(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0096467
(43) 공개일자 2021년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/45 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/45 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0009965
(22) 출원일자 2020년01월28일
심사청구일자 2020년01월28일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
배규운
경기도 수원시 장안구 정자천로188번길 21, 101동 904호 (정자동, 정자 케이티 이-편한세상)
강종순
경기도 수원시 장안구 화산로187번길 19, 107동 1802호 (천천동, 천천 삼성래미안)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한) 다래

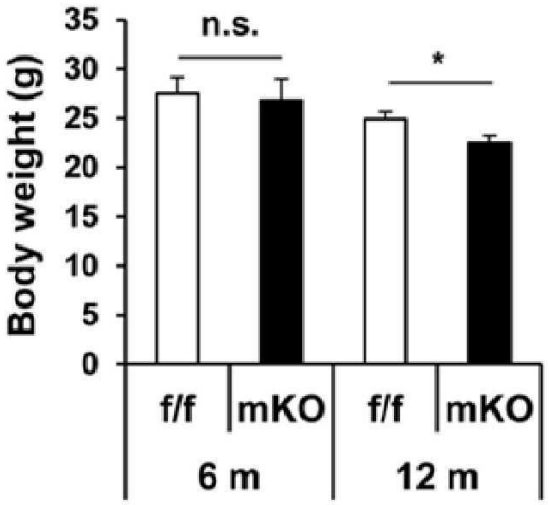
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 질환의 치료 또는 근육 재생용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 질환의 치료 또는 근육 재생용 조성물로서, PRMT1이 근육 세포의 분화를 촉진하고, 근섬유의 재생을 유도함을 확인한 바, 이와같은 효과를 이용하여, 근육 질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물 및 근육 세포 분화 촉진 및 근육 재생용 조성물로 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 5/0658 (2013.01)
G01N 33/5061 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)
C12N 2501/72 (2013.01)
G01N 2333/91017 (2013.01)
(72) 발명자
이상진
서울특별시 성동구 고산자로 160, 108동 1001호 (
응봉동, 대림강변아파트)
구승희
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 103동 502(대치
동, 대치삼성아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

PRMT1(Protein arginine methyltransferase 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

PRMT1(Protein arginine methyltransferase 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 근육 질환은 근육 소모성 질환 또는 근육 위축성 질환 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 근육 질환은 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질 (cachexia) 또는 노인성근육감소증(sarcopenia) 중 하나 이상인 근육 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

PRMT1(Protein arginine methyltransferase 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 세포의 분화 또는 근육 재생 촉진용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 의약품, 식품, 동물용 사료, 동물용 사료 첨가제 또는 세포 배양액 중 하나 이상을 선택하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

i) in vitro 상에서 근육 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;

ii) 상기 후보 물질을 처리한 근육 세포에서 PRMT1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

iii)미처리군과 비교하여 PRMT1의 발현 또는 활성을 증진시키는 후보 물질들을 선정하는 단계를 포함하는 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 근육 질환의 치료 및 개선과 근육 세포의 분화 및 근육 재생에 관여하는 PRMT1 단백질 및 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 조성물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골격근은 단밸질의 전환 또는 합성과 관련된 여러 경로를 통해 환경적 신호에 동적으로 반응한다. 근육 위축은 과도한 단백질의 분해로 인하여 발생되며, 대사를 감소시키고, 다른 만성 질환을 악화시켜, 이환율과 사망률을 증가시킨다.

[0003] 골격근의 형성과 분화에는 다양한 인자가 관여한다. 위축성 근육에서는 FOXO 전사 인자가 활성화되어 있으며, 이는 근육 특이적 유비퀴틴 리가아제인 TRIM63 / MURF-1 및 FBXO32 / ATROGIN1과 같은 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 여러 성분을 조절하여 단백질의 분해 및 위축을 가속화한다. 근육 위축 시, 단백질 분해 경로의 중요성은 금식 등으로 인한 근육 손실에 대한 내성을 나타내는 FOXO 또는 FBXO32 및 TRIM63을 코딩하는 유전자를 넉아웃한 모델을 이용한 연구에 의해 밝혀졌다. FOXO는 세포 스트레스, 영양소 결핍, 아미노산 결핍 및 사이토카인과 같은 자극인자에 대한 반응으로, 조직 항상성에 중추적인 역할을 하는 자가포식에 관여한다. 오토파지 프로테아좀(자가포식 단백 분해 효소) 시스템은, 근육 기능을 유지하기 위하여, 노화되거나 기능 이상을 일으킨 세포 소기관을 제거하는 역할을 수행한다. 손상된 자가 포식 플럭스는 손상 또는 과도한 자가 포식으로 인한 근 위축증과 관련되어 있다. 예를 들어, 뒤센 근위축증(Duchenne muscular dystrophy (DMD)) 환자는 자가 포식작용의 손상으로 인하여, 손상된 소기관이 축적되어 있다. 반대로, AKT-MTOR 경로는 자가 포식을 억제한다. 뚜렷한 영양장애가 있는 마우스 모델 또는 환자에 대한 선행 연구는, AKT 비활성화 또는 FOXO 활성화와 함께 자가포식의 중요성을 보여주었다. 이와 같이, 몇몇 주요 조절 인자가 연구되었음에도 불구하고, 근육 위축을 제어하는 메커니즘은 여전히 밝혀지지 않은 부분이 많다. 특히, 골격근에서 FOXO 전사 인자가 조절되는 기전은 근육 항상성 및 기능 장애를 잘 이해하기 위해 연구되어야 할 분야이다.

[0004] 근육 이상과 관련된 질환의 치료 등에 있어서, 상기와 같은 근육 위축 및 손상 경로에 관여하는 단백질과 이를 코딩하는 유전자의 발현 조절 및 이를 촉진할 수 있는 다양한 방법을 적용하는 새로운 치료 방법에 대한 연구가 다방면으로 이루어지고 있는 실정이다. 특히 노령 인구의 증가로, 노화에 의한 근육 감소는 노인 인구의 복지에 큰 영향을 미치는 요인 중 하나이며, 노화 이외에도 다양한 만성 질환, 예를 들어 고혈압, 내당능장애, 당뇨, 비만, 이상지질혈증 등의 심혈관 또는 대사성 질환과, 암, 자가면역 질환, 감염 질환, HIV 감염, AIDS, 만성 염증, 관절염, 영양실조, 신장 질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 폐기종, 구루병, 만성 하부 척추 통증, 말초신경 손상, 척수 손상, 화학적 손상, 중추신경계(CNS) 손상과 같은 다른 질환도 근육 손실과 연관되거나 근육 손실을 야기할 수 있다.

[0005] 만성 질환에 기인한 근육 손실은 운동성의 조기 손실을 유발하고 질환-관련 사망률의 위험성을 증가시킬 수 있다. 폐용으로 인한 근육 손실은 근육 기능 및 근육량에 있어 연령 관련 결함을 이미 가질 수 있는 노년층에서 특히 심각한 문제로, 영구적 무력함 및 조기 사망뿐 아니라 골절률의 증가를 야기한다. 이러한 임상적 중요성에도 불구하고, 상기 상태를 예방하거나 역전하기 위한 치료법이 거의 존재하지 않아 이에 대한 해결방안이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 근육 관련 질환과 연관성이 있는 다양한 단백질 및 유전자를 연구하던 중, 골격근 형성에 관여하는 PRMT1(Protein arginine methyltransferase 1) 유전자에 대한 연구를 진행하여, 상기 유전자의 조절을 통해 근육 소모성 질환과 같은 근육 질환에 대한 치료 효과를 달성할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 세포의 분화 또는 근육의 재생 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, PRMT1을 이용하여 근육 질환의 치료 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해서 본 발명은, PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하

는, 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 또는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명의 상기 근육 질환은 근육 소모성 질환 또는 근육 위축성 질환 등이 포함될 수 있으며, 보다 상세하게는 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질 (cachexia) 및 노인성근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 근육질환일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 세포의 분화 또는 근육의 재생 촉진용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명의 조성물은 근육 세포의 분화 또는 근육의 재생 촉진 효과를 가지므로, 의약품, 건강기능식품, 동물용 사료, 세포 배양액 조성물 등 다양한 용도로 활용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 i) in vitro 상에서 근육 세포에 후보 물질을 처리하는 단계; ii) 상기 후보 물질을 처리한 근육 세포에서 Prmt1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 iii)미처리군과 비교하여 Prmt1의 발현 또는 활성을 증진시키는 후보 물질들을 근육 질환 치료 물질로 선정하는 단계를 포함하는, 근육 질환의 치료 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 조성물은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하며, 상기 PRMT1 단백질은 근육 세포의 분화 과정에 중요한 역할을 담당하고 있는 인자로서, 근육 질환, 특히 근육 소모성 질환 또는 근육 위축성 질환의 예방 및 치료 효과를 가진다. 또한, 상기 조성물은 MyoD 전사 활성을 유의적으로 증가시키고 분화된 C2C12 세포에서의 MHC 발현유도를 통하여 근육세포로의 분화를 촉진함을 확인한 바, 근육 질환의 치료 이외에, 근육 세포의 분화 촉진 또는 근육의 재생용도로서, 다양한 분야에서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 6개월령 및 12개월령의 PRMT1 넉아웃 마우스(mKO)와 정상 대조군 마우스의 체중을 비교한 결과를 나타낸 것이다. (값은 평균±SD 이며, * P <0.05.)

도 2는 6개월령의 넉아웃 마우스(mKO)와 정상 대조군 마우스의 각각의 상대적 근육량(mass)을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 대조군 근육의 값을 1.0으로 설정 하였다 (n = 8-10).

도 3은 6개월령의 넉아웃 마우스(mKO)와 정상 대조군 마우스의 TA 및 EDL 근육에서 MYH4 (Myh type IIb) 및 LAMA1 (laminin)의 발현량을 비교하기 위한 면역 염색결과이다. (단위는 50 μm 이다.)

도 4는 6 개월령 마우스의 TA 및 EDL 근육에서 MYH4 양성 근섬유의 단면적의 정량 결과이다(n=4). (데이터는 평균±SEM을 나타냄. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001)

도 5는 6 개월령 대조군 및 PRMT1 넉아웃 마우스(mKO)로부터 TA 근육의 qRT-PCR 분석결과이다. (데이터는 평균±SD를 나타냄. *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001(n=4))

도 6은 6 개월령 마우스의 그립 강도를 측정한 결과(n=8, 데이터는 평균±SD를 나타냄. ** P <0.01) 및 6 개월령 대조군 및 PRMT1 넉아웃 마우스(mKO)의 EDL 근육을 isometric force 및 힘-주파수 분석으로 측정한 결과이다.(n=4, 값은 평균±SD. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

도 7은 다양한 조절제의 발현을 위한 급식, 단식(16 시간) 및 재 급식(6 시간)시, TA 근육의 면역 블롯 결과 및 p-AMPK, LC3-II 및 PRMT1의 상대 단백질 수준의 정량 결과로서, p-AMPK, LC3-II 및 PRMT1의 강도는 각각 총 AMPK, LC3-I 및 TUBB / β-튜불린으로 각각 정규화 되었다. 급식 상태의 값은 1.0(n=4)으로 설정되었다. 데이터는 평균±SD를 나타냄. *P<0.05, **P<0.01, ***P <0.001

도 8은 10분 동안 인슐린 투여군(0.1 U/개체) 및 미투여군에 대한 대조군 및 prmt1 mKO 근육의 면역 블롯 분석 결과(n=3) 및 인슐린 투여 없이 대조군 및 prmt1 mKO 근육으로부터 p-AMPK, LC3-II 및 SQSTM1의 상대 단백질 발현 수준의 정량 결과이다. p-AMPK, LC3-II 및 SQSTM1의 강도는 각각 총 AMPK, LC3-I 및 TUBB로 정규화 되었다. 대조군 근육의 값은 1.0(n = 3)으로 설정되었다. 데이터는 평균±SD를 나타냄. * P <0.05, *** P <0.001

도 9는 MHC, LC3 및 TRIM63의 발현을 위해 D3에서 대조군 RNAi (ad-control) 또는 Prmt1 RNAi(ad-Prmt1i)를 아데노바이러스로 감염시킨 후, 이를 도입한 C2C12 세포의 면역 블롯 분석 결과(LC3-II의 상대 단백질 수준의 정

량 결과, LC3-II의 강도는 LC3-I로 정규화 되었음. 데이터는 평균±SD를 나타냄. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001), D3에서, C2C12/ad-control 또는 C2C12/ad-Prmt1i 세포의 MHC의 면역 염색 결과(단위는 50 μm 이다.) 및 D2에서, C2C12/ad-control 또는 C2C12/ad-Prmt1i 세포에서 근관 직경의 정량 결과를 나타낸 것으로, 데이터는 평균±SD를 나타냄. *P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

도 10은 C2C12/pcDNA-HA 및 C2C12/PRMT1-HA 세포를 지시된 시간 동안 2% HS를 함유하는 DMEM에서 starving한 후, 지시된 마커에 대한 면역 블롯 분석을 수행한 결과, 및 10nM 바필로마이신 A1 처리 및 미처리 C2C12/pcDNA-HA 및 C2C12/PRMT1-HA 세포로부터 3 시간 동안 LC3-II 수준의 면역 블롯 분석 및 정량 결과를 나타낸 것이다(n = 3). 데이터는 평균±SD를 나타냄. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

도 11은 FOXO1 및 FOXO3에 대한 6 개월령 대조군 및 prmt1 mKO 에서의 TA 근육의 면역 블롯 분석 및 FOXO3 및 FOXO1의 상대 단백질 수준의 정량 결과(GAPDH로 정규화된 결과)를 나타낸 것이고, (데이터는 평균 ± SD를 나타냄(** P <0.01, n.s.=명확하지 않음.)) 우측 그래프는 6 개월령 대조군 및 prmt1 mKO 마우스의 TA 근육에서 Foxo1 및 Foxo3 수준의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸 것이다(n = 4).

도 12는 6 개월령 대조군 및 prmt1 mKO 마우스로부터 TA 섹션에 대한 FOXO3(녹색) 및 DES (적색)에 대한 면역 염색의 대표적인 이미지를 나타낸 것이다. (단위 : 20 μm)

도 13은 C2C12/ad-control 및 C2C12/ad-Prmt1i 세포 전체, 핵 및 세포질에서 각 인자의 발현을 확인한 결과와, 핵 내의 FOXO3 및 FOXO1 단백질 수준의 상대적인 양의 LMNB1로 정규화된 정량치 및 D2에서 C2C12/adcontrol 및 C2C12/ad-Prmt1i 세포에서 Prmt1, Foxo3 및 Trim63 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과이다(n = 4). 데이터는 평균±SD를 나타낸다. (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001)

도 14는 2 개월령 대조군 및 prmt1 넉아웃(mKO) 마우스의 TA 근육으로부터의 PRMT 수준의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸 것이다. (n=4)

도 4(b)는 대조군 및 prmt1 넉아웃 마우스(mKO)의 TA 근육에서 PRMT1 및 PRMT6 단백질 발현을 확인하기 위한 면역 블롯 분석 결과, 및 PRMT4 및 PRMT6의 상대 단백질 수준의 정량 결과로서, 강도는 GAPDH로 정규화 되었다(n=4). 데이터는 평균±SD를 나타냄. *P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

도 16은 6 개월령 마우스의 TA 근육에서 PRMT6 (녹색) 및 DAPI (파란색)에 대한 면역 염색 결과를 나타낸 것이다. (스케일 바 : 20 μm)

도 17은 D3에서 대조군 및 prmt1 녹아웃 C2C12 세포에서의 PRMT1, PRMT6 및 TRIM63 발현의 면역 블롯 분석 결과, D3에서 C2C12/ad-control 또는 C2C12/ad-Prmt1i 세포에서 Prmt6 수준의 qRTPCR 분석 결과 및 D3에서 C2C12/pcDNA-HA 또는 C2C12/PRMT1-HA 세포에서 Prmt6 수준의 qRT-PCR 분석 결과이다. 데이터는 평균±SD를 나타냄. (*P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001)

도 18은 D2에서 C2C12/ad-control 및 C2C12/ad-Prmt1i 세포에서 +752 내지 -82의 Prmt6 프로모터 영역의 크로마틴-면역 침전 (ChIP) 검정 결과를 나타낸 것이다. 값은 세 가지 측정값±SD 이다. *P<0.05, **<0.01, ***<0.001.

