



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0132158
(43) 공개일자 2019년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0057490

(22) 출원일자 2018년05월18일

심사청구일자 2018년05월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

구승희

서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 103동 502호 (대치동, 대치삼성아파트)

한혜숙

서울특별시 성북구 길음로 33, 807동 2402호 (길음동, 길음뉴타운)

(74) 대리인

이명진

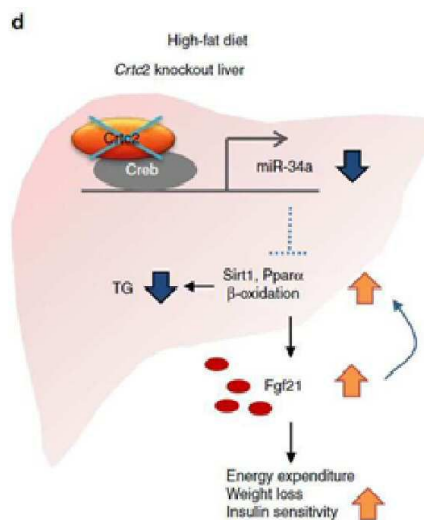
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **Crtc2의 간 특이적 조절에 의한 지방간 및 비만 제어용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 Crtc2 간 특이적 조절에 의한 간 포함 전신체적 에너지 대사를 조절하는 기술에 관한 것이다. 보다 구체적으로, Crtc2 간 특이적 억제에 의해 고지방식이에 의한 혈당 상승이 억제되고, 포도당과 인슐린 저항성이 개선되는 효과가 있다. 또한, Crtc2 간 특이적 억제에 의해 간세포 이외에 지방세포의 크기 및 지방축적이 감소하며, 에너지 소모 증가를 통해, 항 비만 효과가 있다. 또한, Crtc2 간 특이적 억제에 의해 지방 산화가 증가되어 지방간을 억제할 수 있는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 Crtc2 간 특이적 억제는 비만 또는 지방간 등의 예방, 개선 또는 치료에 적용될 수 있으며, Crtc2 간 특이적 조절을 이용하여 비만 또는 지방간 등의 치료제 개발에도 이용될 수 있다.

대표도 - 도13d



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61P 3/04 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A23V 2250/5434 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711036929
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 도약연구지원
연구과제명 cAMP 신호전달계에 의한 에너지 대사 조절 연구
기 여 율 60/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711060124
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국가마우스표현형분석사업
연구과제명 유전자변형마우스의 노화 표현형 분석 파이프라인 구축과제
기 여 율 40/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.02.19 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Crtc2 (CREB regulated transcription coactivator 2) 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제하거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성을 간 특이적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제하거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성을 간 특이적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 비만은 고지방식이 또는 식이 유도 비만인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, Fgf21 (Fibroblast growth factor 21) 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 증가하거나, 또는 Fgf21 단백질의 활성을 증가하는 물질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물.

청구항 6

제5항의 조성물을 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 키트.

청구항 7

생물학적 시료에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단에 대한 정보 제공 방법.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법.

- (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전

자의 발현을 간 특이적으로 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법.

- (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질이 cAMP 반응 요소 결합 단백질(cAMP response element binding protein (Creb))에 결합하는 정도를 측정하여 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질의 상기 Creb에의 결합을 간 특이적으로 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.

청구항 10

세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템에 있어서, 상기 목적 뉴클레오타이드 서열은 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 억제하는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 비만 또는 지방간 치료, 예방 또는 개선용 유전자 전달 시스템.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 유전자 전달 시스템은 목적 뉴클레오타이드 서열이 간 조직 특이적 프로모터에 작동적으로 연결되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CREB 조절 전사 도움 인자 2 (CREB regulated transcription coactivator 2) (이하, Crtc 2)의 신규한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간은 에너지 대사의 핵심 기관으로, 포도당 및 지방 대사의 항상성에 기여한다. 간은, 음식 조건 하에서, 뇌 및 골격근을 포함하는 주요 기관에 충분한 연료를 제공하기 위해, 포도당생합성 및 케톤생합성 활동을 통해 에너지 항상성을 유지하는 주요한 역할을 한다. 이러한 활동은 주요 속도-제한 효소를 인코딩하는 유전자의 전사 증가를 통해 이뤄진다. 예를 들어, 다양한 전사 요소 중에서, cAMP 반응 요소 결합 단백질(cAMP response element binding protein (Creb))의 cAMP-매개 활성화는 간의 포도당 생합성 증가를 담당하는 것으로 알려져 있고, peroxisome proliferator-activated receptor (Ppar) α의 유리 지방산-의존성 유도는 간에서의 지방산 β-산화 및 케톤생합성 활성을 위한 주요 전사 요소로서의 기능이다.

[0005] 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast growth factor) (이하, Fgf) 21은 엔도크린 호르몬으로 기능하는 Fgf 단백질의 서브패밀리에 속한다. 이는 주로 공복 또는 케톤 식이에 따라 Ppar α, Foxo1, 및 Atf4 에 의한 전사 조절을 통해 간에서 생성된다. 탄수화물(carbohydrate) 섭취는 또한 carbohydrate response element binding protein(Chreb)의 의존성 방식으로 Fgf 21의 발현을 향상시킨다. 간에서 이외에도, 냉 노출(cold exposure) 또는 미토콘드리아 스트레스 또한 주로 오토크린(autocrine) 및 파라크린(paracrine) 방식으로, 지방세포 및 골근육 내에서 Fgf21의 발현을 유도한다. Fgf21은 간에서의 간 지방산 산화 및 케톤 합성을 증가시킴으로써 에너지 항상성을 개선하고, 갈색 지방(brown adipose tissue (BAT))의 열발생(thermogenesis)을 개선하며, 백색 지방 조직(white adipose tissue (WAT))의 갈색화를 개선하여, 포유동물에서 전신 에너지 소비를 증가시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는,
- [0008] Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제하거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성을 간 특이적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물을 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0012] 또한, 생물학적 시료에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 또한, 다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:
- [0014] (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0015] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및
- [0016] (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.
- [0017] 또한, 다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:
- [0018] (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0019] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질이 cAMP 반응 요소 결합 단백질(cAMP response element binding protein (Creb))에 결합하는 정도를 측정하여 비교하는 단계; 및
- [0020] (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질의 상기 Creb에의 결합을 간 특이적으로 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.
- [0021] 또한, 세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템에 있어서, 상기 목적 뉴클레오타이드 서열은 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 억제하는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 비만 또는 지방간 치료, 예방 또는 개선용 유전자 전달 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0023] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제하거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성을 간 특이적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한, Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만

또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물을 제공한다.

- [0026] 또한, Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물을 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0027] 또한, 생물학적 시료에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0029] (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0030] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및
- [0031] (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.
- [0032] 또한, 다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0033] (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0034] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질이 cAMP 반응 요소 결합 단백질(response element binding protein cAMP response element binding protein (Creb))에 결합하는 정도를 측정하여 비교하는 단계; 및
- [0035] (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질의 상기 Creb에의 결합을 간 특이적으로 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.
- [0036] 또한, 세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템에 있어서, 상기 목적 뉴클레오타이드 서열은 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 억제하는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 비만 또는 지방간 치료, 예방 또는 개선용 유전자 전달 시스템을 제공한다.
- [0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0040] 본 발명자들은 간에서의 신호물질이 간 내부 뿐만 아니라 장기 간 crosstalk에 의해 직,간접적으로 다른 조직에도 전달되어 온몸의 에너지 대사 항상성에 중요한 작용을 할 것임에 착안하여, Crtc 2의 간 특이적 조절을 통해 간 포함 전신체적 에너지 대사에 미치는 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0041] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 정상생쥐 및 Crtc2 간 특이적 적중 생쥐(Crtc2 liver-specific knockout mice)에 고지방식을 통한 비만을 유도한 결과, Crtc2 간 특이적 적중 생쥐는 정상생쥐에 비해서 혈당이 낮으며, 포도당 저항성이 개선되며, 특히, 간에 지방축적이 현저히 낮아짐을 확인하였다. 또한, Crtc2 간 특이적 적중 생쥐의 경우 간세포 이외에도 지방세포의 크기 및 지방축적이 감소하였으며, 에너지 소모가 더 많아, 정상생쥐에 비해서 고지방식에 의한 비만이 크게 감소되었으며, 체지방수치의 개선 효과를 보임을 확인하였다. 따라서, 간에서의 Crtc2 조절이 전신체적으로 혈당, 지방간 및 비만을 동시에 조절할 수 있는 대사 질환 제어의 핵심 타겟이 될 수 있음을 확인하였다.
- [0042] 아울러, 본 발명자들은 Crtc2 간 특이적 적중 생쥐에 miR-34a를 주입하면 지방간 생성 및 인슐린 저항성이 증가되는데, miR-34a와 Fgf21을 동시주입하게 되면 대사 질환 표현형 유발이 되지 않는 결과를 확인하였다. 따라서 간 조직의 Crtc2 조절은 miR-34a-Fgf21 축을 통해 전신 에너지 대사를 조절함을 확인하였고, 간 조직의 Crtc2 결손에 의한 대사 개선은 Fgf21 증가를 통해 촉진됨을 확인하였다.
- [0044] 이에, 본 발명은 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제하거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성을 간 특이적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물; 및 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제하거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성을

간 특이적으로 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0046] 본 발명에 있어서, “Crtc2, 즉 CREB 조절 전사 도움 인자 2 (CREB regulated transcription coactivator 2)”는 CREB의 전사도움 인자로서, CREB 결합 도메인(CREB binding domain) (이하, CBD)를 포함하며, Crtc2가 타겟 유전자의 전사를 조절하기 위해서는 CREB와 결합(binding)하여야 활성을 나타내며, CREB와 결합 하지 못하면 타겟 유전자의 전사조절을 할 수 없다(Targeted disruption of the CREB coactivator Crtc2 increases insulin sensitivity. PNAS February 16, 2010. 107 (7) 3087-3092 Yiguo Wang, Hiroshi Inoue, Kim Ravnkjaer, Kristin Viste, Nina Miller, Yi Liu, Susan Hedrick, Liliana Vera, and Marc Montminy). 아울러, Crtc2는 C-terminus의 trans-activation domain(TAD)도 포함하는데, TAD가 결손되면 전사활성을 갖지 못한다(CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 12, pages 141-151 (2011) Judith Y. Altarejos & Marc Montminy)
- [0047] 본 발명에 있어서, Crtc2 단백질은 바람직하게 CBD 및/또는 TAD를 포함한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, Crtc2 단백질은 바람직하게 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하며, 더욱 바람직하게 서열번호 5의 아미노산 서열로 나타낸다.
- [0049] 또는, Crtc2 단백질은 바람직하게 서열번호 7의 아미노산 서열로 나타낸다.
- [0050] Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자는 바람직하게 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 더욱 바람직하게 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열로 나타낸다.
- [0051] 또는, Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자는 바람직하게 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열로 나타낸다.
- [0053] 본 발명은 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 Crtc2 단백질의 활성이 억제되는 것을 특징으로 한다.
- [0054] 이에, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물의 유효성분은 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질일 수 있다. 보다 바람직하게, Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오타이드 서열의 단편에 대한 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), DNase 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0056] 특히, 본 발명은 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 간 특이적으로 억제되거나, 또는 Crtc2 단백질의 활성이 간 특이적으로 억제되는 것을 특징으로 한다.
- [0057] 본 발명에 있어서, “간 특이적(으로)”는 간(liver) 조직에서만 반응이 일어남을 의미하며, 보다 구체적으로 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제 또는 Crtc2 단백질의 활성 억제 반응이 간 조직에서만 일어남을 의미한다.
- [0058] 바람직하게, 본 발명에 따른 조성물에는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제 또는 Crtc2 단백질의 활성 억제 반응이 간 특이적으로 일어나기 위한 성분 내지 조작이 포함될 수 있다.
- [0059] 보다 구체적으로, 이에 제한되지 않지만, 상기 본 발명에 따른 조성물의 유효성분이 간 조직의 Crtc2 단백질 내지 이를 코딩하는 유전자 만을 타겟팅하도록 유도하는 성분 내지 조작이 포함될 수 있다. 상기 간 조직의 Crtc2 단백질 내지 이를 코딩하는 유전자 만을 타겟팅하도록 유도하는 성분에는 유전자, 단백질, 화합물 등이 제한되지 않고 포함될 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 본 발명에 따른 조성물의 유효성분과 상기 간 조직의 Crtc2 단백질 내지 이를 코딩하는 유전자 만을 타겟팅하도록 유도하는 성분은 대상에게 동시에 또는 이시에 투여될 수 있다.
- [0061] 또한, 상기 본 발명에 따른 조성물의 유효성분과 상기 간 조직의 Crtc2 단백질 내지 이를 코딩하는 유전자 만을 타겟팅하도록 유도하는 성분은 당업계 공지된 다양한 방법으로 조성물 내에 포함될 수 있으며, 예컨대 상기 본 발명에 따른 조성물의 유효성분과 상기 간 조직의 Crtc2 단백질 내지 이를 코딩하는 유전자 만을 타겟팅하도록 유도하는 성분이 복합체를 형성하는 방법, 구조체(예. 셀-코어 구조체) 내에 함께 포함하는 방법, 링커로 연결

되는 방법 등으로 제한되지 않는다.

- [0062] 또한, 상기 본 발명에 따른 조성물의 유효성분을 포함하는 전달 시스템을 사용할 수 있으며, 상기 전달 시스템에는 거대 분자 전달 시스템 또는 유전자 전달 시스템이 포함될 수 있고, 상기 전달 시스템은 간 특이적으로 전달되는 특징을 갖는 것을 이용할 수 있다. 유전자 전달 시스템으로는 이에 제한되지 않지만, 예컨대 플라스미드, 재조합 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오솜 등이 사용될 수 있다.
- [0063] 또한, 예컨대, 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자와 작동 가능하게 연결되는 프로모터로 알부민 프로모터를 사용하였는바, Crtc2 단백질의 활성이 간 특이적으로 억제되도록 Cre 재조합효소(recombinase)의 알부민 프로모터 매개 발현(Albumin promoter-mediated expression) 시스템을 사용하였다(Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2004 Mar;12(3):163-6. "A transgenic mouse that targets the expression of Cre recombinase in hepatocyte").
- [0065] 본 발명에 있어서, "비만"은 과다한 체지방을 가진 상태를 의미하며, 바람직하게 고지방식이 또는 식이 유도 비만일 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서, "지방간"은 간 내 과도하게 지방이 축적된 상태를 의미한다.
- [0068] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에는 Fgf21 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 증가하거나, 또는 Fgf21 단백질의 활성을 증가하는 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0069] 상기 Fgf21는 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast growth factor)의 한 종류로서, 내분비 호르몬으로 작동하는 것으로서, 지방세포에 작용하여 지방의 사용 증가 및 에너지 소비의 증가를 유발하며, 이를 통하여 항비만의 효과를 나타냄이 보고된 바 있다. 특히, 간에서 공복시에 PPAR alpha 및 Sirt1에 의해 발현이 증가됨으로써, 간에서 분비되는 내분비 호르몬 (hepatokine)으로 알려져 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, Fgf21 단백질은 바람직하게 서열번호 9의 아미노산 서열또는 서열번호 11의 아미노산 서열로 나타낸다. Fgf21 단백질을 코딩하는 유전자는 바람직하게 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 12의 뉴클레오티드 서열로 나타낸다.
- [0072] 본 발명에 있어서, "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하거나 지연시키는 모든 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, "치료"는 질환 또는 질병의 발전의 억제; 질환 또는 질병의 경감; 및 질환 또는 질병의 제거 등 질환 또는 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, "개선"은 질환 또는 질병의 발전의 억제; 또는 질환 또는 질병의 경감 등 질환 또는 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 것을 의미한다.
- [0074] 본 발명의 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체 내지 건강기능식품학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [0078] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양 내지 건강기능식품학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "유효한 양"은 의학적 치료 내지 건강기능식품학적 개선에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 내지 개선하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학/건강기능식품학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0079] 본 발명에 따른 조성물은 개별 제제로 투여하거나 다른 제제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0080] 구체적으로 본 발명의 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3 회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0084] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 지방간의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0086] 또한, 본 발명은 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제를 포함하는 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한, 상기 조성물을 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0087] 또한, 본 발명은 생물학적 시료에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 비만 또는 지방간 예후 또는 진단에 대한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0089] 본 발명에 있어서, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 비만 또는 지방간 상태의 동정, 지방 또는 지방간의 단계 결정 또는 치료에 대한 비만 또는 지방간의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0090] 본 발명에 있어서, "예후"는 질병의 진행 가능성 과정, 특히, 질병의 차도, 질병의 재생, 질병의 재발 측면에서의 예측을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서의 예후는 환자의 질병이 완치될 가능성을 의미한다.
- [0092] 본 발명에 있어서, "생물학적 시료"는 인체 또는 포유동물로부터 얻어지는 모든 시료, 예컨대, 세포 또는 조직, 오줌, 타액, 혈액, 혈장 또는 혈청 시료를 의미하며, 특별히 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 간 조직에서 유래된 세포, 조직, 혈액, 혈장 또는 혈청 시료가 포함될 수 있다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 "Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하는 제제"는 비만 또는 지방간 개체의 생물학적 시료에서 발현되는 Crtc2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하여, 이의 간 특이적 발현수준을 확인함으로써, Crtc2의 간 특이적 검출에 사용될 수 있는 분자를

의미한다.

- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 “간 특이적 발현을 측정” 하기 위해서, 간 유래의 생물학적 시료에서의 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 측정하고, 간 이외의 생물학적 시료에서의 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 측정하여, 두 가지 측정 값을 비교하여, 간 특이적으로 발현하였는지 여부를 확인할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 제제는,
- [0098] Crtc2 단백질에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer); 또는
- [0099] Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있다.
- [0100] 본 발명에 있어서, “항체”란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명에 따른 Crtc2에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0101] 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다
- [0102] 본 발명에 있어서, “프라이머”는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 Crtc2 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 비만 또는 지방간을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0103] 본 발명에 있어서, “프로브”란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 MED30 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0104] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, “캡화”, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0106] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [0107] 상기 키트에는 Crtc2 또는 Crtc2를 코딩하는 유전자의 발현을 측정하는 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다. 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합

한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

- [0109] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 측정은
- [0110] Crtc2 단백질을 웨스턴 블랏, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 크로마틴 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 및 단백질 칩 방법으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 의해 측정; 또는
- [0111] Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 의해 측정하는 것일 수 있다.
- [0112] 본 발명에 있어서, 상기 "Crtc2 단백질 (간 특이적 발현) 측정"이란 비만 또는 지방간을 진단하기 위하여 생물학적 시료, (특히 간(liver)에서의) 단백질의 존재 여부, 발현 정도 또는 활성 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양 내지 활성도를 확인하는 것이다.
- [0113] 본 발명에 있어서, 상기 "Crtc2 유전자 (간 특이적 발현) 측정"이란 비만 또는 지방간을 진단하기 위하여 생물학적 시료, (특히 간(liver)에서의) 유전자의 존재 여부, 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 양을 확인하는 것이다.
- [0115] 본 발명은 다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다:
- [0116] (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0117] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및
- [0118] (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 간 특이적으로 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.
- [0120] 또한, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다:
- [0121] (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0122] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질이 cAMP 반응 요소 결합 단백질(response element binding protein cAMP response element binding protein (Creb))에 결합하는 정도를 측정하여 비교하는 단계; 및
- [0123] (c) 상기 (b) 단계의 비교 결과, 대조군과 비교하여 실험군의 Crtc2 단백질의 상기 Creb에의 결합을 간 특이적으로 억제시키는 시험 물질을 선별하는 단계.
- [0125] 본 발명의 스크리닝 방법은 상술한 Crtc2 발현량을 분석하는 과정을 포함하기 때문에, 상술한 내용과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0127] 본 발명의 방법에 따르면, (a) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계

를 포함한다.

