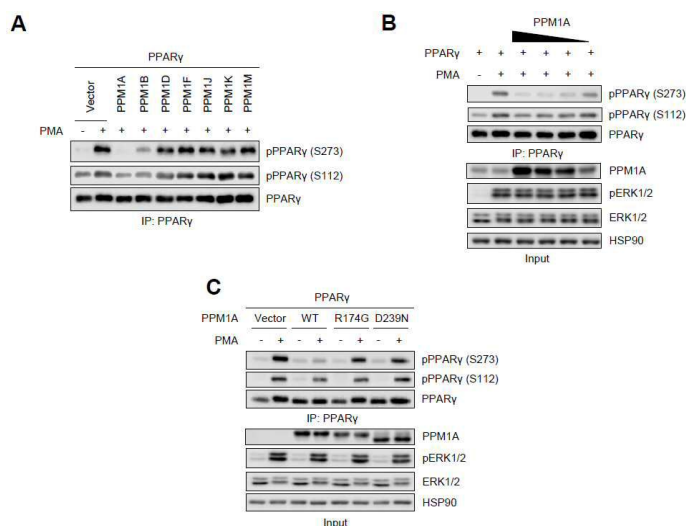


- 전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 PPM1A를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 치료 또는 예방용 조성물

본 발명은 PPM1A(Protein phosphatase 1A)을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 PPM1A는 PPAR γ 의 Ser273 잔기를 직접 탈인산화(dephosphorylation) 시킴으로써 비만 또는 당뇨병 등의 대사성 질환 치료 또는 예방에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 3/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711097566
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	지방세포분화 및 리모델링 기전 규명
기 여 율	30/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2019.07.20 ~ 2020.03.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711086908
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	당뇨 유발 핵심단백질인 Thrap3의 기능 규명을 통한 생체에너지 대사제어 기술 구축
기 여 율	40/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465027600
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구자주도질병극복연구(R&D)
연구과제명	PPAR γ 인산화 의존적 지방세포 리모델링을 통한 대사질환 치료물질 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 프로테인 포스파타아제 1A는 PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린 잔기 내 인산을 직접 탈인산화 하는 것을 특징으로 하는, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고지혈증, 고중성지방혈증, 간질환, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색, 심혈관질환, 과혈당증, 인슐린 저항성 질환 및 과인슐린혈증으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 대사성질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는, 대사성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 포함하는, PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 시약조성물.

청구항 6

프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내(in vitro) PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 PPM1A는 PPAR γ 의 Ser273 잔기를 직접 탈인산화(dephosphorylation)시킴으로써 비만 또는 당뇨병 등의 대사성 질환 치료 또는 예방에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0003] 전 세계적으로 만성 질환, 특히 비만, 당뇨 등의 대사성 질환에 대한 연구가 큰 주목을 받고 있는 가운데, 대사성 질환의 주된 형태로 나타나는 제2형 당뇨병을 극복하기 위한 신약 개발 연구에 많은 관심과 투자가 이루어지고 있다.
- [0004] PPAR 감마(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)는 리간드에 의해 활성화되는 핵 내 호르몬 수용체 상과(superfamily)에 속하는 전사인자로서 지방세포 분화 및 지질, 염증, 당의 항상성에 관여하는 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다. 현재 당뇨병 치료제로 널리 사용되고 있는 thiazolidinediones(TZDs) 계열의 화합물은 PPAR γ 의 리간드로서, PPAR γ 에 선택적으로 작용하여 인슐린 감수성을 향상시킨다. 하지만 이러한 TZDs 계열의 약들은 PPAR γ 의 활성을 증가시켜 생체 인슐린 저항성을 완화시키지만, 여러 부작용을 일으키는 유전자의 발현도 함께 조절하여 우혈성 심부전, 부종, 비만, 골절 등의 부작용을 동반하는 것으로 나타나 그 사용이 점차 제한되고 있어 새로운 당뇨병 치료제의 개발이 필요하다.
- [0005] 최근 연구를 통해 PPAR γ 의 Ser273 잔기의 인산화가 당뇨의 발병과 밀접한 연관이 있으며, 인산화를 억제하는 물질들이 PPAR γ 의 활성과는 무관하게 항당뇨 효과를 보인다는 것이 밝혀진바 있다.
- [0006] 본 연구에서는 비만 또는 당뇨 발병 및 치료제 개발의 새로운 타겟으로서 'PPAR γ 의 Ser273 잔기 인산화 조절'이라는 새로운 방향을 제시하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) (0001) 일본공개특허 제2010-510797호(2008.06.05 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에, 본 발명에서는 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 포함하는 PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린(Serine 273) 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 시약조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(in vitro) PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린(Serine 273) 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 PPAR γ 의 Ser273 잔기를 직접 탈인산화시키는 탈인산화효소로서 PPM1A를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물에 대한 것으로, 지방 생성 과정에서 PPM1A의 발현은 mRNA 및 단백질 수준

에서 모두 증가하였으나, 시험관 내 인슐린-내성 모델에서는 PPM1A의 발현이 감소함을 확인하였고, 비만 유도(DIO) 마우스 및 비만 환자 모두에서 PPM1A 발현은 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화를 감소시키는바 음의 상관관계가 있음을 확인하였으며, GTEx 데이터를 사용한 전사체 분석에서 PPM1A는 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화에 의해 조절되는 유전자 세트와 양의 상관관계가 있음을 확인하였다.

[0017] 이에, 본 발명에서는 PPM1A가 비만 또는 당뇨병의 예방 및 치료제로 활용될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 PPAR γ 의 Ser273 및 Ser112에서 신규 포스파타제의 동정하기 위한 웨스턴 블롯 결과이다. (A) HEK293 세포를 7 PPMs 및 PPAR γ 로 형질감염(transfection)시킨 후, PMA(500nM)를 이용해 30 분 동안 PPAR γ 를 인산화시키고, 세포 용해물을 α -FLAG 항체와 함께 배양한 후, 웨스턴 블롯을 통해 PPAR γ 및 PPAR γ 인산화를 확인한 결과이다. (B) HEK293 세포를 용량-의존적 방식으로 PPAR γ 및 PPM1A로 형질감염시킨 후 면역 침전된 세포 용해물에서 PPAR γ 인산화를 분석하고, 웨스턴 블롯을 통해 PPM1A, ERK1/2 및 ERK1/2 인산화를 확인한 결과이다. (C) WT PPM1A 및 이의 돌연변이체(R174G 및 D239N)를 PPAR γ 와 함께 HEK293 세포에 형질감염시킨 후 웨스턴 블롯 수행한 결과이다. 이때 로딩 대조군(loading control)으로 HSP90을 사용하였다.