도 19는 D2에서 C2C12/ad-control 및 C2C12/ad-Prmt1i 세포에서 지시된 마커에 대한 면역 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 대조군 또는 prmt1-넉아웃 C2C12 세포의 세포 분획 후 지시된 마커를 이용한 면역 블롯 분석 결과로, 넉아웃 세포에서 특히 핵 내 Prmt1의 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있으며, 우측 그래프는 FOXO3-리포터, 대조군 또는 FOXO3 및 대조군, PRMT1 또는 PRMT6 발현 벡터와 공동 형질 감염된 C2C12 세포의 루시퍼라제 분석 결과이다. 데이터는 평균±SD를 나타낸다. 문자는 통계적으로 구별되는 그룹을 나타낸다(일원 분산 분석 <0.01).

도 21은 pcDNAHA 또는 PRMT6-HA를 코딩하는 플라스미드로 형질 감염된 D1에서 C2C12 세포의 세포 분획화 후 지시된 마커에 의한 면역 블롯 분석한 결과이다.

도 22는 C2C12/pcDNA-HA 및 C2C12/PRMT6-HA 세포를 지시된 시간 동안 2% HS를 함유하는 DMEM에서 인큐베이션한 다음 지시된 마커에 대한 면역 블롯 분석을 수행한 결과이다.

도 23은 C2C12/ad-control 및 10nM Baf A1로 처리하거나 처리하지 않은 C2C12/ad-Prmt6i 세포에서 3 시간 동안 LC3-11 수준의 면역 블롯분석 및 정량 결과를 나타낸 것이다(n = 3). 데이터는 평균 ± SD를 나타냅니다. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

도 24는 지시된 시간 동안 0.1% FBS를 함유하는 DMEM과 함께 배양된 10 T1/2 마우스의 배아 섬유 아세포의 용해물에 FOXO3 항체를 사용하여 면역 침전 및 지시된 항체를 사용한 면역 블롯 분석 결과(Left) 및, 대조군, PRMT1-HA 또는 PRMT6-HA 및 대조군 또는 FOXO3- 플래그 형질 감염된 293T 세포의 공동-면역 침전 결과 및 플래그 항체 및 지시 된 항체에 의한 면역 블롯 분석 결과를 나타낸 것(Right)이다.

도 25는 일시적으로 대조군, PRMT6 WT 또는 PRMT6 V86K, D88A 돌연변이체 및 대조군 또는 FOXO3-HA 단백질을 발현하는 293T 세포로부터의 공동 면역 침전을 수행한 것으로, 지시된 항체를 통한 면역 블롯팅 분석에 의해 항-HA 면역 침전물을 분석한 결과(Left) 및 FOXO3-리포터, FOXO3 및 PRMT6 WT 또는 PRMT6V86K/D88A 돌연변이체와 공동 형질 감염된 C2C12 세포의 루시퍼라제 분석 결과(Right)이다. 데이터는 평균 ± SD를 나타낸다. 문자는 통계적으로 다른 그룹을 나타낸다 (One way ANOVA, P <0.01).

도 26은 FOXO3 및 PRMT6 WT 또는 PRMT6V86K, D88A에서 Db에 형질 감염된 C2C12 세포에서 Fbxo32 및 Trim63의 발현량을 확인하기 위한 qRT-PCR 분석 결과이다. 데이터는 평균±SD를 나타낸다. 문자는 통계적으로 구별되는 그룹을 나타낸다 (일원 분산 분석, P <0.01).

도 28은 PRMT6-HA 및 플래그-태그된 FOXO3 WT, R188K, R218K 또는 R249K의 공동 면역 침전 결과로서, 상기 결과는 플래그 항체를 사용하여 일시적으로 형질 감염된 293T 세포 및 지시된 항체를 사용한 면역 블롯 분석으로 수행하였다.

도 29는 DOX에서 FOXO3 WT 또는 R188K, R218K 또는 R249K 형질 감염된 C2C12 세포에서 Fbxo32 및 Trim63의 발현에 대한 qRT-PCR 분석 결과이다. 데이터는 평균±SD를 나타낸다. 문자는 통계적으로 다른 그룹을 나타낸다 (One way ANOVA, P <0.01).

도 30은 플래그-태그된 pcDNA, FOXO3 WT, R188K, R218K 또는 R249K로 형질 감염된 D3에서의 C2C12 세포의 세포 분별 후, 지시된 마커에 의한 면역 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 31은 FOXO3-리포터, 대조군 또는 FOXO3와 공동 형질 감염되고 비히클 또는 10 μM EPZ020411로 24 시간 동안 처리된 C2C12 / ad-control 또는 C2C12 / ad-Prmt1i 세포에 의한 루시퍼라제 분석 결과이다. 데이터는 평균 ± SD를 나타낸다. 문자는 통계적으로 다른 그룹을 나타낸다 (One way ANOVA, P <0.01).

도 32는 대조군 또는 prmt1- 넉아웃 C2C12 세포를 ad-control 또는 ad-Prmt6i에 의해 형질 도입하고 3 일 동안 배양 한 후, 세포 분별 및 면역 블롯팅을 수행한 결과이다.

도 33은 D3에서 C2C12 세포에서 Foxo3, Trim63 및 Fbxo32의 발현에 대한 qRT-PCR 분석 결과이다. 데이터는 평균 ± SD를 나타낸다. 문자는 통계적으로 다른 그룹을 나타낸다 (One way ANOVA, P <0.01).

도 34는 근육 특이적으로 PRMT1이 넉아웃된 마우스의 근육 크기를 관찰한 결과이다.

도 35는 넉아웃된 마우스에서 크기가 작은 근섬유의 빈도 및 수를 대조군과 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 36은 PRMT1 이 넉아웃된 마우스에서의 미오게닌 및 IL6의 발현량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 37은 PRMT1이 넉아웃된 세포에서의 glycolytic enzyme의 활성도를 관찰한 결과이다.

도 38은 PRMT1이 넉아웃된 세포에서 글리코겐의 축적량을 PAS 염색을 통하여 관찰한 결과이다.

도 39는 PRMT1이 넉아웃된 세포에서 글리코겐 및 glycolytic enzyme의 상대적 발현량을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 40 및 41은 PRMT1 넉아웃 세포에서 포도당 공급 제한 시 글리코겐의 축적량 변화를 PAS 염색, ELISA를 통해 관찰한 결과(도 40) 및 상대적 발현량을 측정(도 41)한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 PRMT1(Protein arginine methyltransferase 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효 성분으로 포함하는, 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명에서, PRMT1은 히스톤과 비 히스톤의 아르기닌 잔기에 메틸화를 매개하는 효소이며, 인간 세포에서 모든

아르기닌 메틸화의 85% 이상을 차지한다. PRMT1이 결실될 경우, 초기 배아에서 치사를 일으키는 것으로 알려져 있으며, 유전자의 전사, 세포증식, 세포사, DNA 손상, 간 포도당 대사 등 다양한 생물학적 과정과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. PRMT1이 골격근 및 근육 전구체에서 발현될 경우, 이는 근육세포의 전구체 분화 및 근육 재생에 관여하는 것으로 본 발명자들에 의해 확인되었으며, 이러한 기능을 이용하여, PRMT1을 근육 질환에 대한 예방, 개선 및 치료 용도로 활용하기 위한 본 발명을 완성하게 되었다.

[0023] 본 발명의 상기 “근육 질환”은 근육이 노화 혹은 질병에 의해 손상되거나 손실되는 상태에 있는 것을 의미하며, 이는 유전적 소인, 고혈압, 내당능장애, 당뇨, 비만, 이상지질혈증, 아테롬성경화증 또는 심혈관질환 등의 연령과 관련된 질환; 암, 자가면역질환, 감염성 질환, AIDS, 만성 염증성 질환, 관절염, 영양 실조, 신장 질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐기종, 구루병, 만성 하부 척추통증, 말초 신경 손상, 중추 신경 손상 및 화학적 손상과 같은 질환 등의 만성 질환; 골절, 외상 등과 같은 원인 혹은 장기간의 침상 요양에 의한 운동 손실; 노화 등 다양한 원인에 의해 기인할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질 (cachexia) 및 노인성근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 근육질환, 구체적으로, 노인성근위축 또는 암으로 인한 근육관련 질환, 보다 구체적으로는, 노인성근위축 또는 암으로 인한 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질 (cachexia), 노인성근육감소증(sarcopenia) 및 근육소실증을 포함할 수 있고, 보다 바람직하게는 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질 (cachexia) 및 노인성근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 근육 질환일 수 있다.

[0024] 본 명세서에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 근육 질환을 억제 시키거나 발병을 지연시킬 수 있는 모든 행위를 의미한다.

[0025] 본 명세서에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0026] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 제형화에 필요한 담체 혹은 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 유효 성분에 추가로 포함될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 포함된다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0027] 예를 들어, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물 또는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0028] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 또는 비경구 투여(정맥주사, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도 및 약물 형태, 투여 경로 및 시간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절한 형태로 선택될 수 있다.

[0030] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 “약학적으로 유효한 양“이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 양으로, 질병을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 그 기준은 환자의 질환, 중증도, 약물 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 병용되는 성분

및 기타 사항에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 개별 치료제 혹은 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용을 최소화할 수 있는 수준으로 투여량을 결정할 수 있고, 이는 당업자에 의해 용이한 수준으로 결정될 수 있다. 구체적으로 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중, 중증도, 성별 등에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 체중 1kg 당 0.001 내지 150 mg, 보다 바람직하게는 0.01 내지 100mg 의 양을 매일 또는 격일, 1일 1 내지 3회 투여할 수 있다. 다만, 이는 예시적인 것으로, 상기 투여량은 필요에 달리 설정할 수 있다.

[0031] 또한 본 발명은 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품, 특히 건강기능식품 조성물에 대한 것이다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명의 상기 식품 또는 건강기능식품은, 근육 질환의 예방 및 개선을 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등 약학적 투여 형태 또는 티백, 침출자, 음료, 캔디, 젤리, 껌 등의 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[0034] 본 발명의 상기 식품 또는 건강기능식품 조성물은, 식품 첨가물로 사용될 수 있으며, 단독으로 혹은 다른 성분과 조합하여 제품화될 수 있다. 또한, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 이의 염, 알긴산 및 이의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함될 수 있다. 상기 성분은 단독 혹은 조합하여 사용될 수 있으며, 적절한 함량으로 조합되어 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명은 또한, PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 근육 세포의 분화 또는 근육의 재생 촉진용 조성물에 대한 것이다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는 PRMT1이 근원세포로부터 근섬유로 분화하는 것을 촉진하며, PRMT1을 결핍시킨 PRMT1 넉아웃 마우스 모델에서, 근섬유량과 근육 무게가 모두 감소한 것을 확인하였다. 또한, PRMT1 결핍 시, 근 위축을 유발하는 자가포식 유도 인자인 FBXO32 및 TRIM63의 발현량이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 본 발명의 다른 실시예는 FOXO3의 발현이 PRMT1 결핍된 모델에서 증가되는 것을 확인하였다. 상기의 실험결과는 모두 PRMT1이 결핍된(넉아웃된) 모델에서, 근육세포의 분화를 억제하고, 근위축을 유발하는 인자의 발현이 상승된다는 사실을 확인한 것이며, 이로부터, PRMT1이 근육 세포의 분화 또는 근육, 특히 근섬유의 재생을 촉진하는 효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

[0037] 즉, 본 발명의 PRMT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는, 근육 세포의 분화 또는 근육 재생용도로 활용될 수 있으며, 따라서, 이러한 용도로서, 앞서 검토한 약학적 조성물 및 건강기능식품의 용도 이외에도, 세포 배양액, 동물용 사료 조성물, 사료 첨가제 등으로 활용될 수 있다.

[0039] 또한 본 발명은, i) in vitro 상에서 근육 세포에 후보 물질을 처리하는 단계; ii) 상기 후보 물질을 처리한 근육 세포에서 PRMT1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 iii)미처리군과 비교하여 PRMT1의 발현 또는 활성을 증진시키는 후보 물질들을 근육 질환 치료 물질로 선정하는 단계를 포함하는, 근육 질환의 치료 물질을 스크리닝 하는 방법에 대한 것이다.

[0040] 본 발명에서 상기 PRMT1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계는 PRMT1 유전자의 발현에 의해 생성된 RNA 또는 단백질의 양을 측정할 수 있는 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 바람직하게, RNA의 발현량은 RT-PCR(실시간 PCR), 마이크로어레이, 노던 블롯팅 등을 이용하여 확인할 수 있으며, 단백질의 활성 및 발현은 면역침강, 면역염색, 크로마틴면역염색, 효소면역분석(ELISA), 웨스턴블롯팅 등의 방법으로 확인할 수 있으며, 그 방법에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다

완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0043] **실험재료 및 방법**

[0044] **1. 동물 실험 방법**

[0045] 고려 대학교 동물 관리 위원회의 승인된 프로토콜에 따라 모든 절차를 수행 하였다. Prmt1-플록스 대립 유전자(EUCOMM에서 얻은 Prmt1 f/f)를 갖는 마우스를 Myl1 프로모터(KRIBB의 이철호 박사 제공, Myl1/MLC1f-Cre)의 제어 하에 Cre를 발현하는 형질 전환 마우스와 교배시켜, PRMT1의 골격근 특이적 넉아웃 마우스(이하, mKO라 함)를 제작하였다. 유전자형 분석에 사용되는 프라이머는 다음과 같다 :

[0046] Prmt1 프라이머 : 정방향 5-GTGCTTGCCATACAAGAGATCC-3 '; 역방향 5-ACAGCCGAGTAGCAAGGAGG-3,

[0047] Cre 프라이머 : 정방향 5-GCGGTCTGGCAGTAA AAACTATC-3; 역방향 5 -GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3.

[0048] 근육 운동 능력의 평가를 위해, 6개월령 대조군 및 mKO 마우스로부터의 그립 강도 측정기 (Bioseb, Bio-GS3)를 사용하여 앞다리의 그립 강도를 측정 하였다. 모든 그립 강도 측정 값(그램으로 측정)을 체중으로 정규화 하였다. 지방 및 희박 질량은 서울대학교 한국 마우스 표현형 센터 (KMPC)에서 NMR 분석기 Bruker Minispec LF50 (Bruker Optics Inc.)을 사용하여 분석 하였다.

[0050] **2. 근육의 생리학적 측정**

[0051] 6 개월령 대조군 및 mKO 마우스로부터 단리된 신근 손가락 연골 (EDL) 근육의 수축 특성을 조사 하였다. 분리된 근육을 Krebs-Ringer 완충액(118mM NaCl, 4.75mM KCl, 24.8mM $NaHCO_3$, 1.18mM KH_2PO_4, 2.5mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.18mM $MgSO_4$, 10mM 글루코스, pH 7.4)이 포함된 챔버로 옮겨 95% O_2 및 5% CO_2로 산소화하고, 25℃에서 유지시켰다. 근위 힘줄은 클램프를 사용하여 고정되었고, 원위 힘줄은 힘 변환기(Grass Instruments, FT03D)에 고정되었다. 최적의 근육 길이는 0.2ms 동안 지속되는 최대 맥박으로 가장 높은 트위치 힘(mN)을 생성하는 길이로 결정되었다. EDL 근육에 대하여, 전기 자극기 (Grass Instruments, S48)를 사용하여 100Hz의 자극 주파수, 100V의 자극 전류 및 200ms의 지속 시간으로 아이소 메트릭 파상 수축력(mN)을 결정 하였다. 근육량은 EDL 근육 질량으로 정규화되었다.

