다. Cox2의 발현 증가가 PPARs 발현 증가와 관련이 있다고 알려져 있다. 소의 배반포 단계에서 Cox2의 표현이 증가함에 따라 PPARs 패밀리의 3가지 동형 단백질 (isoform)의 발현과 기능 분석을 보여주는 뚜렷한 데이터는 없다. Wnt 활성화 조건에서 배양된 배반포로 qRT-PCR 분석을 수행하였다. PPARs 패밀리의 3가지 동형 단백질 중, PPAR δ 의 발현은 주로 Wnt 활성화에 의해 증가 되었다 (도 6). RT-PCR 분석 결과, PPAR δ 발현은 소 배아 발달의 다른 단계에서 검출되었다 (도 7). 또한 면역형광염색 분석 결과 Wnt 작용제가 보충된 배지에서 배양된 소 배아가 착상 전 기간의 모든 발달 단계에서 PPAR δ 발현이 증가되었음을 확인하였다 (도 8). 이러한 결과는 PPAR δ 가 소 배아의 착상 전 기간 동안 Wnt/ β -카테닌 경로에 의해 조절되고, PPAR δ 와 Wnt는 상승 작용에 의해 소 배발생 (embryogenesis) 을 조절한다는 것을 의미한다.

[0086] <실시예 5> PPAR δ 에 의한 배아 발달

[0087] 배아의 착상 전 발달 단계에서의 세포 증식이 PPAR δ 발현 조절을 통한 Wnt 신호 경로에 의해 조절된다는 것을 확인하기 위해, PPAR δ 의 길항제인 GSK3787로 PPAR δ 의 기능을 억제하였다. 그 결과는 도 9 내지 12 및 표 3에 나타내었다.

[0088] 도 9는 소 배반포 발달 단계에서 6-Bio, GSK3787 처리에 따른 배반포 발달 및 부화율을 나타낸 그래프이며, 도 10은 PPAR δ 억제에 따른 c-Myc 및 CyclinD1의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 11는 PPAR δ 억제에 따른 c-Myc, CyclinD1의 면역형광염색 결과를 나타낸 사진이다. 초록색은 PPAR δ , 빨간색은 c-Myc를 나타낸다. 마지막으로, 도 12는 c-Myc와 PPAR δ 의 공국재화 (co-localize) 비율과 면역형광염색 강도를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[0089] 도 9 내지 12 및 표 3에 나타낸 바와 같이, GSK3787의 처리는 PPAR δ 기능을 약화시키고, 용량 의존적으로 배반포의 품질 및 부화율을 변화시켰다. GSK3787의 이러한 길항 효과는 6-Bio 처리에 의해 잘 회복되었다 (표 3 및 도 9). 이러한 결과는 Wnt 작용제에 대한 PPAR δ 발현의 수준이 Wnt/ β -카테닌 신호의 의해 증가할 수 있고, 배반포의 발달 및 부화율을 개선할 수 있음을 시사한다. 또한, 세포 증식 지수에 대한 PPAR δ 길항제 GSK3787의 효과를 분석 하였다. PPAR δ 의 억제는 세포 증식률을 유의하게 감소시키고 배반포의 질을 손상시키는 반면, PPAR δ 길항제 GSK3787에 의한 PPAR δ 기능의 감소는 Wnt 작용제 (6-Bio) 첨가 시 회복되었다. 다음으로, PPAR δ 억제에 따른 Wnt 표적화된 세포 증식 마커 c-Myc 및 CyclinD1의 수준을 측정하였다. 이들 유전자의 발현은 대조군에 비해 GSK3787이 처리된 그룹에서 현저하게 감소되었다 (도 10). 이어서, PPAR δ 발현이 Wnt 유도 유전자 발현과 함께 공국재화 (co-localize)될 수 있고 배반포 발달 동안 세포 증식을 촉진시키는지 확인하였다. Wnt 작용제를 포함한 배지에서 배양된 배반포는 면역 형광 분석에 의해 나타낸 바와 같이 PPAR δ 와 함께 c-Myc의 공국재화된 (co-localize) 발현을 보여 주었다. c-Myc 및 PPAR δ 의 발현은 GSK3787 처리 그룹에서 현저하게 감소되었다. 반면에, 6-Bio와 함께 GSK3787을 처리한 그룹에서는 감소된 c-Myc 및 PPAR δ 의 발현이 성공적으로 회복되었다 (도 11). 이러한 결과는 Wnt/ β -카테닌 신호 전달의 증가가 세포 증식을 상승적으로 촉진시키고 소 배반포의 발달 가능성을 향상시키는 PPAR δ 신호 전달을 상향 조절한다는 것을 의미한다.

표 3

Groups	Oocytes	Speculated zygote	Cleaved embryo	Total blastocyst	Hatched Blastocyst
Control	502개	481개	377개 (78.5±0.2) ^c	140개 (29.2±0.5) ^c	63개 (45.0±0.9) ^c
6-Bio (400 nM)	521개	496개	387개 (78.2±0.3) ^c	188개 (37.8±1.3) ^d	115개 (61.1±1.6) ^d
GSK3787 (15 μM)	453개	430개	323개 (75.0±0.4) ^a	69개 (16.1±0.6) ^a	5개 (7.2±2.5) ^a
6-Bio+ GSK3787	521개	494개	378개 (76.7±0.4) ^b	120개 (24.3±0.4) ^b	43개 (35.5±1.2) ^b

<실시예 6> 지방산 산화 대사 조절

Wnt가 PPAR δ 발현과 지방산 산화 대사의 유도에 의해 배반포 부화를 가속화하는 것을 확인하기 위해 PPARs 패밀리의 전사인자 하류에 있는 지방산 산화와 관련된 주요 조절 유전자인 Cpt1과 Pdk4의 발현을 측정하였다. 그 결과는 도 13 내지 15에 나타내었다.

도 13은 Wnt 활성화에 따른 Cpt1의 mRNA 발현 분석 결과를 나타낸 그래프이며, 도 14는 Wnt 활성화에 따른 Cpt1의 면역형광염색 결과를 나타낸 사진이고, 도 15는 Wnt 활성화에 따른 Cpt1의 면역형광염색 강도를 정량화 하여 나타낸 그래프이다 (*p<0.01; **p<0.01; ***p<0.001).

