



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0117772

(43) 공개일자 2021년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0275 (2013.01)

A01K 2217/072 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0034462

(22) 출원일자 2020년03월20일

심사청구일자 2020년03월20일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김태형

광주광역시 서구 풍암신흥로 40, 동부센트레빌아파트 104-602

박정희

광주광역시 서구 화개1로78번길 8, 호반리젠시빌 5차아파트 505-304

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅

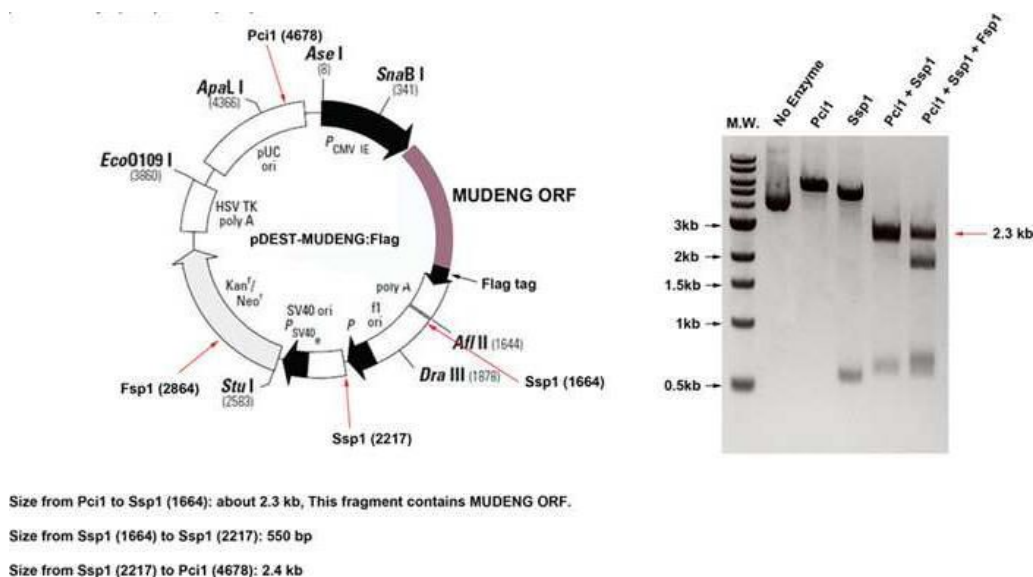
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 동물 모델에서는 간손상에 의한 간섬유화가 촉진되고 일시적인 탈모효과가 일어나는 것을 관찰할 수 있으며, 이를 통해 MUDENG 유전자가 간섬유화의 과정과 일시적인 탈모현상에 어떤 영향을 미치는지 연구할 수 있고, 이는 간섬유화와 탈모현상에 대한 이해를 도울 수 있을 뿐 아니라, 그 두 가지 현상이 어떻게 관련되어 있는지 발견할 수 있는 좋은 수단이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

(72) 발명자

한지혜

광주광역시 남구 용대로 194, 302호

명승현

광주광역시 북구 북문대로242번길 50, 푸른마을주
공2단지아파트 205-1103

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1D1A1A02043850

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 SGER

연구과제명 암면역물질 발굴 및 펩타이드 항암제 병용치료를 통한 차세대 면역치료 요법 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 조선대학교

연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.30

명세서

청구범위

청구항 1

MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 형질전환은 MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 카세트로 수행하는 것인, 동물 모델.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 형질전환 카세트는 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 cDNA의 5'쪽에 가지고 있고, Flag tag를 cDNA의 3'쪽에 가지는 것인, 동물 모델.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 MUDENG 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 동물 모델.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 MUDENG 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 동물 모델.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 동물 모델은 뇌, 폐, 간, 피부, 고환 및 혈액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 기관에서 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 과발현되는 것인, 동물 모델.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 동물 모델은 간섬유화가 쉽게 촉진되고, 일시적인 탈모현상이 일어나는 것인, 동물 모델.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 동물은 마우스인 것인, 동물 모델.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 동물 모델은 마우스의 수정란을 이용하여 형질전환되는 것인, 동물 모델.

청구항 10

하기의 단계를 포함하는 상기 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델의 제조방법:

MUDENG 유전자 및 프로모터가 삽입된 형질전환 카세트를 제조하는 형질전환 카세트 제조 단계;

형질전환 카세트를 배아에 주입하여 수정란을 제조하는 수정란 단계; 및

수정란을 착상시키는 착상 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 형질전환 카세트는 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 cDNA의 5'쪽에 가지고 있고, Flag tag를 cDNA의 3'쪽에 가지는 것인, 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 MUDENG 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 MUDENG 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 동물 모델은 뇌, 폐, 간, 피부, 고환 및 혈액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 기관에서 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 과발현되는 것인, 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 동물 모델은 간섬유화가 간손상에 의해 쉽게 촉진되고, 일시적인 전신의 탈모현상이 일어나는 것인, 제조방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 상기 동물은 마우스인 것인, 제조방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 배아는 마우스의 배아인 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 동물 모델에서는 간손상에 의한 간섬유화가 촉진되고 일시적인 탈모효과가 일어나는 것을 관찰할 수 있으며, 이를 통해 MUDENG 유전자가 간섬유화의 과정과 일시적인 탈모현상에 어떤 영향을 미치는지 연구할 수 있고, 이는 간섬유화와 탈모현상에 대한 이해를 도울 수 있을 뿐 아니라, 그 두 가지 현상이 어떻게 관련되어 있는지 발견할 수 있는 좋은 수단이다.

배경 기술

[0002] MUDENG 단백질은 490개의 아미노산으로 이루어져 있으며 창자와 고환을 포함하는 다양한 조직에서 발현되고 있다. 진화론적으로 볼 때 MUDENG 유전자는 인간을 포함한 포유류부터 양서류에 이르기까지 잘 보존되어 있다.