[0053] **3. 근섬유 발현량 측정 : 크라이요섹션, 면역 염색 분석법**

[0054] 새로 단리된 TA 근육을 최적의 절단 온도 (Sakura finetek, 4583)에서 급속 냉동시키고, 극저온 마이크로톰(Leica, Wetzlar, Germany)에서 7㎛ 두께로 절단 하였다. 면역 염색을 위해, 근육 섹션을 고정시키고, 투과화시키고, MYH7/Myh type I(발달 연구 하이브리도마 뱅크, BA-D5), MYH4/Myh type IIb(DSHB, BFF3) 및 MYH2/Myh type IIa(DSHB, BF-32), MYH1/Myh type IIx(DSHB, 6H1), FOXO3(Cell Signaling Technology, 12829), PRMT6(Cell Signaling Technology, 14641), LAMA1/Laminin(abcam, 11575) 및 DES/desmin(Santa Cruz Biotechnology, sc23879)에 대한 1차 항체를 처리하여 인큐베이션 하고, 2차 항체 (Life Technologies, A-11001 및 A-11012)를 순차적으로 처리하였다. 이미지는 Nikon ECLIPS TE-2000U 및 NIS-Elements F 소프트웨어 (일본 도쿄, 니콘)를 이용하여 캡처하였다. 상기 이미지로부터 근섬유를 추적하여, 이들의 면적을 NISElements F 소프트웨어 (Nikon)를 사용하여 측정되었다.

[0056] **4. 근모세포 발현 측정 : 세포 배양, 루시퍼라아제 어세이**

[0057] 293T 세포와 C2C12 근육 모세포는 공지된 방법에 따라 배양되었다. 대조군의 RNAi(5-GGCATTACAGTATCGATCAG-3), Prmt1 RNAi (5-GCAACTCCATGTTTCACAATC-3 ') 및 Prmt6 RNAi(5-ACAAGATACGGACATTTCC-3)를 발현하는 재조합 아데노 바이러스는 AdEasy 시스템을 사용하여 생성되었다 . C2C12 세포로의 감염을 위해 세슘 클로라이드 밀도 구배 방법으로 아데노 바이러스를 정제하였다. C2C12 근아세포(myoblasts)의 분화를 유도하기 위해, 밀집된 세포를 15% 우태아 혈청을 함유하는 DMEM에서 2% 말혈청을 함유한 DMEM(Gibco, 26050-088)으로 옮겨 배양하였다. 루시퍼라제 분석은 전술한 바와 같이 수행되었다. 모든 실험을 3회 이상 반복하여 수행하였다.

[0058] 이 연구에 사용된 구조물은 다음과 같다 : FHREluc(Addgene, 1789; Dr. Michael Greenberg에 의해 기탁),

pcDNA3-PRMT1-HA, pcDNA3-PRMT6-HA, pcDNA3-FOXO3-플래그.

[0059] 플래그-태깅된 FOXO3 발현 벡터를 구축하기 위해, FOXO3의 전체 코딩 영역을 PCR로 증폭시키고 PCR 생성물을 플래그-태깅된 pcDNA3에 클로닝 하였다(Addgene, 20011; Dr. Stephen Smale에 의해 기탁됨). 마우스 FOXO3의 R188, R218 및 R249에서 아르기닌-리신 치환된 점 돌연변이체를 생성하기 위해, QuikChange II XL 부위 지향 돌연변이 유발 키트 (Stratagene, 200518)를 사용하여 돌연변이 유발을 수행 하였다.

[0061] **5. PRMT1 녹아웃 C2C12 세포주 생성**

[0062] PRMT1 gRNA는 gRNA 디자인 툴을 사용하여 제작하였다(Genscript). pSpCas9 플라스미드는 Addgene (62988; Dr. Feng Zhang에 의해 기탁 됨)에서 구입 하여 사용하였다.

[0063] PRMT1 sgRNA 및 pSpCas9 플라스미드를 TransIT-LT1 형질 감염 시약 (Mirus, MIR5400)을 사용하여 C2C12 세포주로 일시적으로 형질 감염시켰다. 클론의 표적화된 서열은 서열 분석으로 확인되었다. 이 연구에 사용된 가이드 RNA 서열은 다음과 같다 :

[0064] PRMT1 gRNA : 정방향 5-CACCGCTCACCATGGTCTAACTTGT-3 ', 역방향 5-AAACACAAGTTAGACCATGGTGAGC-3.

[0066] **6. RNA 및 단백질 분석**

[0067] qRT-PCR 분석은 공지된 방법에 따라 시행되었다(JeongMH, Leem YE, KimHJ, et al. A Shh coreceptor Cdo is required for efficient cardiomyogenesis of pluripotent stem cells. J Mol Cell Cardiol. 2016 Apr;93:57-66. PubMed PMID: 26906632; eng.). RNeasy plus mini Kit(Qiagen, 4106)를 사용하여 배양된 세포 또는 근육 조직으로부터 총 RNA를 분리 하였다. cDNA는 GoScript 역전사 시스템 (Promega, A5001)을 사용하여 얻었고, SYBR Green(TAKARA, RR420A) 또는 SensiFAST SYBR No-ROX 키트(Bioline, BIO-98050)를 사용하여 정량적 실시간 PCR로 분석하였다. 데이터는 리보솜 유전자 RPL32 또는 GAPDH의 발현으로 정규화되었다. 프라이머 서열은 하기 표 1에 제시되어있다.

표 1

[0068]

Primers		Sequence (5'- 3')
Rp132	F	GGCCTCTGGTGAAGCCCAAGATCG
	R	CCTCTGGGTTTCCGCCAGTTTCGC
Gapdh	F	CACCATCTTCCAGGAGCGAG
	R	CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC
Myh7	F	CCATCTCTGACAACGCCTATC
	R	GGATGACCCTCTTAGTGTTGAC
Myh2	F	GGCTTCAGGATTTGGTGGATAA
	R	GGATCTTGCGGAACTTGGATAG
Myh4	F	GATTGACGTGGAGAGGTCTAAC
	R	CCTGAGTTTCCTCGTACTTCTG
Fbxo32	F	ATGCACACTGGTGCAGAGAG
	R	TGTAAGCACACAGGCAGGTC
Trim63	F	ACGAGAAGAAGAGCGAGCTG
	R	CTTGGCACTTGAGAGGAAGG
Foxo3	F	AGCCGTGTACTGTGGAGCTT
	R	TCTTGGCGGTATATGGGAAG
Foxo1	F	ACTTTGATAATGTGTTGCCC
	R	CTGCTGTCAGACAATCTGA
Prmt1	F	ACCCTCACATACCGCAACTC
	R	TGTTGGCTTTGACAATCTTCAC
Prmt2	F	AGGATGGGGCACAGTTACAG
	R	GTCAGCCAACATTTCCAGGT
Prmt3	F	GTGCCTTGGGAAAAAGATGA
	R	TCAACAACAGATGCGCTTTC
Prmt4	F	ACCACACGGACTTCAAGGAC

	R	CTCTTCACCAGGACCTCTGC
Prmt5	F	GGAACTCTGAAGCGGCTATG
	R	GTGTGTAGTCGGGGCATTCT
Prmt6	F	TGTCGCTGAGCAAGAAAAGA
	R	GACGTCGGAGTAGCACTCGT
Prmt7	F	GCTGCTGTGAAGATTGTGGA
	R	CAAACAGCTCCGTGATCAGA
Prmt6 Promoter	F	CTGCACCACGATCTCCGAAT
	R	CGGACTACGAATCCCAGCAG

[0069] 웨스턴 블롯 분석은 공지된 방법으로 수행되었다(Jeong MH, Kim HJ, Pyun JH, et al. Cdon deficiency causes cardiac remodeling through hyperactivation of WNT/beta-catenin signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Feb 21;114(8):E1345- E1354. PubMed PMID: 28154134; eng.). 간단히 설명하면, 세포는 완전한 프로테아제 억제제 칵테일을 함유하는 세포 추출 완충액 (10 mmol / L Tris HCl, pH 8.0, 150 mmol / L NaCl, 1 mmol / L EDTA, 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787))에서 용해되었다. 이어서 SDS-PAGE를 수행하기 위하여 1 차 및 2 차 항체와 인큐베이션 하였다. 조직 추출물은 액체 질소로 냉동 분쇄하여 세포 추출 완충액에 용해시켰다 .1 차 항체는 PRMT1 (Upstate, 07-404), PRMT4 (Cell Signaling Technology, 4438), PRMT6 (Cell Signaling Technology, 14641), 비대칭 디메틸 아르기닌 (Cell Signaling Technology, D6A8; custom order), p-AMPK (Cell Signaling Technology, 2535), AMPK (Cell Signaling Technology, 2532)), p-AKT (Cell Signaling Technology, 9271), AKT (Cell Signaling Technology, 9272), SQSTM1 (Cell Signaling Technology, 5114), LC3A / B (Cell Signaling Technology, 4108), FOXO1 (Cell Signaling Technology, 9454) , FOXO3 (Cell Signaling Technology, 12829), HSP90 (Santa Cruz Biotechnology, sc7947), GAPD H (Santa Cruz Biotechnology, sc25778), HA (Santa Cruz Biotechnology, sc7392), TRIM63 / MURF-1 (Gene Tex, 110475), LMNB1 / LaminB1 (Abcam, 16048), LAMP1 (Abcam, 24170), LAMP2 (Abcam, 25631), HDAC1 (Abcam, 7028), HDAC2 (Abcam, 2540), HDAC3 (Abcam, 7030), YY1 (Abcam, 109237), 플래그 (Sigma-aldrich, F3165), TUBB / β-tubulin (Sigma-aldrich, 5293), MHC (DSHB, MF20) 및 K48- 유비퀴틴 (Millipore, 05-1307)을 사용하였다. 세포 분획 분석은 공지된 방법에 따라 수행되었다(Jeong MH, Ho SM, Vuong TA, et al. Cdo suppresses canonical Wnt signalling via interaction with Lrp6 thereby promoting neuronal differentiation. Nat Commun. 2014 Nov 19;5:5455. PubMed PMID: 25406935; PubMed Central PMCID: PMCPMC4412020.).

[0070] 간단히 설명하면, C2C12 세포를 40mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 디티오트레이톨(DTT) 및 프로테아제 억제제를 함유하는 100μl의 시토졸 분별 완충액에 재현탁시키고 10분 동안 얼음에서 인큐베이션 하였다. 7.5 ㎕의 10% NP-40(Sigma-Aldrich, 74385)을 첨가한 후, 세포를 잠시 볼 텍싱하고 4 ℃에서 10 분 동안 13,000 g에서 원심 분리 하였다. 세포질 상청액을 옮긴 후, 핵 펠렛을 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 420 mM NaCl, 10 % 글리세롤, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 및 단백질 분해 효소 억제제를 함유하는 50 ㎕의 핵 분별 완충액에 분산시킨 후 15분 동안 인큐베이션 하였다. 얼음 위에서 최소 13,000 g에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 핵 분획을 함유하는 상청액을 새로운 튜브로 옮기고, 분획을 면역 블롯팅으로 분석 하였다. 대조군으로, 우리는 세포질 마커로서 TUBB 또는 HSP90을 사용하였고 핵 마커로서 LMNB1을 이용 하였다.

[0072] **7. 면역 침강(Immunoprecipitation, IP) 및 염색질 면역 침강법**

[0073] 면역 침강 분석은 공지된 방법에 따라 수행되었다. HEK293T 세포를 TransIT-LT1 형질 감염 시약 (Mirus, MIR5400)을 사용하여 플라스미드로 형질 감염시켰다. 세포를 20mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100(Sigma-Aldrich, T8787), 2.5mM 피로인산나트륨, 50mM NaF, 5mM β-글리세로포스페이트, 1mM Na_3VO_4, 프로테이나제 억제제 칵테일 (Roche, 04693132001)을 함유하는 용해 완충액에 용해시켰다. 용 해물을 AUTOPHAGY 1079 항-플래그 M2 친화성 겔(Sigma-aldrich, A2220)과 함께 4 ℃에서 배양 하였다. 면역 침전물은 SDS-PAGE에 의해 분해되고 면역 블로팅되었다. 크로마틴 면역 침전 분석은 공지된 방법에 따라 수행되었다 (Jeong HJ, Lee HJ, Vuong TA, et al. Prmt7 deficiency causes reduced skeletal muscle oxidative metabolism and age-related obesity. Diabetes. 2016 Jul;65(7):1868-1882. PubMed PMID: 27207521.). 사용된 항체는 토끼 IgG (abcam, ab37415), PRMT1 (abcam, ab3768), YY1 (abcam, ab109237), HDAC1 (abcam, ab7028), HDAC2 (abcam, ab7029) 및 HDAC3 (abcam, ab7030)이었다. -82 내지 +752 사이의 Prmt6 프로모터 영역

을 증폭시키기 위해 표 1에 열거된 프라이머를 사용하였다.

[0075] **8. 통계 분석**

[0076] 그림 범례에 표시된 대로 값은 평균 ±SD 또는 ±SEM으로 표시되었다. 통계적 유의성은 쌍 또는 쌍을 이루지 않은 양측 스튜던트 t 검정을 사용하여 계산되었다. 여러 그룹 간의 비교를 위해 SPSS(버전 12.0; 일리노이 주 시카고, SPSS)를 사용한 일원 분산 분석 테스트를 통해 통계적 유의성을 테스트하였다. 차이는 P <0.05의 값 또는 그 미만에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0078] **실험예 1. PRMT1의 근손실 유발 효과**

[0079] **1-1) PRMT1 골격근 특이적 넉아웃 모델 제작 및 표현형 비교**

[0080] PRMT1의 골격근 특이적 넉아웃 마우스(이하, mKO라 함)는 하기 방법으로 제작하였다. 먼저, 유사 분열 후 활성화되는 TypeⅡ 근섬유 Myl1 프로모터(Myl1-Cre)의 제어 하에 Cre 재조합 효소를 발현하는 플록스된 대립 유전자에 대한 Prmt1 flox/flox (f/f) 마우스 이형 접합체를 교차시켜 제작하였다. 상기 넉아웃 모델의 다양한 조직에서 PRMT1에 대한 면역 블롯 분석을 통해 절단 여부를 확인하였으며, 심장 또는 간과 같은 조직에서는 절단이 일어나지 않았으나, 골격근에서 특이적으로 절단됨을 확인하였다. PRMT1의 골격근 특이적 넉아웃 마우스는 Prmt1 f/f(이하, f/f라 함)과 외관상 구별되지 않았다. 6개월령 mKO 마우스의 체중은 야생형과 비교하여 차이가 없었던 반면, 12개월령 mKO 마우스는 체중이 감소된 것을 확인하였다.(도 1). NMR 분석기를 사용하여 체성분을 분석한 결과, 대조군 마우스에 비하여 근육량은 감소하였으나, 지방의 질량은 증가된 것으로 확인되었다. 이와 마찬가지로, mKO 마우스에서 내장 및 피하 백색 지방 조직의 상대적 무게는 유의하게 증가된 반면, 심장 및 간의 상대적 무게는 유사하였다. 이와 대조적으로 각각의 뒷다리 근육을 분석한 결과, 두 월령 그룹 모두 mKO 마우스에서 경골 전방(TA), 위복근 (GAS) 및 신근 손가락 연골(EDL) 근육의 무게가 유의하게 감소된 것으로 나타났으며, 주로 type Ⅰ 근섬유를 함유하는 단독(SOL) 근육의 상대적 중량은 6개월령 mKO 마우스에서 감소되었다(도 2). 이로부터 PRMT1의 넉아웃으로 인하여 근육 손실이 유발된다는 것을 알 수 있다.