도 2는 PPM1A가 PPAR γ 의 Ser273 잔기를 직접 탈인산화 하였음을 확인한 결과이다. (A) 전장 GST-융합 인산화된 PPAR γ (full-length GST-fused phosphorylated PPAR γ) 및 0, 1, 0.5, 0.1 μ g의 PPM1A와 함께 배양하여 시험관 내(in vitro) PPM1A 포스파타제 분석한 결과와 GST, PPM1A, PPAR γ 및 PPAR γ 인산화에 대한 웨스턴 블롯 결과이다. (B) 활성 PPM1A(active PPM1A)와 함께 포스포-펩티드가 측부에 위치한 pSer273 잔기(phosphopeptide flanking pSer273 residue)를 사용하여 점블롯검정(Dot blot assay) 수행한 결과로서, PPAR γ 의 Ser273 인산화를 웨스턴 블롯으로 분석하고, 독립적인 3 가지 실험을 수행하였고, PPAR γ 인산화 수준을 Image Studio에 의해 정량화한 결과이다. (C) GST-융합 인산된 PPAR γ 및 면역-정제된 WT PPM1A 및 이의 돌연변이체인 R174G 및 D239N에 대하여 시험관 내 PPM1A 포스파타제 분석(in vitro PPM1A phosphatase assay)을 수행하고, 웨스턴 블롯팅에 의해 PPAR γ 인산화, GST 및 PPM1A가 검출되었음을 확인한 결과이다. (D) 및 (E) 시험관 내 PPM1A 포스파타제 분석을 마그네슘 및 망간 이온의 존재 하에서 수행하였고, 표시된 각각의 단백질을 검출하기 위해 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다(*** P <0.001; 오류 막대는 s.e.m을 나타냄).

도 3은 PPM1A와 PPAR γ 의 직접인 상호 작용과 지방세포의 핵에서 공존하고 있음을 확인한 결과이다. (A) 아세포 분획된 완전 분화 3T3L1 지방세포(subcellular fractionated fully differentiated 3T3L1 adipocytes)의 웨스턴 블롯 결과로서, 핵 및 세포질 마커 단백질로서 히스톤 H2A 및 β -튜불린이 각각 검출되었다. (B) 및 (C) 3T3L1 지방세포로 면역 침전법을 수행한 결과로서, 내인성 PPM1A(또는 PPAR γ) 및 면역 침전된 PPAR γ (또는 PPM1A)는 웨스턴 블롯에 의해 검출되었다. (D) HEK293 세포를 PPAR γ 및 PPM1A로 형질감염시키고 면역 침전법을 수행한 후 각각의 단백질을 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. (E) WT PPAR γ 및 phospho-defective S273A PPAR γ 를 PPM1A와 함께 HEK293 세포에서 형질감염시키고, 면역 침전법을 수행한 후 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. (F) WT PPM1A 및 불활성인 돌연변이체 R174G 및 D239N을 PPM1A와 함께 HEK293 세포에 형질감염시키고, 면역 침강을 수행한 후 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다.

도 4는 PPM1A의 손실이 PPAR γ 의 인산화에 의해 변경된 유전자 세트를 하향 조절함을 확인한 결과이다. HEK293 세포를 특정 인간 PPM1A 표적화 siRNA로 형질감염시켰다. (A) siRNA에 의해 형질감염된 HEK293 세포 용해물의 웨스턴 블롯 수행한 결과로서 인간 PPM1A mRNA 발현을 실시간 PCR(n = 3)로 분석하였다. (C) 3T3L1 세포에 siRNA를 표적화하는 특정 마우스 PPM1A를 형질 도입하고, PPM1A 및 지방 생성 마커 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인한 결과이다. (D) 3T3L1 세포에 siRNA를 표적화하는 특정 마우스 PPM1A를 형질 도입하고, PPAR γ S273 인산화에 의해 조절된 특정 유전자 세트의 mRNA 발현을 확인한 결과이다(* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; 오류 막대는 s.e.m을 나타냄).

도 5는 지방세포에서 PPM1A 과발현이 항 당뇨병 유전자 세트 발현(anti-diabetic gene set expression)을 회복 시킴을 확인한 결과이다. (A) WT PPM1A 및 2 개의 돌연변이체(R174G 및 D239N)를 갖는 HEK293 세포에 대해서 PPARE-루시퍼라제 분석을 수행한 결과이다. (B) 3T3L1 세포에 WT, R174G 및 D239N PPM1A를 형질 도입하고, PPM1A 및 지방 생성 마커 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인한 결과이다. (C) 3T3L1 세포에 WT, R174G 및 D239N PPM1A를 형질 도입하고, PPAR γ S273 인산화에 의해 조절되는 특정 유전자 세트의 mRNA 발현을 확인한 결과이다(* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; NS: 유의하지 않음; 오류 막대는 s.e.m을 나타냄).

도 6은 지방(adipogenesis) 생성 동안 PPM1A의 발현 증가와 시험관 내 인슐린-저항 모델에서 PPM1A 발현 저하를 확인한 결과이다. (A) 매일 수확한 3T3L1 세포로부터 PPM1A 및 지방 생성 마커 단백질에 대해 웨스턴 블롯 수행한 결과이다. (B) PPM1A 및 지방 생성 마커 유전자의 상대 mRNA 발현을 실시간 PCR로 분석한 결과이다(n = 3). (C) 시험관 내 인슐린 저항성 유도(IR-induced) 모델에서 PPM1A 및 인슐린 저항성 반응 유전자(IL6, CCL2 및 CCL9) 및 인슐린 민감성 반응 GLUT4의 mRNA 발현을 확인한 결과이다(* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; NS: 유의하지 않음; 오류 막대는 s.e.m을 나타냄).

도 7은 설치류 및 인간 모두에게 병리 생리학적 조건에서 PPM1A의 Ser273과 PPAR γ 의 인산화 사이의 음의 상관관계를 확인한 결과이다. (A) 8 주 정상 식이(NCD) 공급 마우스 및 고지방식이(HFD) 공급 마우스의 부고환 백색 지방 조직에서 Ser273에서의 PPM1A, PPAR γ , 및 PPAR γ 인산화를 웨스턴 블롯 분석한 결과이다. PPM1A 및 pPPAR γ S273 발현을 각각 HSP90 및 PPAR γ 에 의해 표준화하고 막대 그래프로 나타내었고, 웨스턴 밴드 강도는 Image Studio로 분석하였다. (B) NCD 공급 마우스 및 HFD 공급 마우스의 PPM1A에 대한 상대적 mRNA 발현을 확인한 결과이다(n = 3). (E) 인간 피하 지방 조직에서 PPM1A, 인슐린 감수성 관련 유전자(아디포넥틴 및 Glut4) 및 인슐린 저항성 관련 유전자(TNF- α 및 MCP-1)의 발현을 확인한 결과이다. (F) PPM1A와 인간 피하 지방 조직 내의 PPAR γ 의 Ser273 인산화에 반응하는 유전자 사이의 피어슨 상관계수를 계산하여 나타낸 것이다(* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; 오류 막대는 s.e.m을 나타냄).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이에, 본 발명자들은 지방 생성 과정에서 PPM1A의 발현은 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 증가하였으나, 시험관 내 인슐린-내성 모델에서는 PPM1A의 발현이 감소함을 확인하였고, 비만 유도(DIO) 마우스 및 비만 환자 모두에서 단백질 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A) 발현은 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화를 감소시키는바 음의 상관관계가 있음을 확인하였으며, GTEx 데이터를 사용한 전사체 분석에서 PPM1A는 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화에 의해 조절되는 유전자 세트와 양의 상관관계가 있음을 확인하였고, 단백질 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)가 비만 또는 당뇨병의 예방 및 치료에 유용한 약물로서 고려될 수 있다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 본 발명에서, ‘Serine 273’ 또는 ‘Ser273’은 PPAR γ 의 아미노산 서열(서열번호 1)에서 273 번째에 위치하는 세린(Serine) 아미노산을 의미한다. PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)은 accession no. NM_001127330 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 이에 본 발명은 단백질 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0024] 상세하게는, 상기 단백질 포스파타아제 1A는 PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린(이하, Serine 273 또는 Ser273) 잔기 내 인산을 직접 탈인산화 시키는 탈인산화제이다.
- [0025] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고지혈증, 고중성지방혈증, 간질환, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색, 심혈관질환, 과혈당증, 인슐린 저항성 질환 및 과인슐린혈증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는 비만 또는 당뇨이다.
- [0026] 본 발명의 약학 조성물은 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유

