(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0129703
(43) 공개일자 2019년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 27/02* (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5058 (2013.01)
G01N 27/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0042541
(22) 출원일자 2019년04월11일
심사청구일자 2019년04월11일
(30) 우선권주장
1020180054043 2018년05월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박재용
서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동,래미안라센트)
유강현
서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 106동 705호 (하월곡동,꿈의숲푸르지오아파트)
배연주
서울특별시 중구 동호로8길 30, 헤리티지 403호 (신당동)
(74) 대리인
이명진

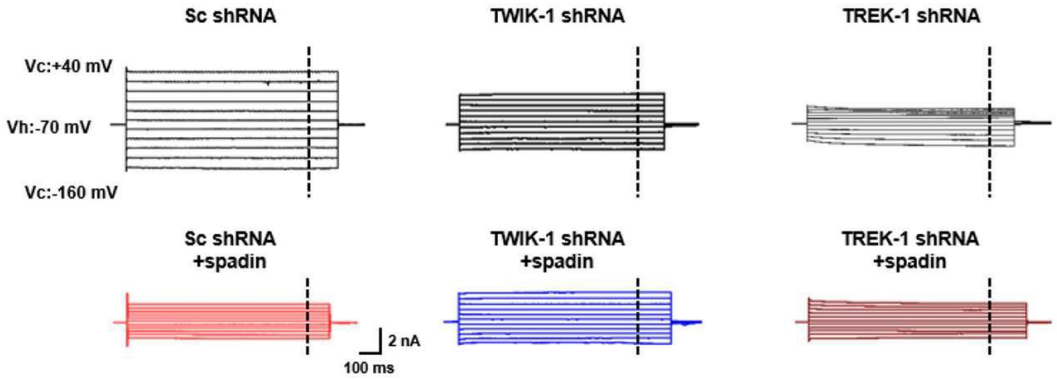
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **별아교세포 특이적 수동전도도 억제약물의 스크리닝 시스템 및 이의 활용**

(57) 요 약

본 발명은 별아교세포 특이적 수동전도도를 조절할 수 있는 조성물에 관한 것이며, 더 나아가 상기 약물을 이용하여 별아교세포 특이적 수동전도도 억제약물를 스크리닝하는 시스템 및 이의 활용 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 스파딘(Spadin)의 별아교세포 수동전도도 억제 효과를 이용하여, 수동전도도 억제물질 탐색 시스템으로 활용이 가능하며 TREK-1 또는 TWIK-1 이온통로의 유전자 발현을 억제시킨 별아교세포를 이용함으로써, TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존성 및 비의존성 수동전도도를 제어하는 물질 탐색을 위한 스크리닝 시스템 개발이 가능하며 관련된 생리현상, 질병의 발병기전 연구 및 그 치료법 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도7a



(52) CPC특허분류
G01N 33/4833 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711068824
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구
연구과제명 인터렉톰 기반 TWIK1 이온통로의 뇌세포 특이적 기능연구
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711061082
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 질병 표적 막단백질에 대한 다중표적 기반 천연물 효능검증기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.11.01 ~ 2018.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

스파딘(Spadin)을 유효성분으로 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 별아교세포의 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 억제하는 것을 특징으로 하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 별아교세포의 칼륨 이온(K^+)의 전도도를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물.

청구항 4

(a) 별아교세포에 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 별아교세포에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 측정에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도가 억제되는 경우 상기 후보물질을 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제로 선정하는 단계를 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제 스크리닝 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 (b) 단계의 수동전도도 측정은 별아교세포의 칼륨 이온(K^+) 전도도 측정을 통하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스파딘(Spadin)을 유효성분으로 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물 및 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 별아교세포(astrocyte)는 뇌에서 가장 많은 부분을 차지하는 세포로서, 신경세포(neuron)가 그 기능을 수행하는데 있어 보조적인 역할을 수행하는 것으로만 알려져 왔다. 그러나, 최근 여러 연구를 통해서 별아교세포가 신경세포와 활발하고 유기적인 상호작용을 통하여 신경세포의 생존, 영양 공급뿐 아니라 신경세포 간의 신호전달을 조절함으로써 뇌기능에 중요한 역할을 수행하고 있음이 밝혀졌다. 특히, 성숙한 별아교세포는 “수동전도도”라

고 부르는 직선에 가까운 전압-전류 관계를 보여, 이는 세포 외 칼륨 이온(K^+) 농도를 조절하여 생리 및 병리학적 상황에서 신경세포의 생존과 흥분성을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 별아교세포의 수동전도도는 고농도의 바륨 이온(Ba^{2+}), 퀴닌(quinine), 퀴니딘(quinidine) 등에 의해 일정부분 저해됨이 보고된 바 있으나, 현재까지 별아교세포의 수동전도도에 선택적인 활성억제제는 알려져 있지 않기에 별아교세포의 수동전도도의 효과적 조절에 어려움이 있어 왔다. 또한, 바륨 이온(Ba^{2+}), quinine 등은 전압반응성 칼륨 이온통로 (Kv), 내측편향성 칼륨 이온통로(Kir)에 대해서도 비특이적, 비효율적 저해제로 사용되고 있기에, 높은 농도의 바륨 이온(Ba^{2+}), 퀴닌(quinine), 퀴니딘(quinidine)의 사용은 별아교세포 수동전도도의 억제 뿐 아니라 다양한 칼륨 이온통로 억제에 따른 간접적, 비특이적 부작용을 높일 수 있다.

[0004] 별아교세포의 수동전도도를 담당하는 이온통로의 분자적 실체를 규명하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔으며, 본 발명자의 선행연구에 의해 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로가 별아교세포의 수동전도도를 담당하는 이온통로임을 과학적으로 증명한 바 있다. 본 발명자는 선행연구를 통해 별아교세포에서 TWIK-1과 TREK-1 이온통로가 서로 결합하여 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로를 형성함을 확인하였다. 또한, 별아교세포에서 TWIK-1 혹은 TREK-1(TWIK-related potassium channel-1) 중 한 가지 유전자의 발현을 저해하는 것만으로도 별아교세포의 수동전도도가 크게 감소됨을 확인하였다. 그 결과, TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로가 별아교세포의 수동전도도의 약 70 %를 매개함을 확인하였으며, 나머지 30 %를 매개하는 이온통로는 아직 규명되지 않았다.

[0005] 별아교세포의 수동전도도를 담당하는 TWIK-1/TREK-1 이온통로는 TWIK-1 또는 TREK-1 이온통로의 이형결합으로 만들어진 이온통로이기에 TREK-1, TWIK-1 각각의 이온통로 활성제 및 억제제에 의해 활성이 조절될 가능성이 매우 높다. 선행연구를 통해 이종 시스템(Heterologous system)에 과발현된 TREK-1 이온통로는 아카리돈산(arachidonic acid), 플루옥세틴(Fluoxetine), 퀴니딘(Quinidine), 솔티린(Sortilin) 단백질로부터 유래된 펩타이드(peptide)인 스파딘(spadin) 등에 의해 활성이 억제됨이 보고되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허공보 10-1580857

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 초대배양된 별아교세포에 shRNA 및 CRISPR/Cas9 기술을 사용하여 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로의 발현을 저해한 대조군 별아교세포에서 전기생리학적 이온통로 활성측정기술을 활용한 별아교세포 특이적 수동전도도 억제약물 스크리닝 시스템을 완성하였으며, 기존에 보고된 TREK-1 이온통로의 억제제들을 대상으로 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로의 억제능력을 확인함으로써 별아교세포 특이적 수동전도도 선택적인 약물 스크리닝에 활용 가능성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 스파딘(Spadin)을 유효성분으로 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스파딘(Spadin)을 유효성분으로 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로, 상기 조성물은 별아교세포의 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 억제할 수

있다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 별아교세포의 칼륨 이온(K^+)의 전도도를 억제할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 (a) 별아교세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0015] (b) 상기 (a) 단계의 별아교세포에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 측정하는 단계; 및

[0016] (c) 상기 (b) 단계의 측정에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도가 억제되는 경우 상기 후보물질을 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제로 선정하는 단계를 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예로, 상기 (b) 단계의 수동전도도 측정은 별아교세포의 칼륨 이온(K^+) 전도도 측정을 통하여 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 스파딘(Spadin)은 다양한 생리적 및 병리적 상황에서 별아교세포의 수동전도도를 효과적으로 조절할 수 있고, TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로 비의존성 수동전도도에 대한 분자적 실체와 그 기작을 규명하는 데 활용될 것으로 기대되며, 본 발명에 따른 별아교세포의 수동적 전도도 조절은 세포 수준으로부터 동물 수준에 이르기까지 수동적 전도도의 분자적 기작, 관련 질병의 발병 기작에 대한 연구를 위한 모델 및 별아교세포 관련 질환 치료제 개발에 활용될 것으로 기대된다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 스파딘(Spadin)의 별아교세포 수동전도도 억제 효과를 이용하여, 수동전도도 억제물질 탐색 시스템으로 활용이 가능하며, TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로의 유전자 발현을 억제시킨 별아교세포를 이용함으로써, TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존성 및 비의존성 수동전도도를 제어하는 물질 탐색을 위한 스크리닝 시스템 개발이 가능하며 관련된 생리현상, 질병의 발병기전 연구 및 그 치료법 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

[0020] 나아가, 기존에 사용되던 테트라에틸암모늄(tetraethylammonium;TAE), 4-아미노피리딘(4-aminopyridine;4-AP), 바륨 이온(Ba2+), 퀴니딘(quinidine), 플루옥세틴(fluoxetine) 등 칼륨 이온통로(potassium channel)의 저해제는 수동전도도에 영향이 없거나, 높은 농도에서 약간의 저해성을 보임으로써 선택성이 매우 낮기 때문에 효과적 사용이 제한되는데 비해, 스파딘(Spadin)은 상대적으로 매우 낮은 농도에서 특이적으로 작용하며 매우 높은 억제능력을 보인다.

[0021] 즉, 본 발명을 통해 스파딘(Spadin)이 별아교세포의 수동전도도를 효과적으로 저해함을 관찰하였을 뿐 아니라, 다양한 유전자 발현 조절기술과 접목하여 수동전도도의 많은 부분이 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로 의해 매개됨을 규명으며 또한, TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로 비의존적 수동전도도가 별아교세포에 존재함을 확인하였으므로, 본 발명의 상기 연구결과는 TWIK-1/TREK-1 의존적 또는 비의존적 별아교세포 특이적 수동전도도 억제 약물의 스크리닝 시스템 및 이의 활용에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 배양된 별아교세포에 스파딘(Spadin)을 표시된 농도로 각각 처리하고 세포의 칼륨 이온(K^+)의 전도도를 막전압을 -150 mV 에서 +50 mV로 변화시키면서 측정 후 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 1b는 상기 도 1a에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 1c는 상기 도 1a에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV에서의 스파딘(Spadin)에 대한 약물영향효과 (EC50: Half maximal effective concentration)에 대한 꺾은선그래프이다.

도 1d는 상기 도 1a에서처럼 스파딘(Spadin)을 표시된 농도로 각각 처리하였을 시 반전전위(reversal potential)를 나타낸 그래프이다.

도 2a는 배양된 별아교세포에 TREK-1에 대한 shRNA 또는 scrambled RNA를 형질주입(transfection)한 후, 10μM 스파딘(Spadin)을 처리하고 세포의 칼륨 이온(K^+)의 전도도를 막전압을 -150 mV 에서 +50 mV로 변화시키면서 측정한 후 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 2b는 상기 도 2a에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 2c는 상기 도 2a에서 10μM 스파딘(Spadin)을 처리 전후 조건에서 scrambled RNA 형질주입 후 측정된 전류값에서 TREK-1 shRNA 형질주입 후, 측정된 전류 값을 뺀 전류 값에 대한 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 2d는 상기 도 2c에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 3a는 배양된 별아교세포에 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자와 control guide RNA(gRNA) 또는 TREK-1를 표적으로 하는 gRNA와 함께 형질주입한 후, 면역세포화학(Immunocytochemistry)방법으로 TREK-1의 단백질의 세포내 발현억제 효과를 확인한 그림이다.

도 3b는 배양된 별아교세포에 Cas9 유전자와 control gRNA 또는 TREK-1 gRNA과 함께 형질주입한 후, 10 μM 스파딘(Spadin) 처리 유무에 따른 세포의 칼륨 이온(K^+) 전도도를 막전압을 -150 mV 내지 +50 mV로 변화시키면서 측정 후 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 3c는 상기 도 3b에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 3d는 상기 도 3b에서 10μM 스파딘(Spadin)을 처리 전후 조건에서 scrambled RNA 형질주입 후 측정된 전류값에서 TREK-1 shRNA 형질주입 후, 측정된 전류 값을 뺀 전류 값에 대한 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 3e는 상기 도 3d에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 4a는 배양된 별아교세포에 Cas9 유전자와 TWIK-1를 표적으로 하는 gRNA과 함께 형질주입한 후, 염색체 유전자 상에서 유도된 돌연변이의 염기서열을 확인한 그림이다.

