(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0078982
(43) 공개일자 2012년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/15 (2006.01) *C12N 5/0793* (2010.01)
G01N 33/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0000310
(22) 출원일자 2011년01월03일
심사청구일자 2011년01월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
황선욱
서울특별시 서초구 동광로3길 18, 402동 1006호 (방배동, 방배 아이파크)
방상수
경기도 광명시 하안로 320, 하안주공10단지아파트 1011동 502호 (하안동)
(74) 대리인
한양특허법인

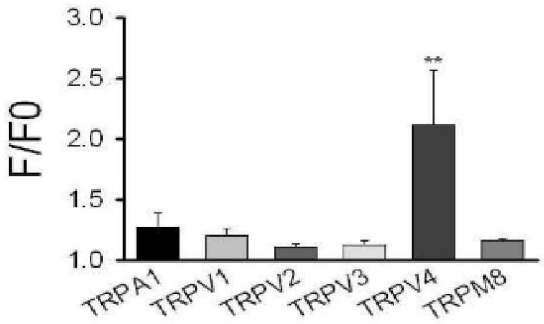
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **DMAPP 또는 그 염을 이용한, TRPV4의 활성제 또는 활성 억제제를 스크리닝 하기 위한 조성물, TRPV4 양성 또는 음성 뉴런의 분리방법, 및 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제를 스크리닝 하기 위한 방법**

(57) 요 약

본 발명은 DMAPP를 포함하는 TRPV4 활성제에 관한 것으로, 구체적으로는 DMAPP를 이용한 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 DMAPP는 TRPV4에만 특이적으로 작용하여, TRPV4를 발현하는 감각 신경세포만을 분리할 수 있게 할 수 있게 함으로 TRPV4 작용 기작 연구 및 TRPV4 작용 진통제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1e



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	E00457
부처명	한국학술진흥재단
연구사업명	신진교수연구지원
연구과제명	비흥분성 세포에서의 thermoTRP 역할규명 및 작용약물 적용을 통한 세포 기능 조절
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.07.01 ~ 2011.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100016133
부처명	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자-기본(유형I)
연구과제명	Mevalonate pathway 신호경로의 TRP연관성 말초통증 조절 기전에 관한 연구
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

DMAPP 또는 그 염을 포함하는 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DMAPP 또는 그 염은 선택적으로 TRPV4의 활성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물.

청구항 3

1) 피검체로부터 분리된 뉴런을 배양한 후 DMAPP 또는 그 염을 처리하는 단계;

2) 단계 1)에서 처리된 뉴런의 TRPV4 활성을 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP가 처리되지 않은 뉴런의 TRPV4 활성 측정치와 비교하여 TRPV4 양성 반응을 나타낸 뉴런을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 양성 뉴런의 분리 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단계 1)의 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 단계 2)의 TRPV4 활성 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 6

1) 피검체로부터 분리된 뉴런을 배양한 후 DMAPP 또는 그 염, 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 분리된 뉴런에 처리하는 단계;

2) 단계 1)에서 처리된 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 각 측정치를 DMAPP 또는 그 염, 및 비특이적 thermoTRP 활성제가 처리되지 않은 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성 측정치와 비교하여 비특이적 thermoTRP 활성제에는 양성 반응을 나타내지만 DMAPP에는 음성 반응을 나타내는 뉴런을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 음성 뉴런의 분리 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단계 1)의 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 단계 1)의 비특이적 thermoTRP 활성제는 2-APB, 캡사이신, 신남알데히드,

프로베네시드, 캄파 및 멘톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 단계 2)의 칼슘 이온 채널 활성 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 분리 방법.

청구항 10

1) TRPV4 양성 뉴런에 DMAPP 또는 그 염, 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하는 단계;

2) TRPV4 음성 뉴런에 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리하는 단계;

3) 단계 1) 및 단계 2)에서 처리된 TRPV4 양성 뉴런 및 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

4) 단계 3)에서 측정된 각각의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 양성 뉴런의 활성 측정치와 비교하여 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리한 TRPV4 양성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성은 억제하되 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리한 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성에는 영향을 주지 않는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 TRPV4 양성 뉴런은 제3항의 방법으로 분리되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 TRPV4 음성 뉴런은 제6항의 방법으로 분리되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 단계 1)의 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 비특이적 thermoTRP 활성제는 2-APB, 캡사이신, 신남알데히드, 프로베네시드, 캄파 및 멘톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 단계 3)의 TRPV4 칼슘 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 16

1) TRPV4를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

2) 상기 형질전환체에 DMAPP 또는 그 염, 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하는 단계;

3) TRPV4 음성 뉴런에 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리하는 단계;

4) 단계 2) 및 단계 3)에서 처리된 형질전환체 및 TRPV4 음성 뉴런의 TRPV4 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

5) 단계 4)의 각각의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 형질전환체의 TRPV4 활성 측정치와 비교하여 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리한 형질전환체의 칼슘 이온 채널 활성을 억제하고 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리한 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성에 영향을 주지 않는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 TRPV4 음성 뉴런은 제6항의 방법으로 분리되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 단계 1)의 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 비특이적 thermoTRP 활성제는 2-APB, 캡사이신, 신남알데히드, 프로베네시드, 캄파 및 멘톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 단계 2)의 칼슘 이온 채널 활성의 측정은 전세포 전압 클램프 기술 및 칼슘 이미지화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 21

1) 피검체에 DMAPP 또는 그 염, 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 투여하는 단계;

2) 단계 1)에서 처리된 피검체의 침해성 행동 유발을 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 피검체의 침해성 행동 유발 측정치와 비교하여 급성 통증 행동을 유발하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 조절제 스크리닝 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 단계 1)의 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 10 mM의 농도로 투여하는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 단계 2)의 침해성 행동 유발의 측정은 염증성 감작 유발에 의한 통증행동 분석에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 염증성 감작은 상기 DMAPP 또는 그 염의 투여 전에 프로스타글란딘 E2, 카라기난 또는 CFA로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질을 투여하여 유발되는 것을 특징으로 하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법.

청구항 25

1) TRPV4 양성 세포에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성제 후보 피검화합물을 각각 처리하는 단계;

2) 단계 1)의 처리된 TRPV4 양성 세포의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

3) 단계 2)의 각각의 측정치를 비교하여 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 양성 세포의 TRPV4 활성 측정치 보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성제 스크리닝 방법.

청구항 26

1) TRPV4을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

2) 상기 형질전환체에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성제 후보 피검화합물을 각각 처리하는 단계;

3) 단계 2)의 처리된 형질전환체의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 형질전환체의 TRPV4 활성 측정치 보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성제 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DMAPP 또는 그 염을 이용한 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물과 TRPV4 양성 또는 음성 뉴런의 분리 방법 및 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 생리학 및 유전학 분야의 연구를 통해 인체에 존재하는 TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4)가 발견되었고, 다양한 조직에서 생존유지에 필수기능을 수행할 것으로 예측되었다. 특히 상기 TRPV4는 외부의 자극을 감지하는 감각신경세포에 발현되어 있으며, 온도 및 통증유발 유해자극을 감지하는 통각수용체군인 thermoTRP군 (temperature-sensitive transient receptor potential ion channels)에 속해 있다.

[0003] TRPV4는 통증 중 특히 기계적 압력자극에 의한 통증을 매개하는 것으로 규명되어 있다. 통각수용체 TRPV4의 기능을 명확히 규명함으로써 인체의 통각 기전을 밝히고, 아울러 TRPV4 조절약물의 개발을 통해 통증 경감의 목표를 달성할 수 있으리라 예측되고 있다. 상기 TRPV4 기능 규명과 조절약물 개발을 위해서는 다른 TRP 수용체에 작용하지 않으면서 선택적으로 TRPV4 활성화만 유발할 수 있는 특이적인 활성제 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0004] 상기 TRPV4의 특이적인 활성제의 개발에 쓰이는 기반 기술을 이해하기 위한 TRPV4 수용체의 특성은 다음과 같

다. TRPV4는 이온채널이며, 이의 활성화를 통하여 양이온이 감각 신경세포 내부로 이동하고, 이에 의해 세포막 전류가 변화한다. 상기 세포막 전류의 변화에 의해 활동전압이 발생하고 이 전압신호가 궁극적으로 뇌로 전달되어 통증을 감지하는 것이다.

[0005] 상기 TRPV4의 활성화를 측정하는 기술로는 첫 번째, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 팻취 클램프 전기생리학 기술과 두 번째, TRPV4가 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포 내 칼슘 농도 변화 측정 기술이 있다. 첫 번째 기술의 경우 측정의 정밀도에 있어 두 번째 기술보다 우위에 있으며, 두 번째 기술의 경우, 첫 번째 기술 보다 고속 측정이 가능하다는 장점이 있어 서로 보완적이다. 또한 상기한 TRPV4 활성화 측정 기술들은 동물의 뉴런 배양기술, 세포주 배양기술, TRPV4 DNA 관리 및 형질감염 기술이 뒷받침되어야 구현할 수 있다. 즉, 각종 TRPV4 특이적 활성제 후보물질들을 TRPV4 과발현 세포에 투여하여, TRPV4 활성화를 측정하고 활성제 여부 및 그 강력성을 측정할 수 있다.

[0006] TRPV4 특이적 활성제는 향후 TRPV4 조절약물개발이라는 취지에서 TRPV4 활성화를 측정하는데 필수적인 기술이다. 이에 본 발명자들은 여러 TRP를 발현하는 세포주를 제작하여 DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate) 및 TRP 활성제로 알려진 화학물질들 처리에 대한 반응을 비교한 결과, 상기 DMAPP가 TRPV4만을 특이적으로 활성화하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 TRPV4의 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 TRPV4 양성 및 음성 뉴런을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 TRPV4에 특이적으로 활성을 나타내는 활성제를 이용하여 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DMAPP 또는 그 염을 포함하는 TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0011]

[0012] 또한, 본 발명은

[0013] 1) 피검체로부터 분리된 뉴런을 배양한 후 DMAPP 또는 그 염을 처리하는 단계;

[0014] 2) 단계 1)에서 처리된 뉴런의 TRPV4 활성을 측정하는 단계; 및,

[0015] 3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염이 처리되지 않은 뉴런의 TRPV4 활성 측정치와 비교하여 TRPV4 양성 반응을 나타낸 뉴런을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 양성 뉴런의 분리 방법을 제공한다.