[0003] MUDENG은 Adaptor protein complex인 AP5의 구성원 중의 하나로서, AP5M1 (adaptor related protein complex 5 subunit mu 1)이라는 이름으로도 알려져 있다. AP5는 endosome이 운반할 Cargo를 분류하는 기능 (endosomal sorting)에 관련된 일을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 구체적인 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, MUDENG은 Fas에 의해 일어나는 세포자연사 (apoptosis)에 관련되어 있으며, Jurkat T 세포나 HeLa에서 과발현 되었을 때 세포사를 일으키는 것으로 보고되었다. 또한 TRAIL에 의해 apoptosis가 유발되었을 때, caspase3에 의해 MUDENG 단백질의 adaptin 도메인이 잘리게 되고, 잘려진 MUDENG은 세포사를 일으키는 능력이 떨어지는 것으로 보아 MUDENG 단백질의 세포사 유도 기전에는 adaptin 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

[0005] 이와 같은 배경에서 본 발명자들은 MUDENG 단백질의 기능을 더 자세히 알아보기 위해 이를 과발현시키는 형질전환 쥐를 만들었으며, 이는 쥐의 수정란에 MUDENG 유전자를 삽입한 DNA절편을 미세주입하는 방법으로 완성된다. 이렇게 만들어진 쥐에서는 MUDENG 유전자가 뇌, 간 등 다양한 조직에서 과발현되는 것이 보였으며 클로로포름을 이용하여 간손상을 유발시켰을 때 일반 쥐보다 간섬유화가 더욱 촉진되는 모습을 보였다. 또한 생후 3주에서 5주에 이르는 기간 동안 일시적으로 전신에 탈모가 일어나는 현상을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 세포자연사 (apoptosis)에 대한 연구를 진행하던 중 MUDENG 단백질이 세포사를 일으키는 것을 알아내었다. 이에, 그 구체적인 기능에 대해서 연구하던 중 MUDENG 단백질을 과발현 하는 형질전환 쥐 (mouse)를

만들어 내었다. 이렇게 만들어진 쥐에서, 간손상을 일으켰을 때 간섬유화가 정상쥐보다 빠르게 일어나는 것을 관찰하였고, 생후 3주에서 5주에 이르기까지 일시적인 전신의 탈모현상을 관찰할 수 있었다.

[0007] 이에, 본 발명의 목적은 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하는 형질전환 동물 모델 및 이의 제조 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 간섬유화의 촉진과 일시적인 탈모현상을 특징으로 하는 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하는 형질전환 쥐에 관한 것이다. 이는 MUDENG 유전자가 삽입되어 있는 DNA 벡터를 정제하여 원하는 DNA 절편을 쥐의 수정란에 미세주입하여 만들어진다. 이렇게 만들어진 쥐는 MUDENG 단백질의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라, 간손상이 생겼을 때 정상 쥐보다 간섬유화의 진행이 더욱 빨라지며, 생후 3주에서 5주 사이에 일시적으로 몸의 대부분에서 탈모가 진행되는 모습을 보였다. 이는 MUDENG 유전자가 간섬유화와 탈모현상에 중요한 역할을 하는 증거인 동시에 간섬유화와 탈모에 대한 연구에 유용한 동물 모델로 사용될 수 있다.

[0010] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0011] 본 발명의 일 예는 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에 있어서 형질전환은 MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 카세트에 수행하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에 있어서, MUDENG 유전자를 발현시키기 위해, MUDENG의 cDNA를 gateway system을 이용하여 pDEST-Flag에 클로닝하여 pDEST-MUDENG:Flag를 제조하였다.

[0014] 본 발명에 있어서 pDEST-Flag는 클로닝된 cDNA를 발현시키기 위해서 만들어진 벡터로, 발현을 조절하기 위해 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 cDNA의 5' '쪽에 가지고 있고, 발현된 단백질의 확인을 위해 Flac tag를 cDNA의 3' '쪽에 가지는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명에 있어서 벡터는 제한효소인 PciI과 SspI을 이용하여 절단할 수 있고, 이로 인해 단백질의 발현을 위한 프로모터와 단백질의 확인을 위한 Flac tag이 MUDENG의 cDNA의 5', 3' '쪽에 각각 붙어있는 형질전환 카세트를 만들고 분리해 낼 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서 형질전환 카세트는 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 cDNA의 5' '쪽에 가지고 있고, Flag tag를 cDNA의 3' '쪽에 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에 있어서 형질전환 카세트는 도 1의 개열도를 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 있어서 MUDENG 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에 있어서 MUDENG 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 형질전환 동물 모델의 DNA를 추출하여 전체 유전자를 시퀀싱하였을 때, MUDENG 유전자가 쥐의 3번 염색체에 어떤 단백질도 암호화하고 있지 않은 위치에 들어갔음을 확인 할 수 있었다 (도 2).

[0021] 또한, 본 발명의 형질전환 동물과 정상 동물의 교배에서 태어난 자손세대들 중 MUDENG 유전자가 삽입된 동물과 그렇지 않은 동물들을 구분하기 위하여 프라이머를 디자인 하였으며 (도 2), PCR을 통해 이를 확인할 수 있었다 (도 3).

[0022] 본 발명의 형질전환 동물 모델의 MUDENG이 과발현된 장기를 알아보기 위해 형질전환 동물과 정상 동물의 주요장기들을 적출하여 RT PCR을 시행하였고, 뇌, 폐, 간, 피부, 고환, 혈액 등의 장기에서 MUDENG이 발현되고 있는 것을 확인하였다 (도 4).

[0023] 본 발명에 있어서 형질전환 동물 모델은 뇌, 폐, 간, 피부, 고환 및 혈액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상

의 기관에서 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 과발현되는 것일 수 있다.

- [0024] 본 발명에 있어서 형질전환 동물 모델은 흉선, 심장 및 비장으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 기관에서 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 과발현되지 않는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서 형질전환 동물 모델은 간섬유화가 쉽게 촉진되고, 일시적인 탈모현상이 일어나는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서 동물은 포유동물인 것일 수 있으며, 예를 들어, 마우스인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에 있어서 동물 모델은 마우스의 수정란을 이용하여 형질전환되는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 형질전환 동물 모델은 생후 약 15일경부터 전신의 털이 빠지기 시작하여 24일경 대부분의 털이 빠졌다가, 약 30일 경부터 다시 털이 나기 시작하는 것을 특징으로 한다 (도 5).
- [0029] 본 발명의 형질전환 동물 모델은 간손상을 주기 위하여 사염화탄소 (CCl₄)를 복강 내로 주었을 때 정상 동물보다 간섬유화가 빠르게 진행되는 것을 특징으로 한다 (도 6).
- [0030] 본 발명의 다른 일 예는 하기의 단계를 포함하는 상기 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델의 제조방법에 관한 것이다:
- [0031] MUDENG 유전자 및 프로모터가 삽입된 형질전환 카세트를 제조하는 형질전환 카세트 제조 단계;
- [0032] 형질전환 카세트를 배아에 주입하여 수정란을 제조하는 수정란 단계; 및
- [0033] 수정란을 착상시키는 착상 단계.
- [0034] 본 발명에 있어서 형질전환 카세트는 CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 cDNA의 5 '쪽에 가지고 있고, Flag tag를 cDNA의 3' 쪽에 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서 MUDENG 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 있어서 MUDENG 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에 있어서 형질전환 동물 모델은 뇌, 폐, 간, 피부, 고환 및 혈액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 기관에서 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 과발현되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서 형질전환 동물 모델은 흉선, 심장 및 비장으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 기관에서 MUDENG 유전자 및 MUDENG 단백질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 과발현되지 않는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서 형질전환 동물 모델은 간섬유화가 쉽게 촉진되고, 일시적인 탈모현상이 일어나는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서 동물은 포유동물인 것일 수 있으며, 예를 들어, 마우스인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에 있어서 동물 모델은 마우스의 수정란을 이용하여 형질전환되는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서 동물 모델에 대한 상기 기재와 동일한 부분은 생략한다.