도 4b는 배양된 별아교세포에 Cas9 유전자와 TWIK-1 gRNA를 형질주입한 후, 면역세포화학(Immunocytochemistry)방법으로 TWIK-1 단백질의 발현억제 효과를 확인한 그림이다.

도 4c는 배양된 별아교세포에 Cas9 유전자와 control gRNA 또는 TWIK-1 gRNA를 함께 형질주입한 후, 10 μM Spadin을 처리 전후 조건에서 세포의 칼륨 이온(K^+) 전도도를 막전압을 -150 mV 부터 +50 mV로 변화시키면서 측정한 후 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 4d는 상기 도 4c에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 4e는 상기 도 4c에서 10μM 스파딘(Spadin)을 처리 전후 조건에서 scrambled RNA 형질주입 후 측정된 전류값에서 TREK-1 shRNA 형질주입 후, 측정된 전류 값을 뺀 전류 값에 대한 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 4f는 상기 도 4e에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 5a는 TREK-1, TWIK-1 유전자를 일렬로 연결한 융합유전자 (TREK-1/TWIK-1)를 COS-7 세포주에 형질 주입한 후, TREK-1/TWIK-1 이온통로를 통해 흐르는 칼륨 이온(K^+)의 전도도에 미치는 스파딘(Spadin)의 억제효과를 막전압 -150 mV 에서 +50 mV로 변화시키면서 측정하여 나타낸 전압-전류 관계를 나타낸 것이다.

도 5b는 상기 도 5a에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +50 mV와 -150 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 6a는 마우스 뇌로부터 얻어진 해마 절편에 스파딘(Sapdin), 퀴니딘(quinidine) 또는 플루옥세틴(Fluoxetine)을 각각 표시된 농도로 처리한 후 막전압을 -160 mV 에서 +40 mV로 변화시키면서 별아교세포 수동전도도를 측정하여 나타낸 전류값이다.

도 6b는 상기 도 6a에서 측정된 전류-전압 관계로 수동적 전도도를 나타낸 것이다.

도 6c는 상기 도 6b에서 측정된 전류 값 중 막전압이 +40 mV와 -160 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

도 6d는 상기 도 6b에서 측정된 역전 전압(reversal potential)을 나타낸 막대그래프이다.

도 7a는 생쥐 뇌의 해마부위에 TWIK-1, TREK-1 유전자를 각각 표적으로 하는 shRNA들 또는 control scRNA를 지니고 있는 아데노 관련 바이러스(adeno-associated virus)를 정위법으로 주입 후 2주 후 생쥐 뇌로부터 얻어진 해마 절편에 10 μM 스파딘(Sadin)을 처리 전후 조건에서 막전압을 -160 mV 에서 +40 mV로 변화시키면서 별아교세포의 수동전도도를 측정하여 나타낸 것이다.

도 7b는 상기 도 7a에서 scRNA가 주입된 마우스로부터 측정된 스파딘(Spadin) 처리 전후에 따른 별아교세포 수동전도도의 변화를 전류-전압 관계로 나타낸 것이다.

도 7c는 상기 도 7a에서 TWIK-1 shRNA가 주입된 마우스로부터 측정된 스파딘(Spadin) 처리 전후에 따른 별아교세포 수동전도도의 변화를 전류-전압 관계로 나타낸 것이다.

도 7d는 상기 도 7a에서 TREK-1 shRNA가 주입된 마우스로부터 측정된 스파딘(Spadin) 처리 전후에 따른 별아교세포 수동전도도의 변화를 전류-전압 관계로 나타낸 것이다.

도 7e는 상기 도 7b, 7c 및 7d에서 측정된 전류값 중에서 막전압이 +40 mV와 -160 mV 인 경우의 전류값을 나타낸 막대그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명자들은 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로의 발현을 저해한 대조군 별아교세포에서 전기생리학적 이온통로 활성측정기술을 활용한 별아교세포 특이적 수동전도도 억제약물 스크리닝 시스템을 완성하였으며, 기존에 보고된 TREK-1 이온통로의 억제제들을 대상으로 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로의 억제능력을 확인함으로써 별아교세포 특이적 수동전도도 선택적인 약물 스크리닝에 활용 가능성을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서는, 별아교세포의 수동전도도 활성조절 물질을 개발하기 위하여, 배양된 별아교세포에 다양한 후보 약물을 처리하여 전기생리학적 기술을 이용하여 수동전도도에 미치는 약물의 효과를 비교한 결과, 배양된 별아교세포에서 스파딘(Spadin)이 효과적으로 수동전도도를 저해함을 확인하였다(실시예 1, 6 참조).

[0025] 본 발명의 다른 실시예에서는, shRNA 또는 CRISPR/Cas9 기술을 통해 TREK-1 또는 TWIK-1 이온통로의 유전자 발현을 억제함으로써 스파딘(Spadin)이 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로 의존적 수동전도도를 조절함을 확인하였다(실시예 2, 3, 4 참조).

[0026] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, TREK-1/TWIK-1 이온통로를 통해 흐르는 칼륨 이온(K^+)의 전도도에 미치는 스파딘(Spadin)의 억제효과를 확인하였다(실시예 5 참조).

[0027] 본 발명의 또 다른 실시에에서는, 마우스 뇌의 해마조직 절편에서 스파딘(Spadin), 퀴니딘(Quinidine) 또는 플루옥세틴(Fluoxetine) 등과 별아교세포 수동전도도에 대한 억제효과를 비교하여, 스파딘(Spadin)이 가장 효과적인 수동전도도의 저해제임을 확인하였다(실시예 6 참조).

[0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 스파딘(Spadin)을 유효성분으로 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제용 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명에서 "별아교세포(astrocyte)"는, 신경 조직을 지지하는 신경 아교를 이루는 세포 중 하나로, 세포가 크고 혈관과 뇌막 쪽으로 뻗는 많은 돌기가 있다. 가늘고 긴 돌기가 매우 많아 별모양처럼 보이기 때문에 별아교세포라는 이름이 붙은 세포이다.

[0031] 본 발명에서 “수동전도도”는 성숙한 별아교세포에서 직선에 가까운 전압-전류 관계를 보여, 이는 세포 외 칼륨 이온(K^+)의 농도를 조절하여 생리 및 병리학적 상황에서 신경세포의 생존과 흥분성을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0032] 본 발명의 상기 조성물은 별아교세포의 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 억제할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 TWIK-1과 TREK-1는 별아교세포 내에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로를 형성하며, TWIK-1 혹은 TREK-1 중 한 가지 유전자의 발현을 저해하는 것만으로도 별아교세포의 수동전도도를 억제할 수 있다. 또한, TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로가 별아교세포 전체 수동전도도의 약 70 %를 매개하며, 나머지 30 %를 매개하는 이온통로는 아직 규명되지 않은 상태이다.

[0034] 본 발명의 조성물은 별아교세포의 칼륨 이온(K^+)의 전도도를 억제시킬 수 있다.

[0035] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 별아교세포에 후보물질을 처리하는 단계;

[0036] (b) 상기 (a) 단계의 별아교세포에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 측정하는 단계; 및

[0037] (c) 상기 (b) 단계의 측정에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도가 억제되는 경우 상기 후보물질을 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제로 선정하는 단계를 포함하는, 별아교세포 특이적 수동전도도 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에서 상기 상기 (b) 단계의 수동전도도 측정은 별아교세포의 칼륨 이온 전도도 측정을 통하여 수행될 수 있다.

[0039] 또한, 상기 본 발명의 내용에 비추어 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로가 별아교세포 전체 수동전도도의 약 70 %를 매개하므로, 나머지 약 30 %는 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로에 비의존적 수동전도에 관여하는 것으로 볼 수 있다.

[0040] 따라서, shRNA 또는 CRISPR/Cas9 기술 등을 이용하여 별아교세포의 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 억제시킨 다음 별아교세포의 수동전도도를 측정하는 1단계를 수행하고, 상기 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도가 억제된 별아교세포에 시험물질을 처리한 다음 별아교세포의 수동전도도를 측정하는 2단계를 수행하여, 상기 1단계 및 2단계에서의 별아교세포의 수동전도도를 비교한 결과, 2단계에서 별아교세포의 수동전도도가 더 억제된 것으로 관찰된다면 상기 시험물질은 TWIK-1/TREK-1 이형결합 비의존적 수동전도도 억제제로 기능한다는 점을 알 수 있다.

[0041] 따라서, 본 발명은 (a) 별아교세포의 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도를 억제시킨 다음 별아교세포의 수동전도도를 측정하는 단계;

[0042] (b) 상기 (a) 단계에서 TWIK-1/TREK-1 이형결합 의존적 수동전도도가 억제된 별아교세포에 후보물질을 처리한 다음 별아교세포의 수동전도도를 측정하는 단계; 및

[0043] (c) 상기 (b) 단계에서 별아교세포의 수동전도도 및 상기 (a) 단계에서 별아교세포의 수동전도도 측정값을 비교하여 (b) 단계에서 별아교세포의 수동전도도가 더 억제되는 경우 상기 후보물질을 TWIK-1/TREK-1 이형결합 비의존적 수동전도도 억제제로 선정하는 단계를 포함하는, TWIK-1/TREK-1 이형결합 비의존적 수동전도도 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1. 배양된 별아교세포에서 스파딘(Spadin)의 농도별 효과**

[0047] 별아교세포에서 스파딘(Spadin)의 칼륨 이온(K^+) 전도도에 대한 효과를 확인하기 위하여, 배양된 별아교세포에 스파딘(Sapdin)을 0 부터 10 μM 까지 다양한 농도로 각각 처리하고, 전세포 패치 (whole cell patch) 측정방법으로 세포막전압(Vm;membrane potential)을 -150 mV 부터 +50 mV로 변화시키면서 칼륨 이온(K^+)의 전도도 변화를 측정하였다. 그 결과, 스파딘(Spadin)의 농도가 증가함에 따라 전압-전류 (I-V) 관계를 나타내는 선그래프의 기울기 및 전류값이 감소함을 관찰하였다(도 1a 및 1b 참조). 또한, 세포막전압(Vm)이 +50 mV일 때의 전류(I) 값을 비교 분석하였을 때, 스파딘(Spadin)의 칼륨 이온(K+)의 전도도에 대한 EC50 값이 42.1 nM됨을 확인하였으며(도 1c 참조), 스파틴의 농도가 올라갈수록 반전전위(reversal potential)가 감소함도 확인하였다(도 1d 참조).

[0049] **실시예 2. 배양된 별아교세포에서 shRNA를 이용한 TREK-1 발현 억제에 따른 스파딘(Spadin) 효과의 변화**

[0050] TREK-1을 표적으로 하는 shRNA(서열번호1: 5'-GCGTGGAGATCTACGACAAGT-3')를 배양된 별아교세포에 형질주입(transfection)한 후, 스파딘(Spadin)을 처리에 따른 칼륨 이온(K^+)의 전도도 변화 등을 측정하여 대조군과 비교하였였다. 그 결과, 도 2a 내지 2d에 나타난 바와 같이, shRNA에 의해 TREK-1의 발현이 저해된 별아교세포에

서 칼륨 이온(K^+)의 전도도가 감소하였고, 대조군에서 관찰되는 스파딘(Spadin) 처리에 의한 억제효과는 없음을 확인하였다.

[0052] **실시예 3. 배양된 별아교세포에서 CRISPR/Cas9 실험기법을 이용한 TREK-1 발현 억제에 따른 스파딘(Spadin) 효과의 변화**

[0053] TREK-1의 CRISPR/Cas9 유전자를 형질주입(서열번호2: TREK-1 유전자 선택적인 gRNA의 염기서열 5'-ATAGTGGCAGCAATAAACGC-3')한 후, 면역세포화학(Immunocytochemistry)방법으로 별아교세포내에 TREK-1 이온통로 단백질의 발현이 사라짐을 확인하였고(도 3a 참조), CRISPR/Cas9으로 TREK-1의 발현을 저해했을 경우에도 별아교세포에서 칼륨 이온(K^+)의 전도도와 전류값이 감소하였으며, 스파딘(Spadin)의 억제효과가 관찰되지 않음을 확인하였다(도 3b 내지 도 3e 참조). 상기 결과를 통하여 별아교세포에서 스파딘(Spadin)의 칼륨 이온(K^+)의 전도도 억제효과는 TREK-1 이온통로에 의존적인 것임을 확인하였으며, 배양된 별아교세포에 TREK-1 의존적 칼륨 이온(K^+)의 전도도가 존재함을 확인 하였다.

