



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0040438
(43) 공개일자 2017년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A23L 1/305* (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)

A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0139213

(22) 출원일자 2015년10월02일

심사청구일자 2015년10월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 노원구 중계4동 131번지

(74) 대리인

이처영, 장제환

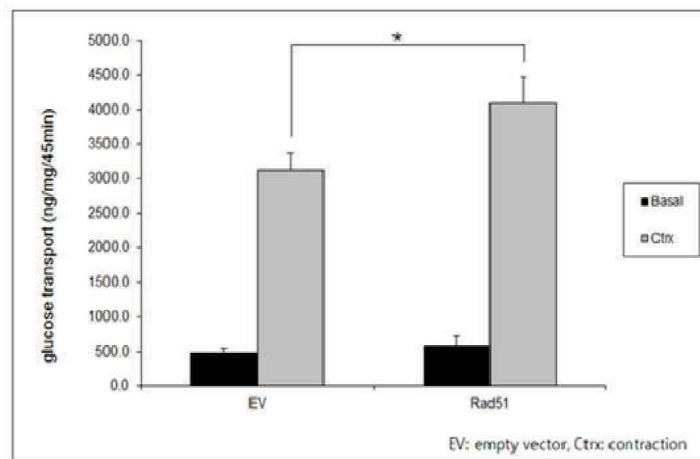
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 Rad51을 유효성분으로 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 Rad51을 유효성분으로 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 AMPK와 상호결합을 통하여 AMPK 활성 및 당 흡수(glucose uptake)를 증가시키는 Rad51을 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 Rad51은 AMPK와 상호결합을 통해 AMPK와 ACC의 인산화 촉진 및 근육의 당 흡수(glucose uptake) 증가 등의 우수한 항당뇨 및 항비만 효과를 나타내므로, 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료제로 매우 유용하다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 38/17 (2013.01)

G01N 33/5008 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015022000

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 신규 발굴된 AMPK 활성화인자 및 결합단백질의 혈당 및 암 세포사멸 제어 인자로서의 활용가능성 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

Rad51 단백질 또는 Rad51을 발현하는 전달체를 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AMPK 인산화가 필요한 대사질환은 당뇨, 비만, 고지혈증, 지방간 및 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Rad51은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 Rad51은 AMPK의 인산화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 AMPK의 인산화는 근육의 당 흡수(glucose uptake)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 AMPK의 인산화는 ACC의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 ACC의 인산화는 지방산 합성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

Rad51 단백질을 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 개선용 식품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 AMPK 인산화가 필요한 대사질환은 당뇨, 비만, 고지혈증, 지방간 및 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 Rad51은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법:

- (a) Rad51 단백질 또는 Rad51 유전자를 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 후보물질을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군의 Rad51의 활성 또는 Rad51 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및
- (c) 상기 실험군의 Rad51 활성 또는 Rad51 유전자 발현 수준이 대조군에 비해 증가한 경우의 후보물질을 AMPK 인산화가 저해되어 있는 대사질환의 예방 또는 치료제로 선별하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 AMPK 인산화가 필요한 대사질환은 당뇨, 비만, 고지혈증, 지방간 및 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 Rad51은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 Rad51을 유효성분으로 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 AMPK와 상호결합을 통하여 AMPK 활성 및 당 흡수(glucose uptake)를 증가시키는 Rad51을 함유하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 제2형 당뇨병은 체내로 흡수된 포도당을 제대로 이용하지 못하여 여러 합병증을 유발시켜 환자의 사망률에 영향을 주는 질병이다. 실제 임상에서는 당뇨병 치료의 가장 중요한 부분인 혈당 조절이 어려운 실정으로, 당뇨병 환자의 약 40%만이 당화혈색소 목표치인 7.0% 미만에 도달되어 있어 혈당관리를 위한 다각적 노력이 필요한 상태이다. 이러한 당뇨병을 치료하기 위해, 최근에는 인크레틴 호르몬 기반 치료제들이 널리 사용되고 있다.
- [0004] 인크레틴 호르몬은 음식을 섭취하면 소장에서 분비되는 호르몬으로, 췌장에서 인슐린이 분비되는 것을 도와 최근 들어 당뇨병 치료의 새로운 대안으로서 각광받고 있다. 인크레틴 호르몬을 이용한 당뇨병 치료의 가장 큰 장점은 인슐린 호르몬 치료의 맹점인 저혈당, 체중 증가 등의 부작용이 적고, 당뇨병으로 손상된 췌장의 베타세포도 재생되며, 특히 고령인 환자에도 비교적 안전하게 사용될 수 있다는 점이다. 대표적인 인크레틴 호르몬인 glucagon-like peptide-1(GLP-1)과 glucose dependent insulintropic polypeptide(GIP)은 영양소(nutrient)에 반응하여 장에서 생성되고 분비되는 것으로 알려져 있다. GLP-1과 GIP는 포도당 의존적인 방식으로 인슐린 분비의 증대 및 글루카곤 분비의 감소를 통해서 혈당을 낮추며, 또한 위배출(gastric emptying) 속도를 지연시키고, 포만감을 증가시켜 체중 증가에도 영향을 주지 않는 특징을 가지고 있다. 그러나, 두 호르몬 모두 dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)에 의하여 빠르게 분해되기 때문에 치료 목적으로 사용하기에 어렵다는 문제점이 있다.

