(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0091488
(43) 공개일자 2012년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0133211
(22) 출원일자 2010년12월23일
심사청구일자 2010년12월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김영미
서울특별시 강남구 도곡로93길 12, 우성2차아파트 205동 901호 (대치동)
정재훈
경기도 용인시 기흥구 한보라2로 167, 휴먼시아 한보라마을 902동 603호 (공세동)
(74) 대리인
이원희

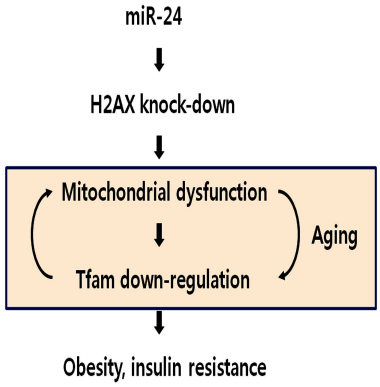
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환 동물 모델로서의 마이크로 알엔에이?2 4 를 과발현한 형질전환 생쥐**

(57) 요 약

본 발명은 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현한 형질전환 생쥐 및 그의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 U6 프로모터를 포함하는 발현벡터에 클로닝하여 제작한 벡터를 생쥐에 형질전환하여 제조한 miR-24를 짧은 헤어핀 구조로 과발현한 형질전환 생쥐는 히스톤 H2AX의 발현이 억제되고, 연령 증가에 따라 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 인자인 미토콘드리아 전사 인자 A(mitochondrial transcription factor A; Tfam)의 발현이 억제되며, 비만 또는 당뇨 등 미토콘드리아 기능 감소에 따라 예측되는 질환 증상을 나타냄으로써, 상기 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로서 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있다.

대 표 도 - 도17



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	FPR08A1-071
부처명	교육과학기술부(한국연구재단)
연구사업명	프로테오믹스이용기술개발
연구과제명	대사증후군 표적 후보단백질의 기능 검증을 위한 functional proteomics
주관기관	서울대학교(위탁, 경희대학교)
연구기간	2008.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된, 프로모터 및 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 도 1에 기재된 유전자 컨스트럭트가 도입된 생쥐의 수정란.

청구항 2

제 1항의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 수득한 형질전환 생쥐.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 형질전환 생쥐는 서열번호 1로 기재되는 염기서열에 의해 코딩되는 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 것을 특징으로 하는 형질전환 생쥐.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 형질전환 생쥐는 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환이 유발되는 것을 특징으로 하는 형질전환 생쥐.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 형질전환 생쥐.

청구항 6

1) 프로모터 및 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 도 1에 기재된 유전자 컨스트럭트를 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 유전자 컨스트럭트를 생쥐의 수정란에 주입하여 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된 생쥐의 수정란을 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 생쥐를 수득하는 단계를 포함하는, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐의 제조방법.

청구항 7

서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 생쥐에 형질전환하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로 사용하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 발현벡터는 U6 또는 H1 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 발현벡터는 포유류 발현 벡터(mammalian expression vector)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

1) 제 2항의 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 miR-24의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 miR-24의 발현 수준을 유의하게 감소시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 12

1) 제 2항의 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 H2AX의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 H2AX의 발현 수준을 유의하게 증가시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 13

1) 제 2항의 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 Tfam(mitochondrial transcription factor A)의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 Tfam의 발현 수준을 유의하게 증가시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 후보 물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 또는 조직은 간세포 또는 간조직인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 11항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현한 형질전환 생쥐, 및 상기 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로 이용하는 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 미토콘드리아는 세포 내에 존재하는 소기관으로 "세포의 발전소"로 알려져 있다. 미토콘드리아는 세포에서 ATP를 생성할 뿐 아니라 세포사멸(apoptosis), 이온 항상성(ion homeostasis), 당 및 지방 대사(intermediary metabolism), 피리미딘(pyrimidine)/유레아(urea)/헴(heme) 합성 등 세포/개체의 생명유지에 필수적인 기능을 수행한다(Schatz, 2007).

[0003] 동물세포에서 미토콘드리아는 핵 이외에 유전자를 포함하고 있는 유일한 세포내 소기관(organelle)으로서, 한 개의 세포안에는 수십에서 수백 개(copy)의 미토콘드리아 DNA(mtDNA)가 존재한다. 그러나 미토콘드리아에 존재하는 대부분(99% 이상)의 단백질들은 핵에서 합성된 mRNA가 세포질로 이동하고, 세포질에서 전구체(precursor) 형태의 단백질로 합성이 완성된 후 미토콘드리아로 이동하는 과정(post-translational transport)을 통하는 핵 유전자-유래 단백질(nDNA-encoded proteins) 들이다(Neupert and Herrmann, 2007). 한편 미토콘드리아 유전자(mitochondrial DNA, mtDNA)는 사람의 경우 16,569bp 크기이며, 원형구조를 가지고 있다. mtDNA는 13개의 단백질에 대한 개방판독틀(open reading frame; ORF)를 가지고 있으며, 12S 및 16S rRNA, 그리고 22개의 tRNA 를 만들어 낸다. mtDNA가 만드는 13개의 단백질들은 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 관여하는 5개의 전자전달계 (electron transport chain complex)중 복합체 II (complex II) 를 제외한 복합체 I, III, IV, V의 서브유닛 단백질(subunit protein)들이다. 이 13개 mtDNA-유래 단백질(mtDNA-encoded proteins)은 미토콘드리아 내에서 mtDNA를 주형(template)으로 하여 mRNA를 만들고, 미토콘드리아 내에 존재하는 tRNA, rRNA를 사용하여 단백질을 합성한다(Wallace, 2007). 이 mtDNA에 의해 합성되는 13개 단백질의 합성과정이 원핵세포(prokaryote)의 단백질 합성원리와 유사하기 때문에 미토콘드리아의 기원을 원핵세포의 세포내 기생관계(symbiosis)로 설명하기도 한다. 따라서 미토콘드리아는 두 개의 유전자가 만드는 하나의 세포내 소기관이라고 정의할 수 있으며, 이는 미토콘드리아의 생성(biogenesis) 및 기능을 이해하는 기본 개념이 된다.

[0004] 미토콘드리아의 생성은 미토콘드리아에 존재하는 단백질과 지방질의 합성, 수송, 결합을 망라하는 복합 과정으로 정의할 수 있다. 미토콘드리아의 수(abundance), 모양(morphology), 그리고 기능(functional properties)은 세포특이적인 에너지, 대사, 신호전달 요구에 부응하기 위해 미세하게 조절된다. 이를 위해 핵에서 코드(code)되는 많은 수의 미토콘드리아 유전자들과 mtDNA의 복제(replication) 및 전사(transcription)를 조절하

는 인자들의 전사 및 발현이 상호 협력적으로 조절되는 것이 필수적이다(Ryan and Hoogenraad, 2007). 그러나 미토콘드리아의 생성조절은 일시적으로 증가하는 에너지 요구량에 부응하기 위한 것이라기보다는 장기간에 걸친 적응반응(adaptive response)로 생각된다. 또한, 약 50%의 미토콘드리아 단백질은 조직 특이적으로 발현되기 때문에 미토콘드리아 단백질군(proteome)이 조직-특이적 기능을 가지고 있다고 생각된다.

[0005]

[0006] 미토콘드리아의 생성을 조절하는 단백질들은 모두 핵 유전자-유래 단백질들이다. 이중 가장 잘 알려진 것이 미토콘드리아 전사인자 A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA or Tfam)와 핵호흡인자-1(Nuclear respiratory factor-1, NRF-1)이며, 이 두 인자의 활성 및 발현을 조절하는 보조전사인자인 Peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator-alpha(PGC-1α)가 있다(Falkenberg et al., 2007). Tfam의 발현을 억제한 생쥐(knock-out mouse)의 경우 미토콘드리아가 거의 존재하지 않았으며, 전신에서 Tfam의 발현을 억제한 경우는 태내에서 사망(embryonic lethal)하였다(Larsson et al., 1998). 베타세포 특이적 KO mouse는 인슐린 저항증과 인슐린 분비 감소(Silva et al., 2000), 심장근 특이적 KO mouse는 심부전(cardiac failure) 증상을 보였다(Wang et al., 1999). PGC-1α KO 마우스도 결핍된 조직에 따라 다양한 표현형을 보이는데, 인슐린 분비 억제, 인슐린 저항증에서부터 심근육염(cardiac myopathy), 중추신경 과민증(CNS-hyperactivity) 등을 예로 들 수 있다(Liang and Ward, 2006)..

[0007] 미토콘드리아 기능 손상은 노화와 관련된 퇴행성 질환, 즉, 비만, 당뇨, 대사증후군, 인슐린 저항증, 심혈관질환(Kim et al., 2008), 파킨슨병, 헌팅톤병, 치매(Lin and Beal, 2006) 등과 상관관계가 있는 것으로 조사된다. 즉, 이들 질병 모델에서 미토콘드리아의 전자현미경사진은 정상에 비해 부풀어 커져 있거나, 크리스타(cristae) 구조가 소실되는 등의 구조적 변형을 보이기도 하고, 세포당 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 수가 감소된 경우도 있으며, mtDNA가 돌연변이(mutation)된 경우도 관찰되었다. 사람 및 동물을 대상으로 노화에 따른 미토콘드리아 기능변화를 모니터링하였을 때, 노화가 진행됨에 따라 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 복제수 및 mtRNA가 감소하였으며(Barazzoni, 2004), Attardi 등은 노화에 따라 mtDNA 복제 및 전사의 조절부위인 D-loop 중 T414G, T408A 돌연변이가 축적됨을 보고하였다(Michikawa et al., 1999; Wang et al., 2001). 최근에는 이런 신경퇴행성 질환의 발병을 유발하는 인자로 동정되는 물질들이 미토콘드리아에 존재하거나, 또는 미토콘드리아 기능 손상과 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다(Beal, 1995; Chen & Yan, 2007; Scheffler, 2008; Wallace, 2005).

[0008] 인체 질병과 관련되어 과거 미토콘드리아에 관한 유전학적 연구는 미토콘드리아 유전자의 돌연변이(mutation)가 대사 및 신경관련 유전질환을 유발함이 증명되었다(Wallace, 2005). 최근 본 발명의 발명자들의 연구실을 포함한, 다양한 연구실에서 보고한 연구결과들은 유전적, 환경적 원인에 의한 미토콘드리아의 기능 손상이 대사증후군(metabolic syndrome)(비만, 당뇨, 지질대사이상, 고혈압 중 2가지 이상의 증상이 한 사람에게서 동시에 나타나는 질병이며 인슐린 저항증 (insulin resistance)이 원인으로 작용함)을 포함한 만성 염증성 질환, 신경퇴화질환, 노화과정에 직접적으로 연관되어 있음을 보여주고 있다(Wallace, 2005). 한 예로, 노령층(elderly people)에서 나타나는 인슐린 저항증이 체중(lean body mass), 지방량(fat mass)가 상관관계가 있으며, in vivo NMR 기법으로 측정한 노령층의 미토콘드리아 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 활성이 약 40% 저하되어 있어서 미토콘드리아의 기능감소가 인슐린 저항증의 원인 인자일 가능성이 확인되었다(Petersen et al., 2003). 또한 인슐린 저항증의 새로운 치료제로 사용되고 있는 peroxisome proliferators activated receptor-alpha(PPARα)의 리간드의 활성을 증강시키는 co-activator인 PGC-1α 미토콘드리아의 생성을 촉진시킴이 보고된 바 있다(Butow and Bahassi, 1999). 따라서 미토콘드리아의 기능과 인슐린 저항증 및 대사증후군의 발병에는 확실한 인과관계가 성립함이 받아들여지고 있다.

[0009] 그러나, 미토콘드리아 기능저하를 원인으로 인슐린 저항증, 당뇨, 비만 등 대사증후군의 표현형을 보이는 동물모델은 매우 한정적이다. 제 2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long Evans Tokushima Fatty(OLETF) rat과 비만과 고혈압을 동반한 fa/fa Zucker rat 등이 있으나 형질전환이나, 유전자 조작을 통해 얻은 strain이 아니고 교배를 통해 완성한 rat 모델이어서 정확한 유전자 표적을 알기 어렵다. 비만 생쥐 모델인 ob/ob 생쥐는 렙틴(leptin)이라는 호르몬이 결핍된 생쥐로 Jackson Laboratory에서 개발하였으며 고혈당과 인슐린 혈중농도가 정상보다

높음(hyperinsulinemia)에도 불구하고 음식섭취량이 과다하여 비만형이 되는 모델이다. 당뇨 생쥐모델인 db/db 생쥐는 렙틴수용체가 결핍된 생쥐로 제 2형 당뇨, 고혈압, 비만을 동반하는 표현형을 보이는 모델이다(Goncalves et al., 2009). 이들 동물 모델들에서 미토콘드리아 기능 저하를 예측할 수는 있으나, 당뇨 및 비만의 원인으로 규정하기에는 어려움이 있다. 더욱이 이들 모델은 사람에서는 존재하지 않는 인위적 모델(artificial model)들이라 사람에게서 나타나는 질병과 연관시켜 연구하는데 있어 한계점이 있다. 앞서 기술한 바와 같이 미토콘드리아 생성을 직접적으로 억제하는 동물모델은 당뇨, 비만의 표현형을 보이지 않아서 사람 환자에서 나타나는 증상을 대변할 수 없다. 따라서 당뇨 및 비만의 실험을 위해 사용되는 실험동물 모델들 중 미토콘드리아 기능의 저하를 원인으로 한 질병 실험 동물 모델은 현존하는 것이 없다.

[0010] 한편, 마이크로 RNA(microRNA)는 표적 유전자의 전사후 발현 조절에 매우 중요한 인자로 최근 발견되었다. 마이크로 RNA는 polymerase II에 의해 primary microRNA(pri-microRNA)가 합성된 후 Drosha에 의해 전구체(precursor) microRNA(pre-microRNA)로 잘라진다. pre-microRNA는 짧은 헤어핀(short hairpin) 구조를 가지고 있다. Pre-microRNA는 핵공을 통해 세포질(cytosol)로 수송되어 Dicer와 결합한 다음, Dicer에 의해 이중 가닥(double stranded) RNA(dsRNA)로 다시 잘라지고 dsRNA 중 하나의 RNA 가닥(strand)이 표적 mRNA의 3' UTR에 결합하여 표적 mRNA의 분해(degradation) 또는 번역(translation)을 억제함으로써 표적 유전자의 발현을 조절한다. microRNA에 의한 표적 mRNA의 발현을 조절하는 분자적 기전은 유전자의 전사후 발현조절(post-transcriptional regulation)으로 매우 중요한 유전자발현 조절 기작의 하나로 알려져 있다(Kim et al., 2009).

[0011] miR-24는 적혈구 생성(erythropoiesis)을 억제하고(Wang et al., 2008), 또한 DHFR(dihydrofolate reductase) mRNA에 결합하여 단백질 생산을 저해한 결과, 메토트랙사트(methotrexate)에 저항성을 나타내게 되었다고 보고된 바 있다(Mishra et al., 2007).

[0012] 따라서 microRNA를 짧은 헤어핀(short hairpin) 구조로 전사되도록 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 합성한 다음, 포유류 발현 벡터(mammalian expression vector)에 클로닝(cloning)하면, 실제 세포내에서 합성되는 microRNA와 동일한 염기서열을 갖는 유사 microRNA를 발현할 수 있다. 이때 사용하는 프로모터는 U6 또는 H1으로서 RNA polymerase III에 의해 인식되어 small RNA들이 많이 발현할 수 있다. 이는 RNA polymerase II에 의해 발현되는 벡터 보다 훨씬 더 많은 양의 성숙(mature) microRNA를 발현시킬 수 있다는 장점이 있다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 U6 프로모터를 포함하는 벡터에 클로닝한 짧은 헤어핀(short hairpin) 구조의 microRNA-24(miR-24)를 과발현함으로써 간세포에서 miR-24가 표적으로 하는 히스톤 H2AX의 발현을 억제함을 증명하였다. 상기 짧은 헤어핀 miR-24를 C57BL/6NCrjBgi 생쥐의 수정란에 주입하여 과발현하는 형질전환 생쥐를 제작하여 표현형(phenotype)을 분석한 결과, 상기 형질전환 생쥐에서 미토콘드리아 기능이 연령-의존적(age-dependent)으로 감소하고, 비만, 당뇨 등 미토콘드리아 기능 감소에 따라 예측되는 질병 증상을 보임을 확인함으로써, 상기 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질병 모델로서 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) Barazzoni, R. (2004). Skeletal muscle mitochondrial protein metabolism and function in ageing and type 2 diabetes. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7, 97-102.

(비특허문헌 0002) Butow, R.A., and Bahassi, E.M. (1999). Adaptive thermogenesis: orchestrating mitochondrial biogenesis. Curr Biol 9, R767-769.

(비특허문헌 0003) Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. Annu Rev Biochem 76, 679-699.

(비특허문헌 0004) Goncalves, A.C., Tank, J., Diedrich, A., Hilzendeger, A., Plehm, R., Bader, M., Luft, F.C., Jordan, J., and Gross, V. (2009). Diabetic hypertensive leptin receptor-deficient db/db mice develop cardioregulatory autonomic dysfunction. Hypertension 53, 387-392.

(비특허문헌 0005) Kim, J.A., Wei, Y., and Sowers, J.R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. Circ Res 102, 401-414.

(비특허문헌 0006) Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 126-139.

(비특허문헌 0007) Lal, A., Pan, Y., Navarro, F., Dykxhoorn, D.M., Moreau, L., Meire, E., Bentwich, Z., Lieberman, J., and Chowdhury, D. (2009). miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. Nat Struct Mol Biol 16, 492-498.

(비특허문헌 0008) Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. Nat Genet 18, 231-236.

(비특허문헌 0009) Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. Cell 115, 787-798.