[0055] **실시예 4. 배양된 별아교세포에서 CRISPR/Cas9 실험기법을 이용한 TWIK-1 발현 억제에 따른 스파딘(Spadin) 효과의 변화**

[0056] CRISPR/Cas9과 TWIK-1 유전자 선택적인 gRNA(서열번호3: 5'-CACGGTGCCCCTGTCAGATG-3')를 형질주입(transfection)한 후 염색체 염기서열 분석 및 면역세포화학(Immunocytochemistry)방법으로 TWIK-1 유전자의 돌연변이 염기서열을 확인하였으며(도 4a 참조), 별아교세포에서 TWIK-1 단백질의 발현이 사라짐을 확인하였다(도 4b 참조). 또한, CRISPR/Cas9으로 TWIK-1 유전자 발현을 저해했을 경우 별아교세포의 칼륨 이온(K^+) 전도도 및 전류값이 감소하였으며, 스파딘(Spadin)의 칼륨 전도도 억제효과는 관찰되지 않았다(도 4c 내지 4f 참조). 상기 결과를 통하여 스파딘(Spadin)의 별아교세포 칼륨 전도도 억제효과는 TREK-1 및 TWIK-1 이온통로에 의존적인 것임을 확인하였다.

[0058] **실시예 5. TREK-1과 TWIK-1 유전자를 일렬로 연결한 이형융합 이온통로 (TREK-1/TWIK-1) 에 대한 스파딘(Spadin) 효과**

[0059] TREK-1과 TWIK-1 유전자를 일렬로 연결한 이형융합 이온통로(TREK-1/TWIK-1)를 COS-7 세포주에 형질 주입한 후, TREK-1/TWIK-1 이온통로를 통해 흐르는 칼륨 이온(K^+)의 전도도에 미치는 스파딘(Spadin)의 억제효과를 확인한 결과, 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이 스파딘이 처리된 경우 칼륨 이온(K^+)의 전도도가 억제됨을 확인하였다. 상기 결과는 스파딘(Spadin)이 TREK-1/TWIK-1 이온결합 이온통로의 효과적인 저해제임을 의미한다.

[0061] **실시예 6. 해마절편에서 별아교세포의 수동전도도에 대한 스파딘(Spadin)의 효과**

[0062] 생쥐 뇌로부터 해마절편을 얻어, 스파딘(Spadin), 퀴니딘(quinidine) 또는 플루옥세틴(fluoxetine)을 표시된 농도로 처리 후, 별아교세포로부터 전세포 패치(whole cell patch) 실험기법으로 막전압을 -160 mV 에서 +40 mV로 변화시키면서 별아교세포 수동전도도를 측정하였다. 그 결과, 도 6a 내지 6d에 나타난 바와 같이 상기 3 가지 저해제 모두 별아교세포 수동전도도를 감소시켰고, 이중 스파딘(Spadin)이 가장 낮은 농도에서 우수한 저해효과를 보였다. 상기 결과는 생쥐의 뇌조직 내에서, 스파딘(Spadin)이 별아교세포 수동전도도를 효과적으로 저해함을 의미한다.

[0064] **실시예 7. 생쥐 뇌조직의 별아교세포에서 TWIK-1 또는 TREK-1 이온통로 발현 저해 조건에서 스파딘(Spadin)의 효과의 변화**

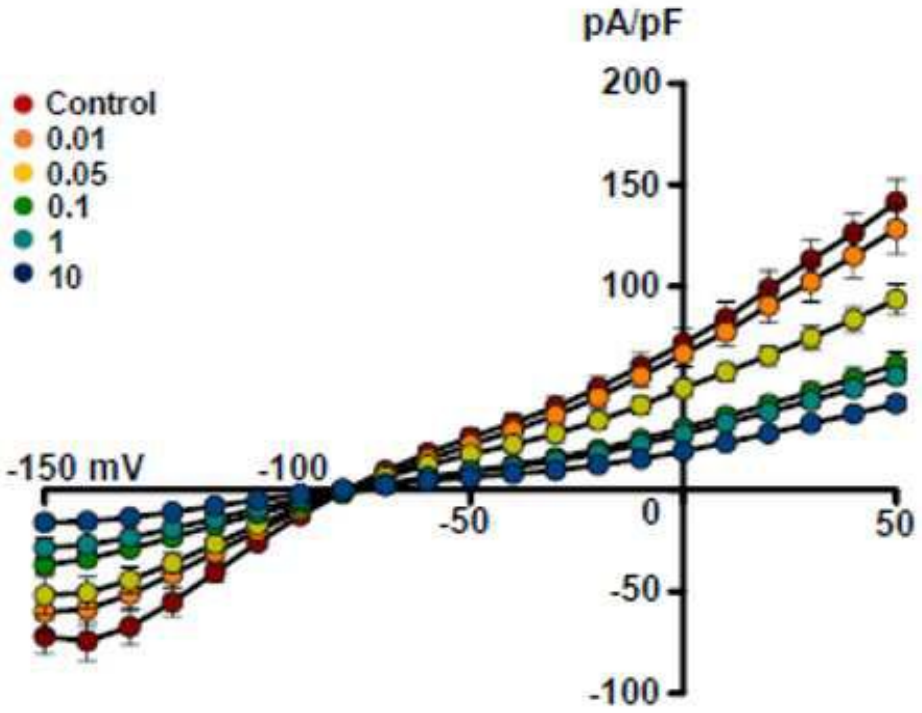
[0065] TWIK-1 또는 TREK-1 유전자 발현을 억제하는 shRNA(TREK-1 shRNA: 서열번호1 5'-GCGTGGAGATCTACGACAAGT-3' / TWIK-1 shRNA: 서열번호4 5'-GCATCATCTACTCTGTCATCG-3')를 발현시키는 아데노 관련 바이러스(adeno-associated

virus)를 생쥐의 해마부위에 정위법으로 주입 (stereotaxic injection)시키고 2주 후에 생쥐의 뇌로부터 뇌절편을 얻어 스파딘(Spadin)을 처리하고 별아교세포의 수동전도도 변화를 비교하였다. 그 결과, 도 7a 내지 7e에 나타난 바와 같이 TWIK-1 또는 TREK-1 이온통로의 발현이 저해된 마우스의 경우 대조군에 비해 수동전도도가 현저히 감소하였고, 스파딘(Spadin)의 추가적인 억제효과를 확인할 수 없었다. 상기 결과를 통하여, 스파딘(Spadin)은 TWIK-1/TREK-1 이형결합 이온통로 의존적인 별아교세포 수동전도도를 조절함을 확인하였다.

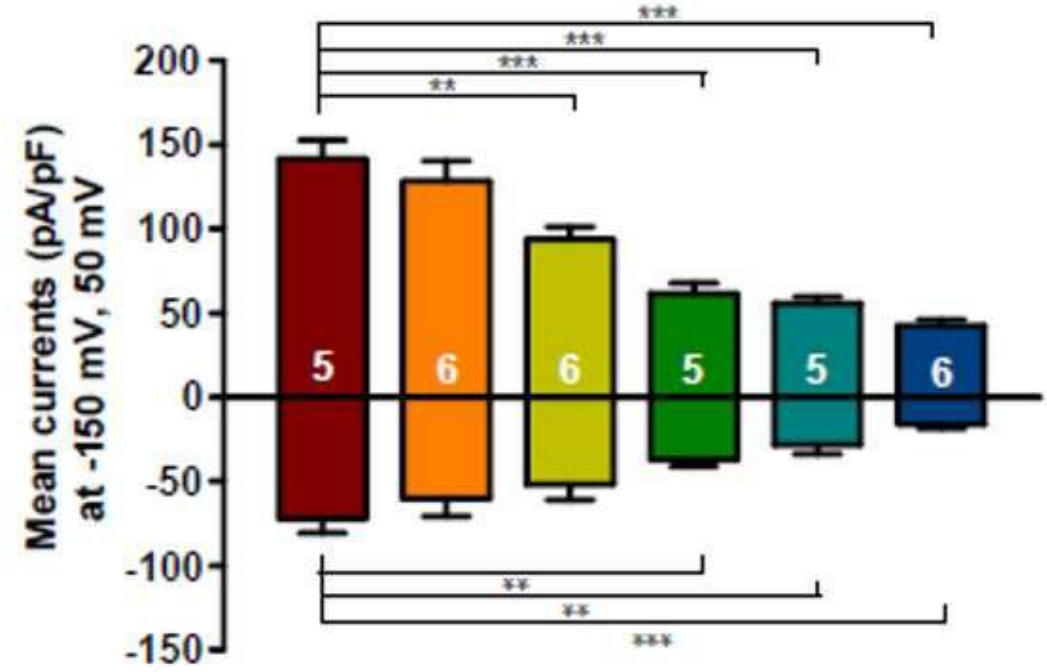
[0066] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

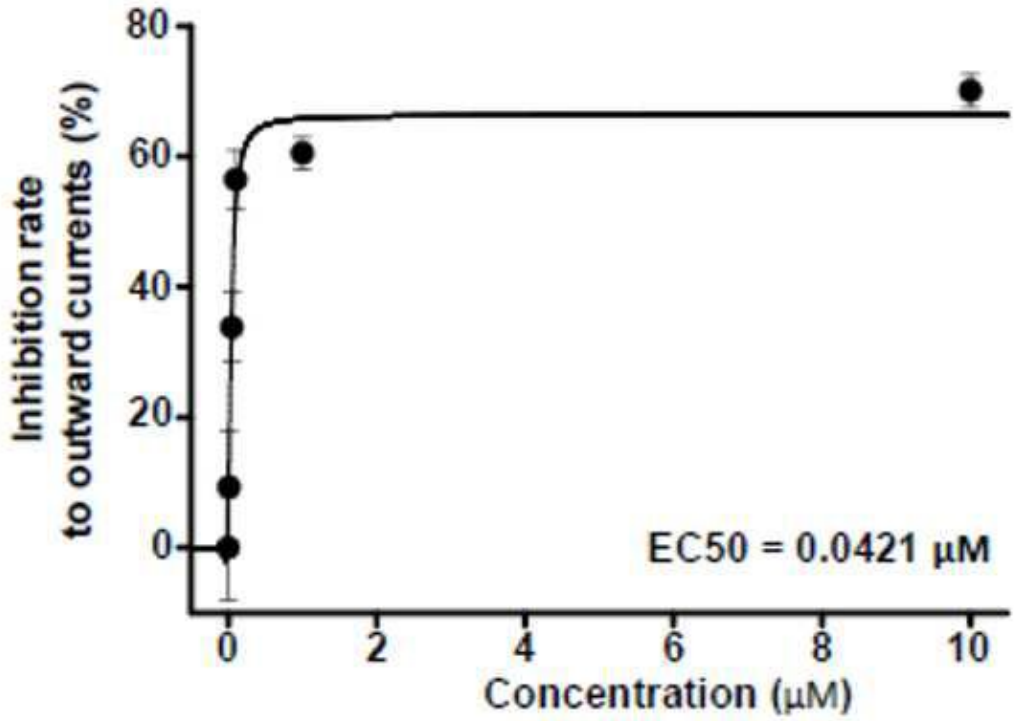
도면1a



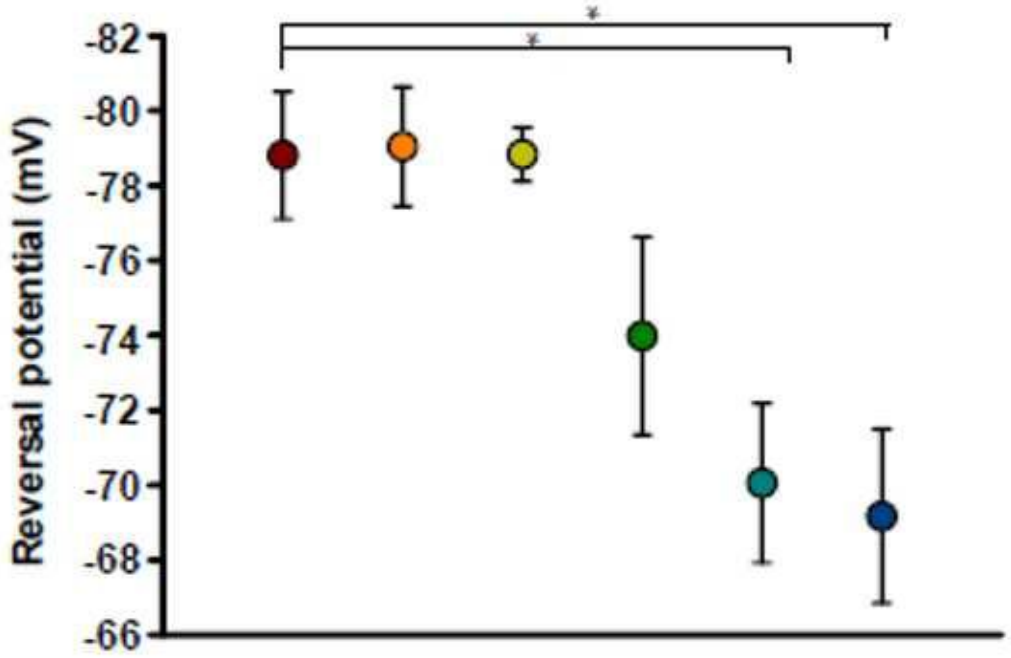
도면1b


Mean currents (pA/pF)
at -150 mV, 50 mV
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
5
6
6
5
5
6
***
***
***
**
**
**
***