도 13 내지 15에 나타낸 바와 같이, qRT-PCR 분석 결과 Wnt의 활성이 cpt1과 Pdk4의 발현을 크게 증가시켰다. GSK3787 (PPAR δ 길항제)을 이용한 PPAR 기능의 억제제는 지방산 산화 대사와 관련된 유전자 발현을 현저하게 감소시켰다. 이러한 cpt1과 Pdk4 유전자의 발현 감소는 GSK3787과 6-Bio의 조합에 의해 회복되었다(도 13). 이어서, 면역형광염색 분석을 통해 Cpt1 발현에 대한 PPAR δ 억제제의 길항효과를 확인한 결과, 상기 qRT-PCR 분석 결과와 일치했다(도 14). 이러한 결과는 Wnt 신호는 PPAR δ 신호를 증가시키고, PPAR δ는 지방산 산화 대사를 촉진하고 배반포의 부화 속도를 가속화한다는 것을 의미한다.

<실시예 7> 배반포 영양막 세포의 지질 함량과 침윤능력

Wnt의 활성화가 PPAR δ 발현을 상향 조절함으로써 지질 대사를 강화시킨다는 것을 확인하기 위해, 배반포 발달 단계에서 형광 프로브 나일 레드(nile red)를 이용하여 지질 방울 함량을 측정하였다. 그 결과는 도 16 내지 19에 나타내었다.

도 16은 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 나일 레드(Nile Red) 염색 결과를 나타낸 사진이며, 도 17은 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 나일 레드(Nile Red) 염색 강도를 정량화 하여 나타낸 그래프이고, 도 18은 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 명시야상 관찰결과를 나타낸 사진이다. 또한, 도 19는 Wnt 활성화에 의한 배반포 영양외배엽(trophectoderm) 세포의 평균 침윤 영역 및 이주된 세포의 수를 나타낸 그래프이다 (**p<0.01; ***p<0.001).

도 16 내지 19에 나타낸 바와 같이, 측정된 지질 함량이 대조군에 비해 6-Bio 처리그룹에서 현저히 낮은 것으로 나타났다. 또한, PPAR δ 길항제(GSK3787) 처리 그룹은 측정된 지질 함량이 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 그러나 GSK3787 및 6-Bio의 처리그룹에서는 지질 방울 함량을 감소시켰다(도 16). 이러한 결과는 Wnt의 활성화에 의한 증가된 PPAR δ가 지방산 산화 대사를 증가시켜 배아 발달 중 지질 함량을 감소시킨다는 것을 의미하며, 지방산 산화 대사가 강화됨으로써 높은 에너지 수요를 효율적으로 충족시키기 위해 배아 발달 및 부화 속도가 향상되었다는 것을 의미한다. 또한, 배반포의 착상 잠재력을 알아보기 위한 침윤 분석 결과, Wnt가 활성화된 조건에서 배양된 배반포는 대조군과 비교하여 더 넓은 영역으로 확산되었음을 확인하였다. 반면에, PPAR δ의 억제제는 배반포의 착상 능력과 세포침투 능력을 감소시켰다. 그러나 6-Bio와 GSK3787을 함께 처리한 경우, GSK3787에 의해 감소되었던 배반포의 착상 능력과 세포침투 능력이 회복되었다. 이러한 결과는 배반포의 착상 과정에서

PPAR δ 신호와 함께 Wnt/ β -카테닌 경로의 활성이 필요하다는 것을 의미한다.

[0103] <실시예 8> β -카테닌과 PPAR δ 의 공국재화 (co-localize)

[0104] 6-Bio는 Wnt/ β -카테닌 활동을 자극하여 소 배아에서 PPAR δ 의 발현을 유도한다. 또한, Wnt/ β -카테닌 경로 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 배반포의 발달과 부화율에 영향을 미친다. β -카테닌은 TCF/LEF 전사 인자의 전사보조인자로, 표준 Wnt 신호 경로에 의해 조절되는 여러 유전자의 발현을 촉진한다. 소의 배반포 발달 단계에서 PPAR δ 과 β -카테닌의 상호작용을 알아보기 위해, 배반포 세포에서 PPAR δ 과 β -카테닌에 대한 면역형광염색 분석을 수행하였다. 그 결과는 도 20 내지 21에 나타내었다.

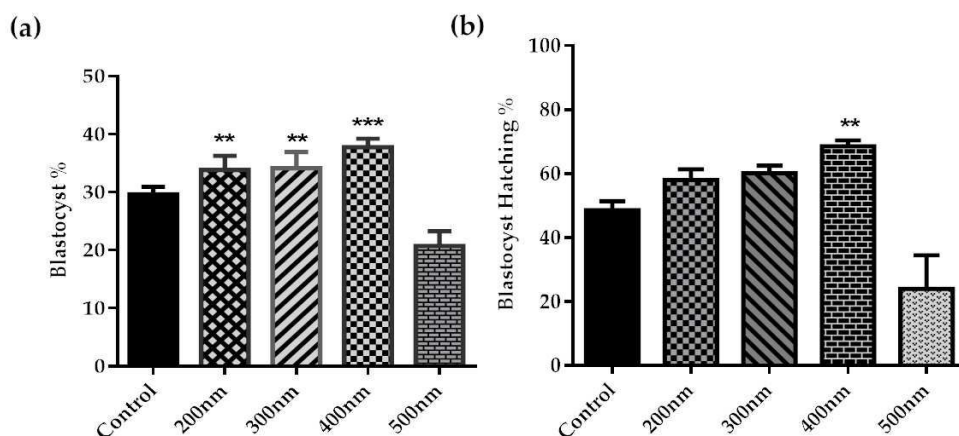
[0105] 도 20은 β -카테닌과 PPAR δ 의 공국재화 (co-localize)를 확인하기 위한 면역형광염색 분석 결과를 나타낸 사진이다. 녹색은 PPAR δ , 붉은색은 β -카테닌, 노란색은 공국재화 (co-localize)된 것을 나타내며, 핵은 DAPI로 염색함 (파란색). 하단의 magnified는 상단의 박스영역을 확대한 것이다. 도 21은 β -카테닌과 PPAR δ 의 평균 형광 강도를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[0106] 도 20 내지 21에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 Wnt 활성의 자극은 PPAR δ 가 β -카테닌과의 공간적 중첩을 현저하게 증가시켰다 (도 20). 또한, GSK3787의 처리로 PPAR δ 를 억제한 결과 β -카테닌의 공국재화 (co-localize)를 감소시켰다. 그러나 6-Bio를 추가하여 처리한 경우, 감소된 β -카테닌의 공국재화 (co-localize)를 회복시켰다. 이러한 결과는 Wnt가 PPAR δ 의 발현을 상향 조절하고 β -카테닌과의 공국재화 (co-localize)를 증가시켰다는 것을 의미하며, 이러한 공국재화 (co-localize)는 Wnt 표적 유전자 발현을 촉진하고 소 배반포 발달을 향상시키기 위한 전사보조활성자 (transcriptional co-activator) 복합체를 만들 수 있다는 것을 의미한다.