- [0128] 상기 생물학적 시료에는 인체 또는 포유동물로부터 얻어지는 모든 시료, 예컨대, 세포 또는 조직, 오줌, 타액, 혈액, 혈장 또는 혈청 시료를 의미하며, 특별히 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 간 조직에서 유래된 세포, 조직, 혈액, 혈장 또는 혈청 시료가 포함될 수 있다.
- [0129] 바람직하게, 상기 생물학적 시료에는 Crtc2을 포함하는 생물학적 시료가 포함되며, 상기 Crtc2을 포함하는 생물학적 시료에는 Crtc2을 내인적으로(endogenous) 발현하는 생물학적 시료 또는 일시적으로(transiently) Crtc2이 고발현된 생물학적 시료를 포함하며, 이에 특별히 제한되지 않는다.
- [0130] 본 발명에 있어서, "시험물질"은 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 예컨대, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0132] 이어서, (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질이 cAMP 반응 요소 결합 단백질(response element binding protein cAMP response element binding protein (Creb))에 결합하는 정도를 측정하여 비교하는 단계; 또는
- [0133] (b) 상기 (a) 단계의 실험군과 시험 물질을 처리하지 않은 대조군에서 Crtc2 단백질이 cAMP 반응 요소 결합 단백질(response element binding protein cAMP response element binding protein (Creb))에 결합하는 정도를 측정하여 비교하는 단계를 포함한다.
- [0134] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 Crtc2 단백질이 결합하는 Creb에는 그의 다운스트림 방향에 리포터 유전자를 추가적으로 포함할 수 있다. 리포터 유전자로서 바람직하게는, 루시페라아제의 유전자, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제의 유전자, β -갈락토시다아제의 유전자, 사람의 성장 호르몬의 유전자, 녹색 형광단백질(green fluorescent protein), 분비성태반 알칼린 포스파테이즈(secreted placental alkaline phosphatase) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, 루시페라아제 유전자이다.
- [0136] 또한, 본 발명은 세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 전달 시스템에 있어서, 상기 목적 뉴클레오타이드 서열은 Crtc2 단백질 또는 Crtc2 단백질을 코딩하는 유전자의 간 특이적 발현을 억제하는 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 비만 또는 지방간 치료, 예방 또는 개선용 유전자 전달 시스템에 관한 것이다.
- [0137] 본 발명의 유전자 전달 시스템을 제조하기 위해, 목적 뉴클레오타이드 서열은 적합한 발현 컨스트럭트(expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서, 목적 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서, "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 본 발명에 있어서, "작동적으로 결합된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다. 본 발명에 있어서, 목적 뉴클레오타이드 서열에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포, 보다 더 바람직하게는 인간 또는 마우스 세포, 가장 바람직하게는 간세포에서 작동하여 Crtc2 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, CII 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림프톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 및 간 조직 특이적 프로모터 (예컨대, 알부민 프로모터)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게, 간 조직 특이적 프로모터 (예컨대, 알부민 프로모터)를 포함할 수 있다.
- [0138] 본 발명의 유전자 전달 시스템은 다양한 형태로 제작할 수 있는 데, 이는 (i) 내이키드(naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터, 그리고, (iv) 상기 내이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태로 제작할 수 있다

[0139] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 유전자 전달 시스템은 플라스미드, 재조합 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 배시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오솜 등에 적용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 목적 뉴클레오타이드 서열을 아데노 바이러스에 적용하여 제조된다.

발명의 효과

[0141] 본 발명에 따르면, Crtc2 간 특이적 조절에 의해 간 포함 전신체적 에너지 대사에 미치는 효과가 있다.

[0142] 보다 구체적으로, Crtc2 간 특이적 억제에 의해 고지방식이에 의한 혈당 상승이 억제되고, 포도당과 인슐린 저항성이 개선되는 효과가 있다.

[0143] 또한, Crtc2 간 특이적 억제에 의해 간세포 이외에 지방세포의 크기 및 지방축적이 감소하며, 에너지 소모 증가를 통해, 항 비만 효과가 있다.

[0144] 또한, Crtc2 간 특이적 억제에 의해 지방 산화가 증가되어 지방간을 억제할 수 있는 효과가 있다.

[0145] 따라서, 본 발명의 Crtc2 간 특이적 억제는 비만 또는 지방간 등의 예방, 개선 또는 치료에 적용될 수 있으며, Crtc2 간 특이적 조절을 이용하여 비만 또는 지방간 등의 치료제 개발에도 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0147] 도 1은 간 특이적 Crtc2 적중 생쥐에 관한 것이다.

a. 간 특이적 Crtc2 적중 생쥐를 제작하기 위한 타겟 전략을 보여주는 Schematic diagram이다. **b-c.** Crtc2^{LKO} 생쥐에서 Crtc2이 간 특이적으로 결실됨을 보여준다. 보통 식이(NCD) 하에서 6h-금식한 12주령 생쥐에서 Crtc2가 간 특이적으로 결실됨을 구체적으로 보여주는 몇가지 주요 조직에서의 Crtc2의 mRNA 수준(b) 및 단백질 수준(c). **d.** normal chow diet (NCD) 하에서 6h-금식한 12주령 생쥐에서 간 Crtc2의 만성 결실의 glucose metabolism 및 insulin signaling 에 대한 효과를 보여주는 Glucose tolerance test (GTT, left), pyruvate tolerance test (PTT, middle), 및 insulin tolerance test (ITT, right) 를 도시한다. (n=5 mice per group). GTT 및 PTT 는 16 h-fasting 이후에 실시하고, 및 ITT 는 6 h-fasting 이후에 실시한다. **e.** NCD 하에서, Crtc2^{f/f} mice 또는 Crtc2^{LKO} mice 의 16 h-fasting body weight (좌측), 및 6 h-fasting (fasted) blood glucose levels (우측) (n=5 mice per group). **f.** NCD 하 16 h-fasted mice에서 간 Crtc2의 만성 결실이 간 유전자 발현에 미치는 영향 (Q-PCR, n=5 mice per group). **f** 에서의 데이터는 mean ± s.d. 나타내고(*; P<0.05, **; P<0.01, t-test), **d** 및 **e** 에서의 데이터는 mean ± s.e.m. 를 나타냄(*; P<0.05, **; P<0.01, t-test).

도 2는 간 Crtc2 만성 결실이 간 항상성 및 인슐린 신호전달에 미치는 효과를 보여준다.

a. 16 h-fasted, 17 주령 NCD-fed Crtc2^{f/f} mice 또는 Crtc2^{LKO} mice의 피하 간에서의 Paraffin-embedded sections (좌측), brown adipose tissues (BAT, 중앙), 및 visceral white adipose tissues (WAT, right) 을 H&E로 염색. 데이터는 3 회의 독립 실험에 의함 (n=3 mice per group). **b.** 16 h-fasted, 17 주령 NCD-fed Crtc2^{f/f} mice 또는 Crtc2^{LKO} mice의 피하 간에서의 Plasma triglycerides (TG) levels (좌측) 및 hepatic TG levels (우측) (n=6 mice per group). **c.** NCD 하에서 9주령 6 h-fasted mice 의 간 Crtc2의 만성 결실이 인슐린 주입 (0.1 unit/mice) 후 인슐린 신호 전달 경로에서 간 단백질에 미치는 영향 (n=4~6 mice per group). **b** 에서의 데이터는 mean ± s.e.m. 를 나타냄(NS; not significant, t-test).

도 3은 포유동물에서 간 Crtc2가 전신 포도당 및 지방 대사를 조절함을 보여주는 것이다.

도 3a는 8주 간 HFD 조건 하 생쥐의 간 Crtc2 만성 결손이 포도당 대사 및 인슐린 신호전달에 미치는 효과를 보여주는 Glucose tolerance test (GTT, 왼쪽), pyruvate tolerance test (PTT, 중간), 및 insulin tolerance test (ITT, 오른쪽) 도기한 것이다. (n = 13, Crtc2^{f/f} mice 및 n = 11, Crtc2^{LKO} mice). 각 테스트에서 Area under the curve (AUC) 또한 도시함.

도 3b는 9주 간 HFD 조건 하 각각 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의, Ad libitum (fed) 또는 16 h-fasting (fasted) 혈중 포도당 수준 (왼쪽), 및 ad libitum (fed) 또는 16 h-fasting (fasted) 인슐린 수준 (오른쪽)을 도시한 것이다. ($n = 13$, $Crtc2^{f/f}$ mice 및 $n = 11$, $Crtc2^{LKO}$ mice).

도 3c는 9주 간 HFD 의 ad libitum (fed) 또는 16 h-fasting (fasted) 조건 하 각각 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의, 혈장 트리글리세라이드(Plasma triglycerides) (TG) 수준 (왼쪽) 및 간 TG 수준을 도시한 것이다. ($n = 13$, $Crtc2^{f/f}$ mice 및 $n = 11$, $Crtc2^{LKO}$ mice).

도 3d는 8주 간 HFD 식이 생쥐에서 적출한 간의 파라핀-임베디드 부분(Paraffin-embedded sections) 을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin, H&E)으로 염색한 것을 도시한 것이다(왼쪽). 냉동 간 부분을 오일 레드 오로 염색한 것을 도시한 것이다(오른쪽). 데이터는 3회의 독립된 실험을 나타낸다 ($n = 3$ mice per group).

도 3e는 9주 간 HFD 식이 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 16 h 금식 후, 피하 백색 지방 조직의 파라핀-임베디드 부분 (scWAT, left), 내장 백색 지방 조직의 파라핀-임베디드 부분(visWAT, middle), 및 갈색 지방 조직의 파라핀-임베디드 부분 (BAT, right)을 H&E로 염색한 것을 도시한 것이다. 데이터는 3회의 독립된 실험을 나타낸다 ($n = 3$ mice per group).

도 3f는 HFD 식이 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 체중을 도시한 것이다. ($n = 13$, $Crtc2^{f/f}$ mice 및 $n = 11$, $Crtc2^{LKO}$ mice).

도 3g는 대사 케이지를 사용해, 7주 간 HFD 식이 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 에너지 소비 (왼쪽) 및 로코모터 활성(locomotor activity) (오른쪽) 을 측정된 결과를 도시한 것이다. ($n = 10$ for $Crtc2^{f/f}$ mice and $n = 9$ for $Crtc2^{LKO}$ mice). HFD 는 age의 4주에서 시작되어 실험 기간 동안 지속됨.

도 3의 a, b, c, f 및 g 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m. 로 나타낸다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test a-c 및 g 또는 Tukey-Kramer multiple comparisons f).

도 4는 간 $Crtc2$ 의 만성 결손이 생쥐의 glucagon response, insulin signaling, 및 lipid metabolism에 미치는 영향을 보여준다.

a. 6주간의 고지방 식이(HFD) 하 6 h-fasted mice 의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 혈장 글루코스 수준에서 글루카곤-반응 변화에 미치는 영향을 보여주는 Glucagon tolerance test ($n=7-8$ mice per group). b. 6주간 HFD 하 ad libitum (fed), 6 h-fasted 및 24 h-fasted $Crtc2^{f/f}$ mice 또는 $Crtc2^{LKO}$ mice에서의 간 글리코겐 수준 ($n=5-7$ mice per group). c-d. 9 week-HFD 하 생쥐의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 인슐린 주입 (0.1 unit/mice) 후 the liver (c) or visceral WAT (d) 에서 인슐린 신호전달에 미치는 영향 ($n=5-6$ mice per group). a, b 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.e.m.를 나타냄(*; $P<0.05$, **; $P<0.01$, t-test). b e. 9 week-HFD 하 ad libitum-mice 의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 lipogenic genes에 미치는 영향.). e 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.d. 를 나타냄 (**; $P<0.01$, t-test) f. 23 week-HFD 하 생쥐의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 fat body mass 및 lean body mass ($n=5-6$ mice per group)에 미치는 영향 ($n=3$ for $Crtc2^{f/f}$ mice 및 $n=7$ for $Crtc2^{LKO}$ mice). f 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.e.m. 를 나타냄(*; $P<0.05$, **; $P<0.01$, t-test).

도 5는 간 $Crtc2$ 의 만성 결손이 생쥐의 autophagy 및 energy homeostasis에 미치는 영향을 보여준다.

a. 9 week-HFD 하 16 h-fasted mice 의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 autophagy와 관련된 유전자에 미치는 영향. b. 9 week-HFD 하 16 h-fasted mice 의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 autophagy와 관련된 단백질에 미치는 영향. a 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.d. 를 나타냄(**; $P<0.01$, t-test), and data in c- e represent mean $\pm$ s.e.m. (*; $P<0.05$, **; $P<0.01$, t-test).

c-d. Oxygen consumption (VO_2 , c, 상단), carbon dioxide production (VCO_2 , c, 하단), body weight (d, 좌측), daily food consumption (d, 중앙), 및 daily water consumption (d, 우측) 은 metabolic cage를 사용해 7 week-HFD-fed $Crtc2^{f/f}$ mice 또는 $Crtc2^{LKO}$ mice 에서 측정 ($n=10$ mice per group). e. 23 week-HFD 하 16 h fasted-mice 의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 plasma ketone bodies 에 미치는 영향 ($n=3$ for $Crtc2^{f/f}$ mice and $n=7$

for $Crtc2^{LKO}$ mice).

도 6은 간 $Crtc2$ 의 만성 결손이 간에서 $Ppar\ \alpha$ -의존성 전사 프로그램을 촉진함을 보여주는 것이다.

도 6a는 9주간 HFD 조건 하에서 생쥐의 간 $Crtc2$ 만성 결손에 따라 지방 산 베타 산화 유전자에 미치는 효과를 도시한 것이다 (Q-PCR, $n = 5.7$ mice per group).

도 6b는 $Ppar\ \alpha$ 아고니스트 WY14643의 존재(16 h 동안 $10\ \mu M$) 또는 부재 시에, $Crtc2$ 적중이 1차 간세포 내 지방 산 베타 산화 유전자에 미치는 영향을 도시한 것이다 (Q-PCR, $n =$ 그룹 당 세포 3 세트).

도 6c는 지방 산 산화율의 대응으로서 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 1차 간세포에서 산소 소비율을 측정 한 결과를 도시한 것이다 ($n =$ 그룹 당 세포 5 세트). Area under the curve 는 오른쪽에 도시하였음.

도 6d는 9주간 HFD 조건 하에서 생쥐의 간 $Crtc2$ 의 만성 결손에 따른 $Fgf21$ 발현에 미치는 영향을 도시한 것이다 (Q-PCR, $n = 5-7$ mice per group).

도 6e는 $Ppar\ \alpha$ 아고니스트 WY14643의 존재(16 h 동안 $10\ \mu M$) 또는 부재 시에, $Crtc2$ 적중이 1차 간세포 내 $Fgf21$ 발현에 미치는 영향을 도시한 것이다 (Q-PCR, $n =$ 그룹 당 세포 3 세트).

도 6f는 8주간 HFD 조건 하에서 16 h-금식 생쥐의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 혈장 $Fgf21$ 수준에 미치는 영향을 도시 한 것이다($n = 7-11$ mice per group).

도 6g는 8주간 HFD 조건 하에서 16 h-금식 생쥐의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 피하 WAT 내 $Ucp1$ 단백질 수준에 미치는 영향을 도시한 것이다(위). 각 그룹에서 $Ucp1$ 수준의 정량화는 $Ucp1$ 밴드 위에 도시됨($P < 0.01$, t-test). 8 주간 HFD 조건 하에서 16 h-금식 생쥐의 간 $Crtc2$ 만성 결손이 BAT 내 $Ucp1$ 단백질 수준에 미치는 영향을 도시 한 것이다(아래). 각 그룹에서 $Ucp1$ 수준의 정량화는 $Ucp1$ 밴드 위에 도시됨 ($P < 0.05$, t-test).

도 6h는 생쥐 내 $Crtc2$ 의 간 특이적 만성 결손이 BAT 내 $Ucp1$ 발현에 미치는 영향을 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 분석을 통해 도시한 것이다. 데이터는 4회의 독립된 실험을 나타낸다. ($n = 4$ mice per group). HFD 는 age의 4주에서 시작되어 실험 기간 동안 지속됨. 도 6에서, a-e 및 g 에서의 데이터는 평균 $\pm$ s.d. 를 나타내고 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test (c) 또는 Tukey-Kramer multiple comparisons a, b, d 및 e), 그리고 f 에서의 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m. 나타냄(** $P < 0.01$, Tukey-Kramer multiple comparisons).

도 7은 $Creb/Crtc2$ 의 hepatic gluconeogenesis에 미치는 영향을 보여준다.

a. 9 week-HFD 하 16 h-fasted mice 에서 간 $Crtc2$ 의 만성 결손이 $Crtcs$ 및 gluconeogenic genes에 미치는 영향 (Q-PCR, $n=4$ mice per group). b. cAMP agonist forskolin 이 존재하는 경우 또는 존재하지 않는 경우에 따라 $Crtc2$ knockout 이 primary hepatocytes 내의 gluconeogenic genes에 미치는 영향 (Q-PCR, $n=3$ sets of cells per group). c. 9 week-HFD 하 16 h-fasted mice 에서 간 $Crtc2$ 만성 결손이 C/ebp alpha 및 beta isoforms 의 발현에 미치는 영향 (Q-PCR, $n=4$ mice per group). d. NCD (좌측) 또는 HFD (9-week) (우측)하 16 h-fasted mice에서 간 $Crtc2$ 의 만성 결손이 plasma corticosterone 수준에 미치는 영향 ($n=4$ mice per group). a-c 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.d. (**; $P<0.01$, t-test), 및 d 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.e.m. (**; $P<0.01$, t-test)를 나타냄. e. 9 week-HFD 하 16 h-fasted mice 에서 간 $Crtc2$ 의 만성 결손이 primary miR-34a 발현에 미치는 영향 ($n=4$ mice per group). f. ad libitum 하 생쥐에서 8 week-HFD 가 간의 miR-34a 발현에 미치는 영향 ($n=4$ mice per group). e 및 f 에서의 데이터는 mean $\pm$ s.d. (**; $P<0.01$, t-test).

도 8은 간의 miR-34a 가 $Creb/Crtc2$ -의존성 방식으로 $Sirt1$ - $Ppar\ \alpha$ -매개 $Fgf21$ 의 발현을 감소시키는데 중요함을 보여준다.

도 8a는 16 h-금식, 9-주간 HFD-식이 생쥐의 간 $Crtc2$ 를 적중하는 경우 간에서의 $Atf4$, $Foxo1$, 및 $Ppar\ \alpha$ 단백질 발현에 미치는 효과를 도시한 것이다.

도 8b는 16 h-금식, 9-주간 HFD-식이 생쥐의 간 $Crtc2$ 를 적중하는 경우 간에서의 성숙 microRNA 발현에 미치는 효과를 도시한 것이다(왼쪽) (Q-PCR, $n = 4$ mice per group). AGO2-associated miR-34a 수준을 또한 도시한 것이다(오른쪽) (Q-PCR, $n = 4$ mice per group).

도 8c는 16 h-금식, 9-주간 HFD-식이 생쥐의 간 $Crtc2$ 를 적중하는 경우 간에서의 단백질 발현에 미치는 효과를 도시한 것이다. 각 조건에서의 단백질 수준의 정량화는 오른쪽에 도시하였다.

도 8d 및 도 8e는 *Crtc2*의 본질적 활성 형태(S171A) 발현이 간 유전자에 미치는 효과를 도시한 것이다. 8-주령 C57BL/6 생쥐에 5일 동안 아데노바이러스를 주입하고, 24h 금식 후에 죽임. Ad-GFP 또는 Ad-*Crtc2* S171A 아데노바이러스 주입된 C57BL/6 생쥐의(n = 5 mice per group), 간의 miR-34a 수준 (d, 왼쪽), Ppar α 타겟 유전자의 간 발현 (d, 오른쪽), 간 단백질 수준 (e, 왼쪽), 및 단백질 수준(e, 오른쪽)의 정량화 결과를 도시한 것이다.