[0016]

[0017] 또한, 본 발명은

[0018] 1) 피검체로부터 분리된 뉴런을 배양한 후 DMAPP 또는 그 염 및 비특이적 thermoTRPV 활성제를 순차적으로 또는 역순으로 처리하는 단계;

[0019] 2) 단계 1)에서 처리된 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0020] 3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염 및 비특이적 thermoTRP 활성제가 처리되지 않은 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성 측정치와 비교하여 비특이적 thermoTRP 활성제에는 양성 반응을 나타내지만 DMAPP 또는 그 염에는 음성 반응을 나타내는 뉴런을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 음성 뉴런의 분리 방법을 제공한다.

[0021]

[0022] 또한, 본 발명은

[0023] 1) TRPV4 양성 뉴런에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하는 단계;

[0024] 2) TRPV4 음성 뉴런에 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리하는 단계;

[0025] 3) 단계 1) 및 단계 2)에서 처리된 TRPV4 양성 뉴런 및 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0026] 4) 단계 3)에서 측정된 각각의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 양성 뉴런의 활성 측정치와 비교하여 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리한 TRPV4 양성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 억제하고 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리한 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성에 영향을 주지 않는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0027]

[0028] 또한, 본 발명은

[0029] 1) TRPV4를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0030] 2) 상기 형질전환체에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하는 단계;

[0031] 3) TRPV4 음성 뉴런에 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리하는 단계;

[0032] 4) 단계 2) 및 단계 3)에서 처리된 형질전환체 및 TRPV4 음성 뉴런의 TRPV4 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0033] 5) 단계 4)의 각각의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 형질전환체의 TRPV4 활성 측정치와 비교하여 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리한 형질전환체의 칼슘 이온 채널 활성을 억제하고 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리한 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성에 영향을 주지 않는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0034]

[0035] 아울러, 본 발명은

[0036] 1) 피검체에 DMAPP 또는 그 염과 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 투여하는 단계;

[0037] 2) 단계 1)에서 처리된 피검체의 침해성 행동 유발을 측정하는 단계; 및,

[0038] 3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 피검체의 침해성 행동 유발 측정치와 비교하여 후보물질의 침해성 행동을 유발하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0039]

[0040] 또한, 본 발명은

[0041] 1) TRPV4 양성 세포에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성제 후보 피검화합물을 각각 처리하는 단계;

[0042] 2) 단계 1)의 처리된 TRPV4 양성 세포의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0043] 3) 단계 2)의 각 측정치를 비교하여 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 양성 세포의 TRPV4 활성 측정치 보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0044]

[0045] 또한 본 발명은

[0046] 1) TRPV4을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0047] 2) 상기 형질전환체에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성제 후보 피검화합물을 처리하는 단계;

[0048] 3) 단계 2)의 처리된 형질전환체의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0049] 4) 단계 3)의 각각의 측정치를 비교하여 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 형질전환체의 TRPV4 활성 측정치보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0050] 본 발명의 DMAPP 또는 그 염은 통증 전달에 중요한 수용체인 여러 TRP 중 TRPV4에만 특이적으로 작용하여, 1. TRPV4에 대한 활성제 또는 활성 억제제를 스크리닝할 수 있도록 하며, 2. TRPV4를 발현하는 감각 신경세포를 분리할 수 있도록 하여 TRPV4 작용 기작 연구 및 TRPV4 작용 진통제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 DMAPP의 TRPV4 특이적 활성을 나타낸 도이다.

도 1a는 TRPV4-형질전환 HEK293T 세포를 이용한 Fluo-3 칼슘 이미지화 실험에서 10 μM DMAPP 처리에 의해 활성화된 TRPV4에 의한 세포 내 칼슘 유입 증가 (n=5)를 나타낸 도이다.

도 1b는 10 μM DMAPP, 10 μM 4α-PDD (4a-Phorbol 12-13-didecanoate) 처리에 반응하는 TRPV4의 전류-전압 관련성을 나타낸 도이다.

도 1c는 10 μM DMAPP 및 10 μM DMAPP + 30 μM RN-1734 처리에 반응하는 TRPV4의 전류-전압 관련성을 나타낸 도이다.

도 1d는 Fluo-3 칼슘 이미지화 실험에 의해 결정된 DMAPP에 대한 반응에 의한 TRPV4 활성의 양적 관계 (Dose-response curve)를 나타낸 도이다. 힐 플랏 (Hill-plot) 방법으로 구한 DMAPP의 EC50은 2.5 μM 이었다.

도 1e는 DMAPP 처리에 대한 여러 TRP 형질전환 세포주들의 반응을 나타낸 도이다. TRPV4 세포주에서만 칼슘 유입 증가를 나타내었다.

도 2는 TRPV4 활성제 처리에 의한 배양된 마우스 척수후근 신경절 뉴런의 반응을 나타낸 도이다.

도 2a는 뉴런의 약리학적 반응의 대표도로서 Fura-2 칼슘 이미지화 실험에서 10 μM DMAPP, 10 μM 4α-PDD (4a-Phorbol 12-13-didecanoate), 그리고 TRPV4를 활성화하는 자극인 저삼투환경 (219 mOsm/kg: hypo로 표기)의 처리에 의해 뉴런의 칼슘유입이 나타났음을 확인한 도이다. 뉴런으로서의 전기적 성질을 유지하는지 확인하기 위하여 KCl 탈분극을 실험 중간에 실시하였으며, 이에 의해서도 칼슘유입 반응이 나타나는 것으로 뉴런이 정상적인 전기적 성질을 유지하고 있음을 확인하였다. N은 뉴런의 개수를 의미한다.

도 2b는 10 μM DMAPP, 10 μM 또는 4α-PDD (4a-Phorbol 12-13-didecanoate) 처리에 반응하는 척수후근 신경절 뉴런의 전류-전압 관련성을 나타낸 도이다.

도 3은 100 ng 프로스타글란딘 E2를 전처리한 염증조건에서 DMAPP가 통증을 유발하는 것을 나타낸 도이다.

도 3a는 통증행동 (flinch) 횟수의 증가가 3 mM DMAPP 투여에 의하여 급성적으로 발생하였고, 일반적인 TRP 통로 활성 억제제인 루테늄 레드 (RR)의 동시투여 시에는 이러한 반응이 억제되는 것을 나타낸 도이다.

도 3b는 도3a의 통증행동 횟수를 10분간 종합하여 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0053]

[0054] 본 발명은 DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate) 및 그 염을 포함하는 TRPV4 활성제 또는 활성 억제제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0055] 상기 DMAPP 또는 그 염은 TRPV4의 활성을 촉진하는 역할을 수행한다. 본 발명의 한 구현예에서는 상기 DMAPP가 TRPV4 과발현 세포에서 그 활성을 증가시키는 것을 칼슘 이미지화 실험을 통해 확인하였다 (도 1a 참조). 또한 상기 DMAPP 및 TRPV4 활성제로 알려진 4α-PDD (4α-Phorbol 12-13-didecanoate)가 TRPV4에 미치는 영향을 팻취클램프 기법의 일종인 전세포 전압 클램프 실험으로 확인한 결과, 상기 두 물질이 TRPV4의 활성을 촉

진하는 것으로 나타났다 (도 1c 참조). 즉, 4α-PDD에 반응한 모든 세포들은 DMAPP에 대해서도 반응하였다. 또한, DMAPP 및 4α-PDD에 반응한 상기 전류들은 TRPV4-매개 전류의 전형적인 특성을 나타내는 외향 정류 현상 (outward rectifying)을 나타냈다 (도 1b 참조).

[0056] 또한 상기 DMAPP 또는 그 염은 TRPV4를 특이적으로 활성화하는 역할을 수행한다. 본 발명의 한 구현예에서 척수후근 신경절 감각 뉴런에서 발현되는 것으로 알려진 TRP 중에서 TRPA1 (Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1), TRPV1, TRPV2, TRPV3 및 TRPM8 (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8)을 발현하는 형질전환 세포주에 DMAPP를 가하여 활성을 측정한 결과, 활성이 나타나지 않았다 (도 1e 참조). 즉, DMAPP는 TRPV4에 대해서만 활성을 나타낸다.

[0057] 또, 본 발명의 구현예에서 척수후근 신경절 뉴런에서 발생한 DMAPP-유발 칼슘 유입은 4α-PDD에 의해 칼슘유입이 유발되는 뉴런에서 나타났고 (도 2a 참조), 4α-PDD-감수성 척수후근 신경절 뉴런에서의 DMAPP-유발 전류가 TRPV4-매개 전류의 전형적인 특성을 나타내는 외향 정류현상을 나타내었다 (도 2b 참조).

[0058] 또한, 상기 DMAPP를 동물에 투여하여 통증행동반응 강도를 측정함으로써 상기 TRPV4 활성이 실제 행동반응으로 외삽 되는지를 확인할 수 있고, 또한 이를 통해 여러 통증 중 TRPV4의 관련 통증을 판별할 수 있다. 즉, DMAPP는 TRPV4 활성제 스크리닝시 TRPV4 활성 후보물질의 표준 물질로 사용될 수 있고, DMAPP에 의해 활성화되는 TRPV4 활성 억제제 개발에도 유용하게 사용될 수 있다. 아울러, 상기 DMAPP는 이의 화학적 가공을 통해 더욱 높은 강도의 활성제 또는 활성 억제제로 변형하는데 응용할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 DMAPP는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다. 이때 허용가능한 염으로는 유리산 (free acid)에 의해 형성된 부가염이 유용하다. 적합한 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 구연산 (citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (tartariac acid), 말레인산, 푸마르산 (fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060]

[0061] 또한, 본 발명은

[0062] 1) 피검체로부터 분리된 뉴런을 배양한 후 DMAPP 또는 그 염을 처리하는 단계;

[0063] 2) 단계 1)에서 처리된 뉴런의 TRPV4 활성을 측정하는 단계; 및,

[0064] 3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염이 처리되지 않은 뉴런의 TRPV4 활성 측정치와 비교하여 TRPV4 양성 반응을 나타낸 뉴런을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 양성 뉴런의 분리 방법을 제공한다.

[0065] 상기 피검체는 척추동물이고, 바람직하게는 인간을 제외한 척추동물이며 더 바람직하게는 인간을 제외한 포유동물이다. 구체적으로는 쥐, 토끼, 기니피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0066] 상기 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 1 내지 10 μM의 농도이다. 본 발명의 구현예에서 DMAPP의 TRPV4에 대한 EC50(effectiveconcentration50%:50%효과 농도)은 2.5 μM이었고, 최대 유효량은 대략 100 μM이었다. 이것은 DMAPP가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPV4에 활성 효과를 나타내는 것을 시사한다 (도 1d 참조).