[0082] **1-2) 면역 염색에 의한 근섬유 크기 및 mRNA 발현량 비교**

[0083] 6개월령 마우스의 PRMT1 넉아웃 근육 표현형을 더욱 상세히 분석하기 위하여, 근육 조직을 면역염색법으로 확인하였다. 대조군 및 mKO 마우스의 TA 및 EDL 근육을 MYH(미오신 중쇄)의 iso형으로 면역 염색 하여 관찰한 결과, mKO 마우스의 근육에서 typeⅡ 근섬유의 크기가 유의하게 감소된 반면, typeⅠ근섬유는 대조군의 근육에 비해 수 및 크기가 증가된 것으로 나타났다.(도 3) 이와 일관되게, mKO 근육에서 Myh7 (Myh type I)의 mRNA는 증가, Myh4 (Mhy type IIb)의 mRNA 발현은 감소되었다(도 5). 상기 결과는 PRMT1 결핍이 type Ⅱ 근섬유 크기가 감소된 근섬유 조성의 변화를 유발한다는 것을 보여주는 것이다.

[0084] 또한, f/f 및 mKO의 TA 근육에서 위축 관련 유비퀴틴, 리가아제, FBXO32 및 TRIM63의 발현을 조사하였다. 그 결과, 근육 위축 모델의 표현형과 동일하게, PRMT1가 넉아웃된 마우스의 근육은, f/f 근육과 비교하여 FBXO32 및 TRIM63의 발현이 강화된 것을 확인하였다(도 5(좌)).

[0086] **1-3) 동물 모델의 근력 비교 (그립 강도 및 근수축 평가)**

[0087] 상기와 같은 발현량의 차이에 따른 근육 기능의 결과를 확인하기 위하여, 대조군 및 mKO 마우스의 그립 강도를 평가하였다(도 6). 그 결과, mKO 마우스는 그립 강도가 약화되었으며, 이는 f/f 마우스와 비교하여 TypeⅡ 근섬유로 구성된 해당 근육의 발현이 크게 감소하였다는 사실을 확인할 수 있는 결과이다. 또한, isometric force and force-frequency 분석을 측정하여, 6개월령 f/f 및 mKO 마우스로부터 EDL 근육의 수축 기능을 평가하였다. 해당 EDL 근육은 등각 변환 및 지각력을 크게 감소시켰다(도 6). 힘 발생 감소는 상기 도 6에서 확인한 바와 같이, 수축성 단백질이 변경되었다는 점을 반영한 결과이며, 이러한 데이터로부터, PRMT1의 근육 특이적 절제가 조숙한 근육의 손실 및 약화를 유발할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0089] **실험예 2. PRMT1 넉아웃으로 인한 골격근 에너지 경로 조절**

[0090] **2-1) 에너지 상태에 따른 PRMT1 발현량의 비교**

[0091] PRMT1이 결핍된 경우 근육 위축 매커니즘을 조사하기 위하여, 서로 다른 에너지 상태에서의 PRMT1의 발현량을 평가하였다. PRMT1, p-AMPK, AMPK 및 LC3-II (LC3B라고도 함)의 발현량을 각각 정상 식이, 16시간 공복 및 6시간 공복 후, TA 근육을 검사 하였다. 주된 에너지 센서인 AMPK(p-AMPK)의 인산화된 형태는 공복근에서 크게 증가하였고, 전체 AMPK 수준의 변화 없이, 근육통이 감소되었다 (도 7). LC3-II 수준은 공복 근에서 크게 증가한 반면, 근육이 감소된 근육에서는 감소하여 에너지 상태에 대한 자가 포식 반응을 나타내었다. 공복근에서는 PRMT1 단백질의 수준이 감소한 반면, 정상 식이 상태에서는 증가 하였다. 이 데이터는 에너지 감지 경로 제어에서 PRMT1가 잠재적인 역할을 수행함을 암시한다.

[0093] **2-2) PRMT1 넉아웃 모델의 에너지 경로 인자 발현량의 비교**

[0094] 에너지 감지 경로에 대한 PRMT1 결핍의 효과를 확인하기 위하여, 대조군인 f/f 및 mKO 마우스를 6시간 동안 금식시켜, 10분간 인슐린(0.1U/마우스)으로 처리하였다. 인슐린 처리 없이, mKO 근육은 f/f 근육과 비교하여 p-AMPK 및 LC3-Ⅱ의 수준이 크게 향상되었으며, SQSTM1/p62의 수준이 감소되었다(도 8). 상기 결과는 인슐린 처리로 인하여 대조군 및 mKO 마우스의 근육에서 AKT 활성화가 증가되었으며, 이는 PRMT1이 인슐린에 의한 AKT 활성화에 필수적임을 시사하는 것이다. p-AMPK의 수준은 인슐린 처리된 mKO 근육에서 부분적으로 감소했지만 이는 여전히 인슐린 처리된 대조군보다는 높았다.

[0095] 흥미롭게도, LC3-II 수준은 대조군 근육과 비교하여 인슐린 처리된 mKO 근육에서 더 높게 유지되었다. 또한, SQSTM1의 수준은 mKO 근육이 대조군 근육보다 낮았다. 이 결과는 PRMT1 결핍이 골격근의 에너지 부족 신호를 향상시킴을 시사하는 것이다.

[0097] **2-3) PRMT1 결핍이 에너지 경로에 미치는 영향 : in vitro 결과**

[0098] 이 메카니즘을 추가로 확인하기 위해, C2C12 근아세포를 24시간 동안 분화하도록 유도한 후, 아데노바이러스 발현 제어 RNAi 또는 Prmt1 RNAi로 감염시켰다. 3일 후, PRMT1 결핍의 영향을 조사 하였다 (도 9). PRMT1이 결핍된 근육과 유사하게, LC3-II 및 TRIM63의 상대적 수준은 대조군과 비교하여 PRMT1이 결핍된 근관에서 크게 증가하였다. PRMT1이 결핍된 세포는 미오신 중쇄 발현의 감소를 나타내었고 더 얇은 근관을 형성 하였다. 대조 실험에서, 지시된 시간 동안 대조군 또는 PRMT1-과발현 C2C12 세포에 혈청이 박탈되었고, 자가 포식 반응 및 AMPK 활성화가 평가되었다 (도 10). 혈청을 제거하고 4시간 후, p-AMPK 수준은 두 실험군 모두에서 크게 향상되었다; 그러나, p-AMPK의 유도 수준은 PRMT1-과발현 세포에서 둔화되었다. 이와 일관되게, PRMT1가 과발현된 세포는 대조군 세포에 비해 LC3-II 수준이 감소되었다. 또한, 유비퀴틴화 된 K48에 대한 항체에 의해 측정된 유비퀴틴화된 단백질의 수준뿐만 아니라 LAMP1 및 LAMP2의 유도는 PRMT1-과발현 세포에서 감소되었다. 자가 포식 플럭스를 평가하기 위해, 리소좀 억제제인 바필로마이신 A1 (Baf A1)로 세포를 처리 하였다. PRMT1- 과발현 세포는 Baf A1의 존재하에 LC3-II 축적량이 감소하였고, 대조군과 비교하여 감소된 자가 포식 플럭스를 나타냈다. 이들 데이터는 PRMT1가 결핍된 경우, 에너지 부족 신호 및 자가 포식을 교란시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0100] **실험예 3. PRMT1 결핍 모델의 FOXO3 단백질 발현량 확인**

[0101] **3-1) PRMT1의 FOXO3 단백질 발현 조절 기능**

[0102] FOXO 전사 인자, 특히 FOXO3는 단백질 분해 및 근육 위축과 연관된 유비퀴틴 리가아제인 TRIM63 및 FBXO32의 자가 포식 및 유도에 관여한다. 따라서, 상기 실험 데이터와 조합하여, PRMT1이 골격근에서 FOXO의 작용을 억제하는 것을 추측할 수 있었다. 이 가설을 시험하기 위해, 대조군 및 PRMT1이 결핍된 마우스의 근육에 FOXO1 및 FOXO3 수준에 대한 면역 블롯팅 및 qRT-PCR 분석을 수행 하였다. FOXO1의 단백질 수준은 변화되지 않은 반면, FOXO3 단백질 수준은 PRMT1 결핍 근육에서 매우 크게 증가하였다(도 11). 또한, 대조군 및 mKO 마우스의 TA 근육의 qRT-PCR 분석 결과, mKO 근육이 Foxo3 전사체에서 2배 정도 증가한 반면 Foxo1 mRNA 발현의 증가는 최소한으로 증가되었음을 확인하였다 (도 11(우)).

[0104] **3-2) 면역 염색 분석 결과**

[0105] 면역 염색 분석에서도, mKO 근육은 근섬유의 핵을 포함하여 FOXO3에 대해 더 많은 양성 미오뉴클리를 가졌다(도 12). 또한, 대조군 및 PRMT1-결핍된 C2C12 세포에 대하여, 세포 분별에 의해 FOXO1 및 FOXO3 발현 수준에 대해 조사 하였다(도 13).

[0106] 즉, PRMT1가 결핍된 경우, 세포 전체 및 핵 내의 FOXO1 및 FOXO3 단백질의 수준을 상승 시켰으며, 이는 PRMT1이 결핍된 세포에서 FOXO 활성화가 향상되었음을 보여주는 결과이다. 또한, 이는 Trim63 및 Fbxo32의 발현 증가와도 일치하는 것이다(도 13(우측 아래)). 종합하면, 이들 결과는 PRMT1이 FOXO3의 발현 및 활성을 음성으로 조절한다는 것을 시사한다.

[0108] **실험예 4. PRMT1의 PRMT6 발현 억제 효과 확인**

[0109] 이전의 연구는 PRMT1에 의한 FOXO1의 아르기닌 메틸화가 간 포도당 대사에서 FOXO1의 활성을 촉진한다는 것을 보여 주었다. 따라서, PRMT1이 메틸화를 통해 FOXO3를 억제하는지 여부를 조사 하였다. PRMT1은 FOXO3와 상호작용했지만 메틸화는 하지 않았다. 이전의 연구에서 대조군 f/f와 mKO 근육에서 여러 가지 PRMT의 발현을 평가했다 (그림 14). 여러 PRMT의 발현이 mKO 근육에서 변경되었지만, 특히 Prmt6 mRNA는 PRMT1 결핍 근육에서 가장 높은 수준으로 상향 조절되었으며, 이는 단백질 수준에서 추가로 확인되었다 (도 15). 또한, PRMT6에 대한 면역 염색 결과, mKO 근육, 특히 미요뉴클리에서 증가된 면역 양성을 나타내었고, 반면 대조 근육은 미요뉴클리에서 감소됨을 확인할 수 있었다(도 16). 상기 결과는 근육 분석과 일치하여, C2C12 세포에서 PRMT1 결핍은 TRIM63 단백질과 함께 PRMT6의 수준을 대략 3배 향상 시켰지만 (도 17), PRMT1 과발현은 Prmt6 전사 수준을 감소시켰다 (도 17(우측)). 이들 데이터는 PRMT1이 PRMT6 발현을 억제한다는 것을 시사한다.

[0110] 이전 연구에서, PRMT1은 YY1 매개 유전자의 조절에 관여하며, YY1은 히스톤아세틸트랜스퍼라제(HAT) 또는 히스톤디아세틸라아제(HDAC)와 같은 다양한 히스톤 개질제와의 상호 작용을 통해 유전자의 발현을 조절할 수 있다고 보고되었다. Prmt6 프로모터 영역의 서열 분석을 통해 전사 개시부위 주변의 2개의 잠재적인 YY1 결합 부위를 예측하였으며, 본 발명자들은 크로마틴 면역 침전 분석법에 의해 PRMT1,YY1 및 HDAC(1~3)가 Prmt6 프로모터에 결합하였는지 여부를 확인하였다.(도 18). PRMT1 및 YY1 은 대조군 세포에서 Prmt6 프로모터 영역으로 결합되어 있는 반면에, PRMT1의 결핍은 YY1의 결합을 저해하였다. 더욱이, HDAC2 및 HDAC3는 대조군 세포의 프로모터 영역에서 풍부해진 반면, PRMT1의 결핍은 이와 같은 결합을 둔화시켰다. 그러나, PRMT1-결핍된 세포에서 Prmt6 프로모터 영역으로 결합하는 것은 PRMT1의 발현량 변화로 인한 것은 아님을 확인하였다(도 19).

[0111] 종합하면, 이들 데이터는 PRMT1이 YY1 및 HDAC2/3와 함께 프로모터 영역에 결합함으로써 Prmt6 전사를 억제함을 시사한다.

[0113] **실험예 5. PRMT1 결핍 세포에서 PRMT6의 작용 : FOXO3 및 오토파지 증가**

[0114] FOXO3 조절에서 PRMT1과 PRMT6 사이의 관계를 추가로 정의하기 위해, 2 % 말 혈청에서 3 일 동안 배양 된 대조군 또는 prmt1 녹아웃 C2C12 세포를 세포 분별 분석에 적용 하였다. PRMT1 고갈은 핵 및 총 용 해물에서 FOXO3 및 PRMT6 단백질의 수준을 크게 증가 시켰으며, 이는 상승 된 TRIM63 발현과 밀접한 관련이 있었다 (도 20 (좌)). FOXO3 활성에 대한 이들 PRMT의 효과를 조사하기 위해, C2C12 세포에 PRMT1 또는 PRMT6과 함께 FOXO3를 코딩하는 플라스미드를 형질 감염시키고 FOXO3-루시퍼라제 리포터 분석을 수행 하였다. PRMT6은 FOXO3 매개 루시퍼라제 활성을 크게 향상 시켰지만, PRMT1 발현은 그것에 영향을 미치지 않았다 (도 20(우)). 이에 따라, C2C12 근아세포에서 PRMT6 과발현은 FOXO3의 총량 및 핵 내 수준을 크게 증가시켰다 (도 21). 자가 포식에 대한 PRMT6의 효과를 조사하기 위해, PRMT6을 과발현하는 C2C12 세포를 12 및 24 시간 동안 저 혈청 배지로 전환시켰다 (도 22). PRMT6 과발현은 대조군 세포와 비교하여 LC3-II의 수준을 추가로 상승시켰다. 반대로, PRMT6-결핍된 C2C12 세포는 대조군 및 Baf A1 처리 된 샘플 둘 다에서 LC3-II가 적었고, 대조군 세포와 비교하여 감소된 자가 포식 플럭스를 나타내었고 (도 23), 이는 자가 포식에서 PRMT6의 긍정적 인 역할을 시사한다 . 종합하면, 이들 데이터는 PRMT1 고갈-유도 FOXO3 활성화 및자가 포식이 PRMT6에 의해 매개 될 가능성이 있음을 시사한다.

[0116] **실험예 6. PRMT6의 아르기닌 잔기 188 및 249의 메틸레이션에 의한 FOXO3 활성조절**

[0117] **6-1) 면역침전/ 면역블롯팅 결과**

[0118] PRMT6이 메틸화에 의해 FOXO3을 활성화시키는지 여부를 조사하기 위해, 10T 1/2 세포를 6 시간 또는 18 시간 동안 저혈청 배지로 전환하고 FOXO3의 비대칭 메틸화를 비대칭 디메틸아르기닌-특이적 D6A8 항체를 이용하여 면역침전 및 면역 블롯팅으로 확인하였다. 골격근에서 얻은 데이터에 따라, PRMT1 단백질 수준은 혈청 부족에 반응하여 감소한 반면, PRMT6 수준은 FOXO3 메틸화에 의해 크게 향상되었다 (도 24(좌)).