도 8f는 마우스 miR-34a 프로모터 위에 putative Creb/*Crtc2* response element를 맵핑하기 위해 5' - 및 3' - 삭제 분석을 수행한 결과를 도시한 것이다(왼쪽). miR-34a 프로모터 활성에 미치는 Creb/*Crtc2*의 영향을 결정하기 위해 루시퍼라제 리포터 분석을 293T 세포에서 수행한 결과를 도시한 것이다(오른쪽). N = 삼중의 3 회의 독립 실험.

도 8g는 생쥐 miR-34a 프로모터 위 putative CREs의 위치(위), 생쥐 miR-34a 프로모터 활성에 CRE 돌연변이가 미치는 영향(왼쪽), 그리고 생쥐 miR-34a 프로모터에 Creb/*Crtc2*의 사용이 보여주는 크로마틴 면역침전 분석 결과(오른쪽)를 도시한 것이다. N = 삼중의 3 회의 독립 실험. HFD는 age의 4주 차에 시작되고 실험 기간 동안 지속됨 (a-c). b-g 에서의 데이터는 평균 $\pm$ s.d 로 나타냄. (*P < 0.05, **P < 0.01, t-test)

도 9는 miR-34a가 Ppar α target genes의 간 발현에 미치는 영향을 보여준다.

a-c. miR-34a의 간 발현이 Fgf21에 미치는 영향. 5일 동안 Ad-GFP 또는 Ad-miR-34a adenovirus로 감염시킨 8주령의 C57BL/6 생쥐 (n=5 mice per group)에서의 (a) 16 h-fasting 하 간 단백질 수준 및 이의 정량화, (b) ad libitum 및 16 h-fasting 하 Ppar α 및 이의 타겟 유전자의 간에서의 발현, 및 (c) ad libitum 및 16 h-fasting plasma Fgf21 수준. a 및 b에서의 데이터는 mean $\pm$ s.d. (*; P<0.05, **; P<0.01, t-test), 및 c에서의 데이터는 mean $\pm$ s.e.m. (*; P<0.05, Tukey-Kramer Multiple Comparisons)를 나타냄.

도 10은 Creb/*Crtc2*가 인간 miR-34a의 발현에 미치는 영향을 보여준다.

a-b. (a) miR-34a 프로모터 활성에 미치는 p53 또는 Creb/*Crtc2*의 영향을 결정하기 위해 293T 세포에서 루시퍼라제 리포터 분석을 실시. (b) 5' - 및 3' -결실 분석은 인간 miR-34a의 프로모터에 대한 putative Creb/*Crtc2* response element를 맵핑하기 위해 실시. N=3중 3회의 독립 실험.

a-b 데이터는 mean $\pm$ s.d.를 나타냄(*; P<0.05, **; P<0.01, Tukey-Kramer Multiple Comparisons).

c. 인간 miR-34a 프로모터 위 putative CREs의 위치 (좌측), 인간 miR-34a 프로모터 활성에 CRE mutations가 미치는 영향(중앙), 및 인간 human miR-34a 프로모터 위 *Crtc2*에 사용한 chromatin immunoprecipitation assay 결과 (우측). N=3 independent experiments in triplicate. c 데이터는 mean $\pm$ s.d.를 나타냄(*; P<0.05, **; P<0.01, Tukey-Kramer Multiple Comparisons).

도 11은 DIO mice에서 간 특이적 *Crtc2* 적중이 에너지 대사에 미치는 영향을 Fgf21결손이 전복시킴을 보여준다.

a. 16 h-fasted, 11 week-HFD-fed *Crtc2*^{f/f} mice, *Crtc2*^{LKO} mice, *Crtc2*/Fgf21^{LKO} mice, 또는 Fgf21^{LKO} mice에서 visceral white adipose tissues (visWAT), subcutaneous white adipose tissues (scWAT), brown adipose tissues (BAT) 및 liver tissues의 Paraffin-embedded sections을 hematoxylin 및 eosin (H&E)으로 염색 (n=4 mice per group). **b.** 생쥐 각 그룹의 지방 크기 **c.** 11 week-HFD 하 16 h-fasted mice에서 Fgf21 및/또는 *Crtc2*의 만성 간-특이적 결실이 혈장 Fgf21 수준에 미치는 영향 (n=5~7 mice per group). **d.** 11 주 간 HFD 하 *Crtc2*^{f/f} mice, *Crtc2*^{LKO} mice, *Crtc2*/Fgf21^{LKO} mice, 또는 Fgf21^{LKO} mice의 16 h-fasting blood glucose 수준 (n=5~7 mice per group). **e.** 11 주 간 HFD 하 *Crtc2*^{f/f} mice, *Crtc2*^{LKO} mice, *Crtc2*/Fgf21^{LKO} mice, 또는 Fgf21^{LKO} mice의 16 h-fasting body weight (n=5~7 mice per group). **f.** 16 h-fasted, 11 week-HFD fed mice에서, 간의 Fgf21 단백질 수준 및 BAT의 Ucp1 단백질 수준에 간 *Crtc2* 및/또는 Fgf21 적중이 미치는 영향. Data는 mean $\pm$ s.e.m.를 나타냄 (*; P<0.05, Tukey-Kramer Multiple Comparisons).

도 12는 *Crtc2* 간 특이적 적중 생쥐에서 miR-34a가 adiposity에 미치는 영향이 Fgf21의 co-expression에 의해 전복됨을 보여준다.

a-d. 9 week-HFD 하 *Crtc2*^{LKO} mice에 miR-34a 및/또는 Fgf21가 미치는 영향 (n=5 mice per group). 각 유전형의 생쥐에서의 Plasma Fgf21 levels (a), body weight (b), vWAT weight (c), 및 scWAT weight (d). 데이터는 mean $\pm$ s.e.m. (*; P<0.05, **; P<0.01, Tukey-Kramer Multiple Comparisons)를 나타냄.

도 13은 Crtc2 간 특이적 적중 생쥐에서 비만에 미치는 miR-34a 의 영향이 Fgf21의 동시 발현에 의해 전환됨을 보여준다.

도 13a-b는 9주 간 HFD 조건 하에서 Crtc2^{LKO} 생쥐에 미치는 miR-34a 및/또는 Fgf21의 영향을 도시한 것이다(n = 5 mice per group). AAV 주입하는 도식(a, 위) 및 miR-34a 및 Fgf21의 지방 크기에 미치는 영향(a, 아래)을 도시한 것이다. 생쥐의 각 그룹의 간, scWAT, visWAT, BAT 의 H&E 염색 결과를 도시한 것이다(b).

도 13c는 각 유전형의 scWAT 및 BAT 에서의 Ucp1 단백질 및 간 단백질 수준을 보여주는 웨스턴 블롯 분석 결과를 도시한 것이다. 데이터는 4회 독립 실험을 나타냄 (n = 4 mice per group). HFD 는 age의 4주에서 시작되어 실험 기간 동안 지속됨.

도 13d는 식이 유도 비만(diet-induced obesity (DIO)) 및 인슐린 저항성 조건 하에서, 간의 지방 산 대사 및 전신 에너지 항상성에 Creb/Crtc2-주도 miR-34a 발현이 미치는 영향을 도시한 것이다. DIO 조건 하에서, Crtc2 결손은 Sirt1/Ppar α 경로 활성을 촉진시키며, 증가된 간 지방산 베타 산화 및 지방 간 정후의 완화를 유도한다. 게다가, 향상된 간의 Fgf21 발현은 또한 간 및 지방 조직을 포함하는 주변 조직 내 지방 대사를 개선하는데 필수적이며, 개선된 인슐린 민감성 및 증가된 에너지 소비로 귀결된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0148] 이하, 다음의 실시예 또는 도면을 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예 또는 도면에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시 태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리 범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

[0150] [실시예] 실험 방법

[0151] 1. 동물 실험

[0152] Crtc2 조건부 적중(knockout) 생쥐는 EUCOMM (European conditional mouse consortium)에서 입수한 Crtc2 mutant ES cell clone (#EPD0197_3_A08)을 사용해 Macrogen(Seoul, Korea)에서 제작하였다. 상기 knockout first line 는 FRT 영역을 없애기 위해 먼저 CAG-Flp 형질전환 생쥐 (Jackson lab)와 교미하여, Crtc2 유전자의 주요 엑손 4 주위의 loxP 영역을 포함하는 Crtc2 flox/flox 생쥐를 만들어냈다. Crtc2 flox/flox 생쥐는 그리고 나서 간 특이적 Crtc2 적중 생쥐를 만들어 내기 위해 albumin-Cre 형질전환 생쥐 (Jackson lab)와 교배하였다. Fgf21 flox/flox 생쥐는 Jackson lab에서 구입하였다. Fgf21 flox/flox 생쥐는 Crtc2/Fgf21^{LKO} 생쥐를 만들어 내기 위해 Crtc2^{LKO} 생쥐와 교배하였다. 모든 생쥐는 실험에 사용하기 전에 최소한 5회 이상 C57BL/6 와 역교배하였다.

[0153] 비만 및 인슐린 저항성을 유도하기 위해, 수컷 4주령 생쥐에게 3-12주 동안 HFD (60% fat diet, D12492; Research Diets)를 식이하였다 (구체적 조건은 다음 표 1 에 도시하였음.)

표 1

Formula

Product #D12492	gm%	kcal%
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Total kcal/gm	5.24	100

Ingredient	gm	kcal
Casain, 30 Mesh	200	800
L-Cytine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	279.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0
D-Calcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
Total	773.85	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 216.4
Cholesterol (mg)/kg = 279.6

[0154]

[0155]

glucose tolerance test (GTT) 또는 pyruvate tolerance test (PTT)를 위해, 16 h-fasted 생쥐에게 포도당 또는 피루베이트 1회분을 복강 내 주입하였다 (NCD 체중의 2 g/kg 및 HFD 1.5 g/kg). 인슐린 저항성 테스트 (insulin tolerance test) (ITT) 또는 글루카곤 내성 테스트(glucagon tolerance test)를 위해, 6 h-fasted 생쥐에게 인슐린 1회분 (0.75 units of insulin/kg body weight) 또는 글루카곤 1회분(15 µg of glucagon/kg body weight)을 복강 내로 주입하였다. 혈중 포도당을 꼬리 정맥류에서 자동 포도당 모니터(One Touch, LifeScan)를 이용해 측정하였다. 인슐린 시그널링을 위해, PBS 또는 인슐린 (0.1 units per mouse) 을 10분 동안 복강 내로 주입하였고, 간 및 WAT 를 추후 분석을 위해 회수하였다. 이번 연구에서 동물 실험을 위해서는 무작위화(randomization) 내지 맹검(blinding) 은 실시하지 않았다. 표본 사이즈는 대사 평가 위한 이전 실험 방법을 이용해 결정하였다. 모든 절차는 고려대학교, Gyerim Experimental Animal Resource Center의 무균 시설에서, 고려대학교 동물 케어 및 사용 위원회(the Korea University Institutional Animal Care and Use Committee)에서 승인된 프로토콜에 따라, 수행되었다(12:12 h light-dark cycle, 22 ° C 유지).

[0157]

2. 1차 간세포(primary hepatocyte)의 배양

[0158]

8- 내지 10-주령 C57BL/6N 생쥐의 1차 간세포를 콜라게네이즈 관류 방법(Yoon, Y. S. et al. Suppressor of MEK null (SMEK)/protein phosphatase 4 catalytic subunit (PP4C) is a key regulator of hepatic gluconeogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 107, 17704-17709 (2010))에 따라 분리하였다. 상기 분리 이후에, 선택적으로 간세포만 정제하기 위해 관류된 간을 갈아서 퍼콜 중층에 주입하였다. 그리고 나서, 세포를 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT)), 100 U/ml 페니실린(penicillin), 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin), 및 10 nM 덱사메타손(dexamethasone)을 첨가한 medium 199 (M199; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에서 유지하였다.

[0160]

3. 웨스턴 블롯 분석 및 면역침전법(Western blot analysis 및 immunoprecipitation)

[0161] 웨스턴 블롯 분석을 "Choi, D. et al. Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner. Hepatology 56, 1546-1556 (2012)"에 기재된 바와 같이 단백질 추출물 10-60 μ g 을 사용해 실시하였다.

[0162] 항체 아고니스트 Crtc2 및 phosphor-Tyr IR 는 Calbiochem에서 구입하였고, 항체 아고니스트 Crtc3 는 Bethyl lab에서 구입하였으며, 항체 아고니스트 Akt, phosphor Akt(T308, S473), Foxo1, acetyl lysine, autophagy proteins 는 Cell Signaling에서 구입하였으며, 항체 아고니스트 β -actin 및 α -tubulin 는 Sigma에서 구입하였고, 항체 아고니스트 Sirt1 는 Millipore에서, 항체 아고니스트 Hsp90, Atf4, 및 IR β Santa Cruz에서, 항체 아고니스트 Nampt 는 Enzo life sciences에서, 항체 아고니스트 Ppar α 및 Ucp1 는 Abcam에서, 항체 아고니스트 Fgf21는 R&D systems에서 구입하였다. Pgc-1 α 의 아세틸화는 Pgc-1 α 항체를 이용한 면역침전법에 따라 결정되었고, 이어서 항체 아고니스트 아세틸 리신으로 아세틸화된 리신 잔기를 검출하였다. 밴드 밀도는 Image J software (NIH)를 사용해 정량화되었다. 웨스턴 블롯 분석에 사용된 항체의 구체적 조건은 다음 표 2에 요약되어 있다.

표 2

Antibodies	Source	Identifier	dilution
Crt1	Cell Signaling	2587s	1:5000
Crtc2	Calbiochem	ST1099	1:10000
Crtc3	Bethyl	A302-703A	1:5000
β -Actin	Sigma-Aldrich	A5441	1:10000
α -Tubulin	Sigma-Aldrich	T5168	1:10000
Hsp90	Santa Cruz Biotechnology	sc-7947	1:5000
Ucp1	Abcam	ab10983	1:5000
Foxo1	Cell Signaling	9454s	1:2000
Atf4	Santa Cruz Biotechnology	sc-200	1:5000
Sirt1	Millipore	07-131	1:5000
Sirt1	Cell Signaling	2028s	1:5000
Ppara α	Abcam	ab24509	1:5000
Nampt	Enzo Life Sciences	ALX-804-922	1:5000
Pgc-1 α	Mouse polyclonal Ab (generated in the laboratory)		IP (4 μ l/rxn)
acetyl lysine	Cell Signaling	9441s	1:5000
Fgf21	R&D systems	AF3057	1:5000
IR	Santa Cruz Biotechnology	sc-711	1:5000
p-IR(Y1162/1163)	Calbiochem	407707	1:5000
Akt	Cell Signaling	9272s	1:5000
p-Akt(S473)	Cell Signaling	9271L	1:5000
p-Akt(T308)	Cell Signaling	9275s	1:5000
Atg3	Cell Signaling	3415	1:5000
Atg5	Cell Signaling	1299	1:5000
Atg7	Cell Signaling	8558	1:5000
LC3A/B	Cell Signaling	4108	1:5000
Atg16L1	Cell Signaling	8089	1:5000
Atg12	Cell Signaling	4180	1:5000
Beclin1	Cell Signaling	3495	1:5000
p62	Cell Signaling	5114s	1:5000
Ago2	Abnova	H00027161-MO1	IP (5 μ l/rxn)

[0163]

[0165] 4. 조직학적 분석(Histological analysis)

[0166] 간 및 지방 조직을 생쥐에서 분리하였고, 10% 포르말린(Sigma)으로 고정하였다. 조직학적 변화는 H&E 염색으로 실험하였다. 간에서서의 중성 지방 축적은 각각 Oil red O (ORO) 염색을 사용해 분석하였다. 슬라이드는 광 현미경(Leica DMI 8)으로 관찰하였다.

[0168] **5. 플라스미드**

[0169] 인간 miR-34a 프로모터를 pGL3-PMT-miR-34a 플라스미드(a gift from Judy Lieberman (Addgene plasmid #25799))에서 절단하였고, 인간 전장 miR-34a 루시퍼라제 플라스미드를 작제하기 위해 pGL4 벡터로 서브클로닝 하였다. 마우스 miR-34a 프로모터 분석을 위해, miR-34a 프로모터를 포함하는 게놈 서열을 마우스 게놈 DNA(Promega G309a)로부터 PCR을 이용해 증폭하였다. 프로모터 내 CREB binding sites의 돌연변이는 제조사의 프로토콜(Stratagene)에 따라 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 를 사용해 수행되었다. 모든 컨스트럭트는 서열화에 의해 확인되었다.

[0171] **6. 루시퍼라제 리포터 분석**

[0172] 293T 세포는 ATCC에서 직접 구입하였고, 마이코플라스마 오염 여부를 확인하였다. 세포를 24-웰 플레이트에 분주하고, 10% FBS, 페니실린 (100 U/ml), 및 스트렙토마이신 (100 µg/ml)이 첨가된 DMEM (Hyclone)에 두었다. 각 형질전환은 48h 동안 TransIT-LT1 reagent (Mirus)를 사용해 100 ng pGL4-h/m miR-34a 프로모터, 50 ng β-갈락토시다제, 50 ng Creb 또는 Crtc2 발현 벡터로 수행되었다. 실험은 3중으로 수행되었고, 최소 3회 이상 반복되었다. 루시퍼라제 활성은 Promega Luciferase Assay Kit를 사용해 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었고 β-갈락토시다제 활성에 의해 표준화되었다.

[0174] **7. RNA 추출 및 정량 PCR**

[0175] 전체 RNA는 Trisure (Bioline) 및 RNeasy Kit (Qiagen)를 사용해 제조사의 프로토콜에 따라 분리되었다. 상보적 DNA는 제조사의 프로토콜에 기재된 바에 따라 Goscript Reverse transcription systems (Promega) 을 사용해 분석하였다. Quantitative realtime PCR (Q-PCR) 분석은 SensiFAST SYBR green mix (Bioline) 및 CFX connect real-time system (Bio-Rad)을 사용해 삼중으로 수행되었다. mRNA 수준은 ribosomal L32 또는 Gapdh로 표준화되었다. microRNA(miRNA) 정량화를 위해, 전체 RNA 는 miScript II RT Kit (Qiagen)를 사용해 역전사되었다. mouse miR-34a, miR-10b, miR-146b, miR-212, miR-132, 및 miR-582 특이적 프라이머는 Qiagen에서 구입하였다. 값은 RNU6B (Qiagen)에 표준화하였다. 유전자 특이적 프라이머에 대한 서열은 표 3에 기재하였다.