발명의 효과

- [0043] 본 발명의 MUDENG 유전자 및/또는 단백질을 과발현하도록 형질전환된 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 동물 모델에서는 간손상에 의한 간섬유화가 촉진되고 일시적인 탈모효과가 일어나는 것을 관찰할 수 있으며, 이를 통해 MUDENG 유전자가 간섬유화의 과정과 일시적인 탈모현상에 어떤 영향을 미치는지 연구할 수 있고, 이는 간섬유화와 탈모현상에 대한 이해를 도울 수 있을 뿐 아니라, 그 두 가지 현상이 어떻게 관련되어 있는지 발견할 수 있는 좋은 수단이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 MUDENG 유전자가 과발현되는 형질전환 쥐를 제조하기 위한 형질전환 카세트를 만들기 위한 전구체인 pDEST-MUDENG:Flag의 구조를 보여주고 있으며, 상기 형질전환 카세트를 분리한 후 확인한 것을 보여주는 그림이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 MUDENG 유전자가 과발현되는 형질전환 쥐를 만든 후 전체 유전자 시퀀싱을 통하여 알아낸 MUDENG 유전자가 삽입된 염색체의 위치를 나타내고 있으며, 자손세대의 확인을 위하여 디자인한 PCR 프라이머의 위치를 나타낸 그림이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 도 2에서 나타낸 프라이머를 통해 PCR을 시행하여 자손세대에 MUDENG 유전자가 전해졌음을 나타내는 그림이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 MUDENG 유전자가 과발현되는 형질전환 쥐의 MUDENG이 과발현된 장기를 알아보기 위해 RT PCR을 시행하여, 뇌, 폐, 간, 피부, 고환 및 혈액에서 MUDENG이 발현되고 있는 것을 나타낸 그림이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 MUDENG 유전자가 과발현되는 형질전환 쥐에서 일시적인 탈모현상이 일어나는 것을 관찰한 그림이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 MUDENG 유전자가 과발현되는 형질전환 쥐에서 간손상을 주었을 때 일반 쥐보다 간섬유화가 더 빠르게 진행되는 것을 보여주는 그림이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 MUDENG 유전자가 과발현되는 형질전환 쥐에서 간손상을 주었을 때 일반 쥐보다 간섬유화가 더 빠르게 진행되는 것을 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1. MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐의 제조

[0048] 1-1. MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐의 제조

[0049] MUDENG 유전자가 과발현되는 쥐를 만들기 위해, CMV (cytomegalovirus) 프로모터와 Flag tag를 가지고 있는 벡터인 pDEST-Flag에 Gateway system을 이용하여 MUDENG 유전자를 암호화하는 cDNA를 클로닝하여 pDEST-MUDENG:Flag를 제조하였다. 이렇게 제조된 벡터를 제한효소인 PciI과 SspI을 이용하여 절단하였고, MUDENG 유전자를 암호화하는 cDNA의 5'쪽에 CMV 프로모터가 붙어있고 3'쪽에 Flac tag이 붙어있는 형질전환 카세트를 분리할 수 있었다. 분리된 형질전환 카세트를 C57BL/6 쥐의 배아에 주입한 다음, 이 배아를 암컷 쥐 (Macrogen Inc., Seoul, Korea)에 착상시켜 형질전환 마우스를 제조하였다.

표 1

[0050]

서열번호	명명	서열목록	비고
1	MUDENG_gene	ATGGCGCAGCGGCAGTGTGGCTCATAAGCCACGAACCGGGAACCTCCACTTTGTGGCACCCTGA GATTCTCCAGACGGTATCCAACGTGTTGAAAAACGAGCCAGAGTCTTCAATGGAGCAAGTTATGT GCCTGTTCCTGAAGATGGTCCCTTTCTTAAAGCACTGCTCTTTGAACCTAGATTATTGGATGAT GATAAAGACTTCGTTGAGAGTCGTGATAGCTGTTACGCATCAATAAACATCCATTATGGAC TCCTGATAGGAGGTGAAGAACTCTGGCCAGTTGTTGCTTTTCTGAAGAATGACATGATATATGC TTGTGTTCCACTAGTTGAACAACTCTGTCCCTCGTCCGCCACTAATTAGTGTGCTGAGTGGAGTT TCACAAGGCTTTGAATTTCTTTTGGGATACAGGATTTTCTTTATTCAGGTCAAAAAATGACT CTGAGCTGAATACAAAATTGAGCCAGTTGCCTGACTTGCTTCTGCAGGCTTGCCATTGTTGAC TTTATTAGATGCCAACTTACAGAATTCATTAGATAATACCAATTTTGCATCTGTGACTCAGCCA CAGAAACAGCCAGCTTGGAAAACCTGGGACGTACAAAGGAAAACCACAAGTTTCTATTCTATCA CTGAAAAGGTAAAATCCATGCAATATGATAAACAGGATATAGCAGATACATGGCAAGTTGTTGG AACAGTGACTTGCAAGTGTGATTGGAAGGAATCATGCCAAATGTTACCATCAGCTTGAGTCTC CCCACCAATGGATCTCCACTTCAGGATATTCTAGTTCACCCTTGTTAACTTCTCTTGACTCTG CAATTCTGACTTCTAGTAGTATTGATGCAATGGATGACTCTGCATTTAGTGGGCTTACAAATT TCCATTCACTCCACCTTTAGAGTCATTCAACTTATGCTTCTACACTTCCAGGTCCTGTCCCA CCAATTTGGGTTTTTATCAAAATGAAGGAGGAAGAAGTACAATAAGAATAACCATTAATTTAA AACTTCATGAAAGTGTGAAAAATAATTTGAATTCTGTGAAGCCCATATACCTTTTACAATAG AGGTCCAATTACACATTTGGAATACAAAACCTAGTTTGGCCAGCTTGAAGTATTTGAGAGAAA AGCTTATTGATCTGGATTATTGGCCAGAAGTCCCAAAATCAATGGAATTAGTCTTTCTGGAA CTGTAACCTTTGGAGCCAAGAGCCATGAGAAGCAGCCATTGACCCAATTTGTACTGGAGAAAC AGCATATTTAAAGCTTCATTTTAGGATCTTAGATTACACACTTACTGGATGTTATGCAGATCAG CATTCAAGTTCAAGTTTTGCATCAGGAAAACAAAAATAAGTGCACACCGGAACTAATTTCTT CTGATTATTACATCTGGAATTCTAAAGCCCCtGCTCCAGTAACATATGGATCATTATTAT	
2	MUDENG_protein	MAQRAVWLI SHEPGTPLCGTVRFSRRYPTEKRRVFNNGASYVVPEDGPFLLKALLFELRLDD DKDFVESRDSCSRINKTSIYGLLIGGEELWPVFAFLKNDMIYACVPLVEQTLSPRPPLISVSGV SQGFELFLGIQDFLYSGQKNDSELNKLSQLPDLLQACPFGLLDANLQNSLDNTNFASVTQP QKQPAWKGTGYKGPQVSI SITEKVKSMQYDKQGIADTWQVVGTVTCKDLEGIMPVNTISLSL PTNGSPLQDILVHPCVTSLSDAILTSSSIDAMDDSAFSGPYKFPFTPPLSEFNLCFYTSQVFPV PILGFYQMKKEEVQLRITINLKLHESVKNNEFCEAHIPFYNRGPI THLEYKTSFGQLEVFREK SLLIWIIGQKFKPSMEISLSGTVTFGAKSHEKQPFDPICETAYLKLHFRILDYTLTGCVADQ HSVQVFASGKPKISAHRKLISSDYIWNKAPAPVTYGSLL	

