



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월12일
 (11) 등록번호 10-1392942
 (24) 등록일자 2014년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/033 (2014.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-0126382
 (22) 출원일자 2010년12월10일
 심사청구일자 2013년03월06일
 (65) 공개번호 10-2012-0065061
 (43) 공개일자 2012년06월20일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR100655913 B1
 JP2000510001 A
 Endocrinology Vol. 144(11),
 pp.4826-4830(2003)
 JP2004137276A

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
유권
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
이규선
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
김애경
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 15 항

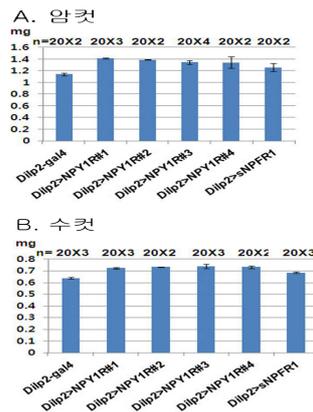
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리를 이용한 비만 치료제 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 인간 신경펩티드 수용체 형질전환 초파리를 이용한 비만 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 상기 형질전환 초파리가 NPY/NPY1R 신호전달체계를 통하여, ERK의 인산화를 증가시키고, ERK 신호전달의 하위 단계인 Dilp 유전자의 발현을 증가시키며, NPY1R 형질전환 초파리에서 개체의 크기가 증가되고, 섭식 행동이 증진되는 표현형을 관찰함으로써, 이를 이용하여 NPY1R의 활성을 조절시키는 비만 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 이용할 수 있음을 알 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 KGM3310912
 부처명 과학기술부
 연구사업명 주요사업(연구개발과제)
 연구과제명 초파리 모델을 이용한 신경펩타이드 기전연구
 기여율 1/2
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2009.01.01 ~ 2009.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 20090080870
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 기초연구지원사업
 연구과제명 대사질환 조절을 위한 신경펩타이드 F 신호전달 기능 연구
 기여율 1/2
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2009.05.01 ~ 2010.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

인간 NPY1R(Neuropeptide Y 1 receptor) 유전자를 초파리에 도입하여 제조된, 인간 NPY1R 형질전환 초파리.

청구항 2

제 1항에 있어서, NPY1R 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리.

청구항 3

제 1항에 있어서, 인간 NPY1R 형질전환 초파리는 ERK(Extracellular signal-regulated kinases)의 인산화가 정상 대조군에 비하여 증가하는 것을 특징으로 하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리.

청구항 4

제 1항에 있어서, 인간 NPY1R 형질전환 초파리는 Dilp 유전자의 발현이 정상형 대조군에 비하여 증가하는 것을 특징으로 하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리.

청구항 5

제 4항에 있어서, Dilp 유전자는 Dilp1, Dilp2, Dilp3 및 Dilp5인 것을 특징으로 하는 초파리.

청구항 6

수탁번호 KCTC11814BP로 기탁된, 인간 NPY1R 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 7

- 1) 인간 NPY1R(Neuropeptide Y 1 receptor) 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 단계 1)의 NPY1R 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 단계 1)의 벡터는 pUAST 벡터인 것을 특징으로 하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 단계 1)의 벡터는 P-인자 매개 생식세포 형질전환방법(P-element-mediated germ line transformation)을 이용하여 도입되는 것을 특징으로 하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는 방법.

청구항 11

- 1) 실험군으로서 제 1항의 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 1항의 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 섭식 행동 또는 체중변화를 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)에서 측정한 섭식 행동 또는 체중변화가 무처리 대조군 초파리와 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

청구항 12

- 1) 실험군으로서 제 1항의 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 1항의 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 ERK(Extracellular signal-regulated kinases)의 인산화를 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)에서 측정한 ERK의 인산화가 무처리 대조군 초파리와 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 단계 2)의 ERK의 인산화는 웨스턴 블롯을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

청구항 14

- 1) 실험군으로서 제 1항의 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 1항의 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 Dilp의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 Dilp의 인산화가 대조군과 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 단계 2)의 Dilp의 발현 정도는 역전사 증합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 인간 신경 펩티드 수용체(Neuropeptide Y 1 receptor, NPY1R) 형질전환 초파리, 이의 제조 방법, 및

[0001]

상기 형질전환 초파리를 이용한 비만 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 비만(Obesity)은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다 섭취할 경우 체 지방이 과다하게 축적된 상태로써 에너지 불균형에 의해 유발되는 질병이다. 비만은 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환 등과 같은 혈액 순환계 질병을 유발할 뿐만 아니라 제2형 당뇨병, 지방간, 퇴행성 관절염, 담석증, 일부 암질환 등 다양한 질환들을 유발시키는 것으로 알려져 있으며, 발병률은 전 세계적으로 지속적으로 증가하는 추세이다.
- [0003] 이러한 비만을 치료하기 위하여 다양한 약물들이 사용되고 있는데 크게 식욕억제제와 지방의 흡수를 저해하는 약물로 구분되고, 이 중 장기간 복용이 허가된 약물로는 시부트라민(sibutramine)과 오르리스타트(orlistat)등이 있다. 이러한 약물들은 다양한 부작용을 초래하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 섭식행동과 성장에 관련된 대사과정을 표적으로 하여 부작용을 최소화할 수 있는 비만치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- [0004] 체내에 존재하는 많은 종류의 신경펩티드(Neuropeptide, NPY)는 개체의 섭식행동을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 특히 뇌의 시상하부에서 발현되는 포유류 NPY(neuropeptide Y)라 불리는 36개의 아미노산으로 이루어진 신경펩티드가 개체의 섭식행동을 촉진시키고, 에너지 소비를 억제함으로써 개체의 몸무게와 신진대사 호르몬을 증가시켜 비만을 유발한다는 것이 알려져 있다. 랫트의 뇌 시상하부에 NPY를 투여한 연구에서는 개체의 과식증 및 비만 형질이 유발된 것으로 나타났다(Emeson RB *et al.*(2005) *Sci STKE* 2005, pe12; Wahlestedt C *et al.*(1993) *Science* 259, 528-531).
- [0005] 현재 Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 및 Y6의 서브타입(subtype)이 NPY 수용체로서 알려져 있다(Trends in Pharmacological Sciences, Vol.18, 372(1997)). 개체의 섭식행동을 조절하는 NPY는 여러 종류의 NPY 수용체(NPYR)들 중 NPY1R과 NPY5R가 주로 NPY의 신호를 전달하는데 관여하는 것으로 알려져 있고, 그의 길항제는 항비만제로서 기대된다는 것이 제안되어 왔다(Peptides, Vol.18, 445(1997), Nature, Vol.382, 168(1996)).
- [0006] 특히 NPY1R은 G 단백질 연관 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR)로서 NPY와의 친화력이 NPY5R보다 높으며, 에너지 항상성을 조절하는 시상하부를 포함한 뇌에서 많은 양이 발현되고, 사람의 신장, 심장, 폐, 결장, 정소, 부신, 태반, 척수, 혈관 근육 등 다양한 조직에서도 발현되는 것으로 보고되었다(Caberlotto L *et al.*(1997) *Eur. J. Neurosci.*, 9: 1212-1225). 설치류에서는 NPY1R에 대한 작용약 투여가 섭식행동을 증가시켰고, 그 결과 NPY1R의 활성이 식욕증진 작용을 유도함을 알 수 있었다(Gerald C *et al.*(1996) *Nature*, 382: 168-171). 반면, NPY1R 결핍된 마우스의 경우에는 NPY를 투여함에도 불구하고 섭식행동이 증가되지 않는 것으로 나타났다(Kanatani A *et al.*(2000) *Endocrinology*, 141, 1011-1016). 이와 같은 결과들은 NPY1R이 개체의 섭식행동을 조절하는데 중요한 역할을 수행하는 것을 알 수 있다.
- [0007] 초파리의 sNPF는 포유류 NPY의 상동 유전자로서 개체의 크기와 섭식행동을 조절하는 것으로 알려져 있다(Lee KS *et al.*(2004), *J Biol Chem* 279: 50781-50789). sNPF/sNPF1R 신호전달체계는 인슐린생성세포 내 신호연관 키나아제(extracellular signal-related-kinase, ERK)를 활성화시켜, 포유류의 인슐린과 유사한 초파리의 인슐린 펩티드 유전자(insulin-like peptide; Dilp)를 발현시킨다. 상향 조절된 Dilp 펩티드는 체내로 분비되어 지방체와 같은 표적 조직의 인슐린 신호전달체계를 활성화시킨다. 이는 포유류 췌장 유래 세포주에서도 초파리와 마찬가지로 NPY/NPYR 신호전달체계가 ERK-인슐린신호전달을 조절함을 확인하였다(Lee KS *et al.*(2008), *Nat Cell Biol*, 10: 468-475).
- [0008] 이와 같은 결과들은 포유류와 초파리 사이에 NPY/NPYR 신호전달체계가 잘 보존되어 있음을 말해줌으로써 초파리 모델동물을 인간의 질병치료를 위한 신약개발에 이용할 만한 가치가 있음을 보여준다. 이전의 많은 연구결과들도 초파리가 인간의 질병에 대한 증상이 같고, 저렴한 비용으로 대량의 신약 스크리닝이 가능한 장점을 가지고 있어 신약개발에 대한 이용가치가 높음을 보고하고 있다(Giacomotto J *et al.*(2010) *Br J Pharmacol*. 160(2):204-16).