(비특허문헌 0010) Liang, H., and Ward, W.F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ 30, 145-151.

(비특허문헌 0011) Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 443, 787-795.

(비특허문헌 0012) Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. Annu Rev Biochem 76, 723-749.

(비특허문헌 0013) Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. Science 300, 1140-1142.

(비특허문헌 0014) Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. Annu Rev Biochem 76, 701-722.

(비특허문헌 0015) Schatz, G. (2007). The magic garden. Annu Rev Biochem 76, 673-678.

(비특허문헌 0016) Silva, J.P., Kohler, M., Graff, C., Oldfors, A., Magnuson, M.A., Berggren, P.O., and Larsson, N.G. (2000). Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. Nat Genet 26, 336-340.

(비특허문헌 0017) Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu Rev Genet 39, 359-407.

(비특허문헌 0018) Wallace, D.C. (2007). Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA Insights from evolutionary medicine. Annu Rev Biochem 76, 781-821.

(비특허문헌 0019) Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Bruning, J.C., Kahn, C.R., Clayton, D.A., Barsh, G.S., et al. (1999). Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. Nat Genet 21, 133-137.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐를

제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또다른 목적은 상기 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또다른 목적은 상기 형질전환 생쥐를 이용하여 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환 치료제의 효과 검증 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된, 프로모터 및 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 도 1에 기재된 유전자 컨스트럭트가 도입된 생쥐의 수정란을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된 생쥐의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 수득한, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은

[0021] 1) 프로모터 및 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 도 1에 기재된 유전자 컨스트럭트를 제조하는 단계;

[0022] 2) 상기 단계 1)의 유전자 컨스트럭트를 생쥐의 수정란에 주입하여 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된 생쥐의 수정란을 제조하는 단계; 및

[0023] 3) 상기 단계 2)의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 생쥐를 수득하는 단계를 포함하는, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐의 제조방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 생쥐에 형질전환하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로 사용하는 방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은

[0026] 1) 상기 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

[0027] 2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 miR-24의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0028] 3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 miR-24의 발현 수준을 유의하게 감소시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은

[0030] 1) 상기 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

[0031] 2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 H2AX의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0032] 3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 H2AX의 발현 수준을 유의하게 증가시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033] 아울러, 본 발명은

[0034] 1) 상기 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

[0035] 2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 Tfam(mitochondrial transcription factor A)의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0036] 3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 Tfam의 발현 수준을 유의하게 증가시킨 후보물질을 선별하는

단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 miR-24 과발현 형질전환 생쥐는 기존의 연구결과로는 예측하지 못했던 세포의 미토콘드리아 기능을 연령의존적으로 감소시키며, 실제 miR-24의 표적인 H2AX의 활성저하가 미토콘드리아 기능을 억제하고, 순차적으로 연령이 증가함에 따라 미토콘드리아의 복제 및 전사를 조절하는 주요 조절자인 Tfam의 발현을 억제한다. 그러므로 본 발명에 따른 형질전환 생쥐는 노령화에 따라 미토콘드리아 기능이 감소되어 발생하는 것으로 제시된 거의 모든 퇴행성 질환의 모델로 사용될 수 있다. 이러한 퇴행성 질환에는 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병, 치매 등을 생각할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명에서 제작한 발현벡터를 나타내는 그림이다:

A: 짧은 헤어핀(short hairpin) 구조로 miR-24를 과발현하기 위하여 제작된 재조합 발현벡터를 나타내는 그림이다.

B: miR-24 이중 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides)의 염기서열과 프로세스 후 만들어질 짧은 헤어핀 miR-24의 구조를 나타내는 그림이다.

도 2는 게놈 DNA의 PCR을 이용한 miR-24 형질전환 마우스 생쥐의 스크리닝 결과를 나타내는 그림이다.

도 3은 miR-24에 의한 H2AX 발현 억제를 나타내는 그림이다:

A: 합성 siRNAs, 아데노바이러스(Ad-shRNA), 레트로바이러스(Rv-shRNA) 로 처리한 세포의 시간대별 H2AX 발현을 웨스턴블랏으로 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

B 및 C: miR-24에 의한 H2A 아형(isoform) 중 H2AX 특이적 억제를 나타내는 그림이다.

D: Mito-T(mito-tracker)에 의한 미토콘드리아 염색 억제(박스안은 레이저 양을 증폭한 것)를 나타내는 그림이다.

E: miR-24와 H2AXi는 둘다 핵과 미토콘드리아에 존재하는 H2AX를 억제함을 나타내는 그림이다[Hsp60와 cytochrome c(Cyto C)는 미토콘드리아 마커, PARP는 핵, β-actin는 로딩(loading) 양 마커임].

도 4는 miR-24와 H2AX의 표적 특이성을 검증한 결과를 나타내는 그림이다:

A: H2AX-GFP 키메라(chimeric) 단백질을 과발현한 세포에 처리한 shH2AX가 H2AX를 특이적으로 억제함을 나타내는 그림이다.

B: H2AX-3' UTR을 루시퍼라제(luciferase) 리포터 뒤에 클론하여 miR-24 포함 플라즈미드를 형질전환시키고, 이때 H2AX-3' UTR은 3개의 결합추정 사이트를 각각 제거한 것(ΔA, ΔB, 및 ΔC)도 같이 사용한 것으로, 그 결과 3개의 사이트가 모두 필요함을 보여주는 그림이다(n=6).

도 5는 miR-24 와 shH2AX 과발현에 의한 미토콘드리아 기능 억제를 나타내는 그림이다:

A: 미토콘드리아 막전압 측정 결과를 나타내는 그림이다. 100 nM TMRE로 염색한 후 공초점 현미경으로 관찰하고 정량하였다.

B: 세포내 ATP 감소를 나타내는 그림이다.

C: 산소소모량의 감소를 나타내는 그림이다. 산화적 인산화 복합체 1~4 가 모두 억제되었다.

D: ROS(Reactive oxygen species)의 증가를 나타내는 그림이다. 1 uM DCF-DA로 염색한 후 공초점 현미경으로 관찰하고 정량하였다.

E: 산화단백질양의 증가를 나타내는 그림이다. 카보닐 단백질의 양을 OxyBlot으로 측정하였다(*p<0.05,

**p<0.01 vs. shSCR 대조군 세포(n=5~6)).

도 6은 miR-24와 shH2AX에 의해 산화적인산화(OXPHOS) 복합체 단백질 발현 억제를 나타내는 그림이다:

A: RT-PCR에 의한 mtDNA-유래 13개 단백질들의 mRNA 발현 정량을 나타내는 그림이다.

B: RT-PCR에 의한 핵유전자-유래 단백질들의 mRNA 발현 정량을 나타내는 그림이다.

C: PCR에 의한 mtDNA 정량을 나타내는 그림이다.

D: 웨스턴블랏에 의한 핵유전자-유래 단백질발현 정량을 나타내는 그림이다.

E: 웨스턴블랏에 의한 핵유전자-유래 미토콘드리아 조절 단백질들의 발현 정량을 나타내는 그림이다.

도 7은 miR-24와 shH2AX 과발현에 의해 산화적인산화(OXPHOS) 복합체 단백질 발현 억제 정량 그래프를 나타내는 그림이다.

A: RT-PCR에 의한 mtDNA-유래 13개 단백질들의 mRNA 발현 정량 그래프를 나타내는 그림이다.

B: RT-PCR에 의한 핵유전자-유래 단백질들의 mRNA 발현 정량 그래프를 나타내는 그림이다.

도 8은 miR-24와 shH2AX 과발현 초기 계대 세포의 H2AX 발현 억제를 나타내는 그림이다:

A: 웨스턴블랏에 의한 H2AX의 발현 억제를 나타내는 그림이다.

B: 미토콘드리아 막전압 측정. 100 nM TMRE로 염색한 후 공초점 현미경으로 관찰하고 정량한 결과를 나타내는 그림이다.

C: 1 uM DCF-DA로 염색한 후 공초점 현미경으로 관찰하고 정량한 결과, ROS의 증가를 나타내는 그림이다.

D: 복합체 5와의 커플되었을 때와 언커플되었을 때의 산소소모량을 나타내는 그림이다.

E: 웨스턴블랏에 의한 복합체 subunit과 Tfam의 단백질들의 발현을 나타내는 그림이다.

도 9는 miR-24와 shH2AX 과발현 후기 계대 세포의 세포 증식 저하, 세포 배양액 산성화 및 세포주기의 변화를 나타내는 그림이다.

A: 배양시간에 따른 세포수 측정한 결과를 나타내는 그림이다.

B: 칼세인 활성 분석(Calcein viability assay) 결과를 나타내는 그림이다.

C: 세포내 LDL 활성 분석 결과를 나타내는 그림이다.

D: 세포 배양액의 pH 변화 및 FACS에 의한 세포주기 측정 결과를 나타내는 그림이다.

도 10은 miR-24와 shH2AX 과발현 초기 계대 세포의 인슐린 신호전달계 억제를 나타내는 그림이다.

A: 0.5% FBS 포함 저포도당 DMEM에서 100 nM 인슐린으로 15분간 처리 후 수득하여 표기한 1차항체로 웨스턴블랏을 수행한 결과를 나타내는 그림이다.

B: H2AX 발현 억제에 의한 미토콘드리아 손상이 Akt의 활성을 억제하여 인슐린 활성을 억제하는 모식도를 나타내는 그림이다.

도 11은 히스톤 H2AX의 재발현으로 miR-24 과발현에 의한 기능 억제의 회복

A: 웨스턴블랏에 의한 pcDNA3.1-H2AX의 형질전환으로 H2AX의 재발현을 확인하는 그림이다.

B: H2AX의 재발현으로 미토콘드리아 막전압 및 H2AX 발현 정상화를 공초점 현미경이미지로 나타내는 그림이다.

C: H2AX의 재발현으로 ROS 정상화를 공초점현미경이미지로 나타내는 그림이다.

D: H2AX의 재발현으로 미토콘드리아 막전압 정상화를 나타내는 그림이다.

E: H2AX의 재발현으로 세포내 ATP 정상화를 나타내는 그림이다.

F: H2AX의 재발현으로 미토콘드리아 산소소모량 정상화를 나타내는 그림이다.

G: H2AX의 재발현으로 세포 배양액 pH 정상화를 나타내는 그림이다.

도 11은 히스톤 H2AX의 재발현으로 H2AX 발현 억제에 의한 미토콘드리아 전자현미경 구조 정상화를 나타내는 그림이다(배율 6,000x 및 50,000x).

도 13은 miR-24 포함 아데노바이러스를 생쥐의 꼬리 정맥으로 주입후 7일 경과한 다음 분석한 결과를 나타내는 그림이다:

A: 경구당부하검사(Oral glucose tolerance test; OGTT) 결과를 나타내는 그림이다.

B. 체중을 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

C. 가자미근(soleus muscle) 산소소모량 결과를 나타내는 그림이다.

D. 간 미토콘드리아 산소소모량 결과를 나타내는 그림이다.

E. 간조직 및 간 미토콘드리아에서 H2AX와 Tfam 단백질 발현을 나타내는 그림이다.

F. 간, 지방, 근육에서 H2AX mRNA 발현을 나타내는 그림이다(*P<0.05 vs shSCR-*Ad*)

도 14는 miR-24를 과발현하는 43주령 형질전환 생쥐에서 보이는 비만과 인슐린 저항증을 나타내는 그림이다:

A: 동일 연령 정상 생쥐(WT)와 miR-24 형질전환 F1 생쥐의 사진을 나타내는 그림이다.

B. 체중을 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

C. 정소 백색지방 중량 증가 결과를 나타내는 그림이다. .

D. 당부하검사 결과를 나타내는 그림이다.

E. 인슐린부하검사 결과를 나타내는 그림이다.

F. 5주령과 43주령 생쥐의 간조직내 단백질 발현을 나타내는 그림이다.

G. 5주령 생쥐의 간 미토콘드리아에서 H2AX 발현 억제를 나타내는 그림이다.

도 15는 miR-24를 과발현하는 52주령 형질전환 생쥐에서 보이는 심근비대증을 나타내는 그림이다:

A: 심장초음파 검사 사진을 비교한 그림이다.

B: 좌심실 벽 두께를 측정하여 비교한 그림이다.

C: 심장박동수를 비교하는 그림이다.

도 16은 miR-24를 과발현하는 54주령 형질전환 생쥐의 조직별로 비교하여 나타내는 그림이다:

A: 각 조직의 비교 사진이다. 내장지방(body), 폐, 정소지방, 비장, 간, 심장의 비교 사진이다.

B: 분리한 조직을 위스턴 블롯 방법으로 H2AX 발현 감소를 확인한 그림이다. 뇌의 부분 중 해마, 선조체(striatum), 흑질(substantia nigra), 대뇌피질(cortex)과 심장, 간, 폐, 위, 신장, 비장, 췌장, 근육 중 가자미근(soleus)과 비복근(gastrocnemius), 정소, 백색지방, 갈색 지방 조직에서 H2AX의 발현 감소를 확인한 그림이다.

도 17은 miR-24의 과발현이 연령-의존성 비만 및 인슐린저항증 발병 모식도를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0040] 본 발명은 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된, 프로모터 및 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트가 도입된 생쥐의 수정란을 제공한다.

[0041] 상기 유전자 컨스트럭트는 도 1에 기재된 구조를 갖는 것이 바람직하다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된 생쥐의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 수득한, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐를 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은

[0044] 1) 프로모터 및 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 도 1에 기재된 유전자 컨스트럭트를 제조하는 단계;

[0045] 2) 상기 단계 1)의 유전자 컨스트럭트를 생쥐의 수정란에 주입하여 수탁번호 KCTC 11821BP로 기탁된 생쥐의 수정란을 제조하는 단계; 및

[0046] 3) 상기 단계 2)의 수정란을 대리모의 자궁에 착상시켜 형질전환 생쥐를 수득하는 단계를 포함하는, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐의 제조방법을 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 생쥐에 형질전환하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로 사용하는 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명에 따른, 상기 발현벡터는 U6 또는 H1 프로모터를 포함하는 것이 바람직하며, 포유류 발현 벡터(mammalian expression vector)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0049] 본 발명에 따른, 상기 형질전환 생쥐는 통상의 형질전환 생쥐의 제조 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0051] 본 발명에 따른, 상기 형질전환 생쥐는 전신에 miR-24이 과발현하는 것으로, 36주령 이후에 비만과 성인형 당뇨병, 인슐린 저항증 등의 증상을 나타내며, 또한 심근 비대증의 증상도 보인다.

[0052] 본 발명의 실시예에서는, 본 발명의 형질전환 생쥐가 간세포를 이용한 실험에서 miR-24를 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 형태로 과발현하였을 때, 히스톤(histone) H2AX의 mRNA와 단백질의 발현이 선택적으로 억제되었으며, 그 정도는 H2AX의 코딩 부위를 표적으로 디자인한 RNA 간섭(H2AXi)을 짧은 헤어핀 형태로 과발현하였들 경우와 거의 유사하였다. 또한, miR-24를 과발현하는 세포를 오랫동안 지속하여 계대배양한 경우 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 인자인 Tfam(mitochondrial transcription factor A)의 발현이 완전히 억제되었다. 그 결과 계대수가 높은 간세포는 미토콘드리아 기능이 완전히 억제되었다. miR-24에 의한 미토콘드리아 기능 손상은 H2AX cDNA를 다시 주입하여 과발현하였을 때 정상으로 회복되었다. 한편 miR-24를 과발현하는 아데노바이러스(Ad-miR-24)를 BL6 생쥐에 정맥으로 주사하였을 때 간에서의 H2AX 발현이 현제히 억제되었으며, 주사후 1주일 후에 백색지방의 양이 약 50% 증가하였다.

[0053] 본 발명의 실시예에서는, 본 발명의 형질전환 생쥐가 founder 생쥐로부터F1 ~ F5에 이르기까지 이들 생쥐의 표현형을 관찰한 결과, 36주령이 경과한 후 체중이 약 50% 이상 증가하고, 정소 백색지방이 80% 이상 증가하였다. 또한, 상기 형질전환 생쥐는 경구당부하 검사 및 인슐린 부하검사에서 인슐린 저항증이 나타났다. 또한, 간조직에서 H2AX의 발현이 90% 이상 감소하고, Tfam의 발현도 90% 이상 감소하였다. 산소소모량으로 측정한 에너지 소비율 검사는 비만이 나타나기 전인 20주령때 이미 50% 이상 감소하였다. 이는 미토콘드리아 기능 억제를 원인으로 한 인슐린 저항증 및 비만, 당뇨를 주 증상으로하는 대사증후군의 대표적인 표현형으로 현존하는 비만생쥐인 ob/ob 생쥐 및 당뇨생쥐인 db/db 생쥐를 대체할 수 있는 획기적 동물 모델이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0054] 본 발명의 실시예에서는, 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 채취한 각 조직에서 H2AX의 발현량을 비교한 결과, 뇌의 해마(hipocampus), 선조체(striatum), 흑질(substantia nigra), 대뇌피질(cortex)에서 현저한 발현 감소가 관찰되었다. 이는 본 발명에 따른 형질전환 생쥐가 미토콘드리아 기능이 저하된 퇴행성 뇌신경질환의 모델로 사용할 수 있음을 시사하고 있다. 또한, 다른 조직인 심장, 간, 폐, 위, 신장, 비장, 췌장에서 H2AX의 발현 감소가 관찰되었고, 근육 중 적색근육인 가자미근(soleus)에서는 감소, 백색근육인 종아리비복근(gastrocnemius)에서는 감소가 관찰되지 않았다. 또한, 정소(testis), 백색지방과 같이 미토콘드리아의 존재량이 극히 적은 것으로 보고된 조직에서는 발현이 변화하지 않거나 오히려 증가된 것 양상을 보였으며, 미토콘드리아가 풍부한 갈색지방 조직에서는 H2AX의 발현이 현저히 감소하였다(도 16).