- [0005] 이러한 문제점을 극복하기 위해, DPP-4 억제제 또는 DPP-4에 의해서 분해가 되지 않는 GLP-1 유사체(analogue)들이 개발되었다. DPP-4억제제는 영양소(nutrient)에 의한 active GLP-1의 분해를 억제하여 HbA1c를 최대 0.7% 정도 개선하며, GLP-1 유사체(analogue)는 HbA1c를 최대 1% 정도 개선하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 GLP-1 유사체(analogue)나 DPP-4 억제제는 그 효과가 낮거나 췌장염 또는 췌장암 등의 위험성이 보고되고 있어, 새로운 당뇨병 치료제 개발이 필요하다.
- [0006] 최근, 라일락의 약효 성분을 바탕으로 합성된 메트포르민(metformin)이나 로지글리타존(rosiglitazone) 등에 의한 혈당강하 효과와 AMPK 활성과의 관련성이 보고된 바 있다(Hawley *et al.*, *Diabetes* 51(8):2420-5, Ye JM *et al.*, *Diabetes* 55(10):2797-804, 2006).
- [0007] 한편, 인슐린-저항성 환자를 대상으로 하는 치료제 개발의 표적 단백질로 AMPK가 큰 주목을 받고 있다. AMPK(AMP-activated protein kinase)는 serine/threonine 키나아제(kinase)의 일원으로 골격 근, 심장과 간 등 대사성 장기에 주로 분포하고 있으며, 단백질의 활성화는 AMP 및 상방향 키나아제인 AMPK kinase(AMPKK)에 의한 인산화 과정을 통하여 일어난다. 또한, AMPK는 세포 내의 작은 AMP 농도 변화에도 민감하게 반응하는 에너지 센서로, 운동이나 저산소증, 허혈 등 세포 내 에너지가 부족한 상황에서 활성화되어 ATP를 소비하는 과정을 억제하고 ATP를 생성하는 과정을 활성화시킨다. 따라서, AMPK는 당뇨치료제 연구의 중요 표적 허브 단백질이다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 AMPK 활성 조절을 타겟으로 하는 새로운 제2형 당뇨병 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, Rad51 단백질이 근육조직에서 AMPK와 상호결합을 통하여 AMPK 발현 및/또는 활성 증가 및 AMPK에 의한 당 조절 능력을 강화시키므로 Rad51이 당 조절의 주요 도구로 사용될 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 Rad51 단백질 또는 Rad51을 발현하는 전달체를 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 Rad51 단백질을 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 개선용 식품을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 Rad51 단백질 또는 Rad51 유전자를 발현하는 세포에서 Rad51의 활성 또는 Rad51 유전자의 발현 측정을 통하여 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Rad51 단백질 또는 Rad51을 발현하는 전달체를 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, Rad51 단백질을 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, (a) Rad51 단백질 또는 Rad51 유전자를 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군의 Rad51의 활성 또는 Rad51 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 실험군의 Rad51 활성 또는 Rad51 유전자 발현 수준이 대조군에 비해 증가한 경우의 후보물질을 AMPK 인산화가 저해되어 있는 대사질환의 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 Rad51은 AMPK와 상호결합을 통해 AMPK와 ACC의 인산화 촉진 및 근육의 당 흡수(glucose