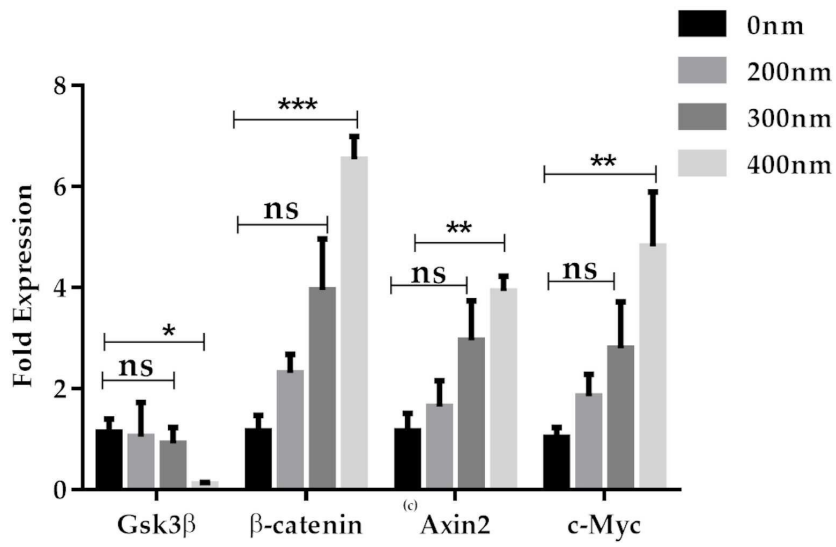
[0108] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

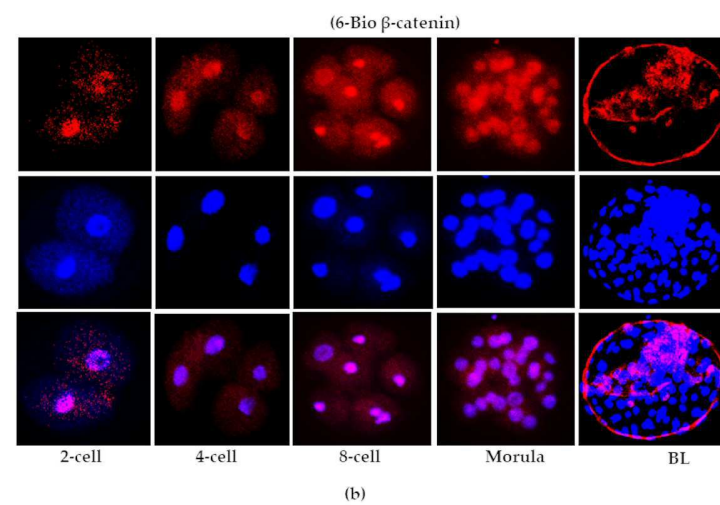
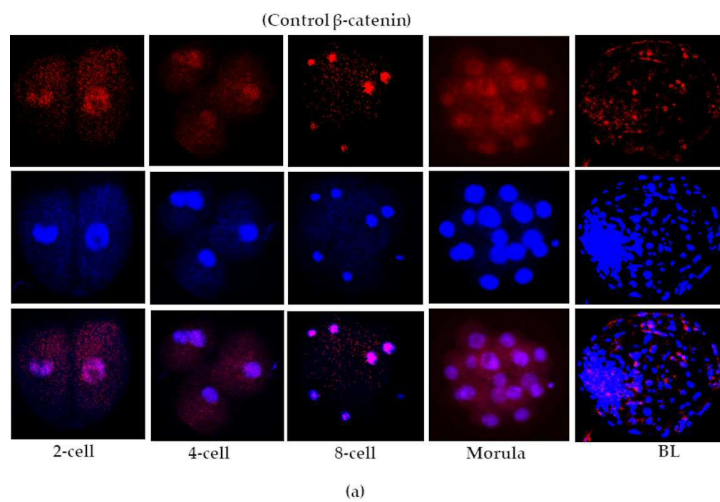
도면1



