

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0114713 (43) 공개일자 2014년09월29일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>A61P 25/16</i> (2006.01) <i>G01N 33/15</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0029419 (22) 출원일자 2013년03월19일 심사청구일자 2013년03월19일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 손형진 서울 용산구 서빙고로 35, 102동 3402호 (한강로3가, 용산시티파크1단지아파트) 김경희 경기도 성남시 중원구 시민로 66, 힐스테이트 211동 1102호 송지현 서울 용산구 백범로90다길 12, 202동 606호 (문배동, 용산씨제이나인파크) (74) 대리인 손민

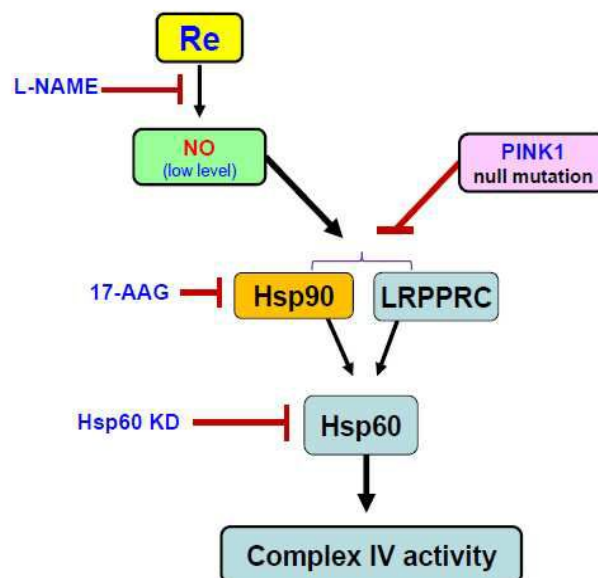
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **열충격단백질(Heat shock protein) 및 LRPPRC 단백질 신호전달을 이용한 파킨슨병 치료제 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 파킨슨병 치료제의 스크리닝하는 방법 및 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트에 관한 것이다. 또한, 파킨슨병 치료제의 효능 검정 방법 및 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트에 관한 것이다. 본 발명은 파킨슨병 치료제의 미토콘드리아 활성 회복 기작 상에서 세포질에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성 정도가 달라지는 것을 확인함으로써, 상기 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링함으로써 파킨슨병 치료제를 스크리닝할 수 있으며, 기존 파킨슨병 치료제의 효능을 손쉽게 효과적으로 검정할 수 있다.

대표도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0009233

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업(유형I)

연구과제명 오토파지조절 신규 유전자패밀리에 의한 오토파지 제어기전 및 신경보호연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 파킨슨병 치료제 후보 물질을 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계;
- (b) 신경 세포에서 열충격단백질90(Heat shock protein 90, Hsp90), 열충격단백질60(Heat shock protein 60, Hsp60), 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질(Leucine-rich PPR motif-containing protein, LRPPRC)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 단계; 및
- (c) 치료제 후보 물질을 처리한 군에서, 처리하지 않은 대조군에 비하여 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자가 활성화되는 경우, 치료제의 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 2

- (a) 파킨슨병 치료제 후보 물질을 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계;
- (b) 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 및 산화질소 양을 모니터링하는 단계; 및
- (c) 치료제 후보 물질을 처리한 군에서, 처리하지 않은 대조군에 비하여 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자가 활성화되고 산화질소 양이 증가되는 경우, 치료제의 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 3

- (a) 파킨슨병 치료제 후보 물질을 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계;
- (b) 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성화를 모니터링하는 단계; 및
- (c) 치료제 후보 물질을 처리한 군에서, 처리하지 않은 대조군에 비하여 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자 및 복합체 IV가 활성화되는 경우, 치료제의 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계의 모니터링하는 단계는 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이(Fluorescence Resonance Energy Transfer)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것인, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 5

열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 수단을 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 추가로 산화질소 양을 모니터링하는 수단을 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트.

청구항 7

제5항에 있어서, 추가로 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성화를 모니터링하는 수단을 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 모니터링하는 수단은 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던 블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수단인 것인, 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트.

청구항 9

- (a) 파킨슨병 치료제를 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계;
- (b) 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 단계; 및
- (c) 치료제를 처리한 군에서, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자 활성도가 해당 파킨슨병 치료제를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되는 정도에 따라 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 효능 검정 방법.

청구항 10

- (a) 파킨슨병 치료제를 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계;
- (b) 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 및 산화질소 양을 모니터링하는 단계; 및
- (c) 치료제를 처리한 군에서, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자 활성화와 산화질소 양이 해당 파킨슨병 치료제를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되는 정도에 따라 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 효능 검정 방법.

청구항 11

- (a) 파킨슨병 치료제를 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계;
- (b) 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성화를 모니터링하는 단계; 및
- (c) 치료제를 처리한 군에서, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성이 해당 파킨슨병 치료제를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되는 정도에 따라 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 효능 검정 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)단계의 모니터링하는 단계는 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것인, 파킨슨병 치료제의 효능 검정 방법.

청구항 13

열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 수단을 포함하는 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 추가로 산화질소 양을 모니터링하는 수단을 포함하는, 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트.

청구항 15

제13항에 있어서, 추가로 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성화를 모니터링하는 수단을 포함하는, 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 모니터링하는 수단은 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수단인 것인, 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 파킨슨병 치료제의 스크리닝하는 방법 및 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트에 관한 것이다. 또한, 파킨슨병 치료제의 효능 검정 방법 및 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 신경계 퇴행성 질환 중의 한 종류로서, 몸이 떨리는 증상(진전, tremor), 근육이 뻣뻣하게 굳어지는 증상(강직, rigidity), 전반적인 동작이 느려지는 운동 완서 증상(서동, bradykinesia)이 대표적 증상이다. 대부분의 파킨슨병은 한쪽 팔, 다리로부터 떨리는 증상이 나타난 후, 느려지고 뻣뻣한 증상이 생기고, 서서히 반대 측 팔다리로 진행된다.

[0003] 파킨슨병은 1817년 영국인 의사인 James Parkinson이 처음 체계적으로 정의한 후, 파킨슨병 또는 파킨슨씨병(Parkinson's disease)이라고 부르게 되었다. 현재 65세 이상 인구 중 1% 정도의 유병률을 보이며 국내에는 약 5만 내지 10만 명의 환자가 있을 것으로 추정되고 있다. 파킨슨병의 궁극적인 원인은 아직 밝혀지지 않은 상황이나 정상인의 중뇌의 흑질(substantia nigra) 부위의 신경세포에서 만들어지는 뇌의 신경전달 물질인 도파민(dopamine)의 결핍으로 인해 여러 증상들이 나타나는 것으로 알려져 있다.

[0004] 뇌의 흑질에 분포하는 신경세포에서 생성된 도파민은 선조체(corpus striatum)를 포함하는 뇌의 기저핵(basal ganglia)과 연결된다. 기저핵은 뇌의 운동피질 및 기타 여러 부위와 복잡하게 연결되어 있어 인체의 운동을 부드럽고 조화롭게 그리고 정확하게 수행할 수 있도록 해주는 매우 중요한 부위이다. 이러한 도파민성 신경의 손상에 의하여 결과적으로 기저핵 도파민성 신경 말단에서 유리되는 도파민의 결핍이 파킨슨병에서 나타나는

운동성 장애의 주요 원인이다.

[0005] 파킨슨병의 원인, 즉, 무엇 때문에 흑질의 신경세포가 파괴되는가에 대하여 아직 정확한 해답이 없으나, 이를 규명하기 위하여 활발한 연구가 진행되고 있다. 바이러스성 뇌염 등 감염설, 면역기전이 관계된다는 면역설, 선천적으로 그 기질을 타고난다는 유전설, 유리기가 생성되어 신경세포를 파괴한다는 설, 신경독성 물질의 중독설, 그리고 도파민의 생성 및 대사과정에 문제가 있다는 설 등이 있으나 아직 파킨슨병 전체를 설명하기에는 부족한 점이 많다.

[0006] 근래에는 파킨슨병의 유전적 원인을 추적하는 연구 과정에서 파킨슨병 모델에서 발견된 파킨슨병 관련 유전자인 PINK1 단백질이 미토콘드리아의 활성화와 관련된 것으로 밝혀졌다. 곧, 미토콘드리아의 이상이 신경 세포의 이상을 가져오고 이로 인해 파킨슨병을 일으킨다는 설명이 근래에 주목받고 있다.

[0007] 상기와 같이 파킨슨병에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 파킨슨병의 치료용으로 많은 약제들이 개발되었고, 그 중 효과가 인정되는 것도 상당히 많으나, 파킨슨병은 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로 일단 죽은 신경세포는 다시 살릴 수 없기 때문에 파킨슨병에 사용되는 치료 약제는 근치적인 것이 아니라 증상의 조절을 목적으로 한다. 또한, 도파민을 유리할 수 있는 세포이식이나 유전자이식으로 궁극적으로 치료할 수는 있으나 이러한 치료법은 많은 연구에도 불구하고 아직 성공하지 못하고 있다. 무엇보다도 파킨슨병에서 발견되는 미토콘드리아 활성화 이상을 치료하는 치료제는 아직 밝혀진 바 없다.

[0008] 따라서, 파킨슨병에 의한 미토콘드리아 활성화 이상을 회복시킬 수 있는 치료제를 개발하기 위하여 후보 물질을 스크리닝 방법이 필요한 상태이다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 파킨슨병 치료제 개발과 치료제 효능을 검정하기 위한 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 열충격단백질90(Heat shock protein 90, Hsp90), 열충격단백질60(Heat shock protein 60, Hsp60) 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질(Leucine-rich PPR motif-containing protein, LRPPRC)의 활성화가 파킨슨병 모델 세포에서 미토콘드리아 활성화 회복의 중요한 선행 기작임을 확인하고, 실제 파킨슨병 치료제로 주목받고 있는 진세노사이드 Re를 처리하여 상기 단백질 활성화가 증가하는 것을 모니터링하여 파킨슨병 치료제를 스크리닝하거나 치료제 효능을 검정할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 치료제의 효능 검정 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 스크리닝 방법은 신경 세포에서 열충격단백질90(Heat shock protein 90, Hsp90), 열충격단백질60(Heat shock protein 60, Hsp60), 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질(Leucine-rich PPR motif-containing protein, LRPPRC)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링함으로써 파킨슨병(Parkinson's Diseases, PD) 관련 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] 구체적으로는, 본 발명은 파킨슨병 치료제 후보 물질을 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계; 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질을 처리한 군에서, 처리하지 않은 대조군에 비하여 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR

모티프-포함 단백질의 유전자가 활성화되는 경우, 치료제의 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 파킨슨병 치료제 후보 물질을 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계; 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 및 산화질소 양을 모니터링하는 단계; 및 치료제 후보 물질을 처리한 군에서, 처리하지 않은 대조군에 비하여 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자가 활성화되고 산화질소 양이 증가되는 경우, 치료제의 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 파킨슨병 치료제 후보 물질을 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계; 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성화를 모니터링하는 단계; 및 치료제 후보 물질을 처리한 군에서, 처리하지 않은 대조군에 비하여 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자 및 복합체 IV가 활성화되는 경우, 치료제의 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 용어 "파킨슨병"이란 만성진행성 퇴행성 신경질환으로, 신경전달물질인 도파민을 만들어내는 뇌의 흑질(substantia nigra) 뉴런이 환경적 또는 유전적 원인에 의하여 손상되어 도파민의 부족을 야기하여 생기는 현상으로 이해되고 있다. 구체적인 병인은 아직까지 밝혀지지 않았으나, 유전적 인자와 환경적 인자가 서로 상호작용하는 것으로 이해되고 있다. 60세 이상에서 인구의 약 1%가 파킨슨 병을 앓고 있는 것으로 추정되며, 파킨슨병 환자의 10% 정도에서는 가족성 파킨슨병이 나타나는 것으로 추정되고 있다. 본 발명에서 파킨슨병은 유전적 원인 및 환경적 원인으로 인한 파킨슨병을 모두 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 파킨슨병은 가족성 파킨슨병일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 미토콘드리아 이상에 의한 파킨슨병일 수 있으며, 가장 바람직하게는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 이상에 의한 파킨슨병일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어 "파킨슨병 치료제"는 어떠한 기작으로든 파킨슨병의 증상을 완화하고 진행을 늦추는 효과를 가지는 제제를 의미한다. 바람직하게는, 미토콘드리아 이상을 회복시키는 기능을 가지는 제제일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성화시키는 기능을 가지는 제제일 수 있다. 또한, 산화질소를 증가시키는 효과를 가지는 제제일 수 있다. 바람직하게는 산화질소를 낮은 농도까지 증가시키는 제제일 수 있으며, 이는 내재적 산화질소 생성 효소(endothelial nitric oxide synthase)를 촉진하는 기능을 가진 성분이거나 성분 자체가 산화질소 공여체(nitric oxide donor)일 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어 "파킨슨병 치료제 후보 물질"은 통상적인 선정방식에 따라 파킨슨병의 예방 또는 치료의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 또는 화합물 등이 될 수 있다.

[0021] 본 발명의 파킨슨병 치료제 스크리닝 방법은, in vitro 또는 in vivo의 신경 세포에서 산화질소 관련 신호전달을 통한 파킨슨병 치료제에 의해 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 활성화가 일어나고, 결국 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성화로 이루어지는 신호전달 기작과 연계하여, 치료제 후보 물질을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군에서 열충격단백질90, 열충격단백질60, 및 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질의 활성화를 비교하는 방식으로 고안되었다.

[0022] 본 발명에서 용어 "신경 세포"란, 신경계를 이루는 기본적인 단위 세포로서, 전기적인 방법으로 신호를 전달할 수 있는 특징을 갖는 모든 세포를 포함한다. 이에 in vitro에서 배양되는 신경 세포 뿐 아니라 인간을 제외한 각 동물 모델의 in vivo 신경 세포를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 인간에게 적용함에 있어서도 동일한 효과를 나타냄은 자명하다. 해당 신경 세포는 바람직하게는, 파킨슨병 모델 신경 세포일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 미토콘드리아 이상을 보이는 신경 세포일 수 있으며, 더욱더 바람직하게는 PINK1

결실 신경 세포일 수 있다.

- [0023] 본 발명에서 용어 "열충격단백질90(Heat shock protein 90, Hsp90)"은 세포에 존재하는 가장 풍부한 단백질 중의 하나로 단백질의 3차원적 구조에 기능하는 보호자 단백질(Charperone)이다. 세포 내에서 생성된 단백질이 정상적으로 접히는데(protein folding) 관여하며, 단백질을 안정화시킨다. 열충격단백질90은 약 90 kDa의 크기를 가진다.
- [0024] 본 발명의 용어 "열충격단백질60(Heat shock protein 60, hsp60)"은 미토콘드리아 보호자 단백질(mitochondrial chaperonin)로, 단백질의 세포질에서 미토콘드리아 기질로의 이송(transportation) 및 재접힘(refolding)에 기능한다. 열충격단백질60은 약 60 kDa의 크기를 가진다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질(Leucine-rich PPR motif-containing protein, LRPPRC)"은 미토콘드리아 단백질로 류신이 풍부한 특성을 가지고 있으며 세포 골격 또는 다양한 단백질의 결합을 조절하는 역할을 한다. 특히, 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질은 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 조립 인자(assembly factor)의 기능을 가진다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "미토콘드리아 단백질 복합체 IV(mitochondrial protein complex IV)"는 다른 명칭으로는 시토크롬 c 산화효소 IV(cytochrome c oxidase IV, COX IV)등으로 불리우며, 미토콘드리아에서 에너지 대사에 기능하는 단백질로 파킨슨병 모델에서 활성이 저하되어 있는 것으로 알려져 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어 "산화질소(nitric oxide)"는 질소의 산화물로 반응성이 좋아 산화되기 쉬운 성분이며, 본 발명에서는 특히 일산화질소를 의미한다. 생체 내에서는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase)에 의해 생성되며 혈관에서는 강력한 혈관이완제로도 사용된다. 신경 세포와 관련해서는 기존에 높은 농도에 대하여 세포사멸을 유도하는 성분으로 알려져 있었으나, 최근 낮은 농도의 산화질소의 효과에 대하여는 새로운 연구되고 있는 실정이다. 본 발명에서 산화질소는 세포의 사멸을 유도하지 않으면서, 산화질소에 의한 신호전달 기작은 활성화시키는 정도의 농도인 것이 바람직하며, 이는 진세노사이드 Re 1 내지 5 μ M, 바람직하게는 2 내지 4 μ M에 의해 유도되는 산화질소 농도일 수 있다. 또한, 산화질소 공여체 SNP를 기준으로 5 nM 내지 40 nM, 바람직하게는 10 nM 내지 30 nM에 의해 유도되는 산화질소 농도일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "모니터링"이란 열충격단백질90, 열충격단백질60, 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 여부를 측정하거나 산화질소의 양을 측정하거나 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성을 측정하는 모든 수단을 뜻한다.
- [0029] 바람직한 일 실시태양으로, 상기 모니터링 수단으로 단백질의 발현량 자체 또는 화합물의 양을 측정하는 방법이 있으며, 상기 측정하는 방법은 시약반응, 크로마토그래피(chromatography), 마이크로어레이(RNA, 단백질), 서던블랏팅(southern blotting), 역전사 PCR(reverse transcriptase Polymerase chain reaction), 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time Polymerase chain reaction), 웨스턴블랏팅(western blotting), 면역형광염색법(immunofluorescence method), 및 형광공명에너지전이(Fluorescence Resonance Energy Transfer) 등의 방법이 활용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0030] 또한, 바람직한 일 실시태양으로, 상기 모니터링 수단은 단백질들의 활성을 측정하는 방법이 있으며, 상기 측정하는 방법은 단백질들이 특정 반응에 기능할 경우 해당 반응의 속도, 기질 등의 농도 등을 통하여 측정할 수 있다. 특히, 본 발명에서 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성은 30 mM 인산칼륨, 2.5 mM 도데실말토사이드(dodecylmaltoside) 및 34 μ M 페로사이토크롬 C(ferrocytochrome C, pH 7.4)를 포함하는 240 μ L 반응액을 통해 550 nm에서 분광광도법적으로 측정하였다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "대조군"이란 해당 파킨슨병 치료제 후보 물질을 처리하지 않은 신경 세포로 상기 후보 물질을 처리한 군과 병렬 관계에 속하는 신경 세포를 의미한다. 곧, 본 발명의 대조군은 아예 아무런 물질을 처리하지 않거나, 파킨슨병 치료제가 아닌 다른 음성 대조군 물질을 처리하거나, 기존에 알려진 파킨슨병 치료제인 양성 대조군 물질을 처리하는 것 등이 될 수 있다.

- [0032] 본 발명에서 용어 "활성화"는 단백질 또는 유전자가 가지고 있는 고유의 기능이 증가될 수 있는 모든 현상을 의미하며, 질적, 양적 활성화 모두를 의미할 수 있다. 곧, 유전자라면 해당 유전자가 가진 기능이 촉진되거나 (예를 들어, 각종 인자와의 결합 증가 등), 유전자 발현이 증가하는 것이 될 수 있으며, 단백질의 경우에는 발현량이 증가하거나 단백질이 가진 기능이 증가하는 경우 모두를 의미한다. 이는 발현 증가에 의해서 일어날 수도 있고 각종 변경(modification) 작용에 의해서 일어날 수도 있다. 본 발명의 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC(류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질)은 바람직하게는 발현 증가에 의해 활성화될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 RNA 수준 증가 또는 단백질 수준 증가를 통해 활성화될 수 있다. 본 발명의 미토콘드리아 단백질 복합체 IV는 발현 증가나 활성 증가에 의해 활성화될 수 있으며 바람직하게는 활성 증가에 의해 활성화될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 열충격단백질60 또는 열충격단백질90을 shRNA를 통해 불활성화하였다. 열충격단백질60을 불활성화할 경우에 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 열충격단백질90 특이적 저해제인 17-AAG를 이용하여 열충격단백질90을 불활성화할 경우에는 열충격단백질60의 발현이 감소되며, 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다(도 4a).
- [0034] 또한, 열충격단백질90 및 열충격단백질60을 동시발현하는 경우에 미토콘드리아 단백질 복합체 IV가 활성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(도 5a). 이는 열충격단백질90 및 열충격단백질60이 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성 회복 기작의 중요한 선행 조절자임을 보여주는 것이다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질을 과발현시킨 경우에 열충격단백질60의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며(도 3a), 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성이 증가되는 것을 확인하였다(도 3b). 열충격단백질90 및 열충격단백질60을 동시과발현 시켰을 때와 유사한 효과였다. 상기 결과는, 류신-풍부성 PPR 모티프-포함 단백질이 열충격단백질60의 발현 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성 회복 기작의 중요한 선행 조절자임을 보여주는 것이다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 파킨슨병 모델 세포주(PINK1 결실 세포주)를 제작하였다. 해당 세포주에서 미토콘드리아의 활성, 특히 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성이 비정상임을 확인하였으며(도 1의 A), 아울러 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC의 발현이 현저히 감소된 것을 확인하였다(도 1의 B 및 C). 해당 파킨슨병 모델 세포주에 파킨슨병 치료제 물질로 알려진 진세노사이드 Re를 처리하여, 소실되었던 미토콘드리아의 활성(미토콘드리아 단백질 복합체 IV)이 정상화되는 것을 확인하였으며, 이와 더불어 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC 단백질의 발현 또한 회복되는 것을 확인하였다(도 6a 내지 도 6d). 이러한 진세노사이드 Re의 파킨슨병 치료제 효과는 siRNA를 통한(small interference RNA) 열충격단백질60 녹다운(Knock down, KD)에 의해서 사라지는 것을 확인하였다(도 6e).
- [0037] 진세노사이드 Re가 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성과 열충격단백질 90, 열충격단백질60 및 LRPPRC 단백질에 가지는 효과는 내재적 산화질소 생성효소(endothelial Nitric oxide synthase, eNOS) 저해제인 L-NAME을 처리할 경우에 사라지는 것을 확인하여(도 7), 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성을 촉진하는 효과는 산화질소 관련 신호전달을 통해서 이루어지는 것을 확인하였다.
- [0038] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 정상 신경세포에 진세노사이드 Re를 처리할 경우에 오히려 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성과 열충격단백질60 및 LRPPRC 단백질의 발현양이 다소 감소되는 것을 확인하였다(도 6f 및 도 6g). 이는 정상적인 신경세포에서는 진세노사이드 Re와 열충격단백질 및 LRPPRC 단백질 간의 관계가 전혀 다를음을 보여준다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 산화질소 공여체인 SNP를 낮은 농도로 처리하여(20 nM) 진세노사이드 Re와 유사한 활성을 보이는지 확인하였다. 도 8에서 확인할 수 있듯이, SNP를 처리한 경우에 진세노사이드 Re를 처리한 경우와 동일하게 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성이 증가되는 것을 확인하였으며, 이와 더불어 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 정상 신경세포(SN4741)에 처리할 경우에도 진세노사이드 Re와 동일하게 되려 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성과 열충격단백질60 및 LRPPRC 단백질의 발현양이 다소 감소되는 것을 확인하였다(도 8e 및 도 8f).