[0055] 따라서 본 발명의 miR-24 과발현 형질전환 생쥐는 노령화에 따라 미토콘드리아 기능이 감소되어 발생하는 것으로 제시된 거의 모든 퇴행성 질환의 모델로 사용될 수 있음을 알 수 있다. 이러한 퇴행성 질환에는 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당

뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병, 치매 등이 될 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명은

[0057] 1) 본 발명의 상기 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

[0058] 2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 miR-24의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0059] 3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 miR-24의 발현 수준을 유의하게 감소시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 후보 물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0061] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 세포 또는 조직은 간세포 또는 간조직인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0062] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0063] 본 발명에 따른 miR-24를 짧은 헤어핀 구조로 과발현한 형질전환 생쥐는 miR-24 과발현에 의해 히스톤 H2AX의 발현이 억제되고, 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 인자인 Tfam의 발현이 억제되며, 비만 또는 당뇨 등 미토콘드리아 기능 감소에 따라 예측되는 질환 증상을 나타냄으로써, 상기 형질전환 생쥐를 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 동물 모델로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[0064] 그러므로, 상기 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여한 후, miR-24, H2AX 또는 Tfam의 발현 정도, 및 미토콘드리아 기능 감소에 따른 질환의 표현형의 변화를 분석하여 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제를 개발할 수 있음을 알 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은

[0066] 1) 본 발명의 상기 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

[0067] 2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 H2AX의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0068] 3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 H2AX의 발현 수준을 유의하게 증가시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0069] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 후보 물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0070] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 세포 또는 조직은 간세포 또는 간조직인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0071] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0072] 아울러, 본 발명은

[0073] 1) 본 발명의 상기 마이크로 RNA-24(miR-24)를 짧은 헤어핀(short haipin) 구조로 과발현하는 형질전환 생쥐에 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제 후보물질을 투여하는 단계;

[0074] 2) 후보물질 투여 후, 상기 형질전환 생쥐의 세포 또는 조직에서 Tfam(mitochondrial transcription factor A)의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0075] 3) 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 Tfam의 발현 수준을 유의하게 증가시킨 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환의 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0076] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 후보 물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0077] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 세포 또는 조직은 간세포 또는 간조직인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0078] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환은 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 치매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0079] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0080] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명을 하기 실시예에 한정하지는 않는다.

[0081] **<실시예 1> 짧은 헤어핀(short hairpin) 구조로 miR-24를 과발현하는 벡터의 제작**

[0082] 짧은 헤어핀 구조로 miR-24를 과발현하기 위해, 하기와 같이 재조합 발현벡터를 제작하였다. 우선, 이중 가닥(double stranded) DNA 올리고뉴클레오티드를 도 1에서 보는 바와 같이 다음의 염기서열로 합성하였다: 5'-gatcc tggctcagttcagcaggaacag ttctcgaga ctgttcctgctgaactgagcca tttttggaa-3'(서열번호: 1). 이것은 BamH1 - miR-24 - XhoI loop - 안티센스(antisense) miR-24 - T5(polIII terminator) - EcoRI의 구조를 가지도록 합성하였다(도 1). 이렇게 두줄로 합성한 올리고뉴클레오티드를 어닐링(annealing)한 다음, RNAi-Ready pSIREN-shuttle vector(Clontech)에 클로닝(cloning)하였다. 상기 벡터로 발현된 miR-24가 H2AX의 발현 억제하고 미토콘드리아 기능 저해를 나타내는 것은 배양 세포로 증명하였다.

[0083] **<실시예 2> miR-24 과발현하는 혈질전환 생쥐의 제작 및 확인**

[0084] **<2-1> 형질전환 생쥐의 제작**

[0085] 형질전환 생쥐(transgenic mouse, tg mouse)의 제작은 ㈜마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 통상의 방법으로 진행하였다. 구체적으로, pSIREN-Shuttle Vector에 클로닝한 miR-24 발현 벡터를 도 1에 표시한 바와 같이 NruI과 HindIII로 절단하여 선형화(linearize)한 miR-24 DNA를 2 ng/㎕씩 C57BL/6NCrjBgi 생쥐로부터 얻은 수정란에 주입하였다. 주입한 수정란은 가임신된 C57BL/6NCrjBgi 암컷 생쥐에 착상시킴으로써 형질전환 생쥐를 제작하였다..

[0086] **<2-2> 형질전환 생쥐의 확인**

[0087] miR-24의 형질전환 생쥐를 확인하기 위하여, 태어난 새끼들의 꼬리를 1 cm가량 자른 후 Tris, EDTA, SDS, proteinase K가 포함되어 있는 용액에 꼬리를 넣어 55℃에서 12시간 이상 배양하여 조직을 모두 녹인 후, 페놀/클로로포름을 처리하여 게놈(genomic) DNA를 정제하였다. 이렇게 준비된 게놈 DNA를 주형(template)으로 하여 miR-24 발현 벡터가 크로모좀(chromosome)에 삽입(insertion)되었는지 PCR을 이용하여 확인하였다. 상기 PCR에 사용한 프라이머의 염기서열은 다음과 같다: 정방향(Forward): 5'-CAG CGC TAG ATT ATT GAA GCA TT-3'(서열번호: 2); 역방향(Reverse): 5'-AGG AAA GAA CAT GTG AGC AAA AG-3'(서열번호: 3). 상기 PCR은 94℃에서 5

분간 변성(denaturation)한 후 94℃에서 1분, 56℃에서 1분, 72℃에서 1분을 35회 반복하고, 72℃에서 최종 연장(final extension)하여 종결하였다. PCR 로 얻은 DNA 조각을 1.5% 아가로즈 겔(agarose gel)에서 분리하여 형질전환 생쥐의 생성을 확인하였다. 도 2에서 보는 바와 같이, 9번, 11번, 50번, 60번, 104번의 생쥐에서 형질전환 founder 생쥐가 확인되었다(도 2). P/C는 양성대조 DNA를 사용한 것이다. 이에, 본 발명자들은 제작된 형질전환 생쥐의 수정란을 2010년 12월 3일에 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁명 'BL6/N-Tg(U6-miR24)(mouse embryo)'으로 기탁하였다(KCTC 11821BP).

[0088] **<2-3> 형질전환 생쥐의 사육**

[0089] SPF 시설로 인증된 마크로젠과 경희대학교 의과대학 실험동물실에서 보통 사료를 자유로 섭취하도록 공급하며 사육하였다. 실험생쥐의 일반 유전형을 통일하기 위해 여교배 육종(Back-cross breeding), 자매 육종(sibling breeding)을 통해 F9까지 확립하였다.

[0090] **<실시예 3> 세포 배양 및 일시적 형질전환(Transient Transfection)**

[0091] SK-Hep1 인간 간암세포(human hepatoma cells)(ATCC, HTB-52)는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 100 U/ml 페니실린(penicillin), 100 mg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 Dulbecco's Minimum Essential Medium(DMEM)으로 37℃/5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0092] 일시적 형질전환을 위해, 6 웰 플레이트(well plate)에 4 × 10^5 cells/well로 24시간 동안 배양한 세포에 원하는 DNA 또는 shRNA, siRNA들을 GeneJammer transfection reagent(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 시행하였다. 형질전환 후, 4시간 경과 후 PBS로 씻어낸 다음, 다시 10% FBS DMEM으로 24 ~ 48시간 동안 배양한 후, 분석하였다.

[0093] **<실시예 4> 헤어핀 구조 miR-24 및 H2AX 간섭(interference) RNA를 발현하는 레트로바이러스의 제작**

[0094] 도 1에서 보여준 바와 같이 miR-24를 위한 이중 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드와, shH2AX, 스크램블된 대조군(scrambled control) shRNA(Rv-shSCR)도 유사하게 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ vector에 클로닝하였다. shH2AX와 shSCR의 센스 가닥(sense strand) 염기서열은 각각 다음과 같다: shH2AX, 5'-caacaagaagacgcgaatc-3'(서열번호: 4); shSCR, 5'-aattctccgagcgtgtcacgt-3'(서열번호: 5). 레트로바이러스를 생산하는 BD RetroPack PT67 packaging cells(BD biosciences)에 miR-24, shH2AX, shSCR을 각각 Genejammer transfection reagent(Stratagene, Cedar Creek, TX)와 25 mM 클로로퀴닌(chloroquine)(Sigma-Aldrich)을 사용하여 형질전환하였다. 형질전환 후 48시간 경과 후, 필터와 원심분리(50,000 x *g* for 1.5 h) 방법으로 바이러스를 수득하였다. 수득한 바이러스(miR-24, shH2AX or shSCR)는 SK-Hep1 세포(0.8 x 10^6/60mm plate)에 다시 감염시킨 후, 퓨로마이신(puromycin)(1 mg/ml)을 첨가하여 2주 동안 안정적인(stable) 세포를 선별하였다.

[0095] **<실시예 5> miR-24의 과발현에 의한 히스톤 H2AX의 발현 억제 확인**

[0096] 본 발명자들은 miR-24의 과발현이 히스톤 H2AX의 발현을 억제하는지 알아보기 위해, 상기 제조된 miR-24 과발현 세포를 RT-PCR, 웨스턴블랏 및 면역세포염색을 이용하여 히스톤 H2AX의 발현을 분석하였다.

[0097] 구체적으로, RT-PCR은 다음과 같이 수행하였다. Total RNAs는 트리졸 시약(Trizol reagent)(Invitogen)을 사용하여 분리하였다. 실시간 RT-PCR은 다음의 프라이머를 사용하여 실시하였다. Human H2AX의 증폭은 5'-cat gtc ggg ccg cgg caa-3'(서열번호: 6); 5'-gtg gcg ctg gtc ttc ttg-3'(서열번호: 7)을 사용하였고, mouse H2AX는 5'-ggc ctg tgg aca aga gtt cta t-3'(서열번호: 8); 5'-gcc cat taa atc tcc cca ct-3'(서열번호: 9)를 사용하였다. 또한 18S rRNA primer(human과 mouse, 5'-gag cga aag cat ttg cca ag-3'(서열번호: 10); 5'-ggc atc gtt tat ggt cgg aa-3'(서열번호: 11)를 이용하여 H2AX의 증폭산물을 보정하였다. 96-웰 플레이트(well plate)에 SYBR? Premix Ex Taq™(TaKaRa)을 포함한 PCR 조성액을 Light Cycler1.5 (Roche)로 95℃에서 10초 후 95℃에서 5초, 60℃에서 34초를 40회 반복하였다. 또한, 하기 미토콘드리아 관련 유전자(mitochondria-related genes), nDNA-encoded OXPHOS subunits 및 미토콘드리아의 생성을 조절하는 유전자의 발현을 정량하기 위해 반정량적(semi-quantitative) RT-PCR을 수행하였다. 각각의 반응산물들은 1.2% 아가로즈(agarose) 전기

영동을 통해 확인하였다. 이 실험 역시 18S rRNA 산물로 보정하였다. 또한 mtDNA의 복제수(copy number)를 측정하기 위해 세포에서 추출한 게놈(genomic) DNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 실시하였고 이는 베타-액틴(β-actin) DNA로 보정하였다. RT-PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

RT-PCR 및 PCR에 사용되는 인간 프라이머 세트들

Category (OXPHOS)	Gene	forward (5'-3')	reverse (5'-3')	product size (bp)	Annealing Temp.(℃)	# PCR cycles
1. mtDNA encoded OXPHOS subunits						
NADH dehydrogenase (complex I)	ND1	TCTAGCCACCTCTAGCCTAG	GTCATGATGGCGGAGTAAT	225	60	24
	ND2	CCTCAATTACCCACATAGGA	TTGAGTAGTAGGAATGCGGT	115	60	24
	ND3	CCCTCCTAGCCTTACTACTA	TTGTTTGTAGGGCTCATGGT	213	60	24
	ND4	CTGGGTCAATAGTACTTGCC	GAATGGCTGTTACTACGAGG	228	60	24
	ND4L	CACACCTCATATCCTCCCTA	GCACAATATTGGCTAAGAGG	108	60	24
	ND5	TGTGCCTAGACCAAGAAGTT	GTTGGAATAGGTTGTTAGCG	256	60	24
	ND6	ATCAACGCCCATAATCATAC	GTTGAGGTCTTGGTGAGTGT	197	60	24
Cytochrome b (complex III)	CytB	TATACCCTAGCCAACCCCTT	GCTACTTGTCCAATGATGGT	296	60	24
Cytochrome C oxidase (complex IV)	COXI	TGATCTGCTGCAGTGCTCTG	TATTAGGACTTTTCGCTTCG	519	60	24
	COX2	ACTAACATCTCAGACGCTCA	GATTGTCAACGTCAAGGAGT	265	60	24
	COX3	CAATGATGGCGCGATGTAAC	GGTGATTGATACTCCTGATG	270	60	24
ATP synthase (complex V)	ATP6	AACAACCGACTAATCACCAC	GTAAATGAGTGAGGCAGGAG	164	60	24
	ATP8	ACTATTCCTCATCACCCAAC	GGCAATGAATGAAGCGAACA	138	60	24
2. Nuclear DNA encoded OXPHOS subunits						
NADH dehydrogenase (complex I)	NDUFA6	GGTTGTGGAGTGGATGCTTT	TGGAATTGGTGCACAGTGTT	161	60	28
	NDUFB9	CAGCATCCACAGCCATACAT	GCAGCTGCTTAACCTCTCGT	199	60	28
Succinate dehydrogenase (complex II)	SDHA	ACCAACTACAAGGGGCAGGT	CGACCAAAGACAACCAGGTC	152	60	28
	SDHC	GAAGAGATGGAGCGGTTCTG	CCAGACACAGGGACTTCACA	220	60	28
Cytochrome b (complex III)	UQCRB	GCAAGTGGCTGGATGGTATT	GTGCCCTCTTAATGCGAAAC	168	60	28
	UQCRC1	TGTCTCGTGCAGACTTGACC	GAAGCGGCATGGAGTAAGAG	179	60	28
Cytochrome C oxidase (complex IV)	COX5B	ACTGGGTTGGAGAGGGAGAT	AGACGACGCTGGTATTGTCC	172	60	28
	COX7B	AGCCACCAGAAACGTACACC	TGGGGTAACTCTGCCAACA	150	60	28
ATP synthase (complex V)	ATP5A1	CCAGGGCTATGAAGCAGGTA	TATCCCCTTACACCCGCATA	222	60	28
	ATP5O	CGTTTCTCTCTTCCCACTCG	GTGGCATAGCGACCTTCAAT	176	60	28
3. Genes for other functions						
Mitochondrial function regulation	NRF1	CTACTCGTGTGGGACAGCAA	AATTCCGTCGATGGTGAGAG	212	60	27
	TFAM	GGCACAGGAAACCAGTTAGG	CAGAACACCGTGGCTTCTAC	366	55	30
	PGC-1α	TCAGTCCTCACTGGTGGACA	TGCTTCGTCGTCAAAAACAG	531	56	28
	UCP2	GGATGTGGTAAAGGTCCGAT	AGCTGCTCATAGGTGACGAA	471	60	28
	SIRT 1	ACATTAGTGCCTGCCTGGAT	TATAATCAGGGGCCTGTTGC	212	60	30
Anti-oxidant	SOD2	AATCAGGATCCACTGCAAG	CGTGGTTTACTTTTTGCAAGC	180	60	28

[0098]

[0099] 구체적으로, 웨스턴블랏(Western blot) 분석은 다음과 같이 수행하였다. 각각의 shRNA들을 발현하는 레트로바이러스로 감염(infection)된 SK-Hep1 세포에서 PRO-PREP lysis 버퍼[10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM 디티오트레이톨(dithiothreitol), 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride), 5 mg/ml 아프로티닌(aprotinin), 5 mg/ml 펩스타틴 A(pepstatin A), 5 mg/ml 류펩틴(leupeptin), 및 1% Triton X-100)](iNtRON biotech, Korea)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 그 후 12 ~ 15% SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 단백질을 분리한 후 니트로셀룰로오즈 막(nitrocellulose membrane)에 이동(transfer)하여 웨스턴블랏을 실시하였다. 발현 양을 관찰하기 위해, 사용한 1차 항체로는 항-마우스 H2AX(R&D system, Inc.

MN.), H2A, PGC-1α(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Akt, pAkt, FoxO1, pFoxO1, AMPK, pAMPK, Erk, pErk, NF-κβ(p65)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA), ND9, SDHA, UQCRC2, COXI, COXIV 및 ATPase α(Molecular Probes, Eugene, OR)를 구입하여 확인하였고, 항-인간 H2AX, Tfam 및 NRF-1은 직접 제작하여 사용하였다(Ahn et al., 2009). 동일한 단백질의 양을 로딩(loading)하였는지 확인하기 위하여 항-β-액틴(Sigma) 항체를 이용하였다.

[0100] 한편, 세포 대신 생쥐에서 얻은 조직은 -80℃에서 동결보관한 후, PRO-PREP lysis 버퍼에서 균질화한 다음, 상기와 동일한 방법으로 항-생쥐 H2AX를 사용하여 웨스턴블랏을 실시하였다. 뇌조직들은 30 μg 단백질, 다른 조직들은 20 μg 단백질을 사용하여 15% SDS-PAGE로 분리하였다. 동일한 단백질의 양을 로딩(loading)하였는지 확인하기 위하여, 항-β-튜블린(Abcam) 항체를 이용하였다.