[0067] 또한, 단계 2)의 TRPV4 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 세포막 전류를 증폭하여 그 변화를 측정할 수 있는 전세포 전압 클램프 기술 및 TRPV4가 칼슘 이온 등의 양이온을 이동시키는 데에서 착안한 세포 내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0068] DMAPP-유발 칼슘 유입 결과 및 외향 정류현상을 분석함으로써 TRPV4 활성 억제제 및 활성제의 선별이 가능할 뿐만 아니라, 신규 TRPV4 활성제인 DMAPP 또는 그 염을 사용하여 TRPV4 양성 뉴런을 약리학적으로 분리할 수 있다.

[0069] 본 발명의 한 구현예에서, DMAPP는 TRPV4에만 특이적인 활성을 나타내므로, 감각 신경세포 중에 TRPV4 양성 세포만을 분리하는데 유용하게 사용될 수 있으므로 상기 감각 신경세포의 통각 감지 성격 (예: 열, 화학적 및 기계적 자극에 대한 감수성)의 파악 및 특히 취약한 질환 (예: 염증성, 신경병증성 및 약물부작용의 통증)의

판별이 가능하다.

[0070]

[0071] 또한, 본 발명은

[0072] 1) 피검체로부터 분리된 뉴런을 배양한 후 DMAPP 또는 그 염 또는 비특이적 thermoTRP 활성제를 순차적으로 또는 역순으로 처리하는 단계;

[0073] 2) 단계 1)에서 처리된 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0074] 3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염 및 비특이적 thermoTRP 활성제가 처리되지 않은 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성 측정치와 비교하여 비특이적 thermoTRP 활성제에는 양성 반응을 나타내지만 DMAPP 또는 그 염에는 음성 반응을 뉴런을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 음성 뉴런의 분리 방법을 제공한다.

[0075] 상기 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 1 내지 10 μM의 농도이다.

[0076] 상기 단계 1)의 비특이적 thermoTRP 활성제는 2-APB, 캡사이신, 신남알데히드, 프로베네시드, 캄파 및 멘톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 또한, 단계 2)의 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 전세포 전압 클램프 기술 및 세포 내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0078]

[0079] 또한, 본 발명은

[0080] 1) TRPV4 양성 뉴런에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하는 단계;

[0081] 2) TRPV4 음성 뉴런에 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리하는 단계;

[0082] 3) 단계 1) 및 단계 2)에서 처리된 TRPV4 양성 뉴런 및 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0083] 4) 단계 3)에서 측정된 각각의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 양성 뉴런의 활성 측정치와 비교하여 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리한 TRPV4 양성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성을 억제하고 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리한 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성에 영향을 주지 않는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0084] 상기 TRPV4 양성 뉴런 및 TRPV4 음성 뉴런은 상기 기재된 양성 및 음성 뉴런의 분리 방법에 의해 분리될 수 있다.

[0085] 상기 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 1 내지 10 μM의 농도이다.

[0086] 상기 단계 2)의 비특이적 thermoTRP 활성제는 2-APB, 캡사이신, 신남알데히드, 프로베네시드, 캄파 및 멘톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0087] 또한, 단계 3)의 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 전세포 전압 클램프 기술 및 세포 내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0088] 단계 1)의 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0089]

[0090] 또한, 본 발명은

[0091] 1) TRPV4를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0092] 2) 상기 형질전환체에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리하는 단계;

[0093] 3) TRPV4 음성 뉴런에 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리하는 단계;

[0094] 4) 단계 2) 및 단계 3)에서 처리된 형질전환체 및 TRPV4 음성 뉴런의 TRPV4 칼슘 이온 채널 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0095] 5) 단계 4)의 각각의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 형질전환체의 TRPV4 활성 측정치와 비교하여 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 처리한 형질전환체의 칼슘 이온 채널 활성을 억제하고 상기 TRPV4 활성 억제제 후보물질 및 비특이적 thermoTRP 활성제를 처리한 TRPV4 음성 뉴런의 칼슘 이온 채널 활성에 영향을 주지 않는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0096] 상기 단계 1)의 숙주세포는 이에 제한되는 것은 아니나, HEK 세포주, CHO 세포주, HeLa 세포주, RBL-2H3 세포주 등의 칼슘 채널 활성 연구 및 고효율 억제제 검색에 이용할 수 있는 세포주가 바람직하다.

[0097] 단계 2)의 DMAPP 또는 그 염은 TRPV4만을 특이적으로 활성화하는 작용을 수행한다. 본 발명의 구현예에서 감각 뉴런에서 발현되는 것으로 알려진 thermoTRP 중에서 TRPV4를 발현하는 형질전환 세포주에서만 DMAPP에 의한 활성을 나타냈다 (도 1e 참조).

[0098] 상기 TRPV4 음성 뉴런은 상기 기재된 음성 뉴런의 분리 방법에 의해 분리될 수 있다.

[0099] 상기 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 100 μM의 농도로 처리하는 것이 바람직하다.

[0100] 상기 단계 3)의 비특이적 thermoTRP 활성제는 2-APB, 캡사이신, 신남알데히드, 프로베네시드, 캄파 및 멘톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0101] 또한, 단계 4)의 TRPV4 칼슘 이온 채널 활성의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 전세포 전압 클램프 기술 및 세포 내 칼슘 농도 변화 측정 기술인 칼슘 이미지화에 의해 수행될 수 있다.

[0102]

[0103] 아울러, 본 발명은

[0104] 1) 피검체에 DMAPP 또는 그 염과 TRPV4 활성 억제제 후보물질을 투여하는 단계;

[0105] 2) 단계 1)에서 처리된 피검체의 침해성 행동 유발을 측정하는 단계; 및,

[0106] 3) 단계 2)의 측정치를 DMAPP 또는 그 염만 처리된 피검체의 침해성 행동 유발 측정치와 비교하여 급성 통증 행동을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0107] 상기 피검체는 척추동물이고, 바람직하게는 인간을 제외한 척추동물이며 더 바람직하게는 인간을 제외한 포유동물이다. 구체적으로는 쥐, 토끼, 기니피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0108] 단계 1)의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 비경구투여 방법이 바람직하고, 피내투여가 가장 바람직하다.

[0109] 단계 2)의 DMAPP 또는 그 염은 1 내지 10 mM의 농도로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0110] 단계 3)의 침해성 행동 유발의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 염증성 감작 유발에 의한 통증행동 (예를 들면 뒷발 핥기/튀기기) 분석에 의해 수행될 수 있다.

[0111] 상기 염증성 감작은 상기 DMAPP 또는 그 염의 주사 전에 프로스타글란딘 E2 (prostaglandin E2), 카라기난 (carrageenan) 또는 CFA (complete Freund's adjuvant)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 물질을 투여하여 유발할 수 있다.

[0112] TRPV4는 감각 신경세포로 구성되는 감각신경섬유 중 가는 유수성 섬유 (thinly myelinated fiber) 및 무수성 섬유 (unmyelinated fiber)에서 발현되는 통각 기관 (pain sensor)의 기능을 수행한다. 본 발명의 구현예에서는 상기 DMAPP 처리에 의해 침해성 (nocifensive) 행동을 실제로 유발할 수 있는지를 관찰하였는데, 뒷발에 프로스타글란딘 E2에 의해 염증을 일으킨 쥐에서 DMAPP 투여한 결과, 통증행동 (flinch) 횟수의 현저한 증가를 나타내었고, 이에 TRP에 대한 억제제인 루테늄 레드를 투여한 경우 통증행동의 횟수가 감소되는 것을 확인하였다 (도 3a 내지 3b 참조). 이를 통하여 DMAPP 또는 그 염의 처리를 통해 TRPV4에 관계되는 통증 억제 물

질을 스크리닝 할 수 있음을 알 수 있다.

[0113]

[0114] 또한, 본 발명은

[0115] 1) TRPV4 양성 세포에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성제 후보 피검화합물을 각각 처리하는 단계;

[0116] 2) 단계 1)의 처리된 TRPV4 양성 세포의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0117] 3) 단계 2)의 각 측정치를 비교하여 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 양성 세포의 TRPV4 활성 측정치 보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0118]

[0119]

[0120] 아울러 본 발명은,

[0121] 1) TRPV4을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계;

[0122] 2) 상기 형질전환체에 DMAPP 또는 그 염 및 TRPV4 활성제 후보 피검화합물을 각각 처리하는 단계;

[0123] 3) 단계 2)의 처리된 형질전환체의 TRPV4 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0124] 4) 단계 3)의 각 측정치를 비교하여 DMAPP 또는 그 염만 처리된 TRPV4 형질전환체의 TRPV4 활성 측정치 보다 활성값이 높은 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는 TRPV4 활성제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0125]

[0126] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명한다.

[0127]

[0128] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0129]

[0130] <실시예 1> TRPV 형질전환 세포주 시료

[0131] HEK293T 세포주 (ATCC CRL-11268)를 rTRPV1 (서열번호 1), rTRPV2 (서열번호 2), mTRPV3 (서열번호 3), rTRPV4 (서열번호 4), mTRPM8 (서열번호 5) 및 mTRPA1 (서열번호 6) 플라스미드 DNA를 이용하여 일시적(transiently) 형질전환하였다.

[0132] 구체적으로, HEK293T 세포주를 각각 35 디쉬 당 3 ㎍의 rTRPV1, rTRPV2, mTRPV3, rTRPV4, mTRPM8 및 mTRPA1 플라스미드 DNA 및 600 ng/웰의 pCDNA3 (Invitrogen Corp., USA; 녹색 형광 단백질 cDNA 포함)로 Fugene6 (Roche DiagnosticsCorp., 미국)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질전환하였다. 상기 형질전환된 세포를 24 시간 동안 CO2인큐베이터에서 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양한 후, 폴리-L-라이신 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 10 내지 24 시간 동안 추가 배양하였다.