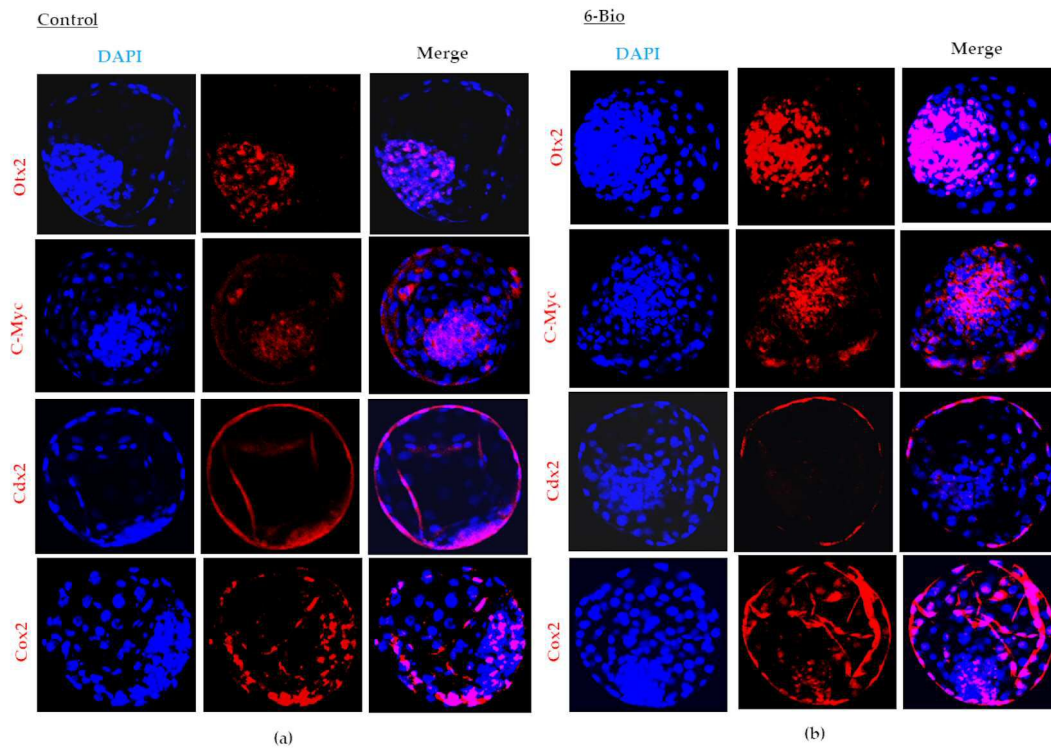
도면2



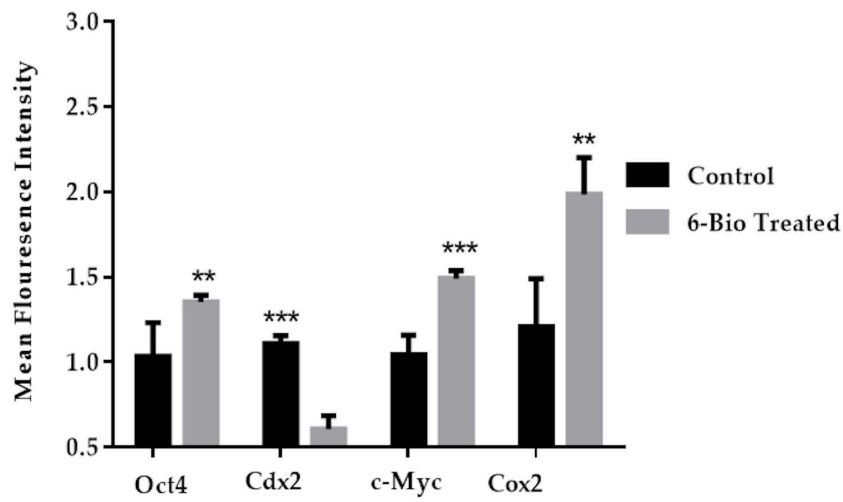
도면3



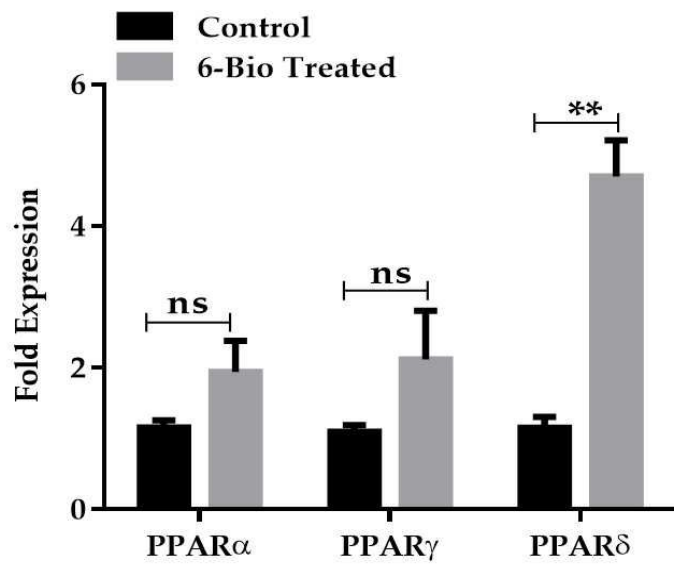
도면4



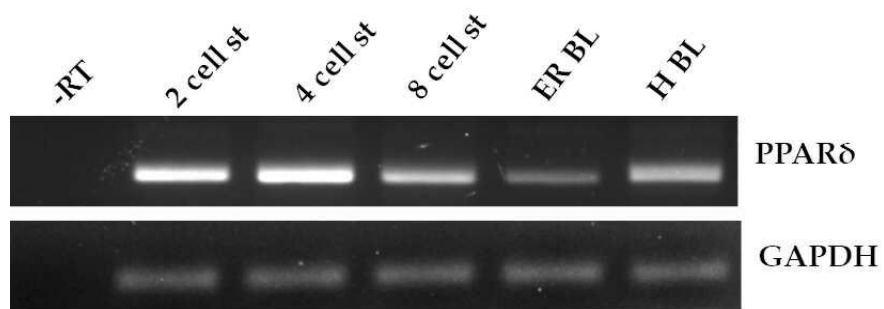
도면5



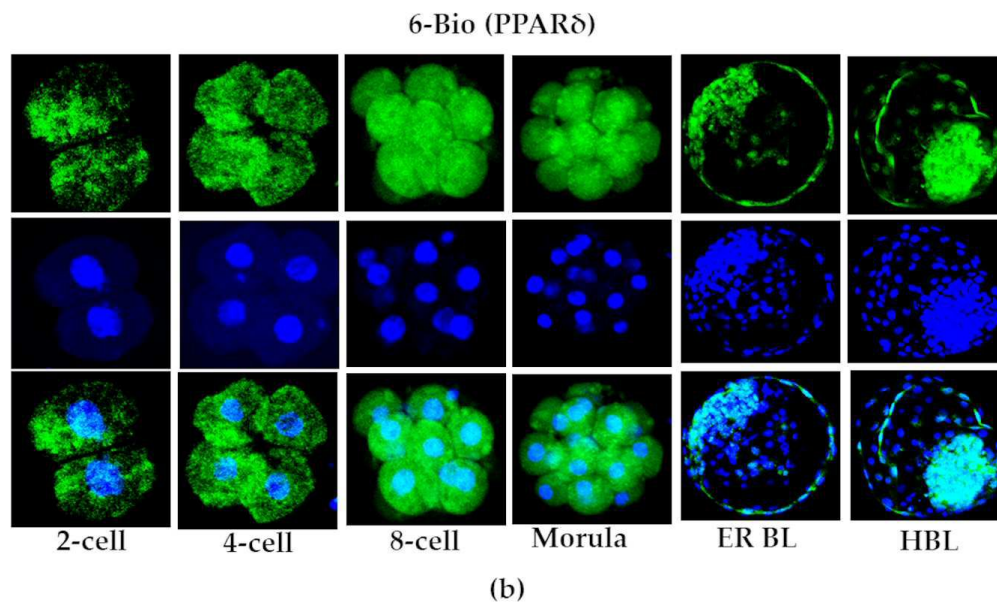
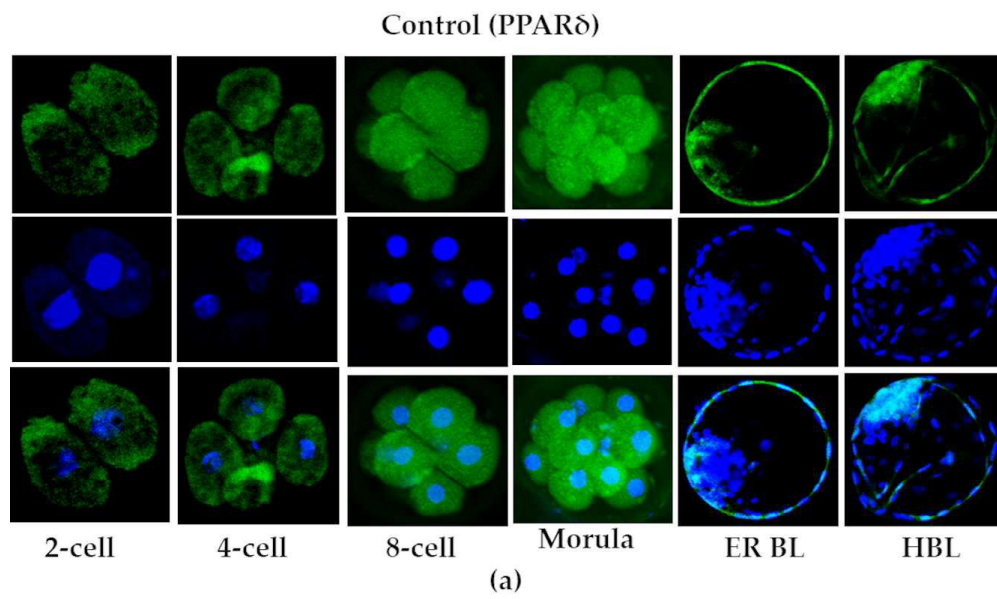
도면6



