



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0120882
(43) 공개일자 2022년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/17 (2016.01) A23L 2/38 (2021.01)
A23P 10/28 (2016.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/17 (2016.08)
A23L 2/38 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2021-0024612

(22) 출원일자 2021년02월24일

심사청구일자 2021년02월24일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명옥

경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호(호탄동, 대동디지털황토아파트)

(74) 대리인

최규환

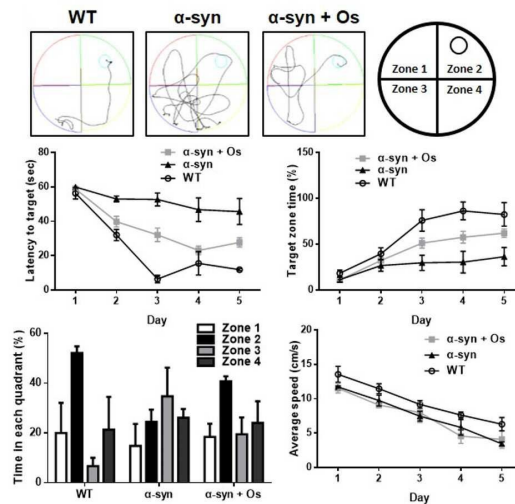
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 오스모틴 단백질은 MPTP/ α -시누클린에 의해 유도된 행동 및 운동능 부족을 완화시키고, 도파민 활성 신경을 보호하며, 신경염증관련 단백질의 발현량을 조절하며, MPTP/ α -시누클린에 의해 유도된 세포 사멸을 억제하고, α -시누클린(A53T)의 과발현에 의한 세포 손상 완화, AMPK 활성화 및 후속 자가포식(autophagy)에 의한 α -시누클린의 축적을 감소시키는 효과가 있으며, 수지상 복합체 구조를 조절하고, 추상세포(pyramidal neurons)에서 가시 밀도를 증가시키며, 인지 결손을 완화시키고, 시냅스 마커 발현을 회복시키는 효과가 있어 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료를 위한 건강기능식품 또는 의약품으로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도24



(52) CPC특허분류

A23P 10/28 (2016.08)
A61K 38/168 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
C07K 14/415 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/548 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119484
과제번호	2020M3E5D9080660
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌질환극복연구사업(R&D)
연구과제명	면역제어 타겟 신규 물질발굴 및 효능 검증 ; 신개념 파킨슨병 예방치료제 개발에

응용

기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 개선할 수 있는 (a)로부터 변이된 오스모틴 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 단백질은 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 오스모틴 단백질은 Nurr1(Nuclear receptor related 1 protein), VMAT2(vesicular monoamine transporter 2), DAT(dopamine transporter), TH(tyrosine hydroxylase), p-p38, p-JNK(c-Jun N-terminal kinase) 및 p-ERK(extracellular signal-regulated kinase) 단백질 중에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현량을 조절하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 변이된 오스모틴 단백질.

청구항 6

하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 신경질환은 신경세포(뉴런)의 점진적인 구조적, 기능적인 손실을 의미한다. 퇴행성 신경질환은 신경계의 특정부위를 주로 침범하여 치매, 추체외로 이상, 소뇌 이상, 감각 장애, 운동 장애 등의 증상을 동반하며, 동시에 여러 부위가 침범되어 복합적인 증상이 나타날 수도 있다. 환자가 보이는 임상 양상에 따라 진단을 하게 되는데, 이 경우 증상이 다양하고 서로 다른 질환들이 공통적인 임상 증상을 보이는 경우가 많아 진단이 어렵다.

[0003] 신경질환 중의 하나인 파킨슨병은 뇌의 흑질(substantia nigra, SNc)에 분포하는 도파민의 신경세포가 파괴되어

점차 소실되며 선조체(striatum)의 도파민 함량이 현저하게 감소되는 것이 특징인 질병이다. 안정 떨림, 경직, 운동 완만(서동) 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환이다. 파킨슨병 환자는 60세 이상에서 인구의 약 1% 정도로 추정된다.

[0004] 한편, 식물에서 유래된 오스모틴은 지방산 산화 조절, 글루코오스 수득, 인산화(AMP 키나아제) 및 신호 변환 경로에 관여한다. 오스모틴(24 kDa)은 당분-측정 단백질 타우마틴(sweet-testing protein thaumatin)과 상동성을 가지는 PR-5 패밀리에 포함되는 안정한 단백질이고, 효모에서 세포 내 신호 전달을 유도하는 것으로 알려져 있다. 오스모틴은 열, 산성 및 효소에 저항성을 가지므로 소화에 의해 분해되지 않고 신체를 순환할 수 있다. 이러한 오스모틴은 동물에 존재하는 아디포넥틴과 상동체로 알려져 있는데, 아디포넥틴의 경우 일부 항염증, 항당뇨, 항죽상경화 능력을 가질 가능성이 있다고 밝혀진 바 있다.

[0005] 또한 오스모틴은 주로 비만이나 당뇨병과 관련된 효과가 널리 알려져 있으며, 한국등록특허 제1308232호에 오스모틴을 함유하는 신경질환의 예방 및 치료용 조성물로 알려져 있으나, 본 발명의 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 아직까지 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 유효성분인 오스모틴 단백질은 MPTP/ α -시누클린에 의해 유도된 행동 및 운동능 부족을 완화시키고, 도파민 활성 신경을 보호하며, 신경염증 관련 단백질의 발현량을 조절하며, MPTP/ α -시누클린에 의해 유도된 세포 사멸을 억제하고, α -시누클린(A53T)의 과발현에 의한 세포 손상 완화, AMPK 활성화 및 후속 자가포식(autophagy)에 의한 α -시누클린의 축적을 감소시키는 효과가 있으며, 수지상 복합체 구조를 조절하고, 추상세포(pyramidal neurons)에서 가시 밀도를 증가시키며, 인지 기능 저하를 완화시키고, 시냅스 마커 발현을 회복시키는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 개선할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 단백질.

[0008] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 단백질.

[0009] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법을 제공한다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 단백질.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 오스모틴 단백질은 MPTP/ α -시누클린에 의해 유도된 행동 및 운동능 부족을 완화시키고, 도파민 활성 신경을 보호하며, 신경염증관련 단백질의 발현량을 조절하며, MPTP/ α -시누클린에 의해 유도된 세포 사멸을 억제하고, α -시누클린(A53T)의 과발현에 의한 세포 손상 완화, AMPK 활성화 및 후속 자가포식(autophagy)에 의한 α -시누클린의 축적을 감소시키는 효과가 있으며, 수지상 복합체 구조를 조절하고, 추상세포(pyramidal neurons)에서 가시 밀도를 증가시키며, 인지 결손을 완화시키고, 시냅스 마커 발현을 회복시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 MPTP 유도(A) 및 NSE-h α Syn 형질전환(B) 마우스에 오스모틴 단백질을 투여하고, 오픈 필드 테스트(OF T)에서 움직인 총 이동거리, 중앙에서의 이동거리 및 보내는 시간을 확인한 것이다. #, ##, ###은 대조군 대비

MPTP 또는 α -syn군의 움직인 총 이동거리 또는 중앙에서의 이동거리 및 머무른 시간이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이고, ##는 $p<0.01$ 이며, ###는 $p<0.001$ 이다. *은 MPTP 또는 α -syn군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 움직인 총 이동거리 또는 중앙에서의 이동거리 및 머무른 시간이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다. ns는 통계적으로 무의미한 변화를 의미한다.

도 2는 MPTP 유도(A) 및 NSE-h α Syn 형질전환(B) 마우스에 오스모틴 단백질을 투여하고, 봉 테스트(pole test) 및 줄에 매달리기 테스트(wire-hang test) 결과이다. #, ##, ###은 대조군 대비 MPTP 또는 α -syn군의 봉에서 바닥으로 내려오는 시간이 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 줄에 매달린 시간이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이고, ##는 $p<0.01$ 이며, ###는 $p<0.001$ 이다. *은 MPTP 또는 α -syn군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 바닥으로 내려오는 시간이 통계적으로 유의미하게 감소하였고, 줄에 매달리는 시간이 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다.