[0133]

[0134] <실시예 2> 척수후근 신경절 뉴런 시료

[0135] 차가운 PBS (Phosphate-buffered saline)에서 성체 ICR계 마우스 (한림실험동물연구소, 한국)의 척수후근 신경절 (Dorsal root ganglia)을 분리하여 세절한 후, 1.5 mg/㎖ 콜라게나아제/디스파아제 (collagenase/dispase; Roche Diagnostics Corp., USA)를 37℃에서 45분간 처리하였고, 0.25% 트립신 (trypsin; Invitrogen Corp., USA)을 15분 동안 처리하였다. 상기 방법으로 제조한 척수후근 신경절 뉴런을 10% FBS (Fetal bovine/dirum), 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 5 ng/㎖ 2.5S NGF (Nerve growth factor, Invitrogen Corp., USA)를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 폴리-L-라이신 코팅된 유리 커버 슬립에 도말한 후, 48 내지 72시간 동안 CO2인큐베이터에서 배양하였다.

[0136]

[0137] 이하, 모든 실시예의 실험 결과는 양측 꼬리(two-tailed), 쌍을 이루지 않은 (unpaired) 스튜던트 검정

(Student's t-test)을 이용하여 통계적으로 분석하였고, 평균±S.E.M.의 형태로 나타내었다. 또한, **P < 0.01 및 *P < 0.05이었다.

[0138]

[0139] <실험예 1> TRPV4의 DMAPP (Dimethylallyl pyrophosphate)와 4α-PDD (4a-Phorbol 12-13-didecanoate)에 대한 반응 조사

[0140] <1-1> DMAPP와 4α-PDD 처리

[0141] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV4 형질전환 세포주에 10 μM DMAPP (Dimethylallyl pyrophosphate; Sigma-Aldrich, USA)와 10 μM 4α-PDD (4a-Phorbol 12-13-didecanoate; Sigma-Aldrich, USA)를 처리하였다. 상기 화학물질들의 저장 용액은 물, DMSO 또는 에탄올을 이용하여 제조하였고, 사용하기 직전에 검사용액으로 희석하여 사용하였다.

[0142]

[0143] <1-2> 전세포 전압 클램프 실험

[0144] 상기 실험예 1-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 팻취클램프 기법의 일종인 전세포 전압 클램프 (Whole-cell voltage clamp) 기록을 Bandell M 외 (Neuron41:849-857,2004)의 방법에 따라 수행하였다.

[0145] 구체적으로는, 세포 외 용액 (extracellular solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl2,1mMMgCl2,10mMHEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)과 피펫 용액 (pipette solution; 140 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2.0 mM MgATP, 0.2 mM NaGTP를 포함하고 CsOH를 이용하여 pH 7.2로 적정)을 사용하였다. 또한 250 ms 동안 -60 mV, -80 mV에서 + 80 mV로 325초 동안 전압경사, 250 ms 동안 -60 mV로 되돌리는 조건을 지속적으로 반복하여 인터스윕 (intersweep) 구간이 없이 실험을 수행하였다. 상기 실험은 5회 반복수행하였다.

[0146] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이 DMAPP를 처리하자마자 전류의 현저한 증가가 생성되었고, 상기 세포는 또한 TRPV4 활성제로 알려진 4α-PDD 처리에 의해서도 이에 버금가는 반응을 나타내었다. 즉, DMAPP에 반응한 모든 세포들은 4α-PDD에 대해서도 반응하였다. DMAPP 및 4α-PDD에 반응한 상기 전류들은 TRPV4-관련 전류의 전형적인 특성을 나타내는 외향 정류현상 (outward rectifying)을 나타내었다. 또한, 도 1c에 나타난 바와 같이 DMAPP에 의한 전류의 증가는 TRPV4 억제제로 알려진 RN-1734의 동시처리에 의해서 감소되었다. 즉, DMAPP를 이용하여 TRPV4 억제제를 탐색할 수 있음을 확인하는 결과이다.

[0147]

[0148] <실험예 2> TRPV4의 DMAPP 특이적 및 농도 의존적 반응 조사

[0149] <2-1> DMAPP 처리

[0150] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV4 형질전환 세포주에 10 μM DMAPP를 처리하였다.

[0151]

[0152] <2-2> DMAPP의 농도별 처리

[0153] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPV4 형질전환 세포주에 0.01 에서 30 μM까지 농도를 점진적으로 증가시키며 DMAPP를 처리하였다.

[0154]

[0155] <2-3> 칼슘 이미지화를 이용한 세포 내 칼슘수준변화 측정

[0156] 상기 실험예 2-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0157] 구체적으로, 0.02% 풀루로닉산 (pluronic acid; Invitrogen Corp., USA)을 포함하는 배스 용액 (bath solution, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl2,1mMMgCl2,10mMHEPES를 포함하고 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정)에서 상기 실험예 3-1의 방법으로 처리된 형질전환 세포에 Fluo-3AM 또는 Fura-2AM (5 μM; Sigma aldrich, USA)을 37℃에서 1시간 동안 주입하였다. 이후, LSM5 Pascal 공초점 현미경 (Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 칼슘 이미지화 (Calcium imaging)를 수행하였고, Carl Zeiss ratio tool software (Carl Zeiss, 독일)를 이용하여 저속촬영이미지 (time-lapse image; 488 여기/514 방출)를 매 3초마다 저장하였다. 힐 플랏

(Hill plot; Kd 값: 2.5 μM)에 의해 칼슘 유입 반응의 평균 수치곡선을 작성하였다.

[0158] 그 결과, Fluo-3 칼슘 이미지화 실험에서도 도 1b에서와 마찬가지로 TRPV4-특이 반응 결과를 나타내었다 (도 1a 참조).

[0159] 또한, 도 1d에서 나타난 바와 같이 DMAPP의 TRPV4에 대한 EC50(effectiveconcentration50%:50%효과 농도)은 2.5 μM이었고 나타난 최대 유효량은 대략 100 μM이다. 이것은 DMAPP가 마이크로몰라 농도의 범위에서 TRPV4에 활성 효과를 나타내는 것을 시사한다.

[0160]

[0161] <실험예 3> TRP 형질전환 세포주별 DMAPP에 대한 반응 조사

[0162] 실시예 1의 방법으로 제조한 TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 및 TRPM8 형질전환 세포주 및 형질전환되지 않은 HEK 세포주 (대조군)에 10 μM DMAPP를 처리하였다. 이후 실험예 2-3의 방법과 동일한 방법으로 상기 방법으로 처리된 형질전환 세포에 칼슘 이미지화를 수행하였다.

[0163] 그 결과, 도 1e에서 나타낸 바와 같이 척수후근 신경절 뉴런에서 발현되는 것으로 알려진 상기 5개의 TRP 중에서 TRPV4만이 DMAPP에 의해 활성을 나타내었다.

[0164]

[0165] <실험예 4> 척수후근 신경절 뉴런에서 DMAPP에 대한 반응 조사

[0166] 실시예 2의 방법으로 처리된 척수후근 신경절 뉴런에 DMAPP 10 μM 및 알려진 TRPV4 특이적 활성제 4α-PDD 10 μM을 처리한 후, 실험예 2-3과 동일한 방법으로 칼슘 이미지화를 수행하거나 실시예 1-2의 방법에 따라 전세포 전압 클램프 실험을 수행하였다.

[0167] 그 결과, 도 2a에서 나타난 바와 같이 DMAPP와 4α-PDD에 반응하여 칼슘 유입되는 뉴런 그룹을 발견하였다. 즉, 4α-PDD 감수성 뉴런은 DMAPP에 반응하였다. 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이 4α-PDD-감수성 척수후근 신경절 뉴런에서의 DMAPP-유발 전류가 TRPV4-매개 전류의 전형적인 특성을 나타내는 외향 정류현상을 나타내었다.

[0168]

[0169] <실험예 5> 급성 통증행동 (flinch)

[0170] <5-1> 염증성 감작 유발

[0171] DMAPP에 의한 염증성 감작 (inflammatory sensitization) 반응을 관찰하기 위하여, 오른쪽 뒷발의 발바닥에 상기 DMAPP 주사 30분 전에 10 ㎕의 프로스타글란딘 E2 (100 ng; Sigma aldrich, USA)를 주사하였다. 또한, 실험에 앞서 쥐를 1 시간 동안 실험환경에 적응하도록 순화시켰으며, 부형액 (3% DMSO 및 0.5% Tween 80을 포함하는 식염수) 및 DMAPP (3 mM)를 포함하는 부형액 각각 10 ㎕를 쥐의 오른쪽 뒷발에 피내주사하였다.

[0172]

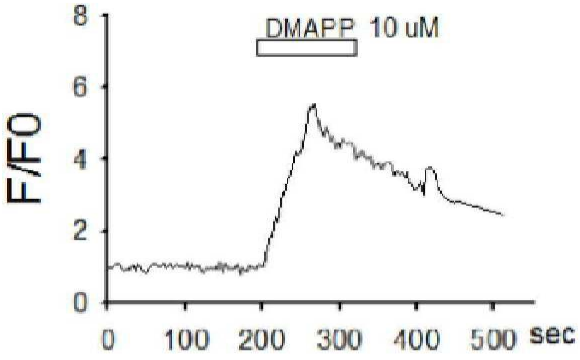
[0173] <5-2> 급성 통증행동 분석

[0174] 뒷발 급성 통증행동 (hindpaw flinching behavior)을 보인 횟수를 Bang S 외 (Br J Pharmacol. 2010, 161(3): 707-20)의 방법에 따라 10분 동안 측정하였다. 통계적 자료는 양측 꼬리 (two-tailed), 쌍을 이루지 않은 (unpaired) 스튜던트 검정 (Student's t-test)을 이용하여 분석하였고, 평균±S.E.M.의 형태로 나타내었다 (***p<0.001,**p<0.01,*p<0.05 and ND, p>0.05).

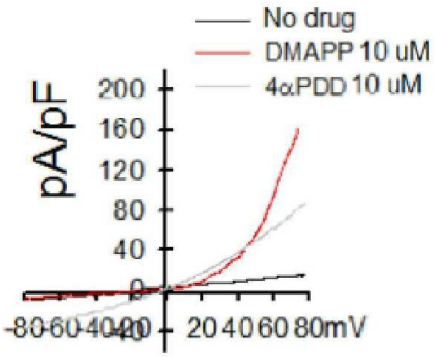
[0175] 그 결과, DMAPP를 뒷발의 피내에 주사한 결과, 정상 쥐에서는 행동의 현저한 변화가 발견되지 않았으나, 프로스타글란딘 E2로 30분간 국부적으로 염증을 일으킨 쥐에서는 시간이 지남에 따라 행동에 변화가 나타났고 (도 3a, 도 3b), 부형액만 투여하거나 루테늄 레드만 투여한 쥐에서는 효과가 나타나지 않았다. 즉, 상기 결과들은 DMAPP가 염증성 조건하에서 통증을 유도할 수 있음을 시사한다. DMAPP와 루테늄레드를 동시 투여한 경우 통증 행동이 유의성 있게 감소하였으며, 이는 TRPV4 차단 효과가 있는 물질을 DMAPP에 의해 유발된 행동반응 양상을 통하여 탐색해낼 수 있음을 증명한다.