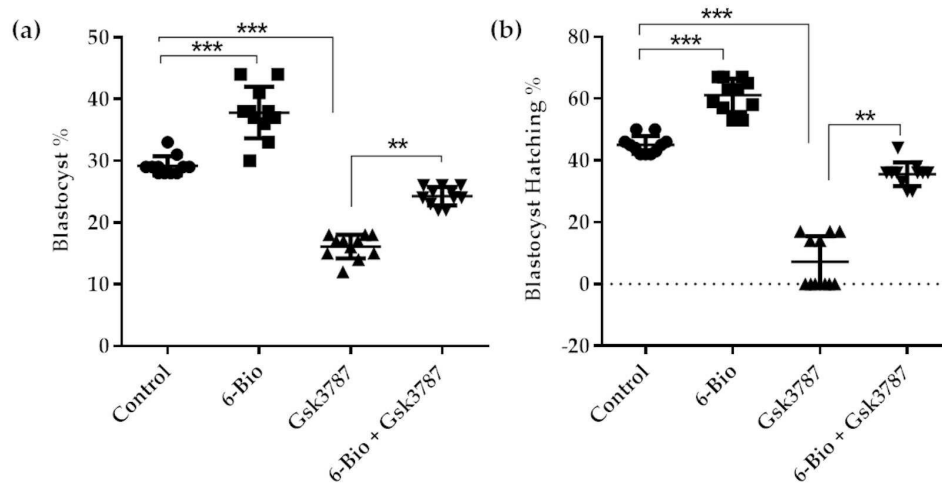
도면7



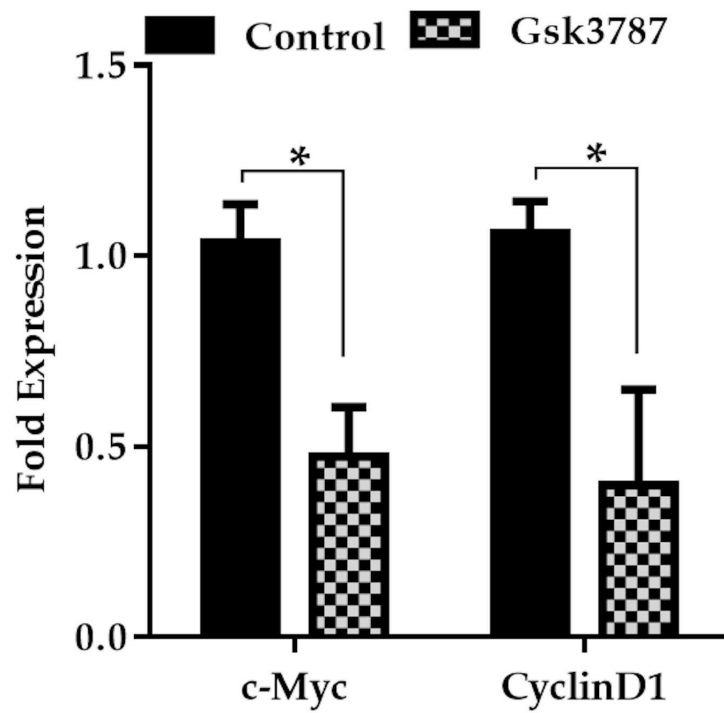
도면8



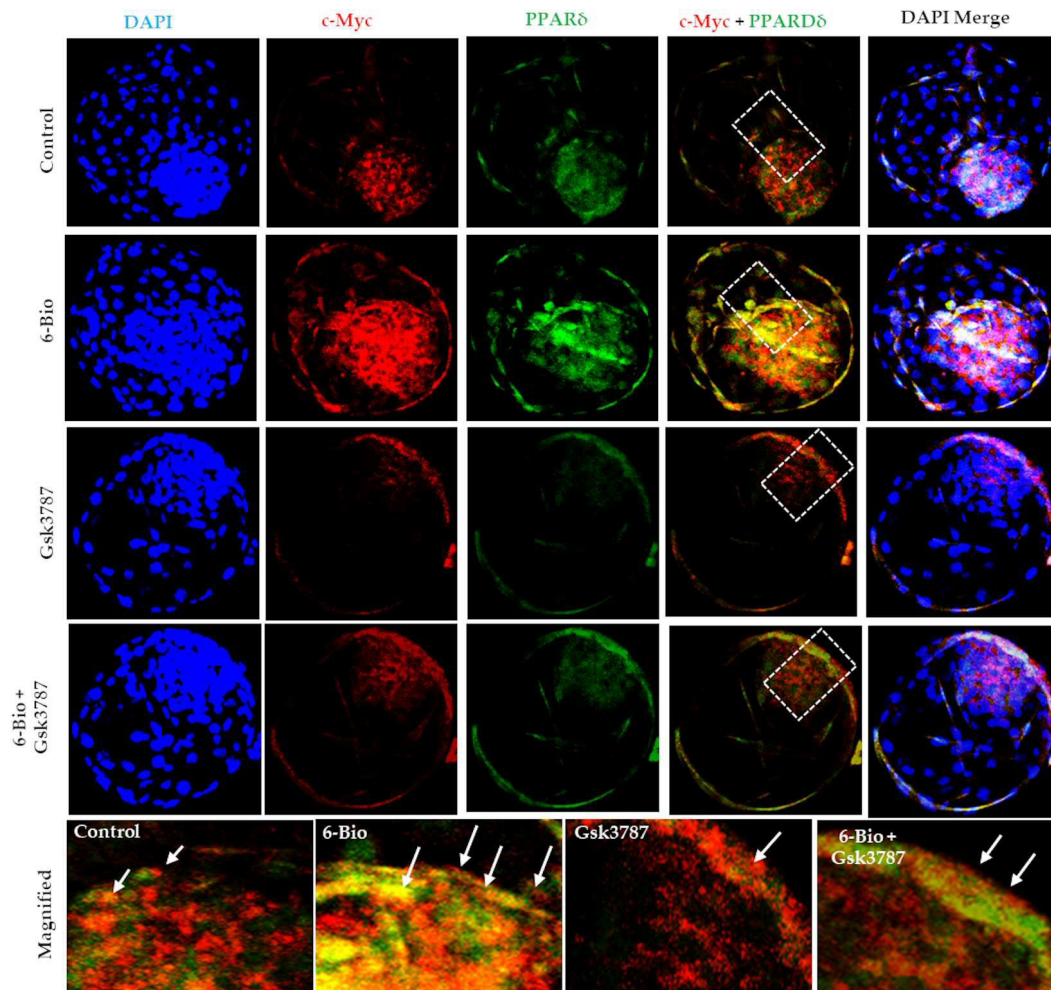
도면9