- [0040] 이러한 기작을 이용하여, Hsp90, Hsp60 및 LRPPRC 단백질 신호전달을 모니터링하여 파킨슨병 치료제, 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성화제 또는 산화질소 공여체를 스크리닝할 수 있음을 뒷받침하는 것이다. 다른 한편으로는, 열충격단백질90, 열충격단백질60, LRPPRC 단백질 뿐 아니라 복합체 IV의 활성 및 산화질소 양을 모니터링하는 것을 통해 파킨슨병 치료제를 스크리닝할 수 있음을 뒷받침하는 것이다.
- [0041] 본 발명의 산화질소와 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성 기작에 대한 개념도는 도 9에 나타난 바와 같다. 구체적으로는, 파킨슨병 치료관련 기작으로 주목받고 있는 산화질소(nitric oxide) 관련 신호전달이 열충격단백질90 및 PINK1 결합 단백질인 LRPPRC 단백질 활성화를 촉진하고, 그로 인해 열충격단백질60이 활성화된다. 열충격단백질60이 활성화되면, 많은 경우에 활성이 감소될 경우 파킨슨병 원인이 되는 것으로 밝혀진 미토콘드리아 단백질 복합체 IV가 활성화된다.
- [0042] 곧, 산화질소 관련 신호전달에 의해 열충격단백질90 및 LRPPRC 단백질이 활성화되고, 뒤따른 열충격단백질60의 활성화가 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성을 촉진한다는 점을 최초로 규명하였다.
- [0043] 이러한 조절 기작의 과정에 있는 각종 단백질에 대해서 발현 및 활성에서의 변화를 모니터링하는 것을 통해 최종적으로 정상적인 미토콘드리아 활성을 회복시킬 수 있는 파킨슨병 치료제를 판단할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 스크리닝 방법에 의하여 얻어진 물질은 이후의 파킨슨병의 예방 또는 치료제 개발 과정에서 선도 물질(leading compound)로 작용하게 되며, 선도 물질을 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 파킨슨병의 예방 또는 치료제를 개발할 수 있으며, 이렇게 개발된 물질은 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC 단백질의 활성을 증가하는 효과를 통해 미토콘드리아의 기능을 정상화하여 파킨슨병 또는 이와 관련된 증상들을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 스크리닝 방법은 파킨슨병의 예방 또는 치료제의 탐색 및 개발에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0046] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 수단을 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝용 키트를 제공한다. 상기 스크리닝용 키트는 바람직하게는 산화질소 양을 모니터링하는 수단을 추가로 포함하거나, 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성을 모니터링하는 수단을 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 모니터링하는 수단은 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 스크리닝용 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 사용설명서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 스크리닝용 키트는 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자의 활성화와 산화질소 양 또는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성을 모니터링할 수 있는 기구, 시약, 프라이머, 항체, 또는 마이크로어레이 등을 포함할 수 있다. 또한, 신경 세포를 추가로 포함할 수 있다. 파킨슨병 치료제는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0050] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 파킨슨병 치료제를 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계; 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 단계; 및 치료제를 처리한 군에서, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질의 활성화가 해당 파킨슨병 치료제를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되는 정도에 따라 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병관련 치료제의 효능 검정 방법을 제공한다.

- [0051] 또한, 본 발명은 파킨슨병 치료제를 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계; 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 및 산화질소 양을 모니터링하는 단계; 및 치료제를 처리한 군에서, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질의 활성화와 산화질소 양이 해당 파킨슨병 치료제를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되는 정도에 따라 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병관련 치료제의 효능 검정 방법을 제공한다.
- [0052] 아울러, 본 발명은 파킨슨병 치료제를 시험관 내(in vitro) 또는 인간을 제외한 동물의 신경 세포에 처리하는 단계; 신경 세포에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성화를 모니터링하는 단계; 및 치료제를 처리한 군에서, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질 및 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성이 해당 파킨슨병 치료제를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가되는 정도에 따라 파킨슨병 치료제의 효능을 검정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병관련 치료제의 효능 검정 방법을 제공한다.
- [0053] 상기 모니터링하는 수단은 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0054] 상기 파킨슨병 치료제의 효능은 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화와 산화질소 양 또는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성이 기존의 파킨슨병 치료제 처리시와 비교하여 증가됐는지 감소했는지를 통해서도 검정될 수 있다.
- [0055] 상기 파킨슨병 치료제의 효능은 상기 유전자 활성화의 차이, 즉, 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질의 활성화와 산화질소 양 또는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성화 정도가 대조군에 비하여 증가되는 정도가 클수록 효능이 우수하다고 판단될 수 있다. 이는 대조군과 비교할 수도 있으나, 해당 증가율이 기존의 파킨슨병 치료제와 비교하여 검정될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 파킨슨병 치료제는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0057] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링하는 수단을 포함하는 파킨슨병 치료제의 효능 검정용 키트를 제공한다. 상기 검정용 키트는 바람직하게는 산화질소 양을 모니터링하는 수단을 추가로 포함하거나, 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성을 모니터링하는 수단을 추가로 포함할 수 있다.
- [0058] 상기 모니터링하는 수단은 크로마토그래피, 마이크로어레이, 서던블랏팅, 역전사 PCR, 정량적 실시간 PCR, 웨스턴 블랏팅, 면역형광염색법, 및 형광공명에너지전이로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0059] 또한, 상기 검정용 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 사용설명서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 검정용 키트는 열충격단백질90, 열충격단백질60 또는 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질의 유전자의 활성화와 산화질소 양 또는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV 활성을 모니터링할 수 있는 기구, 시약, 프라이머, 항체, 또는 마이크로어레이 등을 포함할 수 있다. 또한, 신경 세포를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 파킨슨병 치료제는 상기에서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명은 파킨슨병 치료제의 미토콘드리아 활성 회복 기작 상에서 세포질에서 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화 정도가 달라지는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명은 상기 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 류신-풍부 PPR 모티프-포함 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 활성화를 모니터링함으로써 파킨슨병 치료제를 스크리닝할 수 있으며, 기존 파킨슨병 치료제의 효능을 손쉽게 효과적으로 검정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062]

도 1은 파킨슨병 모델 세포주(PINK1 결실 세포주)에서 복합체 IV 활성 및 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC의 발현을 측정된 도면이다. 도면 A에서는 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 활성을 그래프로 나타낸 것이다. 도면 B는 열충격단백질90, 열충격단백질60 및 LRPPRC의 발현을 보여주는 도면이다.

도 2는 Hsp60에 대한 shRNA를 안정적으로 발현하는 SN4741 세포(Hsp60 Knock down(KD) 세포)를 제조하여 이의 미토콘드리아 complex I, II, IV의 활성을 보여주는 도면이다. 이 60% 이상 현저하게 감소되는 것을 확인하였다(도 2의 B). 반면, Complex I 이나 II의 활성은 Hsp60의 결실에 전혀 영향을 받지 않았다(도 2의 C). 도면 A는 Hsp60 KD 세포(line #9)에서 Hsp60의 발현량 감소를 확인하는 도면이다. 도면 B 및 도면 C는 Hsp60 KD 세포(line #9)에서의 미토콘드리아 complex I, II, IV의 활성을 확인한 도면이다.

도 3A는 LRPPRC 단백질을 발현시켰을 때, LRPPRC, Hsp60 및 Hsp90의 발현을 확인한 도면이다.

도 3B는 LRPPRC 단백질을 발현시켰을 때, 복합체 IV 활성을 확인한 도면이다.

도 3C는 Hsp60 녹다운 세포에서 LRPPRC 단백질 양을 확인한 도면이다.

도 3D는 LRPPRC에 의한 복합체 IV의 활성화에 대한 효과가 Hsp60에 대한 siRNA에 의해 받는 영향을 보여주는 도면이다.

도 3E는 PINK1 또는 LRPPRC에 대한 면역침강법으로 LRPPRC 단백질과 PINK1의 결합 여부를 확인한 도면이다.

도 3F는 Hsp60에 대한 면역침강법으로 Hsp60과 LRPPRC 단백질의 결합 여부를 확인한 도면이다.

도 4A는 Hsp90에 대한 특이적 저해제인 17-AAG를 이용하여 Hsp60 발현과 복합체 IV 활성화에 미치는 영향을 보여주는 도면이다.

도 4B는 Hsp90에 대한 특이적 저해제인 17-AAG가 Hsp90과 LRPPRC의 발현에 미치는 영향을 보여주는 도면이다.

도 4C는 PINK1 결실 세포에 Hsp60을 단독으로 발현시켜 복합체 IV 활성 회복 여부를 확인한 도면이다.

도 4D는 PINK1 결실 세포에 Hsp90을 단독으로 발현시켜 복합체 IV 활성 회복 여부를 확인한 도면이다.

도 5A는 PINK1 결실 세포에 Hsp90과 Hsp60을 동시발현시켜 복합체 IV 활성 회복 여부를 확인한 도면이다.

도 5B는 Hsp90과 Hsp60에 대한 면역침강법을 이용하여 Hsp90과 Hsp60이 직접적으로 결합하는지 여부를 확인한 도면이다.

도 5C는 Hsp90의 발현과 Hsp60의 축적 간의 연관 여부를 확인한 도면이다.

도 6A는 진세노사이드 Re를 농도별로 처리하여 복합체 IV의 활성을 확인한 도면이다.

도 6B는 진세노사이드 Re를 최적 농도(3 μ M)로 처리하였을 때 복합체 IV의 활성을 확인한 도면이다.

도 6C는 PINK1 결실 세포에 진세노사이드 Re를 처리하여 Hsp90의 발현량을 확인한 도면이다.

도 6D는 PINK1 결실 세포에 진세노사이드 Re를 처리하여 LRPPRC 단백질 및 Hsp60의 발현량을 확인한 도면이다.

도 6E는 PINK1 결실 세포에서 Hsp60 siRNA가 진세노사이드 Re를 처리한 효과에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 6F는 정상세포(SN4741)에 진세노사이드 Re 처리하여 복합체 IV의 활성화에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 6G는 정상세포(SN4741)에 진세노사이드 Re 처리하여 Hsp60 및 LRPPRC 발현에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 6H는 정상세포(SN4741)에서 진세노사이드 Re 처리하여 PINK1 발현에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 7A는 진세노사이드 Re의 복합체 IV 활성 촉진 효과가 pan-NOS 저해제인 L-NAME에 의해서 사라진다는 것을 확인한 도면이다.

도 7B는 진세노사이드 Re의 LRPPRC 및 Hsp60 발현 증가 효과가 pan-NOS 저해제인 L-NAME에 의해서 사라진다는 것을 확인한 도면이다.