도 3은 오스모틴 단백질의 투여에 따른 SNpc에서의 TH-양성 신경의 수(A), 선조체(striatum) TH-양성 섬유 밀도(B)를 TH 형광 염색과, MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 TH 발현량(C)을 확인한 결과이다. ##, ###은 대조군(CTL) 대비 MPTP 유도군 또는 SE-h α Syn 형질전환 마우스군에서 TH-양성 신경의 수 또는 TH-양성 섬유 밀도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, ##는 $p<0.01$ 이며, ###는 $p<0.001$ 이다. *, **은 MPTP 유도군 또는 SE-h α Syn 형질전환 마우스군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 TH-양성 신경의 수 또는 TH-양성 섬유 밀도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이고, **는 $p<0.01$ 이다.

도 4는 SNpc 및 선조체에서 TH-양성 신경의 면역활성을 확인한 것으로, ###은 대조군(CTL) 대비 MPTP 유도군에서 신경 수(A) 및 선조체에서 TH-양성 신경섬유 밀도(B)가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, ###는 $p<0.001$ 이다. **은 MPTP 유도군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군에서 신경 수(A) 및 선조체에서 TH-양성 신경섬유 밀도(B)가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **는 $p<0.01$ 이다.

도 5는 오스모틴 투여에 따른 선조체(Striatum), SNpc 및 피질(Cortex)에서의 TH의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. ##, ###은 대조군(Con) 대비 MPTP 유도군의 발현량이 감소하였다는 것으로, ##는 $p<0.01$ 이며, ###는 $p<0.001$ 이다. *, **는 MPTP 유도군 대비 오스모틴 투여군(MPTP+Os)의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.01$ 이다.

도 6은 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 오스모틴 단백질 투여에 따른 SNpc의 Nurr1, DAT 및 VMAT2 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A) 및 이를 정량화한 그래프(B)이다. #, ##은 대조군(Con) 대비 MPTP 유도군의 발현량이 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이며, ##는 $p<0.01$ 이다. *, **는 MPTP 유도군 대비 오스모틴 투여군(MPTP+Os)의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.01$ 이다.

도 7은 MPP⁺로 유도된 SH-SY5Y 세포에서, MPTP 유도 및 오스모틴 처리에 따른 Nurr1, DAT, VMAT2 및 TH의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 8은 SNpc 및 선조체에서, MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 본 발명의 오스모틴 투여에 따른 p-p38/p38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK 단백질 발현량을 확인한 결과이다. #, ##은 대조군(CTL, WT) 대비 MPTP 또는 α Syn 군의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가 또는 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이며, ##는 $p<0.01$ 이다. *, **는 MPTP 또는 α Syn 군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소 또는 증가하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.01$ 이다.

도 9는 MPP⁺/ α -시누클레인(A53T)로 유도된 SH-SY5Y 세포에서, 오스모틴 단백질의 투여에 따른 p-ERK/ERK, p-JNK/JNK 단백질 발현량을 확인한 결과이다. #, ##, ###은 대조군(CTL, WT) 대비 MPP⁺ 또는 α Syn 군의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가 또는 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이며, ##는 $p<0.01$ 이고, ###는 $p<0.001$ 이다. *, **는 MPP⁺ 또는 α Syn 군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소 또는 증가하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.01$ 이다. ns는 통계적으로 무의미한 변화를 의미한다.

도 10은 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 선조체와 SNpc에서 오스모틴 투여에 따른 GFAP 및 Iba-1 발현량 변화를 확인한 것이다. #, ##은 대조군 대비 MPTP 군의 GFAP 및 Iba-1 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이며, ##는 $p<0.01$ 이다. *, **는 MPTP 군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 GFAP 및 Iba-1 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.01$ 이다. ns는 통계적으로 무의미한 변화를 의미한다.

도 11은 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 선조체 및 SNpc 영역에서 오스모틴 투여에 따른 GFAP 및 Iba-1의 발현을 면역 형광분석한 결과이다. ##, ###은 대조군 대비 MPTP 군의 GFAP 및 Iba-1 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, ##는 $p<0.01$ 이며, ###은 $p<0.001$ 이다. *, **는 MPTP 군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 GFAP 및 Iba-1 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.01$ 이다.

도 12는 선조체와 SNpc에서 오스모틴 투여에 따른 ROS 어세이 결과이다. #, ##은 대조군 대비 MPTP 군의 상대적 DCF(ROS 측정을 위한 염색 약물)의 측정량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이며, ##는 $p<0.01$ 이다. *는 MPTP 군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 상대적 DCF의 측정량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이다.

도 13은 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 SNpc 영역에서 오스모틴 투여에 따른 iNOS 및 COX-2의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 14는 MPTP/ α -시누클레인 유도군에서 오스모틴 투여에 따른 세포 생존률(A), 세포독성(B) 및 caspase-3/7(C) 활성 분석 결과이다. #, ###은 대조군 대비 MPTP/ α -시누클레인 유도군의 세포 생존률이 통계적으로 유의미하게 감소하고, 세포독성이 증가하였으며, caspase-3/7(C) 활성이 증가하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이며, ###은 $p<0.001$ 이다. *, **, ***은 MPTP/ α -시누클레인 유도군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 세포 생존률이 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 세포독성이 감소하였으며, caspase-3/7(C) 활성이 감소하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이며, **는 $p<0.001$ 이고, ***는 $p<0.001$ 이다.

도 15는 오스모틴 단백질 처리에 따른 MPTP/MPP⁺으로 유도된 신경세포 사멸에 관여하는 Bcl-2, Bcl-xL, Bax 및 사이토크롬-c(Cyto c)의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 16은 MPP⁺로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 오스모틴 처리에 따른 Bcl-2, Bcl-xL, Bax 및 절단된 caspase-3의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 17은 오스모틴 단백질 투여에 따른 NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 선조체(A) 및 SNpc(B)에서 세포사멸에 관여하는 Bcl-2, Bax, PARP-1, 사이토크롬 c 및 NeuN의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과와 α -시누클레인(A53T)으로 유도된 SH-SY5Y 세포(C)에서 세포사멸에 관여하는 Bcl-2, Bcl-xL, Bax, 사이토크롬 c 및 NeuN의 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 18은 MPTP/ α -시누클레인으로 유도된 선조체와 SNpc에 대한 신경 수(A, B) 및 PTP/NSE-h α Syn 마우스에서 Nissl 염색된 신경 수(C)를 확인한 것이다. ###은 대조군 대비, MPTP군의 신경 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.001$ 이고, *, **는 MPTP군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 신경 수가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *는 $p<0.05$ 이고, **는 $p<0.01$ 이다.

도 19는 오스모틴 투여에 따른 NSE-h α Syn 마우스의 CA1, CA3 및 DG 영역에서 Nissl 염색 결과이다.

도 20은 수지상세포 복합체의 구조(A), NSE-h α Syn 마우스의 수상돌기 길이(B), NSE-h α Syn mouse 뇌의 basal 및 apical한 영역에서의 복합체 수(C) 및 가시밀도(D)를 확인한 Golgi 염색 결과이다. ##은 대조군 대비, NSE-h α Syn 마우스군의 수상돌기 길이, 복합체 수 또는 가시밀도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.01$ 이고, *는 NSE-h α Syn 마우스군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 수상돌기 길이, 복합체 수 또는 가시밀도가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다.

도 21은 NSE-h α Syn 군에서의 사상위족(filopodia) 가시를 확인한 결과로, 사상위족(filopodia) 가시(A) 사진 및 개수(B)를 나타낸 것이다. #는 대조군 대비, NSE-h α Syn 마우스군의 가시 개수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.05$ 이고, *는 NSE-h α Syn 마우스군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 가시 개수가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p<0.05$ 이다. ns는 통계적으로 무의미한 변화를 의미한다.

도 22는 오스모틴 투여에 따른 피질(Cortex) 및 CA1에서 SYP(ophysin)(A) 및 PSD-95(postsynaptic density protein-95)(B)의 면역형광 분석 결과이다. ##, ###은 대조군 대비, NSE-h α Syn 마우스군의 SYP 및 PSD-95의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, ##는 $p<0.01$ 이고, ###은 $p<0.001$ 이며, *, **는 NSE-h α Syn 마우스군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 SYP 및 PSD-95의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이고, **은 $p<0.01$ 이다.