제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

- [0029] 또한, 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0030] 상세하게는, 상기 프로테인 포스파타아제 1A(PPM1A)는 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)의 PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린(이하, Serine 273 또는 Ser273) 잔기 내 인산을 직접 탈인산화시키는 탈인산화제이다.
- [0031] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고지혈증, 고중성지방혈증, 간질환, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색, 심혈관질환, 과혈당증, 인슐린 저항성 질환 및 과인슐린혈증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는 비만 또는 당뇨이다.
- [0032] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0033] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생용 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0034] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 포함하는 PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린(이하, Serine 273 또는 Ser273) 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 시약조성물을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 프로테인 포스파타아제 1A(Protein phosphatase 1A, PPM1A)를 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(in vitro) PPAR γ 의 273 번째에 위치하는 세린(이하, Serine 273 또는 Ser273) 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 방법을 제공한다.
- [0037] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명에서는 PPAR γ 포스파타제로서 PPM1A를 동정하였으며, PPM1A는 PPAR γ 의 Ser273 잔기를 직접 탈인산화 시키는 탈인산화효소로서, PPM1A는 당뇨병, 비만 예방 치료용 조성물로 이용될 수 있다. 구체적으로, 지방 생성 과정에서, PPM1A의 발현은 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 증가시켰으나, 시험관 내 인슐린-내성 모델에서는 감소함 확인하였다. 또한, 비만 유도(DIO) 마우스 및 비만 환자에서, PPM1A 발현이 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화를 감소시키는바 음식의 상관관계가 있음을 확인하였고, GTEx 데이터를 사용한 전사체 분석에서 PPM1A는 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화에 의해 조절되는 유전자 세트와 양의 상관관계가 있음을 확인하였다.
- [0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0041] <실험예>

[0042] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0044] 1. 세포 배양(Cell culture)

[0045] 3T3L1, 인간 배아 신장 293(HEK-293) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였고, 37℃, 5 % CO₂ 조건 하에서 10% bovine calf serum(Gemini Bio-products, West Sacramento) 및 1% 페니실린/스트렙토 마이신(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에서 배양하였다. 지방세포 분화는 이전에 기술된 Nature 2010;466:451-456에 따라 수행되었다. 분화된 3T3L1 세포에서의 지질 축적을 Oil Red O 용액으로 염색하였다. 세포 배양에 사용되는 모든 화학 물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

[0047] 2. 플라스미드 발현 및 RNA 간섭(Expression plasmids and RNA interference)

[0048] FLAG-epitope 태그(tag)된 WT 및 S273A PPAR γ 에 대한 발현 플라스미드를 전술 한 바와 같이 사용하였다 (Nature 2010;466:451-456). WT 인간 PPM1A, 1B, 1D, 1F, 1J, 1K 및 1M은 한국생명공학연구원(KRIBB)으로부터 입수하였다.

[0049] PPM1A R174G 또는 D239N 치환은 애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)(Santa Clara, CA)로부터 입수한 QuickChange II 부위 지정 돌연변이 유발 키트(QuickChange II Site-directed mutagenesis kit)를 사용하여 구축하였다. 모든 포유동물 발현 플라스미드는 제조사의 지시에 따라 Lipofectamine™ 2000 형질감염 시약(ThermoFisher Scientific, MA, Waltham)을 사용하여 형질감염시켰다.

[0050] PPM1A#1(5'-CCAAGTGGACTTGAGACATGGTCAT-3') 및 PPM1A#2(5'-GACATGGTCATCTTTGCTGTATAT-3')에 대한 siRNA는 Shanghai GenePharma (Shanghai, China)에서 구입하였고, 3T3L1 세포를 Lipofectamine™ RNAiMax 형질감염 시약(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)을 사용하여 siRNA#1 또는 siRNA#2을 형질감염 시켰다.

표 1

구분	서열	서열번호
PPM1A#1	5'-CCAAGTGGACTTGAGACATGGTCAT-3'	2
PPM1A#2	5'-GACATGGTCATCTTTGCTGTATAT-3'	3

[0052] PPAR γ 가 발현된 HEK-293 세포를 500 nM의 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)로 처리하고, 총 세포 용해물을 4℃에서 FLAG M2 아가로스(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)와 함께 배양하였다.

[0053] 면역 침전물 또는 총 세포 용해물을 anti-PPAR γ Ser273(Nature 2010;466:451-456), anti-PPAR γ Ser112 (Biocompare) 또는 anti-PPAR 항체(Santa Cruz Biotechnology)에 대한 인산-특이적 항체(phospho-specific antibody)로 분석하였다.

[0054] anti-GST, aP2, 및 C/EBP α 를 포함하여 본 연구에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX)로부터 구입하였고, anti-HA, p-ERK1/2, ERK, adiponectin, β -tubulin, Histone 2A, and HSP90은 Cell Signaling Technology(Danvers, MA)로부터 구입하였다.

[0056] 3. 인 비트로 포스파타제 및 결합측정법(In vitro phosphatase and binding assay)

[0057] PPM1A 인간 재조합(PPM1A human recombinant) 및 활성 ERK1(active ERK1)은 각각 Prospec(Ness-Ziona, Israel) 및 SignalChem(Richmond, Canada)에서 각각 구입하였다. 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)-융합 PPAR γ (Glutathione S-transferase(GST)-fused PPAR γ)는 ATP를 함유하는 활성 ERK1 키나제 분석 완충액(25

mmol/liter Tris-HCl, pH 7.5, 5 mmol/liter β -glycerophosphate, 2 mmol/liter DTT, 0.1mmol/liter Na_3VO_4 , 10mmol/liter MgCl_2)에서 30℃에서 20 분 동안 배양하였다.