[0052]

1-2. MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐의 확인

[0053]

1-1에서 제조한 MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐를 확인하기 위해, 형질전환 쥐의 꼬리조직에서 genomic DNA를 추출하여 PCR 방법으로 확인하였다. 먼저 쥐 꼬리를 약 0.5 cm정도 잘라낸 후, SNET 버퍼 (10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 40 ug proteinase K)를 넣고 55 °C에서 하룻밤 동안 용해시켰다. 용해된 조직은 초음파 분쇄기를 이용하여 10 %의 진폭 (amplitude)으로 0.5 초간 4번 초음파를 가하여 분쇄하였다. 상기 분쇄된 조직에서 페놀-클로로포름 추출법 (phenol-chloroform extraction)을 이용하여 genomic DNA를 추출해내고, DNase free 증류수에 녹인 후 농도를 측정하였다. 상기 DNA 200g을 주형으로 하여 MUDENG cDNA를 목적으로 하는 PCR을 시행하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 프라이머의 위치는 도 2에 나타내었고, 서열은 하기의 표 2에 나타내었다.

표 2

[0054]

서열번호	명명	서열목록	비고
3	P1	agttacagcctttcccatccgag	
4	P2	acttttgtcctgtgcatgatagg	
5	P3	gccatttaccgtaagttatgtaacg	

[0056]

도 2 및 3에서 확인할 수 있듯이, MUDENG이 삽입된 형질전환 쥐인 Tg (transgenic)-a1,2,3 에서는 MUDENG이 제 자리에 잘 들어간 것으로 나타났으며, 정상쥐인 WT (wild type)-a1,2 에서는 MUDENG이 들어가지 않은 것으로 나타났다.

[0058] 1-3. MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐에서의 장기별 MUDENG의 발현 확인

[0059] 1-1에서 제조한 형질전환 쥐의 각 조직을 약 100 mg정도씩 채취하고 잘게 잘라주었다. 잘게 자른 조직에 RNA 추출 버퍼 (Trizole - Qiagen Korea, Seoul, Korea)를 1 ml씩 넣고 균질기를 이용하여 조직을 분해하였다. 실온에서 5분 동안 세포가 분해될 수 있도록 반응시키고, 각 조직별로 트리azole (Trizole) 1 ml당 0.2 ml의 사염화탄소를 넣어주었다. 충분히 잘 섞어준 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액만 새 튜브에 옮겨 담았다. 0.5 ml의 이소프로필 알코올을 넣고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후, 상층액은 버리고 0.6 ml의 70% 에탄올을 넣고 같은 조건으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 완전히 버리고 에탄올이 완전히 제거될 때까지 RNA pellet을 말리고, 에탄올이 다 날아간 RNA pellet은 RNase free 증류수에 녹였다. 모든 RNA는 농도 측정 후 Random hexamer를 이용하여 동일한 조건에서 cDNA를 합성하는데 이용하였다. cDNA합성 시 각 조직별 총 RNA는 5 ug씩 사용하였으며, cDNA 합성 후 MUDENG-FLAG특이적 서열을 가진 프라이머를 이용하여 PCR로 조직별 MUDENG-FLAG의 발현을 RNA 수준에서 확인하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다. MUDENG-FLAG 특이적 프라이머의 서열은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

서열번호	명명	서열목록	비고
6	P4-Mudeng-flag RTprimer Forward	gatgttatgcagatcagc	
7	P5-Mudeng-flag RTprimer Reverse	ctacttatcatcgctcgtc	
8	GAPDH RT primer Forward	accacagtccatgccatcac	
9	GAPDH RT primer Reverse	caccaccctgttgctgtagcc	

[0062] 도 4에서 확인할 수 있듯이, MUDENG이 삽입된 형질전환 쥐의 뇌, 폐, 간, 피부, 고환, 혈액 등의 기관에서는 MUDENG mRNA가 잘 발현되는 것으로 나타났으며, MUDENG이 삽입된 형질전환 쥐의 흉선, 심장, 비장과 정상 쥐의 모든 기관에서는 발현이 관찰되지 않았다.