도면

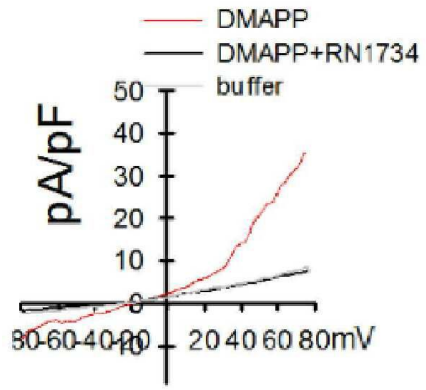
도면1a



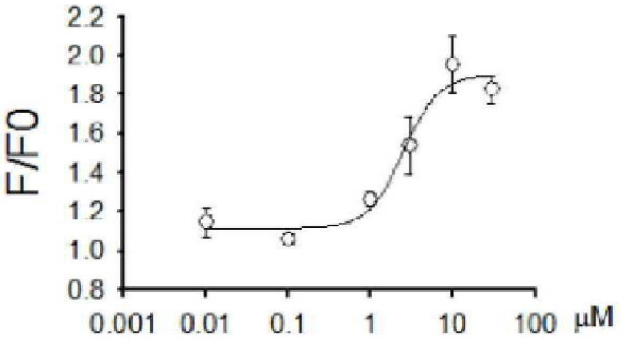
도면1b



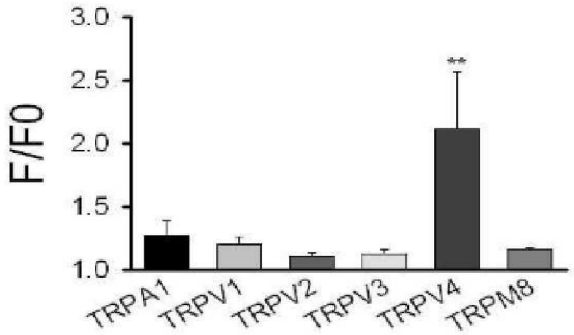
도면1c



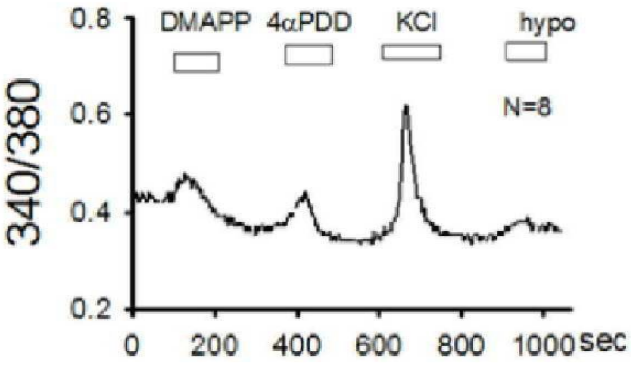
도면1d



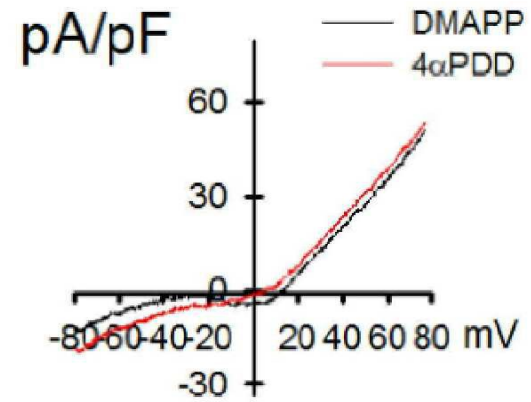
도면1e



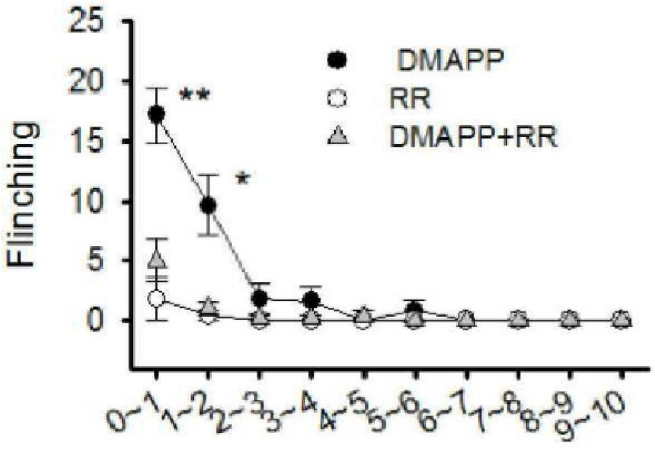
도면2a



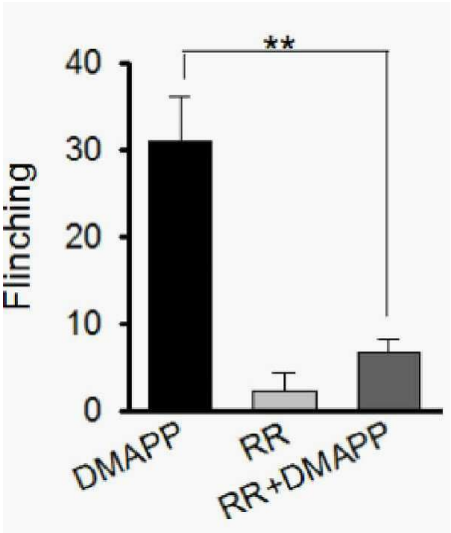
도면2b



도면3a



도면3b



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Composition for screening of TRPV4 activators or inhibitors,