- [0058] PPM1A 포스파타제 완충액(Cell 2006;125:915-928)을 함유하는 PPM1A 인간 재조합체(PPM1A human recombinant)에 인산화된 GST-융합 PPAR γ (phosphorylated GST-fused PPAR γ)을 첨가하고 30℃에서 30 분 동안 배양하였다.
- [0059] PPAR γ 의 탈인산화에서 PPM1A의 촉매 불활성 돌연변이체(R174G 및 D239N)의 효과를 확인하기 위해, HEK-293 세포에 상기 돌연변이체를 형질감염 시켰다.
- [0060] 용해 완충액으로 세포를 용해시키고 α -PPM1A를 사용하여 면역 침전시켰다. 다음으로 면역 침전물을 PPM1A 포스파타제 완충액에서 인산화된 GST-융합 PPAR γ (phosphorylated GST-fused PPAR γ)와 함께 30℃에서 30 분 동안 배양하였다.
- [0061] 단백질 샘플 완충제(protein sample buffer)를 첨가하여 모든 반응을 종결시켰다. PPAR γ 의 탈인산화는 anti-PPAR γ Ser273(Nature 2010;466:451-456), anti-GST 또는 PPM1A 항체에 대한 인산-특이적 항체(phospho-specific antibody)를 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다.
- [0062] GSH-아가로스에 고정된 GST-융합 단백질들은(PPAR γ domain mutants) 헤마글루티닌(HA) 태그된 PPM1A-발현 세포 용해물과 함께 4℃에서 120 분 동안 배양되었다.
- [0063] 단백질 복합체를 원심분리 하여 풀다운 시키고, 결합 완충제로 3 회 세척하였다. anti-GST 또는 HA 항체를 사용하여 면역 블롯팅하여 침전물을 검출하였다.

[0065] 4. 점블롯검정(Dot blot assay)

- [0066] PPM1A 인간 재조합체는 PPM1A 포스파타제 분석 완충액에서 PPAR γ 의 아미노산 서열을 보존하는 phospho-Ser273 펩타이드(TGKTTDK- O S-PFVIYDM, New England peptide, Gardner, MA)와 함께 30℃에서 20 분 동안 배양되었다.
- [0067] 이들의 일부를 니트로셀룰로오스막에서 점으로 찍어 RT에서 3 시간 동안 건조시켰다. 건조단계 후, 막을 10 분 당 3 회 트리스-완충 식염수(Tris-buffered saline) 및 트윈 20 (Tween 20, TBST)으로 세척하였다. 세척된 막을 BSA로 차단시키고 전술한 바와 같이 PPAR γ Ser273에 대한 인산-특이적 항체(phospho-specific antibody)로 면역 블롯팅을 수행하였다.

[0069] 5. 리얼-타임 RT-PCR(Real-Time RT-PCR , qPCR)

- [0070] iNtRON(Korea)에서 구입한 easy-BLUE 토털 RNA(easy-BLUE total RNA) 추출 키트를 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. qPCR은 제조업체의 지침에 따라 7900HT Fast Real-Time PCR System(Life Technology)을 사용하여 수행되었다. 각 유전자의 RNA 발현 수준은 36B4 또는 TBP로 표준화되었고, 각 분석은 3 회 수행하였다. 데이터는 Microsoft Excel을 이용하여 분석하였다.

[0072] 6. 리포터 유전자 분석(Reporter gene assay)

- [0073] HEK-293 세포를 pDR-1 루시페라제 리포터 플라스미드, PPAR γ , RXR α , pRL-Renilla 및 PPM1A로 형질감염 시켰다. 24 시간 동안 밤새 형질감염된 세포에 로시글리타존(rosiglitazone)으로 처리하였다. 이어서, 세포를 수확하고 Dual-Luciferase kit(Promega, Madison, WI)를 사용하여 리포터 유전자 분석을 수행하였다. 루시페라제 활성은 레닐라 활성(Renilla activity)으로 정규화 하였다.

[0075] 7. 인간 지방 조직의 상관관계 분석(Correlation analysis in human adipose tissues)

- [0076] 비만 및 인슐린 저항성 조건 하에서 PPAR γ 의 Ser273에서 인산화와 PPM1A의 상관관계를 분석하기 위해, GSE55200, GSE15773 및 GSE20950을 국립생명공학 정보센터 (NCBI, Bethesda, MD)에서 액세스할 수 있는 public Gene Expression Omnibus (GEO)로부터 제공받았다.

[0078] 8. 동물(Animals)

[0079] 모든 동물 실험은 울산과학기술원 동물 관리위원회의 승인 절차에 따라 수행하였다. 5 주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(DBL, 충북, 한국)에게 고지방식이(60% kcal 지방, D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ)를 16 주 동안 먹였다. 본 연구에 사용된 ob/ob 마우스는 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)에서 구입하였다.

[0081] <실시예 1> PPAR γ 의 Ser273 잔기 또는 Ser112 잔기 내 인산을 탈인산화 하는 신규한 포스파타제의 동정

[0082] 최근 연구에서 금속-의존성 단백질 포스파타제(metallo-dependent protein phosphatase, PPM)가 PPAR γ 의 세린 포스파타제(serine phosphatase)일 수 있다고 보고된 바가 있다(Biochem. J. 2013;451:45-53).

[0083] 따라서, 본 발명자들은 Ser273 잔기 내 인산을 탈인산화하는 신규한 PPAR γ 포스파타제를 확인하고자 하였다. PMA 처리 후 7개의 PPM 중에서 PPM1A 및 PPM1B가 PPAR γ 의 Ser273 잔기의 인산을 탈인산화(dephosphorylation)하였고, PPM1A의 탈인산화 활성은 PPM1B의 것보다 높았다(도 1A).

[0084] 종래의 연구 결과와 부합하게 PPM1B는 PPAR γ 의 Ser112 잔기를 탈인산화함을 확인하였다(Biochem. J. 2013;451:45-53). 흥미롭게도, PPM1A는 Ser112에 대해 PMA-매개 PPAR γ 인산화(PMA-mediated PPAR γ phosphorylation)를 억제하였다.

[0085] 다음으로, PPM1A가 PPAR γ 의 인산화를 조절할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, HEK-293 세포에 PPM1A의 발현을 증가시켰다. 그 결과, PPM1A에 의한 PPAR γ 의 탈인산화는 PPM1A 발현에 용량-의존적(dose-dependent)이었다(도 1B).

[0086] 한편, PPAR γ 의 Ser273 잔기의 인산화는 ERK에 의해 매개되는 것으로 보고되었다(Nature. 2015;517:391-395). 따라서, 본 발명자들은 PPM1A의 탈인산화 효과가 PMA 처리 후 ERK 활성화 억제에 기인한 것인지 확인하기 위해 실험하였다. 그러나 PPM1A의 강제 발현은 PMA-매개 ERK 인산화(PMA-mediated ERK phosphorylation)를 변화시키지 않았으며, 이는 PPM1A에 의한 PPAR γ 의 탈인산화가 ERK의 간접 억제에 의해 야기되지 않음을 시사한다.

[0087] 또한, PPM1A 포스파타제 활성이 PPAR γ 탈인산화에 결정적인지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 2 개의 촉매적으로 불활성인 PPM1A 돌연변이체인 R174G 및 D239N 을 생성하였다(Biochemistry 2003;42;8513-8521).