도 8A는 PINK1 결실세포에 다양한 농도의 산화질소 공여체 SNP를 처리하여 복합체 IV의 활성을 확인한 도면이다.

도 8B는 SNP 최적 농도(20nM)를 처리하였을 때 복합체 IV의 활성을 확인한 도면이다.

도 8C는 PINK1 결실세포에 산화질소 공여체 SNP를 처리하여 Hsp90의 발현양을 확인한 도면이다.

도 8D는 PINK1 결실세포에 산화질소 공여체 SNP를 처리하여 Hsp60 및 LRPPRC 단백질의 발현양을 확인한 도면이다.

도 8E는 정상세포(SN4741)에 산화질소 공여체 SNP를 처리하여 복합체 IV의 활성에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 8F는 정상세포(SN4741)에 산화질소 공여체 SNP를 처리하여 Hsp60 및 LRPPRC 발현에 미치는 영향을 확인한 도면이다.

도 9는 진세노사이드 Re에 의한 복합체 IV 활성화에 대한 기작의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 실시예 1: 도파민성 신경 세포주 및 Hsp60 녹다운(Knock down, KD) 세포주의 확립 및 배양

[0065] 기존 immortalizer 형질전환 쥐(Son, J. H. et al (1999), The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19, pp10-20)와 기존 PINK1 결실 마우스(Shim, J. H. et al (2011), Mitochondrion 11, pp707-715)간의 교배를 통하여 PINK1 결실 도파민성 세포주를 확립하였다.

[0066] 구체적으로는, 수정 후 13.5일째(embryonic day 13.5)에 TH9.0kb-SV40Tag-tsA58 유전자 및 PINK1 결실 변이를 둘다 포함하고 있는 이중 형질전환 쥐 태아의 SN 부위로부터 불멸화된 PINK1-결실 도파민성 신경 세포주가 확립되었다. 도파민성 신경세포는 일전에 개시된대로 33℃, 5% CO₂조건의 RF 배지에서 배양되었다.

[0067] PINK1 결실 도파민성 신경세포는 추가적으로 허용 온도(33℃)에서 면역블랏 및 RT-PCR 분석에 의해 일반적인 신경 마커들, TuJ1, NeuN 및 도파민성 신경-특이적 마커 TH가 발현된다.

[0068] Hsp60 KD 세포주를 제조하기 위하여, 천연형 SN4741 도파민성 신경세포에 Hsp60 shRNA(5'-CCG AAG ACG TTG ACG GAG A-3', 서열번호 1)를 포함하는 pSUPER.retro.puro 벡터(OligoEngine, Seattle, WA, USA) 또는 pSUPER.retro.puro 벡터 단독(대조군)을 주입하였다. puromycin(1 ug/mL)을 포함하는 배양 배지를 이용하여 안정적으로 형질전환된 세포주를 수득하였다.

[0069] 실시예 2: Plasmids, 유전자 knockdown 및 일시적 형질전환(transient transfection) 분석

[0070] pCMVTnT-PINK1-myc, pCDNA3 PINK1-FLAG 및 pCDNA3.1-Hsp60-MycHis 플라스미드들은 M.R. Cookson, Takahashi 및 T.J. Corydon 박사들에게서 제공받았다. pCDNA3 벡터에 삽입된 Hsp90 및 LRPPRC는 Thermo Fisher Scientific Inc.(U.S.A)에서 구입하였다. Mouse LRPPRC cDNA를 EcoRI(5') 및 KpnI(3')으로 잘라 pFLAG-CMV 플라스미드에 삽입하여 pFLAG-LRPPRC를 제작하였다. 유전자 knockdown을 위해서 양방향 siRNA를 TransIT-TKO Transfection 시약(Mirus Bio Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 주입하였다. siRNA 올리고뉴클레오타이드는 바이오니아(대전, 한국)에서 제작하였으며, 서열은 다음과 같다.

[0071] siHsp60 sense(서열번호 2) : 5-r(CACUGUUCUGGCACGAUCU)d(TT)-3

[0072] siHsp60 antisense(서열번호 3) : 5-r(AGAUCGUGCCAGAACAGUG)d(TT)-3.

[0073] 일시적 형질전환 분석은 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법에 의해서 진행하였다.

[0074] 실시예 3: 정량적 실시간 PCR 분석

[0075] 도파민성 세포에서 총RNA를 분리해내었다. 5 μ g의 총RNA와 RT-PCR 키트(MP Biomedicals Inc., CA, USA)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. 내재적 PINK1 mRNA 수준은 b-actin에 비교해서 표준 곡선 방법으로 측정하였다. 정량적 PCR은 AB7300 실시간 PCR(real-time PCR) 시스템 및 DyNAmo HS SYBR green qPCR 키트(Applied Biosystems, CA, USA 및 Thermo Fisher Scientific Inc., NH, USA)를 통하여 실험하였다. 이에 사용한 b-actin 및 PINK1에 관한 프라이머는 하기와 같다.

[0076] b-actin 정방향 프라이머(서열번호 4) : 5'-TTC TTT GCA GCT CCT TCG TTG CCG-3'

[0077] b-actin 역방향 프라이머(서열번호 5) : 5'-TGG ATG GCT ACG TAC ATG GCT GGG-3'

[0078] PINK1 정방향 프라이머(서열번호 6) : 5'- TGA TCT CAG ACT TTG GCT GCT -3'

[0079] PINK1 역방향 프라이머(서열번호 7) : 5'- CCT TGG CCA TAG AAG GGA TT-3'

[0080] 실시예 4: 인삼(*P. ginseng*)으로부터 진세노사이드 Re의 분리 정제

[0081] 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 고속 향류분배 크로마토그래프-증기화 광산란 검출기(high-speed counter-current chromatography coupled with an evaporative light scattering detector, HSCCC-ELSD)을 이용하여 Re를 포함하는 8가지의 진세노사이드를 분리해내었다.

[0082] 구체적으로는, HSCCC-ELSD 분리를 위한 조추출물 시료는 먼저 인삼 추출물을 macroporous 레진으로 정제하여 수득하였다. 특히, 상기 추출물은 Diaion-HP20 컬럼에 주입(loading)하고, 메탄올과 물의 기울기 용리를 통해 분리하였다. 진세노사이드-프로토파낙사디올(ginsenosides-protopanaxadiol) 및 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 분획물은 각각 65% 및 80% 메탄올/물 기울기 용리 방법으로 추출하였다. 이렇게 얻어진 두 분획물로 HSCCC-ELSD를 진행하였다. 분리를 위해 사용된 2상 용매 시스템은 클로로포름/메탄올/물/아이스프로판올을 4:3:2:1의 부피비로 구성되었다. 각 분획물을 수득하고 건조시켰다. 진세노사이드 Re를 포함하여 8개의 진세노사이드를 재용해시켰고 HPLC-ELSD에 의해 측정된 각 진세노사이드의 순도는 98%보다 높았다.

[0083] 실시예 5: 면역침강 분석(Immunoprecipitation)

[0084] 면역침강 실험을 위해서 형질전환된 세포를 프로테아제 저해제를 포함하는 용해 완충액(Thermo Fisher Scientific)에서 얼음위에서 한시간 동안 정치시켰다. 단백질을 추출물을 anti-FLAG M2 아가로스(Sigma-Aldrich Chemicals) 또는 Protein G plus 아가로스와 함께 4°C에서 하룻밤동안 정치시켰다. 침강된 비드를 PBS로 3번 세척하고, 결합한 단백질은 비드를 시료 완충액(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% 글리세롤, 2% SDS, 14.4 mM β -머캅토에탄올, 및 0.1% 프로모페놀 블루)과 함께 끓여서 추출해내었다. 추출된 단백질은 12% SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동실험을 통해 분리한 후, MS Core Facility(EWU, 서울, 한국)에서 LC/MS 및 면역블랏(immunoblot)을 통해서 분석했다.

[0085] 실시예 6: 면역블랏 분석(Immuno-blotting)

[0086] 세포들은 PBS로 3번 세척한 후 1mM PMSF를 포함하는 세포 용해 완충액(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)을 처리하였다. 단백질 용해물은 12% SDS-폴리아크릴아마이드 젤에서 분리되고, PVDF막에 이동되었다. 0.1% Tween 20을 포함하는 5% 분유 TBS 용액으로 블락킹을 한 후, 블랏(PVDF막)은 1차 항체와 함께 4°C에서 하룻밤 동안 정치되었다. 다음과 같은 1차 항체들이 사용되었다 : 항-prohibitin, 항-GAPDH, 항-LRPPRC, 항-Hsp90, 항-Hsp60, 항-GRP7 및 항-Actin(Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), 항-COX I (Abcam, Cambridge, UK), 항-COX IV and 항-GRP75 (Cell Signaling), 항-Myc (Clontech Laboratories, Inc., CA, U.S.A.), 항-FLAG (Sigma-Aldrich) 및 항-NDUFB6 (Invitrogen).

[0087] 1차 항체로 표지된 블랏들은 세척된 후에 항-염소, 항-마우스 또는 항-토끼 IgG-HRP 2차 항체들로 표지되어 ECL 화학발광 시약(ECL chemiluminescence, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 통해 가시화하였다. 밴드의 농도 정량은 Image Analyzer 시스템 및 Multi Gauge version 2.3을 통해 수행하였다.

[0088] **실시예 7: 면역세포화학 염색(immunocytochemistry) 분석**

[0089] 면역세포화학 염색을 위하여 배양 세포를 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 PBS에 실온에서 15분간 고정한 후, 0.1% Triton X-100를 포함하는 PBS로 5분간 투과성 처리(permeablization)한 후, PBS로 세 번 세척하였다.

[0090] 미토콘드리아는 MitoTracker(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 염색하였고 형태학적 변화는 공초점 현미경(Carl Zeiss, Germany)를 통해 분석하였다.

[0091] **실시예 8: 미토콘드리아 분리**

[0092] 미토콘드리아는 기존에 알려진 방법을 통해 준비되었다. 구체적으로는, 세포를 저온 PBS(ice-cold)로 세척한 후, 프로테아제 저해제 혼합물을 포함하는 저온의 10 mM Tris 완충액(pH 7.6)에 현탁하였다. 세포들을 1mL 주사기를 이용하여 물리적으로 파쇄하고, 저온의 1.5 M 설탕용액을 첨가한 후, 2℃에서 600 x g의 속도로 10분간 원심분리하였다. 상청액은 다시 2℃에서 14,000 x g속도로 10분간 원심분리하고, 수득된 펠렛을 세척하고, 프로테아제 저해제 혼합물을 포함하는 저온의 10mM Tris 용액(pH 7.6)에 재현탁하였다. 일정량의 펠렛들은 정량을 위해서 용해되고, 나머지들은 분석시까지 얼음에 보관하였다.

[0093] **실시예 9: 복합체 IV 및 구연산 합성효소 활성 측정**

[0094] 복합체 IV 및 구연산은 기존에 실시된 방법을 통해 분석되었다. 간단하게 설명하자면, 복합체 IV의 활성은 30 mM 인산칼륨, 2.5 mM 도데실말토사이드(dodecylmaltoside) 및 34 μ M 페로사이토크롬 C(ferrocytochrome C, pH 7.4)를 포함하는 240 μ L 반응액을 통해 550 nm에서 분광광도법적으로 측정하였다. 미토콘드리아 시료(1 ug/10 μ L)는 완충액에 더해지고 30℃에서 30초 간격으로 5분간 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군은 1mM KCN을 포함하였다.