[0101] 구체적으로, 면역세포염색(Immunocytochemistry)은 하기와 같이 수행하였다. 우선, 커버슬립(Coverslips)에서 24시간 동안 배양한 세포에 MitoTracker Orange(Molecular Probes Eugene, OR)를 300 nM되게 첨가하고 20분 동안 10% FBS포함 배지에서 미토콘드리아를 염색하였다. 염색이 끝난 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)/PBS로 5분 동안 고정하였다. DPBS로 두 번 세척한 후 차갑게 해둔 0.1% Triton X-100으로 10분 동안 배양하여 세포막투과성을 높였다. DPBS로 두 번 세척한 후 5% BSA/DPBS-T에서 1시간 동안 처리하였다. Anti-H2AX(1:500) 항체를 1시간 동안 처리한 후 세척하고 488 형광물질이 결합한 2차 항체(Alexa Fluor 488, 1:1000, Molecular Probes)를 첨가하여 1시간 동안 처리하였다. DPBS로 두 번 세척한 후 DAKO fluorescent mounting medium(DAKO Corporation, Carpinteria, CA)으로 커브글라스(coverglass)를 고정시키고 공초점레이저현미경으로(Carl Zeiss LSM510) 관찰하였다.

[0102] 이하, 모든 실험의 통계처리는 다음과 같이 수행하였다. 모든 결과는 통계는 평균(mean) ± 표준편차(standard error of mean; SEM)로 표시하였다. 통계적 유의성 검사는 InStat(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 Student's *t*-test로 하였으며, p값이 0.05 이하일 때 통계적 유의성을 가진 것으로 판단하였다.

[0103] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, 인간 간세포 세포주인 SK-Hep1 세포에 miR-24를 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 형태로 과발현하였을 때, 히스톤(histone) H2AX의 mRNA와 단백질의 발현이 선택적으로 억제되었으며, 그 정도는 H2AX의 코딩(coding) 부위를 표적으로 디자인한 RNA 간섭(H2AXi)을 역시 짧은 헤어핀 형태로 과발현하였을 경우와 거의 유사하였다(도 3).

[0104] 또한, 도 4에서 보는 바와 같이, miR-24의 표적은 인간 및 마우스 H2AX의 3'-UTR에 작동하여 H2AX의 발현을 억제하고, shH2AX는 인간 H2AX 코딩 부위에 작동하여 H2AX를 특이적으로 발현을 억제함으로써, miR-24의 표적이 H2AX의 3' UTR이라는 것을 루시퍼라제(luciferase) 리포터 벡터를 사용하여 증명하였다(도 4)

[0105] **<실시예 6> miR-24 과발현에 의한 미토콘드리아 기능 억제 확인**

[0106] 본 발명자들은 miR-24 과발현이 미토콘드리아 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 제조된 miR-24와 shH2AX 과발현 세포에서 미토콘드리아 기능 지표인 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential), 산화적 스트레스(reactive oxygen species; ROS), 세포내 ATP 수준, 산소호흡률(Oxygen consumption rate, OCR)을 각각 측정하였다.

[0107] 구체적으로, 미토콘드리아 막전압 및 산화적 스트레스 분석은 다음과 같이 분석하였다. 우선, 세포주들을 6 웰 플레이트에 배양한 후 100 nM의 테트라메틸로다민 에틸에스테르(tetramethylrhodamine ethylester)(TMRE, Invitrogen) 또는 1 uM의 5,6-클로로메틸-2',7'-디클로로디하이드로플루오르세인 디아세테이트(5,6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester)(CM-H_2DCF-DA, Invitrogen)를 37℃에서 20분간 처리하였다. 각 웰을 PBS로 세척한 후 레이저 공초점 현미경(laser scanning confocal microscope, Carl Zeiss)으로 관찰하였다. 또한, 형광세기의 정량을 위하여 96 웰에 배양한 세포들을 같은 방법으로 염색한 후 형광측정기로 측정하여 그 값으로 보정하였다.

[0108] 또한, 세포내 ATP 정량은 다음과 같이 분석하였다. 우선, 세포를 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM)에 10% 소 태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 포함된 용액에서 37℃, 5% 탄산가스(CO_2), 95% 공기(O_2)의 조건으로 배양하였다. 모든 군의 세포에서 세포 파쇄물을 얻은 다음 ATP-Bioluminescence assay kit(#FLASC; Sigma-Aldrich사, 미국)을 사용하여 ATP 농도를 측정하였다. 이 때 사용된 세포의 단백질농도를 BCA assay 방법으로

측정한 후 보정하여 세포내 ATP값을 계산하였다.

[0109] 또한, 산소호흡률은 다음과 같이 분석하였다. Dulbecco's Modified Eagles Medium & Ham's F12(1:1 DMEM/F12, Gibco) 용액에 포함된 세포를 37℃로 유지되는 Oxygraph-2k 챔버(Oroboros사, 오스트리아)에 옮긴 후 기초 산소 호흡률(OCR)을 측정하였다. OCR은 미토콘드리아의 산화적 인산화(OXPHOS) 복합체를 통하여 전달된 전자가 산소에 전달되며 소모되는 산소량을 측정하는 것으로 미토콘드리아 기능의 직접적 척도가 될 수 있다. State 2(resting complex I-supported respiration)와 state 3(maximal mitochondrial respiration)를 측정하기 위해 10 ug/ml의 디기토닌(digitonin)으로 세포투과성을 높였다. State 2(-ADP)와 state 3 OCR(+ADP)은 기질(10 mM glutamate and 4 mM malate)과 1.5 mM ADP를 serial로 첨가하고 각각 측정되었다. 이때 사용된 세포의 단백질 농도를 BCA 분석 방법으로 측정한 후 보정하여 OCR 값을 계산하였다. 이렇게 측정된 OCR은 pmoles/sec/mg으로 표시하였다.

[0110] 그 결과, 도 5에서 보는 바와 같이, miR-24 과발현 세포는 미토콘드리아 기능 지표인 미토콘드리아 막 전위(membrane potential), 세포내 ATP 수준, 산소호흡률이 50% 이상 현저하게 감소하였으며, 산화스트레스가 2 ~ 4배 증가하였다. 이 세포를 오랫동안 지속하여 계대 배양한 경우 미토콘드리아 복제 및 전사를 조절하는 인자인 미토콘드리아 전사 인자 A(mitochondrial transcription factor A; Tfam)의 발현은 90% 이상 억제되었다. 계대수가 높은 간세포는 미토콘드리아 기능이 완전히 억제되었다(도 5).

[0111] **<실시예 7> miR-24 과발현에 의한 미토콘드리아 산화적 인산화 복합체 발현 억제 확인**

[0112] 본 발명자들은 miR-24 과발현이 미토콘드리아 산화적 인산화 복합체(OXPHOS) 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 제조된 miR-24 과발현 세포에서 상기 <실시예 5>에 기재된 바와 같은 방법으로 RT-PCR 및 웨스턴블랏을 이용하여 mtDNA-유래 단백질, 핵 유전자-유래 단백질 및 미토콘드리아 산화적 인산화 복합체 단백질의 발현을 분석하였다.

[0113] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이, miR-24 과발현 세포는 오래 계대배양할 경우 mtDNA-유래 13개 단백질들 중 ND6를 제외한 mRNA와 단백질들의 발현이 모두 50% 이상 감소하였다. 또한, 핵유전자 유래-단백질들의 발현도 복합체 1인 NDUFA6, NDUFB9, 그리고 복합체 2인 SDHA, SDHC를 제외한 거의 모든 발현이 억제되었다(도 6의 A 및 B). 또한, 미토콘드리아 산화적 인산화 복합체 단백질들의 발현이 억제되었음을 확인하였다(도 6의 D 및 도 7).

[0114] **<실시예 8> miR-24 과발현에 의한 연령-의존성 Tfam과 NRF-1의 발현 억제 확인**

[0115] 본 발명자들은 miR-24 과발현이 Tfam의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 제조된 miR-24 과발현 세포에서 상기 <실시예 5>에 기재된 바와 같은 방법으로 RT-PCR 및 웨스턴블랏을 이용하여 Tfam 및 NRF-1의 발현을 분석하였다.

[0116] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이, 미토콘드리아 생성을 조절하는 Tfam의 발현이 90% 이상 억제되었며, NRF-1은 약간 감소하였으나, PGC-1α 발현은 거의 변화하지 않았다(도 6의 B 및 E). 또한, mtDNA의 수는 약 60% 정도 감소하였다(도 6의 C). 그러나 계대시간이 짧은 세포에서는 H2AX의 발현이 억제되어도 Tfam의 발현은 정상이었으며, 다른 산화적 인산화 복합체의 발현도 거의 정상수준으로 유지되었다(도 8).

[0117] 세포의 배양 계대 수가 증가할수록 미토콘드리아 기능 억제가 계속 악화되어, mtDNA를 인위적으로 결핍시킨 세포인 rho0 세포와 유사한 세포 형태 및 배양 조건을 나타내었다. 이는 miR-24에 의한 H2AX 발현 억제, 미토콘드리아 기능 억제, Tfam 발현 억제가 서로 상호 조절되며 기능 억제의 악순환 고리를 연결하고 있음을 보여주는 것이다.

[0118] **<실시예 9> miR-24 과발현으로 인한 세포증식 속도 억제 확인**

[0119] 본 발명자들은 miR-24 과발현이 세포 증식 속도, 세포 배양액 산성화 및 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 제조된 miR-24 과발현 세포를 배양한 후, 세포수, 배지 pH, 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 활성, 젖산(lactate) 함량, 칼세인 활성(Calcein viability) 및 단백질 산화도(Protein oxidation assay)를 각각 분석하였다.

[0120] 구체적으로, 세포수, 배지 pH, 젖산탈수소효소 활성, 젖산 함량 분석은 하기와 같이 수행하였다. 우선, 세포를 6 웰 플레이트에 넣은 후 12, 24, 48, 72시간 동안 배양한 후 수득(harvest)하여 헤모사이토미터(hemocytometer)를 사용하여 직접 세포수를 측정하였다. 이 과정은 독립적으로 세 번씩 반복하였다. 각각의 세포들을 시간별로 수득한 후, TOX7 LDH assay kit(sigma)를 사용하여 젖산탈수소효소의 활성을 보고된 방법에 따라 측정하였다.(Han and Pak, 1999). 또한 세포 배양액(conditional media)을 수득하고 pH meter를 이용하여 배양액 pH를 측정하였다. 배지상의 젖산(Lactic acid) 양은 lactate assay kit(BioVision, Mountain View, CA)를 사용하여 측정하였다.

[0121] 구체적으로, 칼세인 활성 분석은 하기와 같이 수행하였다. 우선, 검은색 96 웰 배양 플레이트에 각각의 세포주를 24시간 동안 배양한 후, 16시간 동안 페놀 레드(phenol red)와 혈청(serum)이 없는 배지에서 배양하였다. 1 uM 칼세인 AM(Molecular Probes)을 1시간 동안 처리하고 100 ul의 DPBS로 교체한 후 형광측정기(Fluorescence plate reader, Victor, Perkin Elmer)로 485 nm에서 형광세기를 측정하였다. 측정된 각 웰의 형광세기는 단백질농도로 보정하였다.

[0122] 구체적으로, 단백질 산화도 분석은 하기와 같이 수행하였다. 우선, 증가한 ROS에 의해 산화된 단백질의 양을 OxyBlot protein oxidation detection kit(Chemicon International, Temecula, CA)으로 측정하였다. 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH)로 처리한 각각의 단백질을 10 % SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF 막(Millipore, Bedford, MA)에 이동하였다. DNPH에 의해 결합된 카보닐화 단백질은 항-DNPH 항체를 이용하여 웨스턴블랏과 유사한 방법으로 검출하였고, 이것은 항-β 액틴(1:10,000, Sigma) 항체로 검출된 양으로 보정하였다.

[0123] 그 결과, 도 9에서 보는 바와 같이, 세포주기 패턴(cell cycle pattern)에는 거의 차이가 없었으나, miR-24 과발현 세포는 세포 증식력과 칼세인 활성이 감소되었다(도 9). 세포의 배양 시간이 48시간이 경과하면 miR-24 발현 세포는 H2AX의 발현 억제로 인해 세포내 LDH의 활성 증가, 배지내 젖산 증가, 세포배양액의 산성화가 관찰되었다. 이것은 미토콘드리아 기능의 억제로 인한 혐기성 해당작용(anaerobic glycolysis)의 결과물임을 알 수 있다.

[0124] **<실시예 10> miR-24 과발현으로 유도된 H2AX 발현 억제에 의한 인슐린 신호전달계의 억제 확인**

[0125] 본 발명자들은 miR-24 과발현으로 유도된 H2AX 발현 억제가 인슐린 신호전달계에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 제조된 miR-24 과발현 세포를 0.5% FBS 포함 저포도당 DMEM에서 100 nM 인슐린(insulin)으로 15분간 동안 처리 후 수득하여 상기 <실시예 5>에 기재된 방법과 같이 웨스턴블랏을 수행하였다.

[0126] 그 결과, 도 10에서 보는 바와 같이 H2AX의 발현을 억제한 세포는 인슐린 신호전달계에서 인슐린 자극에 의한 Akt 인산화(phosphorylation)와 아래 단계인 Foxo1의 인산화가 나타나지 않았다(도 10의 A). 한편, AMPK의 발현량은 감소하나, pAMPK는 오히려 증가하였고, Erk의 인산화는 정상이었다.

[0127] 이러한 인슐린 신호전달계의 억제는 미토콘드리아 기능 억제와 Akt간의 연계가 있음으로 보여주며, 미토콘드리아 기능억제로 세포의 인슐린 감수성이 저해되는 기전을 보여준다(도 10의 B).

[0128] **<실시예 11> 히스톤 H2AX의 재발현으로 miR-24 과발현에 의한 기능 억제의 회복 확인**

[0129] 본 발명자들은 히스톤 H2AX의 재발현이 miR-24 과발현에 의한 기능 억제를 회복시킬 수 있는지 알아보기 위해, 상기 <실시예 3>와 같은 방법으로 H2AX의 발현을 억제한 세포에 H2AX 발현 벡터를 형질전환시킴으로써 H2AX를 재발현시킨 후, 상기 <실시예 6> 및 <실시예 9>와 같은 방법으로 미토콘드리아 막전압, 세포내 ATP 양, 산소소모량, 세포내 산화스트레스, 젖산 생산 정도를 분석하였으며, 전자현미경을 통해 미토콘드리아의 형태 및 숫자를 관찰하였다.

[0130] 구체적으로, H2AX를 재발현하는 실험은 shH2AX나 miR-24를 안정적(stable)으로 발현하는 pcDNA3.1-H2AX 발현 플라스미드(expression plasmids)를 형질전환(transfection)한 다음, G418(800 ㎍/ml)으로 선별하였다.

[0131] 구체적으로, 전자현미경 관찰을 위해, 세포를 획득한 다음 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 2시간 동안 고정하고, 다시 2% 포름알데히드(formaldehyde)를 포함하는 DPBS에 실온에서 2시간 고정하였다. 이것을 전자현미경 관찰을 위한 고정, 절단, 염색의 과정을 거쳐 JEOL 100CX 전자 현미경(electron microscope)으로 80 kV에서 관찰하였다.

[0132] 그 결과, 도 11에서 보는 바와 같이, H2AX를 재발현하면, 감소했던 미토콘드리아 막전압, 세포내 ATP 양, 산소 소모량, 증가하였던 세포내 산화스트레스, 젖산생산 등, 측정한 모든 비정상 지표들이 모두 정상수준으로 회복되었다(도 11). 또한, 도 12에서 보는 바와 같이 파괴되었던 미토콘드리아의 형태 및 숫자가 정상세포와 거의 비슷하게 회복되었다(도 12). 따라서, miR-24에 의한 기능이 H2AX를 매개로 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0133] **<실시예 12> miR-24를 과발현하는 아데노바이러스(Ad-miR-24)의 정맥주사 모델의 제조**

[0134] 본 발명자들은 miR-24를 과발현하는 아데노바이러스(Ad-miR-24)를 생쥐의 꼬리 정맥으로 주입후 7일 경과한 다음, 당부하검사(Oral glucose tolerance test, OGTT), 체중, 가자미근(soleus muscle)의 산소 소모량, 간 미토콘드리아 산소 소모량을 분석하였고, 간조직과 간 미토콘드리아에서 H2AX와 Tfam 단백질 발현 정도를 웨스턴블랏으로 분석하였으며, 간, 지방 및 근육에서 H2AX mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 이용하여 분석하였다.

[0135] 그 결과, 도 13에서 보는 바와 같이, miR-24를 과발현하는 아데노바이러스(Ad-miR-24)를 C57BL6 생쥐에 정맥으로 주사하였을 때, 간에서의 H2AX 단백질 및 mRNA의 발현이 현저히 억제되었으며, 주사후 1주일 후에 정소 백색지방의 양이 약 50% 증가하였다. 그러나 정소 백색지방의 H2AX 발현에는 전혀 변화가 없어서, 간조직에서 유도된 미토콘드리아 기능의 저하로 인해 유리된 미지의 물질이 백색지방의 증가에 기여한 것임을 알 수 있었다(도 13)

[0136] **<실시예 13> miR-24를 과발현하는 생쥐의 표현형 결정**

[0137] 본 발명자들은 miR-24를 과발현하는 형질전환 생쥐의 표현형을 관찰하기 위해, 상기 통상의 방법으로 제작한 miR-24를 과발현하는 형질전환 생쥐를 back-cross, sibling breeding 등의 방법으로 유전자 cleaning을 하고, F7까지의 세대를 확보하였다. founder 생쥐로부터 F1 ~ F5에 이르기까지 이들 생쥐의 표현형을 관찰하였다.

[0138] 구체적으로, 상기 형질전환 생쥐가 체중 및 정소 백색지방 중량의 증가를 나타내는지 알아보았다. 그 결과, 자유로(ad libtum) 정상식이를 공급한 형질전환 생쥐들에서 36주령이 경과한 후 체중이 약 50% 이상 증가하고, 정소 백색지방이 80% 이상 증가하였다.