[0009] 이에, 본 발명자들은 NPY1R 유전자를 형질전환시킨 초파리를 제조하여, 상기형질전환된 NPY1R 형질전환 초파리에서 NPY1R이 발현하고, NPY/NPY1R 신호전달체계를 통하여 ERK의 인산화가 증가하며, ERK의 하위 신호전달체계인 Dilp 유전자의 발현이 증가함을 확인하였으며, 상기 NPY1R 형질전환 초파리의 체중 및 섭식이 증가함을 확인함으로써, 상기 NPY1R 형질전환 초파리를 비만 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리를 제공하는 것이다.
 [0011] 본 발명의 다른 목적은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리의 제조 방법을 제공하는 것이다.
 [0012] 본 발명의 본 발명의 다른 목적은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리를 이용한 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 NPY1R(Neuropeptide Y 1 receptor) 유전자를 초파리에 도입하여 제조된, 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC11814BP로 기탁된, 인간 NPY1R 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리 제조 방법을 제공한다:

- [0016] 1) 인간 NPY1R(Neuropeptide Y 1 receptor) 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- [0017] 2) 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는 방법.

[0018] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다:

- [0019] 1) 실험군으로서 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0020] 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 섭식 행동 또는 체중변화를 측정하는 단계; 및
- [0021] 3) 단계 2)에서 측정된 섭식 행동 또는 체중변화가 무처리 대조군 초파리와 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

[0022] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다:

- [0023] 1) 실험군으로서 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0024] 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 ERK(Extracellular signal-regulated kinases)의 인산화를 측정하는 단계; 및
- [0025] 3) 단계 2)에서 측정된 ERK의 인산화가 무처리 대조군 초파리와 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

- [0026] 아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0027] 1) 실험군으로서 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0028] 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 Dilp의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [0029] 3) 단계 2)의 Dilp의 인산화가 대조군과 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리는 NPY/NPY1R 신호전달체계를 통하여 ERK의 인산화를 증가시키고 이의 하위단계 유전자인 Dilp 유전자의 발현을 증가시켰으며, 개체의 크기가 증가되고 섭식행동이 증진되는 표현형을 관찰할 수 있었다. 따라서, 이러한 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리를 이용하여 NPY1R과 상호작용하여, 이들 수용체에서의 NPY의 활성을 조절시키는 화합물을 스크리닝하여, NPY를 포함한 신경 호르몬의 불균형과 관련된 비만 및 대식증과 같은 섭식 질환, 및 고혈압과 같은 특정 심혈관 질환의 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리를 제조하는 방법을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리에서 인간 신경 펩티드의 발현을 확인한 결과이다:
- 도 2의 A는 sNPRF-Gal4에 UAS-NPY1R을 교배시킨 후, 발생된 인간 신경 펩티드 sNPRF>NPY1R 초파리에서 NPY1R의 발현을 확인한 RT-PCR 결과이다; 및
- 도 2의 B는 Dilp2-Gal4에 UAS-NPY1R을 교배시킨 후, 발생된 인간 신경 펩티드 Dilp2>NPY1R 초파리에서 NPY1R의 발현을 확인한 RT-PCR 결과이다.
- 도 3은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리에서 ERK의 인산화를 확인한 그림이다:
- 도 3의 A는 sNPRF>NPY1R 초파리에서 ERK의 인산화를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다; 및
- 도 3의 B는 Dilp2>NPY1R 초파리에서 ERK의 인산화를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 4는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리에서 Dilp 유전자의 발현을 분석한 결과이다:
- 도 4의 A는 sNPRF>NPY1R 초파리에서 Dilp 1, 2, 3, 및 5의 발현을 관찰한 RT-PCR 결과이다; 및
- 도 4의 B는 Dilp2>NPY1R 초파리에서 Dilp 1, 2, 3, 및 5의 발현을 관찰한 RT-PCR 결과이다
- 도 5는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리의 체중변화를 나타낸 그래프이다:
- 도 5의 A는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리 암컷의 체중변화를 나타낸 그래프이다;
- sNPRF1-gal4: 대조군 초파리;
- sNPRF1>NPY1R#1 내지 #4: 인간 신경 펩티드 수용체 과발현 초파리;
- sNPRF1>sNPRF1: 초파리 신경펩티드 수용체 과발현 초파리
- 도 5의 B는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리 수컷의 체중변화를 나타낸 그래프이다;
- sNPRF1-gal4: 대조군 초파리;
- sNPRF1>NPY1R#1 내지 #4: 인간 신경 펩티드 수용체 과발현 초파리;
- sNPRF1>sNPRF1: 초파리 신경펩티드 수용체 과발현 초파리
- 도 6은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리의 체중변화를 나타낸 그래프이다:

도 6의 A는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리 암컷의 체중변화를 나타낸 그래프이다;

Dilp2-gal4: 대조군 초파리;

Dilp2>NPY1R#1 내지 #4: 인간 신경 펩티드 수용체 과발현 초파리;

Dilp2>sNPFR1: 초파리 신경펩티드 수용체 과발현 초파리;

도 6의 B는 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리 수컷의 체중변화를 나타낸 그래프이다;

Dilp2-gal4: 대조군 초파리;

Dilp2>NPY1R#1 내지 #4: 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리;

Dilp2>sNPFR1: 초파리 신경펩티드 수용체 과발현 초파리.