method for isolating TRPV4 positive or negative neurons, and

method for screening TRPV4 activators or inhibitors, using DMAPP or its salt

<130> HY101453

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2847

<212> DNA

<213> rTRPV1

<400> 1

cagctccaag gcacttgctc catttggggt gtgcctgcac ctagctggtt gcaaattggg 60

ccacagagga tctggaaagg atggaacaac gggctagctt agactcagag gagtctgagt 120

ccccacccca agagaactcc tgcctggacc ctccagacag agaccctaac tgcaagccac 180

ctccagtcaa gccccacatc ttcactacca ggagtcgtac ccggcttttt gggaagggtg 240

actcggagga ggcctctccc ctggactgcc cttatgagga aggcgggctg gcttcctgcc 300

ctatcatcac tgtcagctct gttctaacta tccagaggcc tggggatgga cctgccagtg 360

tcaggccgtc atcccaggac tccgtctccg ctggtgagaa gcccccgagg ctctatgatc 420

gcaggagcat cttcgatgct gtggctcaga gtaactgcca ggagctggag agcctgctgc 480

ccttcctgca gaggagcaag aagcgcctga ctgacagcga gttcaaagac ccagagacag 540

gaaagacctg tctgctaaaa gccatgctca atctgcacaa tgggcagaat gacaccatcg 600

ctctgctcct ggacgttgcc cggaagacag acagcctgaa gcagtttgtc aatgccagct 660

acacagacag ctactacaag ggccagacag cactgcacat tgccattgaa cggcggaaca 720

tgacgctggt gaccctcttg gtggagaatg gagcagatgt ccaggctgcg gctaacgggg 780

acttcttcaa gaaaaccaaa gggaggcctg gcttctactt tggtgagctg cccctgtccc 840

tggctgcgtg caccaaccag ctggccattg tgaagttcct gctgcagaac tcctggcagc 900

ctgcagacat cagcgcccgg gactcagtgg gcaacacggt gcttcatgcc ctggtggagg 960

tggcagataa cacagttgac aacaccaagt tcgtgacaag catgtacaac gagatcttga 1020

tcctgggggc caaactccac cccacgctga agctggaaga gatcaccaac aggaaggggc 1080

tcacgccact ggctctggct gctagcagtg ggaagatcgg ggtcttggcc tacattctcc 1140

agagggagat ccatgaaccc gagtgccgac acctatccag gaagttcacc gaatgggcct 1200

atgggccagt gcactcctcc ctttatgacc tgtcctgcat tgacacctgt gaaaagaact 1260

cggttctgga ggtgatcgct tacagcagca gtgagacccc taaccgtcat gacatgcttc 1320

tcgtggaacc cttgaaccga ctcctacagg acaagtggga cagatttgtc aagcgcatct 1380

tctacttcaa cttcttcgtc tactgcttgt atatgatcat cttcaccgcg gctgcctact 1440

atcggcctgt ggaaggcttg ccccccctata agctgaaaaa caccgttggg gactatttcc 1500

gagtcaccgg agagatcttg tctgtgtcag gaggagtcta cttcttcttc cgagggattc 1560

aatatttcct gcagaggcga ccatccctca agagtttgtt tgtggacagc tacagtgaga 1620

tacttttctt tgtacagtcg ctgttcatgc tggtgtctgt ggtactgtac ttcagccaac 1680

gcaaggagta tgtggcttcc atggtgttct ccctggccat gggctggacc aacatgctct 1740

actatacccg aggattccag cagatgggca tctatgctgt catgattgag aagatgatcc 1800

tcagagacct gtgccggttt atgttcgtct acctcgtgtt cttgtttgga ttttccacag 1860

ctgtggtgac actgattgag gatgggaaga ataactctct gcctatggag tccacaccac 1920

acaagtgccg ggggtctgcc tgcaagccag gtaactctta caacagcctg tattccacat 1980

gtctggagct gttcaagttc accatcggca tgggcgacct ggagttcact gagaactacg 2040

acttcaaggc tgtcttcatc atcctgttac tggcctatgt gattctcacc tacatccttc 2100

tgctcaacat gctcattgct ctcatgggtg agaccgtcaa caagattgca caagagagca 2160

agaacatctg gaagctgcag agagccatca ccatcctgga tacagagaag agcttcctga 2220

agtgcatgag gaaggccttc cgctctggca agctgctgca ggtggggttc actcctgacg 2280

gcaaggatga ctaccggtgg tgtttcaggg tggacgaggt aaactggact acctggaaca 2340

ccaatgtggg tatcatcaac gaggacccag gcaactgtga gggcgtcaag cgcaccctga 2400

gcttctccct gaggtcaggc cgagtttcag ggagaaactg gaagaacttt gccctggttc 2460

cccttctgag ggatgcaagc actcgagata gacatgccac ccagcaggaa gaagttcaac 2520

tgaagcatta tacgggatcc cttaagccag aggatgctga ggttttcaag gattccatgg 2580

tcccagggga gaaataatgg acactatgca gggatcaatg cggggtcttt gggtggtctg 2640

cttagggaac cagcagggtt gacgttatct gggtccactc tgtgcctgcc taggcacatt 2700

cctaggactt cggcgggcct gctgtgggaa ctgggaggtg tgtgggaatt gagatgtgta 2760

tccaaccatg atctccaaac atttggcttt caactcttta tggactttat taaacagagt 2820

gaatggcaaa tctctacttg gacacat 2847

<210> 2

<211> 2768

<212> DNA

<213> rTRPV2

<400> 2

ctgctctgtc cactgtgtga gacgaacagg tggagggtgg acgacgcaga gaaagctcgg 60

agcgggccgc ggaggttccc acagccccat tactgtcagc gttgagccgc acccctccgg 120

gccgcacttc ctctctcagt ccccgctgcc ggagagcccc gctaggctcg gtgatcctag 180

cctgcagttt gccgccgcta caccttggct tcagcctgcg ggcccctctc catcaccttc 240

tccaggtccc agccaggcct gcccctgcgg tatgagagag gaaccttaac atctccatct 300

ctacagaggt ttcagctgta aggagcatcc tcctctctca ggatgacttc agcctccagc 360

cccccagctt tcaggctgga gacttccgat ggagatgaag agggcaatgc tgaggtgaac 420

aaggggaagc aggaaccgcc ccccatggag tcaccattcc agagggagga ccggaattcc 480

tcccctcaga tcaaagtgaa cctcaacttc ataaagagac ctcctaaaaa cacttctgct 540

cccagccagc aggagccaga tcggtttgac cgtgaccgac tcttcagtgt ggtctcccgg 600

ggtgtccccg aggaactgac tggactgcta gaatacctgc gctggaacag caagtacctc 660

actgactctg catacacaga aggctccact ggaaagacgt gcctgatgaa ggctgtgctg 720

aaccttcagg atggggtcaa tgcctgcatc atgccgctgc tgcagattga caaggattcc 780

ggcaatccca agcccctcgt caatgcccag tgcatcgatg agttctacca aggccacagt 840

gcgctgcaca tcgccataga gaagaggagc ctgcagtgcg tgaagctgct ggtagagaat 900

ggagcggatg ttcacctccg agcctgtggc cgcttcttcc aaaagcacca aggaacttgt 960

ttctattttg gagagctacc tctttctctg gctgcgtgca ccaagcagtg ggatgtggtg 1020

acctacctcc tggagaaccc acaccagccg gccagcctgg aggccaccga ctccctgggc 1080

aacacagtcc tgcatgctct ggtaatgatt gcagataact cgcctgagaa cagtgccctg 1140

gtgatccaca tgtacgacgg gcttctacaa atgggggcgc gcctctgccc cactgtgcag 1200

cttgaggaaa tctccaacca ccaaggcctc acacccctga aactagccgc caaggaaggc 1260

aaaatcgaga ttttcaggca cattctgcag cgggaattct caggaccgta ccagcccctt 1320

tcccgaaagt ttactgagtg gtgttacggt cctgtgcggg tatcgctgta cgacctgtcc 1380

tctgtggaca gctgggaaaa gaactcggtg ctggagatca tcgcttttca ttgcaagagc 1440

ccgaaccggc accgcatggt ggttttagaa ccactgaaca agcttctgca ggagaaatgg 1500

gatcggctcg tctcaagatt cttcttcaac ttcgcctgct acttggtcta catgttcatc 1560

ttcaccgtcg ttgcctacca ccagccttcc ctggatcagc cagccatccc ctcatcaaaa 1620

gcgacttttg gggaatccat gctgctgctg ggccacattc tgatcctgct tgggggtatt 1680

tacctcttac tgggccagct gtggtacttt tggcggcggc gcctgttcat ctggatctca 1740

ttcatggaca gctactttga aatcctcttt ctccttcagg ctctgctcac agtgctgtcc 1800

caggtgctgc gcttcatgga gactgaatgg tacctacccc tgctagtgtt atccctagtg 1860

ctgggctggc tgaacctgct ttactacaca cggggctttc agcacacagg catctacagt 1920

gtcatgatcc agaaggtcat ccttcgagac ctgctccgtt tcctgctggt ctacctggtc 1980

ttccttttcg gctttgctgt agccctagta agcttgagca gagaggcccg aagtcccaaa 2040

gcccctgaag ataacaactc cacagtgacg gaacagccca cggtgggcca ggaggaggag 2100

ccagctccat atcggagcat tctggatgcc tccctagagc tgttcaagtt caccattggt 2160

atgggggagc tggctttcca ggaacagctg cgttttcgtg gggtggtcct gctgttgctg 2220

ttggcctacg tccttctcac ctacgtcctg ctgctcaaca tgctcattgc tctcatgagc 2280

gaaactgtca accacgttgc tgacaacagc tggagcatct ggaagttgca gaaagccatc 2340

tctgtcttgg agatggagaa tggttactgg tggtgccgga ggaagaaaca tcgtgaaggg 2400

aggctgctga aagtcggcac caggggggat ggtacccctg atgagcgctg gtgcttcagg 2460

gtggaggaag taaattgggt tgcttgggag aagactcttc ccaccttatc tgaggatcca 2520

tcagggccag gcatcactgg taataaaaag aacccaacct ctaaaccggg gaagaacagt 2580

gcctcagagg aagaccatct gccccttcag gtcctccagt ccccctgatg gcccagatgc 2640

agcagcaggc tggcaggatg gagtagggaa tcttcccagc cacaccagag gctactgagt 2700

tttggtggaa atataaatat ttttttgcat aaccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760