표 3

Real-time qRT-PCR primers		
Gene	Forward primer	Reverse primer
Crtc2	CATGATGGAGAACGCCATCAG	CACCGTGAAGATGATGTGGG
Crtc2	GCG ACATGACAGTTCGCA	AAGTGCTCTGGGGTTAGGG
Crtc3	CACAGTCAGAGCTTCAGGCTC	ATGGGTTTGGTCAAGTGCG
Acox1	CACGGCTATTCTCACAGCAG	CAAGGCTGTAAATGTCCACCA
Alcad	GGTTGGGCTTTTGGAGAAATG	TGAAGTGTGCAATGTAGAGAA
Crt1a	GTGTGAGGATGAGGAGTTGT	GGGTGTGTGAAGTGTGTGG
Acat1	CCCATGTGATTTCCACTTG	AGCACAAACACAGTGAATGC
Bdnf	GAGATGCTGTGGGGGTAAG	CAGGACTGGTCTGTTTGAAG
Hmgcl	AGTACGAGTCTGTGAGTGGAA	TAGAGCAGTTGGGTTGTTCG
Pdk4	TGACTCAAGAGCGGGAAAGC	ACTGGTGGCAGAGCATCTTT
Pparα	AGAACTGGCAGGAGGGATTT	TGGAGCTGGGTGTCTGTGAT
Fgf21	CAAACTCTGGGTGTCAAGGC	ATTGTAACTGCTCTGAGCA
β2-Microglobulin	TCTGTCCCGATCTACCTTG	GTAGAACTCAAGCGCGAAC
Peptid	TATGCTGATCCTGGGCATAA	CACGTTGGTGAAGATGGTGT
Pgc-1α	ATGTGTGGCTTCTTGCTCT	ATCTACTGCTGGGGACCTT
Pomf	CACATCTGGCATGAAGCCCT	ACCATAGCATTGGAGCTGG
Scrapin	ATGGATTGACACATTTGAGACATGCTC	CCTGGGCGCTGGGGCCCTG
Alas	GCTGGCGAACTTCAGGAAT	AGAGACGTGTCACTCTGAGCTT
Acc	CGCGAGGAGTTGTAATTG	TGTCGAGAGGTAAGCCCTG
Scd1	CCGAGAGCCCTTATGATCGA	TAGCCTGTAAAGATTCTGCA
Dgat1	TGGCTGCATTTGAGATTGAG	GAGACAGCTTTGGGCTTGAC
Dgat2	GTGTGAGGTGGTCAAGAGA	TATGAGGAGAGGTGTGTGG
Atg5	GGAGAGAGAGAGAGGAGGT	GCTGGGGAGCAATGCTAATA
Atg7	TCCGTTGAAGCTCTGCTT	CCACTGAGGTTCAACATCCT
Atg16L1	TCAGCCGAGGTTCTCTTTA	GCCTGCTTCTCTTGTCCAC
LC3	GCCTGTCTGGATAGACCA	GGTTGACAGAGGAAAGAG
Ulk1	AGCATTTCTTACAGTGT	AGTGTCTTCTTCTCTGATAA
Tfeb	CTCAGTTCTCTTGTGG	GTATTCATCATCTTGTAGTCT
Crebbp	TGGACAAAGACAGCAACGAG	TCACTGTCTCACTCCAGCAC
Crebbp	CAAGCTGAGCGAGATACA	CAGCTGCTCCACCTTCTCT
β2	GGCTCTGGTGAAGCCCAAGTGG	CCTCTGGGTTTCCGCGAGTTTCCG
ChIP qRT-PCR primers		
mouse miR-34a	GGGGCTAGCTCCCTATTCCCGCCT	GGGAAGCTTCCGCCAATCTGTGCAGTTAC
human miR-34a	GGGGCTAGCGATGCGGGGCTGGAGAGA	GGGGCTGAGGTGAGAAAGAGAGGTTAGCT

[0176]

[0178] **8. 크로마틴 면역침전 분석(Chromatin immunoprecipitation assay).**

[0179] 쥐 1차 간세포 또는 HepG2 는 100mm dish에 분주하였다. 100 nM glucagon 또는 10 μ M Forskolin 으로 2 h 동안 처리한 후에, 세포는 37 $^{\circ}$ C 에서 10분 동안 1% 포름알데히드로 가교하였고, 최종 농도 0.125 M가 되도록 글리신을 첨가하여 중단시켰다. ChIP 분석은 ChIP Assay Kit (Millipore)를 사용해 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 인간 miR-34a 프로모터를 위한, 프라이머 -140(F): 5' -GATCCCGGCTGGAGAGA-3' , 및 +120(R): 5' -CTGAGAAACACAAGCGTTTACCT-3' 가 사용되었다. 생쥐 miR-34a 프로모터를 위해, 프라이머 -300(F): 5' -CTCCCTATTCCCGCCTG-3' , 및 -1(R): 5' -CCCCAATCTGTGCAGTTAC-3' 가 사용되었다. 모든 투입은 표준 대조군(normalization control)으로 사용되었다.

[0181] **9. 혈청 FGF21, 코르티코스테론(corticosterone), 인슐린 수준.**

[0182] 특정 호르몬의 혈장 수준을 검출하기 위해서, 코르티코스테론(Corticosterone) ELISA Kit (ab108821), Fgf21 Kit (R&D systems MF2100), 및 Insulin Kit (Alpco) 가 제조사의 프로토콜에 따라 사용되었다.

[0184] **10. 트리글리세라이드(Triglycerides) 수준**

[0185] 모든 간 지질은 slight modification을 사용해 Folch method 에 따라 추출되었다(Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509(1957)). 요약하면, 생쥐 간을 클로로포름/메탄올 용액 (2:1, v/v)으로 균질화하고, 실온에서 원심분리하였다. 그리고나서 상층액은 0.9% NaCl의 1/5 volumes 으로 세척하고 다시 원심분리하였다. 윗 부분을 버린 후에, 나머지 용액을 진공 하에서 증발시켰다. Hepatic 및 plasma TG 함량을 Enzymatic Colorimetric Assay Kit (Wako Chemicals)를 사용해 측정하였다.

[0187] **11. 케톤 바디 수준(Ketone body level)**

[0188] 플라스마 베타-하이드록시부티레이트(Plasma β -hydroxybutyrate) 농도는 β -Hydroxybutyrate Assay Kit (Abcam, ab83390)를 사용해 측정하였다.

[0190] **12. 지방산 산화(Fatty acid oxidation).**

[0191] Crtc2^{f/f} 생쥐 또는 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 분리된 1차 간세포는 M199 medium (Sigma)가 담긴 XF-24 cell culture plates (Seahorse Bioscience) 위에 웰당 2×10^4 cells 로 분주하였다. 밤새 배양한 후에, 세포는 KHB buffer (111mM NaCl, 4.7mM KCl, 2mM MgSO₄, 1.2mM Na₂HPO₄, 2.5mM glucose, 0.5mM carnitine, pH 7.4)로 평형화하고, 37 $^{\circ}$ C , 1 시간 동안 CO₂ 없이 배양하였다. 지방산의 산화 유도를 위해, palmitate-BSA complex 를 XF-24 cartridge (Seahorse Bioscience) 내로 최종 농도 600 μ M 가 되도록 주입하였다. 지방산 산화 능력은 palmitate-BSA complex에 반응해 증가된 산화 소비 비율로서 나타낸다.

[0193] **13. 아데노바이러스(Adenovirus, AAV virus)**

[0194] Crtc2의 구성 활성 형태를 발현하는 아데노바이러스(Ad-Crtc2 S171A) 및 miR-34a를 발현하는 아데노바이러스(Ad-miR-34a)는 "Koo, S. H. et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. Nature 437, 1109-1111 (2005)" 및 "Lee, J. et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. J. Biol. Chem. 285, 12604-12611 (2010)"에 기재되어 있다. 재조합 아데노바이러스 (0.5×10^9 pfu)는 꼬리 정맥 주입을 통해 생쥐로 전달하였다. AAV-miR34a를 위해, miR-34a 는 먼저 pAAV-IRES로 서브클로닝하였고, pAAV-DJ 벡터 및 pAAVHelper 벡터로 HEK 293T cells 로 병용-형질전환(co-transfect)하여 재조합 아데노-관련 바이러스 발현(recombinant adeno-associated virus expressing) miR-34a를 제작하였는바, 이는 제

조사의 프로토콜에 기재된 바에 따른다(Cell Biolabs). 약 2×10^{10} vg 의 정제된 바이러스(per mouse) 를 꼬리 정맥 주입을 통해 생쥐에게 주입하였다. 7일 후, 생쥐에게 7 주 동안 HFD 를 먹인 후에 살해하였다.

[0196] 14. 리보핵단백질 면역침전(Ribonucleoprotein immunoprecipitation).

[0197] Ad-miR-34a 감염 후에 AGO2 면역침전 실험을 간 조직을 사용해 수행되었다(Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A. & Darnell, R. B. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. Nature 460, 479-486 (2009)). 요약하면, 간 조직은 10 ml HBSS 내에서 연마하고 10 cm dish에 옮겨두었다. 조직 상청액은 UV cross-linker에서 400 mJ/cm^2 로 3회 조사되었다. 가교된 라이세이트(Cross-linked lysate)는 1×PXL (1×PBS, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 0.5% NP-40, w/o Mg^{2+} , Ca^{2+} , complete protease inhibitor cocktail, RNasin (Promega)) 내에 재부유하였다. 상기 라이세이트를 사전 제작된 AGO2 항체 (2E12, Abnova, H00027161-M01)-Dynabead Protein A complex 와 함께 4 h 동안 4 °C에서 배양하였다. 단백질-RNA complex에 대응하는 항체는 magnetic bar (Invitrogen)로 pull down 하였다. complex 내의 RNA는 miRNeasy Kit (Qiagen)를 사용해 정제하였고, miScript II RT Kit (Qiagen)를 사용해 역전사시켜 miRNA 발현을 분석하였다.

[0199] 15. 대사 케이지 분석(Metabolic cage analysis).

[0200] Indirect calorimetry 는 indirect calorimetric chamber (OxyletPro System, Harvard Apparatus; Panlab)를 사용해 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다(Park, J. et al. SIK2 is critical in the regulation of lipid homeostasis and adipogenesis in vivo. Diabetes 63, 3659-3673 (2014)). 요약하면, 수컷 16 주령, 8주-HFD-fed $\text{Crtc2}^{\text{f/f}}$ 생쥐, 및 $\text{Crtc2}^{\text{LKO}}$ 생쥐를 측정 전에 calorimetric chamber 에서 24시간 동안 적응시켰다. VO_2 및 VCO_2 를 4시간 동안 매 9분 마다 O_2 및 CO_2 analyzer 를 사용해 600 ml/min의 controlled flow rate로 측정하였다. 각 분석 지점에서, 설치된 소프트웨어가 자동적으로 RQ 및 EE를 계산하였다. 추가로, 식이 섭취 및 물리적 활동 또한 시스템에서 측정되었다. 데이터는 단일 24 h 측정치를 나타낸다.

[0202] 16. 바디 조성 분석(Body composition analysis)

[0203] 바디 조성 분석은 NMR analyzer Bruker Minispec LF50 (Bruker Optics Inc.)을 사용해 Korea Mouse Phenotyping Center (KMPC), Seoul National University, Seoul, Korea에서 수행되었다.

[0205] 17. 소 RNA 서열화(Small RNA sequencing).

[0206] 소 RNA 서열화를 위해, RNAs 가 HFD-fed $\text{Crtc2}^{\text{f/f}}$ 생쥐 및 $\text{Crtc2}^{\text{LKO}}$ 생쥐의 간 조직에서 miRNeasy Mini Kit (Qiagen)를 사용해 추출되었다. 전체 RNA 정량 및 정성은 분광측색(spectrophotometrically) 및 전기영동(electrophoretically)으로 (Bioanalyzer 2100) 입증하였다. Illumina TruSeq small RNA Sample Prep Kit를 이용한 Sequencing library construction 이 제조사의 프로토콜에 기재된 바에 따라 수행되었다. Libraries 는 Illumina MiSeq instrument 위에서 서열화되었다. 공지된 그리고 신규한 microRNAs의 검출 및 Sequence alignment 은 miRDeep2 software algorithm을 사용해 수행되었다. 서열 정렬(sequence alignment) 전에, Mus musculus reference genome release mm10 을 UCSC genome browser 에서 회수하여 Bowtie (1.1.1)을 사용해 인덱스하고, 서열 정렬용 bowtie는 reference sequences에 대한 aligning sequencing reads를 위한 것이다. 상기 pre-processed 및 clustered reads는 Mus musculus reference genome에 정렬되었다. 상기 reads 는 그리고나서 miRBase v21에서 수득한 precursor miRNAs 및 Mus musculus matured 에 정렬했다. miRDeep2 algorithm 은 miRNA biogenesis model에 기초하고; 그것은 reads를 Dicer processing에 주로 일치시켜 potential hairpin structures 에 정렬하고, 헤어핀이 true miRNA precursors 라는 가능성을 나타내는 scores 를 할당했다. 추가로, 공지된 그리고 신규한 miRNAs를 검출하는데 더하여, miRDeep2 는 abundance를 예측하였다. 본 실험은 MacroGen, Seoul, Korea에서 수행하였다.

18. 통계(Statistics)

결과는 mean $\pm$ s.e.m.(metabolites) 또는 mean $\pm$ s.d. (Q-PCR 및 luciferase assay)으로 표기하였다. 다른 그룹 간 비교는 두 그룹의 비교를 위해서는 two-tailed unpaired Student's t test를 사용하거나 다수 그룹 간 수치를 비교하기 위해서는 Tukey-Kramer multiple comparisons를 사용하였으며, 이들은 도면에 도시되어 있다.

19. 데이터 이용가능성(Data availability)

본 실험에서의 모든 데이터 및 재료는 용이하게 습득가능하다. 소 RNA 서열화 데이터는 Sequence Read Archive (SRA), National Cancer Center for Biotechnology Information 에 기탁하였다(accession number: SAMN07661813).

[시험예] 실험 결과

1. Crtc2의 간 결손은 포도당 항상성(glucose homeostasis)을 개선하였다.

발명자들은 에너지 대사에서 Crtc2의 생리학적 역할을 확인하기 위해 간 특이적 Crtc2 적중 (Crtc2^{LKO}) 생쥐를 제작하였다. Cre 재조합효소(recombinase)의 알부민 프로모터 매개 발현(Albumin promoter-mediated expression)은 효과적으로 간에서의 Crtc2 발현을 억제하였으나, 다른 조직에서는 그렇지 않았다(도 1a-c). 예상했던 바와 같이, 간에서 Crtc2가 결손된 생쥐는 대조군 (Crtc2^{f/f})과 비교해, 감소된 혈중 포도당 수준, 개선된 인슐린 내성(insulin tolerance) 및 피루베이트 내성(pyruvate tolerance)을 나타내며, 이는 보통 식이(normal chow diet (NCD))하 생쥐 간에서의 phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pepck) 및 glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6pase)와 같은 글루코네오제닉 유전자의 감소를 수반하였다. (도 1d-f). 갈색(brown) 및 WATs에서의 지방 입자(lipid droplets)는 대조군 (Crtc2^{f/f}) 생쥐와 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 더 작은 반면, 간 및 혈장 트리글리세라이드(TG)는 변함이 없었다 (도 2a, b). 개선된 인슐린 내성에도 불구하고, Crtc2^{LKO} 생쥐의 간과 Crtc2^{f/f} 생쥐의 간 사이에는 p-Akt 수준 변화 부족으로 확인된 바와 같이, 인슐린 신호 경로(insulin signaling pathway)에서의 변화를 관찰하지 못했다(도 2c). 비만에서 간 Crtc2의 잠재적 기능을 구체화하기 위해, 쥐에 고-지방 식이(high-fat diet (HFD))를 8주간 하였다. HFD 조건 하에서 Crtc2^{f/f} 생쥐와 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐의 개선된 포도당, 피루베이트, 글루카곤 및 인슐린 내성에 의해 입증된 바와 같이, Crtc2의 간 특이적 결손에 의해 포도당 대사에 상당한 영향이 있음을 확인하였다(도 3a; 도 4a). Crtc2^{LKO} 생쥐는 대조군과 비교해 감소된 금식(fasting) 간 글리코젠 수준을 나타내는 반면, 간 글리코젠 수준은 식이하는 동안 2가지 유전형 간에 차이가 없었다(도 4b). 개선된 인슐린 내성을 갖는 생쥐에서, 주변 인슐린 신호는 Crtc2^{f/f} 생쥐와 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 보다 활성을 나타냈고, 이는 간 또는 내장 WAT 내 인슐린에 반응하여 Akt의 증가된 세린 인산화 및 인슐린 수용체(IR)의 증가된 티로신 인산화에 의해 나타났다(도 4c, d). 혈중 포도당 및 인슐린 수준은 또한 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 더 낮았으나, 포도당 대사에서 Crtc2의 역할을 확인할 수 있었다(도 3b). 간 Crtc2 결핍은 에너지 소비를 향상시켰다. 혈장 및 간 트리아실글리세롤 수준이 Crtc2^{f/f} 생쥐와 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 상당히 낮았으며(도 3c), 이는 전신 Crtc2 적중 생쥐(systemic Crtc2 knockout mic)를 이용한 연구인, 간 리포제네시스(lipogenesis)에서의 Crtc2 억제 효과에 관한 최근 보고와는 상반되었다. 사실상, Crtc2^{f/f} 생쥐의 간과 비교해, Crtc2^{LKO} 생쥐의 간에서 리포제닉 유전자 발현이 다소 감소함을 확인하였으며, 이는 간 리포제네시스에 대한 Crtc2의 간-특이적 결손의 효과가 전신 Crtc2 적중 생쥐와는 차이가 있음을 의미하며, Crtc2^{LKO} 생쥐에서의 개선된 인슐린 민감도가 일부 원인으로 작용한 것으로 추측되었다(도 4e). 간에서 Crtc2의 만성 결손(chronic depletion)에 따라 개선된 지질 대사를 가진다는 데이터에 따라, 간, BAT, 피하 백색 지방 조직(subcutaneous white adipose tissue (scWAT)) 및 내장 백색 지방 조직(visceral white adipose tissue (visWAT))에서 지방 입자(lipid droplets)의 크기가 감소함을 확인하였다(도 1d, e). 게다가, 지방 본체 중량(fat body mass)이 Crtc2^{f/f} 생쥐와 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 감소하였다(도 4f). 간에서의 감소된 지방

입자(lipid droplet) 크기는 $Crtc2^{f/f}$ 간에서와 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 간에서 자가포식(또는 지질포식)에 의해 지방 입자의 증가된 저하를 암시할 수도 있었다. 그러나 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐 간과 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 간 사이에 자가포식의 주요 성분 발현 상에 일치되는 변화를 확인할 수 없었으며(즉, 감소된 Atg7 발현 및 유도된 Atg12 발현, 그리고 p6 수준 또는 LC3-II 수준에서 변화가 없음), 이는 지질포식의 잠재적 관련성과는 상반되었다(도 5a, b). $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서 HFD 이후 감소된 체중 및 지방 세포에서의 감소된 지방 입자가 증가된 에너지 소비를 나타낼 수도 있는바(도 3f), HFD 조건 하에서 생쥐를 사용해 간접 칼로리 분석(calorimetric assay)을 수행하였다. $Crtc2^{f/f}$ 생쥐와 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서 작지만 상당한 에너지 소비 증가를 확인하였으며, 이는 식이 섭취, 물 소비 또는 운동(locomotor) 활성에서의 변화 없이, 돌연변이 그룹에서의 체중 감소를 이끌어낼 수 있었다(도 3g; 도 5c, d).

[0218] **2. 간 $Crtc2$ 의 결손은 $Ppar \alpha$ -의존성 경로를 촉진하였다.**

[0219] $Crtc2$ 는 transcriptional co-activator이므로, 간 $Crtc2$ 결손의 에너지 대사에 대한 영향은 유전자 발현에서의 변화로부터 저지되어야 했다. 그러므로, 광대한 정량 RT-PCR (Q-PCR) 분석을 수행하였고, 이번 연구에서 확인된 대사 표현형에 대한 원인일 수도 있는 $Creb/Crtc2$ 의 잠재적 타겟 유전자를 탐지였다. 지방산 산화 및 케토제네시스(ketogenesis)에서의 효소를 코딩하는 유전자는 통상적으로 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐의 간과 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 간에서 증가하였다(도 6a). 이러한 데이터에 따라, $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서 보다 다량의 혈장 케톤 체 수준, 및 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐와 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서 1차 간세포에서 팔미테이트에 응하여 증가된 산소 소비와 함께 지방산 산화 유전자의 증가 발현을 확인하였다(도 6b, c). 특히, $Fgf21$ 의 발현, 지방 사용의 촉진 및 지방세포에서의 비오한열생산(non-shivering thermogenesis)에 의한 전신 에너지 대사를 대신하는 것으로 나타난 헤파토키인(hepatokine)은, 금식 동안 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐의 간과 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 간에서 2배 이상 유도되었으며, 이는 분리된 1차 간세포에서 확인되었다(도 6d, e). 혈장 $Fgf21$ 수준은 또한 금식 동안 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐와 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서 더 높았다. BAT 및 피하 WAT에서 증가된 $Ucp1$ 단백질 수준이 확인되었으며, 이는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서의 보다 다량의 $Fgf21$ 혈장 농도는 지질 대사에 상당히 영향을 미쳤음을 의미하였다(도 6g, h). 예상밖으로, 비록 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐 유래의 1차 간세포가 폴스콜린(forskolin)에 대한 약화된 전사 반응을 보였지만, 글루코제닉 유전자의 발현은 HFD 조건 하에서 간에서의 $Crtc2$ 의 만성 결손에 의해 거의 바뀌지 않았다(도 7a, b). 글루코네오제닉 유전자의 전사를 향상시키는 것으로 나타난 전사 요소인, $C/ebp\beta$ 의 메신저 RNA (mRNA) 수준에서 잠재적 보상성 증가가 나타났다(도 7c). 이에 더해, $Crtc2^{LKO}$ 생쥐에서의 보다 다량의 혈장 코르티솔 수준은, $Crtc2$ 부재시에도 글루코제오제닉 유전자의 정상 발현 수준을 보장하며, 이는 $Fgf21$ 이 인 비보 상에서 아드레날 글랜드(adrenal gland)로부터 코르티솔의 분비를 유도하여 간에서의 글루코네오제네시스를 유도할 수 있음을 보여준 최근의 연구에서 제안된 바와 같았다.