[0064] 실시예 2. MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐의 탈모현상 관찰

[0065] 2-1. 형질전환 쥐의 관찰과 피부의 고정

[0066] MUDENG 유전자가 과발현되는 쥐는 일시적으로 전신의 털이 빠지는 것을 특징으로 한다. 이에, 털이 빠지기 시작할 때, 털이 다 빠졌을 때 및 털이 새로 나기 시작할 때를 관찰하기 위해, 형질전환 쥐와 정상 쥐를 10마리를 각각 3일마다 관찰하고, 한 마리씩 피부를 벗겨서 그 조직학적인 모습을 관찰하였다. 피부조직을 온전히 얻기 위하여 제모는 하지 않았으며, 머리 부분부터 꼬리 위 쪽까지 1 cm의 폭으로 조직을 길게 잘라내서 머리 쪽 피부 조직이 안쪽으로 들어갈 수 있도록 하여 꼬리 쪽까지 말아주었다. 말아준 피부조직이 풀어지지 않도록 가벼운 실로 묶어주고 4% 포르말린 (formalin)에 고정시켰다.

[0068] 2-2. 파라핀 블록의 제조

[0069] 상기 고정된 시료들을 모아서 70% 에탄올에 넣고 하룻밤 동안 4℃에 보관하였다. 파라핀 처리는 Leica TP-1020 Semi-enclosed Benchtop Tissue Processor를 사용하였고, 그 방법은 제조자가 제공한 설명서의 지침에 따랐으며, 각 단계마다 2시간씩 행구어 주어서 조직에 용액이 충분히 침투될 수 있도록 하였다. 모든 처리과정이 끝나고 파라핀이 침투된 조직은 카세트에 심어서 파라핀 블록을 만들었다. 파라핀 블록은 마이크로톰을 이용하여 5 um의 두께로 박절하여 슬라이드글라스에 붙여주었다.

[0071] 2-3. H&E 염색 (Hematoxylin and Eosin staining)

[0072] 상기 조직이 붙은 슬라이드 글라스를 홀더에 넣고 자일렌 (Xylene)에 3분씩 3번 넣어서 파라핀을 제거하였다.

그 다음, 염색하기 위해 100 % 에탄올에 30초씩 2번, 95 % 에탄올에 30초씩 2번, 70 % 에탄올에 30초, 증류수에 2분 동안 넣어서 조직을 수화 (hydration)시켰다. 수화시킨 조직은 헤마톡실린 (hematoxylin) 용액에 넣고 4분 간 염색한 후, 증류수에서 헤마톡실린을 완전히 씻어내고 0.25 M HCl에서 3초, 0.25 M 암모니아에서 10초간 씻어주었다. 그 다음, 70 % 에탄올부터 100% 에탄올까지 에탄올의 농도를 높여가며 씻어내어 조직을 탈수시켰다. 마지막으로 자일렌으로 2분씩 3회 씻어준 다음 마린올 (Malinol)로 조직을 고정하고 커버글라스로 조직을 덮어준 후 40배 배율의 현미경으로 관찰하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0073] 도 5에서 확인할 수 있듯이, MUDENG 유전자가 과발현되는 쥐는 생후 약15일경부터 털이 빠지기 시작하며 (퇴행기, catagen), 약 24일경에 대부분이 빠졌으며, 약30일경부터 털이 다시 나기 시작하는 것을 관찰할 수 있었다 (성장기, anagen).

[0075] 실시예 3. MUDENG 유전자가 삽입된 형질전환 쥐의 간섬유화 관찰

[0076] 3-1. 형질전환 쥐의 간손상 유발과 파라핀 블록의 제조

[0077] MUDENG 유전자가 과발현되는 쥐는 간손상에 의한 간섬유화가 더욱 촉진되는데, 이를 비교하기 위해 8주령의 정상수컷 쥐 (C57BL/6) 40 마리와 동일 주령의 본 발명의 MUDENG 유전자가 과발현되는 쥐 40마리를 준비하였다. 각 쥐들에게는 사염화탄소와 올리브 오일을 1:7의 부피의 비로 섞은 후 쥐의 복강에 1주일에 2회씩 4주간, 20~25 g의 쥐는 40 uℓ씩 주사하고 25 g 이상은 50 uℓ씩 주사하였다. 간손상의 진행을 관찰하기 위해 2주마다 각 10마리의 쥐를 잡아 간을 절제한 후, 상기 실시예 2와 같이 파라핀 블록으로 만든 후 마이크로톰을 이용하여 5 um 의 두께로 박절하여 슬라이드글라스에 붙여주었다.

[0079] 3-2. 시리우스 레드 염색 (Sirius Red staining)

[0080] 상기 조직이 붙은 슬라이드 글라스를 홀더에 넣고, 실시예 2-3의 H&E 염색 때와 같이 파라핀을 제거하고 수화시킨 후, 1시간 동안 picro-sirius red 시약으로 콜라겐을 염색하였다. 그리고 아세트산으로 간단하게 씻어내고 70 %부터 100 %까지 에탄올의 농도를 높여가며 씻어내어 조직을 탈수시켰다. 마지막으로 조직을 자일렌으로 2분씩 3번 씻어주고 마린올로 조직을 고정한 후 커버글라스로 덮어주고 100배 배율의 현미경으로 관찰하였다.

[0082] 3-3. 시리우스 레드 염색 정도의 비교

[0083] 상기 염색한 조직의 염색 정도를 비교하여 간섬유화의 정도를 비교하기 위하여, 포토샵을 이용하여 색추출 기능을 통해 염색정도를 수치화 하였다. 수치의 신뢰도를 높이기 위하여 각 간마다 12장의 각각 다른 부분의 사진을 찍은 후 하나의 그림으로 합쳐서 염색정도를 측정하여, 그 결과를 도 6 및 7에 나타내었다