uptake) 증가 등의 우수한 항당뇨 및 항비만 효과를 나타내므로, 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료제로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 AMPK와 Rad51 단백질의 상호결합에 의한 당 흡수(glucose uptake) 조절을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 AMPKa2와 Rad51 단백질의 상호결합을 면역침전법으로 확인한 것이다.
- 도 3은 Rad51의 발현에 따른 AMPK의 인산화 증가를 확인한 것이다.
- 도 4는 Rad51의 발현 억제에 따른 AMPK의 인산화 감소를 확인한 것이다.
- 도 5는 Rad51의 발현에 따른 근육의 당 흡수(glucose uptake) 변화를 동물모델에서 확인한 것이다.
- 도 6은 Rad51의 지방산 합성 억제 기능을 확인한 것이다.
- 도 7은 Rad51에 의한 당 흡수(glucose uptake) 촉진을 인-비트로에서 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0023] 본 발명에서는, AMPK와 상호결합하여 AMPK의 활성을 조절하는 Rad51 단백질을 발굴하고, Rad51의 발현에 의한 AMPK, ACC의 인산화 증가 및 근육의 당 흡수(glucose uptake) 증가를 확인함으로써, Rad51의 당뇨 또는 비만의 치료 효과를 규명하였다.

[0024] 따라서, 본 발명은 일관점에서 Rad51 단백질 또는 Rad51을 발현하는 전달체를 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 AMPK 인산화가 필요한 대사질환은 당뇨, 비만, 고지혈증, 지방간 및 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 당뇨 또는 비만인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 Rad51은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명의 Rad51은 주로 DNA repair에 관여하며 암 관련 기전에서 역할을 하므로, 암 치료제 개발의 표적으로 알려져 있다. 그러나, 혈당 조절 등의 대사조절 기능에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 Rad51과 AMPK는 매우 강하게 상호결합하는 것을 특징으로 하며, Rad51은 AMPK의 인산화를 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 AMPK는 운동시 근육에서 활성화되는데, 그 발현양에는 변화가 없이 인산화만 증가되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 AMPK의 인산화는 근육의 당 흡수(glucose uptake)를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으며, ACC의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 ACC의 인산화는 지방산 합성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명의 ACC(acetyl-co A)는 지방산 합성에 관여하는 주요 효소로, Rad51이 ACC의 인산화를 조절하여 지방산 합성 억제를 유도하므로, Rad51이 항비만 기능으로도 활용될 수 있음을 의미한다.

[0034] 본 발명의 전달체는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포좀, 양이온성 고분자, 미셀(micelle), 에멀전, 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles) 등을 사용할 수 있다.

[0035] 바이러스성 벡터(viral vector)는 전달 효율이 높고 지속 시간이 긴 이점이 있다. 상기 바이러스성 벡터에는 레

트로바이러스 벡터(retroviral vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 백시니아바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 벡터(aden-associated viral vector), 암세포 용해성 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 알파 바이러스 벡터, EB 바이러스 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, 포오미 바이러스 벡터 등이 사용될 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.

- [0036] 비바이러스성 벡터(nonviral vector)는 플라즈미드를 포함할 수 있다. 그 외에도 리포솜, 양이온성 고분자, 미셀(micelle), 에멀전, 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles) 등의 다양한 제형이 사용될 수 있다.
- [0037] 리포솜의 형태로서는 양친매성 제제(amphipathic agent), 예를 들어 마이셀, 불용성 단일층, 액정, 또는 수용액에 존재하는 라멜라층으로 존재하는 지질과 조합된다. 리포솜 제형을 위한 지질은 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 설파타이드, 리소레스틴, 레시틴 인지질, 사포닌, 담즙산, 리포펙틴 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 또한, 핵산 전달을 위한 양이온성 고분자에는 키토산, 아텔로콜라겐(atelocollagen), 양이온성 폴리펩타이드(cationic polypeptide) 등과 같은 천연고분자와 poly(L-lysine), 선형 또는 분지형 PEI(polyethylene imine), 사이클로덱스트린계열 다가양이온(cyclodextrin-based polycation), 덴드리머(dendrimer) 등과 같은 합성고분자가 포함된다. 인공적으로 합성된 양이온성 지질은 DNA, 단백질을 등과 같이 음전하를 띠는 생체 분자와 복합체를 형성하여 이들 분자들이 세포내로 전달되게 한다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에서는, Rad51의 siRNA를 이용하여 Rad51을 녹다운시켜, Rad51의 발현억제에 의한 AMPK 및 ACC의 인산화 감소를 확인하였다. 즉, AMPK 및 ACC 활성을 조절할 수 있는 Rad51의 역할을 명확히 규명하였다.
- [0040] 본 발명의 Rad51을 함유하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0041] 본 발명의 Rad51을 함유하는 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 환제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수용액제, 현탁액, 동결 건조제 및 좌제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0042] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.001~100 mg/kg으로 바람직하게는 0.01~10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 경구 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 조성물은 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명은 다른 관점에서, Rad51 단백질을 유효성분으로 함유하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 상기 AMPK 인산화가 필요한 대사질환은 당뇨, 비만, 고지혈증, 지방간 및 고혈압으로 구성된

군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 당뇨 또는 비만인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 Rad51은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0048] 본 발명의 식품은, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 Rad51을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 Rad51을 첨가하여 제조할 수 있다.