[0088] 본 발명자들은 R174G 및 D239N 돌연변이체가 Ser112 및 Ser273에서 PPAR γ 의 탈인산화 능력을 상실한다는 것을 발견하였다(도 1C). 또한, 이들 돌연변이체는 PMA-매개 ERK 활성화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0089] 이들 결과는 PPM1A가 PPAR γ 의 Ser112 및 Ser273 모두에 특이적인 포스파타제임을 강력하게 시사한다.

[0091] <실시예 2> PPM1A는 Ser112 아닌 Ser273에서 직접 탈인산화함을 확인

[0092] 다음으로, 무세포 시스템(cell-free system)으로 PPAR γ 탈인산화에 대한 PPM1A의 영향을 조사하였다. GST-융합된 PPAR γ 재조합 단백질을 정제한 후, 본 발명자들은 활성 ERK를 사용하여 PPAR γ 의 Ser273을 직접 인산화시켰다.

[0093] 이어서, 재조합 활성 PPM1A에 대해 시험관 내 포스파타제 분석을 수행하였다. 분석 결과, PPM1A는 Ser112가 아닌 Ser273에서 PPAR γ 를 직접 탈인산화시켰음을 확인할 수 있었다(도 2A). 이러한 결과는 PPM1A가 Ser273 잔기 내 인산을 직접적으로 탈인산화시키는 PPAR γ 포스파타제이고, PPM1A에 의한 Ser112에서의 탈인산화는 간접 경로에 의해 매개됨을 의미한다.

[0094] 본 발명자들은 활성 PPM1A와 함께 포스포-펩티드가 측부에 위치한 pSer273 잔기(phospho-peptide flanking pSer273 residue)를 배양했을 때, Ser273에서 PPAR γ 의 인산화는 용량 의존적 방식으로 급격히 감소함을 확인하였다(도 2B).

[0095] 또한, PPAR γ 의 탈인산화에 있어서 PPM1A의 촉매 활성을 확인하는 실험은 중요한 것으로, 먼저 본 발명자들은 HEK-293 세포로부터 야생형 PPM1A(WT) 및 2 개의 촉매적으로 불활성인 돌연변이체(R174G 및 D239N)를 면역-정제하였다. 다음으로 PPAR γ 의 Ser273에 인산화한 후, PPM1A와 함께 포스포-PPAR γ (phospho-PPAR γ)를 배양하였다. 돌연변이체인 R174G 및 D239N은 PPAR γ 를 탈인산화 하지 못하였다(도 2C).

[0096] 또한, PPM1A의 포스파타제 활성은 Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 이온의 존재 하에서 급격히 증가하였다(도 2D 및 도 2E). 이러한

결과는 PPM1A가 Ser112가 아닌 Ser273에서 직접적인 PPAR γ 의 포스포타제임을 시사한다.

[0098] <실시예 3> PPM1A와 PPAR γ 과 상호 작용 확인

[0099] PPM1A는 PPAR γ 을 직접 탈인산화하기 때문에 핵(nucleus)에 국한되어야 한다. 따라서, 본 발명자들은 PPM1A 및 PPAR γ 의 세포 하 위치(the subcellular localization)를 분석하였다.

[0100] 분석 결과, PPM1A 및 PPAR γ 둘 모두 주로 핵에서 발현되었다(도 3A). 다음으로, 공동 면역 침전법(co-immunoprecipitation experiments)을 수행하여 PPM1A가 PPAR γ 에 결합하는지 여부를 확인하였다. 내인성 PPM1A는 완전히 분화된 지방세포에서 내인성 PPAR γ 와 특이적으로 상호 작용하고 그 반대도 마찬가지였다(도 3B 및 도 3C).

[0101] 또한, PPM1A는 공동-발현된 HEK-293 세포에서 PPAR γ 과 특이적으로 상호 작용 하였다(도 3D). 흥미롭게도, PPAR γ 의 인산화 결합 돌연변이체(S273A)는 PPM1A와의 상호 작용에 영향을 미치지 않았다(도 3E).

[0102] 또한, PMA는 PPM1A와 PPAR γ 사이의 상호 작용의 힘(potency)을 변화시키지 않았는데, 이는 PPAR γ 의 인산화 상태가 PPM1A와의 상호 작용에 중요하지 않음을 시사한다. 촉매적으로 불활성인 돌연변이체 R174G는 PPAR γ 와 상호 작용하는 힘을 유지시켰지만, D239N은 PPAR γ 와 상호 작용하는 힘을 상당히 감소시켰음을 확인할 수 있었다(도 3F).

[0103] 따라서, PPM1A는 인산화 독립적인 방식으로 PPAR γ 와 직접적인 상호 작용을 하며, 지방세포의 핵에 공동 위치함을 확인할 수 있었다.

[0105] <실시예 4> PPAR γ 의 Ser273 인산화에 의해 조절되는 당뇨병 유전자 세트(diabetic gene set)에 PPM1A가 미치는 영향 확인

[0106] PPM1A와 PPAR γ 사이의 상호 작용의 기능적 역할을 설명하기 위해, 본 발명자들은 HEK-293 세포와 3T3L1 지방세포 각각에 대하여 PPM1A의 발현 감소에 대한 PPAR γ 전사 활성과 PPAR γ 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다. 구체적으로, 인간 PPM1A(hPPM1A)를 표적으로 하는 특정 siRNA를 HEK-293 세포로 형질감염 시키고 루시페라제 분석(luciferase assay)을 수행하였다.

[0107] PPM1A의 발현이 50 내지 60 % 감소하면 PPAR γ 전사 활동이 급격히 감소하였다(도 4A 및 도 4B). 또한, 마우스 PPM1A(mPPM1A)를 표적으로 하는 siRNA는 완전히 분화된 지방세포로 형질 도입 되었다.

[0108] PPM1A의 녹다운(knockdown)은 PPM1A의 mRNA를 극적으로 감소시켰다(도 4C). 아울러, PPM1A 녹다운에 의해 aP2, C/EBP α 및 PPAR γ 와 같은 지방세포 선택성 유전자(adipocyte-selective genes)를 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.

[0109] 한편, 종래의 연구에서는 Ser112에서 PPAR γ 의 인산화가 PPAR γ 의 전사 활성을 감소시키는 것으로 보고된 바 있다(Science 1996;274:2100-2103). PPM1A가 Ser112를 간접적으로 탈인산화 하여(도 1), PPM1A가 지방 생성에 포함된다는 것은 자명한 사실이다. 흥미롭게도, Ser273에서 인산화된 PPAR γ 에 의해 특이적으로 조절되는 것으로 알려진 대부분의 유전자는 PPM1A의 녹다운에 민감하였다(도 4D). 여기에는 인슐린 민감도(insulin sensitivity)와 포도당 항상성(glucose homeostasis)에 대한 주요 아디포킨 조절제(adipokine regulators)인 아디포넥틴(adiponectin)과 아디프신(adipsin)을 포함된다(Nature 2010;466:451-456).