[0221] **3. $Crtc2$ 는 $miR-34a$ 를 조절함으로써 $Sirt1-Ppar \alpha-Fgf21$ 축을 조절하였다.**

[0222] $Ppar \alpha$, $Atf4$, 및 $Foxo1$ 와 같은 다양한 전사 요소는 $Fgf21$ 발현 조절과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 나타났다. $Atf4$ 및 $Foxo1$ 모두의 수준이 전혀 변하지 않은데 반해, $Ppar \alpha$ 단백질 수준은 금식 조건 하에서 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐의 간에서와 비교해 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 간에서 더 높았다(도 8a). 게다가, 쥐의 2 그룹 간 간(liver) $Chrebp$ 발현에서 어떠한 변화도 확인하지 못했다. 이러한 데이터는 $Crtc2$ 가 단백질 수준에서 $Ppar \alpha$ 의 발현을 직접적으로 조절할 수 있음을 암시하며, 이는 microRNAs의 직접 조절을 통해서인 것으로 예측되었다. 그러므로 HFD 하에서 $Crtc2^{f/f}$ 생쥐 또는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 간을 사용한 소 RNA 서열 분석을 수행하였다. $miR-34a$, $miR-10b$, 및 $miR-146b$ 를 포함하는 $Crtc2^{LKO}$ 생쥐의 간에서의 몇몇 microRNAs의 발현에서 상당한 변화를 확인하였다(표 4).

표 4

List of miRNAs that are affected by hepatic *Crtc2* depletion

miRNA	Gene ID	Fold
mmu-miR-34a-5p	ENTREZGENE:723848	-2.6
mmu-miR-146b-5p	ENTREZGENE:751550	-2.0
mmu-miR-423-5p	ENTREZGENE:751519	-1.8
mmu-miR-676-3p	ENTREZGENE:751534	-1.7
mmu-miR-144-5p	ENTREZGENE:387162	-1.6
mmu-miR-3068-3p	ENTREZGENE:100526546	-1.6
mmu-miR-10b-5p	ENTREZGENE:387144	-1.5
mmu-miR-200b-3p	ENTREZGENE:387243	-1.5
mmu-miR-1839-5p	ENTREZGENE:100316717	-1.5
mmu-miR-222-3p	ENTREZGENE:723828	-1.5
down mmu-miR-152-5p	ENTREZGENE:387170	-1.5
mmu-miR-146a-5p	ENTREZGENE:387164	-1.5
mmu-miR-15b-5p	ENTREZGENE:387175	-1.5
mmu-miR-19b-3p	ENTREZGENE:387195	-1.4
mmu-miR-186-5p	ENTREZGENE:387181	-1.4
mmu-miR-194b-5p	ENTREZGENE:100316699	-1.4
mmu-lef-7e-5p	ENTREZGENE:387248	-1.4
mmu-miR-1843b-5p	ENTREZGENE:100628622	-1.4
mmu-miR-335-3p	ENTREZGENE:723930	-1.4
mmu-miR-486a-5p	ENTREZGENE:723876	-1.4
mmu-miR-486b-5p	ENTREZGENE:100526510	-1.4
mmu-miR-127-3p	ENTREZGENE:387146	1.4
up mmu-miR-6240	-	1.6
mmu-miR-182-5p	ENTREZGENE:387177	1.8
mmu-miR-183-5p	ENTREZGENE:387178	1.9

(Read counts >300)

[0223]

[0224]

잠재 microRNAs 중에서, 오직 miR-34a 수준이 *Crtc2* 결손에 따라 2배 이상 감소되었음을 Q-PCR을 통해 확인하였다(도 8b). 1차 miR-34a 수준 또한 HFD-식이 조건 하에서 *Crtc2*^{f/f} 생쥐의 간과 비교해 *Crtc2*^{LKO} 생쥐의 간에서 또한 감소되었으며, 이로써 miR-34a의 전사는 Creb/*Crtc2* transcriptional machinery를 필요로 한다는 가설을 확증하였다(도 7e). miR-34a 수준은 대조군과 비교해 HFD-식이 생쥐의 간에서 보다 높았다(도 7f). 이전의 보고들은 miR-34a가 간에서 Sirt1, Ppar α , 및 Nampt와 같은 다양한 타겟의 발현을 감소시킨다고 하면서, Ppar α 의 활성화에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다고 하였다. Sirt1, Ppar α , 및 Nampt의 단백질 수준은 *Crtc2*^{f/f} 생쥐의 간과 비교해 *Crtc2*^{LKO} 생쥐의 간에서 보다 다량으로 나타났다(도 8c). 게다가, 퍼옥시좀 증식자 활성 수용체 감마(Pgc)-1 α (peroxisome proliferator activating receptor gamma (Pgc)-1 α), Ppar α 에 대한 공지된 co-activator은, 추정하건대 Sirt1 및 Nampt의 증가된 발현 때문에, 감소된 아세틸화를 나타냈다. 이러한 데이터는 감소된 miR-34a 발현이 금식 동안 *Crtc2*^{LKO} 생쥐 간에서 Fgf21의 향상된 발현을 이끌어내면서, Ppar α -transcriptional machinery의 활성화로 귀결된다는 가설을 뒷받침하였다. 간에서의 miR-34a의 과발현은 Ppar α 타겟 유전자 뿐만 아니라 Ppar α 및 Fgf21의 감소된 발현으로 귀결되며, 이로써 miR-34a가 Ppar α -의존 전사 경로를 통해 Fgf21 발현을 조절한다는 것을 확인하였다(도 9a-c). NCD 조건 하에서 *Crtc2* 간-특이적 결손 또는 금식에 의해 miR-34a 발현에서 상당한 변화가 나타나지 않았다. Creb/*Crtc2* transcriptional machinery 그 자체로는 miR-34a의 전사 향상에 충분하지 않고 DIO 조건에서 간의 miR-34a의 발현에 책임이 있었으며, 해당 조건에서 *Crtc2*의 일차 활성화가 관찰되었다. *Crtc2*의 일차 활성화로 귀결되는 DIO 조건을 모사하기(mimic) 위해, *Crtc2*의 본질적 활성화 형태인, *Crtc2* S171A을 발현하는 아데노바이러스를 이용하였다. *Crtc2* S171A의 과발현은 간에서의 miR-34a 증가 발현으로 귀결되었으며, 이는 Ppar α 타겟 유전자와 함께, Ppar α , Sirt1, 및 Fgf21의 단백질 수준의 감소와 일치하였다(도 9d, e). 루시퍼라제 리포터 분석은 배양된 세포에서 Creb 및 *Crtc2*의 동시-발현에 의해 miR-34a의 프로모터 활성화가 유도됨을 보여주었다(도 8f; 도 10a). p53은 miR-34a 전사를 위한 주요 전사 조절자이다. *Crtc2*는 miR-34a 프로모터 활성화에서 p53-의존성 증가를 더욱 활성화시키지는 못했으며, 이들 2가지 경로는 miR-34a의 전사 조절로 수렴하지는 않음을 보여주었다(도 10b). miR-34a에 대한 프로모터 서열은 상술하였고, 몇몇 잠재 cAMP response elements (CRE)를 확인하였다. 돌연변이 연구는 잠재 CREs 중에, 인간 프로모터용 -132에서의 요소 및 마우스 프로모터용 -271에서의 요소는 Creb/*Crtc2* 전사 반응에서 중요하였다(도 8g; 도 10c). 상기 결과는 HepG2 세포 및 생쥐 1차 간세포 모두에서 크로마틴 면역침전 분석에 의해서 또한 확인되었다. 이들 데이터는 DIO 조건 하에서 Fgf21의 간 발현을 조절함으로써 Creb/*Crtc2*가 간에서 뿐만 아

나라 전신 수준에서 Ppar α -의존적 지질 대사 조절을 위해 중요하다는 것을 보여주었다. Fgf21 결손은 DIO 마우스에서 Crtc2 적중의 효과를 바꾸었다. 그리고 나서, Crtc2의 간 특이적 결손이 전신 에너지 대사에 미치는 영향이 Fgf21 수준의 증가 때문인지를 확인하였다. Crtc2/Fgf21 이중 간-특이적 적중 생쥐 (Crtc2/Fgf21^{LKO} mice)와 함께 Fgf21 간-특이적 생쥐(Fgf21^{LKO} mice)를 albumin-Cre transgene을 사용해 제작하였다. 생쥐에서 Fgf21의 단일 적중은 야생형 생쥐에 비해 혈중 Fgf21 수준을 거의 완전히 감소시켰는데 반해, 두가지 유전형 사이에서 혈중 포도당 수준 또는 체중에서는 상당한 변화를 확인할 수 없었다. 유사하게, Crtc2^{f/f} 생쥐 및 Fgf21^{LKO} 생쥐 사이에, 간, scWAT, visWAT, 및 BAT에서 체중 또는 지방 입자(lipid droplet)에서 어떠한 차이도 확인할 수 없었는바, 이는 간의 Fgf21, 그 자체의 단순한 결손은 DIO 조건 하에서 대사 표현형에 영향이 없음을 암시하였다 (도 11a-e). 다른 한편, 간에서 Crtc2 및 Fgf21의 동반 결손은, 거의 완벽히 Fgf21 수준을 감소시켰고, 혈중 포도당 수준, 체중량 및 전신 지질 대사 및 지방축적(adiposity)에서 Crtc2의 간 특이적 결손의 유리한 효과를 바꿔놓았으며, Crtc2^{LKO} 생쥐와 비교해 Crtc2/Fgf21^{LKO} 생쥐의 간, WAT, 및 BAT에서 증가된 지방 입자(lipid droplet) 크기를 확인하였다(도 11a-e). 추가로, Ucp1 단백질 수준(BAT)은 간에서 Crtc2의 단일 적중에 의해 증가되었으며, 생쥐의 간에서 Crtc2 및 Fgf21의 이중 적중에 의해 감소되었다(도 11f). 다시, 간 Fgf21의 단일 적중만으로는 DIO 조건 하에서 BAT Ucp1 수준에 영향을 미치지 못했다. 이들 데이터는 지질 항상성 및 에너지 대사에 대한 Crtc2의 간-특이적 결손의 영향이 증가된 혈장 Fgf21을 통해 주로 작용할 것임을 암시하였다. 간에서의 Fgf21의 적중은 증가된 Fgf21의 유리한 효과를 효과적으로 결손하였으며, DIO 조건 하에서 간 지질 함량 및 전반적인 지방 과다에 대한 Crtc2 결손의 효과를 전환하였다. 이들 데이터는 금식 동안 증가된 혈장 Fgf21가 지질 항상성을 개선하는 반면, 간 Fgf21 결손 (및 그러므로 혈장 Fgf21 수준 감소) 그 자체는 대사 질환을 일으키지 못함을 보여주었다.

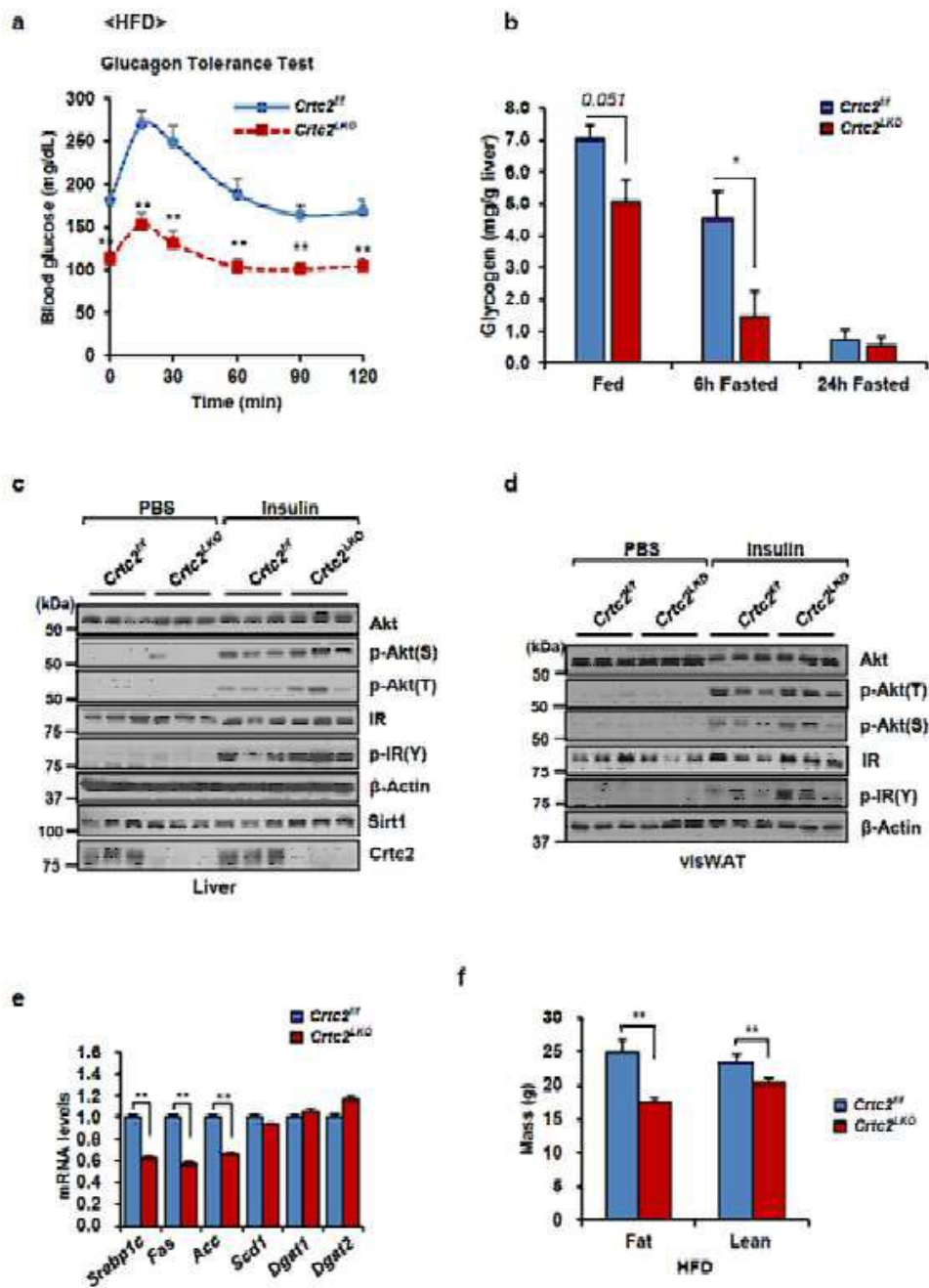
[0226] **4. 지방 과다에 대한 miR-34a의 효과는 Fgf21의 동시-발현에 의해 차단되었다.**

[0227] Crtc2 결손 하에서 증가된 Ppar α /Fgf21 프로그램이 miR-34a-의존성 경로를 통한 것이 맞는지 확인하기 위해, Crtc2^{LKO} 생쥐의 간에서 miR-34a- 또는 miR-34a 플러스 Fgf21를 아데노 관련 바이러스(adeno-associated virus)-매개 유전자 전달을 통해 발현시켰다. 혈장 Fgf21 수준은 대조군과 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐에서 증가하였고, 이는 miR-34a의 재발현에 의해 상당히 감소하였다. 예상한 바와 같이, miR-34a와 Fgf21의 동시발현이 더 높은 혈장 Fgf21를 회복하였다 (도 12a). 체중 뿐만 아니라, WATs의 크기는, 대조군과 비교해, Crtc2^{LKO} 생쥐에서 감소하였다. miR-34a의 재발현은 표현형을 바꿨고 그리고 Fgf21의 동시발현은 miR-34a의 영향을 억제하였다(도 13a; 도 12b-d). 지질 항상성에서의 변화는 간 및 지방 조직을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin (H&E))으로 염색한 데이터에서 나타난 바와 같이 뚜렷하였다(도 13b). MiR-34a는 효과적으로 간의 Crtc2 결손된 생쥐에서 간의 WAT, BAT 및 지방 입자(lipid droplet) 크기에서의 변화를 차단하였고, Fgf21의 동시발현은 또한 생쥐에서 지방과다에 대한 miR-34a의 효과를 간접하였다. Crtc2^{f/f} 생쥐의 간과 비교해 Crtc2^{LKO} 생쥐의 간에서 Ppar α 단백질 및 그의 타겟 Fgf21 단백질이 유도되었다. Crtc2^{LKO} 생쥐에서 miR-34a의 재발현은 모든 단백질의 감소를 이끌어내는데 반해, miR-34a 및 Fgf21의 동시발현은 Ppar α 단백질 수준이 아니라 간의 Fgf21 단백질 수준을 회복하였다. 뿐만 아니라, Crtc2^{LKO} 생쥐의 BAT 및 scWAT에서의 증가된 Ucp1 단백질 수준은 miR-34a 발현에 의해 감소되었고, miR-34a 및 Fgf21 동시발현에 의해 회복되었으며, HFD 유도 비만 및 인슐린 저항성 조건 하에서 Crtc2-miR-34a 축은 Ppar α -Fgf21 경로를 간접한다는 가설을 확인시켜주었다(도 13c).