[0095] 구연산 합성효소 활성은 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 0.1 mM 아세틸코에이 및 0.5 mM 옥살로아세테이트를 포함하는 240 μ L 반응액을 통해 412nm에서 분광광도법적으로 측정하였다. 미토콘드리아 시료(1 ug/10 μ L)는 옥살로아세테이트를 포함하지 않는 완충액에 더해지고 30℃에서 5분간 흡광도를 측정하였다. 그 후 50mM 옥살로아세테이트를 2.5 μ L 첨가하여 반응을 시작하였다. 37℃에서 30초 간격으로 5분간 흡광도를 측정하였다. 동일한 옥살로아세테이트 대신에 동부피의 물을 첨가한 경우를 대조군으로 하였다.

[0096] **실시예 10: 통계 분석**

[0097] 데이터는 3 내지 8번의 독립적 실험에서 얻어진 데이터에 기반하여 평균 $\pm$ 표준편차(SD, standard deviation)값으로 표시하였다. Sigmaplot을 이용하여 통계적 분석을 하였고, 통계적 유의미성은 Student t-test법을 이용하여 측정되었다. 필요한 경우에는 다중 비교는 one-way ANOVA를 통하여 수행하였다.

[0098] **실험예 1: PINK1 결실 도파민성 신경세포와 Hsp60 녹다운 신경세포의 특성**

[0099] PINK1 결실 도파민성 신경세포는 불완전 미토콘드리아들이 축적되고 복합체 IV 활성이 현저하게 감소되는 현상을 보였다(도 1A).

[0100] PINK1 결실 세포에서 미토콘드리아 관련 보호자 단백질의 발현 변화가 복합체 IV 이상에 의한 것인지 여부를 확인하기 위해서, 이러한 단백질들의 발현 수준을 천연형 및 PINK1 결실 도파민성 신경 세포간에 비교하였다. 그 결과, PINK1 결실 도파민성 신경세포에서 미토콘드리아 보호자 단백질 Hsp60, 복합체 IV 결합 인자 LRPPRC(도 1B), 및 TOM complex 결합 보호자 단백질 Hsp90(도 1C)의 수준이 현저하게 감소하였다. 반면, DJ-1 결실 도파민성 신경세포에서 Hsp60, Hsp90, 및 LRPPRC는 감소되지 않았다.

[0101] Grp75나 Grp78 같은 다른 보호자 단백질의 양은 모든 도파민성 신경세포에서 일정하게 유지되었다. 보호자 단백질 및 조합 인자 단백질 양이 감소되는 것을 바탕으로, 천연형 SN4741 세포주와 PINK1 결실 도파민성 신

경세포들을 이용하여 정상 또는 장애 상태에서 Hsp60, Hsp90 및 LRPPRC가 복합체 IV 활성 조절에 관여하는지를 확인하였다.

[0102] 실험예 2: Hsp60 조절과 복합체 IV의 활성

[0103] PINK1을 결실한 세포에서 Hsp60 하향 조절의 기능적 결과를 평가하기 위해서, Hsp60에 대한 shRNA를 안정적으로 발현하는 SN4741 세포(Hsp60 Knock down(KD) 세포)를 제조하였다(도 2의 A). Hsp60 미발현이 복합체 IV 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 분석한 결과, Hsp60 KD 세포(line #9)은 복합체 IV 활성이 60% 이상 현저하게 감소되는 것을 확인하였다(도 2의 B). 반면, Complex I 이나 II의 활성은 Hsp60의 결실에도 전혀 영향을 받지 않았다(도 2의 C).

[0104] 즉, Hsp60 단백질 타겟 shRNA(short hairpin RNA)를 이용하여 넉다운(knock down, KD)시킨 신경세포는 미토콘드리아 기능에 이상이 생겼으며, 특히 미토콘드리아 단백질 complex I 및 II의 활성에는 전혀 차이를 보이지 않았으나, 복합체 IV의 활성은 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0105] 실험예 3: LRPPRC 조절과 복합체 IV의 활성

[0106] PINK1 결실 조건에서 복합체 IV 결합 인자인 LRPPRC 발현이 30% 가량 감소되는바(도 1B), LRPPRC의 수준을 변화시키는 것이 복합체 IV 활성에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다. 먼저, PINK1 결실 도파민성 신경세포에 LRPPRC를 과발현시켜, 복합체 IV 활성 및 Hsp60의 수준을 분석하였다.

[0107] LRPPRC 발현 증가(~40%)는 Hsp60 발현을 25% 가량 증가시켰으며(도 3A), 복합체 IV 활성을 110% 증가시켰다(도 3B). Complex I 또는 II의 활성에는 아무런 변화가 없었는바, PINK1 결실 세포에서 보이는 LRPPRC 수준의 감소는 복합체 IV 이상에 특이적으로 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0108] 반면, Hsp60 KD 세포(Line #9)에서는 LRPPRC 발현에 아무런 변화가 없었으며(도 3C), LRPPRC에 의한 효과 또한 Hsp60 KD 세포에서는 현저히 감소되는바(도 3D), LRPPRC가 Hsp60의 상위 조절자임을 확인하였다. 또한, LRPPRC는 PINK1과 결합하지만(도 3E), Hsp60와는 결합하지 않는바(도 3F), LRPPRC가 PINK1을 조절하는 역할을 할 수 있음을 암시한다.

[0109] 실험예 4: Hsp90 및 Hsp60 조절과 comoplex IV의 활성

[0110] PINK1 결실 도파민성 신경세포에서 Hsp90 수준이 80%가량 감소되는바(도 1의C), 천연형 신경세포에서 17-(Allylamino) geldanamycin (17-AAG)을 이용한 Hsp90 특이적 저해가 복합체 IV 활성에 비슷한 영향을 미치는지 확인하였다.

[0111] 예상한 바와 같이, 복합체 IV 활성 및 Hsp60 수준이 둘 다 17-AAG의 처리 농도에 의존적으로 감소하는 양상을 보였다(도 4A). 그러나, 17-AAG 처리는 Hsp90 및 LRPPRC 수준을 변화시키지 않는바(도 4B), Hsp90은 복합체 IV 활성을 조절하는데 관여하는 Hsp60 발현에 대한 또다른 상위 조절자임을 나타낸다.

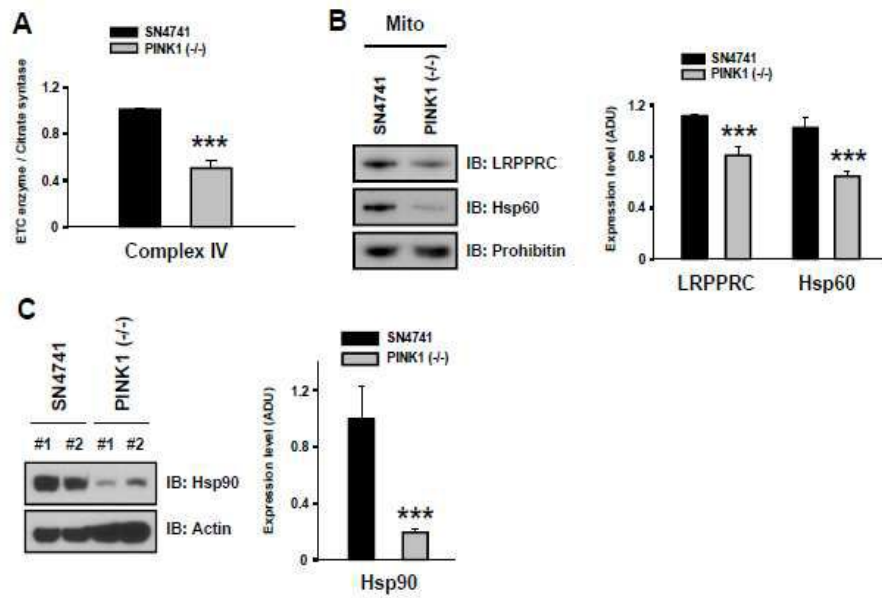
[0112] 다음으로, PINK1 결실 조건에서 Hsp60을 단독으로 과발현하는 것으로 Hsp90 및/또는 LRPPRC 결실을 극복할 수 있는지를 확인하였다. Hsp60 또는 Hsp90을 단독으로 발현시키는 두 경우 모두에서 어떠한 알아챌 만한 복합체 IV 활성의 회복 효과를 볼 수 없었으며(도 4C 및 4D), 이는 PINK1 결실 도파민성 신경세포에서 Hsp90 수준이 감소된 것 때문인 것으로 보인다.

[0113] 반면, PINK1 결실 도파민성 신경세포에서 Hsp90과 Hsp60을 동시발현하는 경우에 복합체 IV 활성이 현저히 증가하였다(도 5A). Hsp90 보호자 단백질은 TOM70 수용체를 통하여 전단백질(preprotein)의 미토콘드리아 기질 내부 이동을 돕는 것으로 알려져 있기 때문에, Hsp90이 이러한 기능으로 인한 것인지 가능성을 제외하기 위해 Hsp90이 Hsp60과 직접적으로 결합하는지를 확인하였다(도 5B). 또한, Hsp90의 과발현이 Hsp60이 미토콘드리아에 축적되는 것을 증가시키는지(도 5C), 이는 Hsp90과 Hsp60 둘 모두가 PINK1 결실로 인한 복합체 IV 활성 감소를 회복시키는데 필요하다는 것을 뒷받침한다.

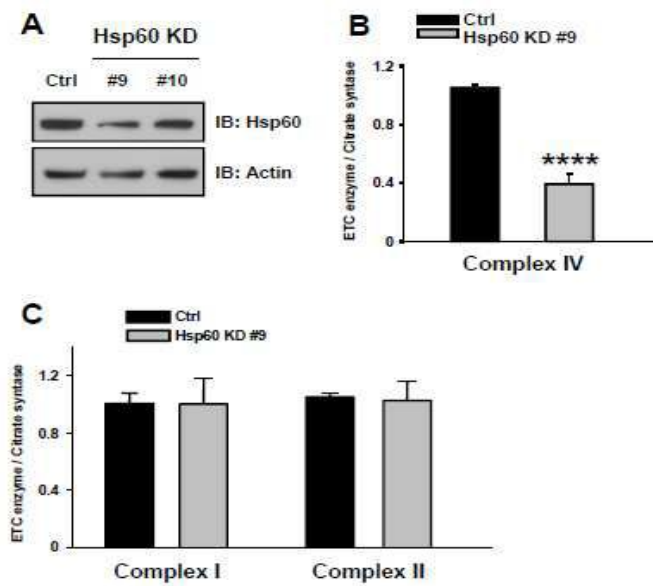
[0114] 실험예 5: 산화질소 신호전달을 통한 진세노사이드 Re의 복합체 IV 활성 회복 효과