[0110] 대조적으로, 완전히 분화된 지방세포에서 PPM1A의 강제 발현은 상기 PPM1A의 녹다운 실험 결과와 비교하여 반대의 결과를 나타냈다. 구체적으로, HEK-293 세포에서 과발현된 WT PPM1A는 PPAR γ 의 전사 활성을 3 배 증가시켰지만, 촉매적으로 불활성인 돌연변이체(R174G 및 D239N)에서는 PPAR γ 의 전사 활성을 증가시키지 못했다(도 5A).

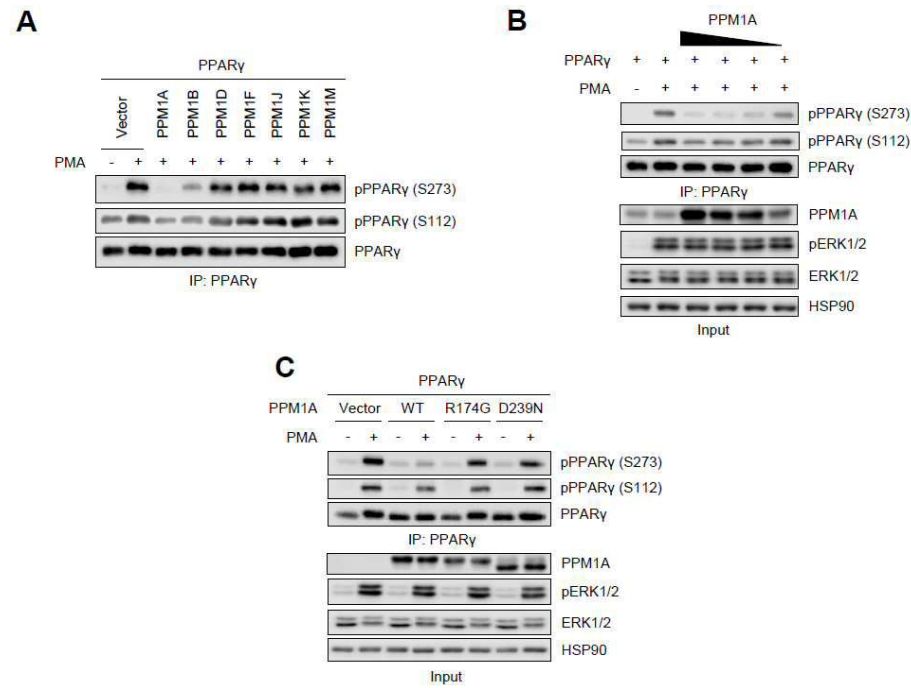
[0111] 이는 루시페라제 분석 결과와 일치하여, WT PPM1A의 과발현은 지방 생성 마커 유전자의 발현을 유의하게 증가시켰지만, 촉매적으로 불활성인 돌연변이체(R174G 및 D239N)는 그렇지 아니하였는바, 이는 포스포타제 활성(phosphatase activity)이 지방세포 분화에 중요하다는 것을 의미한다.

[0112] 또한, PPM1A는 인산화된 PPAR γ 에 의해 조절되는 대부분의 특정 유전자 세트(gene set)를 극적으로 증가시켰지만, 돌연변이체인 R174G 및 D239N은 그렇지 않았다(도 5C).

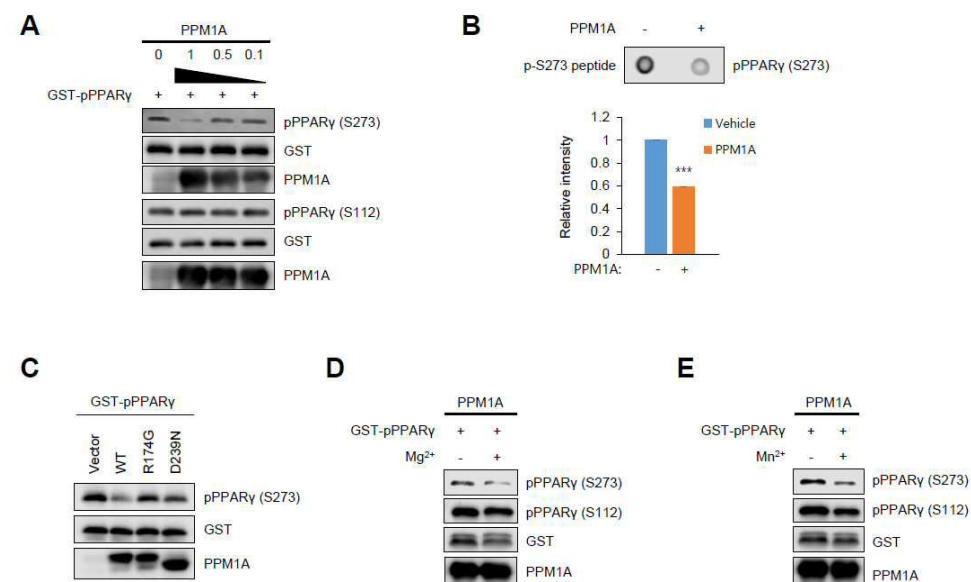
- [0113] 이러한 결과는 PPM1A가 포스포-Ser273(phospho-Ser273)을 탈인산화 시킴으로써, 포스포-Ser112(phospho-Ser112) 및 당뇨병성 유전자 리프로그래밍(diabetic gene reprogramming)을 제거하는 바, 이는 지방 생성 과정을 조절한다는 것을 강력하게 시사한다.
- [0115] <실시예 5> 시험관 내(in vitro) 인슐린 저항성 모델에서 PPM1A의 발현 감소 확인
- [0116] 다음으로, 본 발명자들은 지방세포 분화에서 PPM1A의 생리적 관련성을 조사하였다. 구체적으로, 웨스턴 블롯(Western blot) 및 실시간 PCR(real-time PCR) 분석을 통해 PPM1A가 pre-adipocytes에서 발현되었음을 확인하였고, 지방생성 동안 그의 발현이 유의하게 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 6A 및 도 6B). PPM1A 발현, PPAR γ 발현, 및 aP2, C/EBP α 및 아디포넥틴(adiponectin)을 포함한 지방 생성 마커 유전자(adipogenic marker genes) 발현이 유의하게 증가하였다.
- [0117] 한편, 완전히 분화된 지방세포에 TNF- α 를 처리함으로써 세포 배양 시스템 상에서 인슐린 저항성 상태(인슐린 저항성 모델)를 모방할 수 있다고 보고된 바 있다(Cell Reports. 2013;5:259-270).
- [0118] TNF- α 를 처리한 지방세포(인슐린 저항성 모델)는 IL-6, CCL2 및 CCL9와 같은 인슐린 저항성 유전자의 발현을 극적으로 증가시켰지만, GLUT4 발현은 현저하게 감소시켰다(도 6C). 이는 PPM1A의 유의적인 감소가 PPM1A가 인슐린 감수성과 양의 상관관계가 될 수 있음을 시사한다.
- [0119] 다음으로, 본 발명자들은 고지방식이-유도 비만 모델 마우스(HFD) 및 유전자 유도 비만 모델 마우스(db/db)의 지방조직에서 PPM1A 발현을 측정하였다. PPAR γ 의 Ser273에서의 인산화가 크게 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 7A 및 도 7B). 흥미롭게도, 대조군 마우스와 대비하여 HFD 및 db/db 마우스의 지방 조직에서 PPM1A 발현이 현저하게 하향 조절되었으며, 이는 PPM1A가 PPAR γ 의 인산화와 음의 상관관계가 있음을 시사한다.
- [0120] 아울러, PPM1A와 pPPAR γ 사이의 상관관계를 조사하기 위해, 인간의 비만 또는 인슐린 저항성 지방 조직 사이의 유전자 발현을 비교하는 공개 데이터베이스를 이용하여 조사하였다(C. R. Biol. 2003;326:1075-1078).
- [0121] 그 결과, PPM1A의 발현은 비만 지방 조직에서 정상 지방 조직과 비교하여 현저하게 감소하였다(도 7E). 대조적으로, PPM1A의 발현은 TNF- α 및 단핵구 화학 유인 단백질 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)과 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 아울러, 아디포넥틴 또는 Glut4와 같은 인슐린 감작 유전자는 현저하게 감소시켰다. PPAR γ 의 Ser273에서의 인산화에 의해 조절되는 유전자의 발현은 PPM1A의 발현과 양의 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 인슐린 민감성(sensitive patients) 환자와 인슐린 저항성(resistant patients) 환자 사이의 지방 조직에서도 비슷한 결과가 나타났다(도 7F).
- [0122] 이러한 결과들은 PPM1A가 Ser273에서 PPAR γ 인산화와 음의 상관관계가 있으며, 쥐와 인간 모두에게서 당뇨병 유전자 프로그래밍을 조절할 수 있음을 의미하는 바, 이는 PPM1A가 대사성 질환 관련 질환에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 뒷받침한다.
- [0124] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