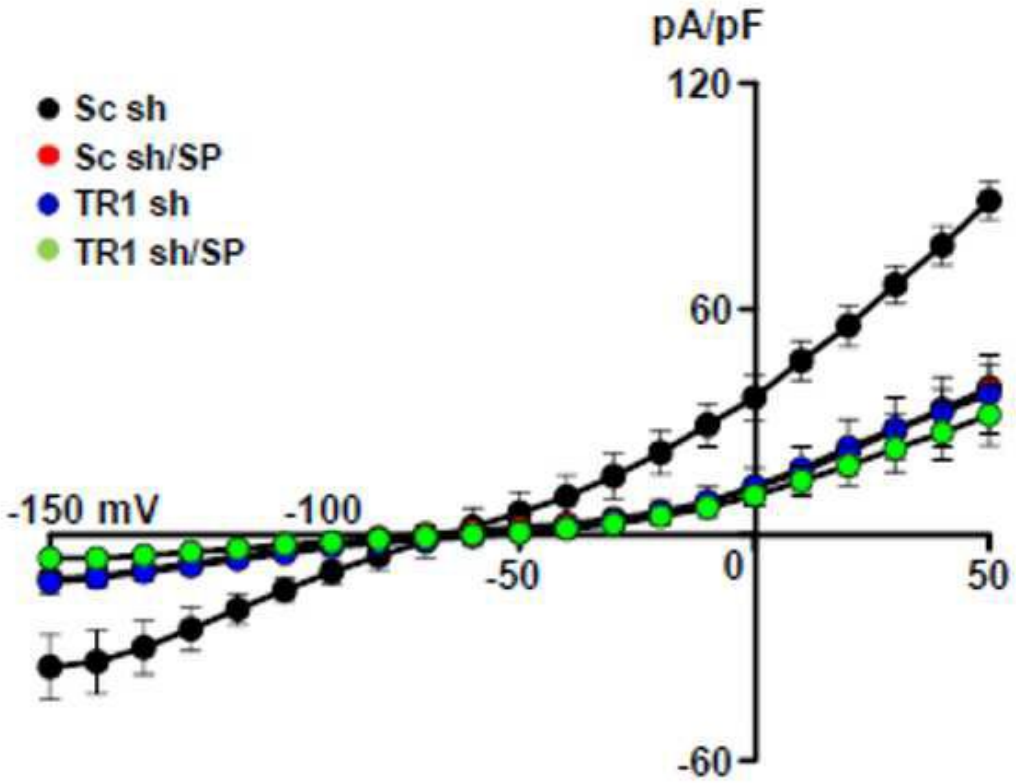
도면1c


Inhibition rate
to outward currents (%)
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
Concentration (μM)
EC50 = 0.0421 μM

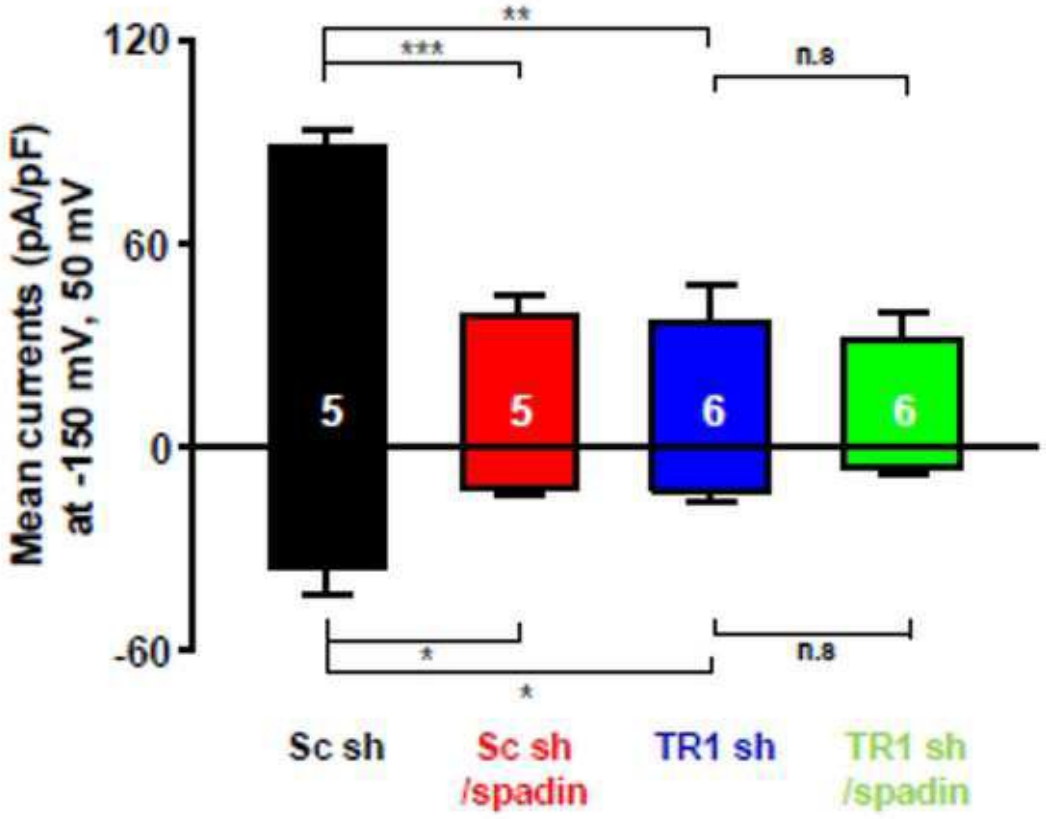
도면1d


Reversal potential (mV)
-82
-80
-78
-76
-74
-72
-70
-68
-66
*
*

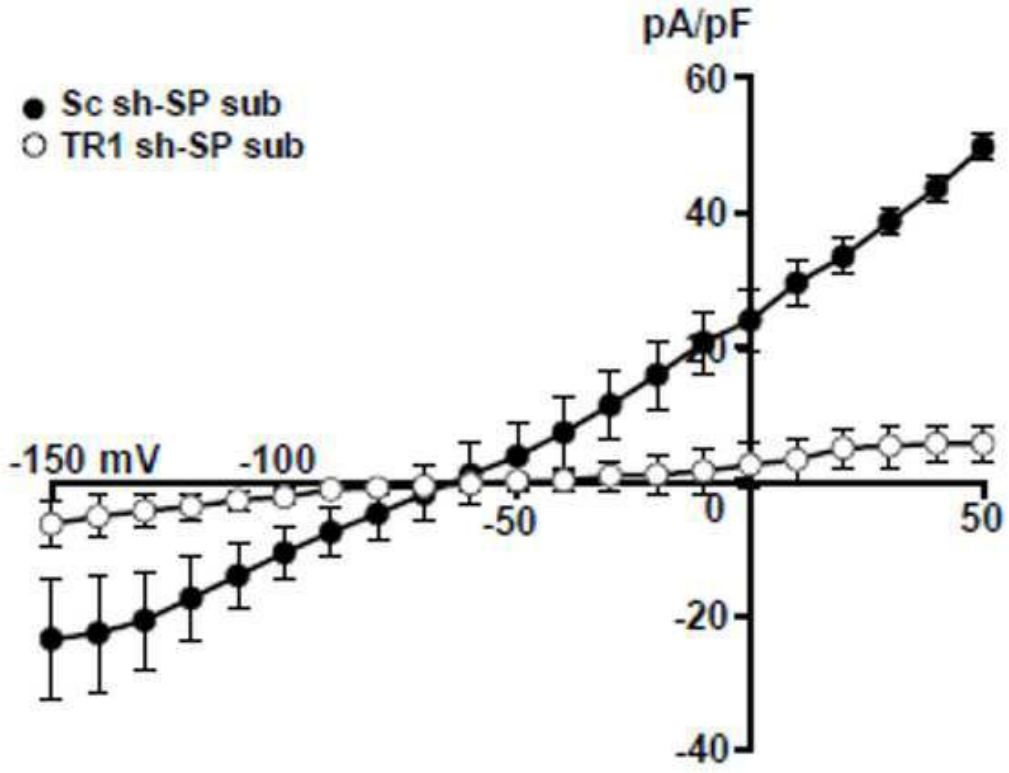
도면2a


pA/pF
120
60
-60
Sc sh
Sc sh/SP
TR1 sh
TR1 sh/SP
-150 mV
-100
-50
0
50

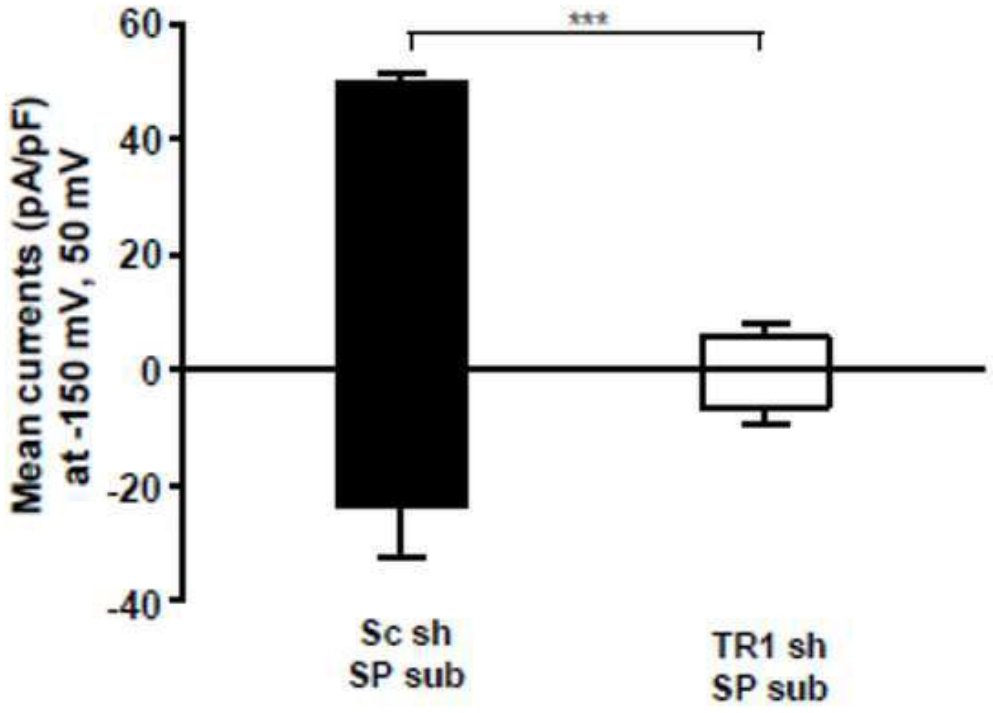
도면2b


**
***
n.s
120
60
0
-60
Mean currents (pA/pF)
at -150 mV, 50 mV
5
5
6
6
*
n.s
*
Sc sh
Sc sh
/spadin
TR1 sh
TR1 sh
/spadin

