



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0079420
(43) 공개일자 2025년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1783 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-0166551

(22) 출원일자 2023년11월27일

심사청구일자 2023년11월27일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

최장현

울산 울주군 언양읍 유니스트길 50

김진우

울산 울주군 언양읍 유니스트길 50

지하늘

울산 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

김중석

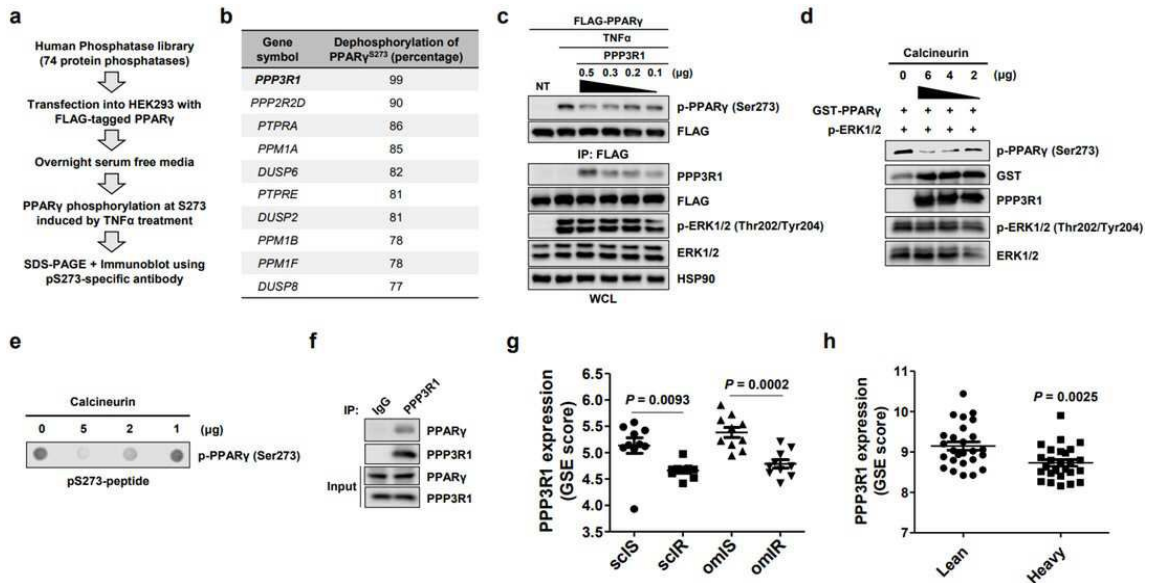
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 PPP3R1을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 PPP3R1을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 PPP3R1이 S273(Ser273)에 인산화 된 PPAR γ 의 탈인산화하여 인슐린 감수성을 높িয়ে 하여 지방 대사를 활성화시키는 기술적 특징이 있으며, 이는 비만 및 당뇨병을 비롯한 대사성 질환 치료에 활용 될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 3/00 (2018.01)

A61P 9/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345362691
과제번호	2021R1I1A2041463
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	지방-간 대사축 규명을 통한 비알코올성 지방간 및 간암 유발기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180283
과제번호	2018R1A5A1024340
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	대사스트레스 세포대응 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)은 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화하는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)에 의해 세린 273번 아미노산이 탈인산화된 PPAR γ 는 인슐린 감수성을 높이는 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 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 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

지방세포에서, PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 처리하는 단계를 포함하는, 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 PPP3R1을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 PPP3R1이 S273(Ser273)에 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화하여 인슐린 감수성을 높이게 하여 지방 대사를 활성화시킴으로써 비만 및 당뇨병을 비롯한 대사성 질환 치료에 활용 할 수 있는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

에너지의 섭취와 소모의 불균형으로 인하여 체내에 지방이 과잉으로 축적되어 지방조직이 비정상적으로 증가인

상태를 비만이라 한다. 비만은 특별한 원인 질환 없이 과대한 열량의 섭취와 운동부족으로 인한 단순성 비만과 유전적 요인, 내분비질환, 시상하부의 식욕중추 이상과 약제의 부작용으로 인해 이차적으로 유발되는 증후성 비만으로 분류되며, 전체 비만 환자 중 약 95%는 단순성 비만이다.