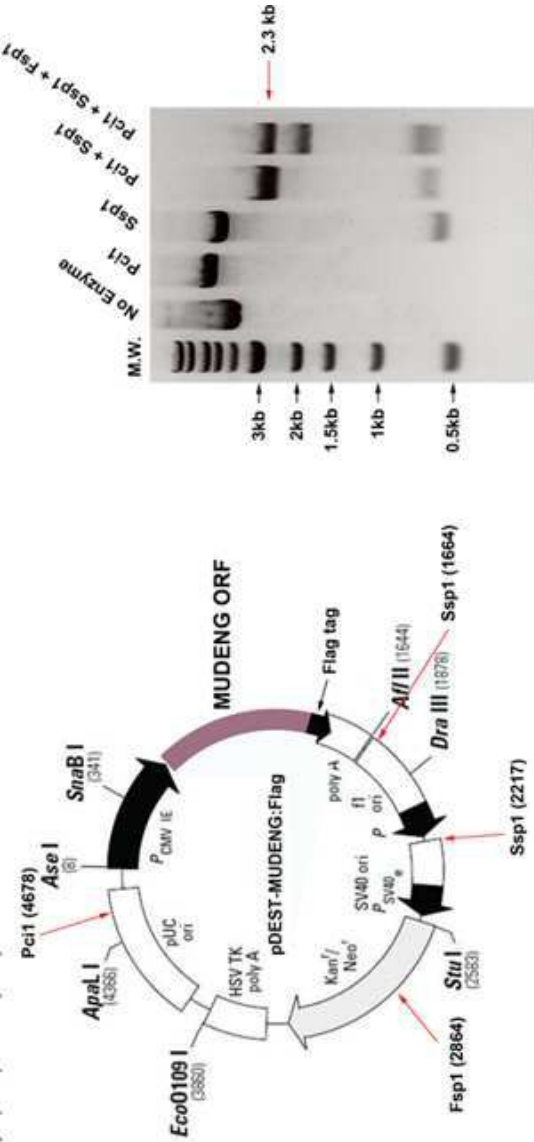
표 4

% Collagen area	C57BL/6	Mudeng Tg	BL6 STDEV	Mud STDEV
None	0.384%	0.360%	0.158%	0.178%
CC14-2 weeks	0.671%	0.911%	0.250%	0.318%
CC14-4 weeks	1.298%	2.512%	0.478%	0.784%
CC14-6 weeks	1.845%	2.865%	0.803%	1.035%

[0086] 도 6 및 7에서 확인할 수 있듯이, MUDENG 유전자가 과발현되는 쥐에서 사염화탄소를 이용하여 간손상을 유발시켰을 때, 정상 쥐에 비해서 간섬유화가 더욱 촉진되는 것을 관찰할 수 있었다.

도면

도면1

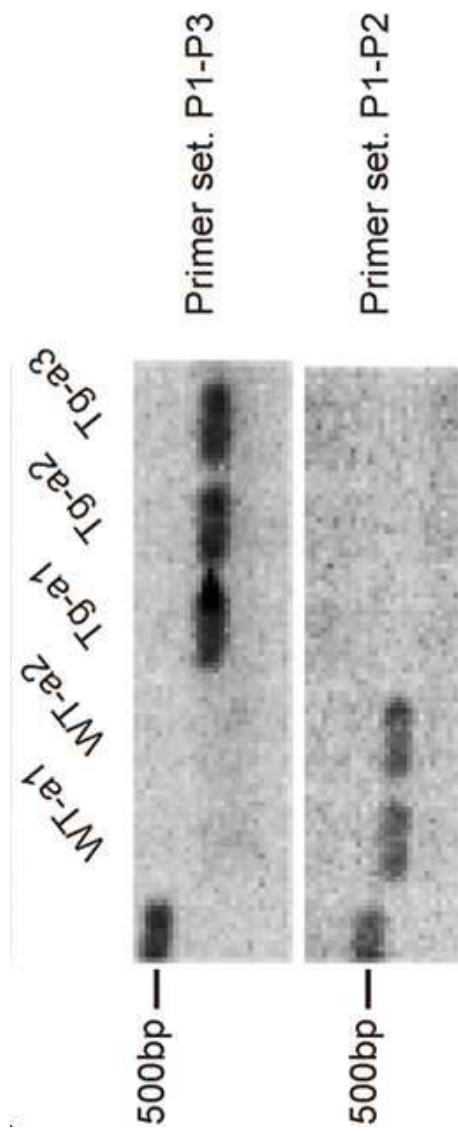


Size from Pci1 to Ssp1 (1664): about 2.3 kb, This fragment contains MUDENG ORF.

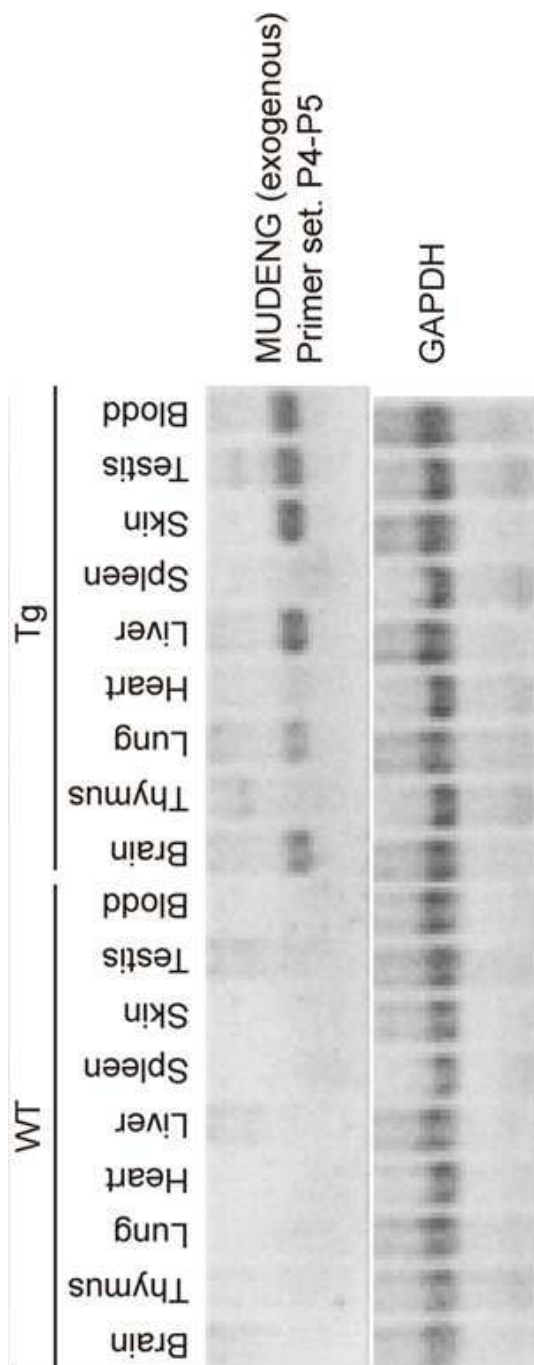
Size from Ssp1 (1664) to Ssp1 (2217): 550 bp