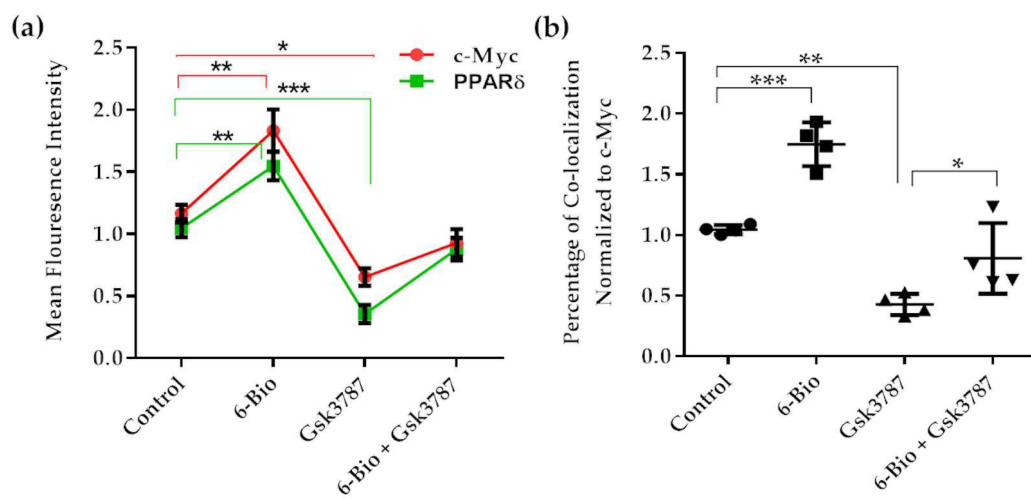
도면10



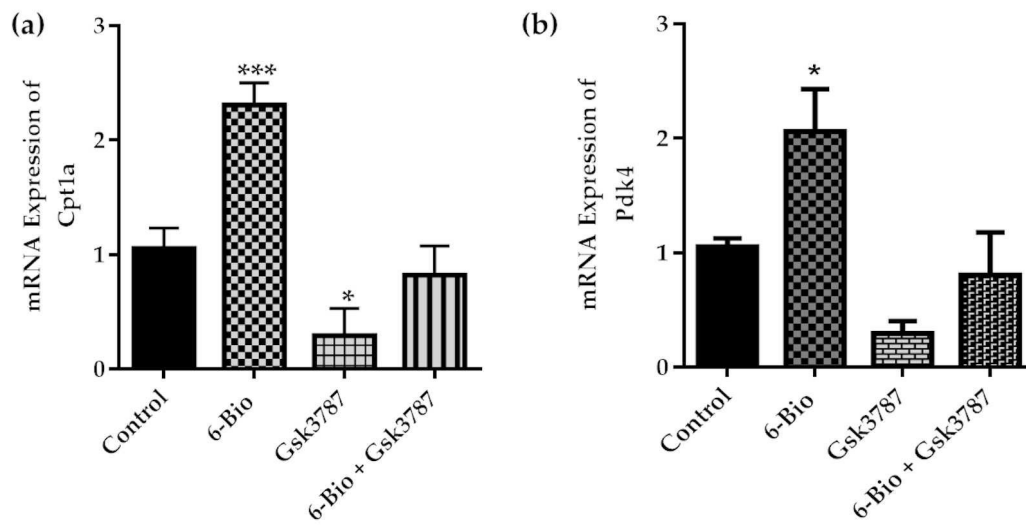
도면11



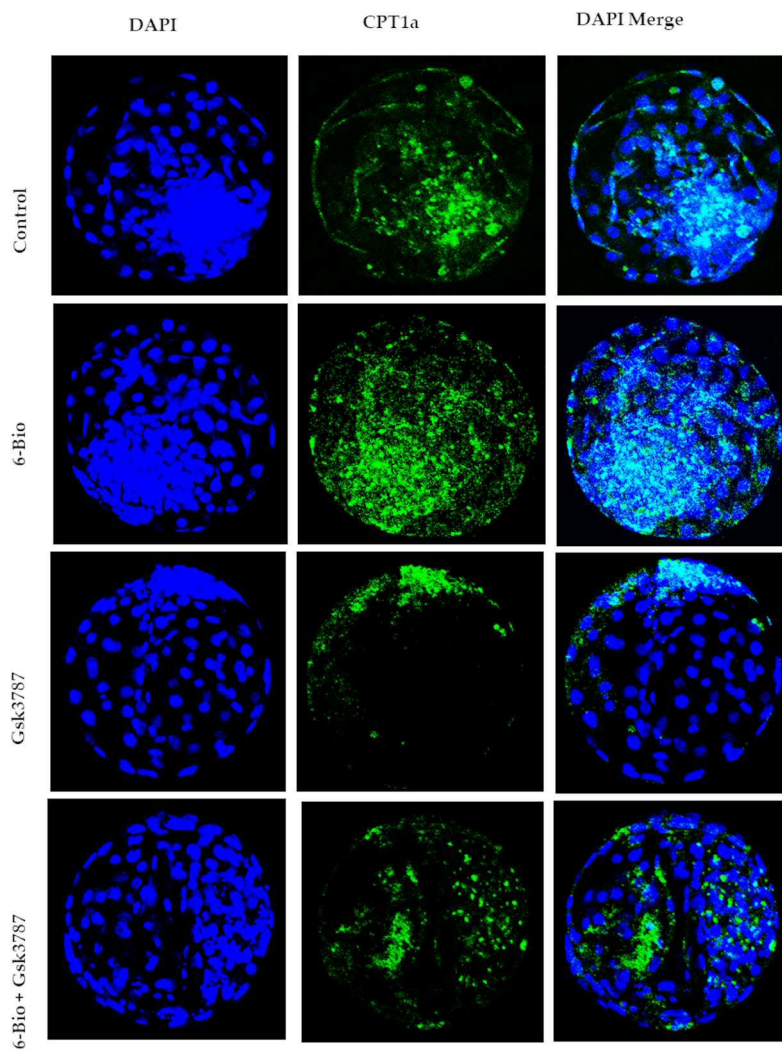
도면12



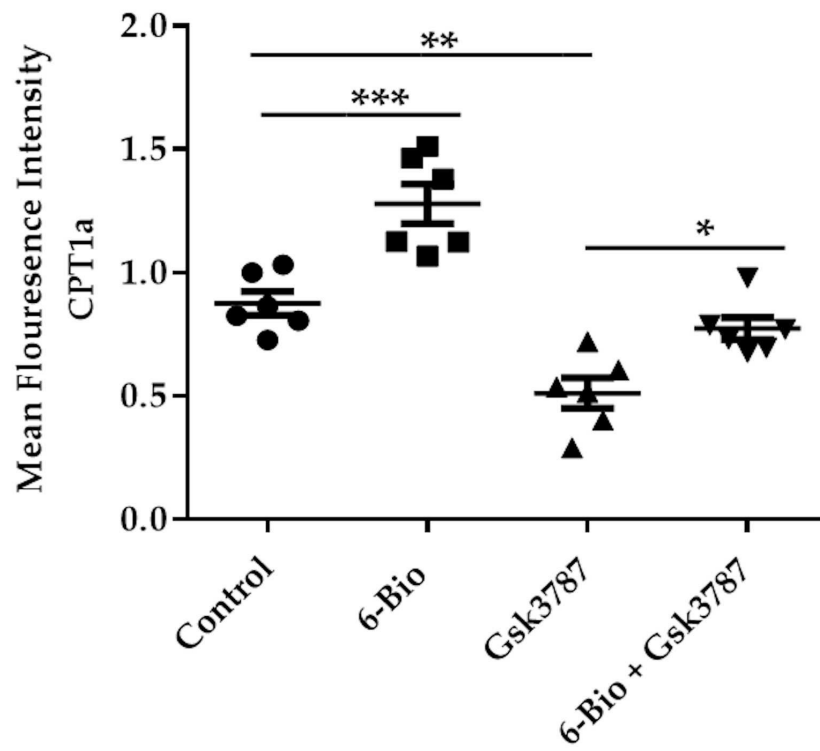