[0004] 또한 비만은 제2형 당뇨병의 주요 위험인자임이 확인되고 있으며, 체질량지수가 23인 경우에 비교하여 체질량지수가 35가 넘으면 당뇨병의 발생률이 40배에 달한다는 보고가 있다. 체지방량 이외에도 지방 분포가 당뇨병의 발생에 연관이 있으며 중심성 비만에서 그 빈도가 높아진다.

[0005] 대사성질환은 고열량, 고지방 및 고당질 식사에 의한 체내 에너지 대사의 불균형은 비만을 초래하고 인슐린 저항성과 대사성 염증을 유도하여 지질대사 이상 및 제2형 당뇨병 등 퇴행성 질환을 일으킬 수 있으므로, 생활습관성 질환이라고도 부르며, 최근 우리나라는 식생활의 서구화로 인해 가공식품과 동물성식품의 섭취 증가와 식물성식품 섭취 감소로 인한 식생활의 변화로 고혈압, 심장병, 동맥경화증 및 당뇨병 등의 만성퇴행성질환의 이환율이 높아지고 있다.

[0006] PPAR γ (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. 최근 연구에 PPAR γ S273(Ser273)의 인산화는 지방생성의 활성에는 영향을 미치지 않지만 당뇨병을 유발한다고 밝혀진 바 있어서 관련 연구들이 활발히 진행되고 있다.

[0007] 따라서 본 발명자들은 비만 및 당뇨병과 같은 대사성 질환 치료제 개발의 새로운 대안으로, 인산화된 S273(Ser273)의 PPAR γ 를 탈인산화하여 인슐린 감수성을 높이게 하여 지방 대사를 활성화 시켜 비만 및 당뇨병을 비롯한 대사성 질환 치료에 활용할 수 있는 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1741956호 (2017.05.24.)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-1815193호 (2017.12.28.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명은 지방세포에서, PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 처리하는 단계를 포함하는, 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화 하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 유효

성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0015] 상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)은 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)에 의해 세린 273번 아미노산이 탈인산화된 PPAR γ 는 인슐린 감수성을 높이는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고지혈증, 고중성지방혈증, 간질환, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색, 심혈관질환, 과혈당증, 인슐린 저항성 질환 및 과인슐린혈증으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명은 지방세포에서, PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 처리하는 단계를 포함하는 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 PPP3R1을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함으로써, PPP3R1이 S273(Ser273)에 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화하여 인슐린 감수성을 높임에 따라 지방 대사를 활성화시키는 작용으로, 비만 및 당뇨병을 비롯한 대사성 질환 치료에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 PPP3R1에 의해 인산화된 S273 PPAR γ 의 탈인산화를 확인한 결과이다.
- 도 2는 인슐린 민감성 아디포카인을 포함한 특정 유전자 세트와 PPP3R1 발현의 상관관계를 분석한 결과이다.
- 도 3은 PPP3R1의 결핍에 따른 인슐린 저항성 유도 및 PPP3R1^{AKO} 마우스의 열 발생 유전자 활성 감소를 나타낸 결과이다.
- 도 4는 비인산화형 S273의 PPAR γ 함유 마우스의 인슐린 감수성 증가와 열 발생 활성화를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 명세서에서 사용되는 용어에 대해 간략히 설명하고, 본 발명에 대해 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0025] 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0026] 아래에서는 첨부한 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0027] 본 발명에 대한 해결하고자 하는 과제, 과제의 해결 수단, 발명의 효과를 포함한 구체적인 사항들은 다음에 기재할 실시예 및 도면들에 포함되어 있다. 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다.
- [0028] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다.
- [0030] 본 발명은 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)은 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를

탈인산화하는 것 일 수 있다.