도 23은 오스모틴 투여에 따른 피질(Cortex)(A) 및 해마(B)에서 SYP, PSD-95, SNAP-25 및 pCREB/CREB의 웨스턴

블랏 결과이다. ##, ###는 대조군 대비, NSE-h a Syn 마우스군의 SYP, PSD-95, SNAP-25 및 pCREB/CREB 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, #는 $p<0.05$ 이고, ##는 $p<0.01$ 이며, *, **는 NSE-h a Syn 마우스군 대비 본 발명의 오스모틴 투여군의 SYP, PSD-95, SNAP-25 및 pCREB/CREB 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p<0.05$ 이고, **은 $p<0.01$ 이다.

도 24는 α -시누클레인으로 유도된 행동적 변화에 대한 오스모틴의 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 개선할 수 있는 (a)로부터 변이된 오스모틴 단백질.
- [0013] 본 발명에서, 오스모틴(osmotin)은 포도 등 숙성된 과일에 다량으로 함유되어 있는 단백질로서, 개체에 따라 약 150~250개의 아미노산으로 구성되는 단백질이다.
- [0014] 상기 오스모틴 단백질은 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0015] 상기 오스모틴 단백질은 Nurrl(Nuclear receptor related 1 protein), VMAT2(vesicular monoamine transporter 2), DAT(dopamine transporter), TH(tyrosine hydroxylase) p-p38, p-JNK(c-Jun N-terminal kinase) 및 p-ERK(extracellular signal-regulated kinase) 단백질 중에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현량을 조절할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 식품으로 제조하거나, 다른 식품 또는 식품의 성분에 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0017] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있고, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드; 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 변이된 오스모틴 단백질.
- [0019] 상기 약학 조성물의 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유할 수 있으며, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유할 수 있다.
- [0020] 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구의 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상

기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 하기로부터 선택되는 오스모틴 단백질을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진 오스모틴 단백질; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 삽입을 갖고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 (a)로부터 유도된 오스모틴 단백질.

[0022] 상기 동물은 인간을 포함하거나 제외한 동물일 수 있다.

[0023] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0024] [실험동물]

[0025] MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 처치를 통해 파킨슨병을 유도할 동물로, 수컷 야생형 C57BL/6J 마우스(25~28g, 생후 8주)을 잭슨 실험실(Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, USA)로부터 구입하였고, C57BL/6-Tg (NSE-h α Syn) Kor1 마우스는 식품의약품안전평가원(National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, (NIFDS, Cheongju, Korea))에서 구입하였다. 상기 동물 모델은 명/암 12시간 주기, 21~23 °C, 60±10%의 습도 조건 하에서 1주 동안 적응시켰으며, 자유롭게 음식과 물에 접근 가능하였다.

[0026] MPTP(Sigma-Aldrich, MO, USA)는 멸균 증류수에 준비하여, 종래의 가이드라인에 따라 연속 5일 동안 복강내로 kg당 30mg의 양을 주입하였다.

[0027] C57BL/6J 마우스는 임의적으로 세 개의 군으로 나누었다. 대조군(control, CTL), MPTP 투여군 및 MPTP+오스모틴 투여군(MPTP+Os)으로 각 군 당 12마리의 마우스를 배정하였다.

[0028] C57BL/6-Tg(NSE-h α Syn) Kor1 마우스는 다음 세 개의 군으로 배정되었다: 야생형군(WT), 대조군(NSE-h α Syn; α -syn) 및 NSE-h α Syn+오스모틴 투여군(α -syn + Os)으로 각 군당 12마리 마우스를 배정하였다.

[0029] 상기 오스모틴 투여는 정제된 오스모틴을 식염수와 함께 kg당 15mg의 양으로 투여하였다.

[0030] [세포 배양]

[0031] 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포는 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank, (KCLB, South Korea))에서 구입하였으며, 이를 1% 항생-항균 용액과 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양된 10% 소태아혈청이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. mHippoE-14 배아의 마우스 해마 세포주(Cedarlane, Canada)를 배아 14일 차에 추출되어 피루브산 나트륨 없이 DMEM에서 배양하였다. SH-SY5Y 세포는 MPP⁺(Sigma-Aldrich, MO, USA)를 처리하였다. EGFP- α -synuclein-A53T 플라스미드는 David Rubinsztein (Addgene #40823)로부터 획득하여 사용하였다. 아디포넥틴 수용체(AdipoR1)는 상업용 AdipoR1 CRISPR/Cas9-KO 플라스미드(Santa Cruz, CA, USA)에 의해 녹아웃 되었다.

[0032] AdipoR1 HDR plasmid (Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 선별 표지 유전자로서 푸로마이신(puromycin) 유전자를 삽입하였고, Lipofectamine 3000(Invitrogen)을 이용하여 상기 플라스미드를 통해 세포에 형질주입시킨 후, 세포를 배양하였다. 이후, 배지는 선발 24시간 전에 제거하였고, 성장 배지에 선별 마커로서 첨가된 2.5 μ g/ml의 푸로마이신(puromycin)을 이용하여 순수하고 안정된 풀의 녹아웃 세포주를 획득하였다.

[0033] 실시예 1. 오스모틴 단백질의 투여에 따른 MPTP/ α -시누클레인(α -synuclein)에 의해 유도된 행동 및 운동 결손의 완화 효과 확인

[0034] MPTP-유도 및 NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 나타나는 운동능 부족에 대한 오스모틴의 효과를 확인하기 위하

여, 운동 손상에 대한 행동적 테스트를 실시하였다.

- [0035] 오픈 필드 테스트(OFT)에서 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스는 움직이는 총 거리가 감소하였으나, MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에 비해 오스모틴 투여한 군에서는 유의미하게 움직이는 총 거리가 증가하였다(도 1).
- [0036] 또한, 운동 및 신경근 강화에 미치는 오스모틴 단백질의 영향을 평가하기 위하여, 봉 테스트(pole test) 및 줄에 매달리기 테스트(wire-hang test)를 실시하였다.
- [0037] 그 결과, 봉 테스트에서는 MPTP/ α -시누클레인 군의 마우스는 대조군 및 야생형군(WT)에 비해 바닥까지 내려오는데 걸린 총 시간(total time, T-LA)이 현저하게 증가하였으나 본 발명의 오스모틴 단백질을 투여한 군에서는 통계적으로 유의미하게 바닥까지 내려오는데 걸린 총 시간(total time, T-LA)을 감소시켰다.
- [0038] 매달리기 테스트에서, 대조군 및 야생형군에 대비하여 MPTP/ α -시누클레인 군은 매달린 시간이 감소되었으며, 이에 대비하여 본 발명의 오스모틴 단백질을 투여한 군에서는 통계적으로 유의미하게 매달린 시간이 증가하였다. 이 결과로부터 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 신경근이 감소되어 있다고 판단하였고, 오스모틴이 신경보호 효과를 지녀 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에 대해 야기되는 운동 결손을 현저하게 감소시키는 것으로 판단하였다(도 2).
- [0039] **실시예 2. 오스모틴 단백질의 투여에 따른 Nurr1(Nuclear receptor related 1 protein), VMAT2(vesicular monoamine transporter 2), DAT(dopamine transporter) 및 TH(tyrosine hydroxylase) 발현량 조절 확인**
- [0040] 오스모틴이 MPTP/ α -시누클레인에 의해 유도된 마우스의 도파민 활성 신경 소실에 대한 보호 여부를 판단하기 위하여, SNpc에서의 TH-양성 신경의 수와 선조체(striatum) TH-양성 섬유 밀도를 TH 형광 염색을 통해 측정하였다. TH 양은 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스군은 대조군 및 야생형군(WT) 마우스 대비 유의미하게 TH 발현량이 감소되었고, 이러한 TH 양의 감소는 오스모틴 단백질의 투여로 현저하게 회복되는 것을 확인하였다(도 3).
- [0041] 또한, TH-양성 신경의 면역활성은 마우스의 SNpc 및 선조체에서 확인하였다. 대조군의 신경 수와 비교하여, MPTP 유도 마우스에서 TH-양성 신경이 현저하게 감소된 것을 확인하였고, 오스모틴 단백질은 MPTP에 의한 파킨스병 유도군의 SPnc 및 선조체에서 TH-양성 신경이 유의미하게 증가하였다(도 4).
- [0042] 이와 유사하게 웨스턴 블롯을 이용하여 TH 발현량에 대한 변화를 분석하였다. 대조군 및 야생형(WT) 마우스의 결과 대비, MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 선조체 및 SNpc의 TH 발현량이 유의미하게 감소되었고, 오스모틴 단백질은 TH의 발현량을 효율적으로 증가시켰다(도 5).
- [0043] MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 *in vivo*에서 SNpc 및 선조체의 Nurr1, VMAT2 및 DAT 발현량은 오스모틴 단백질 투여에 의해 유의미하게 상향 조절되었다(도 6).
- [0044] 한편, MPP⁺로 유도된 SH-SY5Y세포에서, Nurr1, DAT, VMAT2 및 TH의 발현량이 감소되는 것을 확인하였고, 이에 대비하여 오스모틴 단백질 처리군은 농도 의존적으로 Nurr1, DAT, VMAT2 및 TH의 발현량이 상향 조절되는 것을 확인하였다(도 7).
- [0045] **실시예 3. 오스모틴 단백질의 p-p38, p-JNK 및 p-ERK 발현량 및 신경염증의 조절 효과 확인**
- [0046] p38, JNK, ERK 인산화에 대한 오스모틴 단백질의 효과를 확인하기 위하여, MPTP/ α -시누클레인으로 유도된 *in vivo* 및 *in vitro* 모델에서의 p-p38, p-JNK, p-ERK의 발현량을 분석하였다.
- [0047] MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에서 p-p38 및 p-JNK의 발현량은 증가하였고, p-ERK의 발현량은 감소되었다. 이에 대비하여, 오스모틴 단백질 처리군은 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에 대비하여 p-p38 및 p-JNK의 발현량을 유의미하게 감소시키고, p-ERK의 발현량이 유의미하게 증가하였다(도 8).
- [0048] 또한, MPP⁺/ α -시누클레인(A53T)로 유도된 SH-SY5Y 세포에서, 오스모틴의 효과를 평가한 결과, MPP⁺/ α -시누클레인(A53T)로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 감소된 p-ERK/ERK의 발현량이 오스모틴 단백질의 처리에 의해 농도 의존적으로 증가된 것을 확인하였고, p-JNK/JNK 발현량은 MPP⁺/ α -시누클레인(A53T) 유도군에서 증가한 반면 본 발명의 오스모틴 단백질 처리군은 농도 의존적으로 감소하였다(도 9).
- [0049] 또한, 신경염증 반응에 대한 효과를 판단하기 위하여, 활성화된 성상세포(GFAP) 및 소교세포(Iba-1)에 대한 오스모틴의 효과를 평가하였다.
- [0050] 그 결과, GFAP 및 Iba-1 발현이 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 선조체와 SNpc에서 유의미하게 증가되었고,