도 7은 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리의 섭식행동 변화를 관찰한 그래프이다:

sNPFR-Gal4: 대조군;

sNPFR>NPY1R: UAS-NPY1R과 sNPFR1-Gal4를 교배시킨 sNPFR1>NPY1R 형질전환 초파리.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0033]

본 발명은 인간 NPY1R(Neuropeptide Y 1 receptor) 유전자를 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 도입하여 제조된, 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제공한다.

[0034]

상기 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 있어서, NPY1R 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열(GenBank NM_000909.4)을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 인간 NPY1R 유전자는 pUAST 벡터(GenBank: CS482686.1)에 도입하여 형질전환되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 인간 NPY1R 형질전환 초파리는 ERK(Extracellular signal-regulated kinases)의 인산화가 정상 대조군에 비하여 증가하는 것이 바람직하며, 또한 인간 NPY1R 형질전환 초파리는 Dilp 유전자의 발현이 정상형 대조군에 비하여 증가하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 발현이 증가되는 Dilp 유전자는 Dilp1, Dilp2, Dilp3 및 Dilp5인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0035]

본 발명의 구체적인 실시예에서, 인간 신경 펩티드 수용체(Neuropeptide Y 1 receptor, NPY1R) 형질전환 초파리를 제조하기 위하여, 인간 신경 펩티드 수용체 클론을 포함하는 재조합 벡터를 제조하여, 이를 sNPFR1-Gal4 또는 Dilp2-Gal4 초파리에 도입시켜 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하였다(도 1 참조). 제조된 인간 NPY1R 형질전환 초파리(sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R)에 도입된 NPY1R이 발현을 확인하였으며(도 2 참조), 이러한 NPY1R이 ERK의 인산화에 영향을 미치는지 확인한 결과 도 3에 나타난 바와 같이 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 ERK의 인산화가 증가되는 것이 관찰되었다(도 3 참조). 또한, ERK의 하위 단계인 Dilp 유전자의 발현을 관찰하였을 때, 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 Dilp 유전자의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 4 참조). 그 후, 본 발명자들은 상기 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 표현형을 관찰하고자, 형질전환 초파리의 암, 수를 구분하여 이의 섭식행동의 변화와 체중증가를 관찰하였으며, 그 결과 도 5와 도 6에 나타난 바와 같이, 체중이 암, 수 모두에서 증가하였다(도 5, 도 6 참조). 또한, 섭식 행동이 인간 NPY1R 형질전환 초파리 암, 수 모두에 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 7 참조).

[0036]

따라서, 본 발명에 따른 인간 신경 펩티드 수용체를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 제조된 형질전환 초파리는 NPY/NPY1R의 신호전달에 의한 ERK의 인산화, 이의 하위단계인 Dilp 유전자의 발현이 증가함으로써, 도입된 NPY1R이 정상적으로 작동하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 표현형 관찰시, 체중 및 섭식 행동이 증가하는 것을 통하여, 도입된 인간 신경 펩티드 수용체 유전자에 의해서 초파리의 표현형이 변화되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0037]

또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC11814BP로 기탁된, 인간 NPY1R 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

- [0038] 상기 벡터는 2010년 11월 25일에 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korea Collection for Type Culture, KCTC)에 기탁되었으며, NPY1R 유전자를 포함하는 벡터를 이용하여 본 발명에 따른 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는데 이용될 수 있다.
- [0039] 상기 벡터에 포함되는 인간 NPY1R 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열(GenBank NM_000909.4)을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 인간 NPY1R 형질전환 초파리 제조 방법을 제공한다:
- [0041] 1) 인간 NPY1R(Neuropeptide Y 1 receptor) 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- [0042] 2) 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는, 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 제조하는 방법.
- [0043] 상기 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 제조 방법에 있어서, 단계 1)의 NPY1R 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열(GenBank: NM_000909.4)을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 제조 방법에 있어서, 단계 1)의 벡터는 pUAST 벡터(GenBank: CS482686.1)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 인간 NPY1R 유전자를 함유하는 pUAST 벡터는 P-인자 매개 생식세포 형질전환방법(P-element-mediated germ line transformation)을 이용하여 초파리에 도입되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 인간 신경 펩티드 수용체를 포함하는 재조합 벡터(UAS-NPY1R)를 Dilp2-Gal4 또는 sNPFR1-Gal4 초파리에 도입시켰을 때, NPY1R이 도입된 형질전환 초파리에서 발현되었으며, NPY/NPY1R의 하위 단계인 ERK가 활성화되어 인산화되는 결과를 확인하였다. 또한, ERK 신호전달의 하위 단계에 있는 Dilp 유전자의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 아울러, 상기의 제조 방법에 의해서 제조된 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 표현형을 관찰하였을 때, 섭식 행동 및 체중이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0045] 따라서, 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된 인간 NPY1R 형질전환 초파리는 도입된 유전자가 성공적으로 발현하며, 이로 인한 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 개체 크기가 증가되고, 섭식 행동이 증가하는 표현형을 관찰할 수 있었다.
- [0046] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0047] 1) 실험군으로서 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0048] 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 섭식 행동 또는 체중변화를 측정하는 단계; 및
- [0049] 3) 단계 2)에서 측정한 섭식 행동 또는 체중변화가 무처리 대조군 초파리와 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.
- [0050] 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리는
- [0051] 서열번호 1로 기재되는 NPY1R의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 UAS-NPY1R을 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 도입시켜 제조된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 재조합 벡터 UAS-NPY1R가 도입된 초파리는 Dilp2-Gal4 또는 sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 또한, 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, Dilp2-Gal4 형질전환 초파리는 ERK 신호전달의 하위 단계인 Dilp2 유전자가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하며, sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리는 초파리의 소형 신경펩타이드 F 수용체가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 이용하여, 이의 섭식 행동 및 체중변화를 측정하였을 때, 암, 수 모두에서 섭식행동과 체중이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, 이러한 표현형을 이용하여 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리를 이용하여 섭식행동 및 체중을 감소시키는 비만의 예방 및 치료용 조성물을 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [0054] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0055] 1) 실험군으로서 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0056] 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 ERK(Extracellular signal-regulated kinases)의 인산화를 측정하는 단계; 및
- [0057] 3) 단계 2)에서 측정된 ERK의 인산화가 무처리 대조군 초파리와 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.
- [0058] 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리는 서열번호 1로 기재되는 NPY1R의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 UAS-NPY1R을 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 도입시켜 제조된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 재조합 벡터 UAS-NPY1R가 도입된 초파리는 Dilp2-Gal4 또는 sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 또한, 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, Dilp2-Gal4 형질전환 초파리는 ERK 신호전달의 하위 단계인 Dilp2 유전자가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하며, sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리는 초파리의 소형 신경펩타이드 F 수용체가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0060] 또한, 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, Dilp2-Gal4 형질전환 초파리는 ERK 신호전달의 하위 단계인 Dilp2 유전자가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하며, sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리는 초파리의 소형 신경펩타이드 F 수용체가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 단계 2)의 ERK의 인산화는 웨스턴 블롯을 이용하여 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0061] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리에서 ERK의 활성이 증가하였으며, 이러한 형질전환 초파리의 표현형 관찰결과, 섭식 행동 및 체중이 모두 증가하였으므로, ERK의 활성을 감소시킬 수 있는 피검물질을 스크리닝하여, 이를 비만의 예방 및 치료용 조성물을 제조를 위한 후보물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [0062] 아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0063] 1) 실험군으로서 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0064] 2) 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리에서 Dilp의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [0065] 3) 단계 2)의 Dilp의 인산화가 대조군과 비교하여 감소된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물의 스크리닝 방법.
- [0066] 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리는 서열번호 1로 기재되는 NPY1R의 유전자를 포함하는 재조합 벡터 UAS-NPY1R을 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 도입시켜 제조된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 재조합 벡터 UAS-NPY1R가 도입된 초파리는 Dilp2-Gal4 또는 sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 또한, 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, Dilp2-Gal4 형질전환 초파리는 ERK 신호전달의 하위 단계인 Dilp2 유전자가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하며, sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리는 초파리의 소형 신경펩타이드 F 수용체가 발현되는 형질전환 초파리인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0068] 또한, 상기 비만 예방 및 치료용 조성물 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 Dilp의 발현 정도는 역전사 증합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0069] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 인간 신경 펩티드 수용체 형질전환 초파리에서 ERK의 활성이 증가되고, 이의 하위 단계인 Dilp2 유전자의 발현이 증가하였다. 또한, 이러한 형질전환 초파리의 표현형을 관찰하였을 때, 섭식 행동 및 체중이 모두 증가하였으므로, Dilp2 유전자의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있는 피검물질을 스크리닝하여, 이를 비만의 예방 및 치료용 조성물을 제조를 위한 후보물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다.