[0139] 구체적으로, 상기 형질전환 생쥐가 성인형 비만, 당뇨 및 인슐린 저항증을 나타내는지 알아보았다. 43 주령 생쥐에서 성인형 비만, 당뇨 및 인슐린 저항증을 분석한 결과, 도 14에서 보는 바와 같이, 형질전환 생쥐는 경구당부하 검사(oral glucose tolerance test, OGTT) 및 인슐린 부하검사(insulin tolerance test, ITT)에서 모두 인슐린 저항증이 나타났다(도 14의 D 및 E). 또한, 간조직에서 단백질들의 발현을 웨스턴 블랏으로 조사한 결과, 5주령인 형질전환 생쥐의 H2AX의 발현은 약 50% 감소하였으며 Tfam을 비롯한 핵유래-산화적 인산화 복합체 단백질들의 발현은 정상수준이었다. 그러나 43주령 형질전환 생쥐의 경우 H2AX이 90% 이상 감소하고, Tfam, COX1, ATPase α의 발현도 90% 이상 감소하였다(도 14의 F). 미토콘드리아에 존재하는 H2AX는 거의 관찰되지 않았다(도14의 G). metabolic cage를 사용하여 에너지소비율을 측정한 결과, 비만이 나타나기 전인 20주령때 이미 에너지소비율이 50% 이상 감소하였다. 이는 미토콘드리아 기능 억제를 원인으로 한 인슐린 저항증, 비만 및 당뇨를 주 증상으로 하는 대사증후군의 대표적인 표현형이다. 따라서 miR-24 형질전환 생쥐는 현존하는 비만생쥐인 ob/ob 생쥐 및 당뇨생쥐인 db/db 생쥐를 대체할 수 있는 획기적 동물 모델이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0140] 구체적으로, 상기 형질전환 생쥐가 심장비대증(cardiac hypertrophy)을 나타내는지 알아보았다. 52주령의 생쥐를 마취한 후, 심장초음파(sonogram)로 측정한 좌심실 벽의 두께 및 심박동수를 측정한 결과, 도 15에서 보는 바와 같이, 죄심실 벽의 두께가 0.15 cm에서 0.2 cm로 두꺼워져서 좌심실비대증의 특이적인 소견을 보였다. 또한 심장박동수(heart rate)가 분당 300회인 정상 생쥐에 비해 형질전환생쥐는 분당 80로 특징적인 서맥(bradycardia)을 나타내었다(도 15). 이것은 miR-24 과발현에 의해 심근비대질병이 발생함을 나타냄을 알 수 있다.

[0141] 구체적으로, 상기 형질전환 생쥐가 지방간을 나타내는지 알아보았다. 54주령의 생쥐를 희생하여 각 조직별 표현형과 H2AX의 발현 변화를 웨스턴블랏으로 관찰한 결과, 도 16에서 보는 바와 같이, 내장지방의 현저한 증가와 함께 정소 백색지방의 크기가 크게 증가하였다. 또한, 매우 특징적으로 형질전환 생쥐의 간조직의 색깔이 갈색으로 변하는 지방간의 모양이 관찰되었다. 심장의 크기는 전반적으로 약간 비대한 것으로 보이나 전체 무게는 통계적으로 유의성이 없는 정도로 차이가 없었다. 기타 다른 조직에서의 형태학적 변화(morphological chang

e)는 관찰되지 않았다.

[0142] 한편, 54주령 생쥐로부터 채취한 각 조직에서 H2AX의 발현량을 웨스턴 블롯으로 비교하였을 때, 뇌의 해마(hipocampus), 선조체(striatum), 흑질(substantia nigra), 대뇌피질(cortex)에서 현저한 발현 감소가 관찰되었다. 이는 상기 형질전환 생쥐가 미토콘드리아 기능이 저하된 퇴행성 뇌신경질환의 모델로도 사용할 수 있음을 시사하고 있다. 또한, 다른 조직인 심장, 간, 폐, 위, 신장, 비장, 췌장에서 H2AX의 발현 감소가 관찰되었고, 근육 중 적색근육인 가자미근(soleus)에서는 감소, 백색근육인 종아리비복근(gastrocnemius)에서는 감소가 관찰되지 않았다. 또한, 정소(testis), 백색지방과 같이 미토콘드리아의 존재량이 극히 적은 것으로 보고된 조직에서는 발현이 변화하지 않거나 오히려 증가된 것 양상을 보였으며, 미토콘드리아가 풍부한 갈색지방 조직에서는 H2AX의 발현이 현저히 감소하였다(도 16).

[0143] 따라서, 본 발명에서 제작된 miR-24 과발현 형질전환 생쥐는 기존의 연구결과로는 예측하지 못했던 세포의 미토콘드리아 기능을 연령의존적으로 감소시키는 결과를 보여주었다. 실제 miR-24의 표적인 H2AX의 활성저하가 미토콘드리아 기능을 억제하고, 순차적으로 연령이 증가함에 따라 미토콘드리아의 복제 및 전사를 조절하는 주요 조절자인 Tfam의 발현을 억제하게 된다. 이 H2AX, 미토콘드리아 기능, 그리고 Tfam은 연령이 증가함에 따라 상호 지속적으로 활성을 억제하는 악순환을 거듭하는 것으로 관찰되었다. 이런 관계는 도 17에서 도식적으로 표시한 바와 같다(도 17). 그러므로 본 발명에서 제작한 miR-24 과발현 형질전환 생쥐는 노령화에 따라 미토콘드리아 기능이 감소되어 발생하는 것으로 제시된 거의 모든 퇴행성 질환의 모델로 사용될 수 있다. 이러한 퇴행성 질환에는 비만, 인슐린저항증, 체지방증가, 지방간, 간섬유화, 대사증후군, 지질대사이상, 고혈압, 신경퇴화질환, 양극성 장애, 당뇨병, 동맥경화증, 국소빈혈, 심장병, 간질환, 췌장질환, 암, 노화, 심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅톤병, 치매 등을 생각할 수 있다. 그 외에 Tfam의 Knock-out 생쥐에서 관찰된 정자 형성(spermatogenesis) 억제 등 생식 능력의 저하도 가능하다. 실제 형질전환 생쥐의 계대(generation)가 진행될수록 offspring의 수가 감소하고, 자연 유산의 비율이 급증하는 것을 관찰함으로써 알 수 있다. 한편, H2AX는 DNA 회복과 크로모좀 안정성(chromosome stability)에 중요한 역할을 하므로, 암 유발물질(carcinogen)에 노출되었을 때, 정상 생쥐에 비해 본 발명의 형질전환생쥐가 악성종양의 발병율, 악화도가 심화될 수 있음을 알 수 있다.

산업상 이용가능성

[0144] 본 발명에 따른 형질전환 생쥐는 노령화에 따라 미토콘드리아 기능이 감소되어 발생하는 것으로 제시된 거의 모든 퇴행성 질환의 모델로 사용될 수 있으므로, 미토콘드리아 기능 저하에 기인한 질환에 대한 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

수탁번호

[0145]

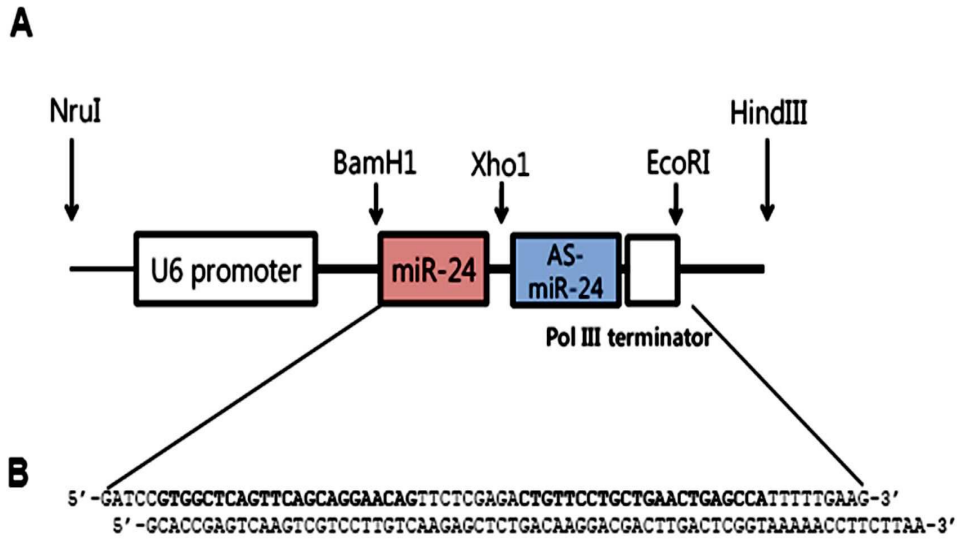
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11821BP

수탁일자 : 20101203

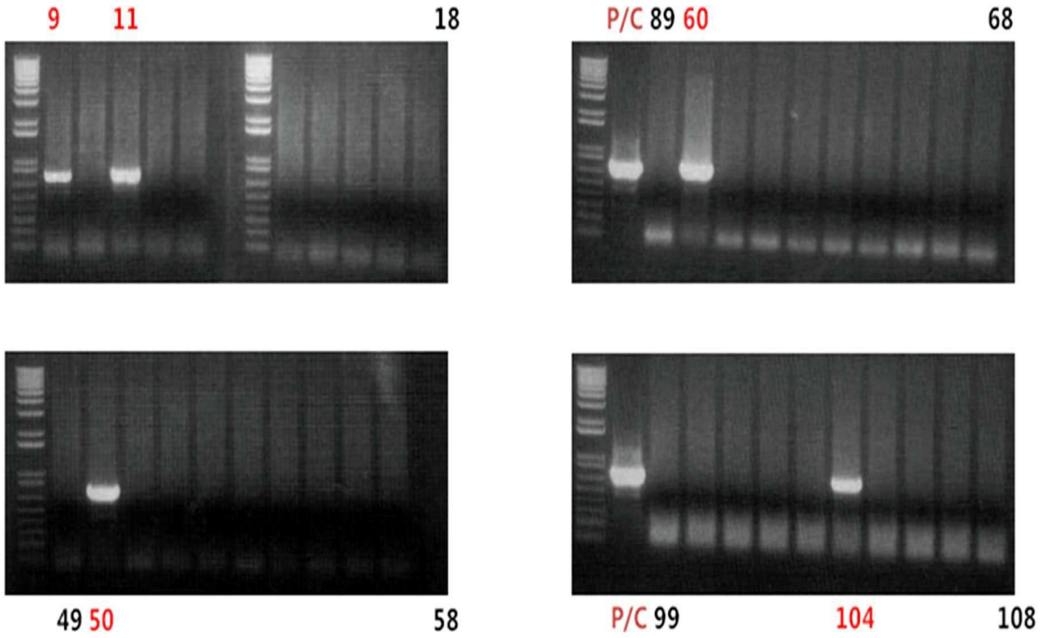
도면

도면1


A
NruI
BamH1
Xho1
EcoRI
HindIII
U6 promoter
miR-24
AS-miR-24
Pol III terminator
B
5′-GATCCGTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGTTCTCGAGACTGTTCCTGCTGAACTGAGCCATTTTTGAAG-3′
5′-GCACCGAGTCAAGTCGTCCTTGTCAAGAGCTCTGACAAGGACGACTTGACTCGGTAAAAACCTTCTTAA-3′



도면2

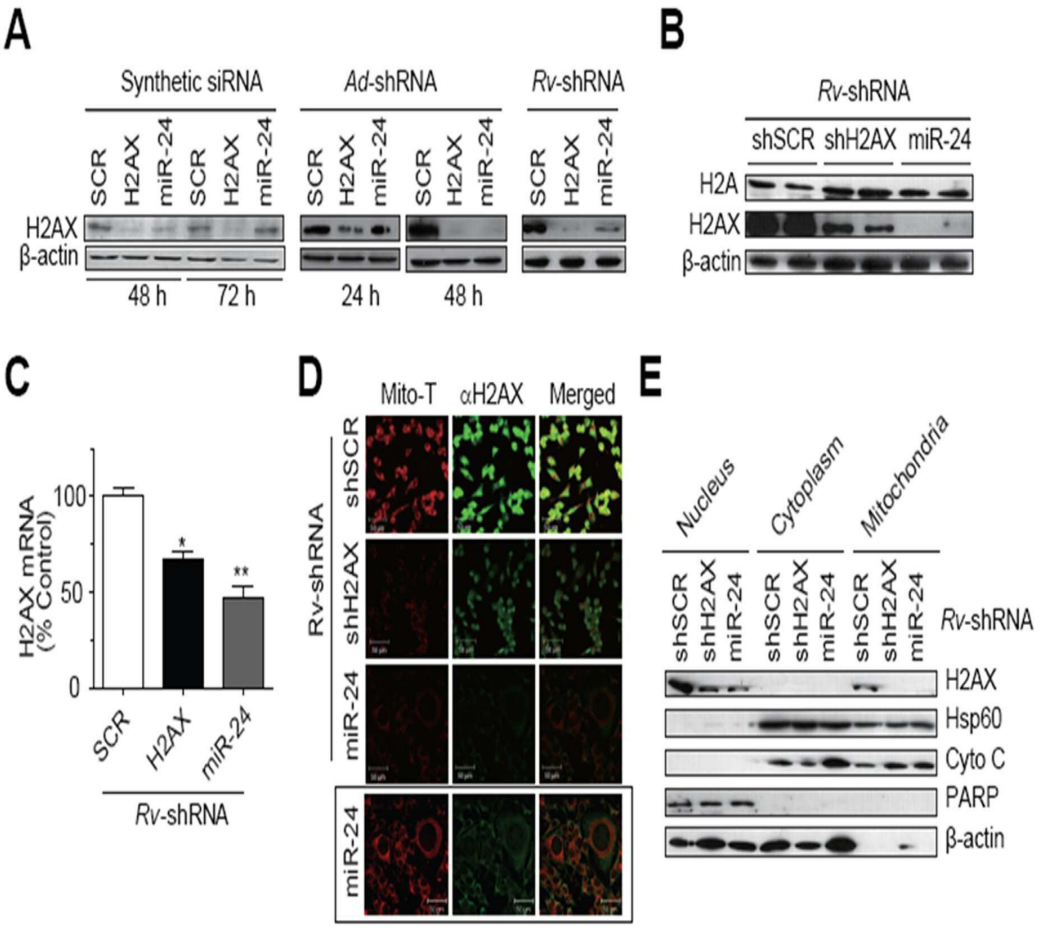


P/C : positive control
9,11,60,50,104 : positive line
Others : negative line

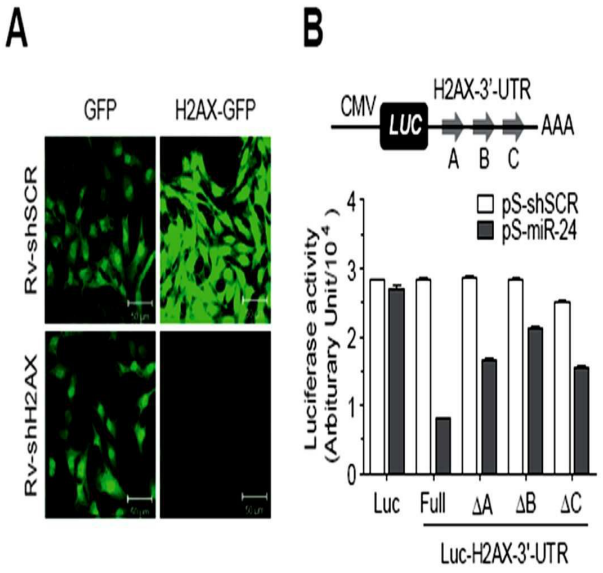
PCR primers for screening

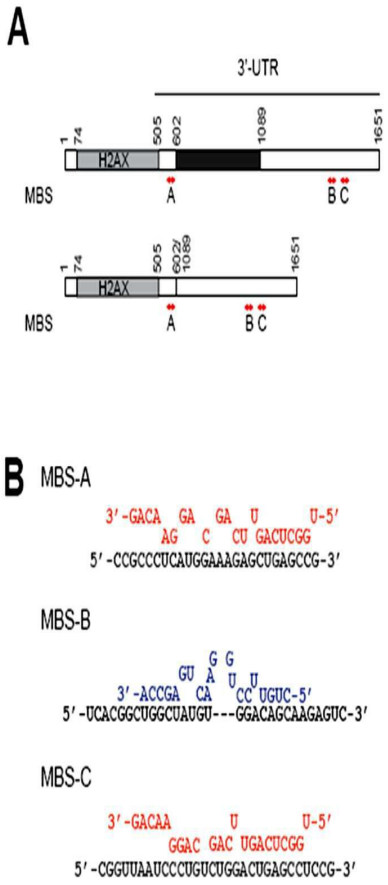
Forward : CAG CGC TAG ATT ATT GAA GCA TT
Reverse : AGG AAA GAA CAT GTG AGC AAA AG