오스모틴의 투여에 의해 이를 현저하게 감소시켰다(도 10).

- [0051] 또한, 면역 형광분석 결과 MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 선조체 및 SNpc 영역에서 GFAP 및 Iba-1의 발현을 오스모틴이 현저하게 감소시킨다는 것을 지지하였다(도 11).
- [0052] 정상세포 및 소교세포의 활성화 관련하여 산화스트레스의 가능한 역할을 확인하기 위하여 ROS 정량 분석하였다. 그 결과, MPTP/NSE-h α Syn 형질전환 마우스에 대비하여 오스모틴 투여군의 ROS가 유의미하게 감소되었다(도 12).
- [0053] 또한, iNOS 및 COX-2의 발현을 분석한 결과, MPTP/NSE-h α Syn로 유도된 마우스의 iNOS 및 COX-2의 발현이 증가하였고 오스모틴 투여군은 이에 대비하여 iNOS 및 COX-2의 발현이 감소하였다(도 13).
- [0054] **실시예 4. 동물 및 세포 모델에서 MPTP/ α -시누클레인으로 유도된 세포사멸에 대한 오스모틴 단백질의 조절 효과 확인**
- [0055] MPP⁺/ α -시누클레인(A53T)로 유도된 독성에 대한 오스모틴의 효과를 평가하기 위하여, ApoTox-Glo Triplex 어세이를 이용하여 세포 생존능, 세포독성 및 caspase-3/7 활성 분석을 수행하였다.
- [0056] 그 결과, MPP⁺ 처리가 세포 생존능을 감소시키고 세포독성 및 caspase-3/7 활성을 증가시켰다. 이에 대비하여 본 발명의 오스모틴 단백질을 처리한 경우 세포 생존율을 증가시키고, 세포 독성 및 caspase-3/7 활성을 감소시켰다.
- [0057] 또한 α -시누클레인(A53T)의 유도에 의해 떨어진 세포 생존능, 세포독성, 및 caspase-3/7 활성에 대한 오스모틴의 효과를 확인한 결과, 오스모틴이 용량 의존적 방식으로 세포 생존율, 세포 독성 및 caspase-3/7 활성에 유의한 효과가 있다는 것을 확인하였다(도 14).
- [0058] 미토콘드리아가 세포사멸 및 퇴행의 과정을 조절한다는 것은 잘 알려져 있다. 오스모틴이 MPTP/MPP⁺으로 유도된 신경세포 사멸을 억제하는지 여부를 조사하기 위하여, 전-/후-세포사멸 마커를 웨스턴 블롯을 이용하여 분석하였다.
- [0059] 그 결과, MPTP는 Bax의 양을 유의미하게 증가시키고, Bcl-2 및 Bcl-xL 양을 유의미하게 감소시켰으나, 오스모틴 단백질은 Bax의 양 및 cytochrome c 분비의 양을 감소시켰고, Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현을 증가시켰다(도 15).
- [0060] 또한, MPP⁺로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 미토콘드리아의 세포사멸 마커들의 발현을 조사하였다. MPP⁺는 유의미하게 Bcl-2 및 Bcl-xL 양을 감소시켰으며, Bax 및 cleaved caspase-3 발현량을 증가시켰다. 그러나, 오스모틴 단백질은 농도 의존적으로 Bax 및 절단된 caspase-3의 전-세포사멸 마커들의 발현량을 감소시켰고, Bcl-2 및 Bcl-xL과 같은 후-세포사멸 마커의 발현량을 증가시켰다(도 16).
- [0061] 또한, NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 선조체 및 SNpc의 사멸 세포에 대한 오스모틴의 후-세포사멸 효과들을 확인하였고, 오스모틴은 Bcl-2, Bax, cytochrome c 및 PARP-1의 발현량을 유의미하게 조절한다는 것을 확인하였고, NSE-h α Syn 마우스는 NeuN의 발현량이 감소되었으나, 오스모틴 단백질은 NeuN의 발현량을 회복시켰다(도 17A, B).
- [0062] 오스모틴의 NSE-h α Syn 마우스의 세포사멸에 대한 *in vivo*에서의 효과는 α -시누클레인(A53T)으로 유도된 *in vitro* 세포에서도 확인되었다. α -시누클레인(A53T)의 과발현이 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현량을 유의미하게 감소시키고, Bax 및 cytochrome c의 발현량을 유의미하게 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이에 대비하여 오스모틴 단백질은 농도 의존적으로 Bcl-2 및 Bcl-xL의 양을 현저하게 증가시키고, Bax 및 cytochrome c의 발현량을 현저하게 감소시켰다(도 17C).
- [0063] MPTP/ α -시누클레인으로 유도된 선조체와 SNpc에 대한 신경독성에 대한 효과들은 Nissl 염색에 의해 분석되었고, 대조군(control 또는 WT)에서의 수와 비교하면, MPTP/NSE-h α Syn 마우스에서 Nissl 염색된 신경들이 현저하게 감소되었으나, 오스모틴 단백질 처리군은 MPTP/NSE-h α Syn 마우스군에 대비하여 Nissl 염색된 신경들을 유의미하게 회복시켰다(도 18).
- [0064] **실시예 5. 수지상 복합체 및 구조 조절, 추상세포(pyramidal neurons)에서 가지 밀도를 증가시키는 오스모틴 단백질의 효과 확인**
- [0065] 오스모틴 처리에 의한 이러한 효과들을 분석하기 위하여, Nissl 염색을 실험 대상 군에 대해 수행하였다. NSE-h

α Syn 마우스의 CA1, CA3 및 DG 영역에서 Nissl 염색된 신경들의 수는 WT 마우스에 비해 유의미하게 감소되었고, 오스모틴 단백질의 투여로 유의미하게 상향 조절되었다(도 19).