[0049] 상기 건강 기능식품 또한, 식품조성물로서 기능성 식품, 영양보조제, 건강식품, 식품 첨가제 등의 다양한 형태를 포함하는 것이며, 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태, 예컨대, 앞서 언급한 Rad51을 차, 주스, 드링크의 형태로 제조하거나, 과립화, 캡슐화, 분말화 하거나, 이러한 화합물 또는 추출물을 음료, 과일 및 가공식품, 어유, 육류 및 그 가공식품, 빵류, 면류, 조미료 등 각종 식품에 첨가하여 제조함으로써 제공될 수 있다.

[0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, Rad51을 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, Rad51을 유효성분으로 함유하는 조성물을 당뇨 또는 비만의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.

[0052] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) Rad51 단백질 또는 Rad51 유전자를 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군의 Rad51의 활성 또는 Rad51 유전자의 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및 (c) 상기 실험군의 Rad51 활성 또는 Rad51 유전자 발현 수준이 대조군에 비해 증가한 경우의 후보물질을 AMPK 인산화가 저해되어 있는 대사질환의 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 AMPK 인산화가 필요한 대사질환의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 Rad51의 활성 또는 Rad51 유전자의 발현을 측정하는 방법은 mRNA 또는 단백질의 양을 측정하는 방법이라면 한정되지 않는다.

[0054] 단백질의 발현 정도 및 활성 정도는 웨스턴 블롯(Western Blot), RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅 (Northern blotting), DNA 칩, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석방법, 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony), 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩 (protein chip)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0056] [실시예]

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0059] 실시예 1: AMPKa2와 Rad51과의 단백질 상호결합

[0060] 본 실시예에서는 AMPKa2와 Rad51과의 단백질 결합을 확인하였다.

[0061] HEK293 세포주(ATCC: American Type Culture Collection, 미국)에 flag-AMPKa2 및 GFP-Rad51을 48시간 발현시킨 후, flag 항체로 면역침전복합체를 취하였다. 그 다음, GFP 항체(Sigma) 및 flag 항체(Sigma)로 웨스턴 블

롯을 실시하여, GFP 항체로 Rad51 시그널을 확인하였다.

[0062] 그 결과, Rad51의 높은 발현을 확인할 수 있었으며(도 2A), 이는 AMPK와 Rad51이 세포 내에서 강하게 상호결합하고 있음을 보여주는 결과이다.

[0063] 또한, HEK293 세포주에 GFP-AMPKa2 및 flag-Rad51을 48시간 발현시킨 후, flag 항체로 면역침전복합체를 취하였다. 그 다음, GFP 및 flag 항체로 웨스턴 블롯을 실시하여, GFP 항체로 AMPKa2 시그널을 확인하였다.

[0064] 그 결과, AMPKa2의 높은 발현을 확인할 수 있었으며(도 2B), 이는 AMPKa2와 Rad51이 세포 내에서 강하게 상호결합하고 있음을 보여주는 결과이다.

[0066] 실시예 2: Rad51 발현과 AMPK 인산화

[0067] 본 실시예에서는 Rad51과 AMPK의 상호결합에 의한 AMPK 인산화 증가를 확인하였다.

[0068] HEK293 세포주에 GFP-Rad51을 48시간 발현시킨 후, AMP 유사체로서 AMPK 인산화를 증가시키는 AMPK 활성화자인 AICAR(Santa Cruze) 2mM을 1시간 동안 처리하였다.

[0069] 그 결과, AMPK 및 AMPK에 의해 인산화가 촉진되면 지방산 합성을 억제하는 기능을 하는 AMPK 하위 물질인 ACC(Acetyl-Co A)의 인산화 증가를 확인할 수 있었다(도 3A).

[0070] 또한, HEK293 세포주에 GFP-AMPKa2 및 flag-Rad51을 48시간 발현시킨 후, AMPK 활성화자인 AICAR 2mM을 1시간 동안 처리하였다.

[0071] 그 결과, 동일하게 AMPK 및 그 하위 물질인 ACC의 인산화 증가를 확인할 수 있었다(도 3B).