도면13



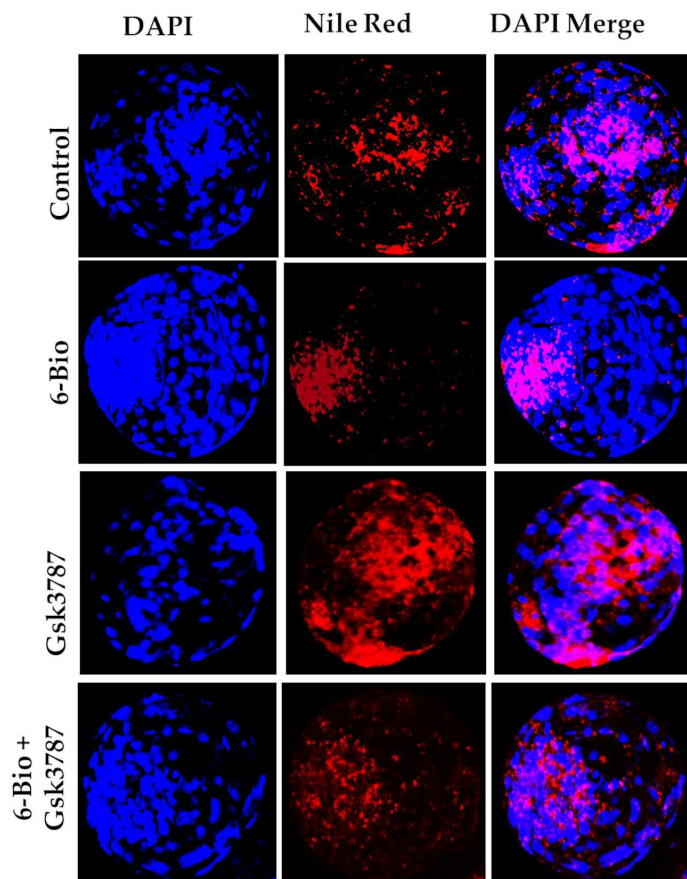
도면14



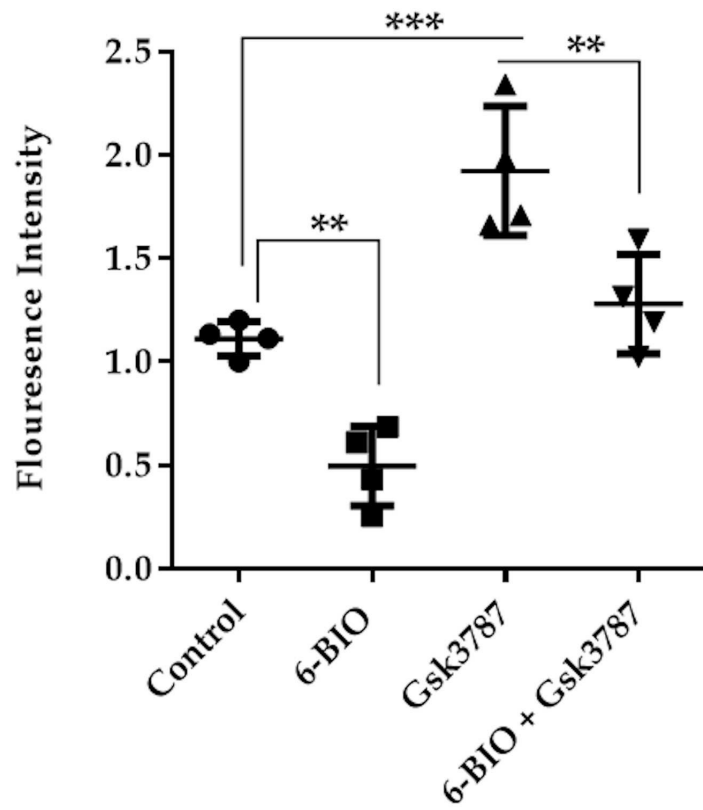
도면15



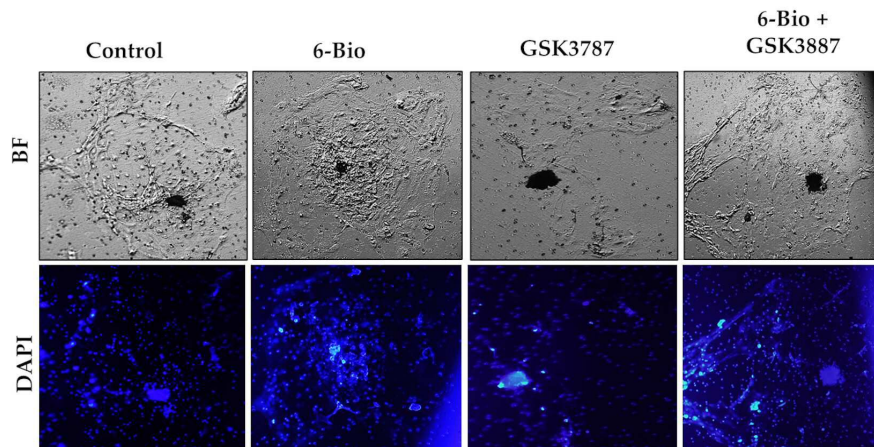
도면16