- [0070] 이하, 본 발명을 실시예, 비교예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0071] 단, 하기 실시예, 비교예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 비교예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0072] <실시예 1> UAS-NPY1R 형질전환 초파리의 제조
- [0073] <1-1> 형질전환 초파리 준비 및 사육
- [0074] 초파리는 25℃, 60% 습도를 유지한 상태에서 표준 콘밀 배지(Standard Conmeal media)(7% 슈크로즈(sucrose), 5% 효모, 2.5% 아가(agar))를 이용하여 사육하였다. 야생형 Oregon-R, w- 초파리는 블룸िंग턴 초파리 연구 센터 [Bloomington Drosophila Stock Center(BDSC) Indiana, USA]에서 얻어서 사용하였다. Dilp2-Gal4 형질전환 초파리는 Rulifson 등이 발표한 내용에 기재되어 있다(Rulifson *et al.*(2002), Science. 296(5570):1118-1120).
- [0075] <1-2> NPY1R 발현 벡터의 클로닝
- [0076] NPY1R cDNA clone(hNPY1R in pCMV-SPORT6)을 구입하여, Kpn1의 제한 효소로 각각 절단한 다음, 동일한 제한 효소로 절단한 pUAST 벡터(Drosophila genome resource center, DGRC, Indiana, USA)에 삽입하여 UAS-NPY1R 벡터를 제조하였다.
- [0077] <1-3> NPY1R 발현 벡터의 초파리 형질 전환
- [0078] 공지의 방법인 P-인자 매개 생식세포 형질전환(P-element-mediated germ line transformation)을 통해 상기 실시예 <1-2-1>에서 제조한 UAS-NPY1R 발현 벡터로 형질전환된 초파리를 수득하였다(Rubin GM *et al.*(1982) Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. 357 Science 218: 348-353).
- [0079] <비교예 1> Dilp2-Gal4 대조군 초파리의 제조
- [0080] 초파리는 25℃를 유지한 상태에서 사육하였고, 대조군으로 사용한 Dilp2-Gal4 형질전환 초파리를 이용하였으며, Dilp2-Gal4 형질전환 초파리는 Rulifson 등이 발표한 내용에 기재되어 있다(Rulifson *et al.*(2002), Science. 296(5570):1118-1120).
- [0081] <비교예 2> sNPFR-Gal4 형질전환 초파리의 제조
- [0082] <2-1> Gal4 발현 벡터의 클로닝
- [0083] 본 발명자들은 UAS-NPY1R 형질전환 초파리에 대한 대조군으로서, 초파리 신경펩티드 수용체 신경세포에 특이적인 발현을 유도하는 sNPFR-Gal4 형질전환 초파리를 제조하고자 하였다.
- [0084] 대조군으로 사용하기 위해 초파리 뇌로부터 게놈 DNA 추출 키트(Qiagen, 미국)를 이용하여 게놈 DNA를 추출한 뒤, 서열번호 2(5'-CACTCGGATTTATGCGAAGCTGT-3')로 기재되는 정방향 프라이머 및 서열번호 3(5'-TTAACTCGCACTCTGGCCGT-3')로 기재되는 프라이머를 사용하였으며, 이를 PCR Mastermix(Promega, 미국)를 이용하여 sNPFR1 유전자의 2.4 Kb의 5'-비번역 부위(5'-untranslated region)를 PCR하였다.
- [0085] 상기 PCR 결과물을 pGEM T-easy vector에 삽입한 후, SpeI과 NotI의 제한 효소로 sNPFR1의 5'-비번역 부위를 분리하고, 이를 XbaI과 NotI의 제한 효소로 절단한 pGAL4 벡터(Drosophila genome resource center, DGRC, Indiana, USA)에 삽입하여 sNPFR1-Gal4 벡터를 제조하였다. 상기 PCR은 95℃에서 5분 동안 변성해 주고, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 2분 30초의 조건으로 35 회전을 돌린 후, 72℃에서 5 분 동안 신장시켜준 뒤, 4℃에서 냉각의 순서로 수행하였다.
- [0086] <2-2> Gal4 발현 벡터의 초파리 형질 전환