[0072] 마지막으로, C2C12 세포에 GFP-Rad51을 발현시킨 후, AMPK 활성화자인 AICAR 2mM을 1시간 동안 처리하였다.

[0073] 그 결과, AMPK 하위 물질인 ACC의 인산화가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 2C). 즉, Rad51이 발현된 조건에서 AICAR를 처리하면 ACC의 인산화가 가장 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 3C).

[0074] 이러한 결과는, Rad51의 세포 내 발현이 AMPK의 인산화를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0076] 실시예 3: Rad51의 억다운에 의한 AMPK 인산화 감소

[0077] 본 실시예에서는 Rad51의 발현억제에 의한 AMPK 인산화 감소를 확인하였다.

[0078] Rad51 siRNA 20nM, 40nM, 80nM(Dharmacon L-062730-00-0005: mouse)를 근육세포주 C2C12(ATCC, 미국)에 transfection 시킨 후 2일간 배양하여, Rad51을 억다운 시켰다.

[0079] 그 결과, Rad51을 억다운에 의해 Rad51의 발현이 감소하였으며, AMPK 및 그 하위 물질인 ACC의 인산화가 감소하는 것도 확인할 수 있었다. 대조군인 non-target siRNA(바이오니아)에 의해서는 Rad51의 발현 및 AMPK와 ACC의 인산화 정도가 변화가 없었으나, 80 nM siRNA를 처리한 실험군에서는 Rad51의 발현 감소 및 AMPK와 ACC의 인산화가 뚜렷하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0081] 실시예 4: Rad51 발현에 의한 근육의 당 흡수(glucose uptake) 증가

[0082] 본 실시예에서는 동물모델에서 Rad51의 과발현에 의한 당조절을 확인하였다.

[0083] 동물수준에서 Rad51의 기능을 검증하기 위해, Rad51 1mg을 ICR 생쥐(오리엔트 바이오) 앞다리 근육(tibialis anterior)에 직접 발현시킨 후, 당 흡수(glucose uptake)의 변화를 관찰하였다.

[0084] 그 결과, empty vector를 발현시킨 대조군에서는 근육 수축을 하면 basal 상태보다 당 흡수가 증가하는 정상적인 패턴을 나타냈다. 그러나, Rad51을 7일 동안 발현시킨 후 근육수축을 하면 대조군보다 더 강하게 당 흡수가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 이는, Rad51의 발현으로 AMPK 인산화가 증가되는 인-비트로(*in vitro*) 결과가 실제 인-비보(*in vivo*)에서도 의미있게 당을 조절할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0086] **실시예 5: Rad51에 의한 지방산 합성 억제**

[0087] 본 실시예에서는 Rad51의 과발현에 의한 지방산 합성 억제를 확인하였다.

[0088] Rad51을 지방세포주 3T3-L1(ATCC, 미국)에 과발현시킨 후, 지방세포주의 분화를 유도하여 ACC 인산화(도 6A) 및 지방(도 6B)을 직접 관찰하였다.

[0089] ACC(acetyl-CoA carboxylase)의 인산화는 지방 합성 억제를 유발하는 중요한 과정이므로, 지방세포주의 분화에 의해 유도되는 지방산 합성을 ACC의 인산화를 통해 확인하였다. Rad51을 지방세포주에 과발현시키고 지방세포주의 분화를 유도한 다음 세포질 단백질을 취하여, 웨스턴 블롯으로 ACC 인산화를 확인하였다.

[0090] 그 결과, 지방세포주의 분화를 유도하면 ACC의 인산화가 감소되고, Rad51을 과발현시킨 후 분화를 유도하면 ACC의 인산화가 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 6A). 이는, 지방세포주의 분화가 유도되면 지방산의 합성이 증가하지만, Rad51에 의해 지방세포주의 분화과정에서 일어나는 지방산의 합성이 억제되는 것을 의미한다.

[0091] 다음으로, 지방세포주의 분화에 의한 지방 합성을 세포염색을 통하여 확인하였다. Rad51을 지방세포주에 과발현시키고 지방세포주의 분화를 유도한 다음 48시간 후에 Oil-Red O 염색으로 지방을 관찰하였다.

[0092] 그 결과, 지방세포주의 분화에 의해 대량 합성된 지방을 관찰할 수 있는 반면, Rad51을 과발현시킨 상태에서 분화를 유도하면 지방 합성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 6B). 즉, Rad51에 의해 지방 합성이 억제되는 것을 알 수 있었다.