Size from Ssp1 (2217) to Pci1 (4678): 2.4 kb

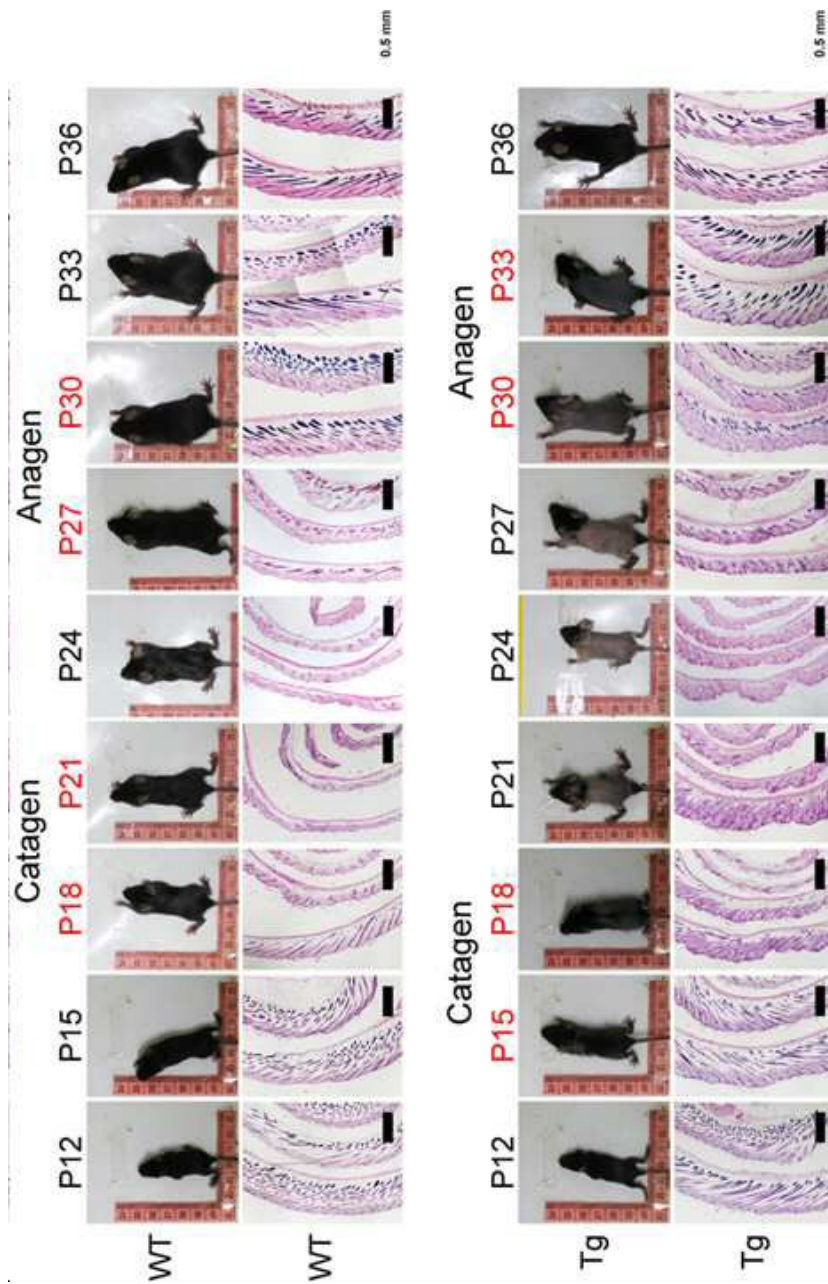
도면3



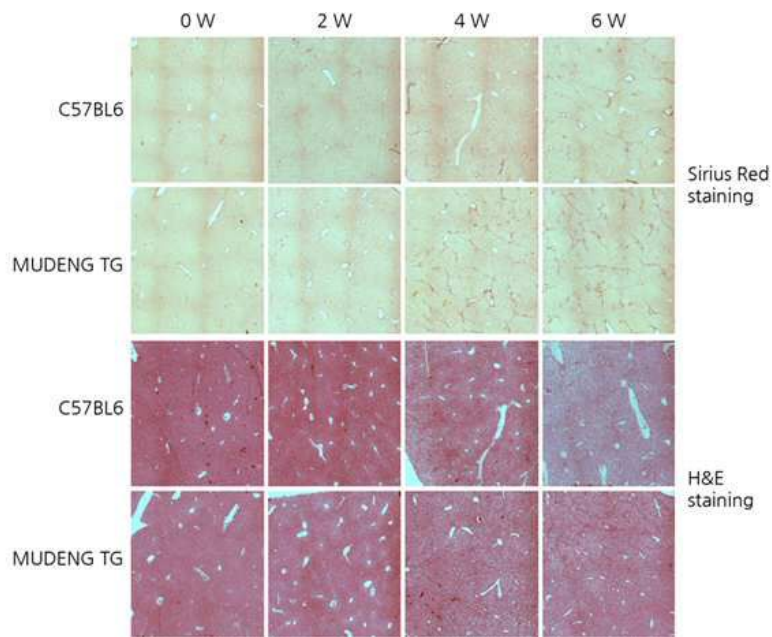
도면4



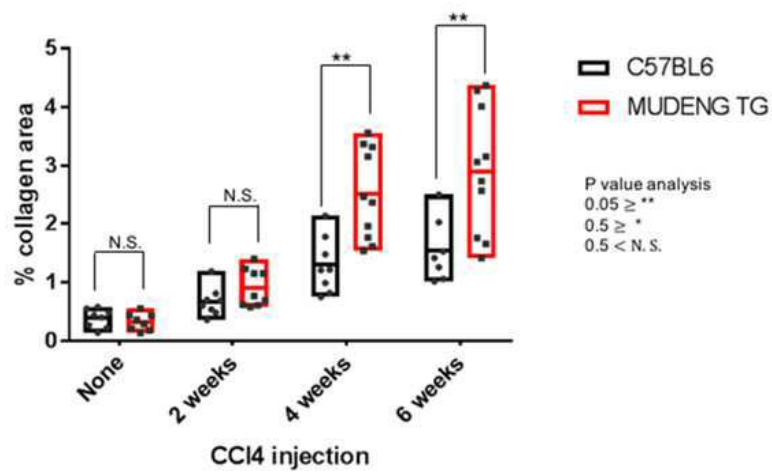
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Animal model transformed to overexpress MUDENG gene and/or protein and method for manufacturing the same
- <130> PN200062
- <160> 9
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1468
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MUDENG_gene