- [0087] 공지의 방법인 P-인자 매개 생식세포 형질전환(P-element-mediated germ line transformation)을 통해 상기 실시예 <1-3-1>에서 제조한 sNPFR1-Gal4 발현 벡터로 형질전환된 초파리를 획득하였다[Rubin GM *et al.*(1982) Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. 357 Science 218: 348-353].
- [0088] <비교예 3> sNPFR1>sNPFR1 형질전환 초파리의 제조
- [0089] 초파리의 Gal4/UAS 시스템을 이용하여, 초파리 신경펩티드 수용체 신경세포에 초파리 신경펩티드 수용체를 과발현 시키기 위해서 sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리와 UAS-sNPFR1 형질전환 초파리를 교배한 후 얻어진 sNPFR1>sNPFR1를 사용하였다. UAS-sNPFR1 형질전환 초파리의 제조 방법은 하기의 문헌에 기재되어 있다(Lee KS *et al.*(2008), Nat Cell Biol 10: 468-475).
- [0090] <비교예 4> Dilp2>sNPFR1 형질전환 초파리의 제조
- [0091] 초파리의 Gal4/UAS 시스템을 이용하여, 초파리 인슐린분비세포에 초파리 신경펩티드 수용체를 과발현시키기 위해서 Dilp2-Gal4 형질전환 초파리와 UAS-sNPFR1 형질전환 초파리를 교배한 후 얻어진 Dilp2>sNPFR1를 사용하였다. UAS-sNPFR1 형질전환 초파리의 제조 방법은 하기의 문헌에 기재되어 있다(Lee KS *et al.*(2008), Nat Cell Biol 10: 468-475).
- [0092] <실험예 1> UAS-NPY1R 형질전환 초파리의 NPY1R 발현 확인
- [0093] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조한 형질전환 초파리가 NPY1R 유전자의 발현을 유도할 수 있는지 확인하고자 UAS-NPY1R 형질전환 초파리를 각각 sNPFR1-Gal4, Dilp2-Gal4 라인과 교배시켜 NPY1R의 발현을 유도한 후 NPY1R의 발현을 RT-PCR을 통해서 확인하고자 하였다.
- [0094] 초파리의 Gal4/UAS 시스템을 이용하여, sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리와 Dilp2-Gal4 형질전환 초파리에 각각 UAS-NPY1R 형질전환 초파리를 교배한 후 얻어진 sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R 초파리와 이에 대한 대조군인 sNPFR1-Gal4, Dilp2>NPY1R 초파리의 머리로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, NPY1R 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.
- [0095] 구체적으로, cDNA의 합성은 easy-BLUE RNA 추출 키트(제조처를 기재하여 주시기 바랍니다.)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1 μ g과 Oligo-dT 1 μ l(Invitrogen, 미국)에 증류수를 13 μ l까지 채운 후, SuperScript First-Strand Synthesis System(Invitrogen, 미국)에 넣어 반응시켰다. 65 $^{\circ}$ C에서 5분, 4 $^{\circ}$ C에서 2분, 50 $^{\circ}$ C에서 60분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA 1 μ l을 주형으로 하여, 서열번호 4(5'-AGAAGAATGCCAGCTTCTGG-3')로 기재되는 NPY1R 정방향 프라이머 및 서열번호 5(5'-GTTACATTTTGAACG GCTCA-3')로 기재되는 역방향 NPY1R 프라이머 쌍, 및 PCR Premix(Bioneer, 한국)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성해 주고, 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초의 조건으로 30 회전을 돌린 후, 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 신장시켜준 뒤, 4 $^{\circ}$ C에서 냉각의 순서로 수행하였다.
- [0096] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, UAS-NPY1R을 sNPFR1-Gal4, Dilp2-Gal4와 교배시켜 발현을 유도한 sNPFR1>NPY1R과 Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리에서만 NPY1R 유전자의 발현이 관찰되나, 대조군인 sNPFR1-Gal4와 Dilp2-Gal4에서는 NPY1R이 발현되지 않음을 확인할 수 있었다(도 2).
- [0097] <실험예 2> 초파리에서 NPY1R에 의한 ERK-인슐린 경로의 활성화 확인
- [0098] <2-1> 초파리에서 NPY1R에 의한 ERK의 활성화
- [0099] 본 발명자들은 NPY1R이 발현되는 sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리에서 도입된 NPY1R의 정상적인 기능을 확인하기 위하여, sNPFR1/sNPFR1와 NPY/NPYR 신호전달체계의 하위 전달 단백질로 알려진 ERK의 활성을 관찰하고자 하였다. 이를 확인하기 위하여, sNPFR1-Gal4 형질전환 초파리(음성 대조군)와 Dilp2-Gal4 형질전환 초파리(음성 대조군), 및 각각에 UAS-NPY1R을 발현시킨 형질전환 초파리를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 ERK의 활성화를 관찰하였다.

[0100] 각각의 대조군과 NPYR을 발현시킨 형질전환 초파리의 머리를 분리한 후 이를 RIPA 버퍼[50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트(sodium deoxycholate)]를 이용하여 전체 단백질을 분리하였다. 상기 전체 단백질에서 ERK 단백질의 활성화를 항-ERK 항체(Diphospho-ERK; Sigma, 미국)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 확인하였다. 이때, 정량적 대조군으로서 β -액틴의 발현량을 함께 관찰하였다(항- β -액틴 항체; Abcam, 미국). 상기 웨스턴 블롯은 공지된 방법을 이용하여 수행하였다(Lee KS *et al.*(2004), J Biol Chem 279: 50781-50789).

[0101] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군인 sNPFR1-Gal4, Dilp2-Gal4와 비교하였을 때, sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리에서 ERK의 인산화가 유의하게 증가한 것을 관찰할 수 있었다(도 3).

[0102] <2-2> 초파리에서 NPY1R에 의한 Dilp mRNA의 발현 증가

[0103] 본 발명자들은 상기 실시예 <4-1>에서 제조한 NPY1R이 발현되는 sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리에서 NPY1R에 의해 ERK가 활성화되는 것을 확인하였다. 이에, 상기 ERK의 활성화에 의해 조절되는 하위 작용자인 Dilp 유전자(Dilp1, Dilp2, Dilp3, Dilp5)의 발현의 증가 여부를 확인하고자 하였다.