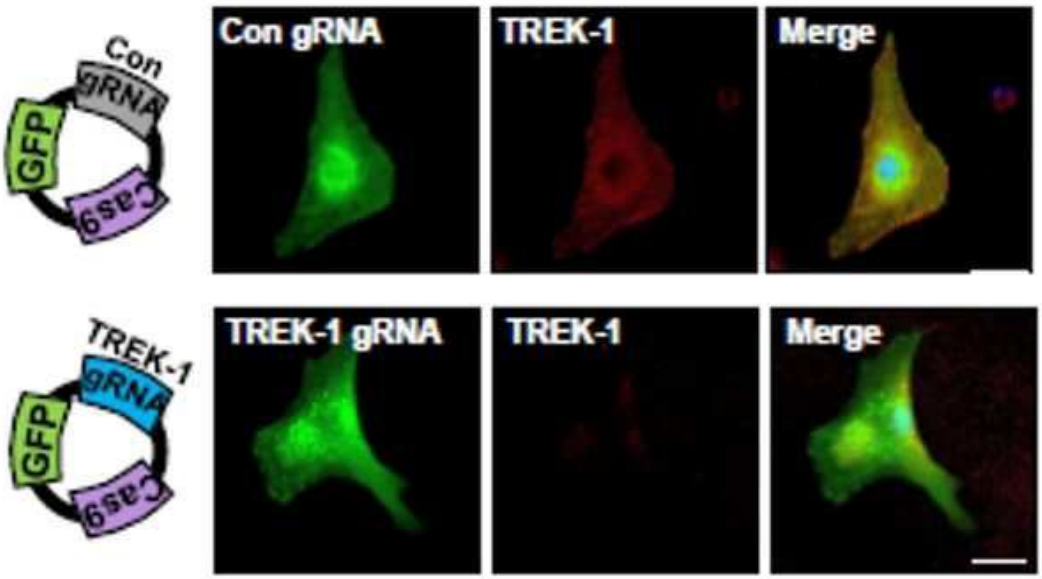
도면2c


pA/pF
Sc sh-SP sub
TR1 sh-SP sub
60
40
-150 mV
-100
-50
0
50
-20
-40

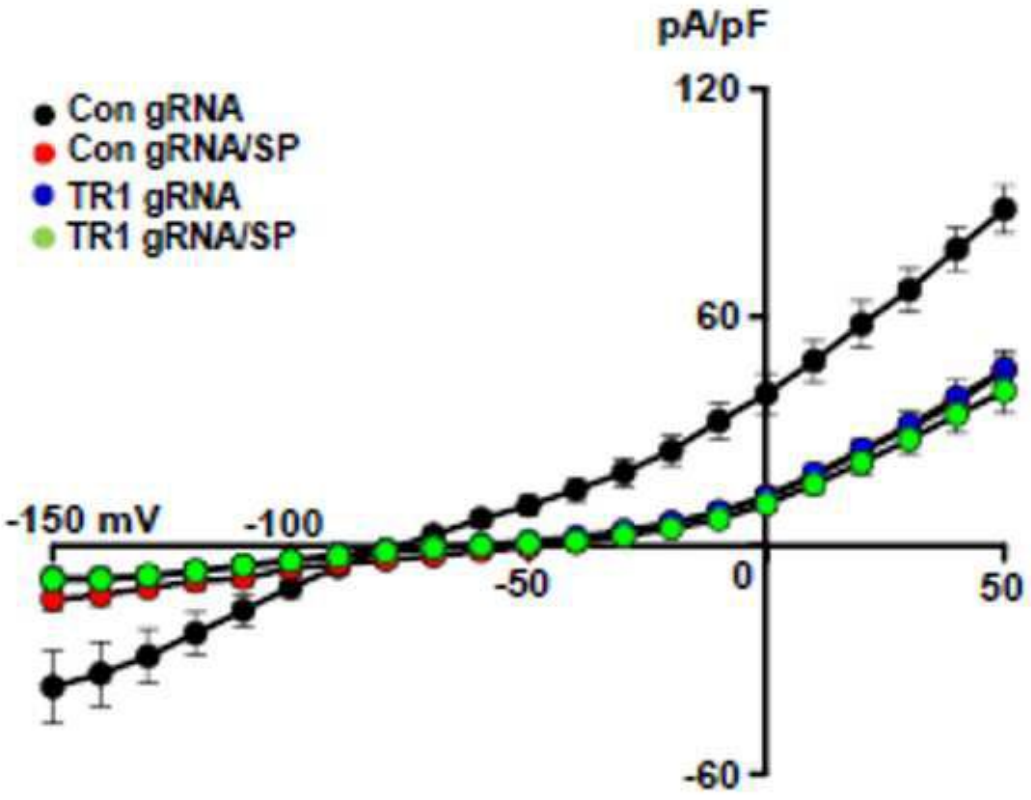
도면2d


***
60
40
20
0
-20
-40
Mean currents (pA/pF)
at -150 mV, 50 mV
Sc sh
SP sub
TR1 sh
SP sub

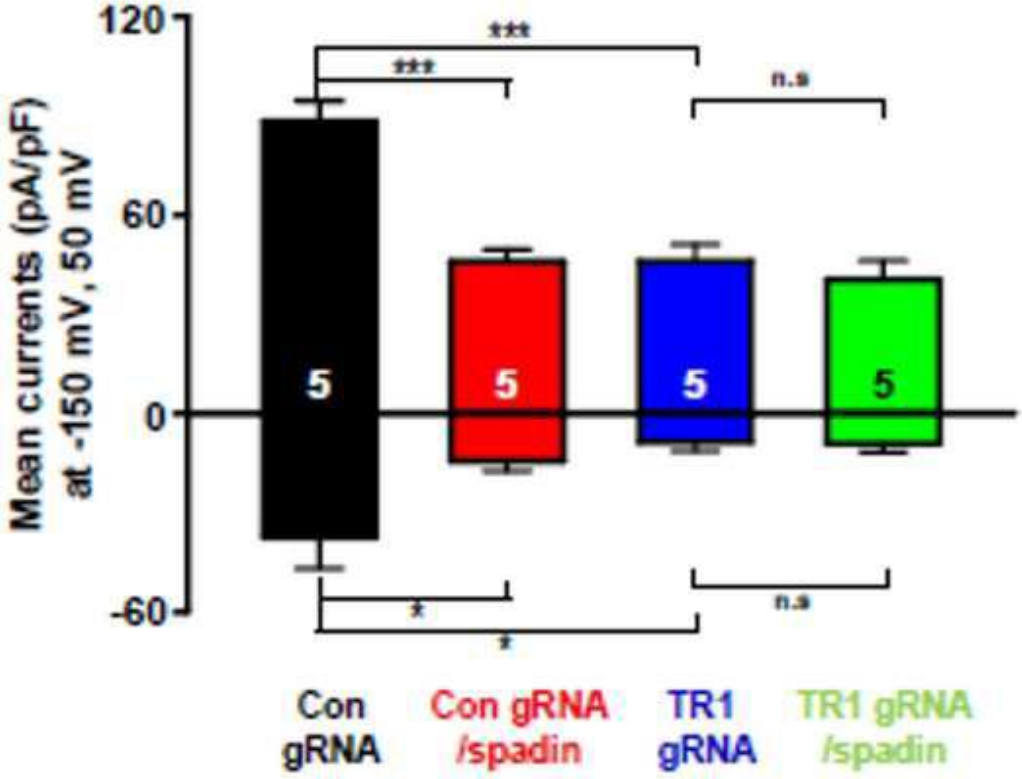
도면3a


Con
gRNA
GFP
Cas9
Con gRNA
TREK-1
Merge
TREK-1
gRNA
GFP
Cas9
TREK-1 gRNA
TREK-1
Merge

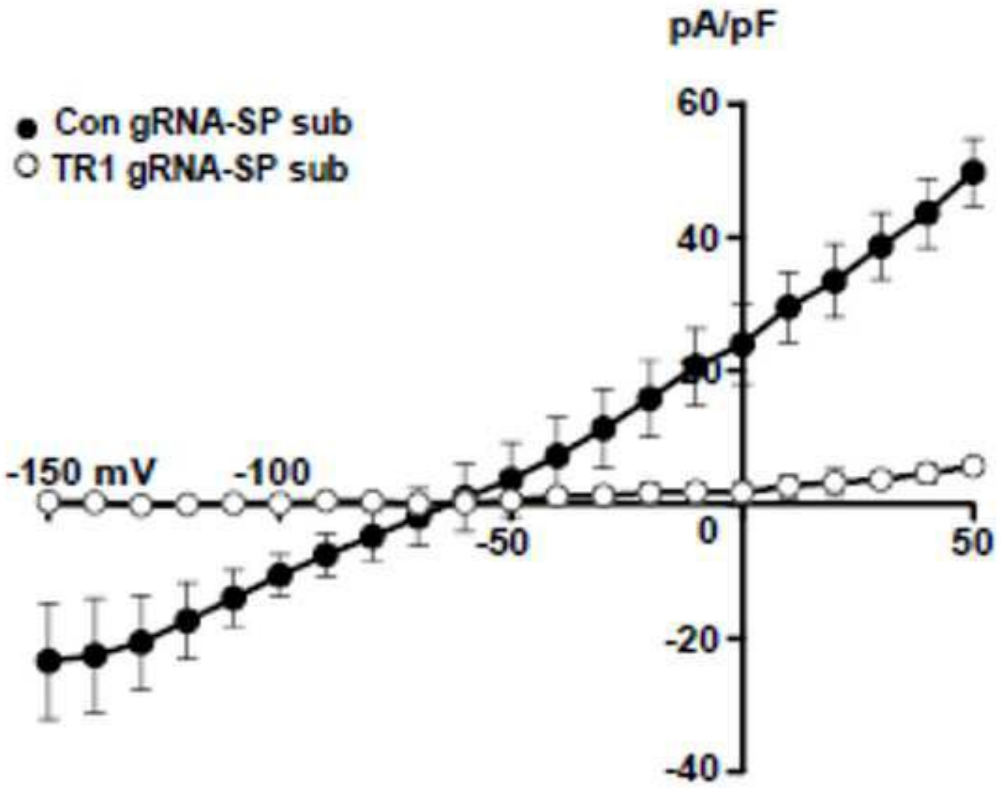
도면3b


pA/pF
120
60
-60
Con gRNA
Con gRNA/SP
TR1 gRNA
TR1 gRNA/SP
-150 mV
-100
-50
0
50

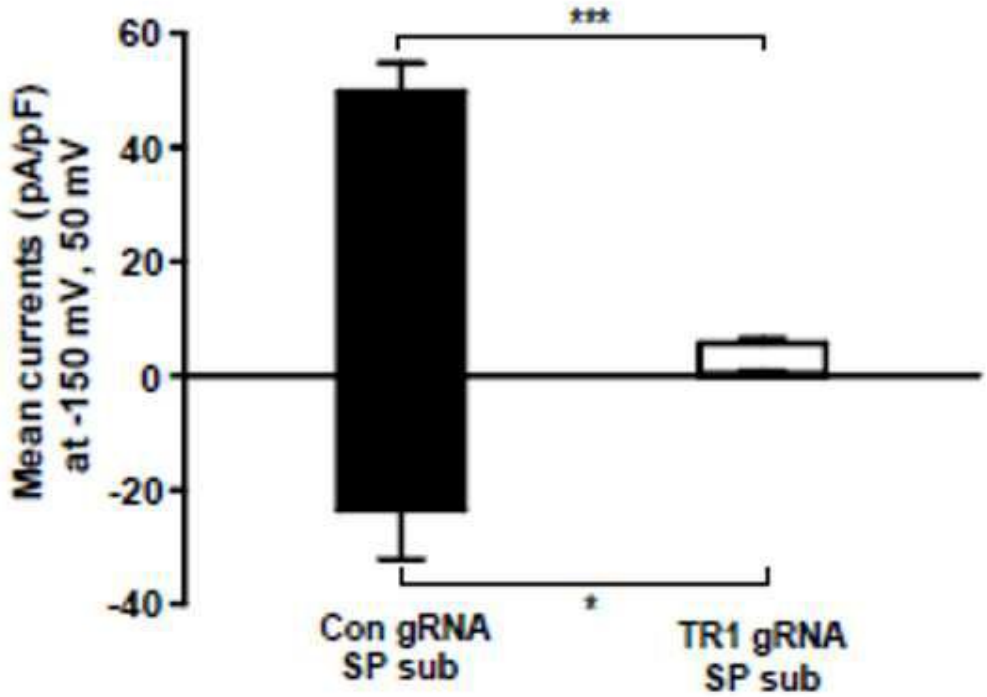
도면3c


Mean currents (pA/pF)
at -150 mV, 50 mV
120
60
0
-60
***
***
n.s
n.s
*
*
5
5
5
5
Con gRNA
Con gRNA /spadin
TR1 gRNA
TR1 gRNA /spadin