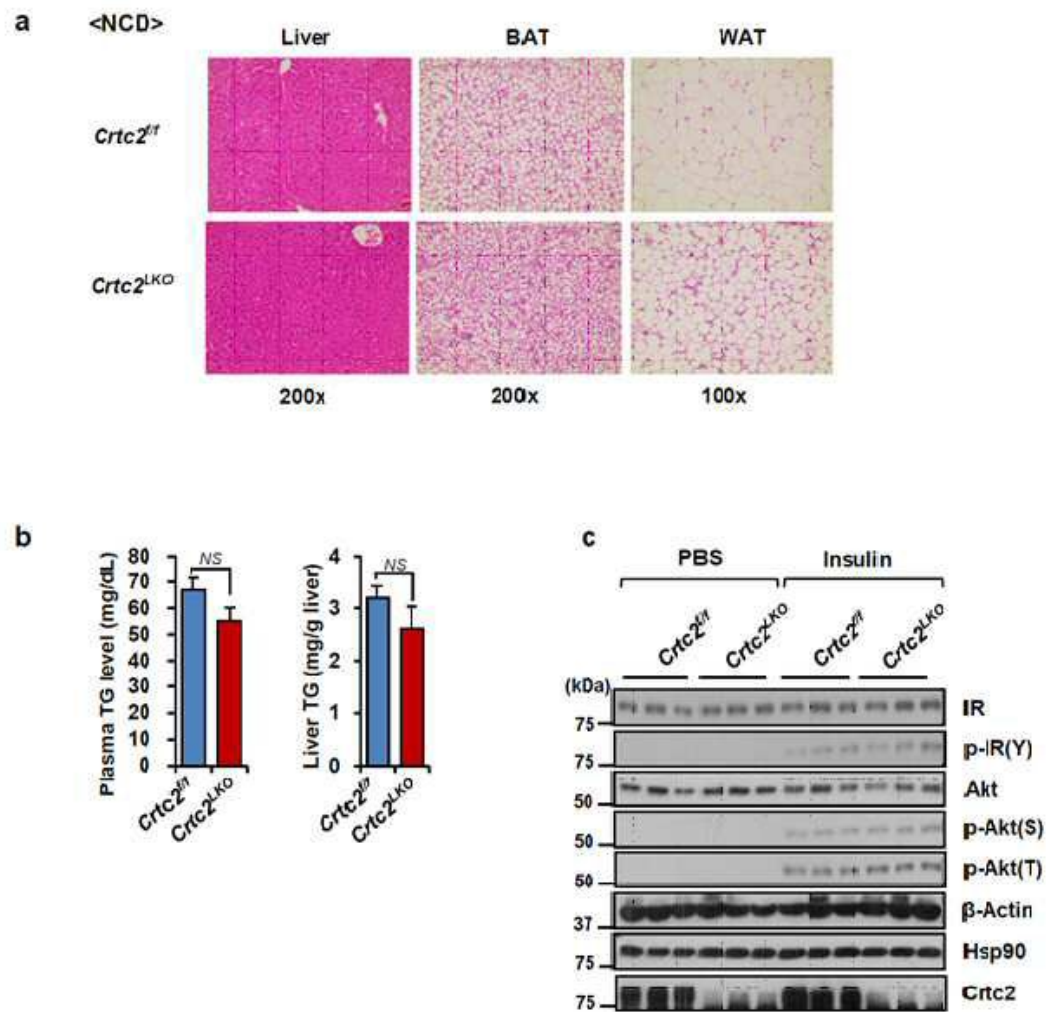
[0229] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예 들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