[0104] sNPFR1-Gal4(음성 대조군)와 Dilp2-Gal4(음성 대조군), 및 각각에 UAS-NPY1R을 발현시킨 형질전환 초파리의 머리로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, Dilp1, Dilp2, Dilp3, Dilp5에 대한 프라이머를 이용하여 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. 이때 rp49를 전체 cDNA의 정량적 대조군으로 사용하였다. 여기에 사용된 프라이머는 다음과 같다:

[0105] dilp1 정방향 프라이머 : 5'-ATGTTTAGCCAGCACAAACGGTGCA-3'(서열번호 6);

[0106] dilp1 역방향 프라이머 : 5'-CTATTCGGTAGACAGTAGATGGCT-3'(서열번호 7);

[0107] dilp2 정방향 프라이머 : 5'-ATGAGCAAGCCTTTGTCCTCATCT-3'(서열번호 8);

[0108] dilp2 역방향 프라이머 : 5'-CTAATTTCTGACCACGGAGCAGTAC-3'(서열번호 9);

[0109] dilp3 정방향 프라이머 : 5'-ATGGGCATCGAGATGAGGTGTCAG-3'(서열번호 10);

[0110] dilp3 역방향 프라이머 : 5'-TTACGTTCTCGGCTTGGCAGCACA-3'(서열번호 11);

[0111] dilp5 정방향 프라이머 : 5'-ATGTTCCGCTCCGTGATCCAG-3'(서열번호 12);

[0112] dilp5 역방향 프라이머 : 5'-TTAGGAGTCGAGTATGCCCT-3'(서열번호 13);

[0113] rp49 정방향 프라이머 : 5'-AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG-3'(서열번호 14); 및

[0114] rp49 역방향 프라이머 : 5'-CACCAGGAACTTCTTGAATCCGG-3'(서열번호 15).

[0115] sNPF/sNPFR 신호전달체계의 표적인자 중 하나인 Dilps의 발현을 분석한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 sNPFR1>NPY1R 형질전환 초파리에서 Dilp1, 2, 3의 발현이 유의하게 증가하였으며, Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리에서는 Dilp1, 2, 3, 5의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였다(도 4).

[0116] <실험예 3> UAS-NPY1R 형질전환 초파리의 성장 조절

[0117] <3-1> 초파리에서 NPY1R에 의한 체중 조절

[0118] 본 발명자들은 sNPF/sNPFR 신호전달이 개체의 크기와 섭식행동을 조절하기 때문에, 인간 NPY1R 과발현 초파리(sNPFR1>NPY1R)의 개체 무게를 측정하여 초파리 신경펩티드 수용체인 sNPFR 과발현 초파리(sNPFR1>sNPFR1)와 같은 표현형을 나타내는가를 분석하였다.

[0119] sNPFR1-Gal4(음성 대조군) 형질전환 초파리와 Dilp2-Gal4(음성 대조군) 형질전환 초파리를 각각 UAS-NPY1R 형질전환 초파리와 교배한 후 얻어진 sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리의 체중을 비교하였다.

[0120] 구체적으로는, 밀집에 의한 영양 부족을 막기 위하여, 5마리 암컷이 낳은 알을 25°C에서 6시간 동안 배양하였다. 이후, 태어난 지 3 내지 5일 정도의 암컷 20 마리의 체중을 저울(METTLER AJ100, 미국)에서 측정

하였다.

[0121] 그 결과, 도 5와 도 6에 나타난 바와 같이, 암수 모두에서 sNPFR1>NPY1R, Dilp2>NPY1R 형질전환 초파리의 무게가 대조군인 sNPFR1-Gal4, Dilp2-Gal4에 비해 증가된 것을 관찰하였다. UAS-NPY1R형질전환 초파리의 독립적인 4개 line들을 확인해 본 결과, 모두 초파리의 무게가 증가하는 표현형이 나타남을 확인할 수 있었다(도 5 및 도 6).

[0122] <3-2> 초파리에서 NPY1R에 의한 섭식 조절

[0123] 인간 NPY1R 형질전환 초파리의 섭식행동의 변화를 확인하기 위하여 sNPFR1-Gal4와 교배시킨 sNPFR1>NPY1R 형질전환 초파리를 청색색소(0.5% Bromophenol blue)가 포함된 효모 배지에서 단위 시간(10분) 동안 섭식행동을 취하게 한 후, 청색 색소가 포함된 효모 배지를 섭식한 섭식개체수를 통계 처리하여 NPY1R 발현에 따른 섭식행동을 분석하였다. 그 결과 NPY1R 형질전환 초파리 암수 모두에서 섭식행동이 증가한 것을 관찰할 수 있었다(도 7).

산업상 이용가능성

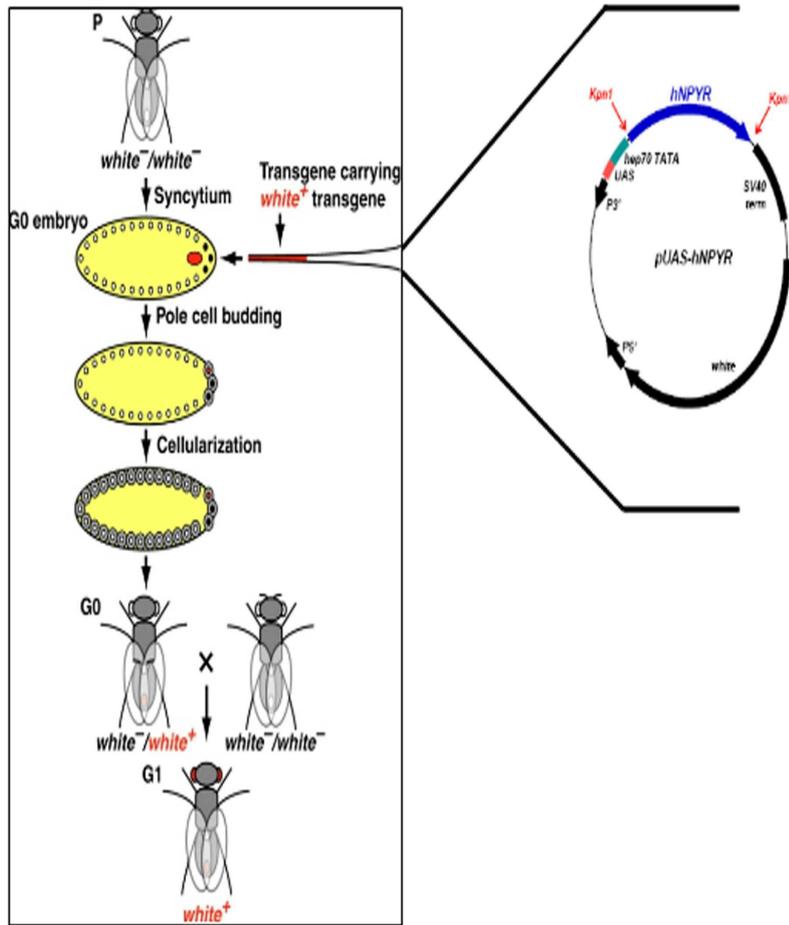
[0124] 본 발명에 따른 인간 NPY1R 형질전환 초파리를 이용하여 스크리닝 된, NPY1R과 상호작용하여 이들 수용체에서의 신경 펩티드 Y(NPY)의 활성을 조절시키는 화합물은 NPY를 포함한 신경호르몬의 불균형과 관련된 생리 질환, 예컨대 비만 및 대식증과 같은 섭식 질환, 및 고혈압과 같은 특정 심혈관 질환의 치료에 유용하다.