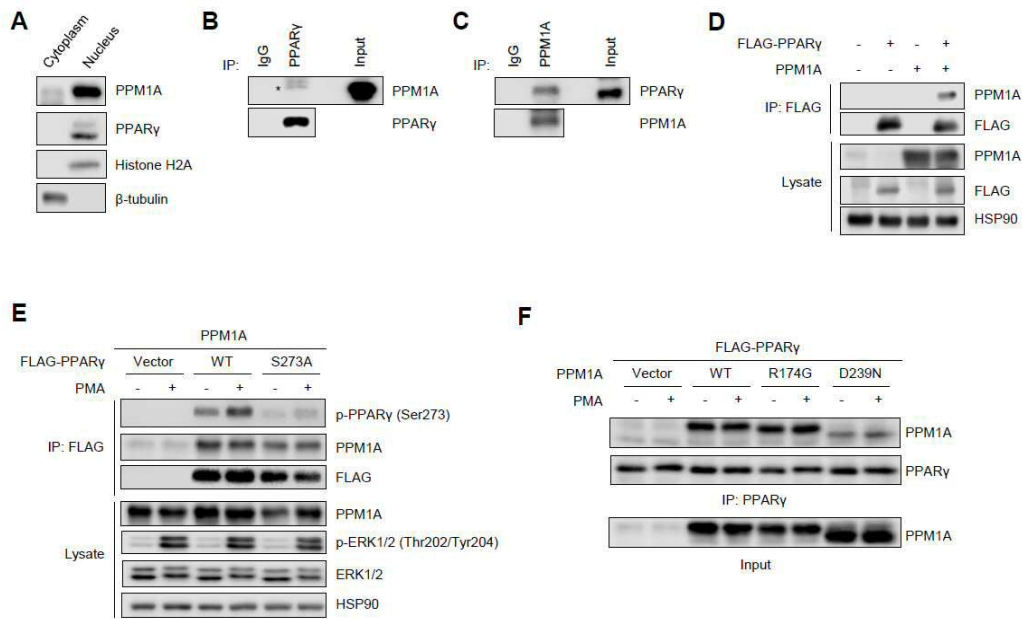
도면1



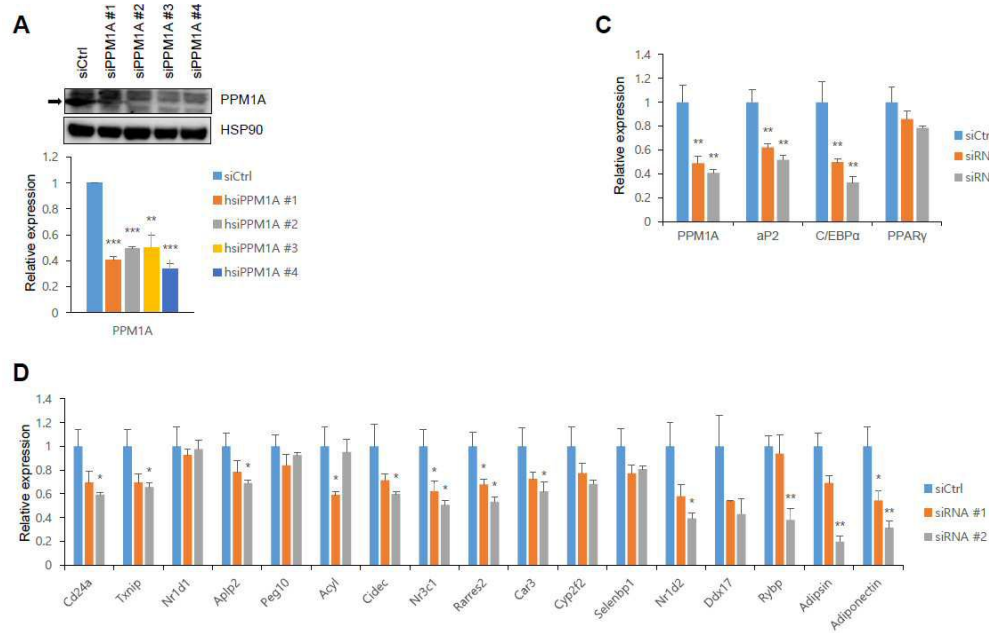
도면2



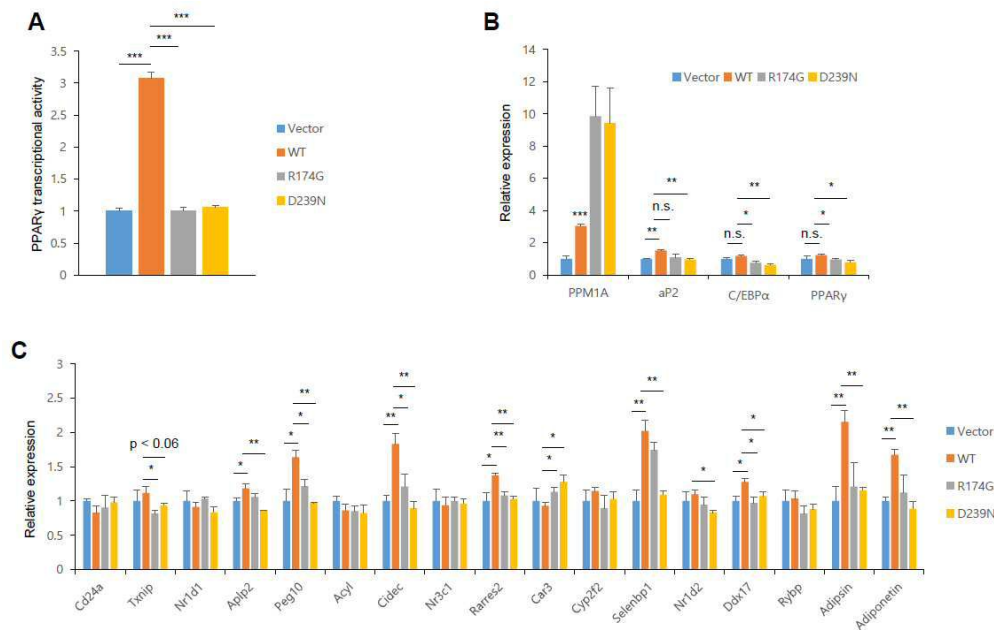
도면3



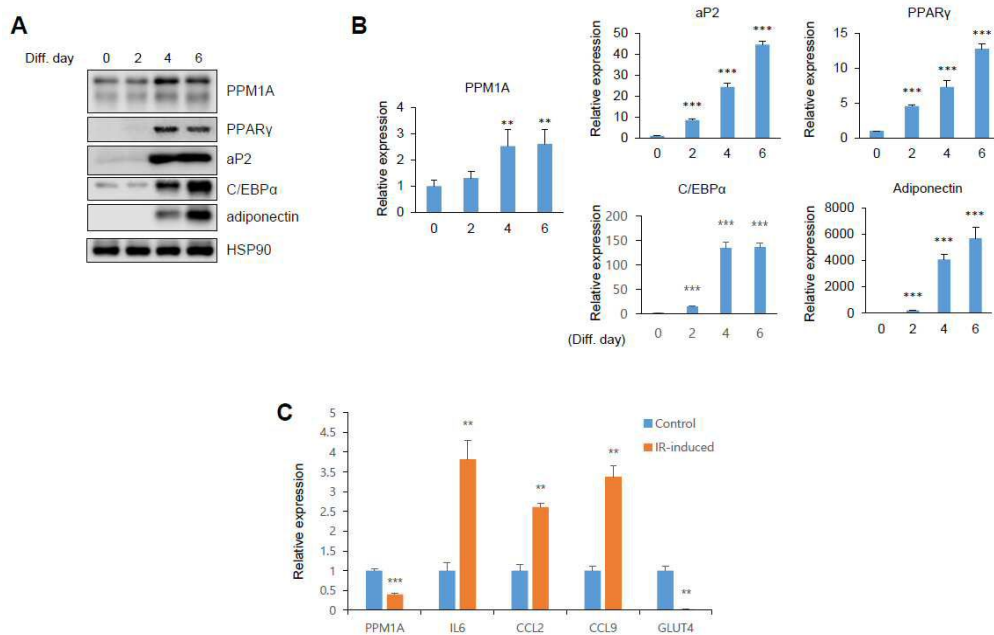
도면4



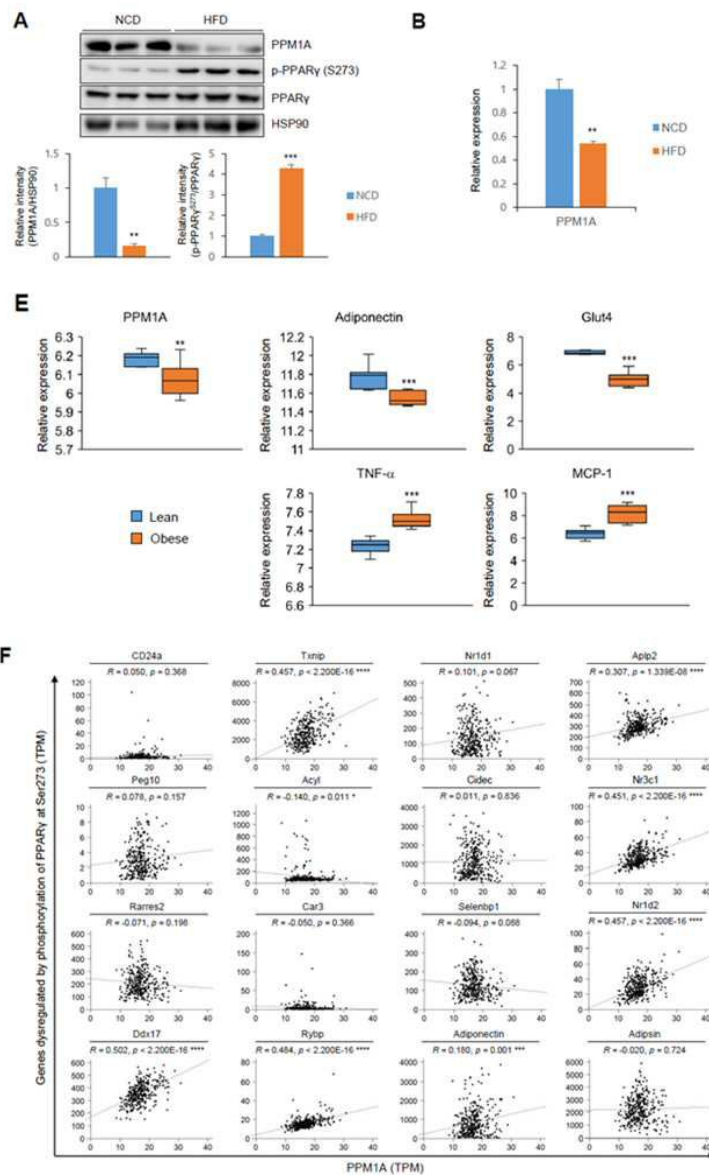
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> UNIST Academy-Industry Research Corporation
- <120> Composition for treating or preventing metabolic syndrome comprising Protein phosphatase 1A
- <130> ADP-2019-0606
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 505
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> peroxisome proliferator activated receptor gamma
 <400> 1
 Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser
 1 5 10 15
 Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val
 20 25 30
 Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val
 35 40 45
 Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro
 50 55 60
 Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp
 65 70 75 80
 Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp
 85 90 95
 Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser
 100 105 110
 Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu
 115 120 125
 Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp
 130 135 140
 Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys
 145 150 155 160
 Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys
 165 170 175
 Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr
 180 185 190
 Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile
 195 200 205
 Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu
 210 215 220
 Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg

225 230 235 240
 Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu
 245 250 255
 Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys
 260 265 270
 Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp
 275 280 285
 Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu
 290 295 300

 Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala
 305 310 315 320
 Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn
 325 330 335
 Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu
 340 345 350
 Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu
 355 360 365
 Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu

 370 375 380
 Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val
 385 390 395 400
 Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile
 405 410 415
 Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys
 420 425 430
 Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln
 435 440 445

 Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu
 450 455 460
 Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu
 465 470 475 480
 Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu

	485	490	495
Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr			
	500	505	
<210>	2		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PPM1A#1		
<400>	2		
ccaagtggac ttgagacatg gtcac			25
<210>	3		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PPM1A#2		
<400>	3		
gacatgggtca ttctttgctg tatat			25