- [0032] 상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)에 의해 세린 273번 아미노산이 탈인산화된 PPAR γ 는 인슐린 감수성을 높이는 것일 수 있다.
- [0033] 상기 PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)에 의해 273번째에 위치하는 세린 잔기가 탈인산화된 PPAR γ 는 인슐린 감수성이 높아짐에 따라 지방 대사가 활성화 될 수 있다.
- [0034] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨, 고지혈증, 고중성지방혈증, 간질환, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색, 심혈관질환, 과혈당증, 인슐린 저항성 질환 및 과인슐린혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약학적 조성물 본 발명의 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 또한 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0037] 상기 약학적 조성물은 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 통상적으로는 국소 투여 방식이 바람직하다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0038] 상기 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0040] 본 발명은 지방세포에서, PPP3R1(protein phosphatase 3 regulatory subunit B alpha)을 처리하는 단계를 포함하는, 세린 273번 아미노산이 인산화된 PPAR γ 를 탈인산화 하는 방법을 제공한다.
- [0042] 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.
- [0044] **<실시 예1> 세포배양 및 분화**
- [0045] 실험에 사용된 3T3-L1과 HEK293 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구매하였고, 10% FBS, 1% penicillin 및 streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하여 5% CO₂를 공급하고 37℃의 온도 조건에서 배양되었다.
- [0046] 지방세포 분화는 지방전구세포인 3T3-L1 으로 실시하였다. 3T3-L1세포를 10% FBS가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 배양하여 플레이트에 100% 차게 되면, 2일 후에 0.5 mM IBMX, 1 μ M dexamethasone 및 850 nM insulin이 포함된 분화 배지로 변경해주고, 이틀에 한번씩 850 nM insulin이 포함된 배지로 바꿔주면서, 7일 동안 분화하였다.

- [0048] <실시 예2> 동물실험
- [0049] 조건부 돌연변이를 생성하기 위해 PPP3R1 유전자의 엑손 2 내지 4 측면에 loxP 부위를 가지고 있는 PPP3R1-floxed 마우스 (C57BL/6-*Ppp3r1*^{tm1St1/J})를 Jackson Laboratory 업체에서 구매하여 실험에 사용하였으며, non-phosphorylatable PPAR γ 포함된 S273A KI 마우스는 식품의약품안전평가원에서 CRISPR/Cas9 기반 Knock-in 방법으로 생성된 마우스를 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 마우스는 수컷 성인마우스(8 ~41주령)를 사용하였다.
- [0050] 식이변화실험을 실시하기 위해, PPP3R1^{f/f} (PPP3R1 야생형 마우스) 와 PPP3R1^{AKO} (PPP3R1의 유전적 결핍 마우스) 마우스를 8주령에 정상 식이(NCD) 또는 고지방식이(HFD)를 투여하였고, S273A KI 및 WT(야생형) 마우스는 10주령에 고지방식이(HFD)를 투여했다.
- [0051] 또한 포도당 내성 테스트(GTT) 또는 인슐린 내성 테스트(ITT)에 대해 각각 밤새 단식한 후 마우스에 포도당을 주사하거나 6시간 단식한 후 인간 인슐린을 주사하였다. 마우스의 신체 구성물은 EchoMRI(Echo Medical Systems)를 사용하여 분석하였고, 조직 샘플은 마우스를 CO₂로 안락사 시켜, 조직 샘플을 수집하여 액체질소에 급속 냉동 후 -80℃에서 보관하여 실험을 실시하였다.
- [0053] <실시 예3> 플라스미드 제작 및 발현
- [0054] FLAG가 태그된 PPAR γ 에 대한 플라스미드 발현 벡터는 FLAG가 태그된 포유동물 발현 벡터로 제조되었고, WT 인간 PPP3R1, PPP3R2, PPP3CA, PPP3CB와 PPP3CC는 한국생명공학연구원(KRIBB)으로부터 분양 받았다. 실험에 사용된 포유동물 발현 플라스미드는 Lipofectamine™ 2000 유전자 도입 용액을 이용하여 유전자를 도입하여 제작 및 발현하였다.
- [0056] <실시 예4> 면역침강법 및 면역블롯팅 (Immunoprecipitation and Immunoblotting)
- [0057] PPAR γ 를 발현하는 HEK293에 TNF α 를 100 ng/ml로 처리하고, 전체 세포 용해물을 FLAG M2 agarose와 함께 4℃에서 배양하였다. 면역침전물 또는 전체세포 또는 조직 용해물은 Ser273의 PPAR γ 에 대한 인산화 특이 항체 및 anti-PPAR γ 항체로 분석하였다.
- [0059] <실시 예5> 시험관 내 탈인산화 분석 (In vitro dephosphorylation assay)
- [0060] GST(Glutathione S-transferase) 융합 PPAR γ 는 ATP가 포함된 키나아제 분석 완충액(Tris-HCl, pH 7.5, β -glycerophosphate, DTT, Na₃VO₄, MgCl₂)에서 활성 ERK1/2와 함께 30℃에서 20분 동안 배양한 다음, 정제된 인산화 GST 융합 PPAR γ 를 calcineurin 포스파타아제 완충액이 포함된 calcineurin 인간 재조합체와 함께 30℃에서 30분 동안 배양시켰고, 단백질을 샘플 완충액을 첨가하여 반응을 종료 시켰다. PPAR γ 의 인산화는 S273의 PPAR γ 에 대한 인산화 특이항체, anti-GST 또는 PPP3R1항체를 사용하여 SDS-PAGE로 분석하였다.
- [0062] <실시 예6> 점 블롯 분석(Dot blot assay)
- [0063] Calcineurin 인간 재조합체를 calcineurin 포스파타아제 분석 완충액에서 PPAR γ 의 아미노산 서열을 보존하는 phospho-Ser273 펩타이드와 함께 30℃에서 20분 동안 배양하였고, 상기 배양한 샘플을 니트로셀룰로스 막에 점을 찍어 실온에서 3시간 동안 건조시켰다. 건조 후 니트로셀룰로스 막을 tris-완충 식염수와 tween20(TBST)로 10분당 3회 세척하였다. 세척된 막은 BSA로 차단하였고, S273의 PPAR γ 에 대한 인산화 특이항체를 사용하여 면역 블롯팅을 수행하였다.
- [0065] <실시 예7> Real-Time RT-PCT (qPCR)
- [0066] 전체 RNAs는 TRIzol 시약을 사용하여 분리하였고, ABI 역전사 키트를 사용하여 RNA의 역전사를 수행하였고, qPCR은 7900HT Fast Real-Time PCR system을 사용하여 수행하였다. 각 유전자의 상대적인 mRNA의 발현 수준은