[0066] α -시누클레인에 의해 변형된 가지 형태에 대한 오스모틴 단백질의 효과를 분석하기 위하여, 해마 CA1 pyramidal neurons에 있는 수지상세포의 구조, 복합체, 길이를 Golgi 염색법으로 확인하였다. WT 마우스 내 수상돌기(dendrites) 길이와 비교할 때 NSE-h α Syn 마우스에서의 총 수상돌기 길이가 유의미하게 감소되어 있다는 것을 확인하였다. 이에 대비하여 오스모틴 단백질 투여군은 NSE-h α Syn 마우스의 수상돌기 길이와 비교할 때 총 수상돌기의 길이를 증가시켰다. 추가적으로, 수지상세포의 복합체가 WT 마우스와 비교할 때 NSE-h α Syn 마우스에서 감소되어 있었다는 것과, 이에 대비하여 오스모틴 단백질은 NSE-h α Syn 마우스 뇌의 basal 및 apical한 영역에서의 복합체들을 유의미하게 증가시켰다는 것을 확인하였다.

[0067] 또한, NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 가지 밀도 및 총 수가 WT 마우스에서의 밀도 및 그 수에 대비하여 유의미하게 감소되어 있었고, 오스모틴 단백질의 투여에 따라 현저하게 상향 조절되었다는 것을 확인하였다(도 20).

[0068] 특히, NSE-h α Syn 군에서의 사상위족(filopodia) 가지들의 수는 WT 군에서와 비교할 때 유의미하게 감소되어 있었던 반면, 오스모틴 단백질 투여군은 NSE-h α Syn 군과 비교할 때 가지 밀도, 가지 및 사상위족 가지들의 총 수를 현저하게 증가시켰다(도 21).

[0069] **실시예 6. NSE-h α Syn 마우스에서 인지 결손을 완화시키고, 시냅스 마커 발현을 회복시키는 오스모틴 단백질의 효과 확인**

[0070] 파킨슨병 모델에서 시냅스 기능 이상에 대한 오스모틴의 보호 효과를 분석하기 위해서, SYP(syntaxin) 및 PSD-95(postsynaptic density protein-95)의 면역형광 분석을 수행하였다. 면역형광 결과들은 WT 마우스에 비해 NSE-h α Syn 형질전환 마우스의 전두엽 및 CA1 영역에 있는 SYP 및 PSD-95의 발현이 현저하게 감소되었다는 것을 보여주었다. PSD-95 및 SYP의 하향조절은 오스모틴의 주입으로 현저하게 상향조절되었다(도 22).

[0071] 면역형광 결과들은 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다. SYP, PSD-95 및 SNAP-25의 발현을 비롯한 기억 연관 단백질 CREB의 인산화는 WT 마우스와 비교하여 NSE-h α Syn 마우스의 피질 및 해마에서 유의미하게 감소되어 있었다. 그러나, 오스모틴 단백질 투여군은 NSE-h α Syn 마우스에서의 SYP, PSD-95, SNAP-25의 발현 및 CREB의 인산화를 유의미하게 상향 조절하였다(도 23).

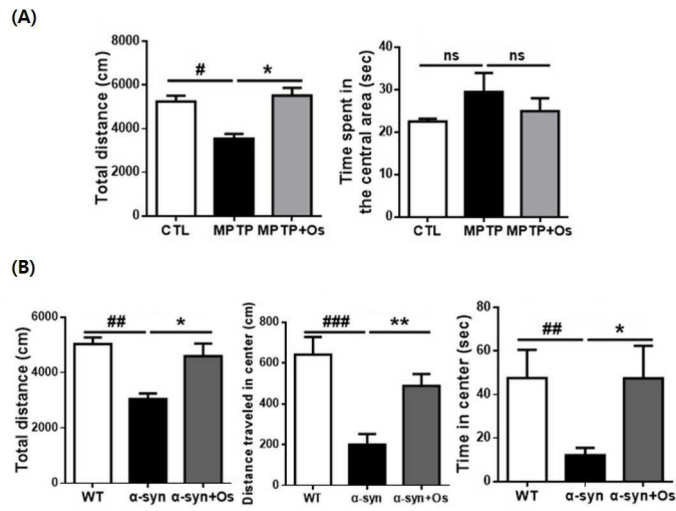
[0072] MWM 테스트는 NSE-h α Syn 마우스에서 α -시누클레인으로 유도된 행동적 변화에 대한 오스모틴 단백질의 효과들을 분석하기 위해 수행되었으며, 오스모틴 주입 후에 해당 플랫폼에 도달하는데 걸린 시간과 목표 사분면에 도달하는데 걸린 시간이 유의미하게 향상되었다. 목표 구역에서 보내는 시간의 정도는 WT 마우스보다 NSE-h α Syn 마우스에서 더 낮게 나타났으며, 플랫폼이 위치한 해당 사분면(zone 2)에서 보내는 시간의 비율은 WT 마우스 대비 NSE-h α Syn 마우스에서 유의미하게 감소된 것을 확인하였다. 그러나 이와는 대조적으로, NSE-h α Syn 마우스에 오스모틴 단백질을 투여한 경우, 목표 지점에서의 시간 빈도와 해당 사분면에서 보내는 시간이 증가하였다(도 24).

[0073] [통계처리]

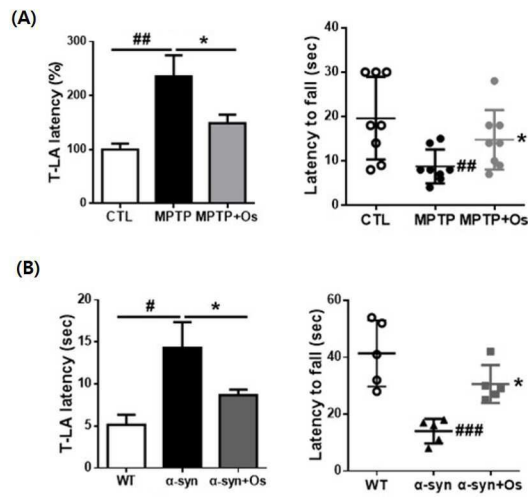
[0074] 데이터는 GraphPad Prism 6 software를 이용하여 분석되었다. 통계적 데이터는 군마다 12마리 마우스를 이용한 적어도 세개의 독립적인 실험들에 근거하여 평균±표준편차(SEM)로 표현되었다. 형태학적 분석을 위해, 비슷한 결론을 갖는 적어도 3번 이상의 실험들로부터 얻어진 3개의 이미지들을 고려하였다. 차이의 유의정도는 일원 또는 이원 분산분석(ANOVA)로 결정하였고, 스튜던트 T-테스트를 수행하였다. 평가 결과, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