aaaaaagg 2768

<210> 3

<211> 2440

<212> DNA

<213> mTRPV3

<400> 3

gatctcaagg caaggactgc caccaccatc tggaacctgc cagcatatgc cttaggctcc 60

agcaatgaat gcccactcca aggagatggc gcccctcatg ggcaaaagaa ccacggcacc 120

tggcgggaac cctgttgtac tgacagagaa gaggccagca gatctcaccc ccaccaagaa 180

gagtgcacac ttcttcctgg agatagaagg atttgagccc aaccccacgg tcaccaagac 240

ctctccaccc atcttctcca agccgatgga ctccaacatc cggcagtgcc tctctggcaa 300

ctgtgatgac atggactctc cccagtctcc tcaggatgat gtgacagaga ccccatccaa 360

tcccaacagt ccgagcgcaa acctggccaa ggaagaacag aggcagaaga agaagcgact 420

gaagaagcgc atcttcgcgg ctgtgtccga gggctgcgtg gaggagctgc gggaactcct 480

acaggatctg caggacctct gcaggaggcg ccgcggcctg gatgtgcctg acttcctcat 540

gcacaagctg acagcctcag acaccgggaa gacctgcctg atgaaggctt tgctcaacat 600

caatcccaac accaaagaga tcgtgcggat tctgcttgcc ttcgctgagg agaacgacat 660

cctggacagg ttcatcaacg ctgagtacac ggaagaggcc tatgaagggc agacagcgct 720

gaacatcgcc atcgagcggc gccagggaga catcacagca gtgcttatag cagcgggtgc 780

tgacgtcaat gctcacgcca agggggtctt cttcaacccc aaataccagc atgaaggctt 840

ctattttggc gagacacccc tggctttggc agcgtgtact aaccagcctg agattgtgca 900

gctgctgatg gagaatgagc agacagacat cacttcccag gattcccggg gaaacaacat 960

cctgcacgcg ctggtgacag tggctgagga cttcaagact cagaatgact tcgttaagcg 1020

catgtatgac atgatcctgc tgaggagtgg caactgggag ctggagacca tgcgcaacaa 1080

cgatgggctc acaccactgc agctggctgc caagatgggc aaggctgaga tcctgaagta 1140

catcctcagc cgcgagatca aggagaagcc tctccggagc ttgtccagga agttcacgga 1200

ctgggcgtat gggcctgtgt catcctcact ctatgacctc accaatgtag acacaacgac 1260

ggataactct gtgctggaaa tcatcgtcta caacaccaac attgataacc gacatgagat 1320

gctgaccctg gagcctctgc atacgctgct acacacgaaa tggaagaaat ttgccaagta 1380

catgttcttc ttgtccttct gcttctattt cttctacaac atcaccctga cccttgtctc 1440

ttactaccgt cctcgggaag atgaggatct cccacacccc ttggccctga cacacaaaat 1500

gagttggctt cagctcctag ggaggatgtt tgtcctcatc tgggccacat gcatctctgt 1560

gaaagaaggc attgccattt tcctgctgag accctccgat cttcagtcca tcctgtcaga 1620

tgcctggttt cactttgtct tttttgtcca agctgtactt gtgatactgt ctgtattctt 1680

gtacttgttt gcctacaaag aatacctcgc ctgcctcgtg ctggccatgg ccctgggctg 1740

ggcgaacatg ctctactaca cgagaggctt ccagtctatg ggcatgtaca gcgtcatgat 1800

ccagaaggtc attttgcatg atgtcctcaa gttcttgttt gtttacatcc tgttcttact 1860

tggatttgga gtagcgctgg cctcactgat tgagaagtgc tccaaggaca aaaaggactg 1920

cagttcctat ggcagcttca gcgacgcggt gctggagctc ttcaagctca ccataggcct 1980

gggcgacctg aacatccagc agaactccac ctaccccatc ctctttctct tcctactcat 2040

cacctatgtc atcctcacct tcgtcctcct cctcaacatg ctcattgccc tgatggggga 2100

gacggtggag aacgtctcca aagaaagtga gcggatctgg cgcttgcaga gagccaggac 2160

catcttggag tttgagaaaa tgttaccaga atggctgaga agcagattcc gcatgggcga 2220

gctgtgcaaa gtagcagatg aggacttccg gctgtgtctg cggatcaacg aggtgaagtg 2280

gacggaatgg aaaacacacg tgtccttcct taatgaagac ccgggaccca taagacggac 2340

agcagattta aacaagattc aagattcttc caggagcaat agcaaaacca ccctctatgc 2400

gtttgatgaa ttagatgaat tcccagaaac gtcggtgtag 2440

<210> 4

<211> 3211

<212> DNA

<213> rTRPV4

<400> 4

gggaggagga cgcggcggga tcaggaagcg gctgcgctgc gcccgcgtcc caagcaggcc 60

gagaagtcca aacagatctg ctcagggtcc agtatggcag atcctggtga tggcccccgt 120

gcagcgcctg gggatgtggc tgagcccccc ggagacgaga gtggcacttc tggtggggag 180

gccttccccc tctcttccct ggccaacctg tttgagggag aggaaggctc ctcttctctt 240

tcaccagtgg atgctagccg ccctgctggc cccggggatg gacgtccaaa cctgcgtatg 300

aagttccagg gcgctttccg caaggggggtt cccaacccca ttgacctgct ggagtccacc 360

ctgtatgagt cctcagtagt gcctgggccc aagaaagcgc ccatggattc gttgttcgac 420

tatggcactt accggcacca ccccagtgac aacaagagat ggaggaggaa ggtcgtagag 480

aagcagccac agagccccaa agctcccgcc ccccagccac cccccatcct caaagtcttc 540

aaccggccca tcctctttga catcgtgtcc cggggctcca ctgccgacct ggacggactg 600

ctctcctact tgctgaccca caagaagcgc ctgactgatg aggagttccg ggaaccatcc 660

acagggaaga cctgcctgcc caaggcactt ctgaacttaa gcaatggccg aaacgacacc 720

atcccagtgt tgctggacat tgcggaacgc acgggcaaca tgcgggagtt catcaactcg 780

cccttcagag acatctacta ccgagggcag acggcactgc acatcgccat tgaacggcgc 840

tgcaagcatt acgtggagct cctggtggcc cagggagccg atgtgcacgc gcaggcccga 900

gggcggttct tccagcccaa ggatgagggt ggctacttct actttgggga gctgcccttg 960

tccttggcag cctgcaccaa ccagccgcac atcgtcaact acctgacaga gaaccctcac 1020

aagaaagccg atatgaggcg acaggactcc agaggcaaca cggtgctcca cgcgctggtg 1080

gccatcgctg acaacacccg agagaacacc aagtttgtca ccaagatgta tgacctgttg 1140

cttctcaagt gctcccgcct cttcccagac agcaacctgg agactgtgct taacaatgac 1200

ggtctttcgc ccctcatgat ggctgccaag actggcaaga tcggggtctt tcagcacatc 1260

atccgacggg aggtgacaga tgaggacaca cggcacctgt ctcgcaagtt caaggactgg 1320

gcctacgggc ctgtgtattc ttctctctac gacctctcct ccctggatac gtgcggggag 1380

gaagtgtccg tgctggagat cctggtttac aacagcaaga tcgagaaccg ccatgagatg 1440

ctggctgtgg agcccattaa cgaactgctg agggacaagt ggcgtaagtt cggggccgtg 1500

tccttctaca tcaacgttgt ctcctatctg tgtgccatgg tcatcttcac cctcacagcc 1560

tactatcagc cactggaggg cacgccaccc tacccttacc gtaccacggt ggactacctg 1620

aggctggctg gtgaggtcat cacgctcctc acaggagtcc tgttcttctt taccagtatc 1680

aaagacttgt tcatgaagaa atgccctgga gtgaattctc tcttcgtcga tggctccttc 1740

cagttgctct acttcatcta ctcagtgctg gtggttgtgt ctgcggcgct ctacctggca 1800

gggatcgagg cctatctggc tgtgatggtc tttgccctgg tcctgggctg gatgaatgcc 1860

ctttacttca cccgtgggct gaagctgaca gggacctaca gcatcatgat tcagaagatc 1920

ctcttcaaag atctcttccg ctttctgctg gtctacctgc tttttatgat tggctatgcc 1980

tcagctctgg tcaccctcct gaatccgtgc accaacatga aggtctgtaa cgaggaccag 2040

agcaactgca cggtgccctc ataccccgcg tgccgggaca gcgagacctt cagcgccttc 2100

ctactggacc tcttcaagct caccatcggc atgggcgacc tggagatgct gagcagcgct 2160

aagtaccccg tggtcttcat tctcctgctg gttacctaca tcatcctcac cttcgtgctc 2220

ctgctgaaca tgctcatcgc cctcatgggt gagaccgtgg gccaggtgtc caaggagagc 2280

aagcacatct ggaagctgca gtgggccacc accatcctgg acatcgagcg ctccttccct 2340

gtgttcctga ggaaggcctt ccgctccgga gagatggtga cagtgggcaa gagctcggat 2400

ggcactccag accgcaggtg gtgcttcagg gtggacgagg tgaactggtc tcactggaac 2460

cagaacctgg gcatcattaa cgaggacccc ggcaagagcg agatctacca gtactatggc 2520

ttctcccata ccatggggcg cctccgcagg gatcgctggt cctcagtggt gccccgcgtg 2580

gtggagctga acaagaactc aggcacagat gaagtggtgg tccccctgga taacctaggg 2640

aaccccaact gtgacggcca ccagcaaggt tatgctccca agtggagggc ggaggacgca 2700

ccactgtagg ggccatgcca gggctggggt caatggccca ggcttggccc ttgctcccac 2760

ctacatttca gcatctgtcc tgtgtcttcc cacacccaca cgtgacctcg gaggtgaggg 2820

cctctgtgga gactctgggg aggccccagg accctctggt ccccacaaag acttttgctc 2880

ttatttctac tcctccccac atgggggacg gggctcctgg ccacctgtct cactcccatg 2940

gagtcaccta agccagctca gggcccctcc actcacaggg ctcaggcccc tgtccctctt 3000

gtgcactatt tattgctctc ctcaggaaaa tgacatcaca ggagtctacc tgcagctgga 3060

acctggccag ggctgaggct catgcaggga cactgcagcc ctgacccgct gcagatctga 3120

cctgctgcag cccgggctag ggtgggtctt ctgtactttg tagagatcgg ggctgttggt 3180

gctcaataaa tgtttgttta ttctcggtgg a 3211

<210> 5

<211> 3869

<212> DNA

<213> mTRPM8

<400> 5

tcctccctcc tccagtgagc taagagacaa gcaggctctt tgaggagaga gaagctcttg 60

gctgattgag cagctccacg tcctggctgt cccggagctt gatacataga aaagactgac 120

ctcagataca cagagatcct tctgcttctg tctcccaagt gctgggatca caggcaagat 180

gtccttcgag ggagccaggc tcagcatgag gagccgcaga aatggtacta tgggcagcac 240

ccggaccctg tactccagtg tatctcggag cacagacgtg tcctacagtg acagtgattt 300

ggtgaatttt attcaggcaa attttaaaaa acgagaatgt gtcttcttta ccagagactc 360

caaggccatg gagaacatat gcaagtgtgg ttatgcccag agccagcaca tcgaaggcac 420

ccagatcaac caaaatgaga agtggaacta caaaaaacat accaaggagt ttccaacaga 480

cgccttcggg gacattcagt ttgagactct ggggaagaaa ggcaagtact tacgcttgtc 540

ctgtgacacc gactctgaaa ctctctacga actgctgacc cagcactggc acctcaaaac 600

acccaacctg gtcatttcag tgacgggtgg agccaaaaac tttgctttga agccacgcat 660

gcgcaagatc ttcagcaggc tgatttacat cgcacagtct aaaggtgcgt ggattctcac 720

tggaggcact cactacggcc tgatgaagta cataggcgag gtggtgagag acaacaccat 780

cagcaggaac tcagaagaga acatcgtggc cattggcatc gcagcatggg gcatggtctc 840

caacagggac accctcatca ggagctgtga tgatgaggga cattttcag ctcaatacat 900

catggatgac tttaccagag accctctata catcctggac aacaaccata cccacctgct 960

gcttgtggac aacggttgtc atggacaccc cacagtggaa gccaagctcc ggaatcagct 1020

ggaaaagtac atctctgagc gcaccagtca agattccaac tatggtggta agatccccat 1080

cgtgtgtttt gcccaaggag gtggaagaga gactctaaaa gccatcaaca cctctgtcaa 1140

aagcaagatc ccttgtgtgg tggtggaagg ctcggggcag attgctgatg tgatcgccag 1200