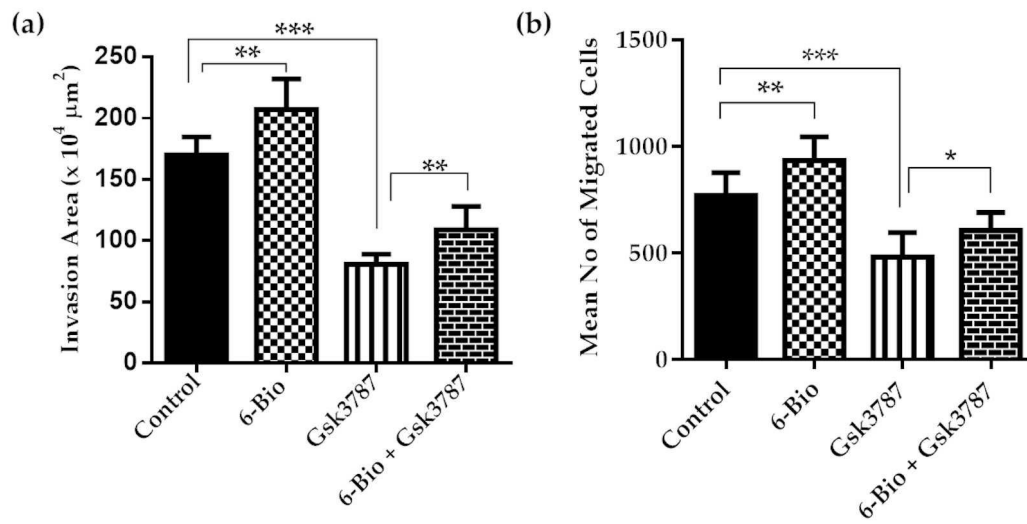
도면17



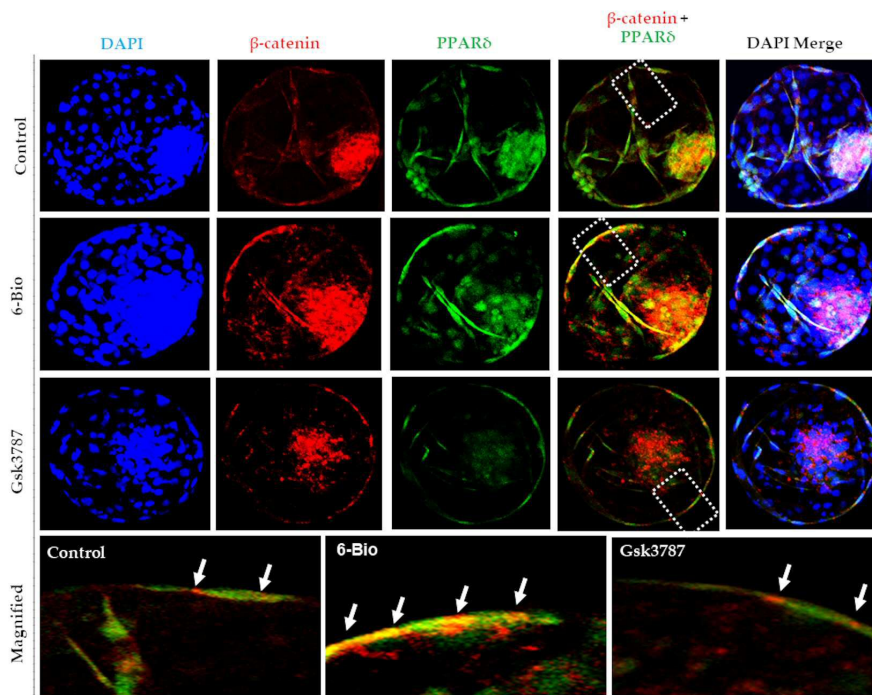
도면18



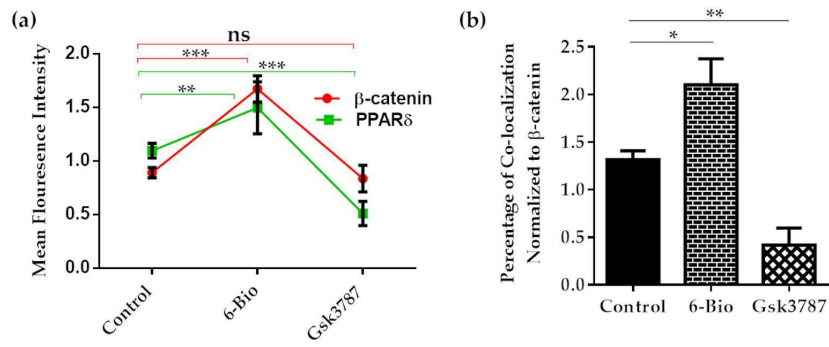
도면19



도면20



도면21



도면22