도면

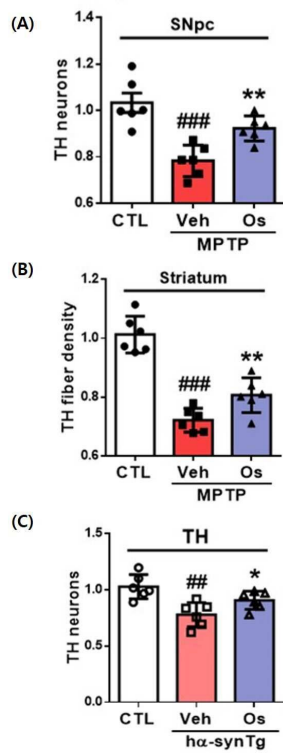
도면1



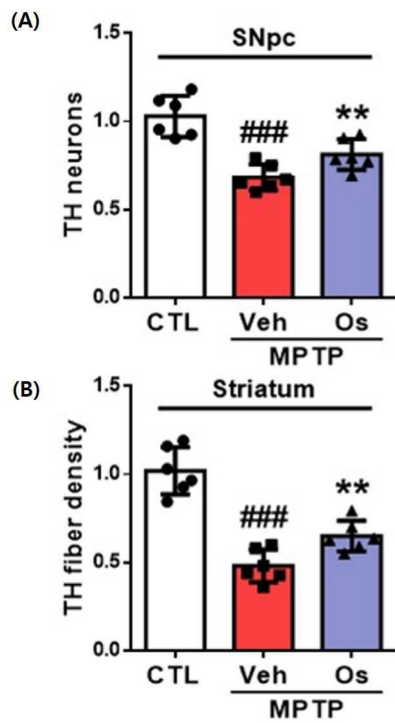
도면2



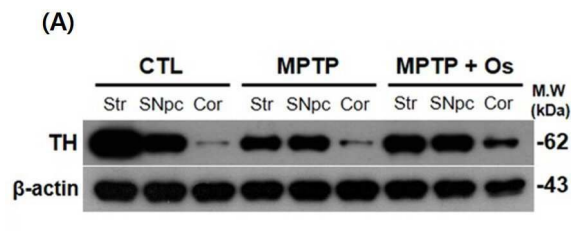
도면3



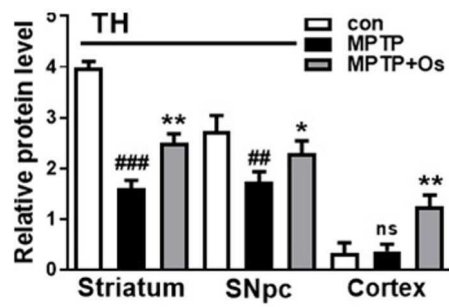
도면4



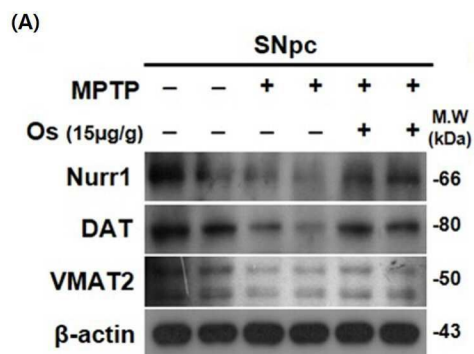
도면5



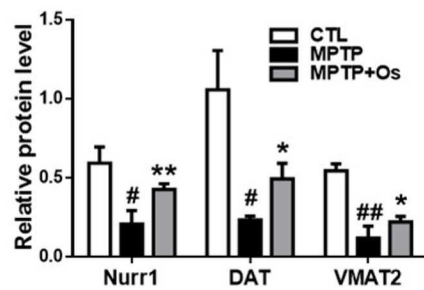
(B)



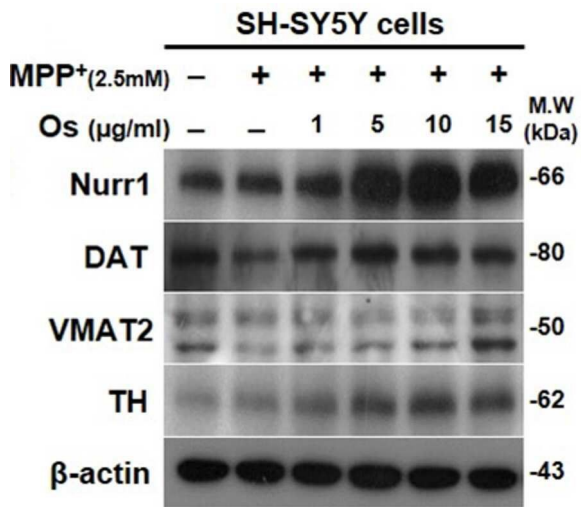
도면6



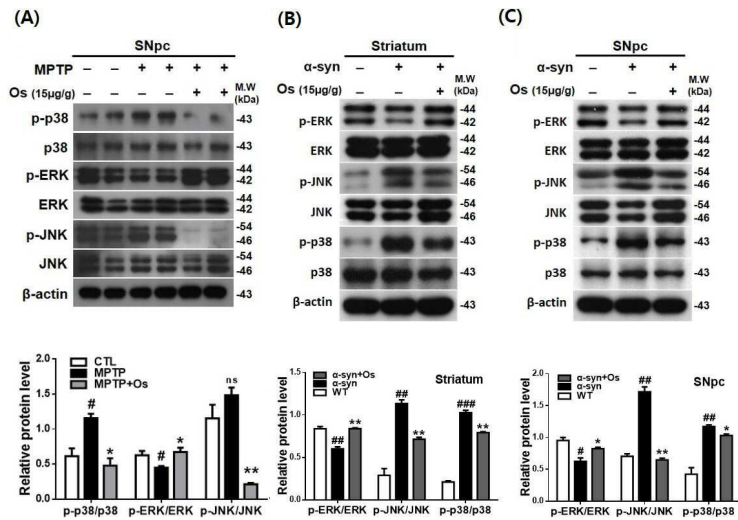
(B)