도면3

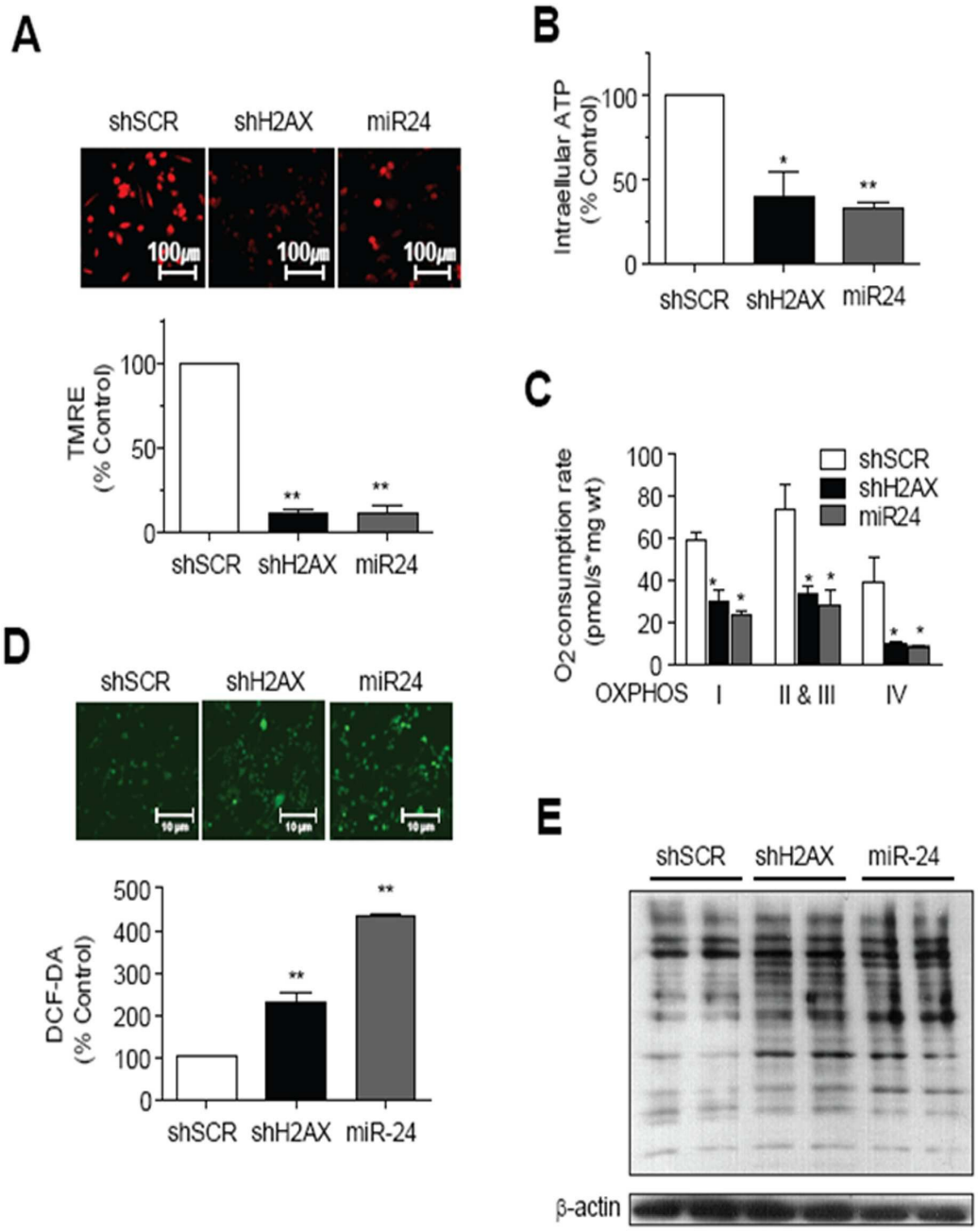

A
Synthetic siRNA
Ad-shRNA
Rv-shRNA
SCR
H2AX
miR-24
H2AX
β-actin
48 h
72 h
24 h
48 h
B
Rv-shRNA
shSCR
shH2AX
miR-24
H2A
H2AX
β-actin
C
H2AX mRNA (% Control)
100
50
0
SCR
H2AX
miR-24
Rv-shRNA
D
Mito-T
αH2AX
Merged
Rv-shRNA
shSCR
shH2AX
miR-24
miR-24
E
Nucleus
Cytoplasm
Mitochondria
shSCR
shH2AX
miR-24
Rv-shRNA
H2AX
Hsp60
Cyto C
PARP
β-actin

도면4

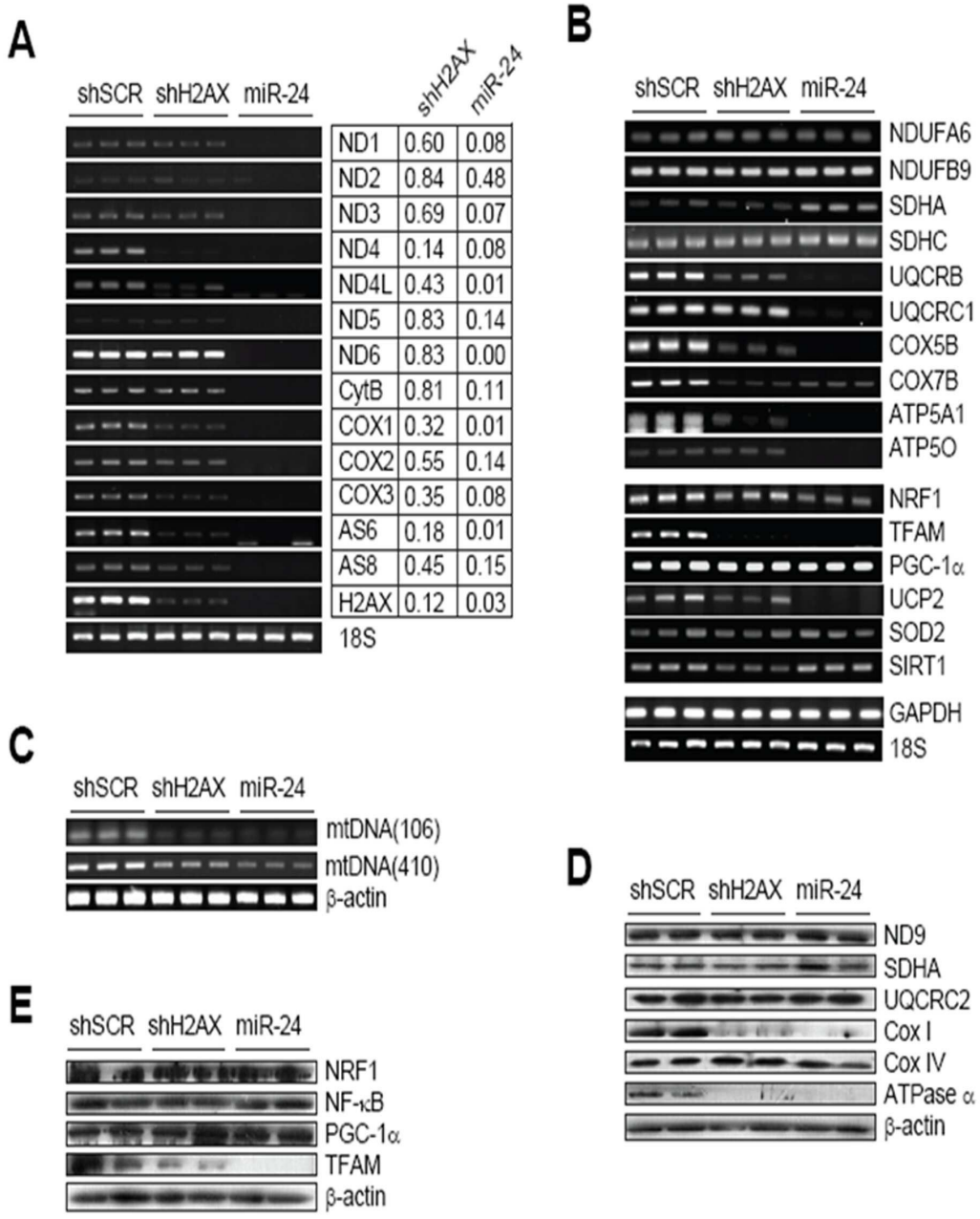

A
GFP
H2AX-GFP
Rv-shSCR
Rv-shH2AX
B
CMV
LUC
H2AX-3'-UTR
AAA
A B C
pS-shSCR
pS-miR-24
Luciferase activity (Arbituary Unit/10^4)
0
1
2
3
4
Luc
Full
ΔA
ΔB
ΔC
Luc-H2AX-3'-UTR


A
3'-UTR
1
74
505
602
1089
1651
H2AX
MBS
A
B C
505
602/
1089
B
MBS-A
3′-GACA GA GA U U-5′
AG C CU GACUCGG
5′-CCGCCCUCAUGGAAAGAGCUGAGCCG-3′
MBS-B
G G
GU A U U
3′-ACCGA CA CC UGUC-5′
5′-UCACGGCUGGCUAUGU---GGACAGCAAGAGUC-3′
MBS-C
3′-GACAA U U-5′
GGAC GAC UGACUCGG
5′-CGGUUAAUCCCUGUCUGGACUGAGCCUCCG-3′

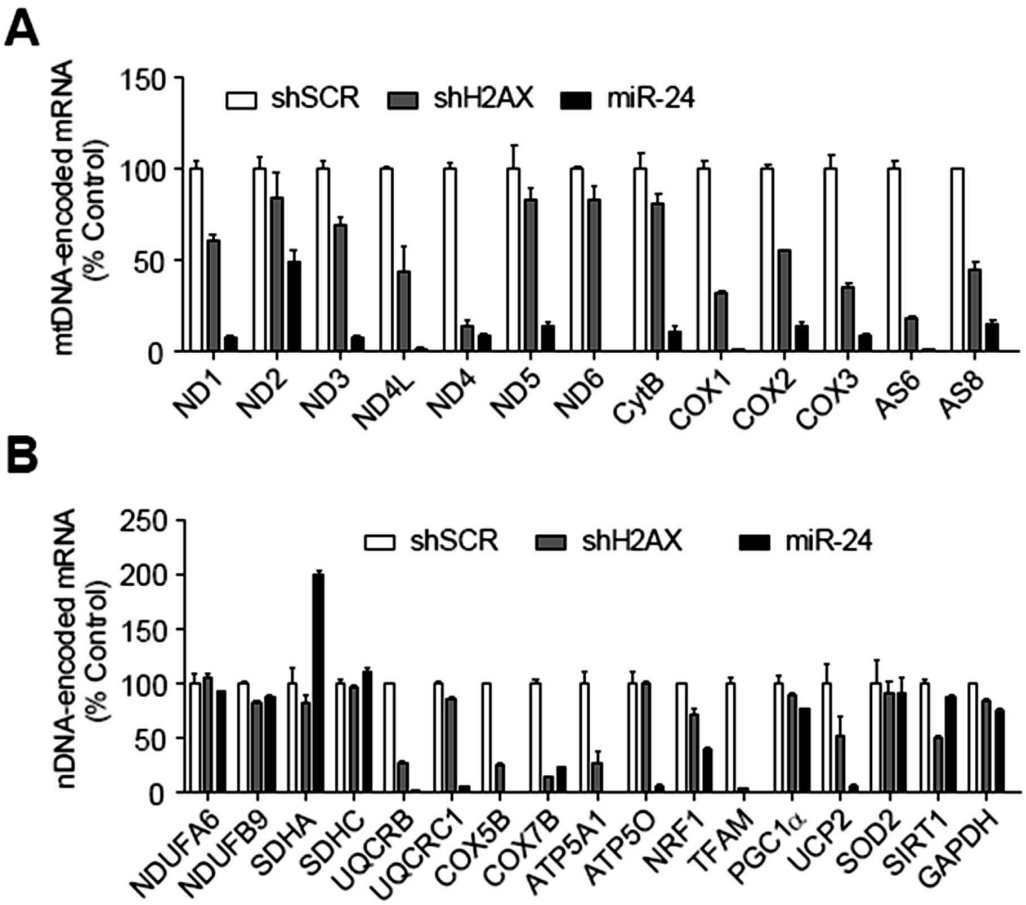
도면5


A
shSCR
shH2AX
miR24
100μm
TMRE (% Control)
100
50
0
**
shSCR shH2AX miR24
B
Intraellular ATP (% Control)
100
50
0
*
**
shSCR shH2AX miR24
C
O2 consumption rate (pmol/s*mg wt)
100
80
60
40
20
0
shSCR
shH2AX
miR24
OXPHOS I II & III IV
D
shSCR shH2AX miR24
DCF-DA (% Control)
500
400
300
200
100
0
**
shSCR shH2AX miR-24
E
shSCR shH2AX miR-24
β-actin

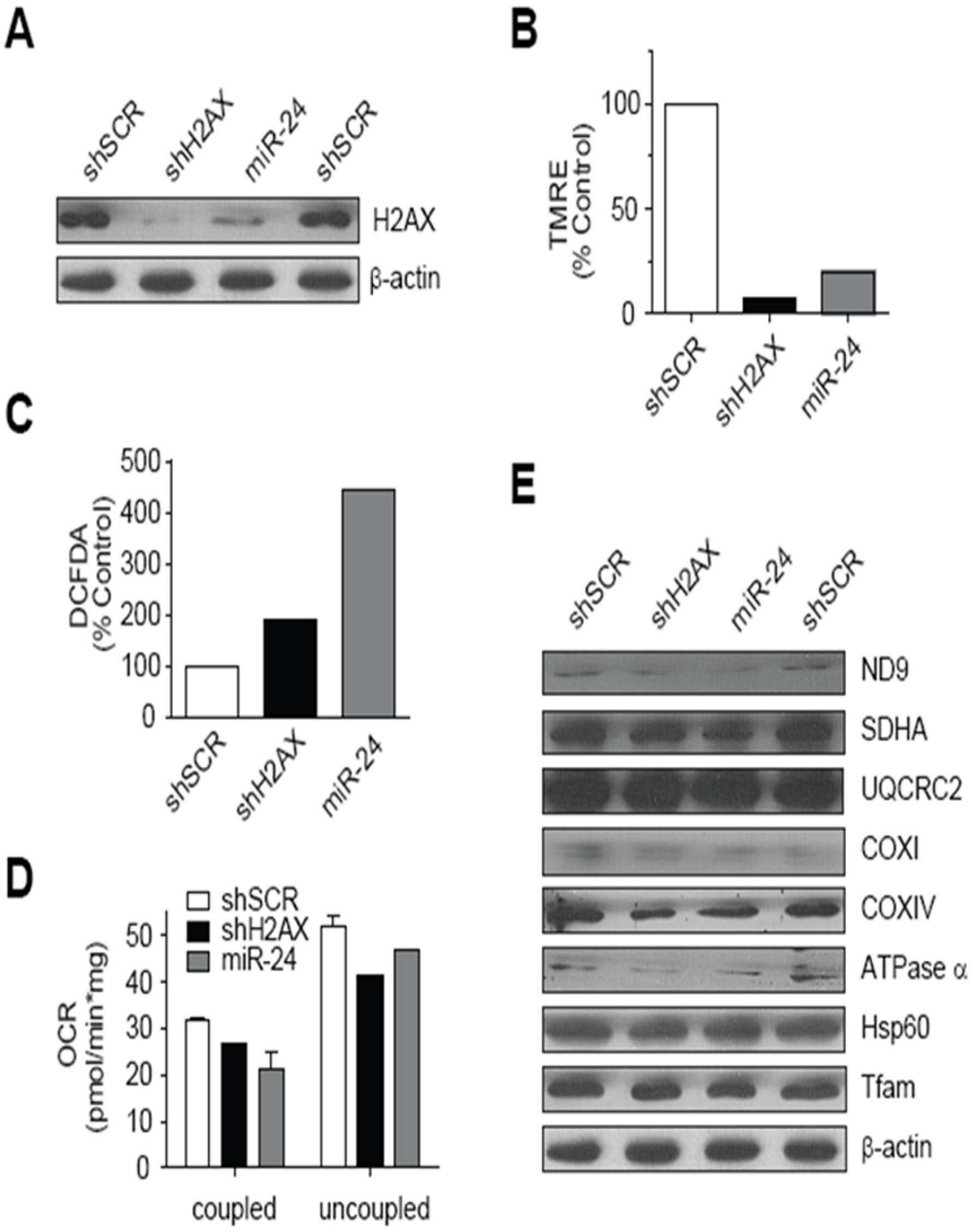
도면6


A
shSCR shH2AX miR-24
shH2AX miR-24
ND1 0.60 0.08
ND2 0.84 0.48
ND3 0.69 0.07
ND4 0.14 0.08
ND4L 0.43 0.01
ND5 0.83 0.14
ND6 0.83 0.00
CytB 0.81 0.11
COX1 0.32 0.01
COX2 0.55 0.14
COX3 0.35 0.08
AS6 0.18 0.01
AS8 0.45 0.15
H2AX 0.12 0.03
18S
B
shSCR shH2AX miR-24
NDUFA6
NDUFB9
SDHA
SDHC
UQCRB
UQCRC1
COX5B
COX7B
ATP5A1
ATP5O
NRF1
TFAM
PGC-1α
UCP2
SOD2
SIRT1
GAPDH
18S
C
shSCR shH2AX miR-24
mtDNA(106)
mtDNA(410)
β-actin
D
shSCR shH2AX miR-24
ND9
SDHA
UQCRC2
Cox I
Cox IV
ATPase α
β-actin
E
shSCR shH2AX miR-24
NRF1
NF-κB
PGC-1α
TFAM
β-actin