[0094] **실시예 6: Rad51에 의한 인-비트로에서의 당 흡수(glucose uptake) 촉진**

[0095] 본 실시예에서는 Rad51의 당조절 능력을 인-비트로(*in vitro*)에서 검증하였다.

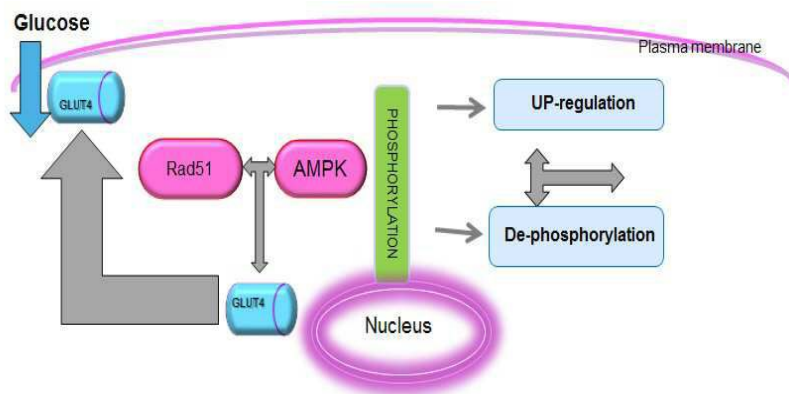
[0096] 근육세포주 L6(ATCC, 미국)에 Rad51 유전자를 과발현 또는 녹다운시킨 후 5mM 메트포르민(metformin)을 처리하여, Rad51에 의해 당 흡수(glucose uptake)가 조절되는지 관찰하였다. Rad51 유전자의 녹다운은 Rad51 siRNA(Dharmacon L-062730-00-0005: mouse)를 이용하였으며, 당 흡수(glucose uptake)는 동위원소 라벨된 H³-glucose를 이용하여 측정하였다.

[0097] 그 결과, Rad51 유전자를 과발현시킨 조건에서는 메트포르민(metformin)에 의해 당 흡수(glucose uptake)가 유의하게 증가하였으며(도 7A), Rad51 siRNA를 이용하여 Rad51을 녹다운시킨 조건에서는 메트포르민(metformin)에 의한 당 흡수(glucose uptake) 증가가 억제(도 7B)되는 것을 확인하였다. 이는, Rad51의 발현이 당 흡수(glucose uptake) 조절에 중요한 매개체로 관여하고 있음을 나타낸다.

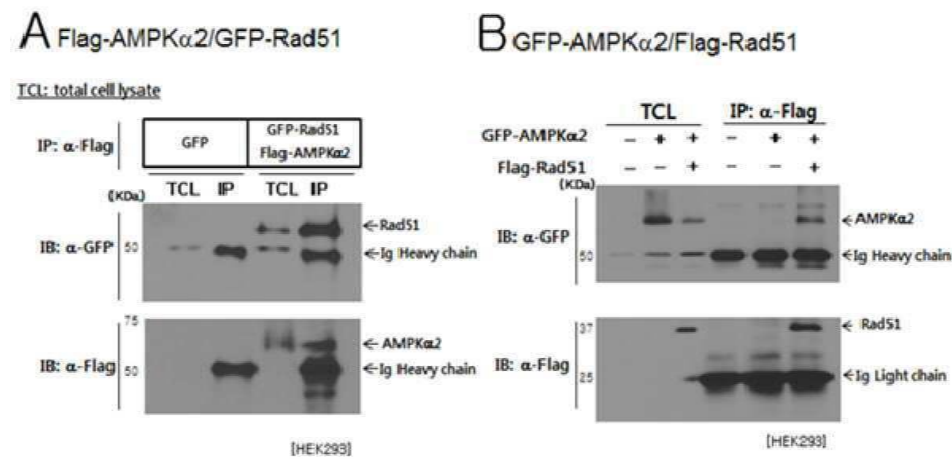
[0099] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