36B4 또는 TBP로 표준화 되었으며, 각 분석은 3회 수행하였고, 데이터는 microsoft excel 프로그램으로 분석하였다.

[0068] <실시 예8> 면역조직화학 (Immunohistochemistry)

[0069] PPP3R1^{f/f}와 PPP3R1^{AKO} 마우스로부터 조직을 수집하여 포르말린에 고정하였고, ingWAT의 UCP1에 대한 면역염색은 Histoire 업체를 통해 수행되었다.

[0071] <실험 예1> PPP3R1에 의한 인산화된 S273 PPAR γ 의 탈인산화

[0072] 상기의 실시 예에 따라 PPP3R1에 의한 인산화된 S273(pS273) PPAR γ 의 탈인산화를 확인해 보았다. pS273 특이 항체를 사용하여 pS273에 대한 74개의 인간 단백질 포스파타제의 효과를 조사하였는데(도 1a), PPP3R1이 pS273의 탈인산화에서 가장 효과적인 포스파타제로 확인되었다(도 1b). 또한 FLAG-PPAR γ 를 갖고 있는 HEK293 세포에서 PPP3R1 및 TNF α 처리에 의해 유도된 S273의 PPAR γ 인산화가 PPP3R1 및 TNF α 의 처리농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었으며(도 1c), PPP3R1이 S273에서 PPAR γ 의 탈인산화에 직접적으로 관여하는지 확인하기 위해 PPP3R1과 PPP3CA를 각각 조절 서브유닛과 촉매 서브유닛으로 구성된 재조합 calcineurin을 사용하여 시험관 내 탈인산화 분석을 실시한 결과 calcineurin은 S273에서 PPAR γ 를 직접 탈인산화시키는 것을 확인하였다(도 1d). 인산화 펩타이드를 재조합 calcineurin과 함께 배양했을 때, pS273이 많이 감소하는 것을 확인하였으며(도 1e), 완전히 분화된 지방세포 3T3L1에서 PPAR γ 와 PPP3R1의 상호작용을 하는 것을 확인하였다(도 1f). 또한 지방 조직에서 PPP3 계열의 임상적, 생리학적 관련성을 확인하기 위해 GEO(유전자 발현 옴니버스) 공개 데이터 세트를 조사하였는데, GEO 분석에 따르면 인슐린 저항성 피하(insulin resistant subcutaneous) 및 그물망 지방 조직(omental adipose tissue), 과체중 개인, 건강에 해로운 비만 개인 및 비만 개인의 지방 세포에서는 PPP3R1의 발현이 일관되고 크게 감소하는 패턴을 보였다(도 1g, h).