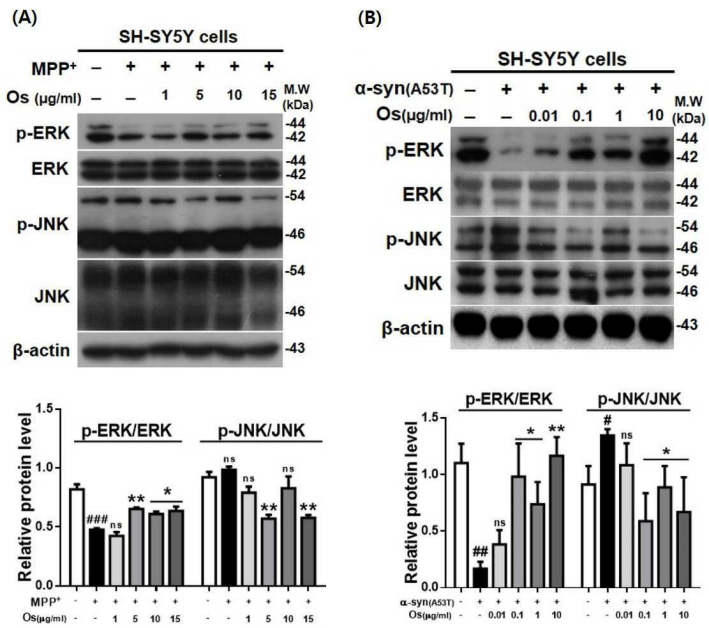
도면7



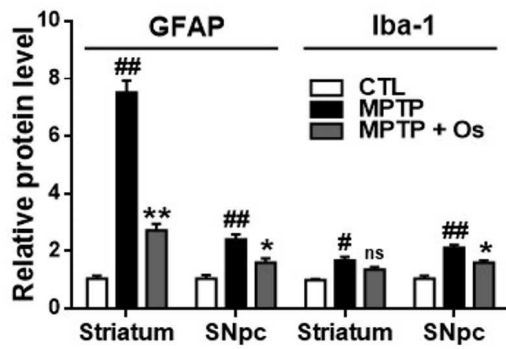
도면8



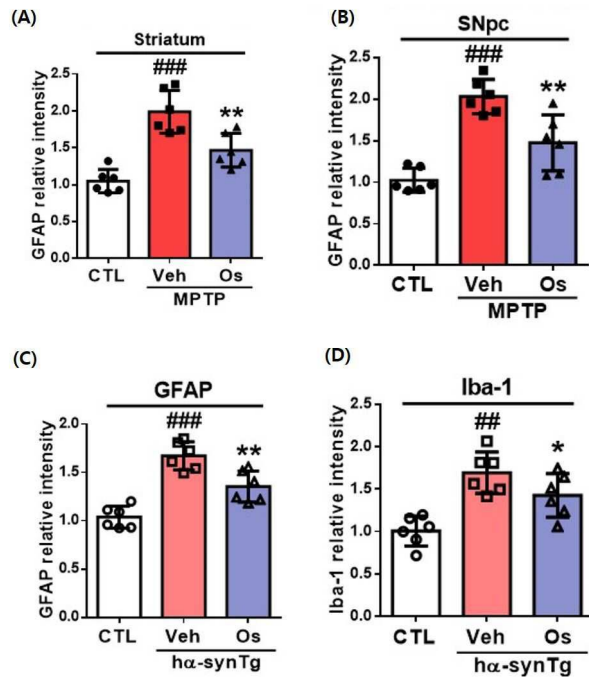
도면9



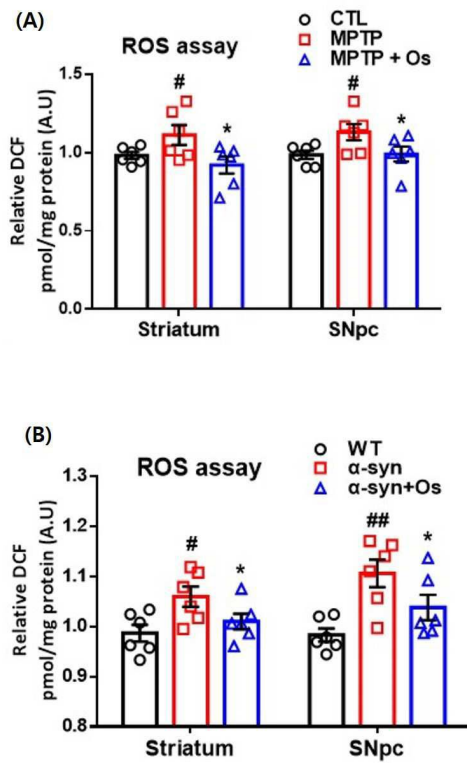
도면10



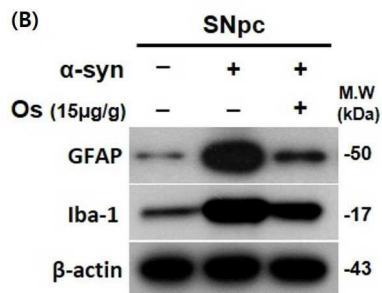
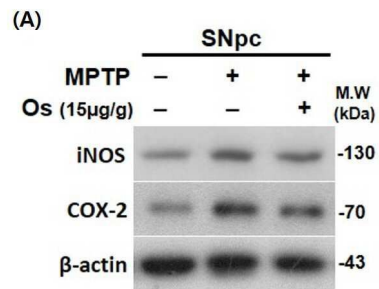
도면11