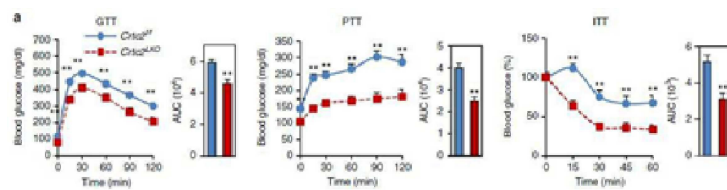
도면1



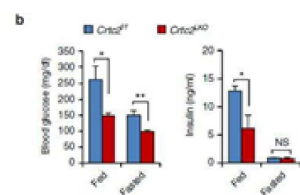
도면2



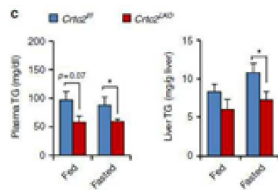
도면3a



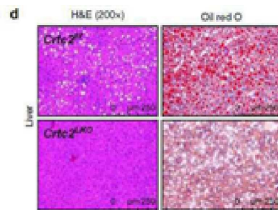
도면3b



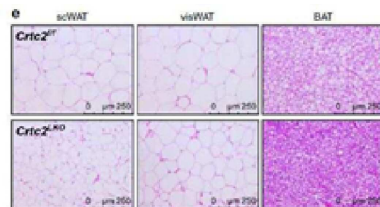
도면3c



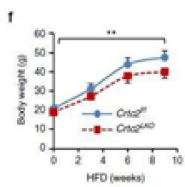
도면3d



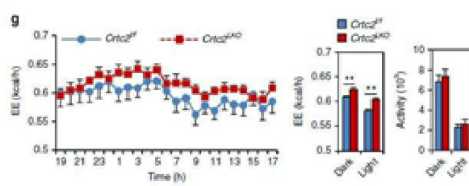
도면3e



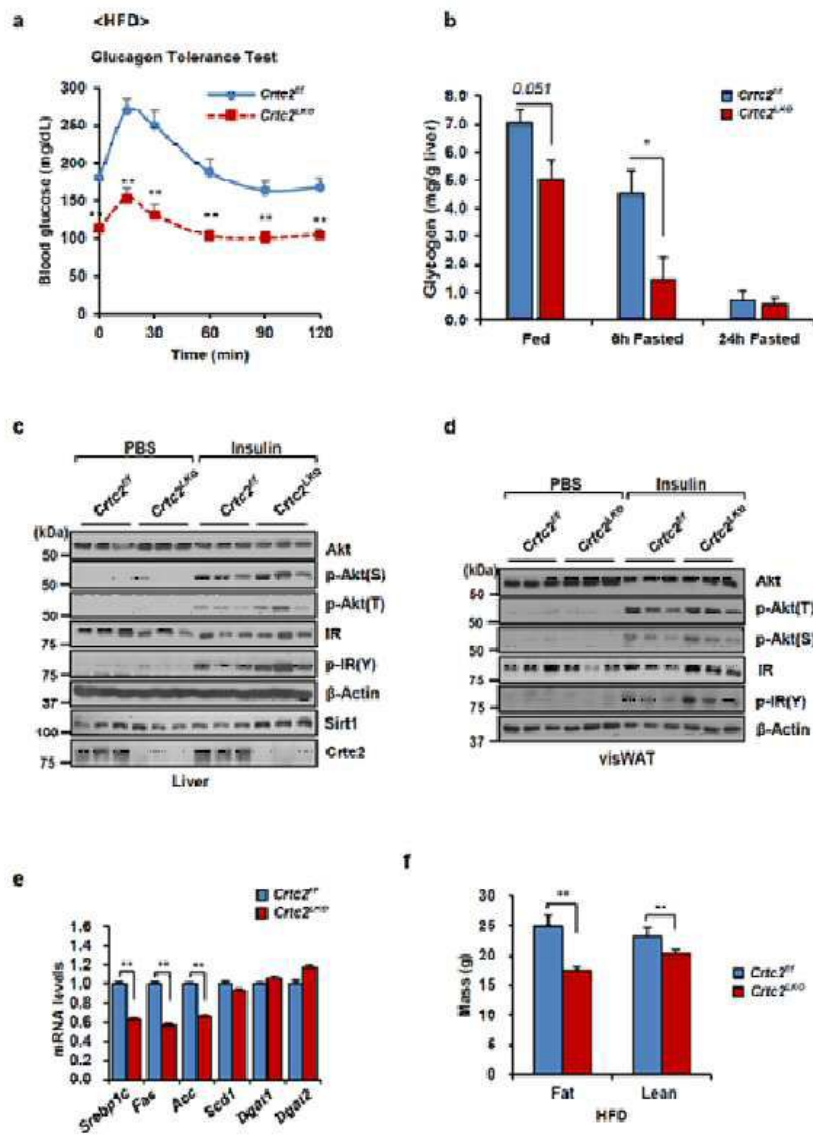
도면3f



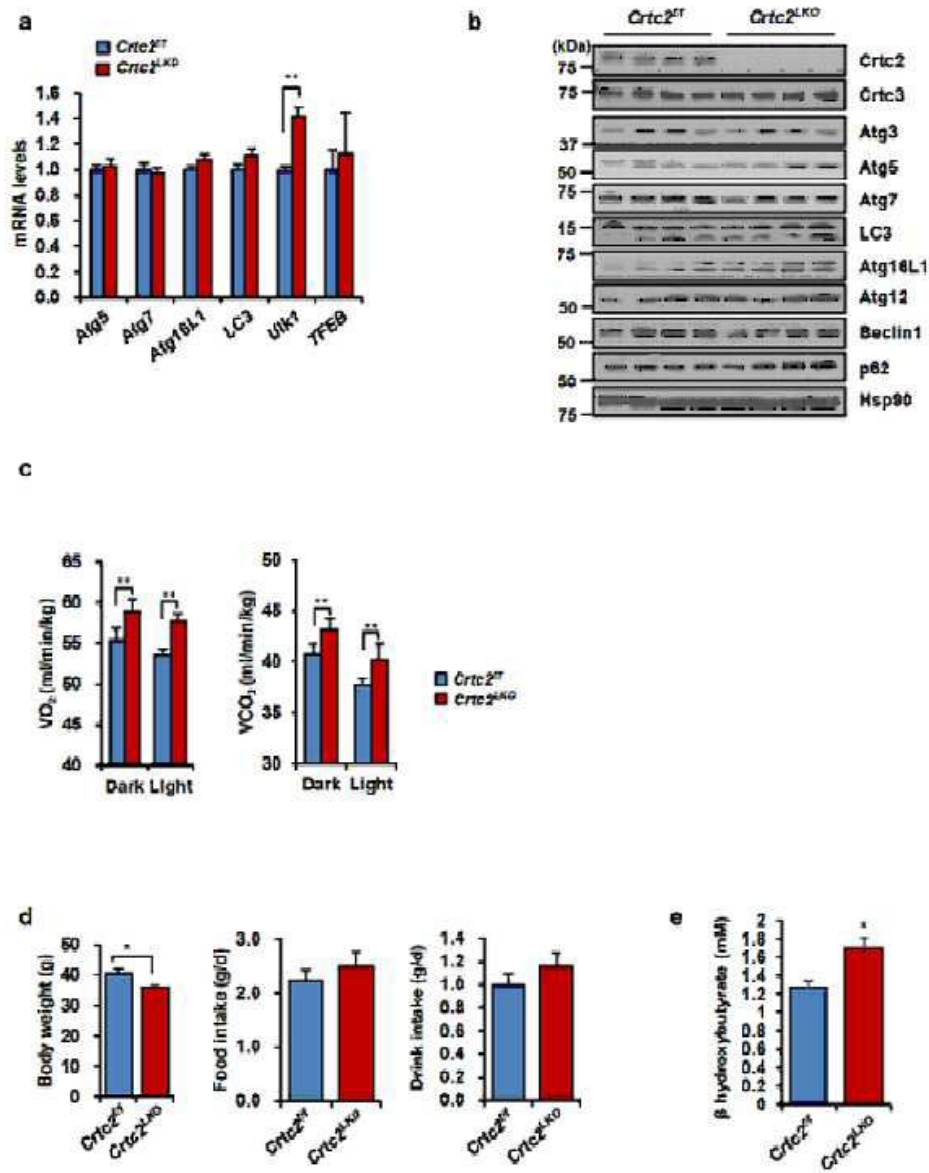
도면3g



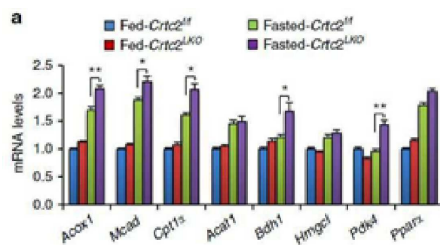
도면4



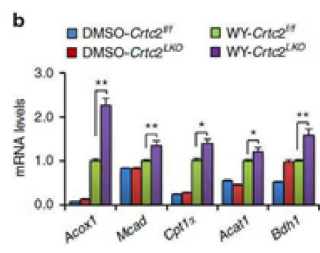
도면5



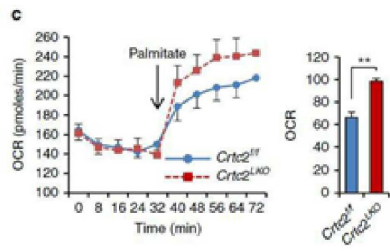
도면6a



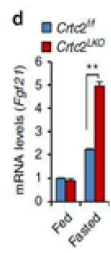
도면6b



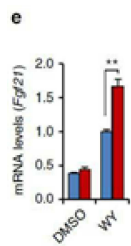
도면6c



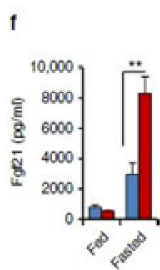
도면6d



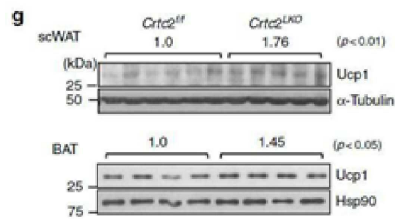
도면6e



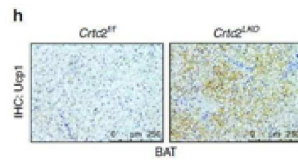
도면6f



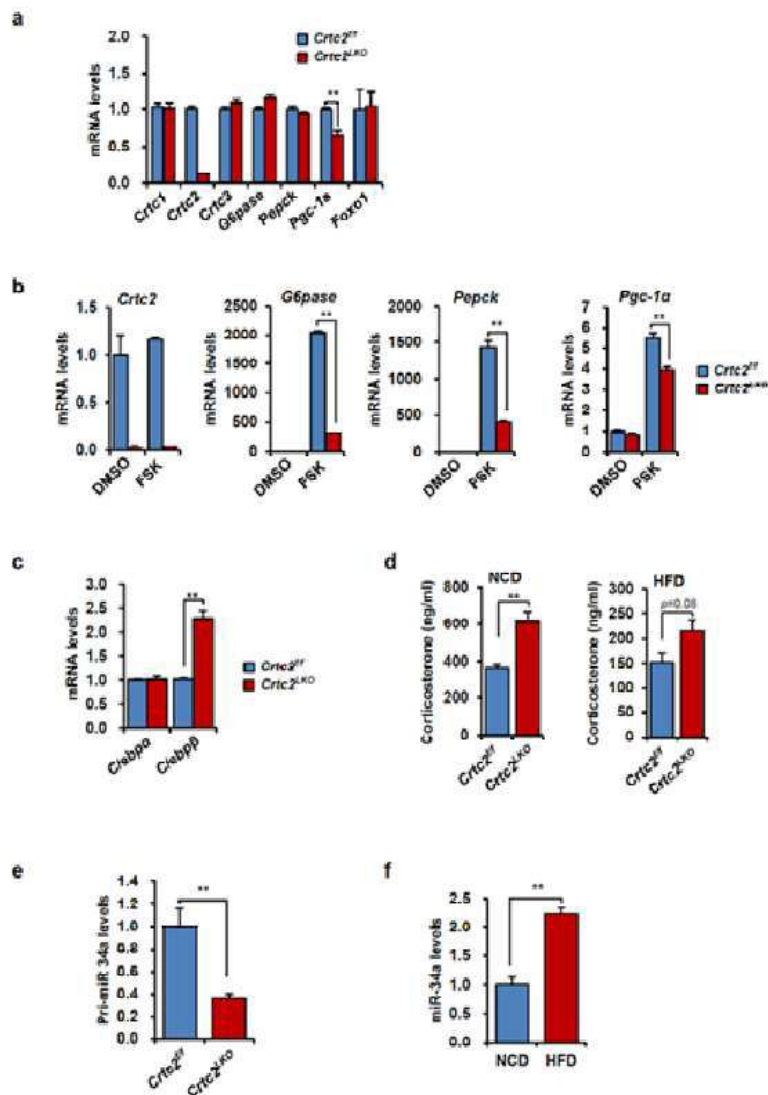
도면6g



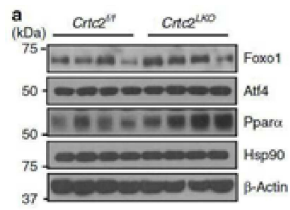
도면6h



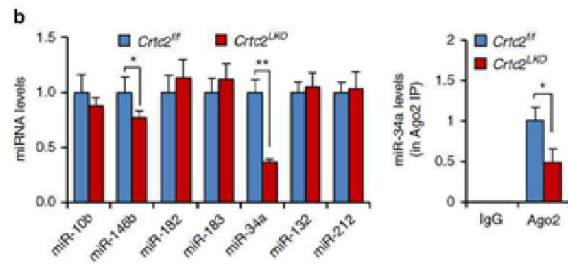
도면7



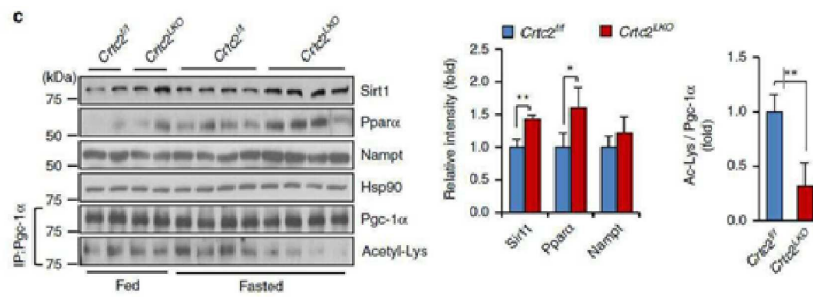
도면8a



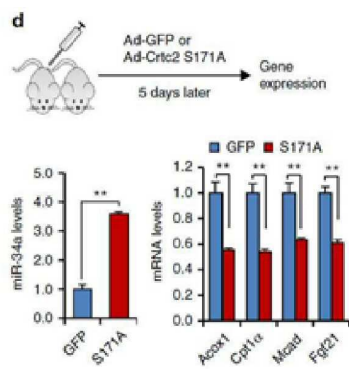
도면8b



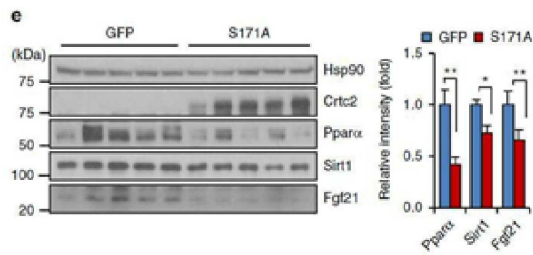
도면8c



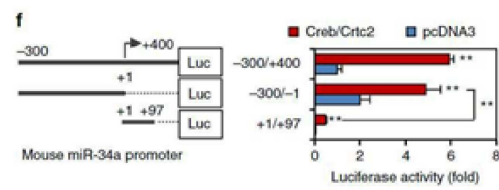
도면8d



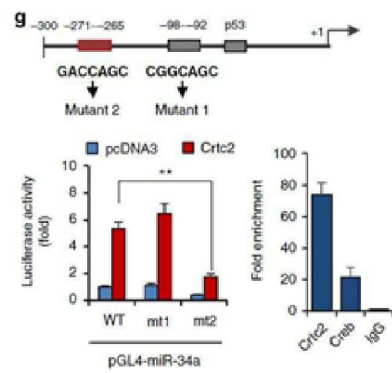
도면8e



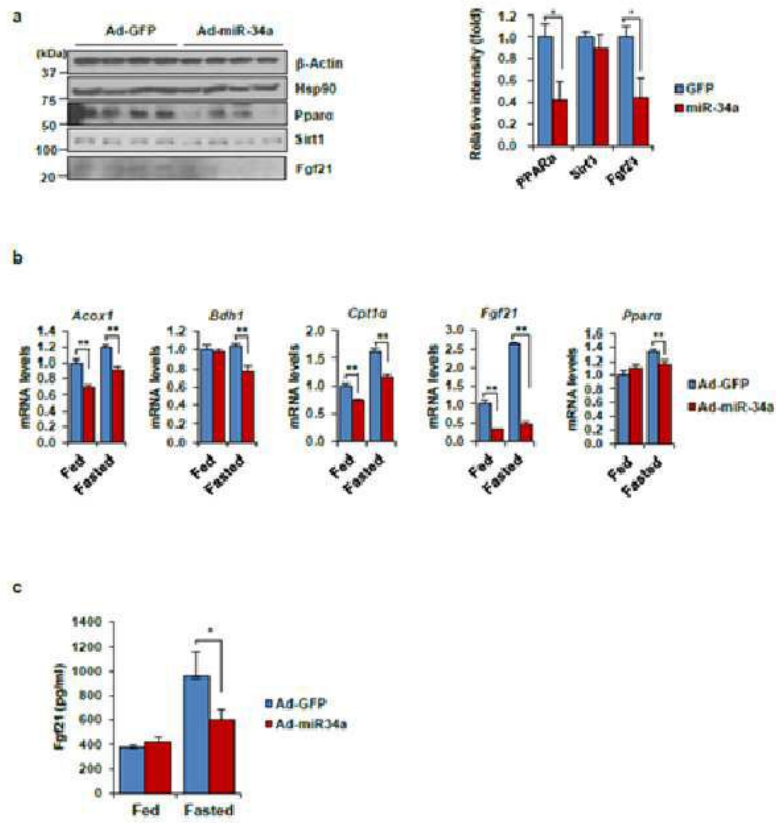
도면8f



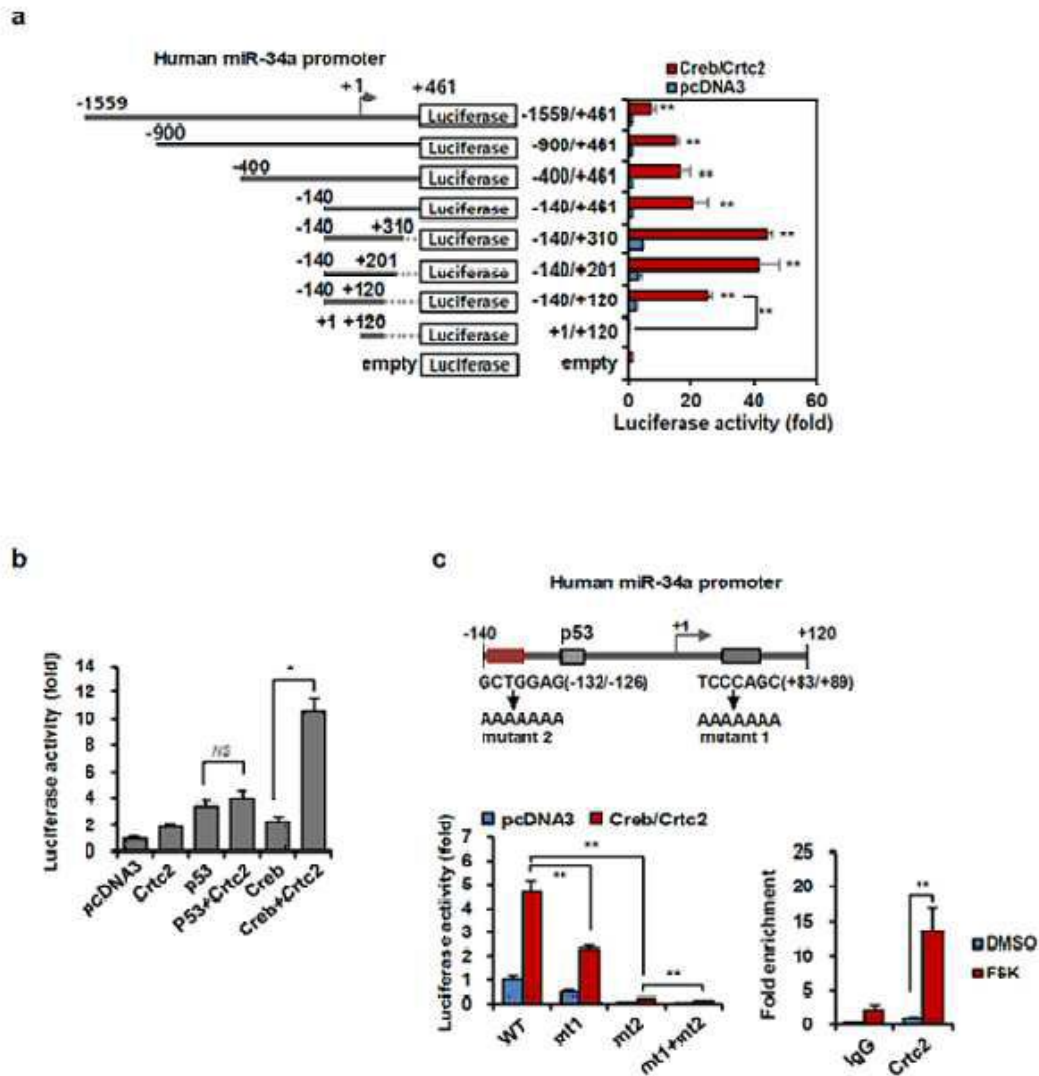
도면8g



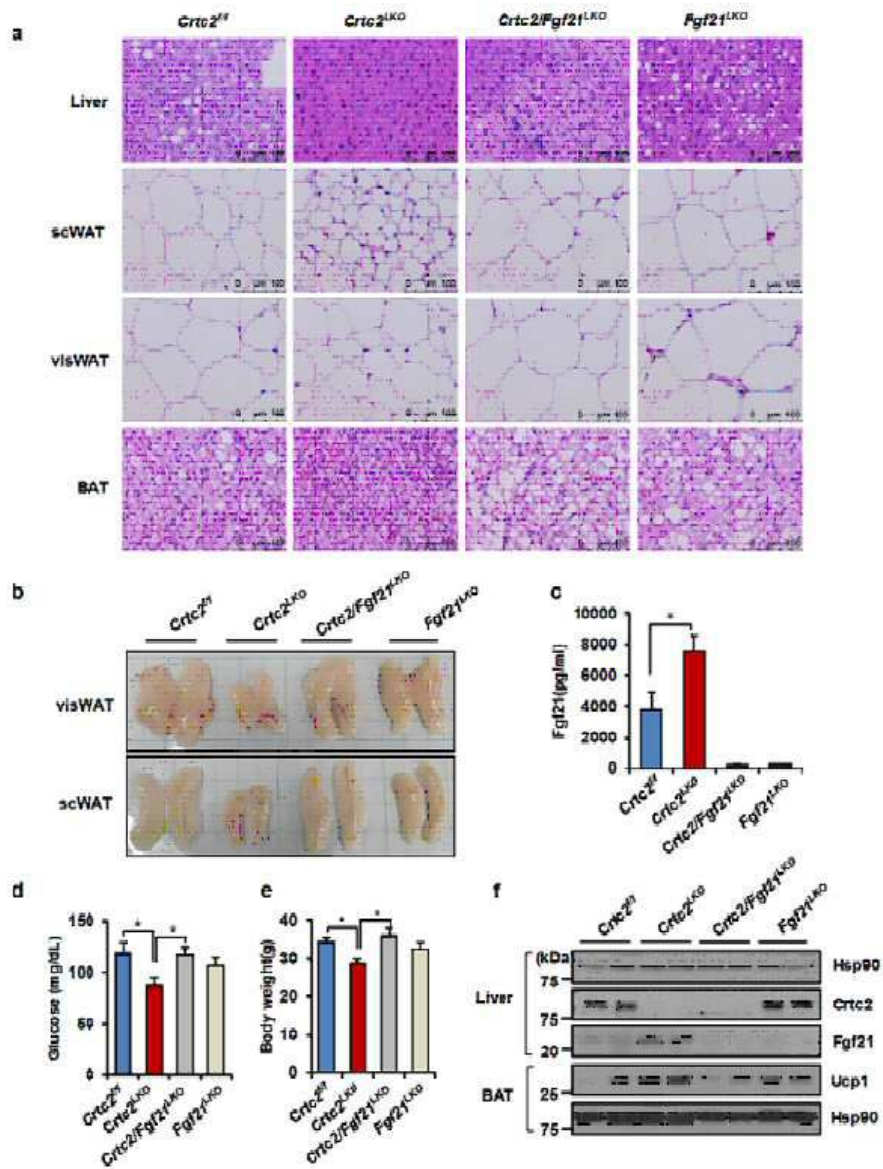
도면9



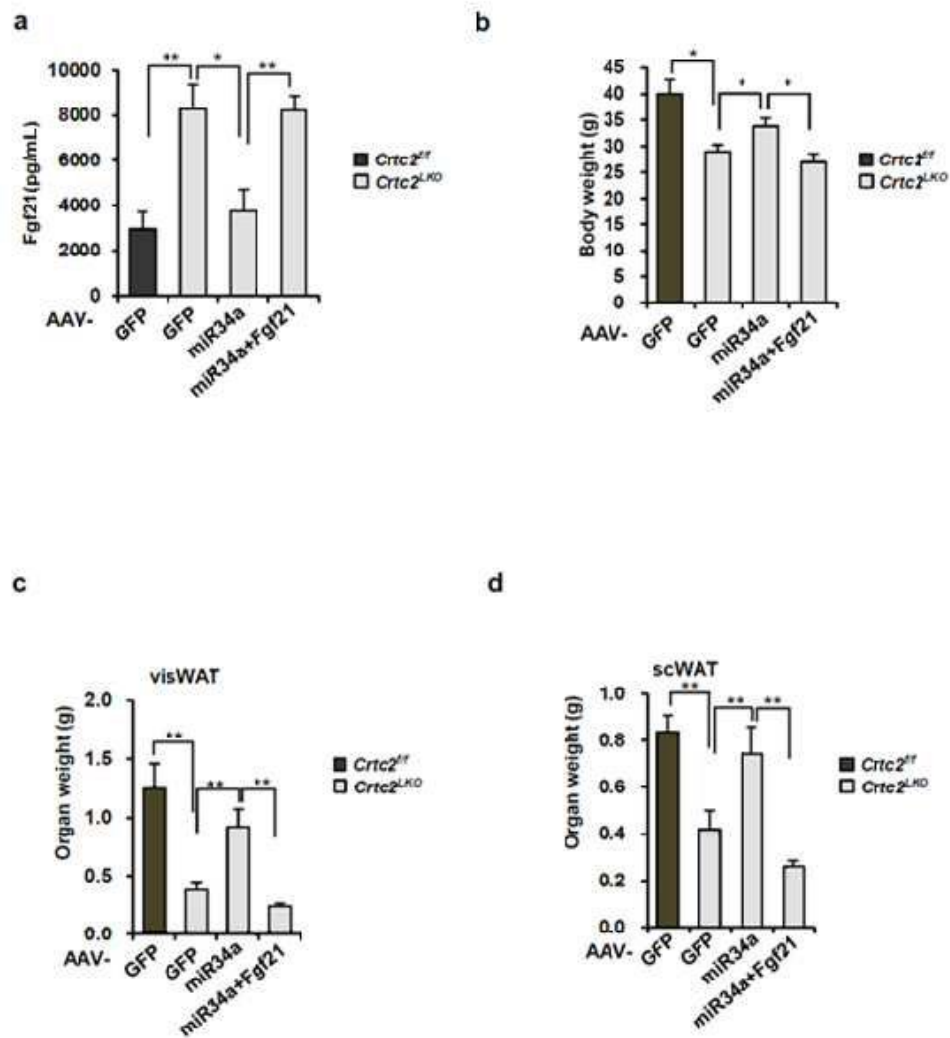
도면10



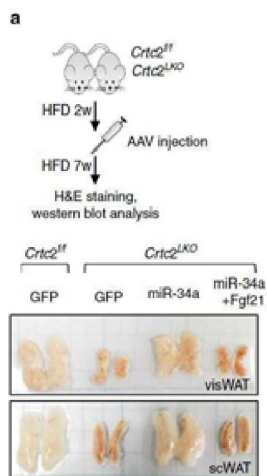
도면11



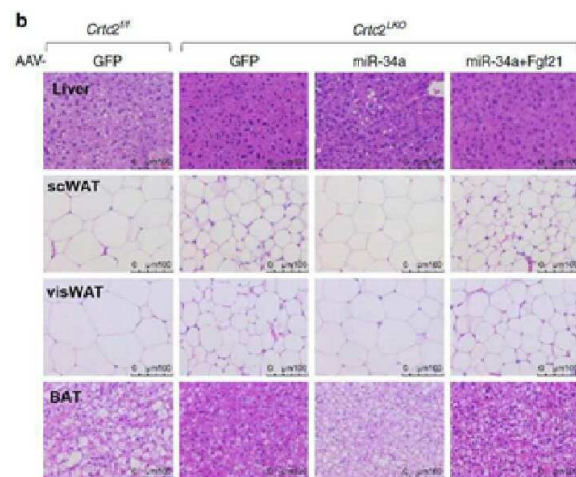
도면12



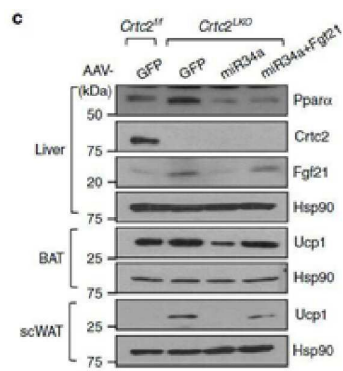
도면13a



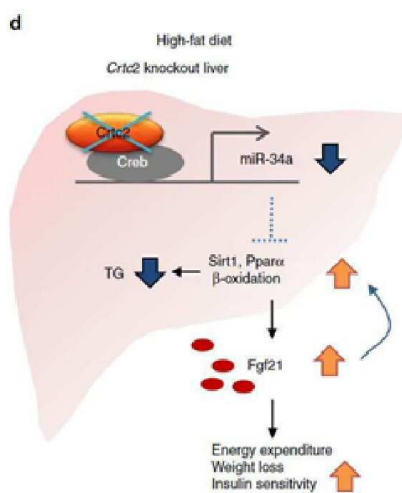
도면13b



도면13c



도면13d



서열 목록

<110> Korea University

<120> Composition for control of fatty liver disease and obesity by

regulating hepatic Crtc2

<130> MP18-070

<160> 12

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 100

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(100)

<223> CREB binding domain (CBD) of Crtc2

<400> 1

Met Ala Thr Ser Gly Ala Asn Gly Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ser Ala

1 5 10 15

Ser Asn Pro Arg Lys Phe Ser Glu Lys Ile Ala Leu Gln Lys Gln Arg

20 25 30

Gln Ala Glu Glu Thr Ala Ala Phe Glu Glu Val Met Met Asp Ile Gly

35 40 45

Ser Thr Arg Leu Gln Ala Gln Lys Leu Arg Leu Ala Tyr Thr Arg Ser

50 55 60

Ser His Tyr Gly Gly Ser Leu Pro Asn Val Asn Gln Ile Gly Cys Gly

65 70 75 80

Leu Ala Glu Phe Gln Ser Pro Leu His Ser Pro Leu Asp Ser Ser Arg

85 90 95

Ser Thr Arg His

100

<210> 2

<211> 301

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> protein_bind

<222> (1)..(301)

<223> CREB binding domain (CBD) of Crtc2

<400> 2
atggcgacgt caggggcgaa cgggccgggt tccgccacag cctcagcgtc caatccacgc 60
aagtttagtg agaagattgc gctgcagaag cagcgtcagg ccgaggagac ggcggccttc 120
gaggaggtga tgatggacat cggctccaca cggttacagg cccaaaaact gcgactggct 180
tatacaagga gctcccatTA tggtggttct ctgcccaatg ttaaccagat tggctgtggc 240

ctggctgagt tccagagccc ccttcactca cctttggatt catctcggag cactcggcac 300
c 301

<210> 3
<211> 93
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> DOMAIN
<222> (1)..(93)
<223> C-terminus's trans-activation domain(TAD) of Crtc2
<400> 3

Asn His Gln Asn Leu Thr His Cys Ser Arg His Gly Ser Gly Pro Asn
1 5 10 15
Ile Ile Leu Thr Gly Asp Ser Ser Pro Gly Phe Ser Lys Glu Ile Ala
20 25 30
Ala Ala Leu Ala Gly Val Pro Gly Phe Glu Val Ser Ala Ser Gly Leu
35 40 45
Glu Leu Gly Leu Gly Leu Glu Asp Glu Leu Arg Met Glu Pro Leu Gly
50 55 60
Leu Glu Gly Leu Thr Met Leu Ser Asp Pro Cys Ala Leu Leu Pro Asp
65 70 75 80
Pro Ala Val Glu Asp Ser Phe Arg Ser Asp Arg Leu Gln
85 90

<210> 4
<211> 282
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220><221> protein_bind

<222> (1)..(282)
 <223> C-terminus's trans-activation domain(TAD) of Crtc2
 <400> 4
 aaccaccaga acttgaccca ctgttcccg ccatggctcag gacctaatat cataactaca 60
 ggagactctt cccaggttt ctctaaggag attgcagcag ccctggctgg agtgcctggc 120
 tttaggtgt cagcatctgg gttggagctg ggctggggc tagaagatga gctgcgcatg 180
 gagccactgg gcctggaagg actaactatg ctgagtgacc cctgtgccct gctgcctgac 240
 cctgctgtgg aggactcatt ccgtagtgat cggctacagt ga 282

<210> 5
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(692)
 <223> Crtc2 protein
 <400> 5

Met Ala Thr Ser Gly Ala Asn Gly Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Arg Lys Phe Ser Glu Lys Ile Ala Leu Gln Lys Gln Arg
 20 25 30
 Gln Ala Glu Glu Thr Ala Ala Phe Glu Glu Val Met Met Asp Ile Gly
 35 40 45
 Ser Thr Arg Leu Gln Ala Gln Lys Leu Arg Leu Ala Tyr Thr Arg Ser
 50 55 60
 Ser His Tyr Gly Gly Ser Leu Pro Asn Val Asn Gln Ile Gly Cys Gly
 65 70 75 80
 Leu Ala Glu Phe Gln Ser Pro Leu His Ser Pro Leu Asp Ser Ser Arg
 85 90 95
 Ser Thr Arg His His Gly Leu Val Glu Arg Val Gln Arg Asp Ala Arg
 100 105 110
 Arg Met Val Ser Pro Leu Arg Arg Tyr Pro Arg His Ile Asp Ser Ser
 115 120 125

Pro Tyr Ser Pro Ala Tyr Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Gly Trp Arg
130 135 140

Arg Met Met Pro Trp Gly Asn Leu Pro Ala Glu Lys Gly Gln Leu Phe
145 150 155 160

Arg Leu Pro Ser Ala Leu Asn Arg Thr Ser Ser Asp Ser Ala Leu His
165 170 175

Thr Ser Val Met Asn Pro Asn Pro Gln Asp Thr Tyr Pro Gly Pro Thr
180 185 190

Pro Pro Ser Val Leu Pro Ser Arg Arg Gly Gly Gly Phe Leu Asp Gly
195 200 205

Glu Met Asp Ala Lys Val Pro Ala Ile Glu Glu Asn Val Val Asp Asp
210 215 220

Lys His Leu Leu Lys Pro Trp Asp Ala Lys Lys Leu Ser Ser Ser Ser
225 230 235 240

Ser Arg Pro Arg Ser Cys Glu Val Pro Gly Ile Asn Ile Phe Pro Ser
245 250 255

Pro Asp Gln Pro Ala Asn Val Pro Val Leu Pro Pro Ala Met Asn Thr
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Pro Asp Leu Thr Asn Leu His Phe Pro Pro Pro Leu
275 280 285

Pro Thr Pro Leu Asp Pro Glu Glu Thr Val Tyr Pro Ser Leu Ser Gly
290 295 300

Gly Asn Ser Thr Thr Asn Leu Thr His Thr Met Thr His Leu Gly Ile
305 310 315 320

Ser Gly Gly Leu Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Asp Val Pro Gly Leu His
325 330 335