[0074] <실험 예2> PPP3R1발현과 인슐린 민감성 아디포카인을 포함한 유전자 세트의 상관관계 분석

[0075] GTEx(Genotype-Tissue Expression) 데이터베이스를 사용하여 인간 피하 및 내장 지방 조직 모두에서 PPP3R1 발현과 유전자 세트의 상관관계를 조사하였는데, 대부분의 유전자는 PPP3R1과 양의 상관관계를 보였다. 이와 같은 결과는 PPP3R1이 인간과 생쥐에서 pS273과 음의 상관관계가 있음을 강력하게 입증하는 것이다(도 2).

[0077] <실험 예3> PPP3R1의 결핍에 따른 인슐린 저항성 유도

[0078] 상기 실시 예에 따라, PPP3R1의 결핍과 인슐린 저항성 분석하기 위해, Ppp3r1-floxed 마우스와 Adiponectin-cre 마우스를 교배하여 loxP-Cre 재조합 효소 시스템을 기반으로 adiponectin-Cre 시스템(지방 조직 특정 녹아웃, AKO)이 적용된 지방세포 특이적 PPP3R1 결핍 마우스(PPP3R1^{AKO})를 생성하였다(도 3a). PPP3R1^{AKO} 마우스에서 PPP3R1 단백질과 Ppp3r1 mRNA 발현을 확인했을 때 지방 조직에서만 PPP3R1 단백질이 고갈되었지만 간에서는 여전히 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다(도 3b, c). pS273은 비만에 의해 유발되는 것으로 잘 알려져 있기 때문에 우리는 정상 식이(NCD) 또는 고지방식이(HFD)을 PPP3R1^{f/f}(PPP3R1 야생형) 및 PPP3R1^{AKO} 한배새끼에게 실시하였다. 몇 주 동안 식이 요법을 하는 동안 PPP3R1^{f/f} 및 PPP3R1^{AKO} 마우스의 체중 변화를 조사했는데 두 식이 조건 모두에서 두 유전자형 사이에 유의미한 차이가 없었다(도 3d). 또한 포도당 항상성에 대한 PPP3R1의 효과를 확인하였는데, 내당능은 정상식이(NCD)를 먹인 PPP3R1^{f/f}와 PPP3R1^{AKO} 사이에서 비슷했지만 고지방식이(HFD)를 먹인 PPP3R1^{AKO} 마우스는 내당능 장애를 보였다(도 3e). 이는 포도당 내성 테스트(GTT)의 결과와 일치하여, 인슐린 내성 테스트(ITT)에서도 고지방식이(HFD)를 먹인 PPP3R1^{AKO} 마우스에서 인슐린 감수성이 감소한 것으로 나타났다(도 3f). 특히 지방 조직에서 PPP3R1의 유전적 결제는 체중 증가 없이 인슐린 저항성을 유도하는 것을 알 수 있었다.

[0080] <실험 예4> PPP3R1^{AKO} 마우스의 열 발생 유전자 활성 감소

[0081] calcineurin의 내인성 억제제인 유전적으로 고갈된 RCAN1 (calcineurin 1의 조절자)은 생체 내에서 PGC1 α 및 UCP1의 활성화를 제어하여 열 발생을 향상 시키는 것으로 알려져 있어서, calcineurin의 필수 구성요소인 PPP3R1의 부족이 식이 유발 열 발생에 영향을 분석하기 위해, 상기 실시 예에 따라 실험을 실시하였다. PPP3R1^{f/f} 한배 새끼의 UCP1 발현과 비교하여 PPP3R1^{AKO} 생쥐의 사타구니 지방 조직에서 UCP1 발현이 크게 감소하였으며(도 3g), PPP3R1^{AKO}의 사타구니 지방 조직에서 Ucp1 및 Pgc1 α 를 포함한 열 발생 유전자 발현이 유의하게 감소하였다(도 3h). 이는 PPP3R1이 식이 유발 열 발생 동안 열 발생 매개체 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