수탁번호

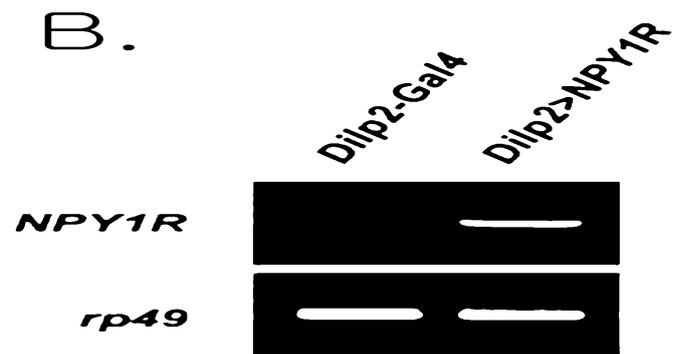
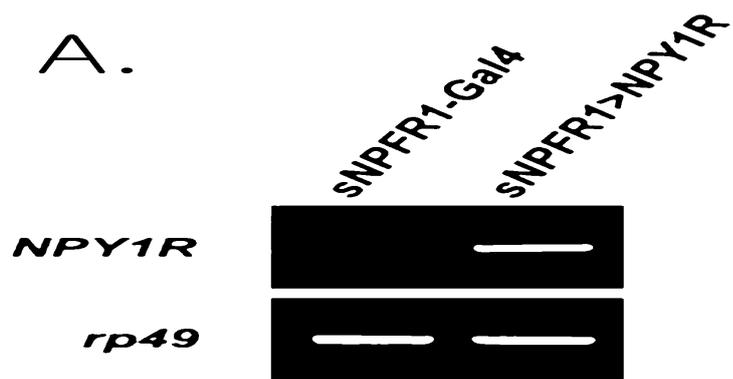
[0125] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC11814BP
 수탁일자 : 20101125