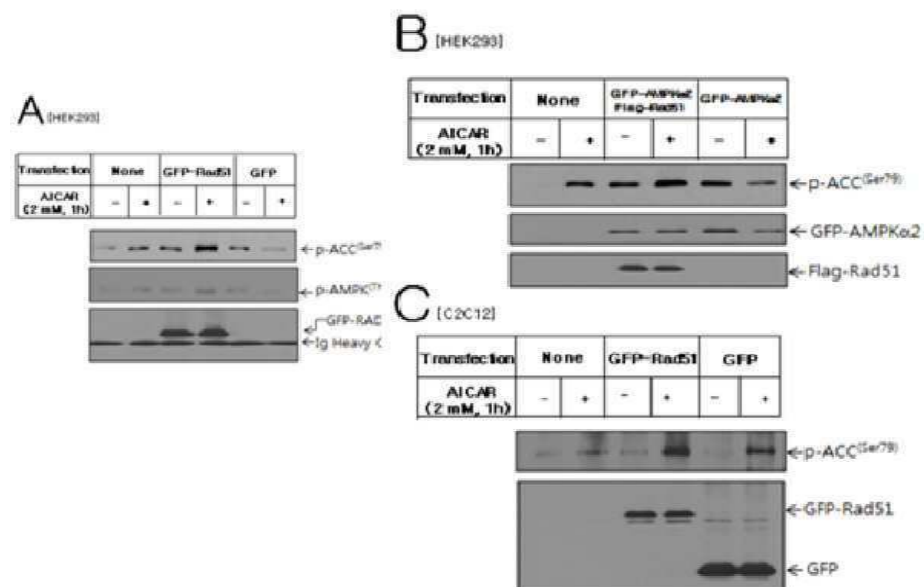
도면1



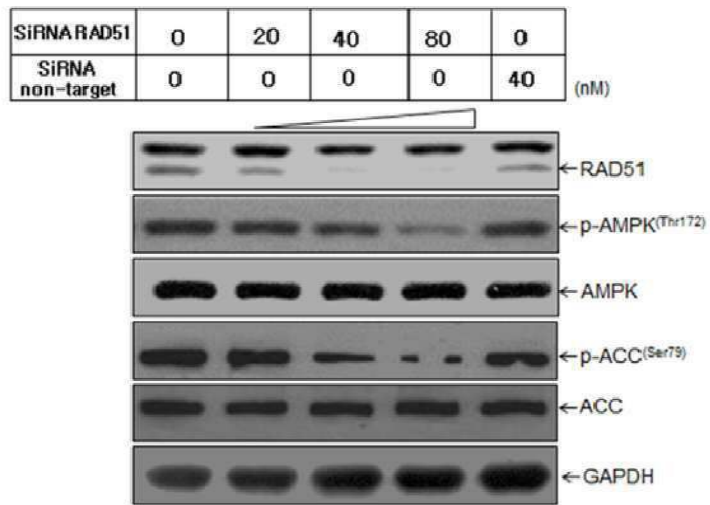
도면2



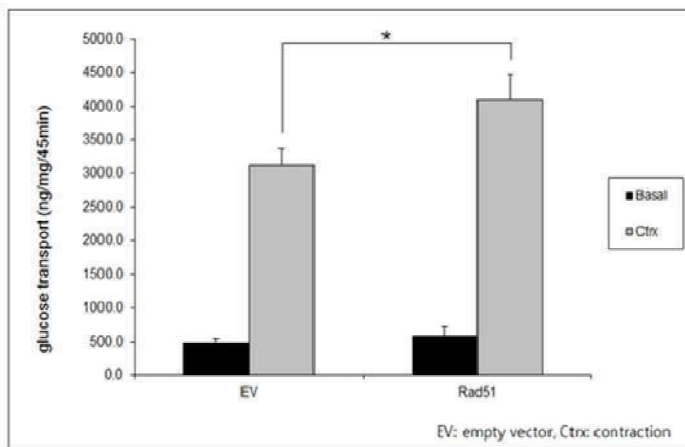
도면3



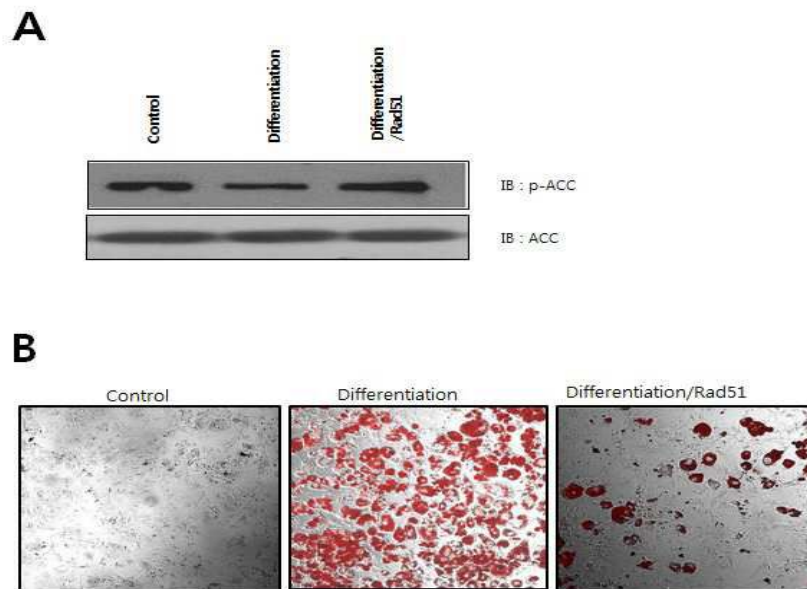
도면4



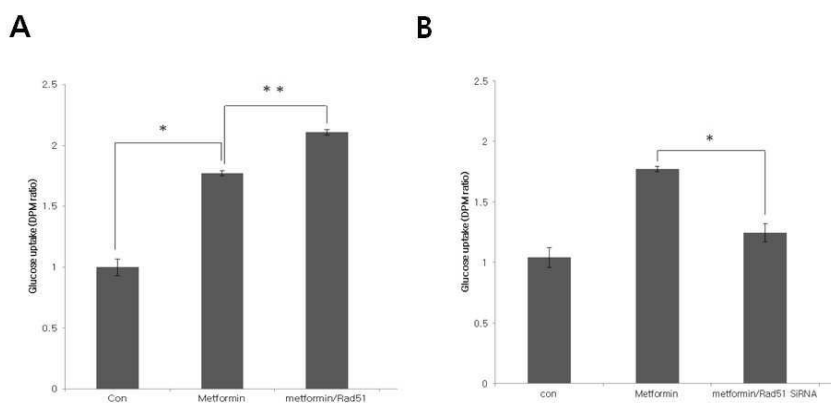
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for preventing or treating of diabetes or obesity containing Rad51
- <130> P15-B219
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 339
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 1

Met Ala Met Gln Met Gln Leu Glu Ala Ser Ala Asp Thr Ser Val Glu
1 5 10 15
Glu Glu Ser Phe Gly Pro Gln Pro Ile Ser Arg Leu Glu Gln Cys Gly
20 25 30
Ile Asn Ala Asn Asp Val Lys Lys Leu Glu Glu Ala Gly Tyr His Thr
35 40 45
Val Glu Ala Val Ala Tyr Ala Pro Lys Lys Glu Leu Ile Asn Ile Lys
50 55 60
Gly Ile Ser Glu Ala Lys Ala Asp Lys Ile Leu Thr Glu Ala Ala Lys
65 70 75 80
Leu Val Pro Met Gly Phe Thr Thr Ala Thr Glu Phe His Gln Arg Arg
85 90 95
Ser Glu Ile Ile Gln Ile Thr Thr Gly Ser Lys Glu Leu Asp Lys Leu
100 105 110
Leu Gln Gly Gly Ile Glu Thr Gly Ser Ile Thr Glu Met Phe Gly Glu