<400> 1

atggcgagc gggcagtg gtcataagc cacgaaccgg gaactccact ttgtggcacc 60

gtgagattct ccagacggta tccaactgtt gaaaaacgag ccagagtctt caatggagca 120

agttatgtgc ctgttcctga agatgggtccc ttctttaaag cactgctctt tgaacttaga 180

ttattggatg atgataaaga cttcgttgag agtcgtgata gctgttcacg catcaataaa 240

acatccattt atggactcct gataggaggt gaagaactct ggccagttgt tgcttttctg 300

aagaatgaca tgatataatg ttgtgttcca ctagtgaac aaactctgtc ccctcgtccg 360

ccactaatta gtgtcagttg agtttcacaa ggctttgaat ttctttttgg gatacaggat 420

tttctttatt caggtcacaa aaatgactct gagctgaata caaaattgag ccagttgcct 480

gacttgcttc tgcaggcttg tccatttggg actttattag atgccaactt acagaattca 540

ttagataata ccaattttgc atctgtgact cagccacaga aacagccagc ttggaaaact 600

gggacgtaca aaggaaaacc acaagtttct atttctatca ctgaaaaggt aaaatccatg 660

caatatgata aacagggtat agcagatata tggcaagttg ttggaacagt gacttgcaag 720

tgtgatttgg aaggaatcat gccaaatgtt accatcagct tgagtctccc caccaatgga 780

tctccacttc aggatattct agttcaccct tgtgtaactt ctcttgactc tgcaattctg 840

acttctagta gtattgatgc aatggatgac tctgcattta gtgggcctta caaatttcca 900

ttcactccac ctttagagtc attcaactta tgettctaca cttcccaggt ccctgtccca 960

ccaattttgg gtttttatca aatgaaggag gaagaagtac aactaagaat aaccattaat 1020

ttaaaacttc atgaaagtgt gaaaaataat ttggaattct gtgaagccca tatacctttt 1080

tacaatagag gtccaattac acatttggaa taaaaacta gttttggcca gcttgaagta 1140

tttcgagaga aaagcttatt gatctggatt attggccaga agttcccaa atcaatggaa 1200

attagctttt ctggaactgt aacttttggg gccaaagagc atgagaagca gccatttgac 1260

ccaatttgta ctggagaaac agcatattta aagcttcatt ttaggatctt agattacaca 1320

cttactggat gttatgcaga tcagcattca gttcaagttt ttgcatcagg aaaacaaaaa 1380

ataagtgcac accggaact aatttcttct gattattaca tctggaattc taaagccctt 1440

gctccagtaa catatggatc attattat 1468

<210> 2

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MUDENG_protein

<400> 2

Met Ala Gln Arg Ala Val Trp Leu Ile Ser His Glu Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Cys Gly Thr Val Arg Phe Ser Arg Arg Tyr Pro Thr Val Glu Lys

20 25 30

Arg Ala Arg Val Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Val Pro Val Pro Glu Asp

35 40 45

Gly Pro Phe Leu Lys Ala Leu Leu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Asp Asp

50 55 60

Asp Lys Asp Phe Val Glu Ser Arg Asp Ser Cys Ser Arg Ile Asn Lys

65 70 75 80

Thr Ser Ile Tyr Gly Leu Leu Ile Gly Gly Glu Glu Leu Trp Pro Val

85 90 95

Val Ala Phe Leu Lys Asn Asp Met Ile Tyr Ala Cys Val Pro Leu Val

100 105 110

Glu Gln Thr Leu Ser Pro Arg Pro Pro Leu Ile Ser Val Ser Gly Val

115 120 125

Ser Gln Gly Phe Glu Phe Leu Phe Gly Ile Gln Asp Phe Leu Tyr Ser

130 135 140

Gly Gln Lys Asn Asp Ser Glu Leu Asn Thr Lys Leu Ser Gln Leu Pro

145 150 155 160

Asp Leu Leu Leu Gln Ala Cys Pro Phe Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn

165 170 175

Leu Gln Asn Ser Leu Asp Asn Thr Asn Phe Ala Ser Val Thr Gln Pro

180 185 190

Gln Lys Gln Pro Ala Trp Lys Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Gln

195 200 205

Val Ser Ile Ser Ile Thr Glu Lys Val Lys Ser Met Gln Tyr Asp Lys

210 215 220

Gln Gly Ile Ala Asp Thr Trp Gln Val Val Gly Thr Val Thr Cys Lys

225 230 235 240
 Cys Asp Leu Glu Gly Ile Met Pro Asn Val Thr Ile Ser Leu Ser Leu

 245 250 255
 Pro Thr Asn Gly Ser Pro Leu Gln Asp Ile Leu Val His Pro Cys Val
 260 265 270
 Thr Ser Leu Asp Ser Ala Ile Leu Thr Ser Ser Ser Ile Asp Ala Met
 275 280 285
 Asp Asp Ser Ala Phe Ser Gly Pro Tyr Lys Phe Pro Phe Thr Pro Pro
 290 295 300
 Leu Glu Ser Phe Asn Leu Cys Phe Tyr Thr Ser Gln Val Pro Val Pro
 305 310 315 320

 Pro Ile Leu Gly Phe Tyr Gln Met Lys Glu Glu Glu Val Gln Leu Arg
 325 330 335
 Ile Thr Ile Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Val Lys Asn Asn Phe Glu
 340 345 350
 Phe Cys Glu Ala His Ile Pro Phe Tyr Asn Arg Gly Pro Ile Thr His
 355 360 365
 Leu Glu Tyr Lys Thr Ser Phe Gly Gln Leu Glu Val Phe Arg Glu Lys
 370 375 380
 Ser Leu Leu Ile Trp Ile Ile Gly Gln Lys Phe Pro Lys Ser Met Glu

 385 390 395 400
 Ile Ser Leu Ser Gly Thr Val Thr Phe Gly Ala Lys Ser His Glu Lys
 405 410 415
 Gln Pro Phe Asp Pro Ile Cys Thr Gly Glu Thr Ala Tyr Leu Lys Leu
 420 425 430
 His Phe Arg Ile Leu Asp Tyr Thr Leu Thr Gly Cys Tyr Ala Asp Gln
 435 440 445
 His Ser Val Gln Val Phe Ala Ser Gly Lys Pro Lys Ile Ser Ala His
 450 455 460

 Arg Lys Leu Ile Ser Ser Asp Tyr Tyr Ile Trp Asn Ser Lys Ala Pro
 465 470 475 480

Ala Pro Val Thr Tyr Gly Ser Leu Leu

485

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1

<400> 3

agttacagcc ttcccatcc gag 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2

<400> 4

acttttgtcc tgtcatgat agg 23

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3

<400> 5

gccatttacc gtaagttatg taacg 25

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P4-Mudeng-flag RTprimer Forward

<400> 6

gatgttatgc agatcagc 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5-Mudeng-flag RTprimer Reverse

<400> 7

ctacttatca tcgtcgtc 18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH RT primer Forward

<400> 8

accacagtcc atgcatcac 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH RT primer Reverse

<400> 9

caccaccctg ttgctgtagc c 21