도면

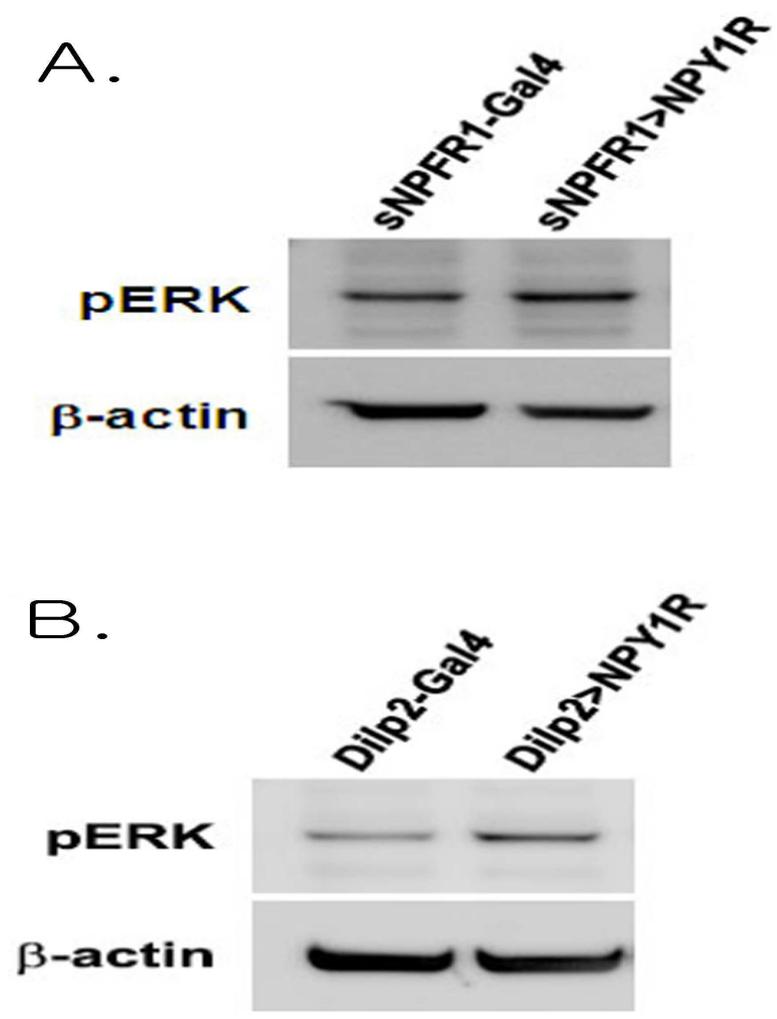
도면1



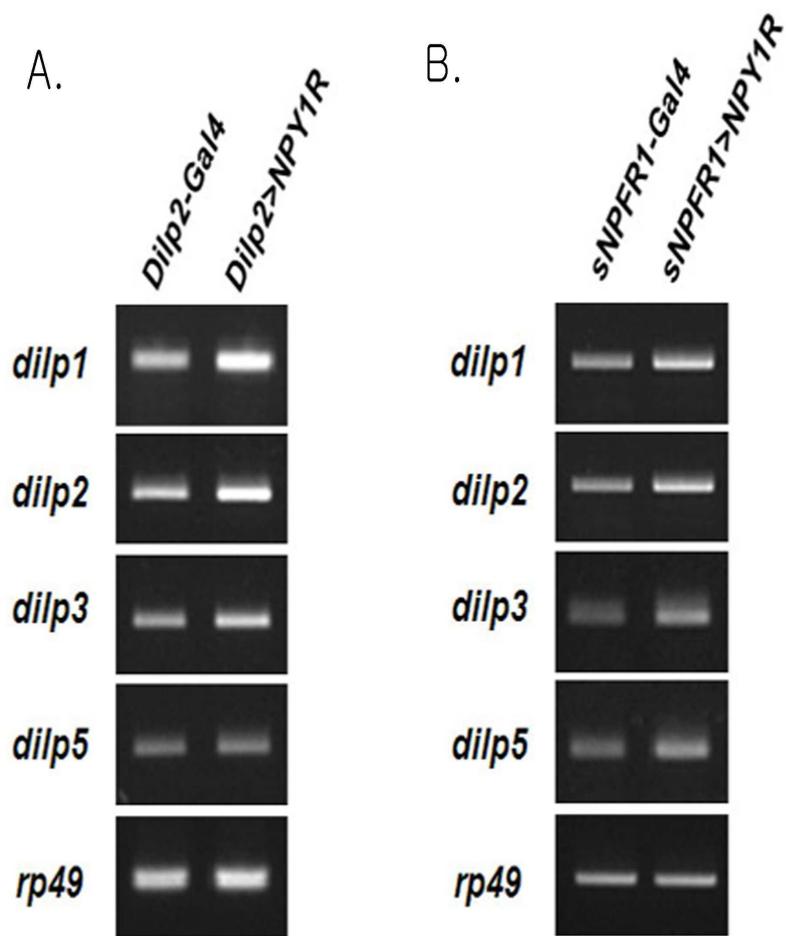
도면2



도면3

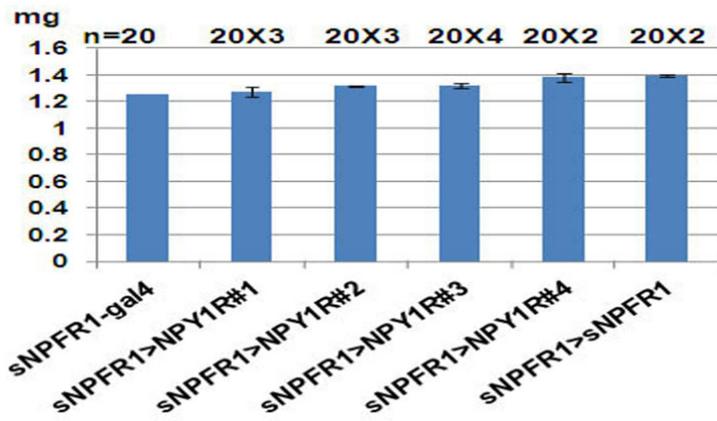


도면4

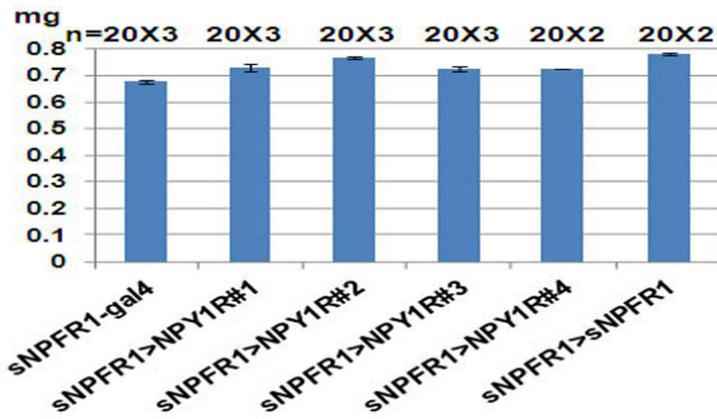


도면5

A. 암컷

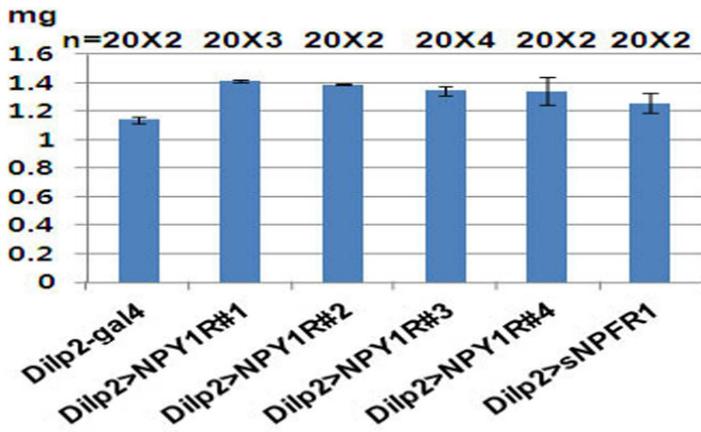


B. 수컷

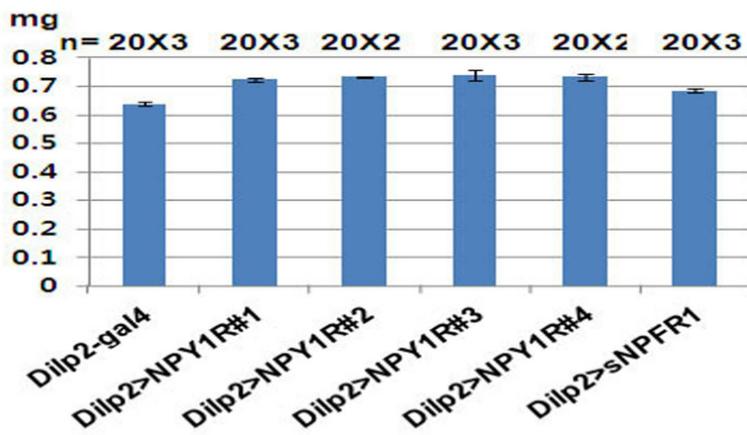


도면6

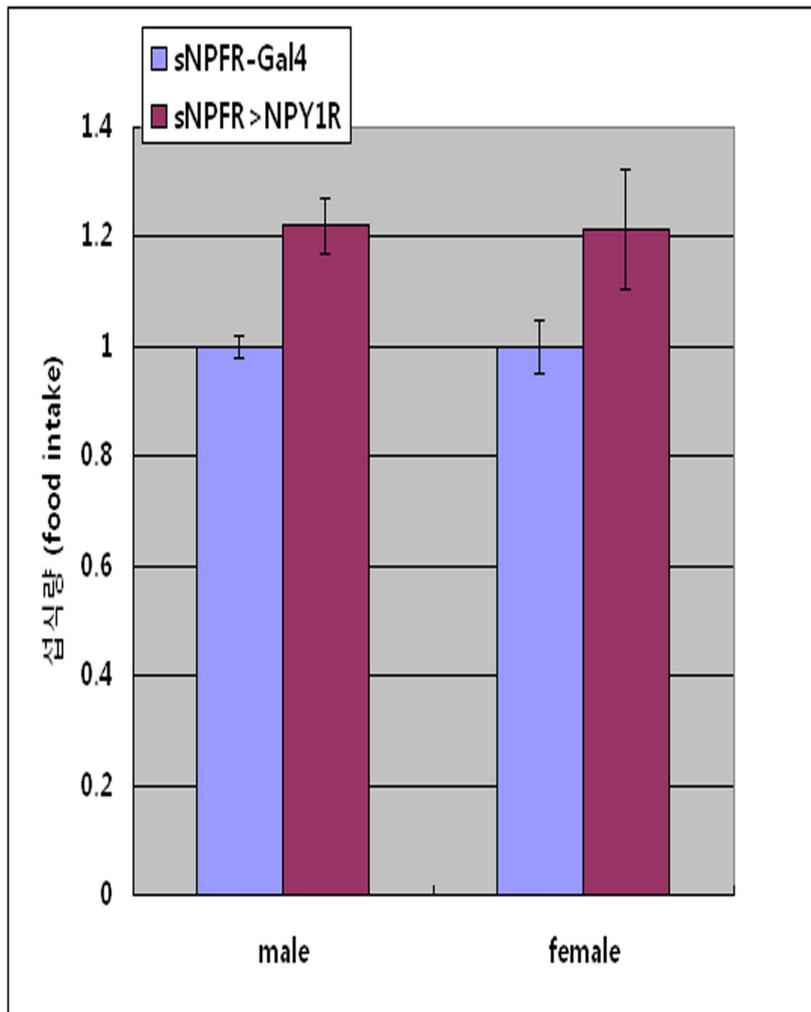
A. 암컷



B. 수컷



도면7



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)