[0120] **6-2) PRMT6 및 FOXO3의 상호작용 확인**

[0121] FOXO3와 PRMT6 사이의 물리적 상호 작용을 조사 하였다. 293T 세포에 플래그 태그 FOXO3와 함께 HA 태그 PRMT1 또는 PRMT6에 대한 벡터를 형질 감염시켰다. 이전 데이터와 일치되게, PRMT1 단백질은 FOXO3와 덜 효율적으로 공침되어 이를 메틸화하지 못하였다. 대조적으로, PRMT6은 FOXO3와 효율적으로 공침하여 비대칭적으로 디메틸화된 아르기닌에 특이적인 D6A8 항체에 의해 인식된 바와 같이 비대칭적으로 디메틸화 하였다(도 24(우)). 다음으로, 야생형 PRMT6 또는 메틸 트랜스퍼라제 활성-결핍 PRMT6(V86K D88A)를 FOXO3를 코딩하는 플라스미드로 공형질 감염시키고 FOXO3의 메틸화 및 활성을 평가하였다 (도 25). 그 결과, 야생형 PRMT6은 비대칭 메틸화 FOXO3 수준을 강력하게 향상 시켰으며 V86K D88A 돌연변이체를 제거하였다.

[0122] 상기 실험 결과는 일관적으로, FOXO3 리포터 활성은 야생형 PRMT6에 의해 유의하게 증가되었지만 V86K D88A 돌연변이에 의해 증가되지 않았다는 것을 보여준다. 이들 데이터는 PRMT6에 의한 FOXO3의 메틸화가 FOXO3 활성화를 촉진한다는 것을 시사한다. 이와 마찬가지로, FBXO32 및 Trim63의 발현은 야생형 PRMT6에 의해 향상되는 반면, 돌연변이 PRMT6은 효과가 없었거나 최소의 효과 만을 나타내었다 (도 26). 이러한 데이터 역시 PRMT6이 메틸화를 통해 FOXO3 활성화를 촉진한다는 것을 시사한다.

[0124] **6-3) FOXO3의 메틸화 부위 확인**

[0125] FOXO3에서 잠재적인 메틸화 부위를 결정하기 위해, 질량 분석법으로 이를 확인하였고, 그 결과, FOXO3에서 3 개의 잠재적인 메틸화 부위 (R188, 218 및 249)가 확인되었다 (도 27). R188 및 R218은 FOXO1에 보존되지 않은 분기점 도메인에 국한된 반면, R249는 핵 위치 신호에 위치하고 FOXO1에서 보존되었다. R249는 세린252 부근에 위치하며 AKT에 의해 인산화되고 억제될 수 있으며, 또한, 아르기닌 메틸화와 FOXO3의 AKT-매개 억제 사이의 잠재적인 crosstalk를 제안하였다. 이러한 변형의 기능적 중요성을 추가로 평가하기 위해, 이들 부위에서 FOXO3에서 아르기닌-리신 돌연변이체를 생성하고 메틸화 및 후속 전사 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 야생형 및 R218K의 메틸화는 야생형 FOXO3에 비해 이소성 PRMT6에 반응하여 동일하게 향상되었다 (도 28). 그러나 이와 대조적으로, R188K 및 R249K 돌연변이체는 PRMT6에 의해 메틸화의 증가가 나타나지 않았으며, 이는 R188 및 R249가 PRMT6의 표적 부위임을 시사하는 것이다. 또한, 야생형 FOXO3 단독의 발현은 LC3-II 수준을 크게 변화시키지 않았다. PRMT6을 이용한 야생형 또는 R218K 돌연변이체의 발현은 LC3-II의 수준을 실질적으로 향상 시켰으며, 이는 PRMT6을 갖는 R188K 또는 R249K를 발현하는 세포에서는 그렇지 않았다.

[0126] 상기 결과의 기능적인 평가를 위해, PRMT6 및 FOXO3 단백질을 C2C12 세포에서 공동 발현하고 TRIM63 및 FBXO32의 발현 수준을 측정 하였다 (도 29). 대조군 세포와 비교하여, 야생형 FOXO3 단독의 발현은 Trim63 및 Fbxo32 수준을 증가 시켰고, 이들은 PRMT6 공동-발현에 의해 추가로 향상되었다. 야생형과 마찬가지로, R218K는 PRMT6에 대해 유사한 반응을 보인 반면, R188K 및 R249K는 PRMT6에 대해 감소된 반응을 나타냈다.

[0128] **6-4) FOXO3 메틸화의 핵 기능 조절**

[0129] 다음으로, FOXO3의 아르기닌 메틸화가 핵 기능을 조절하는지 여부를 확인하기 위하여, C2C12 세포를 FOXO3 단백질을 암호화하는 플라스미드로 형질 감염시키고, 핵 분획화로 이들의 핵 위치를 조사 하였다 (도 30). 야생형 및 R218K 돌연변이의 단백질은 핵 분획에서 비교적 높았지만, R188K 및 R249K 돌연변이의 핵에서의 수준은 더 낮았다. 종합하면, 이들 데이터는 PRMT6이 FOXO3의 R188 및 R249 잔기를 메틸화한다는 것을 시사한다.

[0131] **6-5) PRMT6의 FOXO3 리포터 활성 억제 확인**

[0132] 마지막으로, PRMT6 억제가 PRMT1-결핍에 의해 유발된 높은 FOXO3 리포터 활동을 막을 수 있는지 여부를 조사하였다(도 31). FOXO3 리포터 활성은 PRMT1의 결핍에 의해 증가하였으며, 이는 특정 억제제(EPZ020411)에 의한 PRMT6-억제로 둔화되었다. 또한, 대조군 또는 prmt1 넉아웃 C2C12 세포를 아데노 바이러스 발현 대조군 또는 shPrmt6으로 감염시킨 후 세포 분별 분석을 수행하였다. 이전 데이터와 마찬가지로, prmt1 넉아웃 C2C12 세포는 총 용해물뿐만 아니라 PRMT6 결핍으로 둔화되는 핵 분획에서 FOXO3 및 PRMT6 수준의 극적인 증가를 나타냈다(도 32). 또한, prmt1 넉아웃 C2C12 세포에서 PRMT6 고갈은 Foxo3 및 Trim63의 수준을 거의 제어 세포 수준으로 구제하였으며, Fbxo32 발현에도 작지만 유의한 영향을 미쳤다 (도 33). 우리의 분석은 PRMT1 결핍이 FOXO3와 직접 상호 작용하고 메틸화하여 FOXO3과 활성화를 초래하는 PRMT6의 상향 조절을 야기한다는 것을 시사한다. 결론적으로, PRMT1 결핍으로 유발된 근육 위축은 주로 PRMT6 및 FOXO3의 상향 조절에 기인하며, 골격 근육에서 자가포식 반응 및 단백질 분해 경로를 증가시키는 결과를 가져오는 것을 확인하였다.

[0134] **실험예 7. 근육 특이적 PRMT1 넉아웃 모델에서 근질환(Myopathy) 유발 확인**

[0135] **7-1) 실험 동물 모델 제작**

[0136] 모든 동물 실험은 고려 대학교 실험 동물 자원 센터의 특정 병원체 시설에서 수행되었으며 고려 대학교 동물 동물 관리위원회의 승인을 받았다. PRMT1 f/f 마우스로 MLC-Cre 마우스를 육종함으로써 근육 특이 적 Prmt1 녹아웃 마우스 (Prmt1 mKO)를 생성 하였다. MLC-Cre 마우스는 KRIBB에서 이철호 박사에 의해 제공되었다.

[0138] **7-2) Cryosections**

[0139] 새로 단리 된 TA 근육을 최적의 절단 온도 (Sakura finetek, 4583)에서 급속 냉동시키고, 극저온 마이크로톰 (Leica, Wetzlar, Germany)에서 7㎛ 두께로 절단 하고, H&E 염색(헤마톡실린 및 에오신)을 (Sigma) 수행 하였다. 이미지는 Nikon ECLIPS TE-2000U 및 NIS-Elements F 소프트웨어(일본 도쿄, 니콘)를 이용하여 캡처하였다. 근섬유를 추적하고, 그 면적을 NIS-Elements F 소프트웨어 (Nikon)를 사용하여 측정 하였다.

[0141] **7-3) 세포 배양**

[0142] C2C12 세포를 DMEM 배지에서 배양하였고, 여기에 15% 소태아 혈청을 보충하였다. 분화를 유도하기 위해 배지를 3-4 일 동안 48시간마다 2% 말 혈청을 함유하는 DMEM으로 교체 하였다.

[0144] **7-4) 재조합 아데노바이러스 제작**

[0145] 비특이적 RNAi (5'-GGCATTACAGTATCGATCAG-3') 및 PRMT1 RNAi (5'-GCAACTCCATGTTTCACAATC-3')를 발현하는 재조합 아데노 바이러스는 AdEasy 시스템을 사용하여 생성되었다 (Luo et al., 2007). C2C12 세포로의 감염을 위해 염화 세슘 (CsCl) 밀도 구배 방법을 사용하여 아데노 바이러스를 정제 하였다.

[0147] **7-5) PAS 염색**

[0148] PAS 염색은 제조사의 지시에 따라 PAS 염색 키트 (일본 도쿄, 무토 퓨어 케미칼즈)로 수행되었다. 간략하게, 세포를 10.5%(w/v) 포름 알데히드로 고정시키고 실온에서 10 분 동안 1%(w/v)과 요오드 산으로 처리 하였다. 세포를 증류수로 3 회 세척한 후, 37℃에서 30 분 동안 쉬프 시약으로 처리 하였다. 황산 용액으로 3번 처리하여 염색 반응을 정지시켰다. 샘플을 완전히 건조시키고 명시야에서 Nikon ECLIPS TE-2000U로 관찰 하였다.

[0150] **7-6) 글리코겐 분석**

[0151] 배양된 세포를 트립신 처리하고 PBS로 2회 세척 하였다. 이어서, 세포 펠렛을 증류수에서 얼음 위에서 초음파 처리 하였다. 피어스 BCA 단백질 분석 키트 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 용 해물의 단백질 농도를

측정 하였다. 글리코겐 양이 글리코겐 분석 키트 (BioVision, Milpitas, CA, USA)의 검출 범위 내에 있도록 용해물을 세포 유형-특이적 단백질 농도로 희석시켰다. 그런 다음 제조사의 지침에 따라 글리코겐 양을 분석하고, EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer)로 형광 수준을 측정하였다. 근육의 글리코겐 농도를 분석하기 위해, 25mM 시트르산(pH 4.2), 2.5g/L NaF를 함유하는 용해 완충액에서 40 밀리그램의 경골 전방 근육 샘플을 균질화하였다. 글리코겐 농도는 제조사의 지시에 따라 EnzyChrome 글리코겐 분석 키트 (BioAssay Systems)를 사용하여 측정 하였다.

[0152] 골격근에서 특이적으로 PRMT1을 넉아웃시키면, 근질환(Myopathy)이 유발됨을 상기 실험을 통해 확인하였다. 도 34에서 보듯이, 근육 특이적으로 PRMT1을 넉아웃한 근육에서는 근섬유의 단면이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 또한, 단면의 크기에 따른 빈도/수를 대조군(f/f)과 비교한 결과(도 35)에서도, 작은 크기의 myofiber와 fiber의 빈도/수가 대조군 대비 증가되어 있는 것을 확인하였다. 또한, mKO 모델에서 myogenin 및 IL6의 발현량이 증가된 것으로 보아(도 35), 이와 같은 결과는 근병증(myopathy)이 유발된 것으로 판단할 수 있다.

[0153] 또한, 근육 세포 특이적으로 PRMT1이 넉아웃된 마우스의 글루코오스 대사를 확인하였다. 그 결과 도 36와 같이, 넉아웃된 근육 세포에서 당 분해 효소(glycolytic enzyme)의 활성이 높게 나타났으며, 도 37 및 도 38에서 확인한 바 같이 근육 조직의 글리코겐 농도 및 GLUT4, HK2, PFK와 같은 Glycolytic enzyme의 mRNA 발현이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. (도 39)

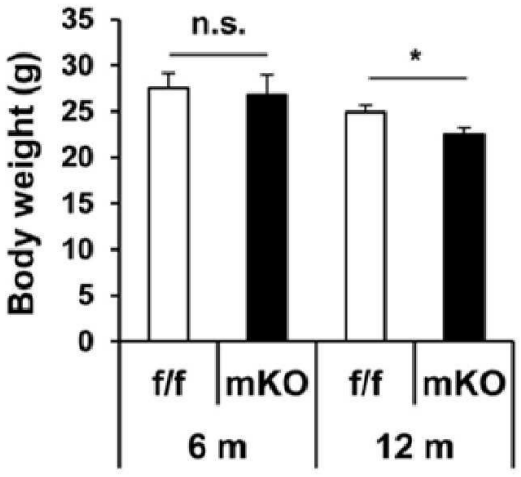
[0154] PRMT1이 넉다운된 C2C12 세포에서 포도당의 공급을 제한할 경우, 침착된 글리코겐이 정상 대조군에 비해 느리게 없어지는 것을 확인할 수 있었다 (도 40, 41).

[0155] 상기 결과로부터 알 수 있는 바, PRMT1이 결핍된 경우, 근육 내에서 비정상적인 글리코겐 대사가 유도되며, 궁극적으로는 근병증(myopathy)이 유발될 수 있다는 것을 확인하였다.