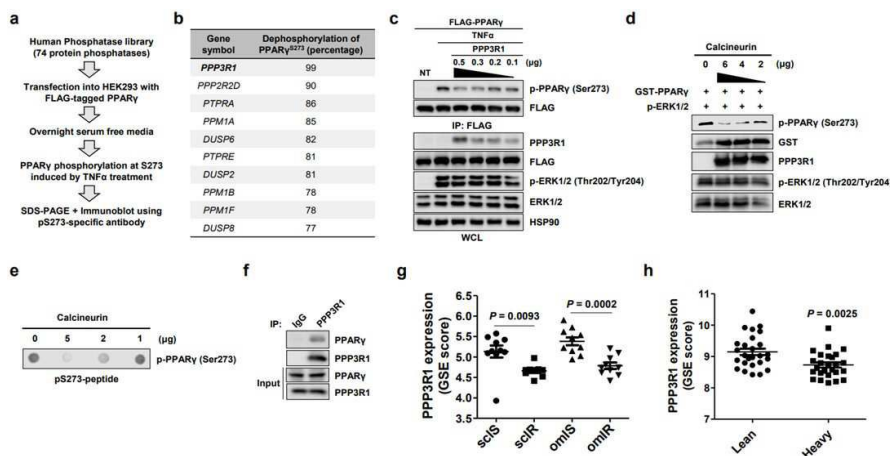
[0083] <실험 예5> 비인산화성 S273의 PPAR γ 함유 마우스의 인슐린 감수성 증가와 열 발생 활성화

[0084] 상기 실시 예에 따라, PPP3R1의 인슐린 감수성과 대사 항상성에서 pS273의 생리학적 역할을 분석하기 위해, PPAR γ 가 S273에서 인산화될 수 없는 유전자 조작 마우스 모델을 생성하여 실험을 실시하였다. CRISPR/Cas9-유도된 녹-인 방법을 사용하여 PPAR γ 의 코돈 273에서 세린을 알라닌으로 치환하였고(그림 4a), 동형 접합성 녹인 마우스(PPAR γ S273A/S273A, 이하 S273A KI라고 함)는 이형접합성 녹인 마우스를 교배하여 생성하였다. 고지방 사료 공급 과정에서 pS273이 높게 유도된다는 점을 고려하여 고지방식이(HFD)에서 S273A KI 및 야생형(WT) 한배 새끼 마우스에 지방 및 체중증가를 확인하였는데, 두 종류 마우스는 체중 증가에 차이가 없었다(도 4b, c). 또한 포도당 내성 테스트(GTT)와 인슐린 내성 테스트(ITT)를 수행하여 고지방식이(HFD)를 실시한 마우스의 포도당 항상성과 인슐린 민감성에 대한 PPAR γ 인산화의 효과를 평가하였는데, 고지방식이(HFD)를 먹인 PPAR γ S273A KI 마우스는 포도당 내성 증가와 인슐린 민감성을 나타내었다(도 4d, e). S273위치에서 인산화된 PPAR γ 의 탈인산화에 기여하는 PPP3R1의 손실은 생체 내에서 식이 유발 열 발생을 손상시키기 때문에, S273A KI 및 WT 마우스에서 열 발생 유전자 발현 패턴을 확인하였는데, 지방 생성 유전자 발현의 변화 없이 WT 동배와 비교하여 S273A KI 마우스에서 열 생성 능력이 확실히 증가했다(도 4f). 이와 같은 결과는 pS273이 식이에 의해 유도된 열 발생을 방해하고 필수 분자 파트너인 PPP3R1에 의해 조절된다는 것을 확인할 수 있었다.