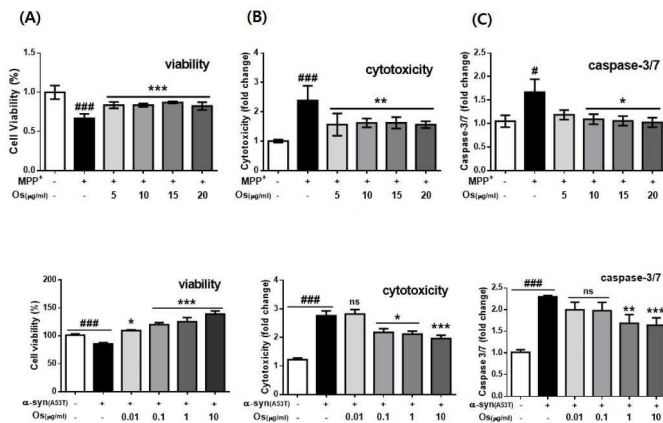
도면12



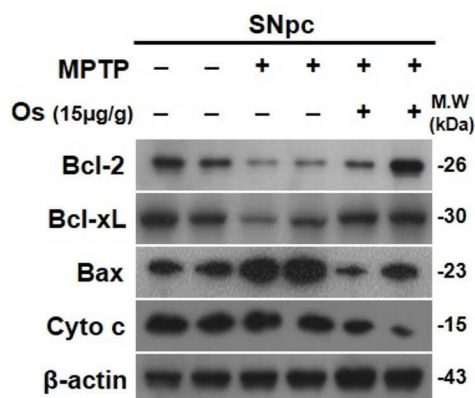
도면13



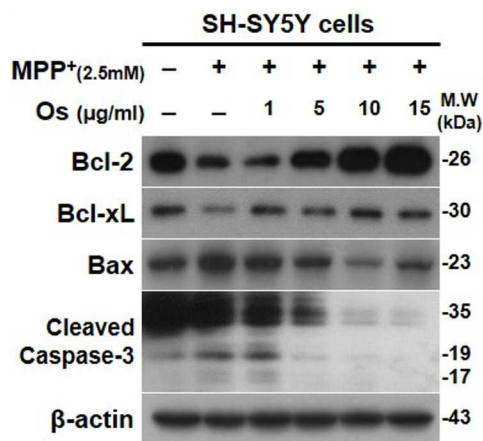
도면14



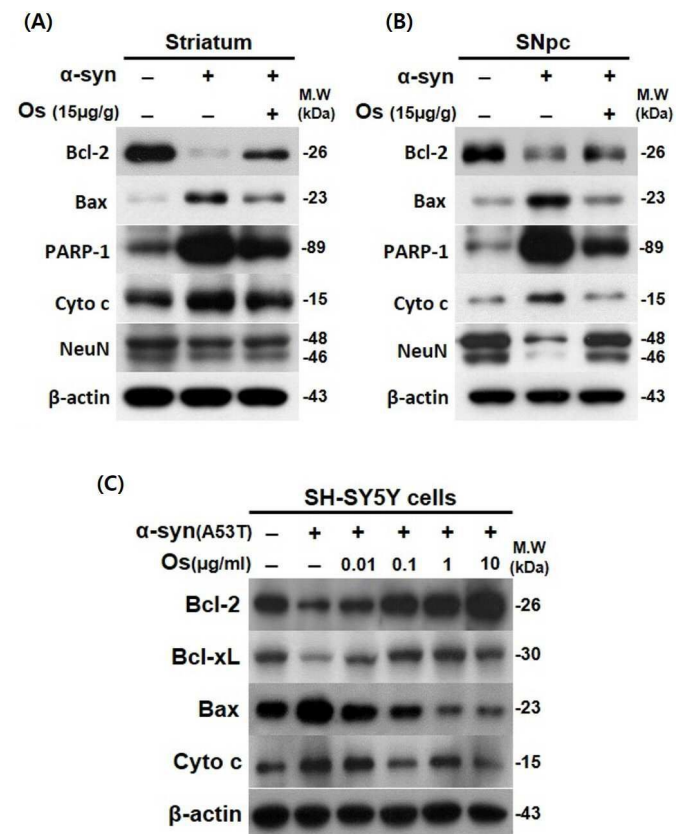
도면15



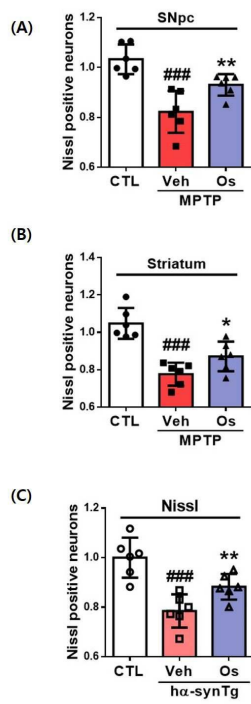
도면16



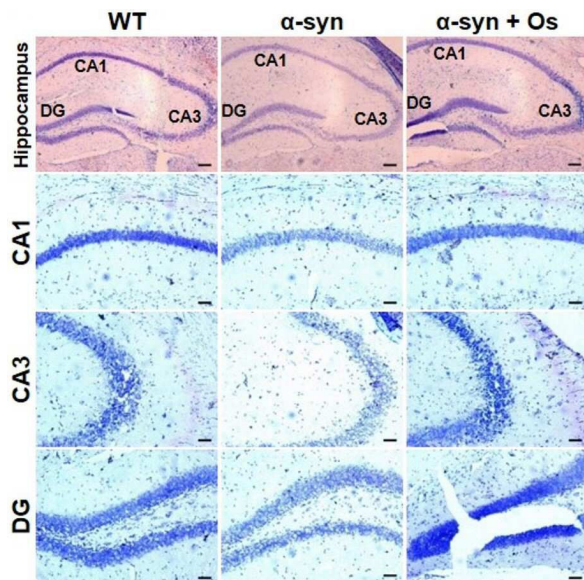
도면17



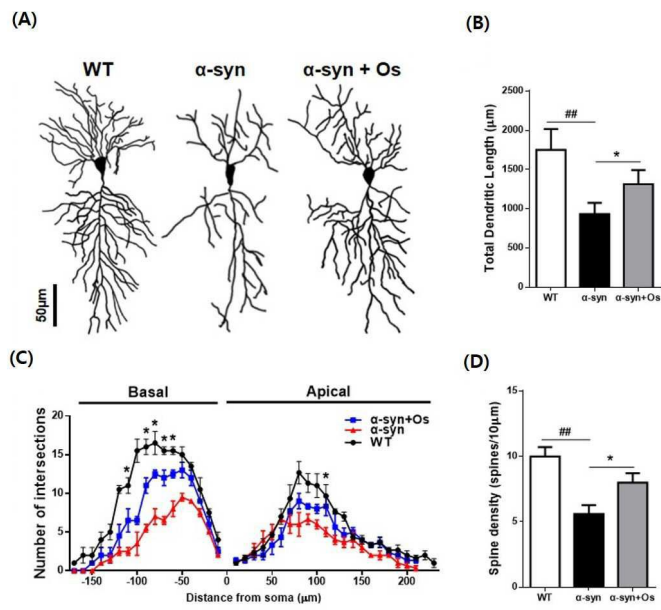
도면18



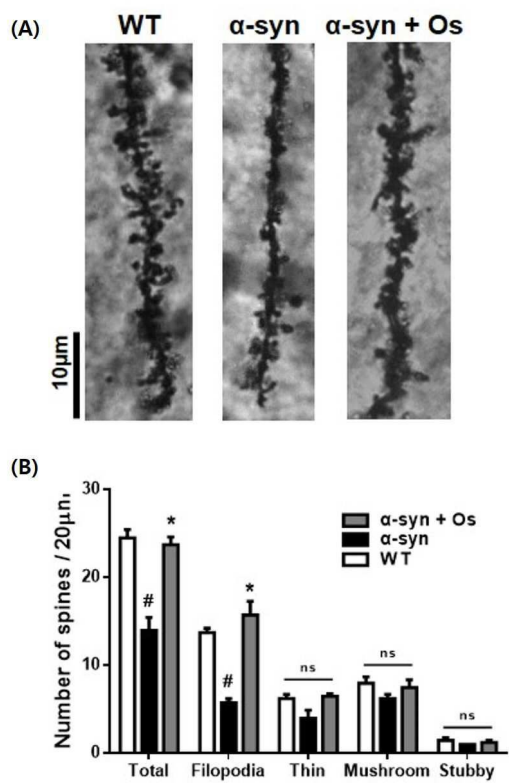
도면19



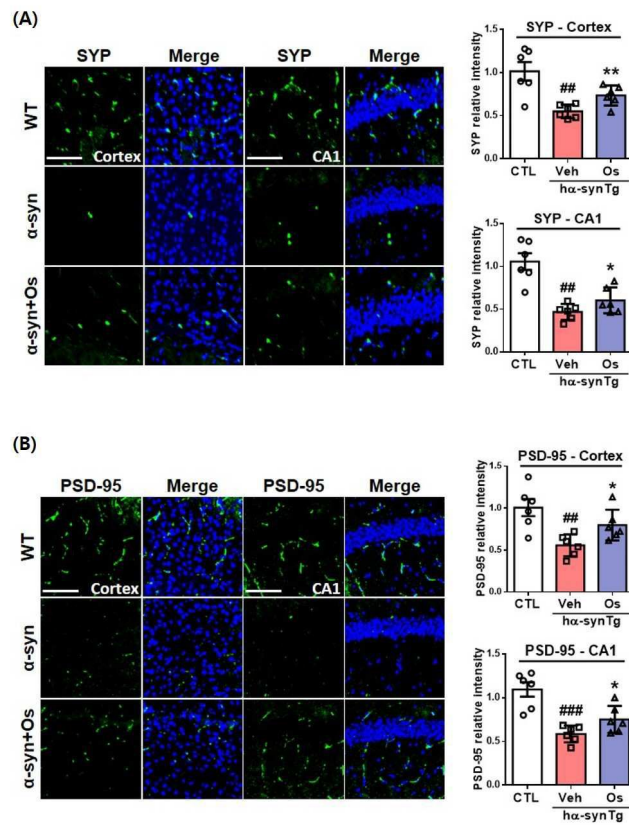
도면20



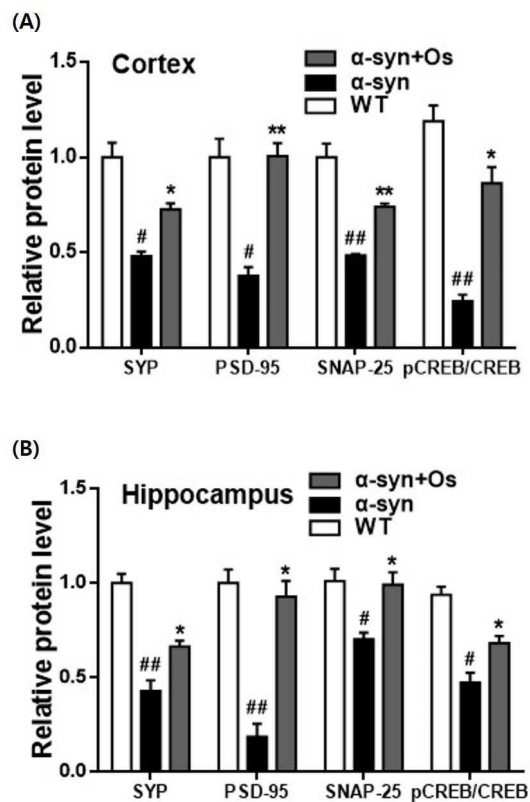
도면21



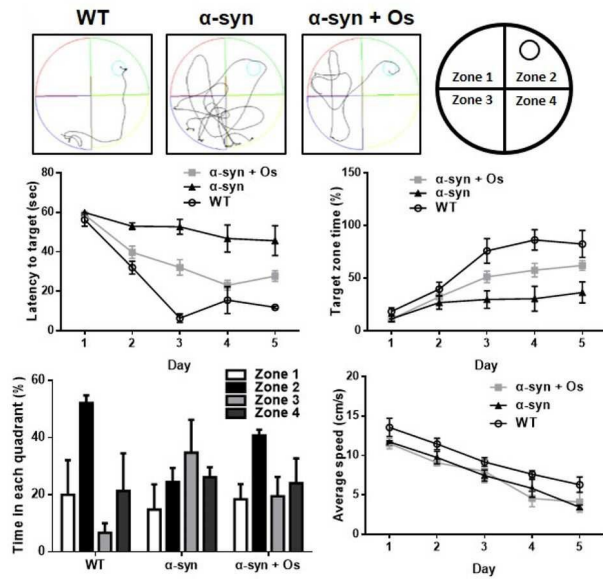
도면22



도면23



도면24



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing, ameliorating or treating parkinson's
disease comprising osmotin protein as effective component

<130> PN20442

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 243

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

 $\langle 400 \rangle$ 1

Met Gly Asn Leu Arg Ser Ser Phe Val Phe Phe Leu Leu Ala Leu Val

1 5 10 15

Thr Tyr Thr Tyr Ala Ala Thr Ile Glu Val Arg Asn Asn Cys Pro Tyr

20 25 30

Thr Val Trp Ala Ala Ser Thr Pro Ile Gly Gly Gly Arg Arg Leu Asp

35 40 45

Arg Gly Gln Thr Trp Val Ile Asn Ala Pro Arg Gly Thr Lys Met Ala

50 55 60

Arg Val Trp Gly Arg Thr Asn Cys Asn Phe Asn Ala Ala Gly Arg Gly
 65 70 75 80
 Thr Cys Gln Thr Gly Asp Cys Gly Gly Val Leu Gln Cys Thr Gly Trp
 85 90 95

Gly Lys Pro Pro Asn Thr Leu Ala Glu Tyr Ala Leu Asp Gln Phe Ser
 100 105 110

Gly Leu Asp Phe Trp Asp Ile Ser Leu Leu Asp Gly Phe Asn Ile Pro
 115 120 125

Ile Thr Phe Pro Thr Asn Pro Ser Gly Gly Lys Cys His Ala Leu Cys
 130 135 140

Thr Ala Ile Asn Gly Glu Cys Pro Ala Glu Leu Arg Val Pro Gly Gly
 145 150 155 160

Cys Asn Asn Pro Cys Thr Thr Phe Gly Gly Gln Gln Tyr Cys Cys Thr

165 170 175

Gln Arg Pro Cys Gly Pro Thr Phe Phe Ser Lys Phe Phe Lys Gln Arg
 180 185 190

Cys Pro Asp Ala Tyr Ser Tyr Pro Gln Asp Asp Pro Thr Ser Thr Phe
 195 200 205

Thr Cys Pro Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Arg Val Ile Phe Cys Pro Asn
 210 215 220

Gly Gln Ala His Pro Asn Phe Pro Leu Glu Met Pro Gly Ser Asp Glu
 225 230 235 240

Val Ala Lys