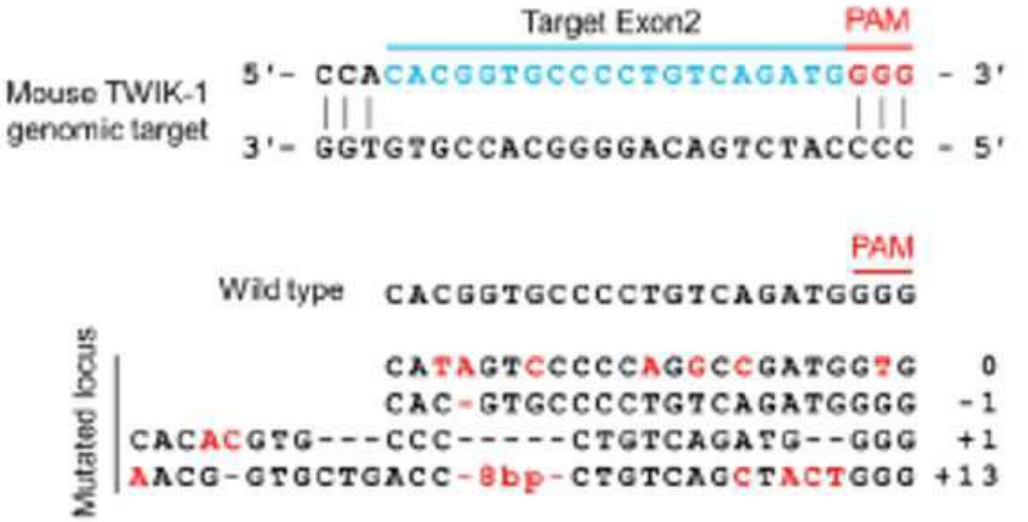
도면3d


pA/pF
Con gRNA-SP sub
TR1 gRNA-SP sub
60
40
-150 mV
-100
-50
0
50
-20
-40

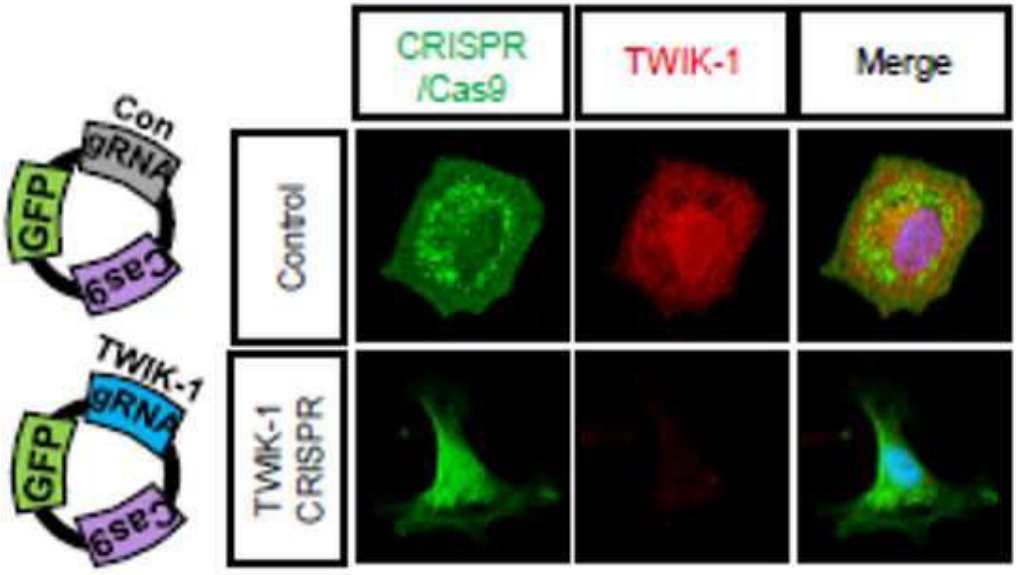
도면3e


***
60
40
20
0
-20
-40
Mean currents (pA/pF)
at -150 mV, 50 mV
*
Con gRNA
SP sub
TR1 gRNA
SP sub

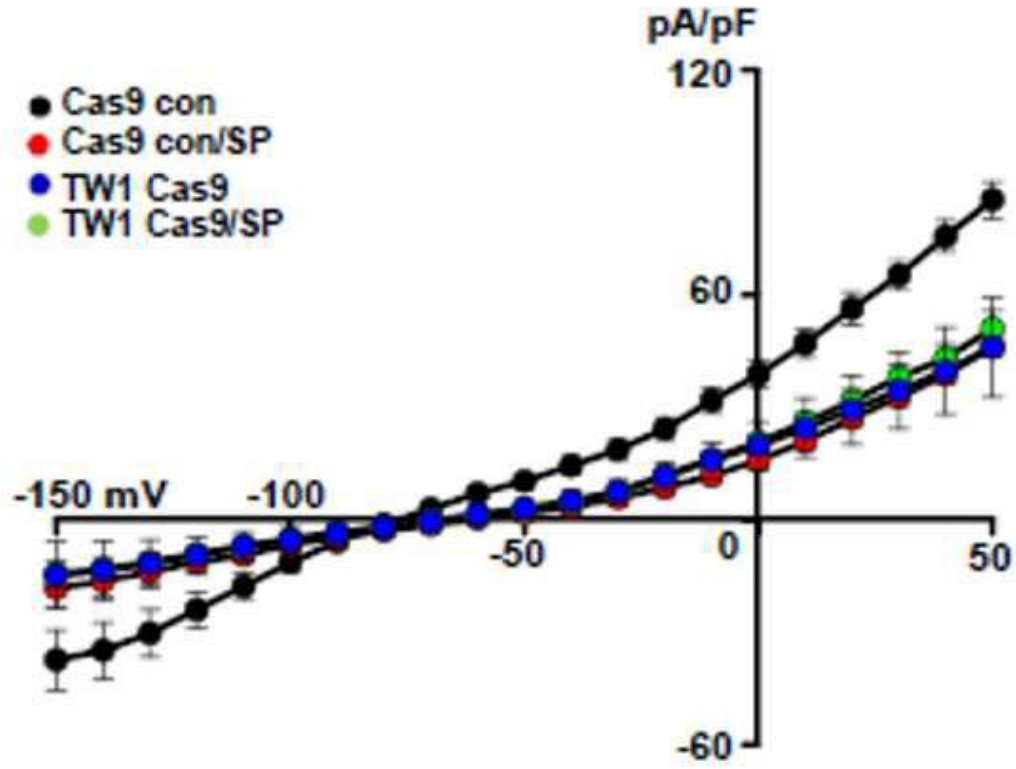
도면4a


Target Exon2
PAM
Mouse TWIK-1 genomic target
5'- CCACACGGTGCCCCTGTCAGATGGGG - 3'
3'- GGTGTGCCACGGGGACAGTCTACCCC - 5'
PAM
Wild type
CACGGTGCCCCTGTCAGATGGGG
Mutated locus
CATAGTCCCCCAGGCCGATGGTG 0
CAC-GTGCCCCTGTCAGATGGGG -1
CACACGTG---CCC-----CTGTCAGATG--GGG +1
AACG-GTGCTGACC-8bp-CTGTCAGCTACTGGG +13

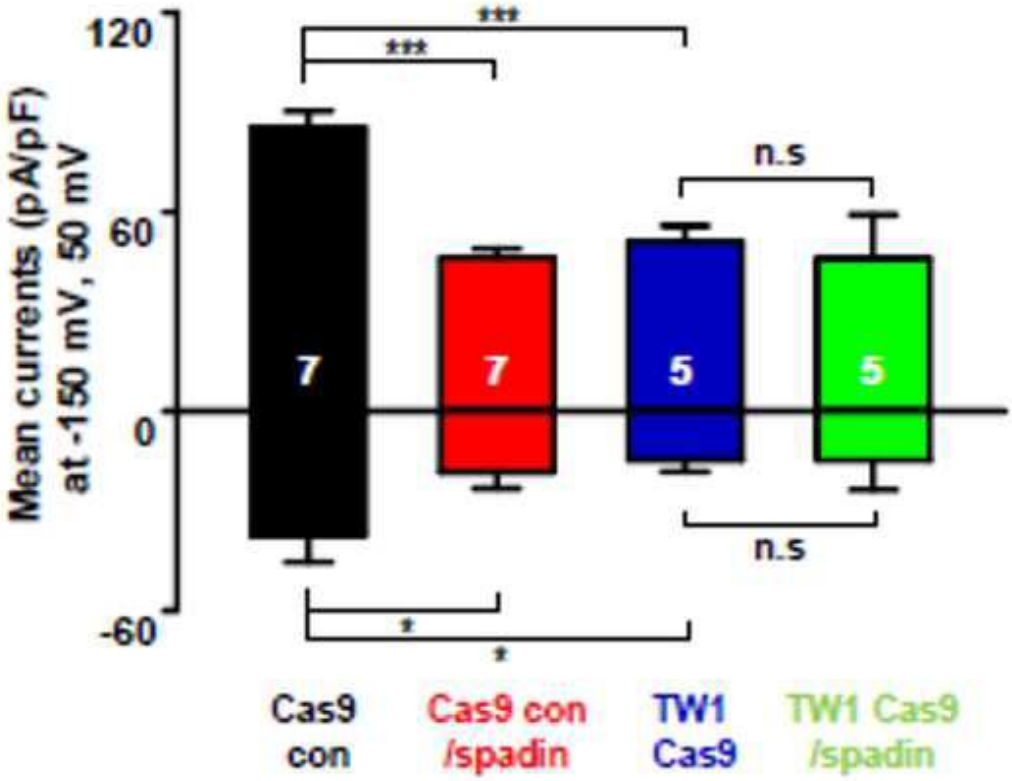
도면4b


CRISPR /Cas9
TWIK-1
Merge
Con
gRNA
GFP
Cas9
Control
TWIK-1
gRNA
GFP
Cas9
TWIK-1 CRISPR