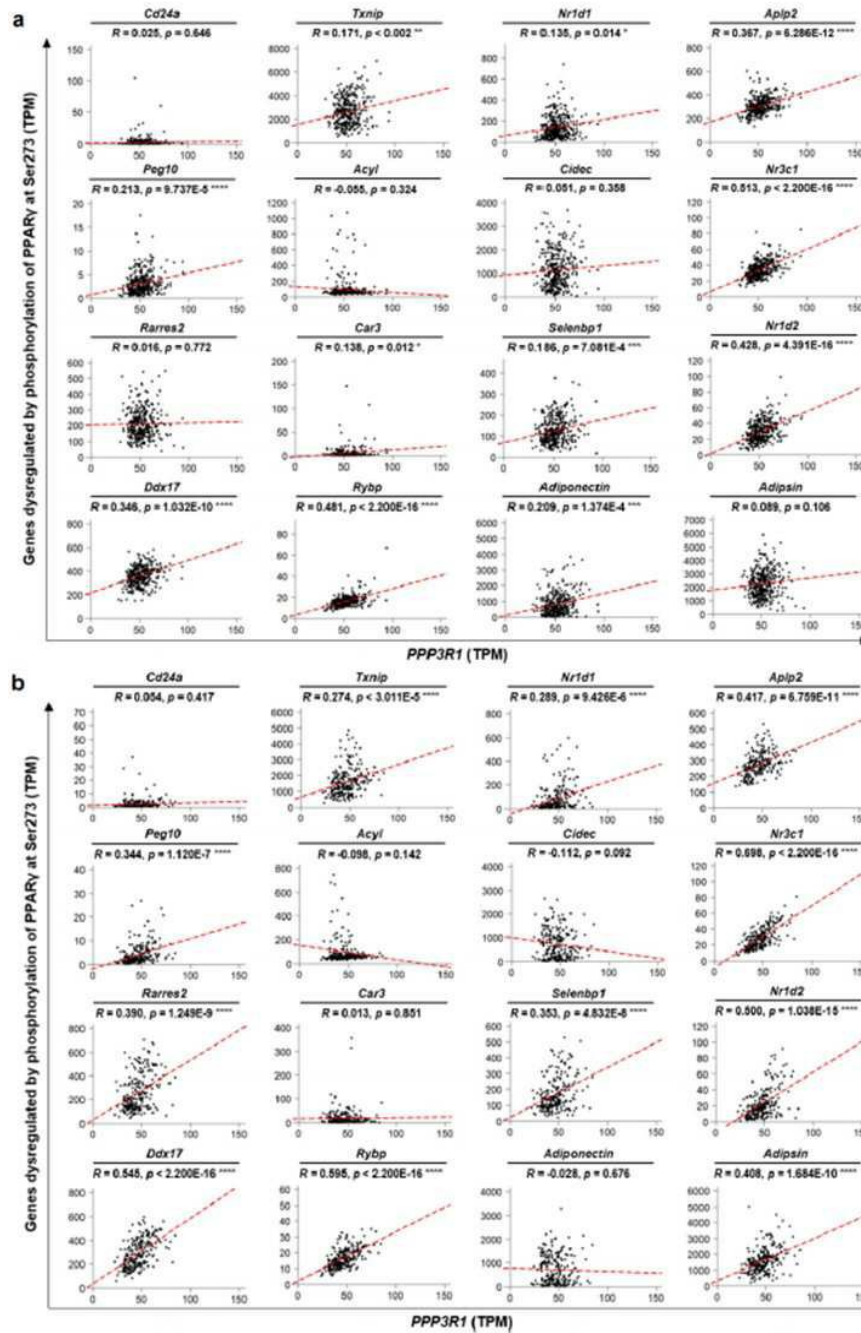
[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

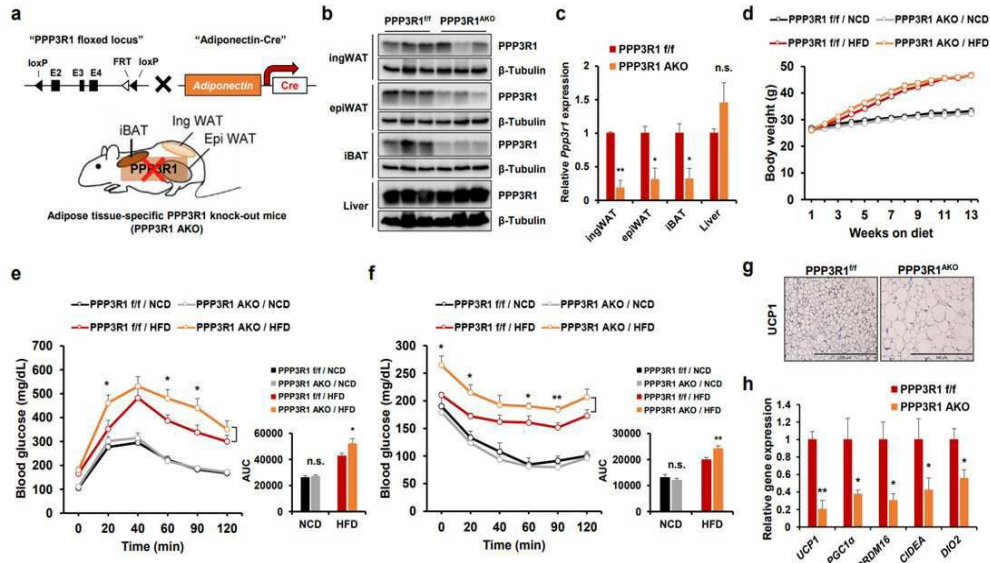
도면1



도면2



도면3



도면4