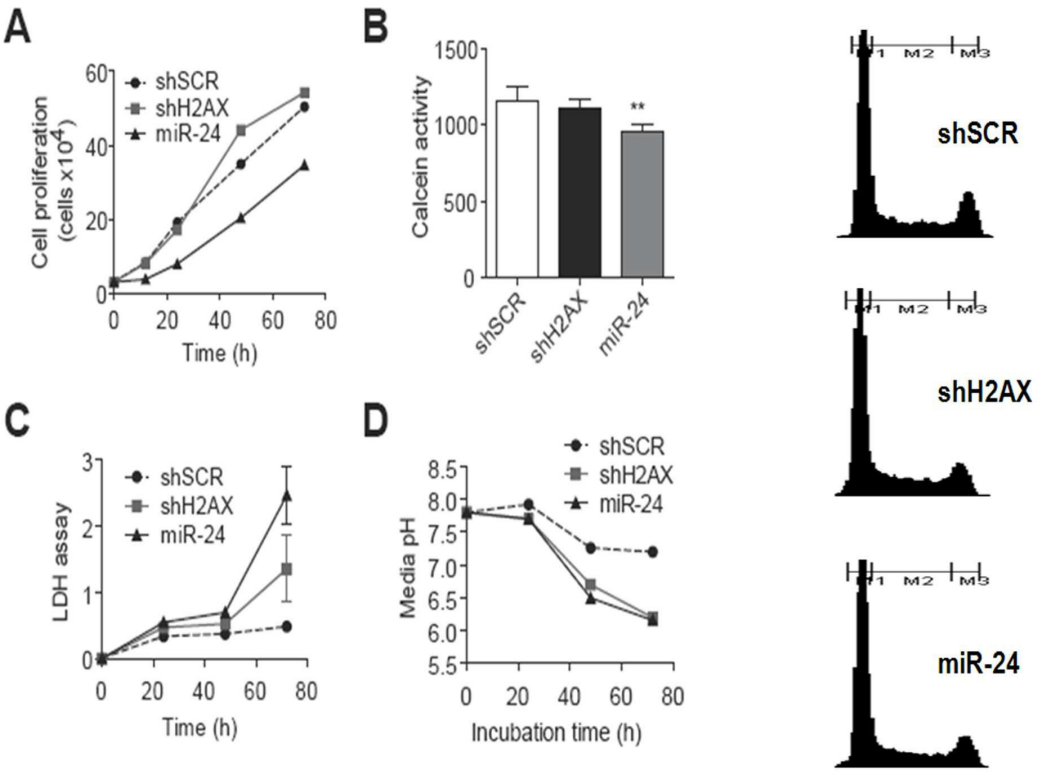
도면7


A
mtDNA-encoded mRNA (% Control)
150
100
50
0
shSCR
shH2AX
miR-24
ND1
ND2
ND3
ND4L
ND4
ND5
ND6
CytB
COX1
COX2
COX3
AS6
AS8
B
nDNA-encoded mRNA (% Control)
250
200
150
100
50
0
shSCR
shH2AX
miR-24
NDUFA6
NDUFB9
SDHA
SDHC
UQCRB
UQCRC1
COX5B
COX7B
ATP5A1
ATP5O
NRF1
TFAM
PGC1α
UCP2
SOD2
SIRT1
GAPDH

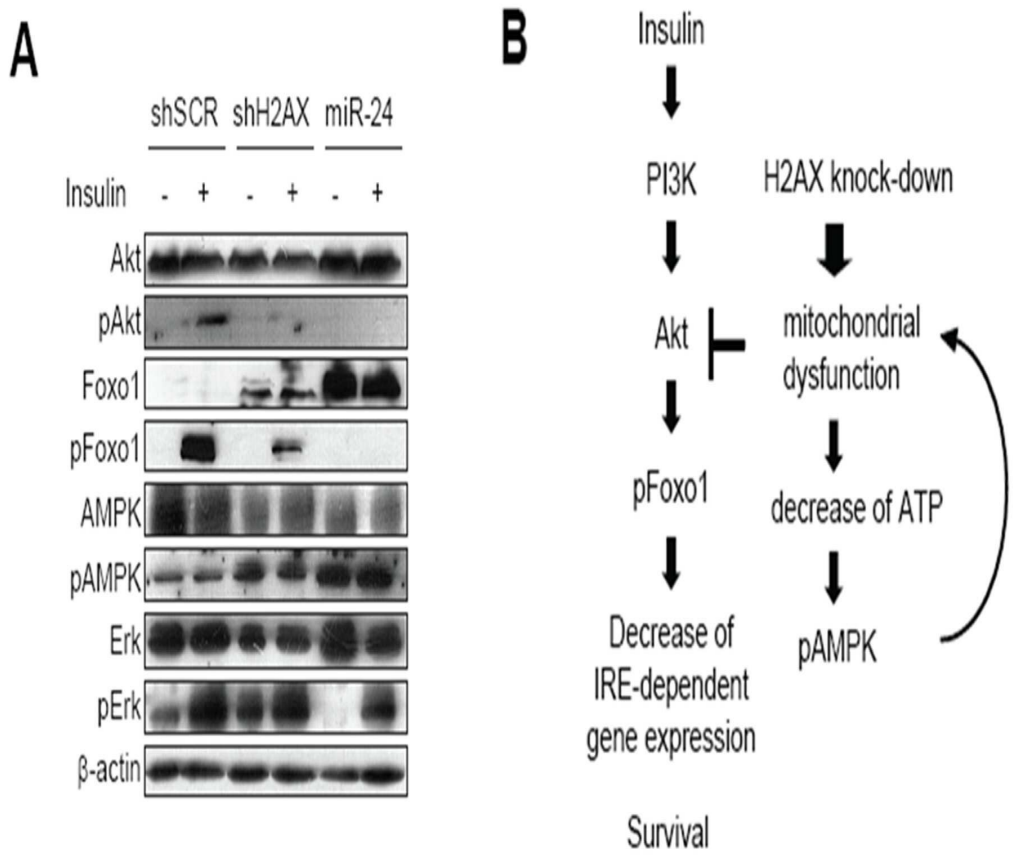
도면8


A
shSCR
shH2AX
miR-24
shSCR
H2AX
β-actin
B
TMRE (% Control)
100
50
0
shSCR
shH2AX
miR-24
C
DCFDA (% Control)
500
400
300
200
100
0
shSCR
shH2AX
miR-24
D
shSCR
shH2AX
miR-24
OCR (pmol/min*mg)
50
40
30
20
10
0
coupled
uncoupled
E
shSCR
shH2AX
miR-24
shSCR
ND9
SDHA
UQCRC2
COXI
COXIV
ATPase α
Hsp60
Tfam
β-actin

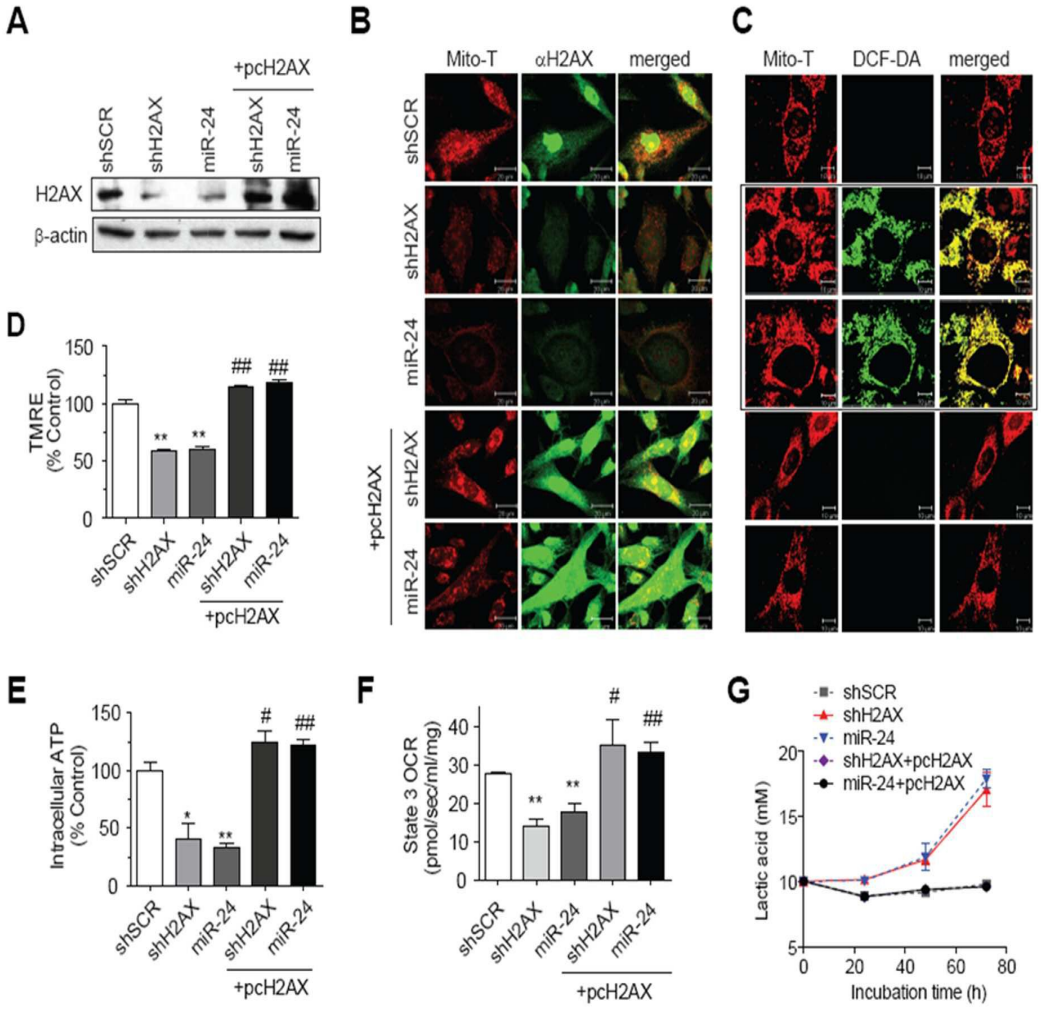
도면9


A
Cell proliferation (cells x10^4)
shSCR
shH2AX
miR-24
Time (h)
B
Calcein activity
**
shSCR
shH2AX
miR-24
C
LDH assay
shSCR
shH2AX
miR-24
Time (h)
D
Media pH
shSCR
shH2AX
miR-24
Incubation time (h)
M1
M2
M3
shSCR
shH2AX
miR-24

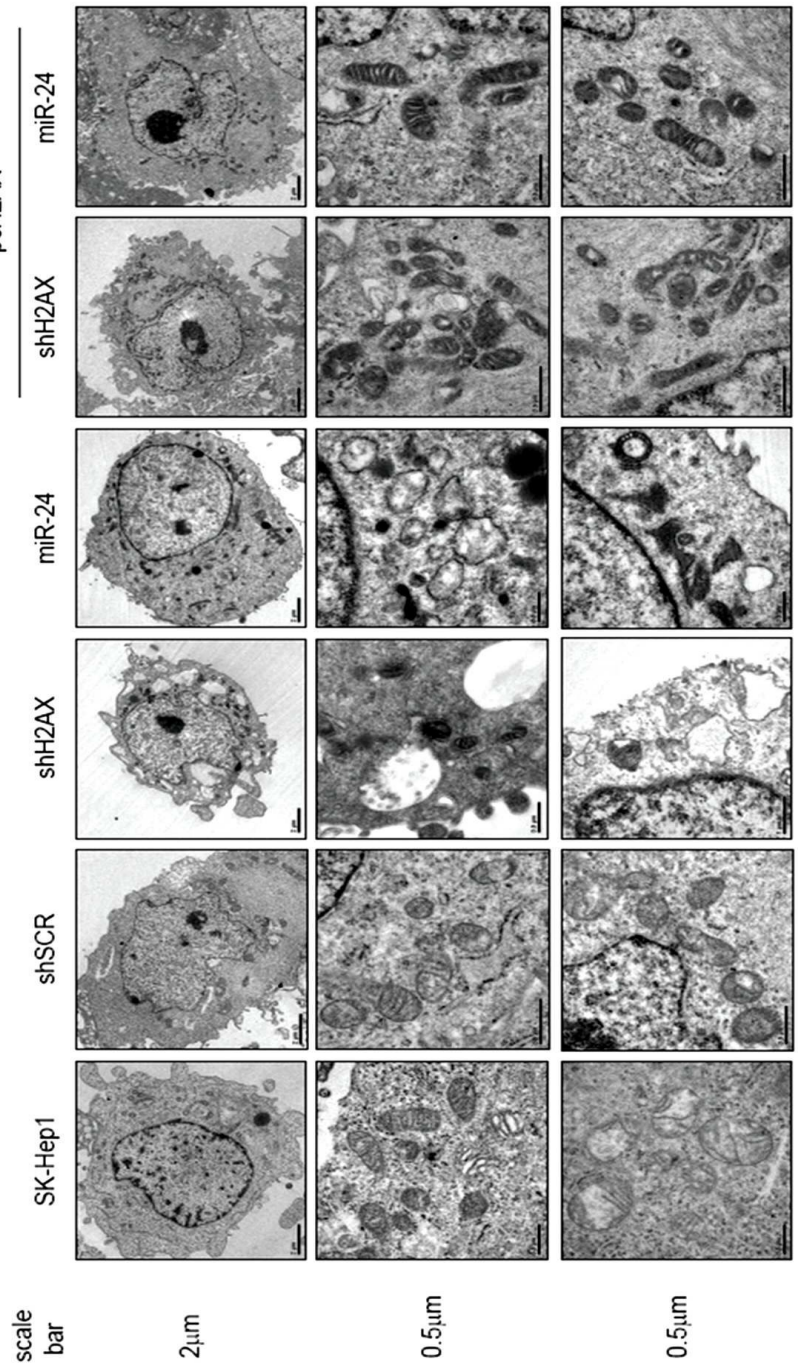
도면10


A
shSCR
shH2AX
miR-24
Insulin - + - + - +
Akt
pAkt
Foxo1
pFoxo1
AMPK
pAMPK
Erk
pErk
β-actin
B
Insulin
PI3K
H2AX knock-down
Akt
mitochondrial dysfunction
pFoxo1
decrease of ATP
Decrease of IRE-dependent gene expression
pAMPK
Survival

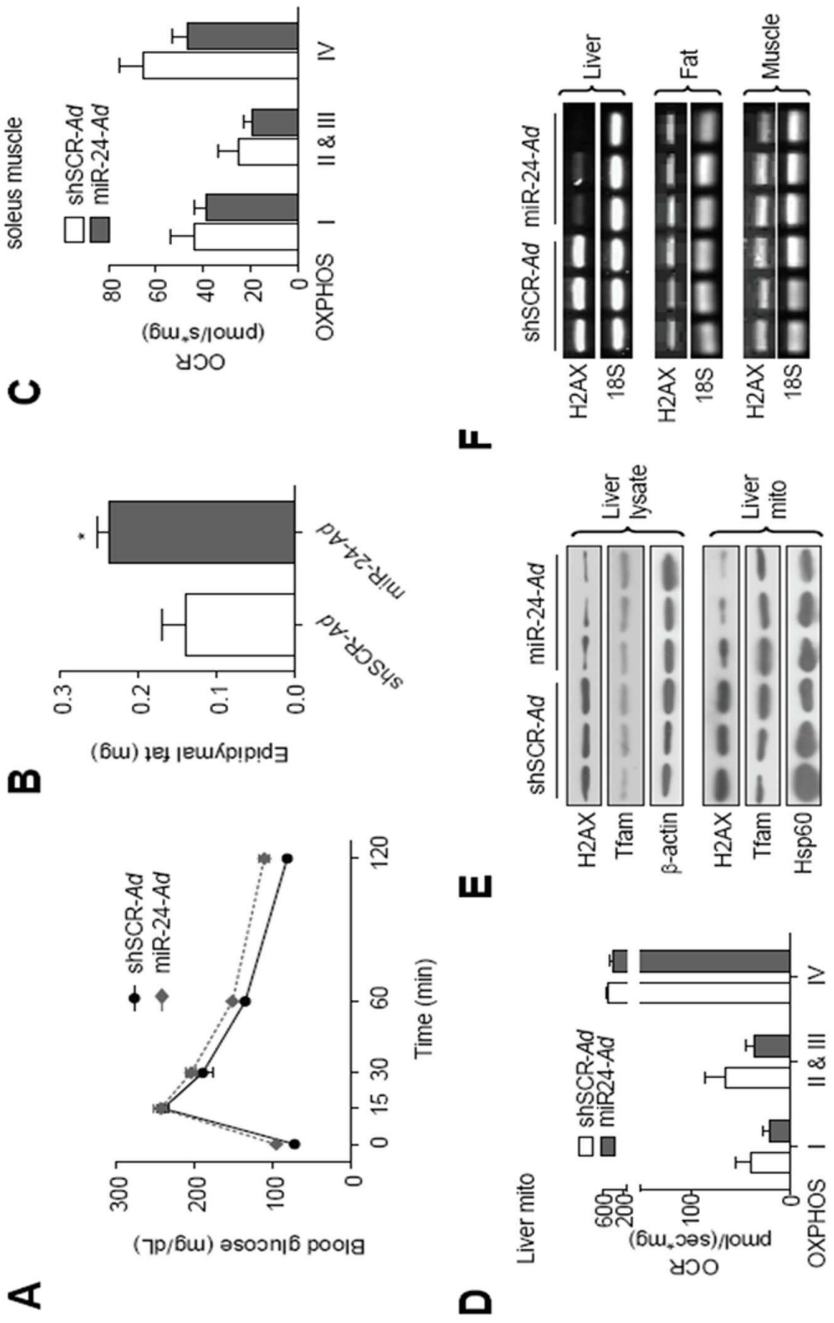
도면11


A
+pcH2AX
shSCR
shH2AX
miR-24
shH2AX
miR-24
H2AX
β-actin
B
Mito-T
αH2AX
merged
shSCR
shH2AX
miR-24
+pcH2AX
shH2AX
miR-24
C
Mito-T
DCF-DA
merged
D
TMRE (% Control)
150
100
50
0
**
**
##
##
shSCR
shH2AX
miR-24
shH2AX
miR-24
+pcH2AX
E
Intracellular ATP (% Control)
150
100
50
0
*
**
#
##
shSCR
shH2AX
miR-24
shH2AX
miR-24
+pcH2AX
F
State 3 OCR (pmol/sec/ml/mg)
40
30
20
10
0
**
**
#
##
shSCR
shH2AX
miR-24
shH2AX
miR-24
+pcH2AX
G
shSCR
shH2AX
miR-24
shH2AX+pcH2AX
miR-24+pcH2AX
Lactic acid (mM)
20
15
10
5
0
20
40
60
80
Incubation time (h)