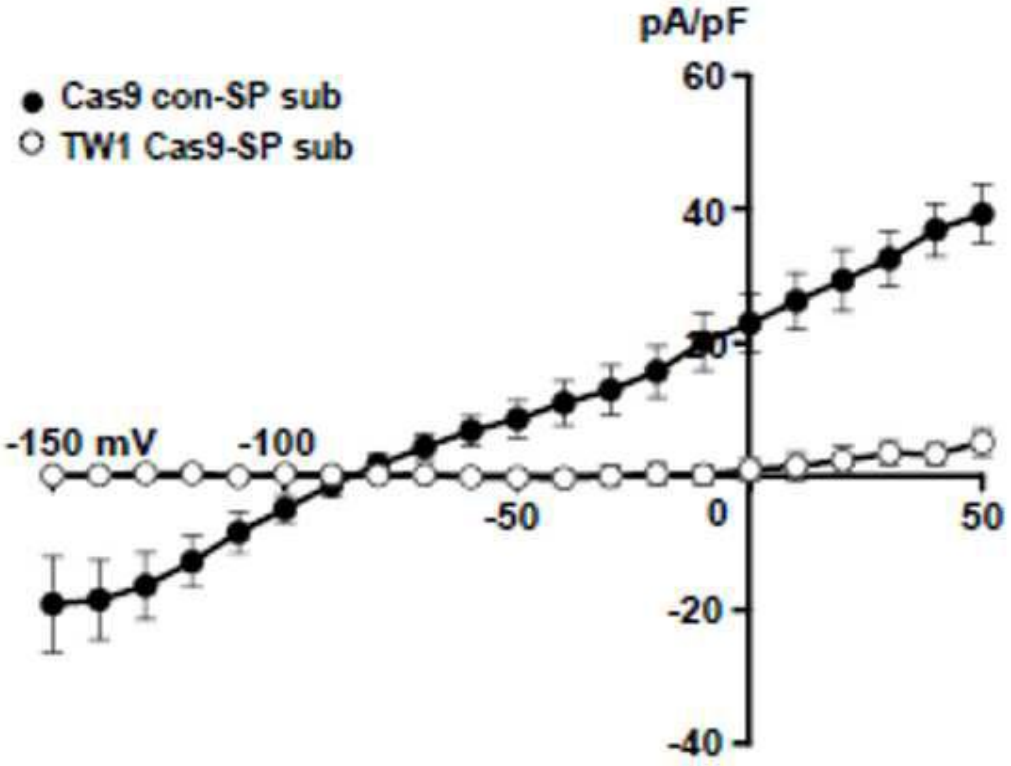
도면4c


pA/pF
120
60
-60
Cas9 con
Cas9 con/SP
TW1 Cas9
TW1 Cas9/SP
-150 mV
-100
-50
0
50

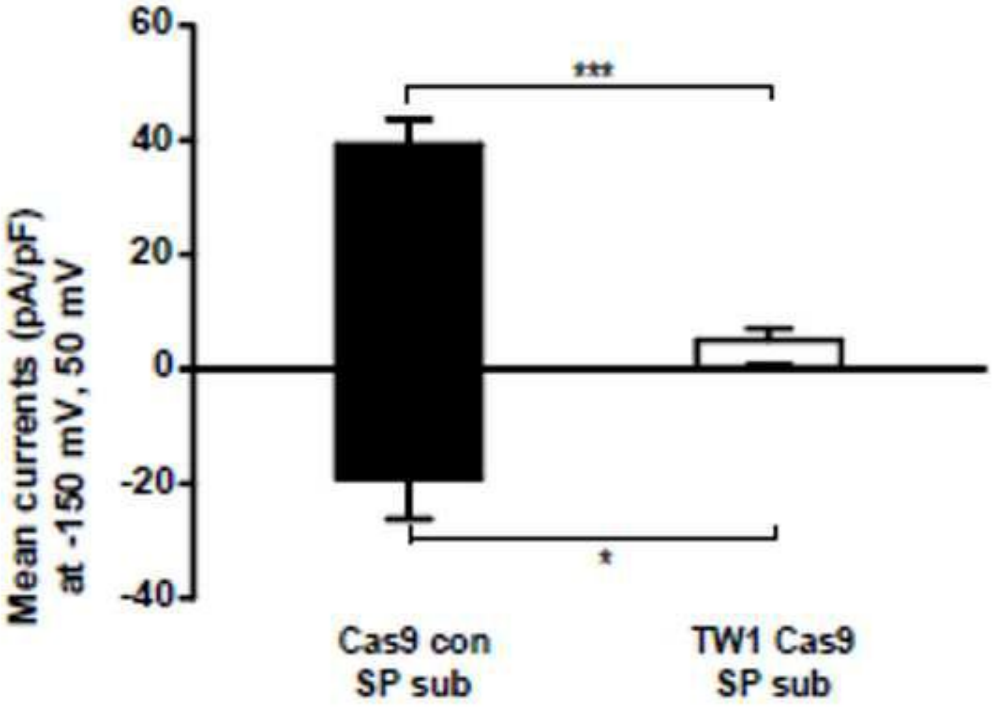
도면4d


Mean currents (pA/pF) at -150 mV, 50 mV
120
60
0
-60
***
***
n.s
n.s
*
*
7
7
5
5
Cas9 con
Cas9 con /spadin
TW1 Cas9
TW1 Cas9 /spadin

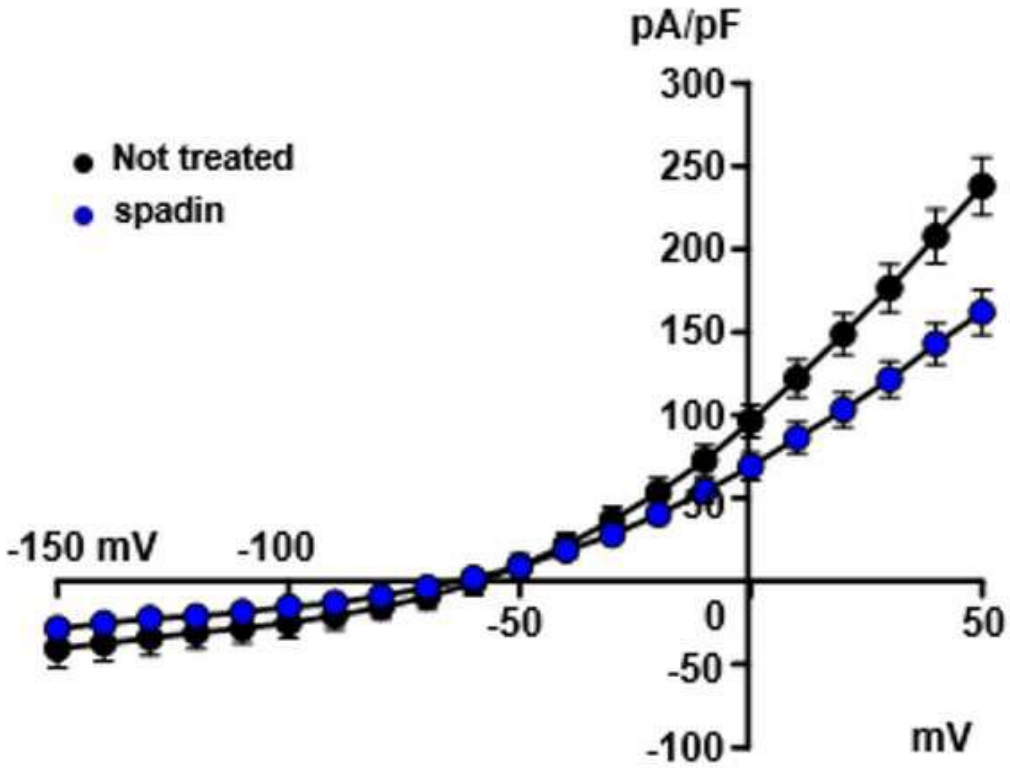
도면4e


pA/pF
Cas9 con-SP sub
TW1 Cas9-SP sub
60
40
-150 mV
-100
-50
0
50
-20
-40

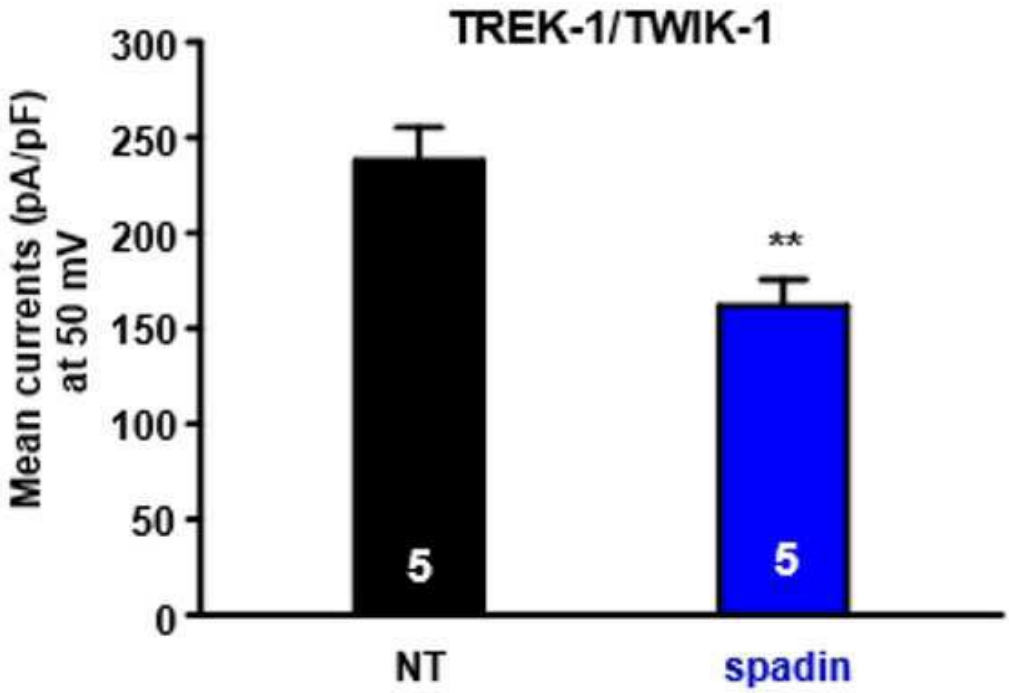
도면4f


60
40
20
0
-20
-40
***
*
Mean currents (pA/pF) at -150 mV, 50 mV
Cas9 con SP sub
TW1 Cas9 SP sub

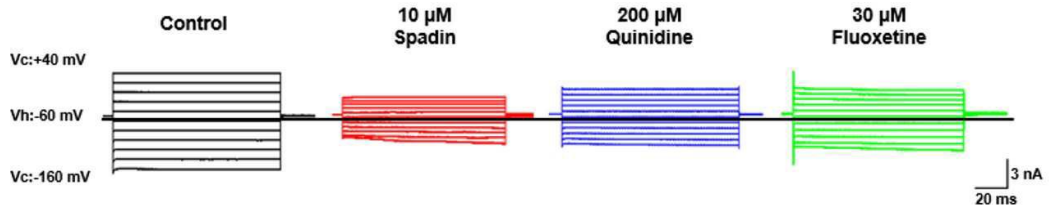
도면5a


pA/pF
300
250
200
150
100
50
-50
-100
Not treated
spadin
-150 mV
-100
-50
0
50
mV

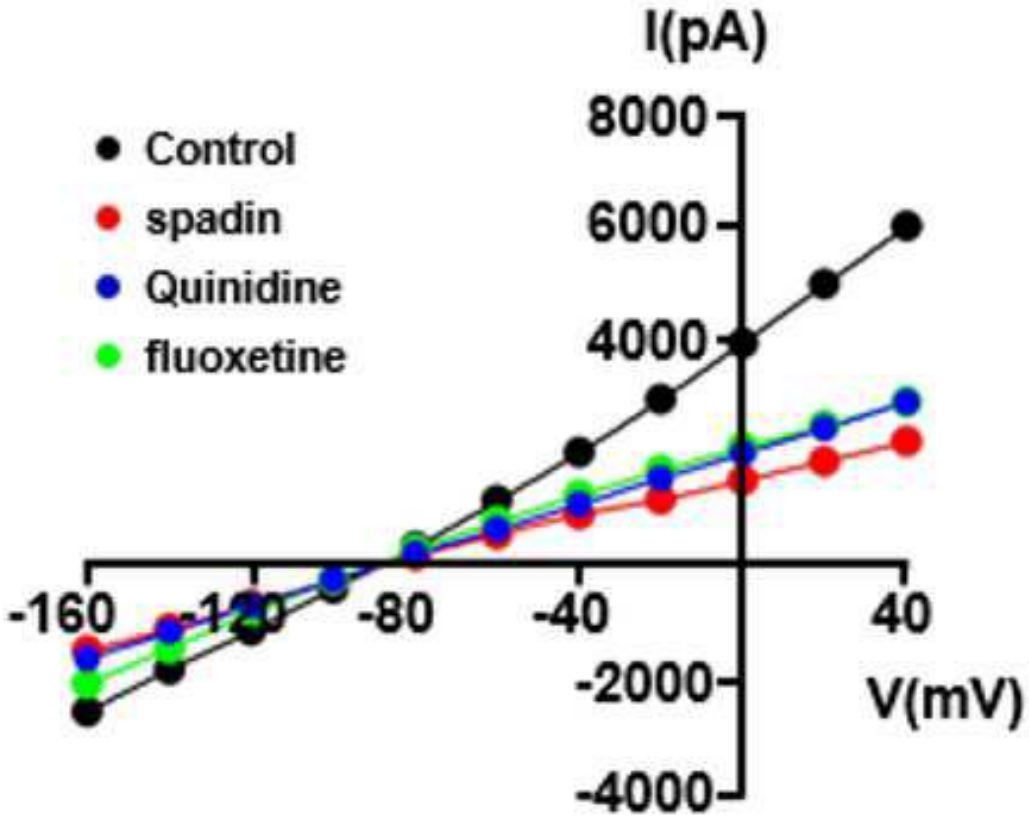
도면5b


TREK-1/TWIK-1
Mean currents (pA/pF) at 50 mV
300
250
200
150
100
50
0
**
5
5
NT
spadin

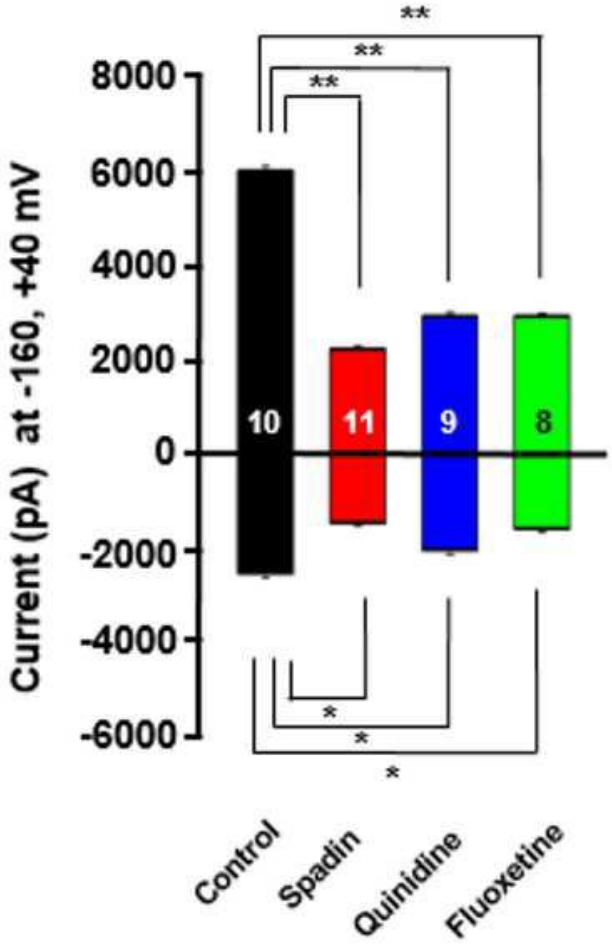
도면6a


Control
10 μM
Spadin
200 μM
Quinidine
30 μM
Fluoxetine
Vc:+40 mV
Vh:-60 mV
Vc:-160 mV
3 nA
20 ms