cctggtggag gtggaggatg ttttaacctc ttccatggtc aaagagaagc tggtacgctt 1260

tttaccacgc actgtgtccc ggctgcctga agaggaaatt gagagctgga tcaaatggct 1320

caaagaaatt cttgagagtt ctcacctact cacagtaatt aagatggaag aggctggaga 1380

tgagattgtg agcaacgcca tttcctatgc gctgtacaaa gccttcagca ctaatgagca 1440

agacaaggac aactggaatg gacagctgaa gcttctgctg gagtggaacc agttggacct 1500

tgccagtgat gagatcttca ccaatgatcg ccgctgggag tctgccgacc ttcaggaggt 1560

catgttcacg gctctcataa aggacagacc caagtttgtc cgcctctttc tggagaatgg 1620

cctgaatctg cagaagtttc tcaccaatga agtcctcaca gagctcttct ccacccactt 1680

cagcacccta gtgtaccgga atctgcagat cgccaagaac tcctacaatg acgcactcct 1740

caccttttgtc tggaagttgg tggcaaactt ccgtcgaagc ttctggaaag aggacagaag 1800

cagcagggag gacttggatg tggaactcca tgatgcatct ctcaccaccc ggcacccgct 1860

gcaagctctc ttcatctggg ccattcttca gaacaagaag gaactctcca aggtcatttg 1920

ggagcagacc aaaggctgta ctctggcagc cttgggggcc agcaagcttc tgaagaccct 1980

ggccaaagtt aagaatgata tcaacgctgc tggggaatcg gaggaactgg ccaatgaata 2040

tgagacccga gcagtggagt tgttcaccga gtgttacagc aatgatgaag acttggcaga 2100

acagctactg gtctactcct gcgaagcctg gggtgggagc aactgtctgg agctggcagt 2160

ggaggctaca gatcagcatt tcatcgctca gcctggggtc cagaatttcc tttctaagca 2220

atggtatgga gagatttccc gagacacgaa gaactggaag attatcctgt gtctattcat 2280

catcccctta gtgggctgtg gcctcgtatc atttaggaag aaacccattg acaagcacaa 2340

gaagctgctg tggtactatg tggccttctt cacgtcgccc ttcgtggtct tctcctggaa 2400

cgtggtcttc tacatcgcct tcctcctgct gtttgcctat gtgctgctca tggacttcca 2460

ctcagtgcca cacacccccg agctgatcct ctacgccctg gtcttcgtcc tcttctgtga 2520

tgaagtgagg cagtggtaca tgaacggagt gaattatttc accgacctat ggaacgttat 2580

ggacaccctg ggactcttct acttcatagc gggtattgta ttccggctcc actcttctaa 2640

taaaagctcg ttgtactctg ggcgcgtcat tttctgtctg gattacatta tattcacgct 2700

aaggctcatc cacattttca ccgtcagcag gaacttggga cccaagatta taatgctgca 2760

gcggatgctg atcgacgttt tcttcttcct gttcctcttt gctgtgtgga tggtggcctt 2820

tggcgtggcc agacagggga tcctaaggca aaatgaacag cgctggagat ggatcttccg 2880

ctctgtcatc tatgagccct acctggccat gtttggccag gttcccagtg acgtggatag 2940

taccacatat gacttctccc actgtacctt ctcgggaaat gagtccaagc cactgtgtgt 3000

ggagctggat gagcacaacc tgccccgctt ccctgagtgg atcaccattc cgctggtgtg 3060

catctacatg ctctccacca atatccttct ggtcaacctc ctggtcgcca tgtttggcta 3120

cacggtaggc attgtacagg agaacaacga ccaggtctgg aaattccagc ggtacttcct 3180

ggtgcaggag tactgcaacc gcctaaacat ccccttcccc ttcgttgtct tcgcttattt 3240

ctacatggtg gtgaagaagt gtttcaaatg ctgctgtaaa gagaagaata tggagtctaa 3300

tgcctgctgt ttcagaaatg aggacaatga gactttggcg tgggagggtg tcatgaagga 3360

gaattacctt gtcaagatca acacgaaagc caacgacaac tcagaggaga tgaggcatcg 3420

gtttagacaa ctggactcaa agcttaacga cctcaaaagt cttctgaaag agattgctaa 3480

taacatcaag taaggctggc gatgcttgtg gggagaaacc aaatcacaat gaggtcacag 3540

caaccacctg gatgtggagg ctcatgggac actgatggac agtactgcta atgacttcta 3600

aaggagacat tttcaggtcc ctgagcacag ggtggatgac tcttagtcac cctcaagggc 3660

ataggtcagg gagcaaagtg tacagaggac tttacacctg aagaggggtg caaaggacca 3720

tgttcttctg tgaaggtgcc tgtgttttct gcatctcaga gccttgtcct gatgctgagg 3780

gattaagtgt tgacactcct ttcccacgac tgtgactctg gccctgattt tatacttata 3840

ctgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 3869

<210> 6

<211> 4263

<212> DNA

<213> mTRPA1

<400> 6

gcgccagccg gcgtccaggt ggagtcaatg aagcgcggct tgaggaggat tctgctcccg 60

gaggaaagga aggaggtcca gggcgttgtc tatcgcggcg tcggggaaga catggactgc 120

tccaaggaat cctttaaggt ggacattgaa ggagatatgt gtagattaga agacttcatc 180

aagaaccgaa gaaaactaag caaatatgag gatgaaaatc tctgtcctct gcatcacgca 240

gcagcagaag gtcaagttga actgatggaa ctgatcatca atggttcttc gtgtgaagtg 300

ctgaatataa tggatggtta tggaaatacc ccactgcatt gtgctgcaga aaaaaatcaa 360

gttgaaagtg taaagtttct tctcagccaa ggagcaaatc caaacctccg aaatagaaac 420

atgatgtcac cccttcacat agctgtgcat ggcatgtaca acgaagtgat caaggtgttg 480

actgagcaca aggccactaa catcaattta gaaggagaga atgggaacac ggctttgatg 540

tccacgtgtg ccaaagacaa cagtgaagct ttgcaaattt tgttagaaaa aggagctaag 600

ctgtgtaaat caaataagtg gggagactac cctgtgcacc aggcagcatt ttcaggtgcc 660

aaaaaatgca tggaattaat cttagcatat ggtgaaaaga acggctacag cagggagact 720

cacattaatt ttgtgaatca caagaaagcc agccctctcc acctagcagt tcaaagcgga 780

gacttggaca tgattaagat gtgcctggac aacggtgcac acatcgacat gatggagaat 840

gccaaatgca tggccctcca ttttgctgca acccagggag ccactgacat cgttaagctc 900

atgatctcat cctataccgg aagtagtgat attgtgaatg cagttgatgg caatcaggag 960

accctgcttc acagagcctc gttatttgat caccatgacc tggcagaata cctaatatca 1020

gtgggagcag acatcaacag cactgattct gaaggacgct ctccacttat tttagcaaca 1080

gcttctgcat cctggaacat tgtgaatttg ctcctctgta aaggtgccaa agtagacata 1140

aaagatcatc ttggacgtaa ctttttgcat ttgactgtgc agcagcctta tggactaaga 1200

aatttgcggc ctgagtttat gcagatgcaa cacatcaaag agctggtgat ggatgaagac 1260

aatgacggat gcacacctct ccattatgcc tgtaggcagg gggttcctgt ctctgtaaat 1320
aacctccttg gcttcaatgt gtccattcat agcaaaagta aagataagaa gtcgcccctg 1380
cattttgcag ccagttatgg gcgcatcaat acatgtcaga gacttctgca agacataagt 1440
gatacgaggc ttttgaatga aggggatctc catgggatga ccccctctcca cctggcagca 1500
aaaaatgggc atgataaagt cgttcaactc cttctgaaga aaggggcctt atttctcagt 1560
gaccacaatg gctggactgc tttgcatcac gcctccatgg gtgggtacac tcagaccatg 1620
aaggtcattc ttgatactaa cttgaaatgc acagaccgac tagatgaaga agggaacaca 1680

gcactccact ttgcagcacg ggaaggccat gccaaggctg ttgcaatgct tttgagctac 1740
aatgctgaca tcctcctgaa caagaagcaa gcttcctttc tgcatattgc cctgcacaat 1800
aagcgcaagg aagtggttct cacaaccatc agaaataaaa gatgggatga gtgtcttcaa 1860
gttttcactc ataattctcc aagcaatcga tgtccaatca tggagatggt agaatacctc 1920
cccgagtgca tgaaagttct tttagatttc tgcatgatac cttccacaga agacaagtcc 1980
tgtcaagact accatattga gtataatttc aagtatctcc aatgcccatt atccatgacc 2040
aaaaaagtag cacctaccca ggatgtggta tatgagcctc ttacaatcct caatgtcatg 2100

gtccaacata accgcataga actcctcaac caccctgtgt gtagggagta cttactcatg 2160
aaatggtgtg cctatggatt cagagcccat atgatgaacc taggatctta ttgtcttggt 2220
ctcataccca tgacccttct tgttgtcaaa atacagcctg gaatggcctt caattctact 2280
ggaataatca atggaactag tagtactcat gaggaaagaa tagacactct gaattcattt 2340
ccaataaaaa tatgtatgat tctagttttt ttatcaagta tatttggata ttgcaaagaa 2400
gtgatccaaa ttttccaaca gaaaaggaat tacttcctgg attacaacaa tgctctggaa 2460
tgggttatct atacaactag tatcatcttc gtgttgccct tgttcctcaa catcccagcg 2520

tatatgcagt ggcaatgtgg agcaatagcg atattcttct actggatgaa cttcctactg 2580
tatcttcaaa ggtttgagaa ctgtggaatt ttcattgtta tgttggaggt gatttttaaa 2640
acattgctga gatcgaccgg agtgtttatc ttcctcctac tggcttttgg cctcagcttt 2700
tatgttctcc tgaatttcca agatgccttc agcaccccat tgctttcctt aatccagaca 2760
ttcagtatga tgctaggaga catcaattat cgagatgcct tcctagaacc attgtttaga 2820
aatgagttgg catacccagt cctgaccttt gggcagctta ttgccttcac aatgtttgtc 2880
ccaattgttc tcatgaactt actgattggc ttggcggttg gggacattgc tgaggtccag 2940

aagcatgcgt cattgaagag gattgctatg caggtggaac ttcataccaa cttagaaaaa 3000

aagctgccac tctggtactt acgcaaagtg gatcagaggt ccaccatcgt gtatccaaat 3060

agacccaggc acggcaggat gctacggttt tttcattact ttcttaatat gcaagaaaca 3120

cgacaagaag taccaaacat tgacacatgc ttggaaatgg aaatattgaa acagaaatat 3180

cggctgaagg acctcacttc cctcttggaa aagcagcatg agctcatcaa actcatcatc 3240

cagaagatgg agatcatctc agagacagaa gatgaagata accattgctc tttccaagac 3300

aggttcaaga aggagaggct ggaacagatg cacagcaagt ggaattttgt cttaaacgca 3360

gttaagacta aaacacattg ttctattagc cacccggact tttagttctg tgtcttatgg 3420

gagtgggaga ctgctttaca tacttatttc agtgaatttc agtttggaaa agagcaaaga 3480

aacagaaagt tgactaacat tgctgcatgg agatcctagt tcctgcaacc tcacccatac 3540

atatgctcat atttcctgtc aattactatg tattgagaag atcctttctg acatgttcaa 3600

tttgaacatg aaggatagtc tctttcgagt gaataaaaac cagggttgtt ggaatgcata 3660

ttatggagga taagaattaa tgtaactatt aaggcagaac acaactacat aatacaagat 3720

gcatataatt ccaagtatta tatttaatct cctaccatgt taaaccttcc tgtgttataa 3780

cctgtctggg acactataat ctctgttcct actatgatta gatcatagtc tcaccctcct 3840

cgtcccatca cacatgacat cattttgagc cacatgacag aagtcctagt tagtagactg 3900

tgataagtat gaatgttaca atagaaatgt gttcccttag tgttcatcag ttgtgatggt 3960

ttaaatgaga aacgttgccc acagactcat acatttaaac ccttagtccc agttgttgct 4020

gctgcttagg ggggccacac agccttgctt gctctctcct ttctgagtgt ggagagaaat 4080

gtgatcagta agactcctgc tcctgctgcc atgctcttta ttccattatg gacttcttct 4140

gaaactgcaa gcagaaattc actgttcctt cctcaaattt cttttggtca tggtattata 4200

tcatagcaac agaaactaac ttatgtacca atggtcttaa taaagaataa agcctgtaca 4260

gtc 4263