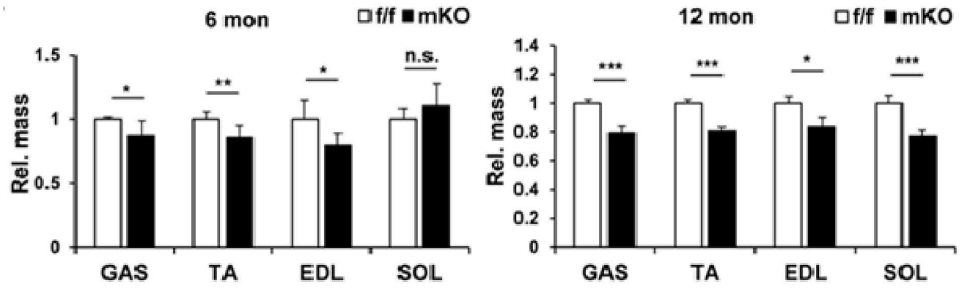
[0157] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

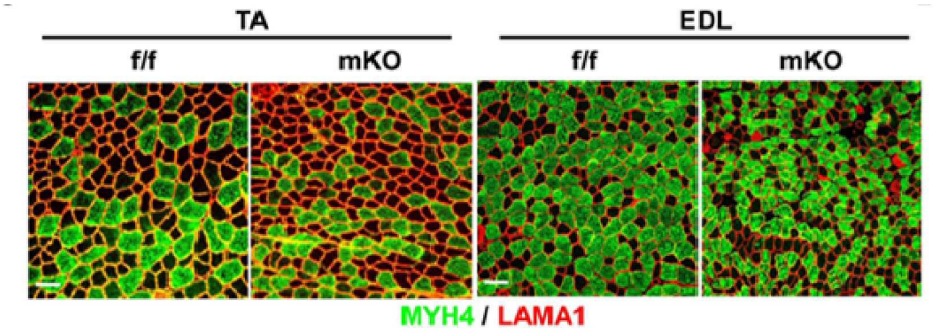
도면1



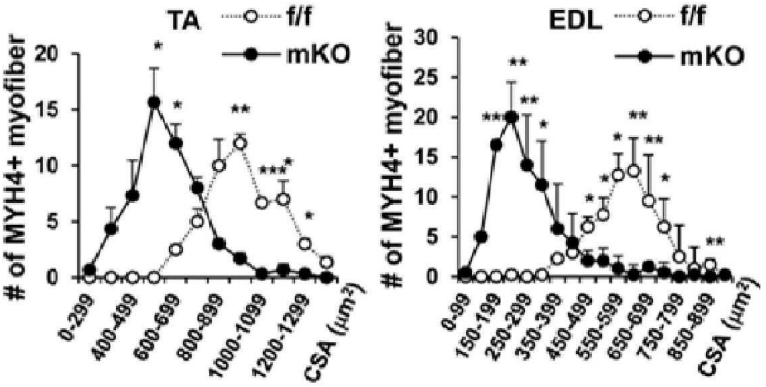
도면2



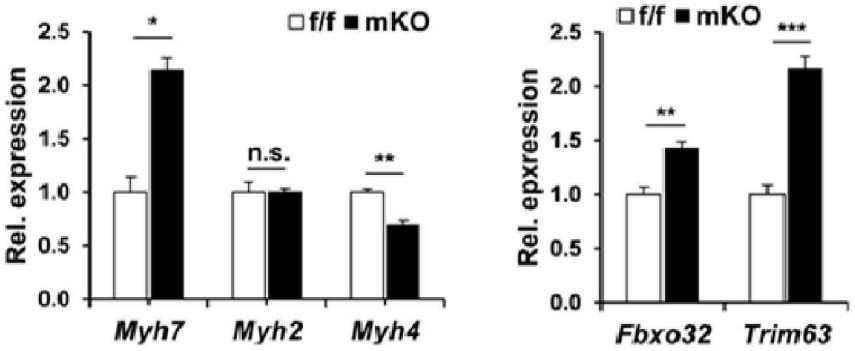
도면3



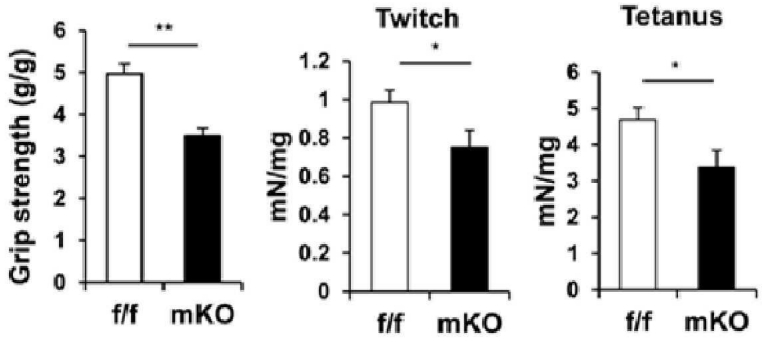
도면4



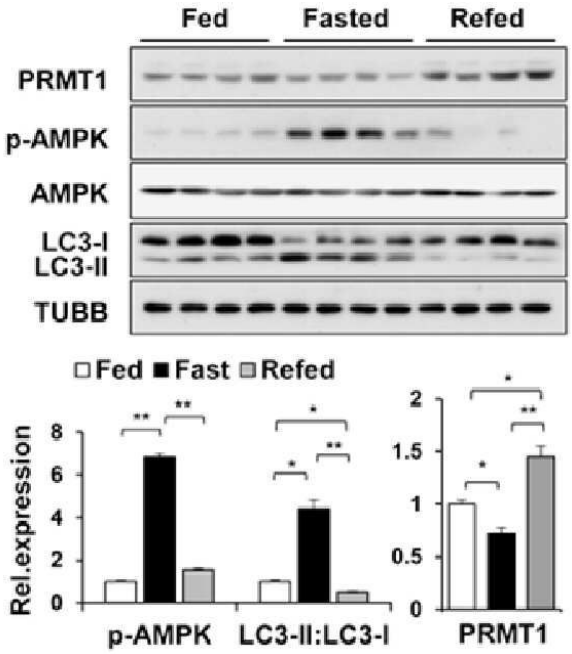
도면5



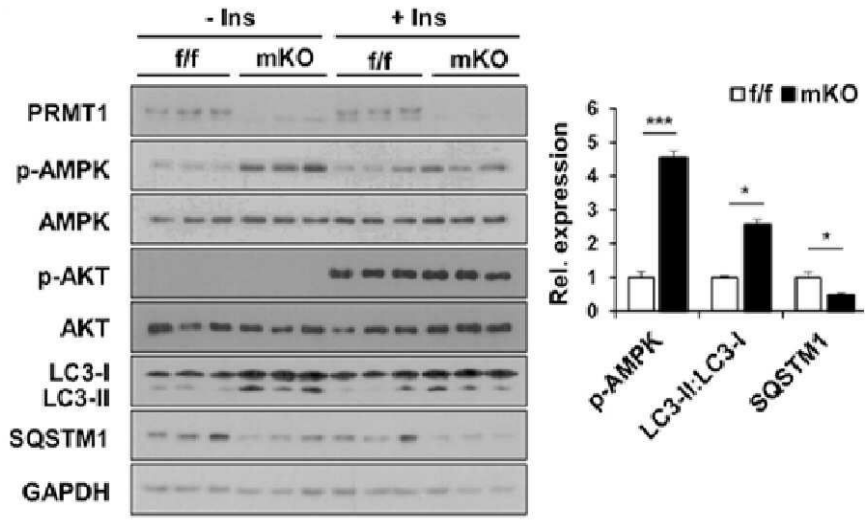
도면6


Grip strength (g/g)
f/f
mKO
Twitch
mN/mg
f/f
mKO
Tetanus
mN/mg
f/f
mKO

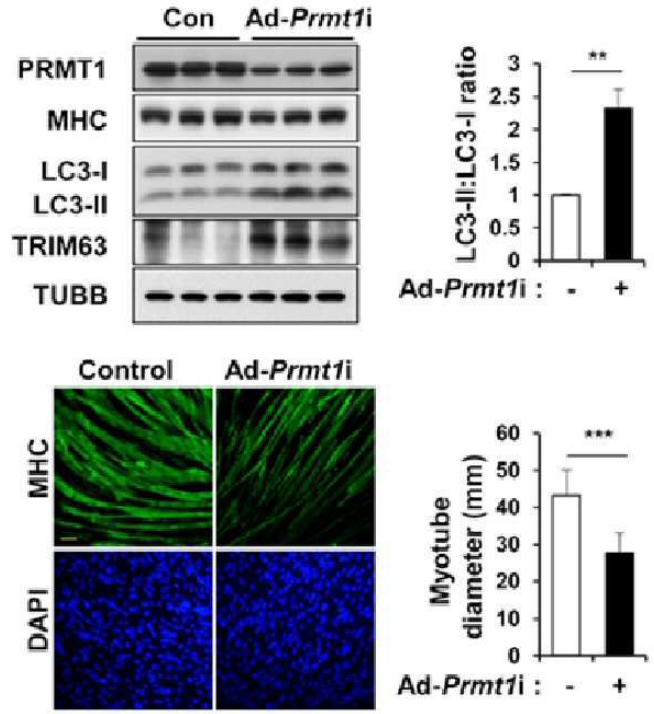
도면7


Fed
Fasted
Refed
PRMT1
p-AMPK
AMPK
LC3-I
LC3-II
TUBB
Fed
Fast
Refed
Rel.expression
p-AMPK
LC3-II:LC3-I
PRMT1

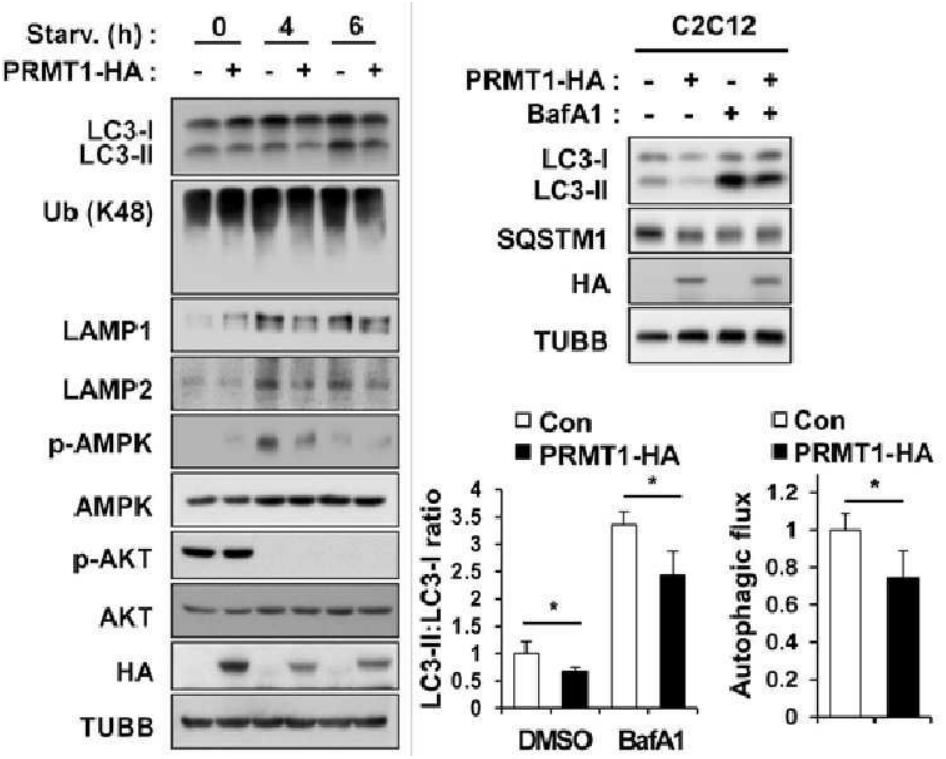
도면8


- Ins
+ Ins
f/f
mKO
f/f
mKO
PRMT1
p-AMPK
AMPK
p-AKT
AKT
LC3-I
LC3-II
SQSTM1
GAPDH
f/f mKO
Rel. expression
***
*
*
p-AMPK
LC3-II:LC3-I
SQSTM1

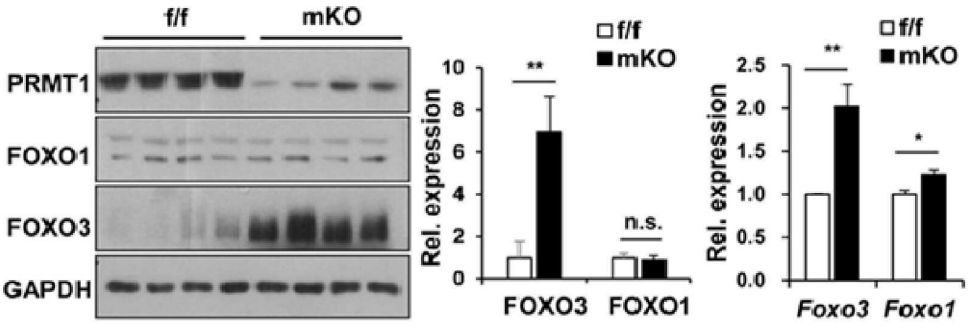
도면9


Con
Ad-Prmt1i
PRMT1
MHC
LC3-I
LC3-II
TRIM63
TUBB
LC3-II:LC3-I ratio
**
Ad-Prmt1i : - +
Control
Ad-Prmt1i
MHC
DAPI
Myotube diameter (mm)
***
Ad-Prmt1i : - +