- [0115] 아직까지 파킨슨병에서 미토콘드리아의 기능을 회복시킬 수 있는 약이 발견되지 않은바, PINK1 결실 도파민성 신경세포에서 진세노사이드를 포함하는 어떠한 천연 화합물이 복합체 IV 이상을 개선할 수 있는지를 확인하였다. 진세노사이드 Re를 최적 농도로(3 μ M) 처리한 경우 PINK1 결실 세포에서 복합체 IV의 활성이 현저하게 회복되었다(도 6A 및 6B).
- [0116] 반대로, 진세노사이드 Re를 5 μ M 이상의 농도로 처리할 경우에는 오히려 복합체 IV의 잔여 활성을 감소시켰다. 최적 농도에서 기능 회복은 Hsp60으로 이어지는 Hsp90과 LRPPRC 둘 다의 발현 증가의 면에서도 이루어졌다(도 6C 및 6D). 진세노사이드 Re의 효과는 Hsp60 KD에 의해서 현저히 감소된다(도 6E). PINK1 결실 신경 세포에서의 효과와 반대로 천연형 도파민성 신경세포에서는 진세노사이드 Re를 동량(3 μ M) 처리한 경우에 LRPPRC 및 Hsp60 수준을 다소 감소시키는 것(각각 17% 및 10% 감소) (도 6G)과 함께 복합체 IV 활성을 미약하게 저해(~13% 감소)하였다(도 6F). 진세노사이드 Re는 PINK1 mRNA 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다(도 6H). 이러한 결과들은 진세노사이드 Re에 의해 유도되는 복합체 IV 활성 증가는 PINK1 결실 병변 조건 및 최적 농도(3 μ M) 둘 다 해당되는 경우에 특이적이라는 것을 암시한다.
- [0117] 진세노사이드 Re가 배양 세포에서 산화질소 생성을 촉진하는 것이 알려져 있기 때문에, 산화질소 신호전달 기작이 진세노사이드 Re-유도 복합체 IV 활성 회복에 작용하는지를 확인하였다. pan-NOS 저해제인 L-NAME이 진세노사이드 Re의 복합체 IV 활성에 미치는 영향을 막는지 확인하였다. 예측한 대로, L-NAME을 처리한 경우에 진세노사이드 Re에 의한 LRPPRC 및 Hsp60의 수준이 증가되는 현상도 사라지고, 복합체 IV 활성 회복 효과 또한 완전히 사라졌다(도 7A).
- [0118] 상기 결과들을 종합해보면, PINK1 결실 조건에서 진세노사이드 Re를 처리함으로 인한 복합체 IV 활성 회복은 산화질소 신호전달을 통해서 이루어진다는 것을 의미한다.
- [0119] 마지막으로, 산화질소 공여체인 SNP를 처리하여 진세노사이드 Re의 복합체 IV 활성을 촉진하고 Hsp90, LRPPRC 및 Hsp60 발현을 증가시키는(도 8B 내지 도 8D) 복합체 IV 활성에 미치는 효과를 재실험될 수 있음을 확인하였다. 이는, 산화질소 신호전달이 복합체 IV 활성 회복에 하는 역할을 하는 것을 나타낸다.
- [0120] 천연형 세포에서는 진세노사이드 Re 처리시 결과와 일치하여, SNP를 동량(20 nM) 처리한 경우에 LRPPRC 및 Hsp60 수준을 다소 감소시키는 것(각각 20% 및 25% 감소) (도 8E 및 8F)과 함께 복합체 IV 활성을 다소 저해(~26% 감소)하였다. 이러한 결과들은 PINK1 결실 세포에서 적정량의 진세노사이드 Re(3 μ M)에 의한 회복효과는 적은 농도의 SNP 처리(20 nM)만으로 재현될 수 있음을 나타낸다.
- [0121] 상기의 데이터들을 종합해 보면, 상기 진세노사이드 Re 및 SNP에 의한 복합체 IV 활성 회복은 PINK1 결실 조건 특이적 증상으로, PINK1 결실에 의한 산화질소 신호전달의 이상을 회복하는 것을 통해 이루어지는 것을 암시한다. 반면, 천연형 세포에서 동일한 처리는 산화질소 신호전달에 동요를 일으킨다.
- [0122] 상기 결과들을 종합하면, 산화질소 공여체가 Hsp90, Hsp60 및 LRPPRC 단백질 신호전달을 촉진한다는 것을 확인하였고, 이를 통해 파킨슨병 모델 세포인 PINK1 결실 세포의 미토콘드리아 단백질 복합체 IV의 이상을 회복시키는 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. 본 발명에서 새롭게 밝힌, 복합체 IV 활성 신호전달 기작은 도 9와 같다. 이를 통해, Hsp90, Hsp60 및 LRPPRC 단백질 신호전달은 산화질소 공여체, 넓게는 미토콘드리아 이상 치료제, 더 넓게는 파킨슨병 치료제 처리시 활성화된다는 것을 확인하였다.
- [0123] 이러한 기작을 이용하여, Hsp90, Hsp60 및 LRPPRC 단백질 신호전달을 모니터링하여 파킨슨병 치료제, 미토콘드리아 이상 치료제 또는 산화질소 공여체를 스크리닝할 수 있음을 뒷받침하는 것이다.
- [0124] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