Ser Pro Leu Ser His Pro Ser Leu Gln Ser Ser Leu Ser Asn Pro Asn
340 345 350

Leu Gln Ala Ser Leu Ser Ser Pro Gln Pro Gln Leu Gln Gly Ser His
355 360 365

Ser His Pro Ser Leu Pro Ala Ser Ser Leu Ala His His Ala Leu Pro
370 375 380

Thr Thr Ser Leu Gly His Pro Ser Leu Ser Ala Pro Ala Leu Ser Ser
385 390 395 400
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Leu Ser Ala Pro Pro
405 410 415
Tyr Pro Ala Ser Thr Pro Gly Ala Ser Pro Arg His Arg Arg Val Pro
420 425 430
Leu Ser Pro Leu Ser Leu Pro Ala Gly Pro Ala Asp Ala Arg Arg Ser
435 440 445
Gln Gln Gln Leu Pro Lys Gln Phe Ser Pro Thr Met Ser Pro Thr Leu
450 455 460
Ser Ser Ile Thr Gln Gly Val Pro Leu Asp Thr Ser Lys Leu Pro Thr
465 470 475 480
Asp Gln Arg Leu Pro Pro Tyr Pro Tyr Ser Pro Pro Ser Leu Val Ile
485 490 495
Pro Thr His Pro Pro Thr Pro Lys Ser Leu Gln Gln Leu Pro Ser Gln
500 505 510
Ala Cys Leu Val Gln Pro Ser Gly Gly Gln Pro Pro Gly Arg Gln Pro
515 520 525
His Tyr Gly Ala Leu Tyr Pro Pro Gly Ser Ser Gly His Gly Gln Gln
530 535 540
Pro Tyr His Arg Pro Ile Asn Asp Phe Ser Leu Gly Asn Leu Glu Gln
545 550 555 560
Phe Asn Met Glu Ser Pro Ser Thr Ser Leu Val Leu Asp Pro Pro Ala
565 570 575
Phe Ser Glu Gly Pro Gly Phe Leu Gly Ser Glu Gly Ser Met Ser Gly
580 585 590
Pro Gln Asp Pro His Val Leu Asn His Gln Asn Leu Thr His Cys Ser
595 600 605
Arg His Gly Ser Gly Pro Asn Ile Ile Leu Thr Gly Asp Ser Ser Pro
610 615 620
Gly Phe Ser Lys Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ala Gly Val Pro Gly Phe

625 630 635 640
 Glu Val Ser Ala Ser Gly Leu Glu Leu Gly Leu Gly Leu Glu Asp Glu
 645 650 655
 Leu Arg Met Glu Pro Leu Gly Leu Glu Gly Leu Thr Met Leu Ser Asp
 660 665 670
 Pro Cys Ala Leu Leu Pro Asp Pro Ala Val Glu Asp Ser Phe Arg Ser
 675 680 685
 Asp Arg Leu Gln

690
 <210> 6
 <211> 2079
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220><221> gene
 <222> (1)..(2079)
 <223> Crtc2 cDNA
 <400> 6
 atggcgacgt cagggggcgaa cgggcccgggt tccgccacag cctcagcgtc caatccacgc 60
 aagtttagtg agaagattgc gctgcagaag cagcgtcagg ccgaggagac ggcggccttc 120
 gaggaggtga tgatggacat cggctccaca cggttacagg ccaaaaaact gcgactggct 180
 tatacaagga gtcgccatta tgggtggttct ctgcccaatg ttaaccagat tggctgtggc 240
 ctggctgagt tccagagccc ctttactca cttttggatt catctcggag cactcggcac 300
 catgggttgg tggaacgggt acaacgagat gcccgagaa tgggtgtccc actccgccga 360
 taccgccgc acattgacag ttctccatat agccctgcct atttatctcc tccccagag 420
 tctggctggc gaaggatgat gccctggggc aacctcccag ctgagaaggg gcagttgttt 480
 agactgccgt ctgcacttaa caggacaagc tctgactctg ctcttcacac aagtgtgatg 540
 aacctaaacc ccaagacac ttatccaggc ccacacctc ccagtgctct gccagccgc 600
 cgaggaggag gttttctgga tggtagatg gatgctaaag tcctgctat taggagaac 660
 gtggtagatg acaagcatct gctgaaacct tgggatgcta agaagctgtc ctcatcttcc 720
 tctcgacctc gatcctgtga agtccctgga atcaacatct ttccatctcc tgaccagcct 780
 gctaattgtc ctgtcctccc acctgccatg aacacaggag gctccctacc tgacctcacc 840
 aacctacact tcctcctcc actgccaca ccctggacc ctgaggagac agtctatccc 900

agcctgagtg ggggcaacag taccaccaat ttgaccata ctatgacca ttgggcatc 960
 agtggaggtc tgggcttggg cccagctat gatgtaccag gacttcactc acctcttagc 1020
 caccatccc tgcagtcctc cctaagcaat cccaacctcc aggccttcct aagtagtctt 1080
 caaccccagc tccagggtc ccatagtcac ccatcactgc ctgcctctc cttggccac 1140

catgcactgc ccaccactc cctgggccc cgtcactta gtgcccagc ctttctctc 1200
 tctcttctt cttcgtccac ttcactctt gtcctgagt cteccctta cccagcttct 1260
 actcctgggg cctctcccg ccaccgtct gtgcccctca gcccctgag cttgcccgcg 1320
 ggcccagcg acgcagaag gtccaacag cagctgcca aacagtttc gccacaatg 1380
 tcaccacct tgccttccat cactcagggc gttcccttg ataccagta attgcctact 1440
 gaccagcat tgcaccata cccatatac ccccaagtc tagttatac caccatcca 1500
 cccacccaa agtctctaca gcagttgcc tctcaggcct gcttagtgca gcctcaggt 1560

ggacagcctc caggcaggca gccacattat ggggcaactg acccacctgg gtccagtga 1620
 catgggcaac agccttacc cgcaccaata aatgacttca gcttggggaa tctggagcaa 1680
 ttcaaatgg agagccatc aaccagcctg gtgctggatc cccctgcctt ttctgaaggt 1740
 cctggatctt tagggagtga gggatcaatg agtggccccc aggaccctca cgtcctcaac 1800
 caccagaact tgaccactg ttcccgccat ggctcaggac ctaatatcat actcacagga 1860
 gactcttccc caggtttctc taaggagatt gcagcagccc tggttgaggt gcctggcttt 1920
 gaggtgtcag catctgggtt ggagctgggc ctggggctag aagatgagct gcgcatggag 1980

ccactgggcc tggaaggact aactatctg agtgaccct gtgccctgct gcctgaccct 2040
 gctgtggagg actcattccg tagtgatcgg ctacagtga 2079

<210> 7

<211> 693

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(693)

<223> Crtc2 protein (NP_859066.1)

<400> 7

Met Ala Thr Ser Gly Ala Asn Gly Pro Gly Ser Ala Thr Ala Ser Ala

1 5 10 15

Ser Asn Pro Arg Lys Phe Ser Glu Lys Ile Ala Leu Gln Lys Gln Arg

20 25 30
 Gln Ala Glu Glu Thr Ala Ala Phe Glu Glu Val Met Met Asp Ile Gly
 35 40 45
 Ser Thr Arg Leu Gln Ala Gln Lys Leu Arg Leu Ala Tyr Thr Arg Ser
 50 55 60
 Ser His Tyr Gly Gly Ser Leu Pro Asn Val Asn Gln Ile Gly Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Ala Glu Phe Gln Ser Pro Leu His Ser Pro Leu Asp Ser Ser Arg
 85 90 95

 Ser Thr Arg His His Gly Leu Val Glu Arg Val Gln Arg Asp Pro Arg
 100 105 110
 Arg Met Val Ser Pro Leu Arg Arg Tyr Thr Arg His Ile Asp Ser Ser
 115 120 125
 Pro Tyr Ser Pro Ala Tyr Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Trp Arg
 130 135 140
 Arg Thr Met Ala Trp Gly Asn Phe Pro Ala Glu Lys Gly Gln Leu Phe
 145 150 155 160
 Arg Leu Pro Ser Ala Leu Asn Arg Thr Ser Ser Asp Ser Ala Leu His

 165 170 175
 Thr Ser Val Met Asn Pro Ser Pro Gln Asp Thr Tyr Pro Gly Pro Thr
 180 185 190
 Pro Pro Ser Ile Leu Pro Ser Arg Arg Gly Gly Ile Leu Asp Gly Glu
 195 200 205
 Met Asp Pro Lys Val Pro Ala Ile Glu Glu Asn Leu Leu Asp Asp Lys
 210 215 220
 His Leu Leu Lys Pro Trp Asp Ala Lys Lys Leu Ser Ser Ser Ser Ser
 225 230 235 240

 Arg Pro Arg Ser Cys Glu Val Pro Gly Ile Asn Ile Phe Pro Ser Pro
 245 250 255
 Asp Gln Pro Ala Asn Val Pro Val Leu Pro Pro Ala Met Asn Thr Gly
 260 265 270
 Gly Ser Leu Pro Asp Leu Thr Asn Leu His Phe Pro Pro Pro Leu Pro

275 280 285
 Thr Pro Leu Asp Pro Glu Glu Thr Ala Tyr Pro Ser Leu Ser Gly Gly
 290 295 300
 Asn Ser Thr Ser Asn Leu Thr His Thr Met Thr His Leu Gly Ile Ser

 305 310 315 320
 Arg Gly Met Gly Leu Gly Pro Gly Tyr Asp Ala Pro Gly Leu His Ser
 325 330 335
 Pro Leu Ser His Pro Ser Leu Gln Ser Ser Leu Ser Asn Pro Asn Leu
 340 345 350
 Gln Ala Ser Leu Ser Ser Pro Gln Pro Gln Leu Gln Gly Ser His Ser
 355 360 365
 His Pro Ser Leu Pro Ala Ser Ser Leu Ala Arg His Val Leu Pro Thr
 370 375 380

 Thr Ser Leu Gly His Pro Ser Leu Ser Ala Pro Ala Leu Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Leu Gly Ala Pro Ser Tyr
 405 410 415
 Pro Ala Ser Thr Pro Gly Ala Ser Pro His His Arg Arg Val Pro Leu
 420 425 430
 Ser Pro Leu Ser Leu Leu Ala Gly Pro Ala Asp Ala Arg Arg Ser Gln
 435 440 445
 Gln Gln Leu Pro Lys Gln Phe Ser Pro Thr Met Ser Pro Thr Leu Ser

 450 455 460
 Ser Ile Thr Gln Gly Val Pro Leu Asp Thr Ser Lys Leu Ser Thr Asp
 465 470 475 480
 Gln Arg Leu Pro Pro Tyr Pro Tyr Ser Ser Pro Ser Leu Val Leu Pro
 485 490 495
 Thr Gln Pro His Thr Pro Lys Ser Leu Gln Gln Pro Gly Leu Pro Ser
 500 505 510
 Gln Ser Cys Ser Val Gln Ser Ser Gly Gly Gln Pro Pro Gly Arg Gln
 515 520 525

Ser His Tyr Gly Thr Pro Tyr Pro Pro Gly Pro Ser Gly His Gly Gln
530 535 540
Gln Ser Tyr His Arg Pro Met Ser Asp Phe Asn Leu Gly Asn Leu Glu
545 550 555 560
Gln Phe Ser Met Glu Ser Pro Ser Ala Ser Leu Val Leu Asp Pro Pro
565 570 575
Gly Phe Ser Glu Gly Pro Gly Phe Leu Gly Gly Glu Gly Pro Met Gly
580 585 590
Gly Pro Gln Asp Pro His Thr Phe Asn His Gln Asn Leu Thr His Cys

595 600 605
Ser Arg His Gly Ser Gly Pro Asn Ile Ile Leu Thr Gly Asp Ser Ser
610 615 620
Pro Gly Phe Ser Lys Glu Ile Ala Ala Ala Leu Ala Gly Val Pro Gly
625 630 635 640
Phe Glu Val Ser Ala Ala Gly Leu Glu Leu Gly Leu Gly Leu Glu Asp
645 650 655
Glu Leu Arg Met Glu Pro Leu Gly Leu Glu Gly Leu Asn Met Leu Ser
660 665 670

Asp Pro Cys Ala Leu Leu Pro Asp Pro Ala Val Glu Glu Ser Phe Arg
675 680 685
Ser Asp Arg Leu Gln
690

<210> 8

<211> 2082

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> gene

<222> (1)..(2082)

<223> Crtc2 cDNA(NM_181715.2)

<400> 8

atggcgacgt cgggggcgaa cgggcctggt tcggccacgg cctcggttc caatcgcgc 60

aaatttagtg agaagattgc gctgcagaag cagcgtcagg ccgaggagac ggccggccttc 120

gaggaggatga tgatggacat cggctccacc cggttacagg cccaaaaact gcgactggca	180
tacacaagga gctctcatta tgggtgggtct ctgccaatg ttaaccagat tggctctggc	240
ctggccgagt tccagagccc cctccactca cctttggatt catctcggag cactcggcac	300
catgggctgg tggaacgggt gcagcgagat cctcgaagaa tgggtgtccc acttcgccga	360
tacacccgcc acattgacag ctctccctat agtctgcct acttatctcc tccccagag	420
tctagctggc gaaggacgat ggcctggggc aatttcctg cagagaaggg gcagttgttt	480
cgactacat ctgcactta caggacaagc tctgactctg cccttcatac aagtgtgatg	540
aacccagtc cccaggatac ctaccaggc cccacacctc ccagcatcct gccagccga	600
cgtaggggta ttctggatgg tgaaatggac cccaaagtac ctgctattga ggagaacttg	660
ctagatgaca agcatttct gaagccatgg gatgctaaga agctatctc atcctcttc	720
cgacctgggt cctgtgaagt ccctggaatt aacatcttc catctctga ccagcctgcc	780
aatgtgcctg tctcccacc tgccatgaac acggggggct ccctacctga cctcaccaac	840
ctgcacttc cccaccact gccaccccc ctggacctg aagagacagc ctaccctagc	900
ctgagtgggg gcaacagtac ctccaattg accacacca tgactcacct gggcatcagc	960
aggggcatgg gcctggggcc aggtatgat gcaccaggac ttattcacc tctcagccac	1020
ccatccctgc agtctccct aagcaatcc aacctcagg ctccctgag cagtctcag	1080
ccccagcttc agggctccca cagccacccc tctctgcctg cctctcctt ggcccgccat	1140
gtactgccc ccacctccct ggccacccc tactcagtg ctccggctct ctctctctc	1200
tctctctct cctccactc atctctgtt ttgggcgccc cctcttacc tgcttctacc	1260
cctggggcct cccccacca ccgccgtgtg ccctcagcc cctgagttt gctcgcgggc	1320
ccagccgacg ccagaaggtc ccaacagcag ctgcccacac agttttcgcc aacaatgtca	1380
cccaccttgt ctccatcac tcagggcgtc ccctggata ccagtaaact gtccactgac	1440
cagcggttac cccataccc atacagctcc ccaagtctgg ttctgcctac ccagccccc	1500
accccaaagt ctctacagca gccagggtg ccctctcagt cttgttcagt gcagtcctca	1560
ggtgggcagc cccaggcag gcagctcat tatgggacac cgtaccacc tgggccagat	1620
gggcatgggc aacagtctta ccaccggcca atgagtgact tcaacctggg gaatctggag	1680
cagttcagca tggagagccc atcagccagc ctggtgtctg atccctctgg cttttctgaa	1740
gggcctggat ttttaggggg tgaggggcca atgggtggcc cccaggatcc ccacacctc	1800
aaccaccaga acttgaccca ctgttcccgc catggctcag ggcctaacat catctcaca	1860

ggggactcct ctccaggttt ctctaaggag attgcagcag ccctggccgg agtgcctggc 1920
 tttagagtggt cagcagctgg attggagcta gggcttgggc tagaagatga gctgcgcatg 1980
 gagccactgg gcctggaagg gctaaacatg ctgagtgacc cctgtgccct gctgcctgat 2040
 cctgctgtgg aggagtcatt ccgcagtgac cggtccaat ga 2082

<210> 9

<211> 210

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(210)

<223> Fgf21 protein (NP_064397.1)

<400> 9

Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg

1	5	10	15
Leu	Leu	Leu	Ala
Val	Phe	Leu	Leu
Gly	Val	Tyr	Gln
Ala	Tyr	Pro	Ile
20	25	30	
Pro	Asp	Ser	Ser
Pro	Leu	Leu	Gln
Phe	Gly	Gly	Gln
Val	Arg	Gln	Arg
35	40	45	
Tyr	Leu	Tyr	Thr
Asp	Asp	Asp	Gln
Asp	Gln	Asp	Thr
Glu	Ala	His	Leu
Glu	Ile		
50	55	60	
Arg	Glu	Asp	Gly
Thr	Val	Val	Gly
Ala	Ala	His	Arg
Ser	Pro	Glu	Ser
65	70	75	80

Leu	Leu	Glu	Leu
Lys	Ala	Leu	Lys
Pro	Gly	Val	Ile
Gln	Ile	Leu	Gly
85	90	95	
Val	Lys	Ala	Ser
Arg	Phe	Leu	Cys
Gln	Gln	Pro	Asp
Gly	Ala	Leu	Tyr
100	105	110	
Gly	Ser	Pro	His
Phe	Asp	Pro	Glu
Ala	Cys	Ser	Phe
Arg	Glu	Leu	Leu
115	120	125	
Leu	Glu	Asp	Gly
Tyr	Asn	Val	Tyr
Gln	Ser	Glu	Ala
His	Gly	Leu	Pro
130	135	140	
Leu	Arg	Leu	Pro
Gln	Lys	Asp	Ser
Pro	Asn	Gln	Asp
Ala	Thr	Ser	Trp

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln
165 170 175
Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
180 185 190
Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
195 200 205
Ala Ser

210

<210> 10

<211> 633

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> gene

<222> (1)..(633)

<223> Fgf21 cDNA(NM_020013.4)

<400> 10

atggaatgga tgagatctag agttgggacc ctgggactgt gggtcgact gctgctggct 60
gtcttcctgc tgggggtcta ccaagcatac cccatccctg actccagccc cctcctccag 120
tttgggggtc aagtcggca gaggtacctc tacacagatg acgaccaaga cactgaagcc 180
cacctggaga tcagggagga tggaacagtg gtaggcgcag cacaccgcag tccagaaagt 240
ctcctggagc tcaaagcctt gaagccaggg gtcattcaaa tcctgggtgt caaagcctct 300
aggtttcttt gccaacagcc agatggagct ctctatggat cgcctcactt tgatcctgag 360

gcctgcagct tcagagaact gctgctggag gacggttaca atgtgtacca gtctgaagcc 420
catggcctgc cctgcgctc gcctcagaag gactcccaa accaggatgc aacatcctgg 480
ggacctgtgc gcttctgcc catgccaggc ctgctccacg agccccaaga ccaagcagga 540
ttcctgcccc cagagccccc agatgtgggc tcctctgacc ccctgagcat ggtagagcct 600
ttacagggcc gaagccccag ctatgcgtcc tga 633

<210> 11

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(209)

<223

> Fibroblast growth factor 21 protein (AAH18404.1)

<400> 11

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro

20 25 30

Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr

35 40 45

Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg

50 55 60

Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu

65 70 75 80

Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val

85 90 95

Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly

100 105 110

Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu

115 120 125

Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu

130 135 140

His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly

145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu

165 170 175

Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp

180 185 190

Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala

195 200 205

Ser

<210> 12

<211> 630
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> gene
 <222> (1)..(630)
 <223> fibroblast growth factor 21 (FGF21) cDNA (NM_019113.3)
 <400> 12

atggactcgg acgagaccgg gttcgagcac tcaggactgt gggtttctgt gctggctggt	60
cttctgctgg gagcctgcc ggacaccccc atccctgact ccagtcctct cctgcaattc	120
gggggccaag tccggcagcg gtacctctac acagatgatg cccagcagac agaagccac	180
ctggagatca gggaggatgg gacggtgggg ggcgctgctg accagagccc cgaaagtctc	240
ctgcagctga aagccttgaa gccgggagtt attcaaattt tgggagtcaa gacatccagg	300
ttcctgtgcc agcgccaga tggggccctg tatggatcgc tccactttga cctgaggcc	360
tgcagcttcc gggagctgct tcttgaggac ggatacaatg tttaccagtc cgaagccac	420
ggcctcccgc tgcacctgcc agggacaacag tccccacacc gggaccctgc accccgagga	480
ccagctcgct tctgccaact accaggcctg cccccgcac tcccggagcc acccggaatc	540
ctggccccc agcccccca tgtgggctcc tcggaccctc tgagcatggt gggaccttcc	600
cagggccgaa gccccagcta cgcttctga	630