115 120 125
Phe Arg Thr Gly Lys Thr Gln Ile Cys His Thr Leu Ala Val Thr Cys
130 135 140
Gln Leu Pro Ile Asp Arg Gly Gly Gly Glu Gly Lys Ala Met Tyr Ile
145 150 155 160
Asp Thr Glu Gly Thr Phe Arg Pro Glu Arg Leu Leu Ala Val Ala Glu
165 170 175
Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Ser Asp Val Leu Asp Asn Val Ala Tyr Ala
180 185 190
Arg Gly Phe Asn Thr Asp His Gln Thr Gln Leu Leu Tyr Gln Ala Ser
195 200 205
Ala Met Met Val Glu Ser Arg Tyr Ala Leu Leu Ile Val Asp Ser Ala
210 215 220
Thr Ala Leu Tyr Arg Thr Asp Tyr Ser Gly Arg Gly Glu Leu Ser Ala
225 230 235 240
Arg Gln Met His Leu Ala Arg Phe Leu Arg Met Leu Leu Arg Leu Ala

245	250	255
Asp Glu Phe Gly Val Ala Val Val Ile Thr Asn Gln Val Val Ala Gln		
260	265	270
Val Asp Gly Ala Ala Met Phe Ala Ala Asp Pro Lys Lys Pro Ile Gly		
275	280	285
Gly Asn Ile Ile Ala His Ala Ser Thr Thr Arg Leu Tyr Leu Arg Lys		
290	295	300
Gly Arg Gly Glu Thr Arg Ile Cys Lys Ile Tyr Asp Ser Pro Cys Leu		
305	310	315
		320
Pro Glu Ala Glu Ala Met Phe Ala Ile Asn Ala Asp Gly Val Gly Asp		
325	330	335
Ala Lys Asp		