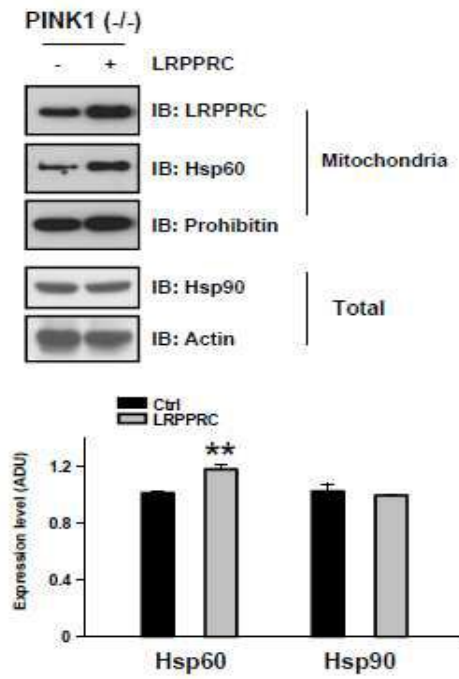
도면1



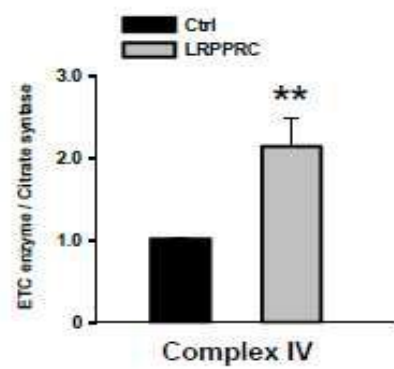
도면2



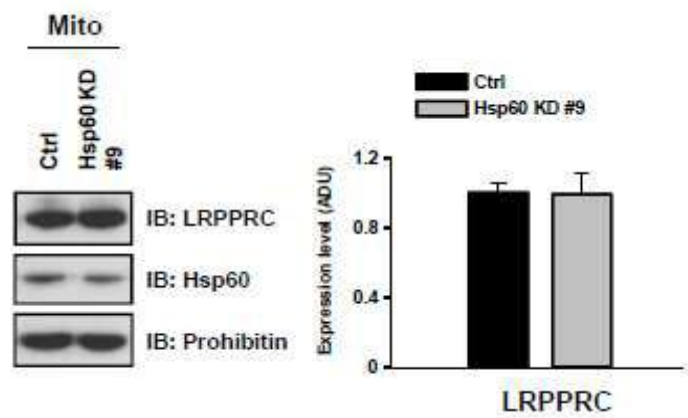
도면3a



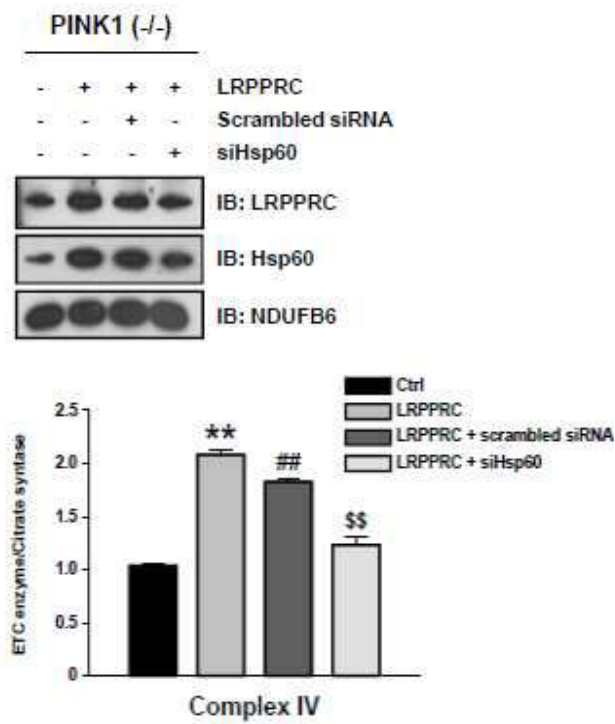
도면3b



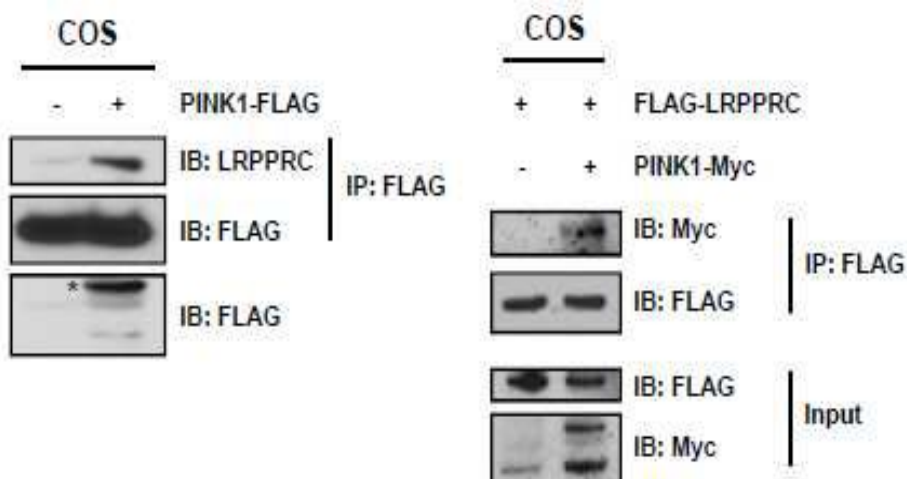
도면3c



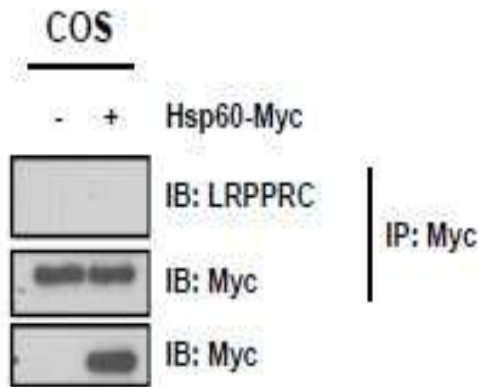
도면3d



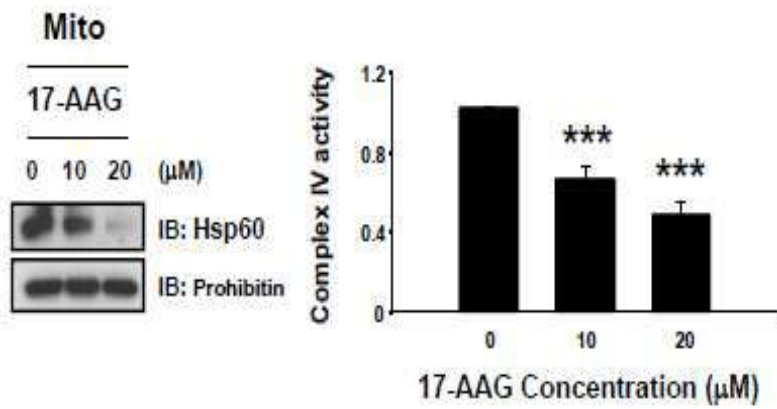
도면3e



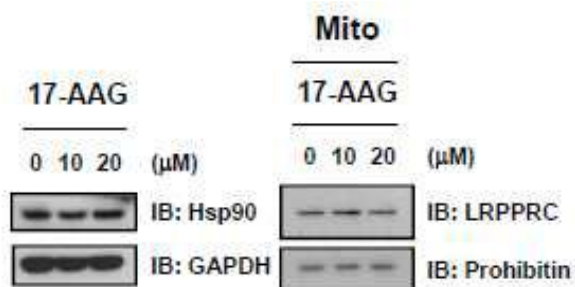
도면3f



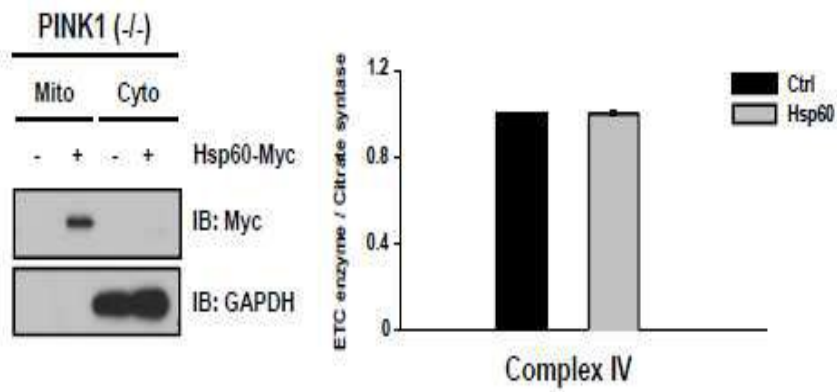
도면4a



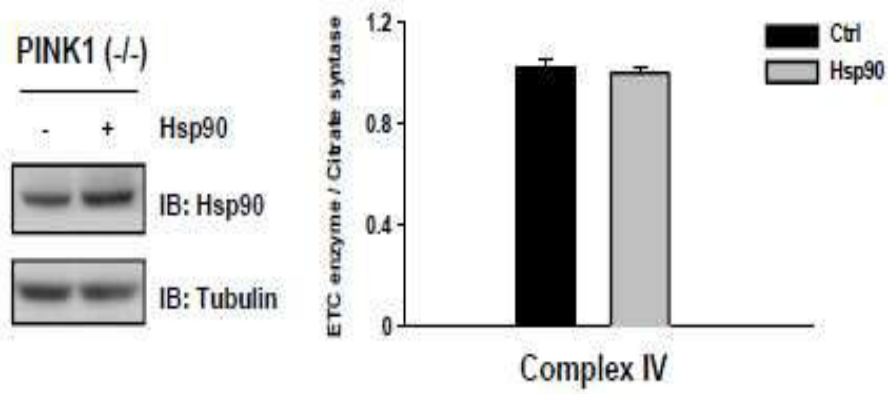
도면4b



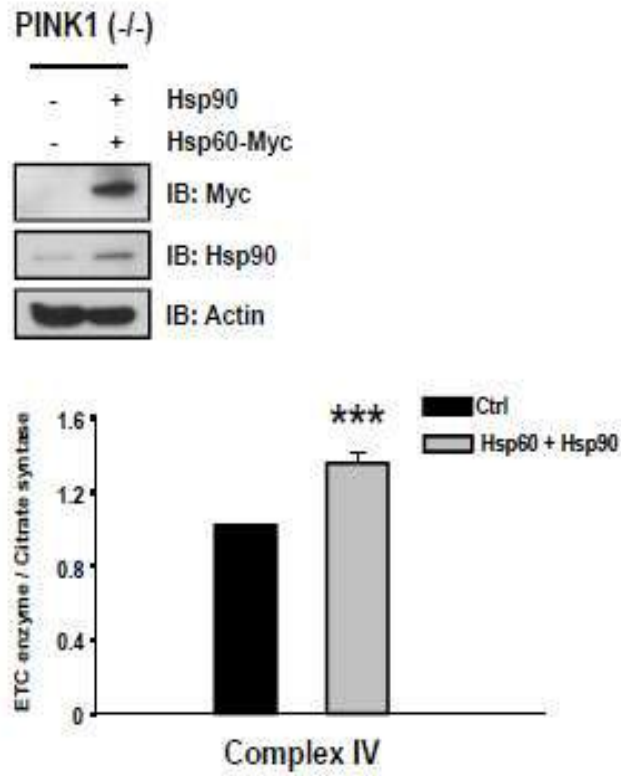
도면4c



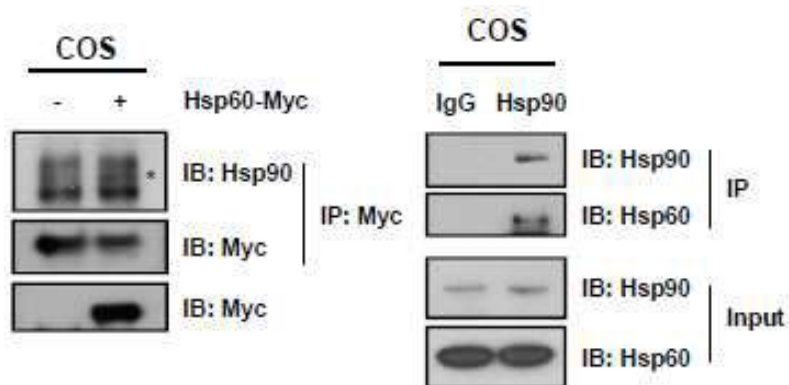
도면4d



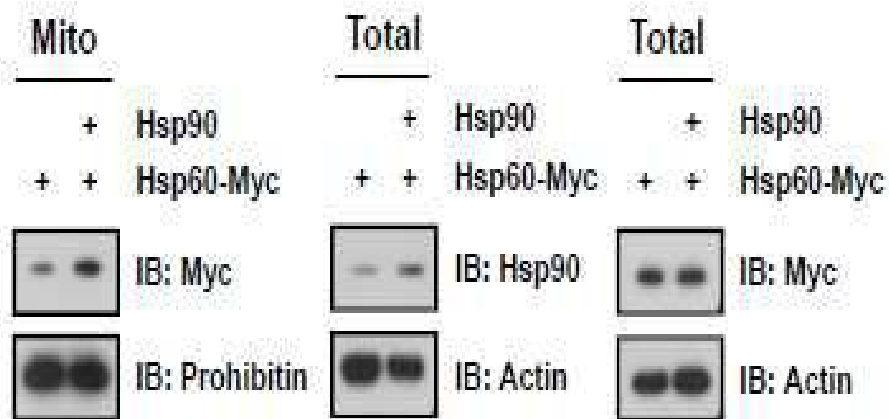
도면5a



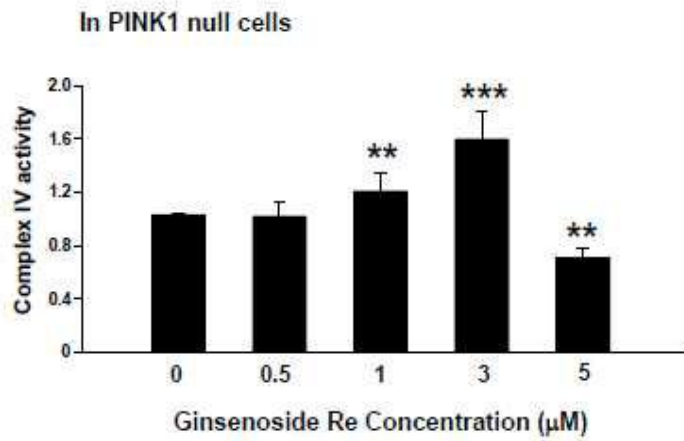
도면5b



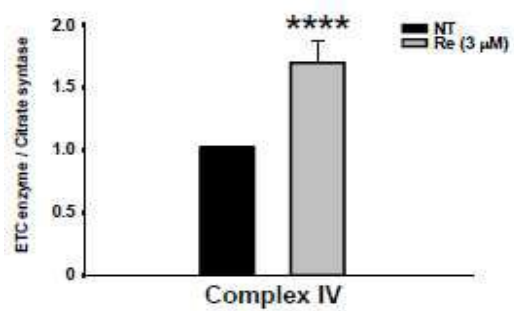
도면5c



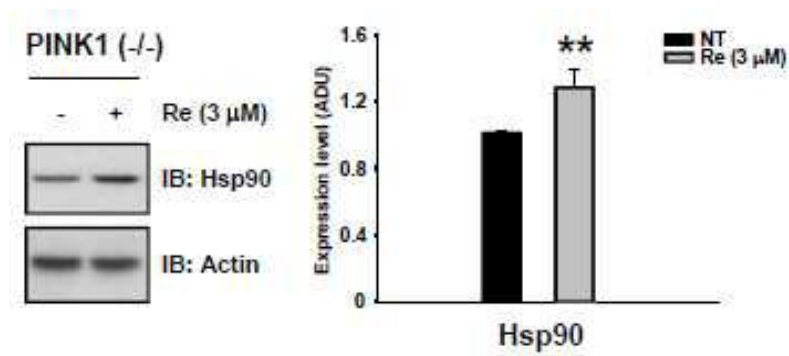
도면6a



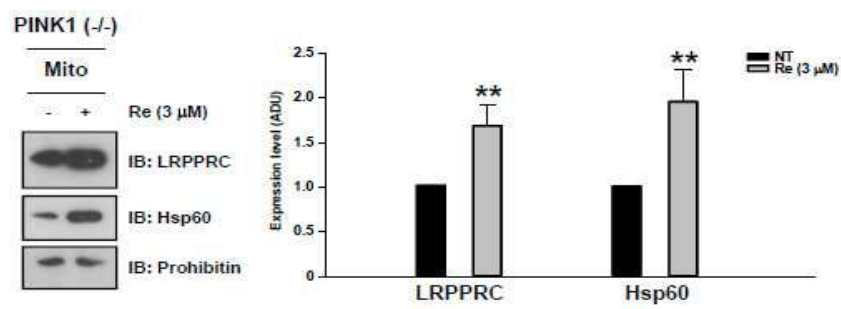
도면6b



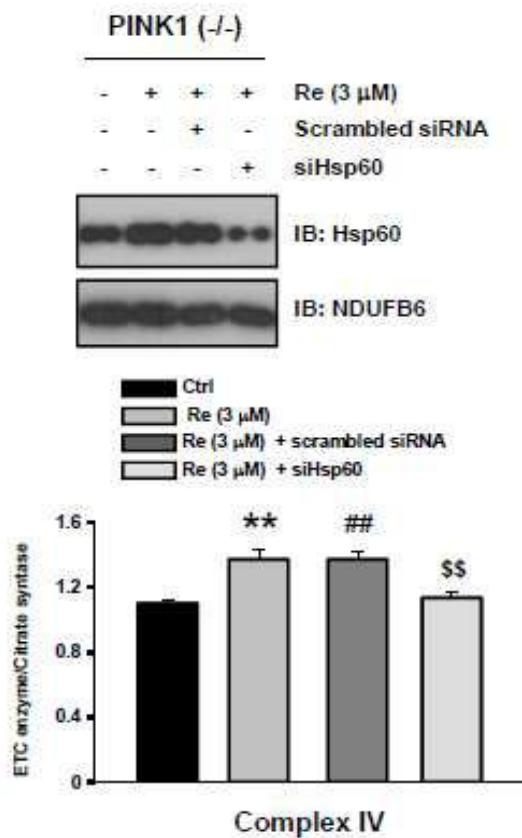
도면6c



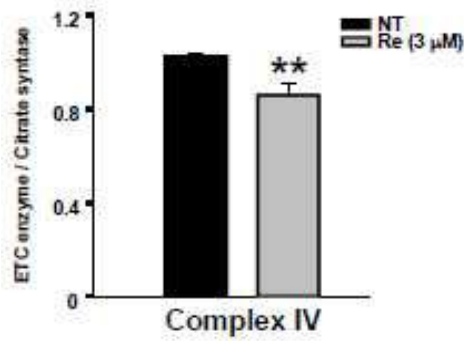
도면6d



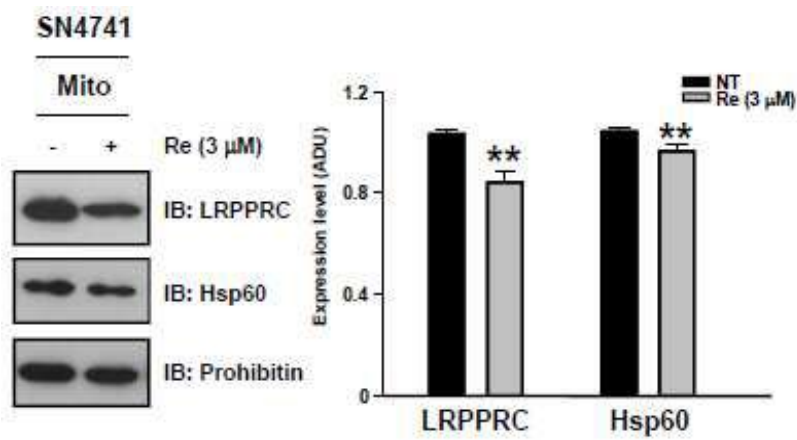
도면6e



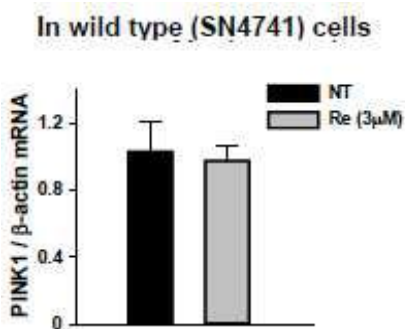
도면6f



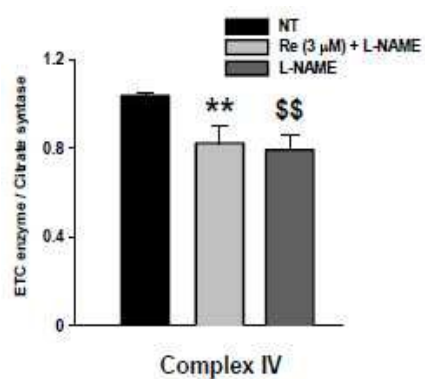
도면6g



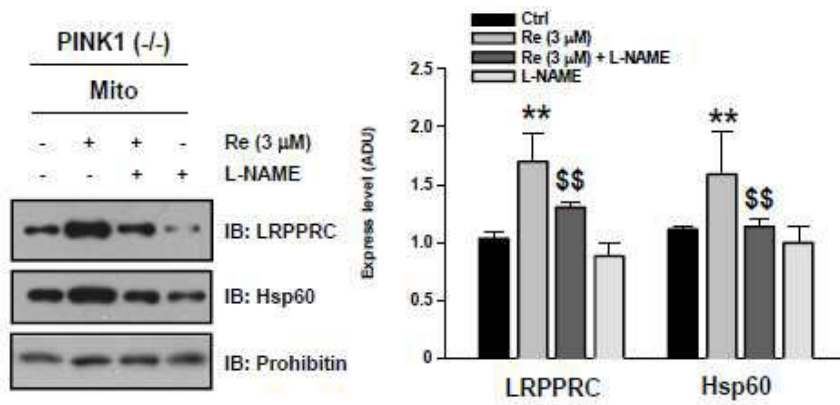
도면6h



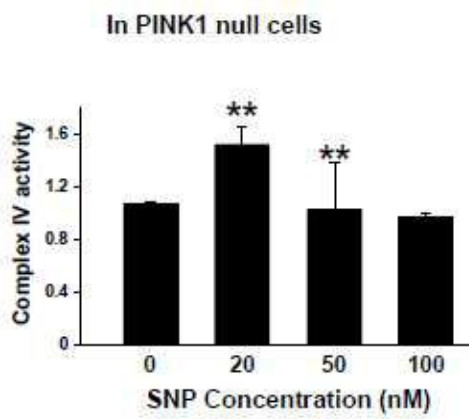
도면7a



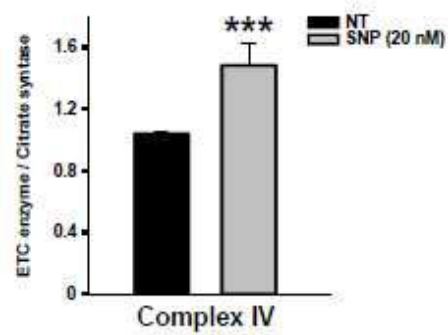
도면7b



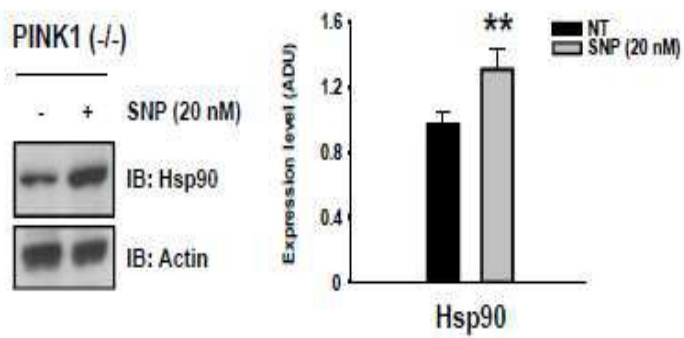
도면8a



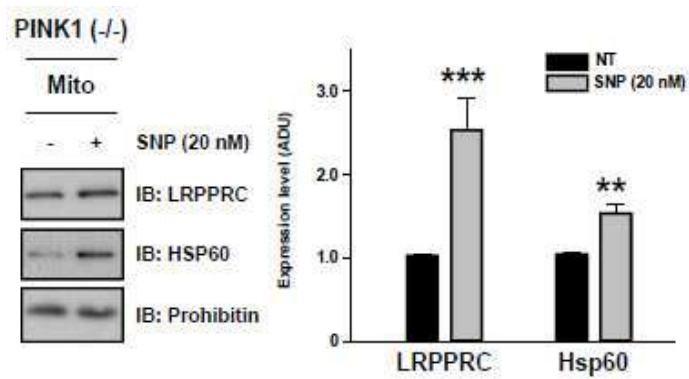
도면8b



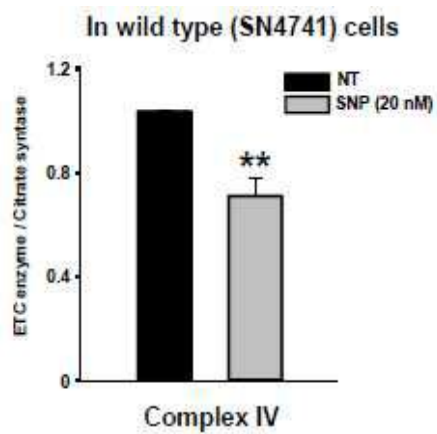