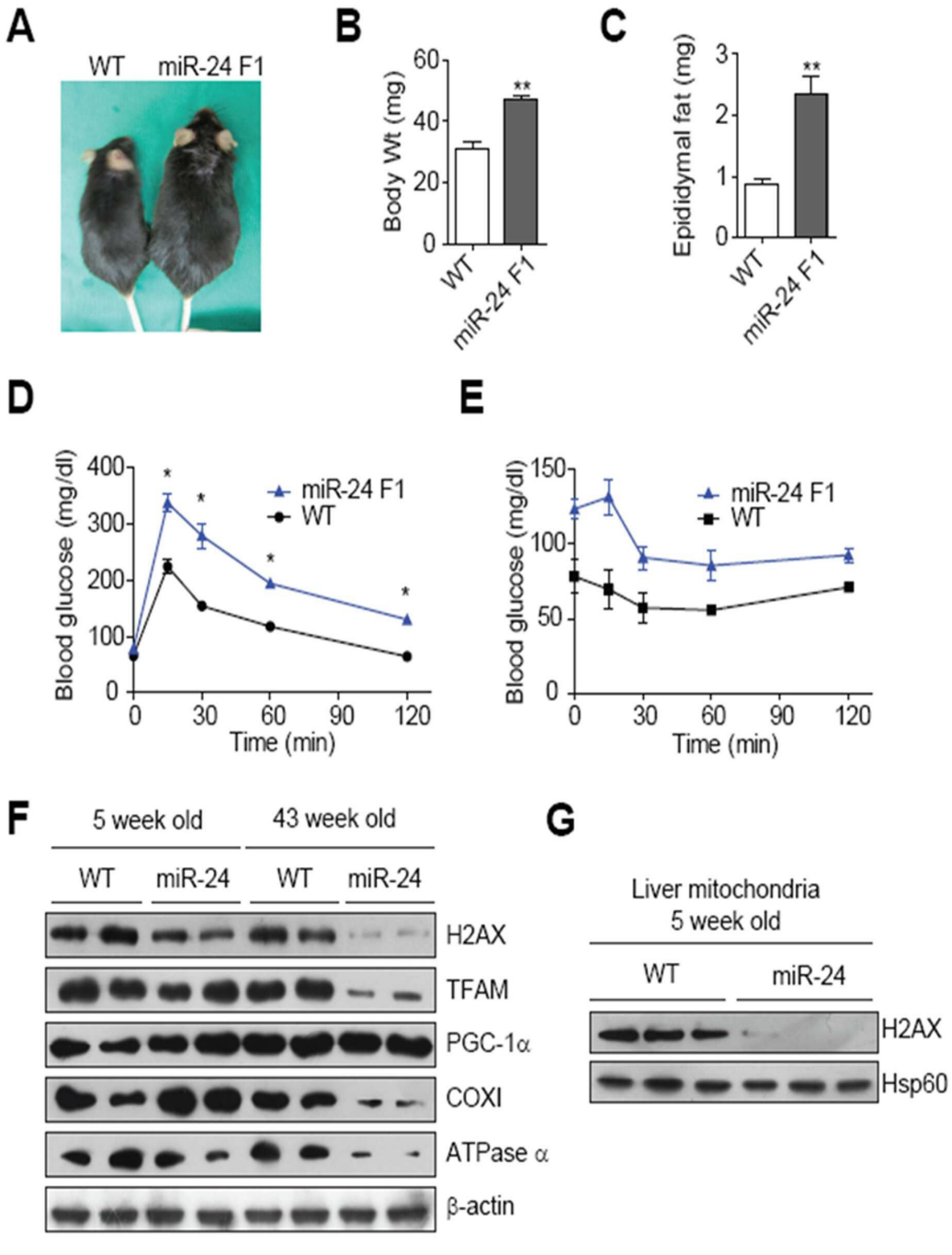
도면12


+ pcH2AX
SK-Hep1
shSCR
shH2AX
miR-24
shH2AX
miR-24
scale bar
2μm
0.5μm
0.5μm

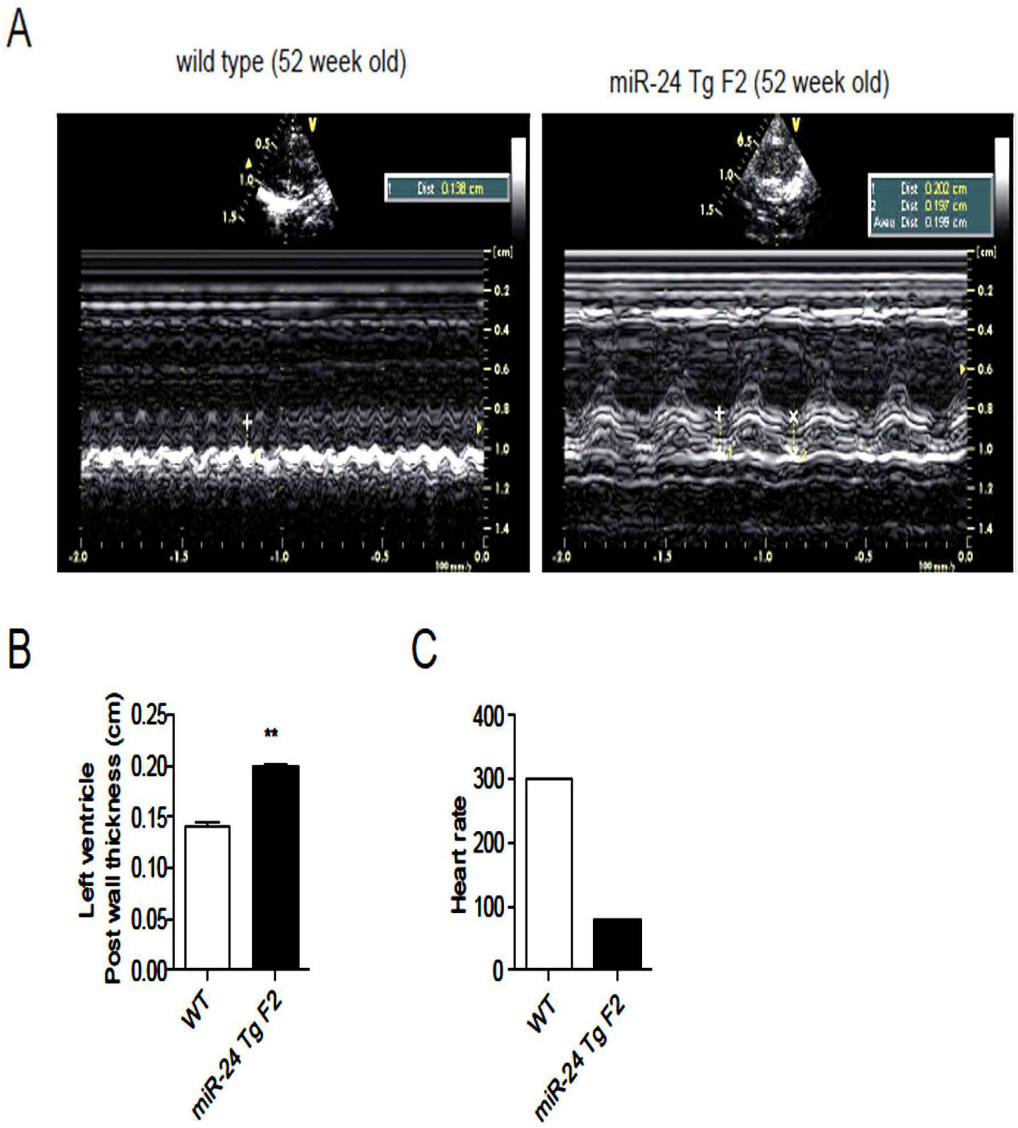
도면13


A
Blood glucose (mg/dL)
shSCR-Ad
miR-24-Ad
Time (min)
B
Epididymal fat (mg)
shSCR-Ad
miR-24-Ad
C
soleus muscle
OCR (pmol/s*mg)
shSCR-Ad
miR-24-Ad
OXPHOS
I
II & III
IV
D
Liver mito
OCR pmol/(sec*mg)
shSCR-Ad
miR24-Ad
OXPHOS
E
shSCR-Ad
miR-24-Ad
Liver lysate
H2AX
Tfam
β-actin
Liver mito
H2AX
Tfam
Hsp60
F
shSCR-Ad
miR-24-Ad
Liver
H2AX
18S
Fat
H2AX
18S
Muscle
H2AX
18S

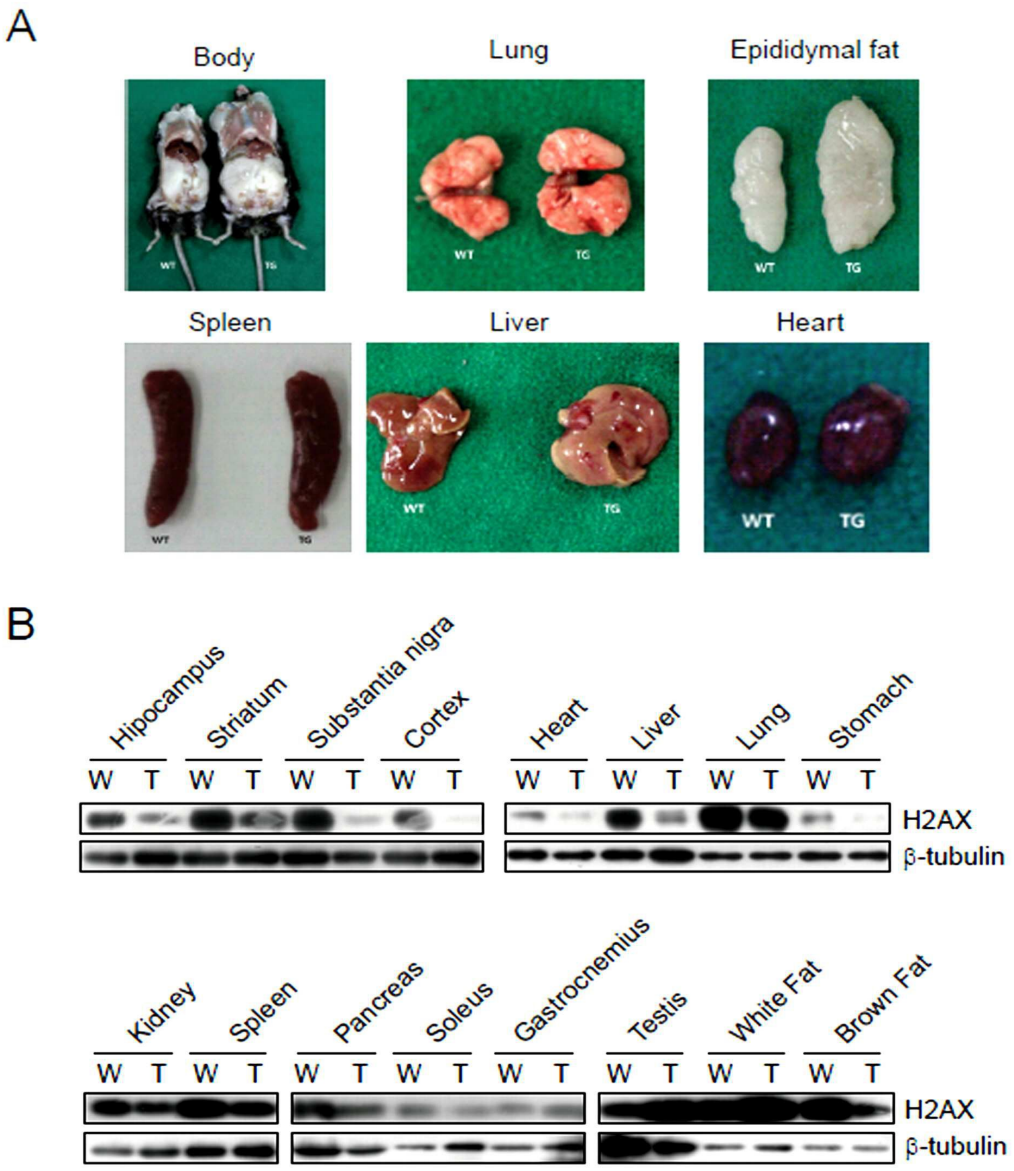
도면14


A
WT
miR-24 F1
B
Body Wt (mg)
60
40
20
0
**
WT
miR-24 F1
C
Epididymal fat (mg)
3
2
1
0
**
WT
miR-24 F1
D
Blood glucose (mg/dl)
400
300
200
100
0
*
*
*
*
miR-24 F1
WT
0
30
60
90
120
Time (min)
E
Blood glucose (mg/dl)
150
100
50
0
miR-24 F1
WT
0
30
60
90
120
Time (min)
F
5 week old
43 week old
WT
miR-24
WT
miR-24
H2AX
TFAM
PGC-1α
COXI
ATPase α
β-actin
G
Liver mitochondria
5 week old
WT
miR-24
H2AX
Hsp60

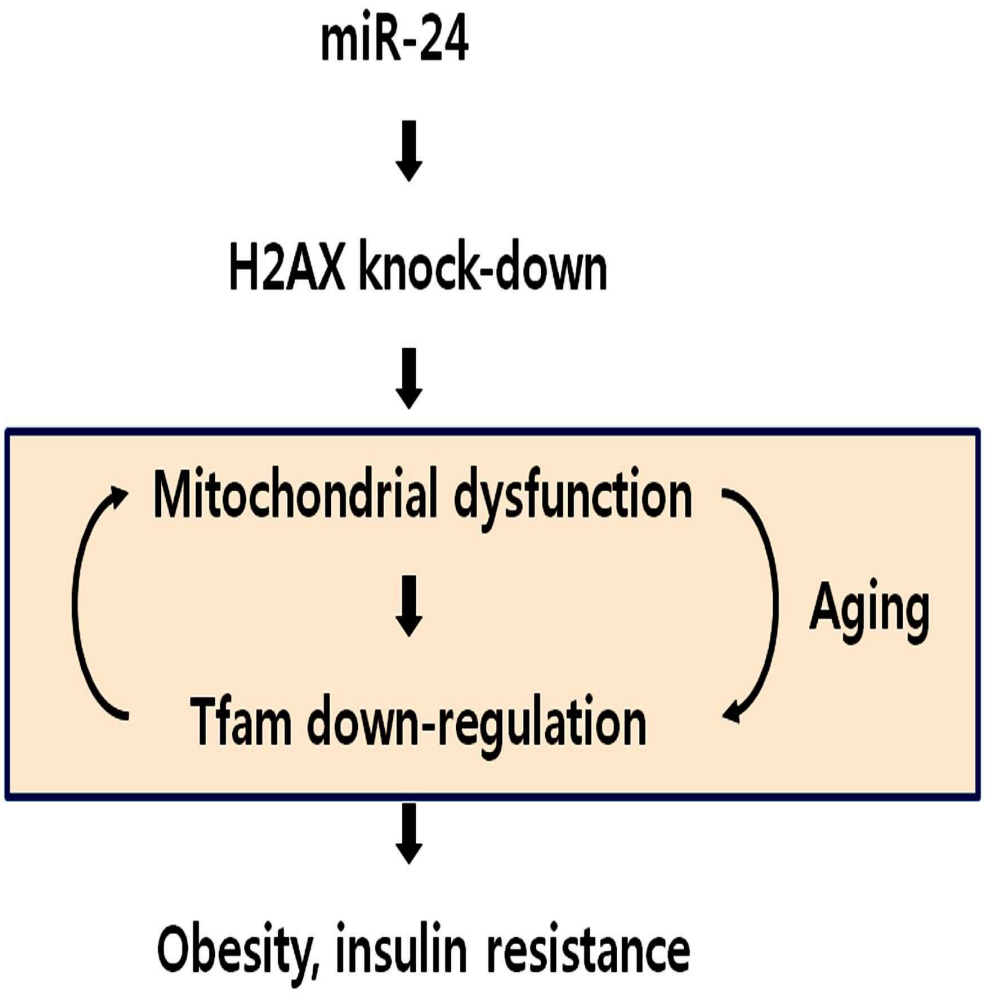
도면15


A
wild type (52 week old)
miR-24 Tg F2 (52 week old)
B
Left ventricle Post wall thickness (cm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
WT
miR-24 Tg F2
C
Heart rate
400
300
200
100
0
WT
miR-24 Tg F2

도면16


A
Body
Lung
Epididymal fat
Spleen
Liver
Heart
WT
TG
B
Hipocampus
Striatum
Substantia nigra
Cortex
Heart
Liver
Lung
Stomach
W T W T W T W T W T W T W T W T
H2AX
β-tubulin
Kidney
Spleen
Pancreas
Soleus
Gastrocnemius
Testis
White Fat
Brown Fat
W T W T W T W T W T W T W T W T
H2AX
β-tubulin

도면17



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Transgenic mouse overexpressing microRNA-24 as a model of mitochondrial dysfunction-associated diseases

<130> 10p-04-22

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA oligonucleotide

<400> 1

gatcctggct cagttcagca ggaacagttc tcgagactgt tcctgctgaa ctgagccatt 60

tttggaa 67

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 2

cagcgctaga ttattgaagc att 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 3

aggaaagaac atgtgagcaa aag 23

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shH2AX sense strand

<400> 4

caacaagaag acgcgaatc 19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shSCR sense strand

<400> 5

aattctccga gcgtgtcacg t 21

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Human H2AX

<400> 6

catgtcgggc cgcggcaa 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Human H2AX

<400> 7

gtggcgctgg tcttcttg 18

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for mouse H2AX

<400> 8

ggcctgtgga caagagttct at 22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for mouse H2AX

<400> 9

gcccattaaa tctccccact 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for 18S rRNA

<400> 10

gagcgaaagc atttgccaag 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for 18S rRNA

<400> 11

ggcatcgttt atggtcggaa 20