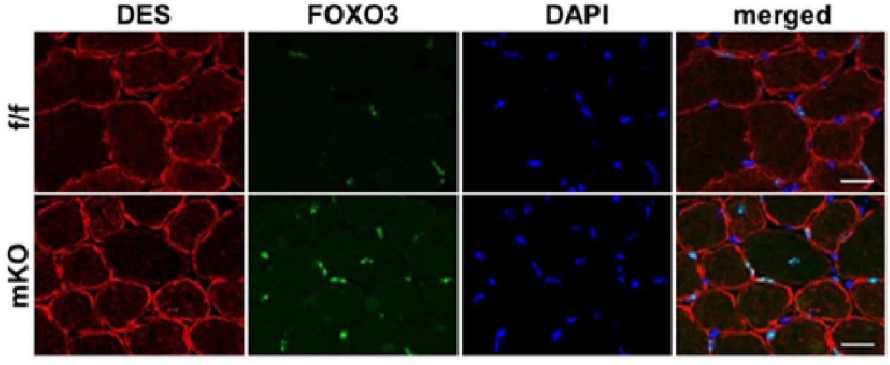
도면10



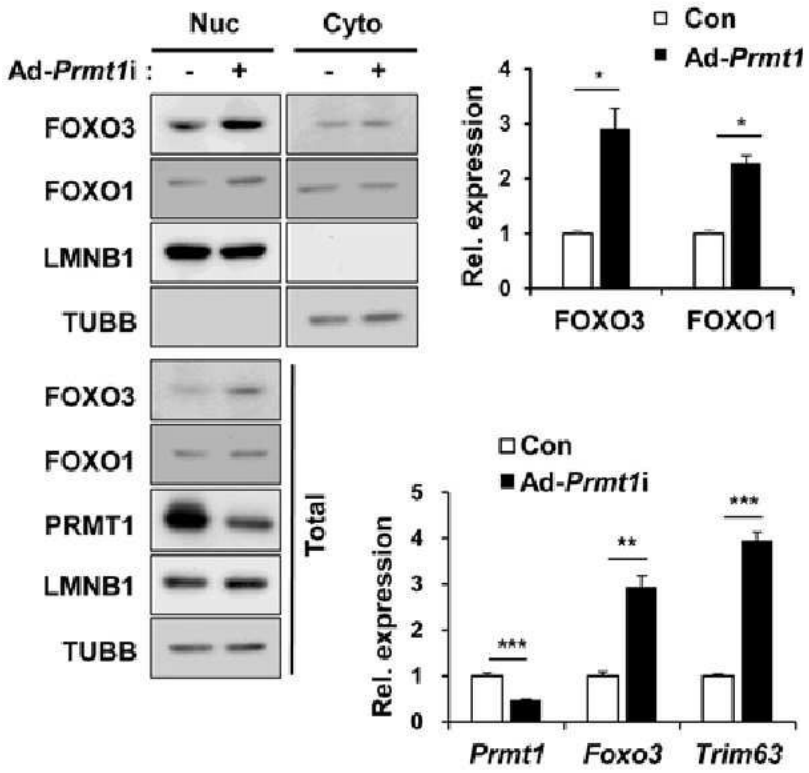
도면11



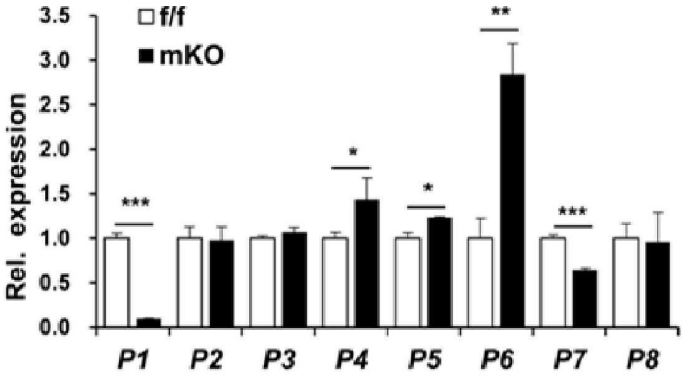
도면12



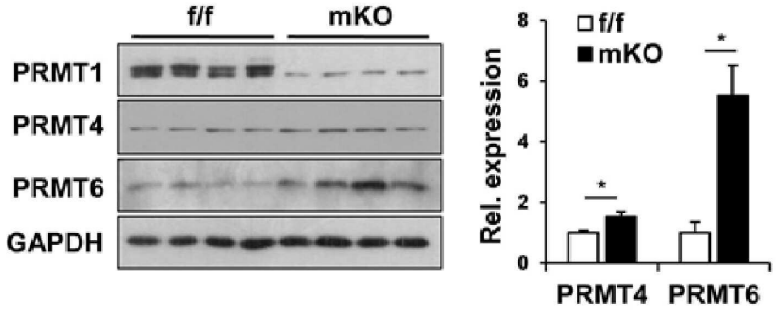
도면13



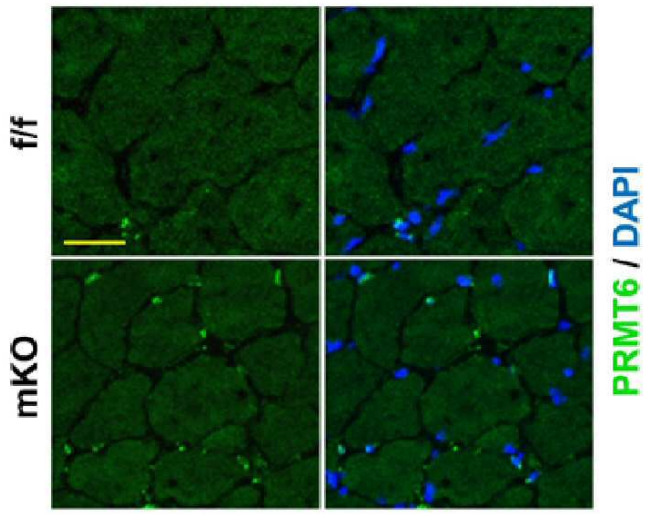
도면14



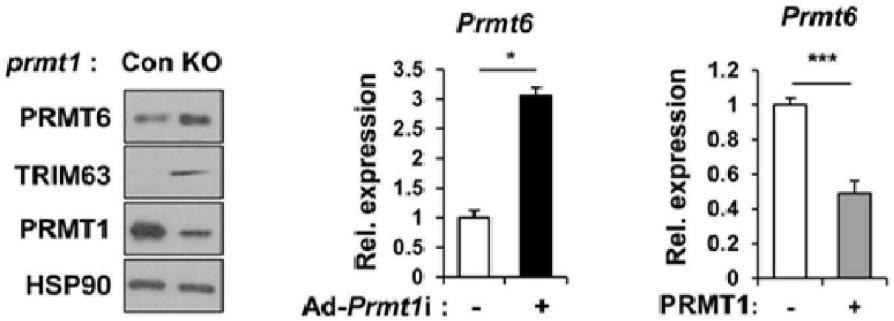
도면15



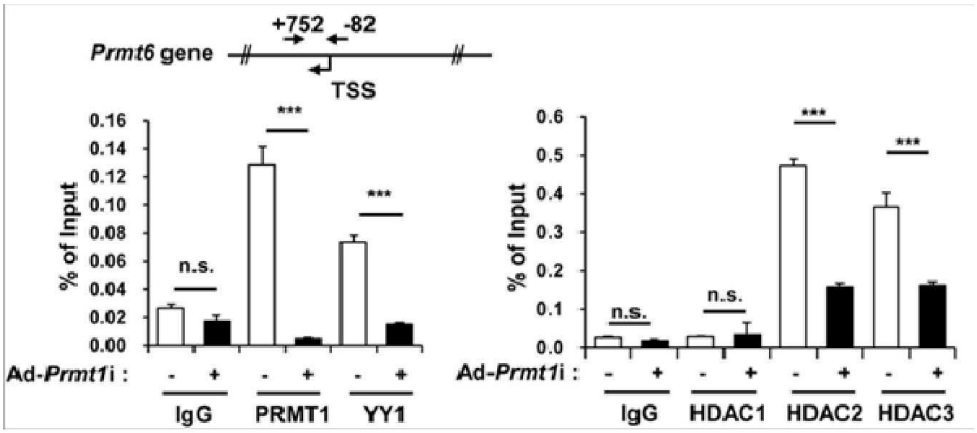
도면16



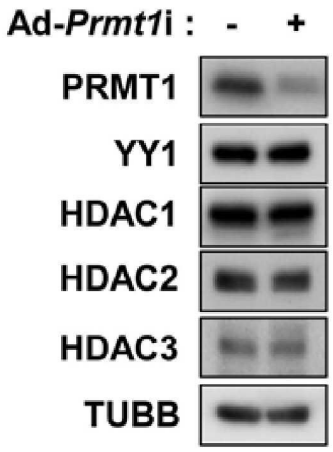
도면17



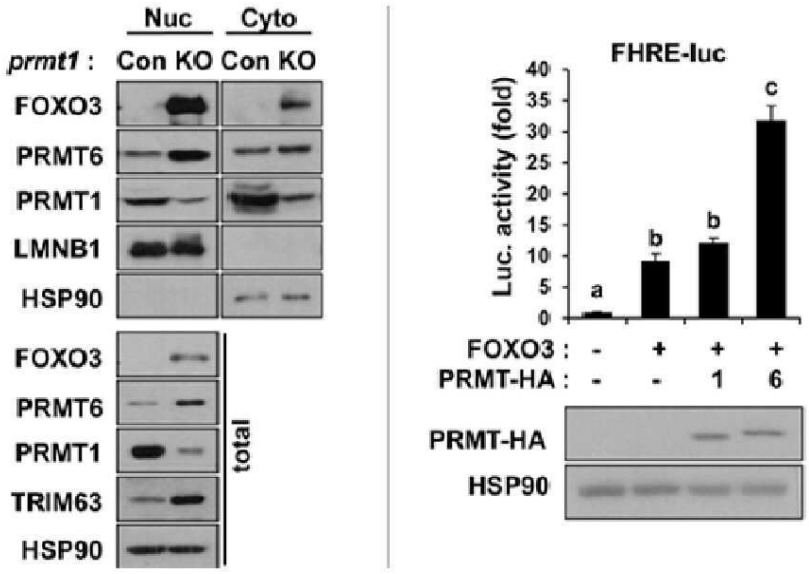
도면18



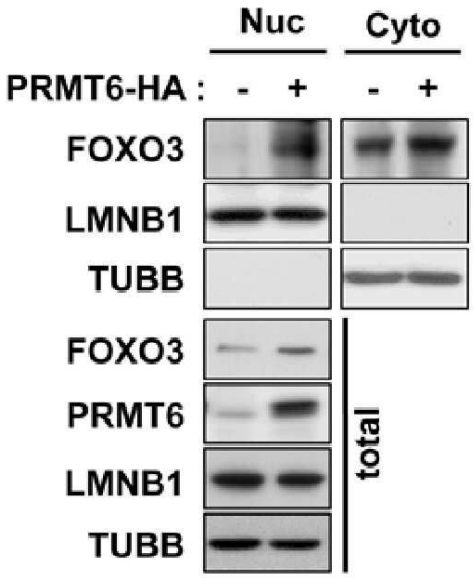
도면19


Ad-Prmt1i : - +
PRMT1
YY1
HDAC1
HDAC2
HDAC3
TUBB

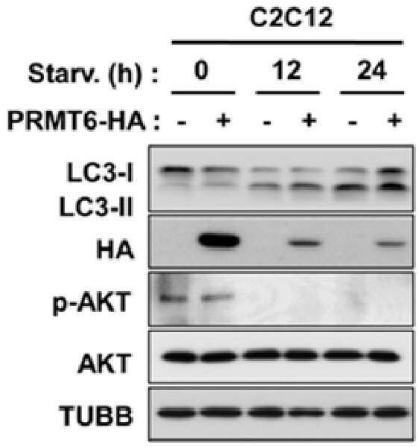
도면20


Nuc
Cyto
prmt1 : Con KO Con KO
FOXO3
PRMT6
PRMT1
LMNB1
HSP90
FOXO3
PRMT6
PRMT1
TRIM63
HSP90
total
FHRE-luc
Luc. activity (fold)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
a
b
b
c
FOXO3 : - + + +
PRMT-HA : - - 1 6
PRMT-HA
HSP90

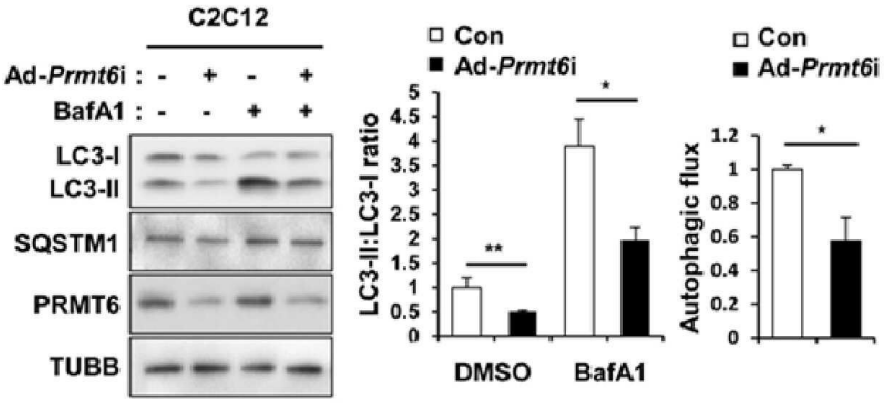
도면21



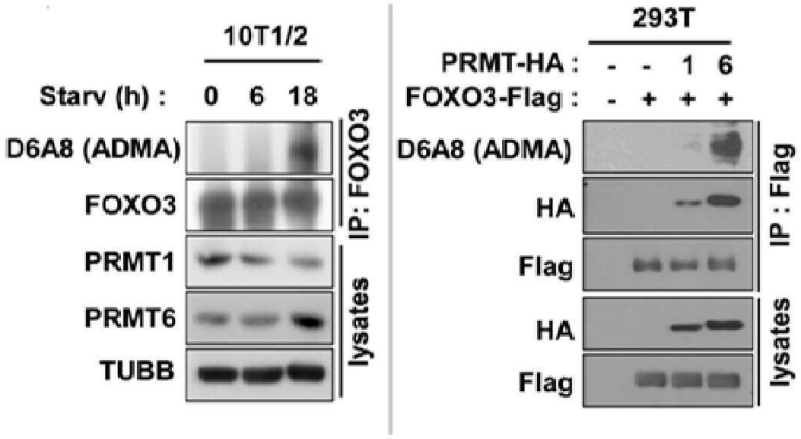
도면22



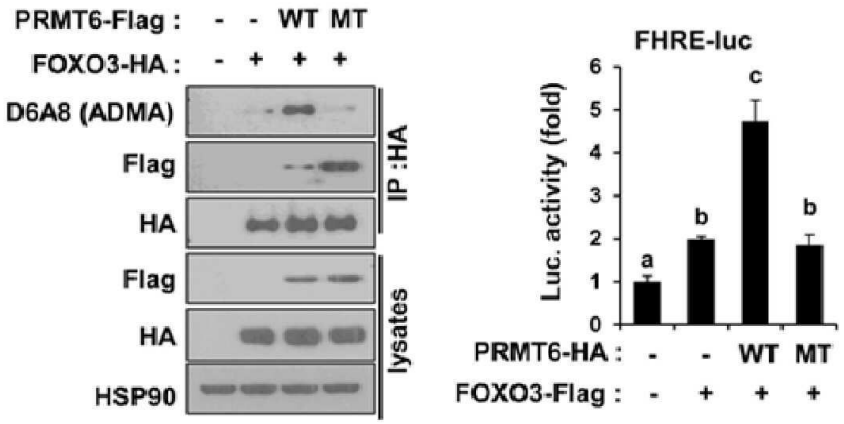
도면23



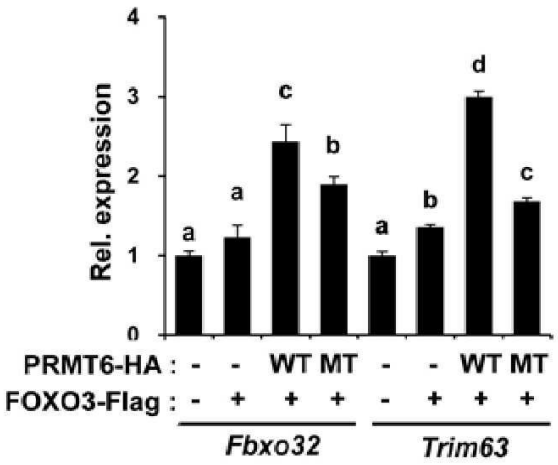
도면24



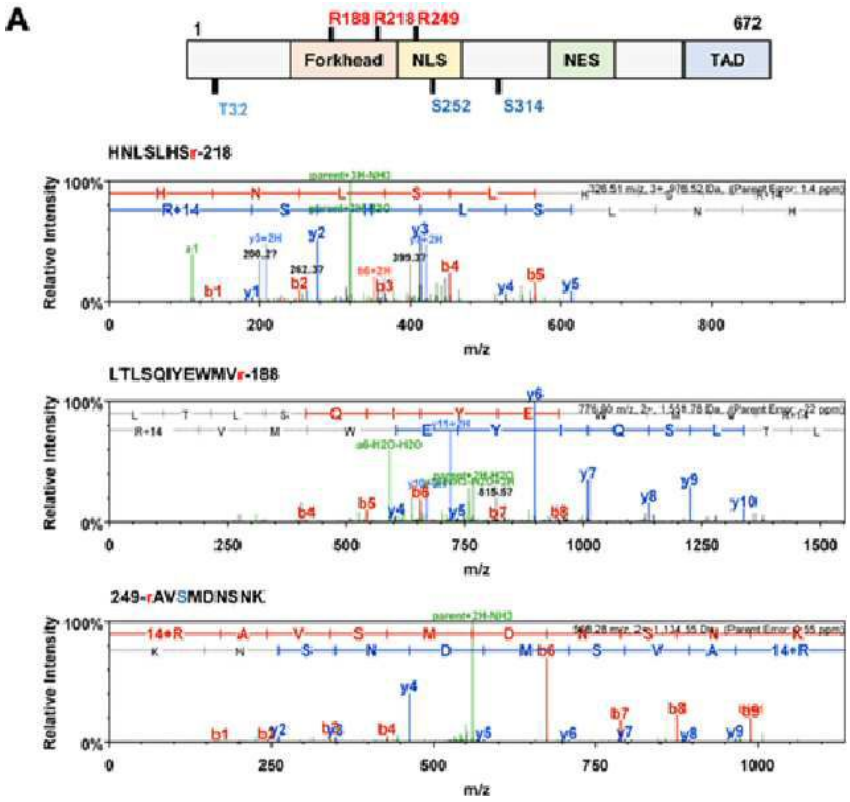
도면25



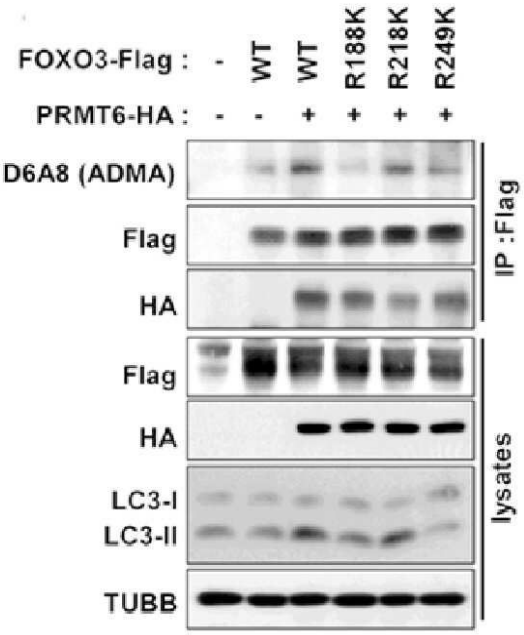
도면26



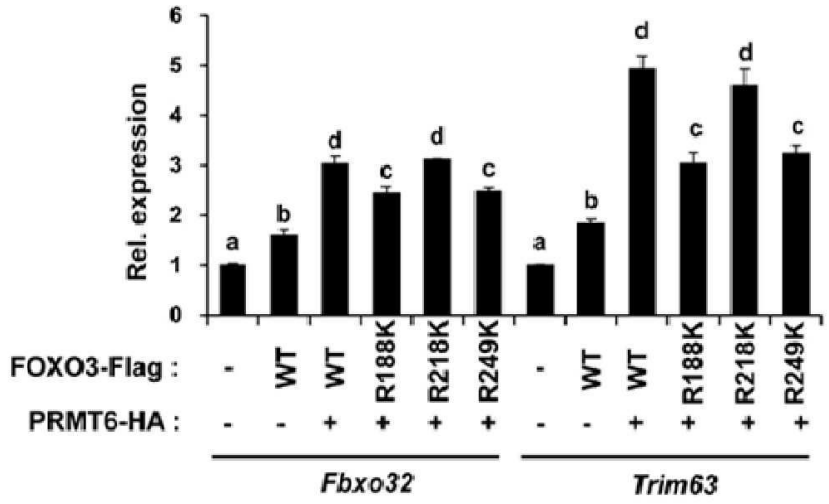
도면27


A
1
R189 R218 R249
672
Forkhead
NLS
NES
TAD
T32
S252
S314
HNLSLHSr-218
LTLSQIYEWMVr-188
249-rAVSMDNSNK
Relative Intensity
m/z