도면8c



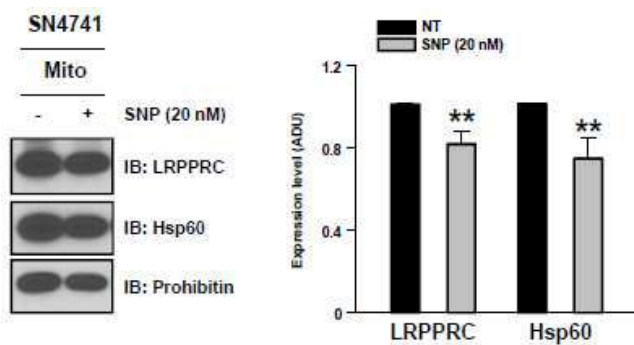
도면8d



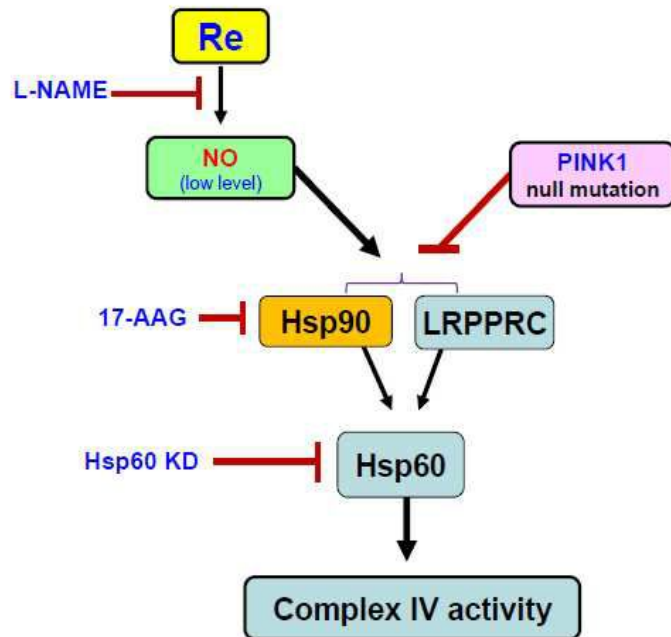
도면8e



도면8f



도면9



서 열 목 록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Screening method for the agents for treating Parkinson's Disease
by monitoring Heat shock protein and LRPPRC signaling
- <130> PA121108
- <160> 7
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Hsp60 shRNA
- <400> 1
- ccgaagacgt tgacggaga
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA_RNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> siHsp60 sense

<220><223> From the 1st to the 19th, sequences are RNA, and the 20th and the
21st 'TT' is DNA
<400> 2
cacuguucug gcacgaucut t 21
<210> 3
<211> 21
<212> DNA_RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> siHsp60 antisense
<220><223> From the 1st to the 19th, sequences are RNA, and the 20th and the
21st 'TT' is DNA
<400> 3
agaucgugcc agaacagugt t 21
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> b-actin forward primer
<400> 4
ttctttgcag ctccttcgtt gccg 24
<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> b-actin reverse primer
<400> 5
tggatggcta cgtacatggc tggg 24
<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PINK1 forward primer
<400> 6
tgatctcaga ctttggtgc t 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PINK1 reverse primer

<400> 7

ccttggccat agaagggatt

20