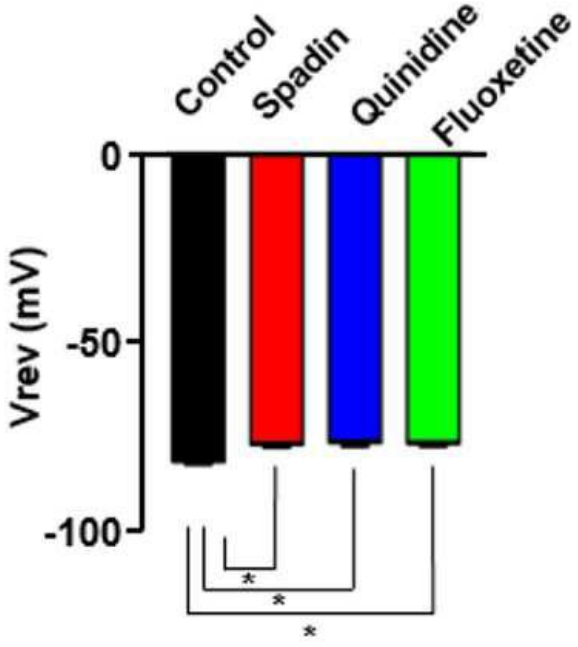
도면6b


I(pA)
8000
6000
4000
-2000
-4000
Control
spadin
Quinidine
fluoxetine
-160
-80
-40
40
V(mV)

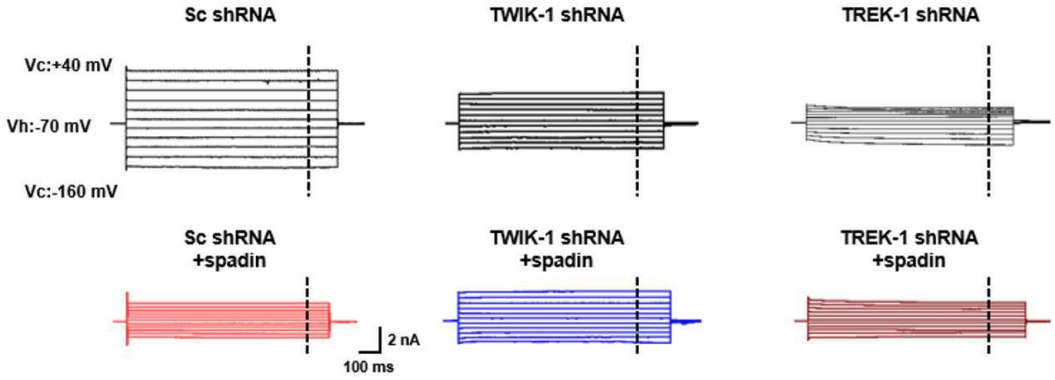
도면6c


**
**
**
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
-6000
Current (pA) at -160, +40 mV
10
11
9
8
*
*
*
Control
Spadin
Quinidine
Fluoxetine

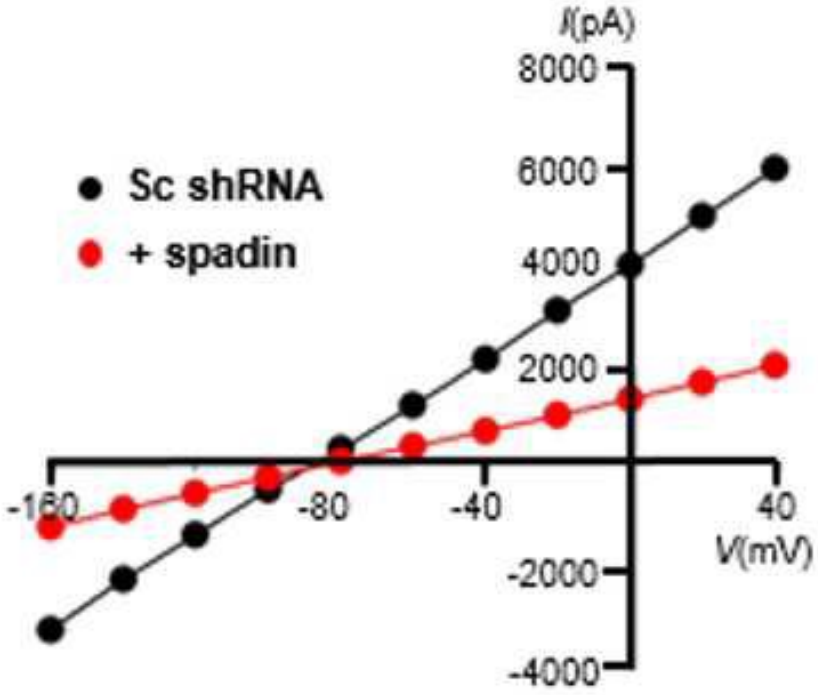
도면6d


Control
Spadin
Quinidine
Fluoxetine
0
-50
-100
Vrev (mV)
*
*
*

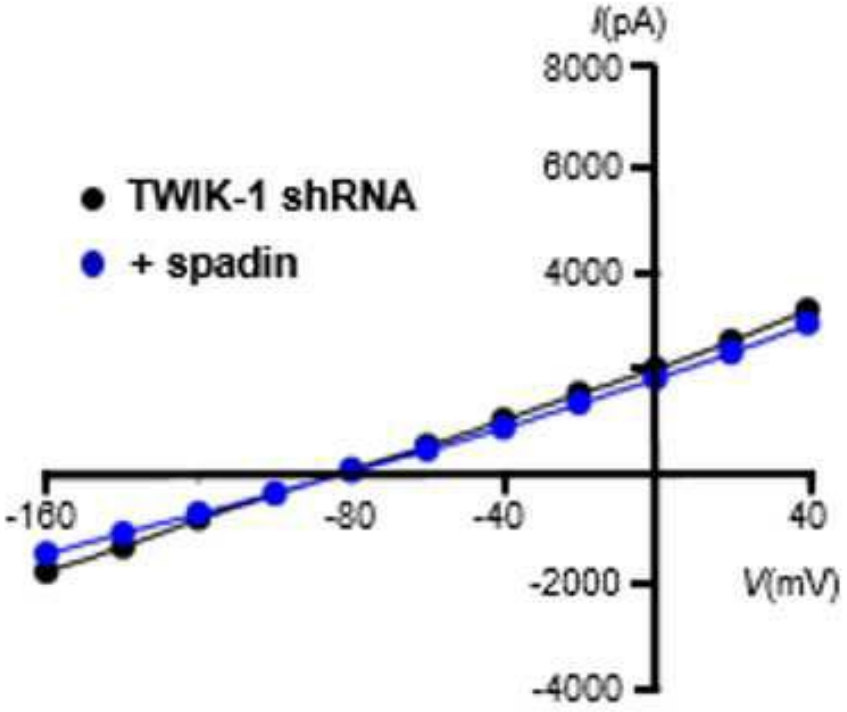
도면7a


Sc shRNA
TWIK-1 shRNA
TREK-1 shRNA
Vc:+40 mV
Vh:-70 mV
Vc:-160 mV
Sc shRNA
+spadin
TWIK-1 shRNA
+spadin
TREK-1 shRNA
+spadin
2 nA
100 ms

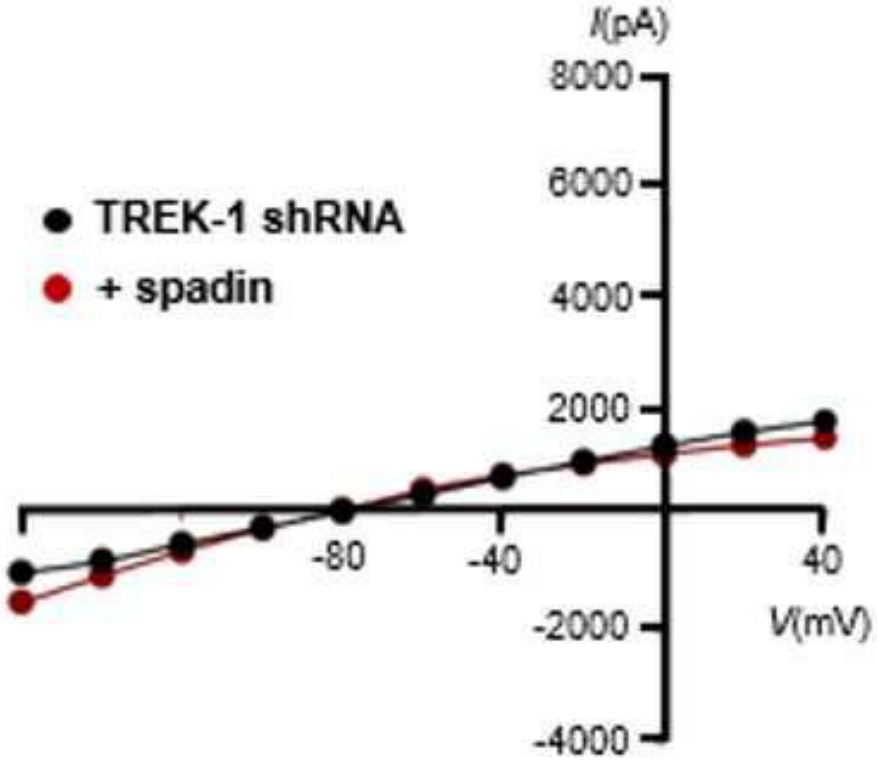
도면7b


I(pA)
8000
6000
4000
2000
-2000
-4000
Sc shRNA
+ spadin
-160
-80
-40
40
V(mV)

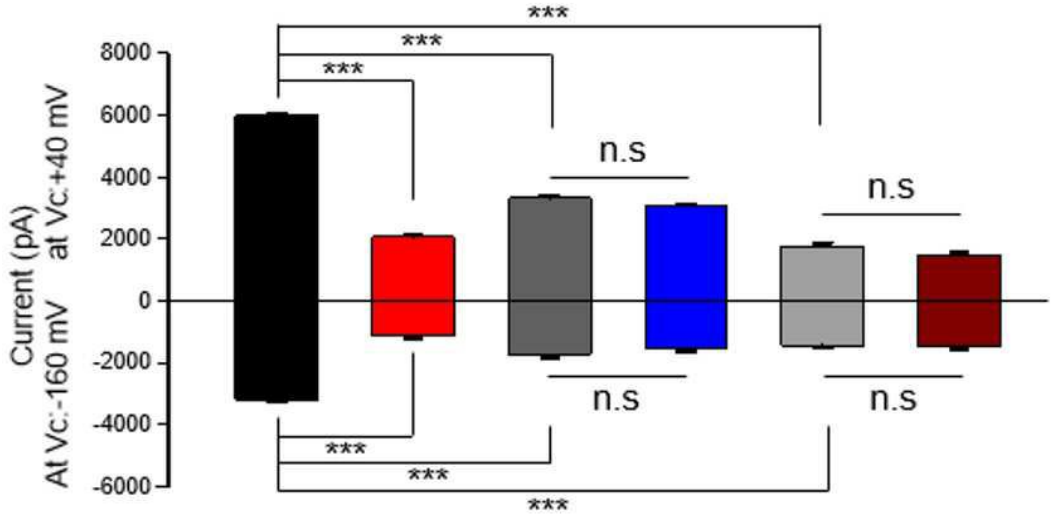
도면7c


I(pA)
8000
6000
4000
TWIK-1 shRNA
+ spadin
-160
-80
-40
40
-2000
V(mV)
-4000

도면7d


I(pA)
8000
6000
4000
2000
TREK-1 shRNA
+ spadin
-80
-40
40
-2000
V(mV)
-4000

도면7e



서 열 목 록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Screening system for inhibitors of astrocyte-specific passive conductance and its application

<130> MP19-089

<150> KR 10-2018-0054043

<151> 2018-05-11

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA(TREK-1)

<400> 1

gcgtggagat ctacgacaag t 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA(TREK-1)

<400> 2

atagtggcag caataaacgc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA(TWIK-1)

<400> 3

cacggtgccc ctgtcagatg 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> shRNA(TWIK-1)

<400> 4

gcatcatcta ctctgtcatc g 21