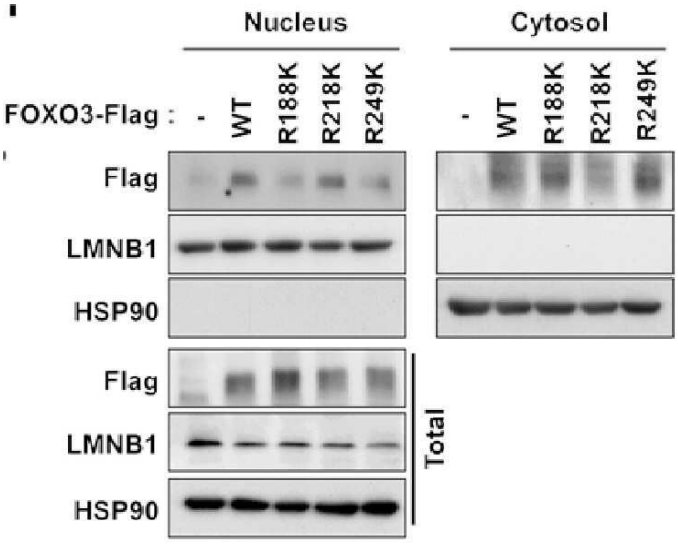
도면28


FOXO3-Flag : - WT WT R188K R218K R249K
PRMT6-HA : - - + + + +
D6A8 (ADMA)
Flag
HA
IP :Flag
Flag
HA
LC3-I
LC3-II
TUBB
lysates

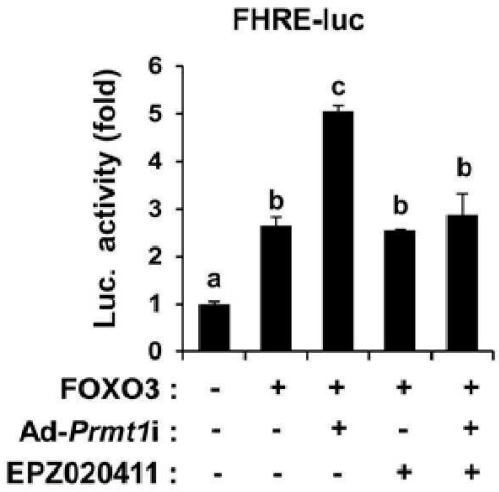
도면29



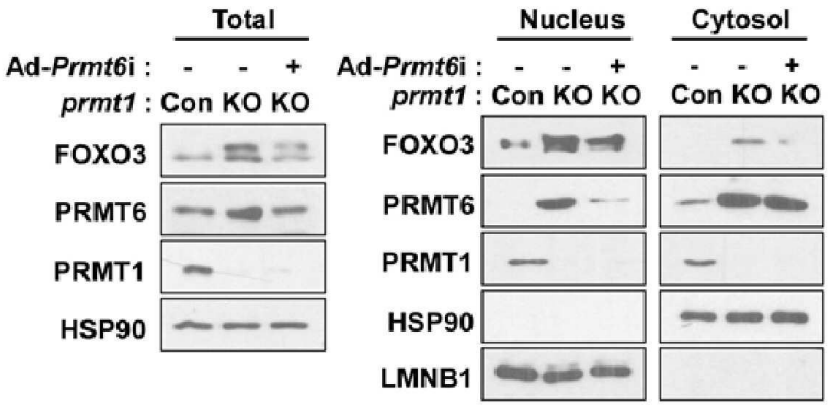
도면30



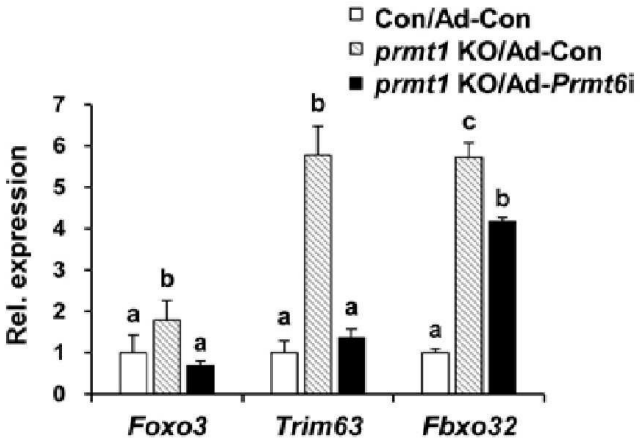
도면31



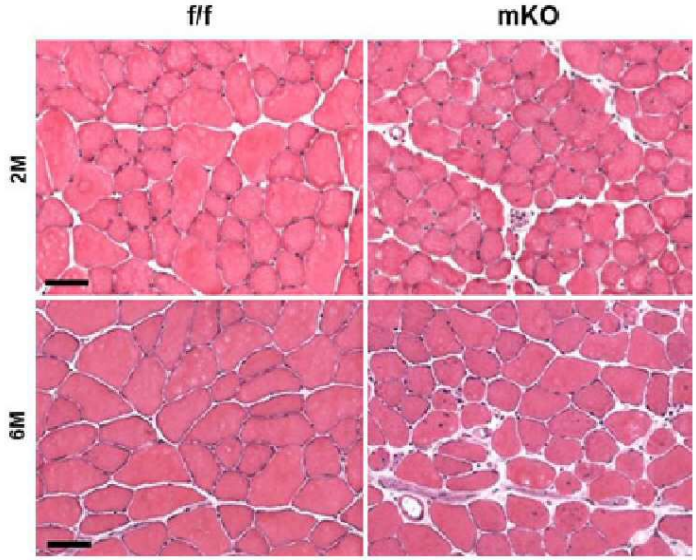
도면32



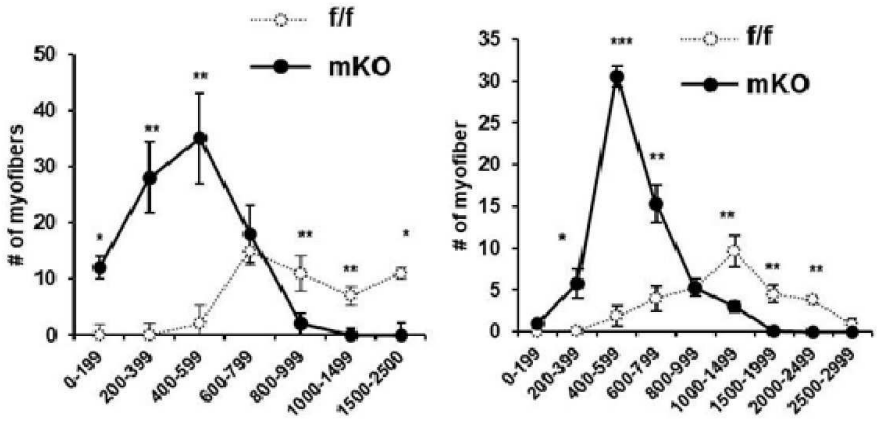
도면33



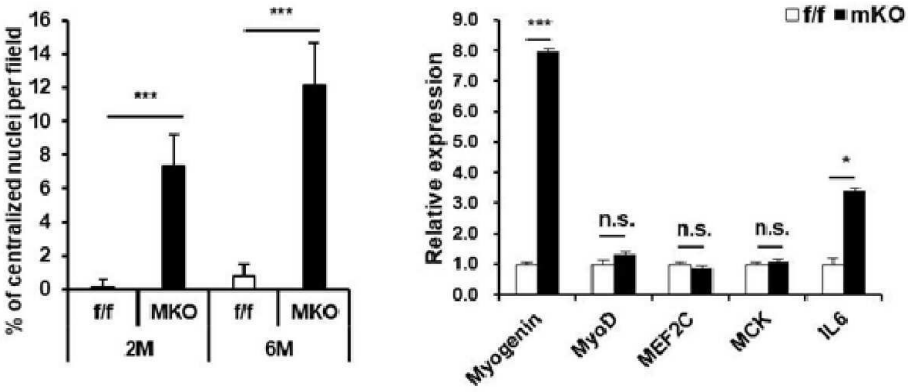
도면34



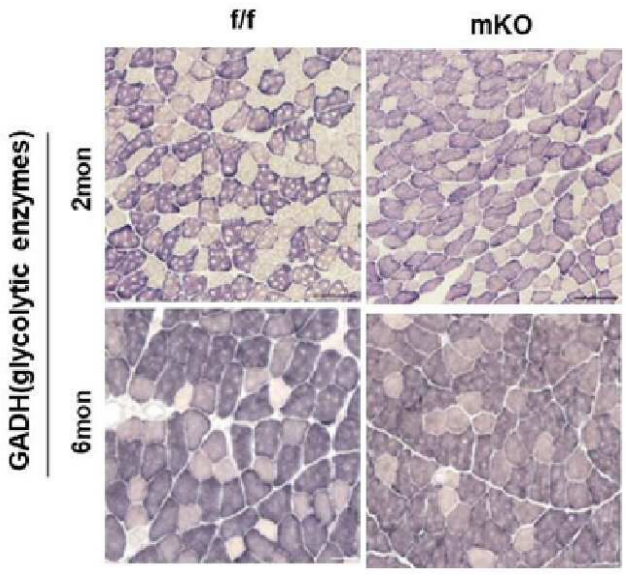
도면35



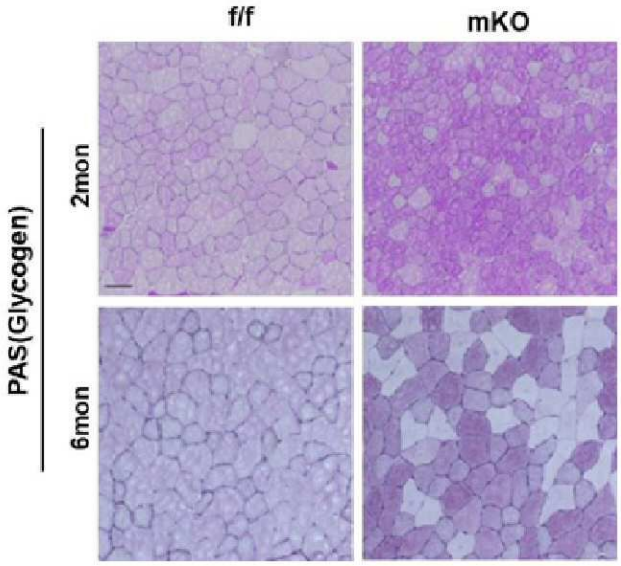
도면36



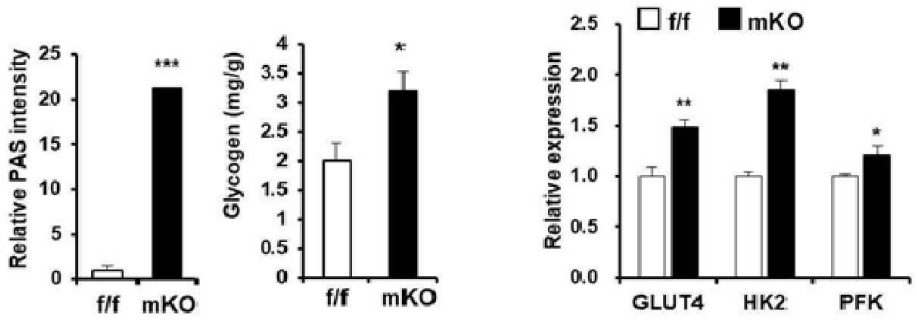
도면37



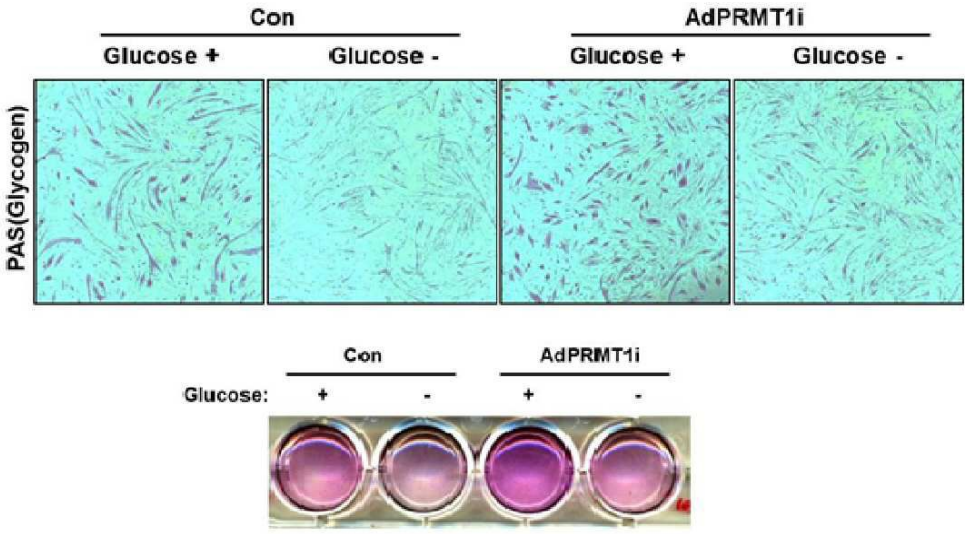
도면38



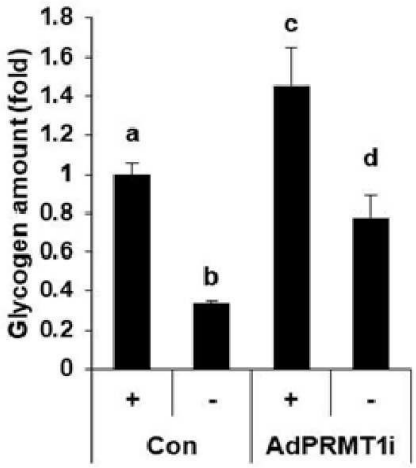
도면39



도면40



도면41


Glycogen amount (fold)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
a
b
c
d
+
-
+
-
Con
AdPRMT1i