



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월26일
(11) 등록번호 10-2049199
(24) 등록일자 2019년11월20일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>G01N 33/6896</i> (2013.01)
<i>G01N 2500/04</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0059724</p> <p>(22) 출원일자 2019년05월21일
심사청구일자 2019년05월21일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
W01996040864 A1
PNAS, 1995, Vol. 92, pp 11894-11898.
FAF1 억제제에 의한 파킨슨질환 생쥐의 도파민 신경세포 보호 효과, 석사학위논문, 2012</p> | <p>(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
김은희
대전광역시 유성구 엑스포로 339번길 320 싸이언스빌 8동 201호</p> <p>(74) 대리인
이원희</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 7 항

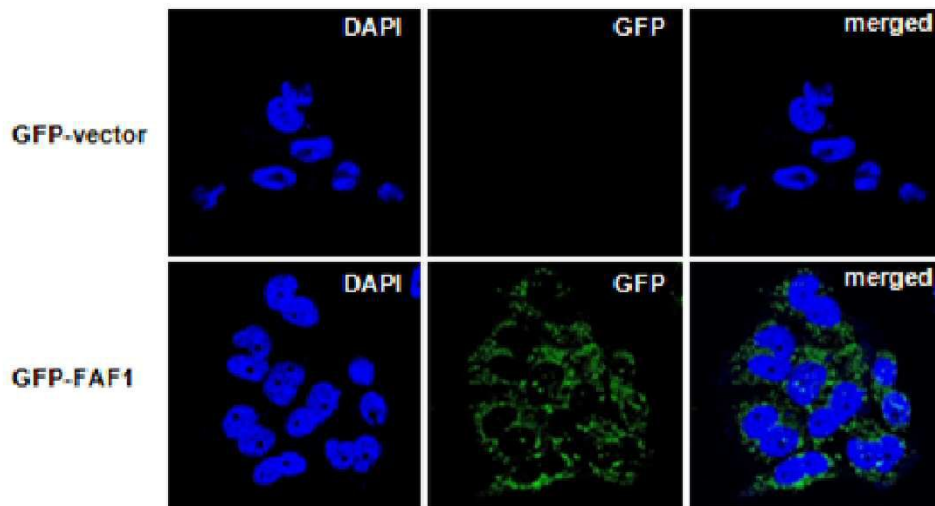
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 퇴행성 뇌질환 치료용 후보약물의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명에서는 신경세포사멸을 유도하는 것으로 보고된 FAF1 단백질이 일반적인 단백질 수송 경로가 아닌 엑소솜에 포함된 형태로 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 분비되어, 다른 세포에 세포 사멸(apoptosis)을 유도할 수 있음을 확인한 바, FAF1 단백질의 세포의 분비를 억제할 수 있는 피검물질을 선별하는 과정을 통해 신경세포사멸이 주요한 원인인 퇴행성 뇌질환의 치료제를 스크리닝 할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C0947

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 치매의 초기 진단 및 약물치료 효과 평가를 위한 신경염증 및 알파-시누클레인 표적 PET
영상기술 개발과 임상적용 연구

기 여 율 1/1

주관기관 분당서울대학교병원

연구기간 2016.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) FAF1(Fas-associated factor 1) 단백질을 발현하는 세포에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 세포에서 FAF1 단백질의 세포외 분비량을 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 FAF1 단백질의 세포외 분비량이 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병(Parkinson's disease)인 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액 또는 동물 조직 추출액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 FAF1 단백질은 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 세포외로 분비되는 것인 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 FAF1 단백질은 엑소좀(exosome)을 통해 세포외로 분비되는 것인 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 6

제 4항 또는 5항에 있어서, 세포외로 분비된 FAF1 단백질은 다른 세포에 세포 사멸(apoptosis)을 유도하는 것인 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 분비량은 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 면역침강법(immunoprecipitation assay), 이중 루시페라제 측정법(dual luciferase reporter assay), 효소면역분석법(ELISA) 및 면역조직화학법으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것인 FAF1이 과발현된 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 FAF1 단백질이 발현된 세포에서 FAF1 단백질의 세포 외 분비를 억제하는 물질을 스크리닝 하여, 퇴행성 뇌질환의 치료제를 개발하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 퇴행성 뇌질환은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서도 뇌에 발생하는 질환으로, 알츠하이머 병, 파킨슨병, 뇌졸중, 헌팅턴 병 및 척수 손상 등이 있으며, 지난 20년 사이 신경 퇴행성 질환 환자가 급증하고 있다. 퇴행성 뇌질환은 현재까지 뚜렷한 원인 및 치료법에 대한 연구가 부족한 상황으로 예방이 가장 중요하다. 퇴행성 뇌질환의 공통된 병리 현상은 중추신경세포의 사멸이다. 다른 기관의 세포들과는 달리 중추신경세포들은 일단 세포 사멸이 일어나면 재생이 거의 불가능하고 이에 따라 영구적인 기능 손실이 불가피하다. 지금까지 이러한 퇴행성 뇌질환에 대한 치료법은 신경세포 자체의 사멸 기전 분석과 이에 근거한 세포 사멸을 억제하는 것에 초점을 맞춰 개발되어 왔다.

[0004] 파킨슨병은 중뇌에 존재하는 흑질(substantia nigra), 선조체(corpus striatum)에서 도파민 신경세포의 사멸로 인한 도파민(dopamine) 결핍으로 유발되는 중추신경계 퇴행성 뇌질환으로, 도파민 신경 세포의 선별적인 사멸에 대한 정확한 원인이 현재까지 밝혀지지 않아, 효과적인 치료제 및 진단 시약의 개발이 미흡한 상태이다. 파킨슨병은 무표정한 얼굴, 경직(rigidity), 손떨림(tremor), 굽은 자세, 운동완서(bradykinesia)와 같은 운동기능과 관련된 증상을 나타낸다. 한국의 파킨슨병(Parkinson's disease, PD) 환자는 2010년 기준 6만 1,565명이었으며 연평균 8.7%의 비율로 증가하여 2014년에는 8만 5,888명이었고, 2014년에는 60세 이상 환자 비율이 95.7%였다. 유병율은 환자의 나이와 상관관계를 보였으며 성비율의 경우 남성이 3만 3,831명이고 여성은 5만 2,057명을 나타내었다.

[0005] Fas (일명, Fas receptor, CD95, Apo1 또는 TNFRSF6)는 세포사멸 수용체 중 하나로, Fas 및 Fas 리간드 (Fas L)는 세포 사멸에 중요한 역할을 한다. Fas 리간드 3개가 Fas 분자 3개에 결합하면 FADD (Fas-associated death domain)라 불리는 어댑터 (adaptor) 단백질이 Fas의 DD(death domain)에 결합한다. 그 후, FADD의 DED(Death effector domain)에 비활성 caspase-8 (일명, FLICE 또는 MACH)의 DED(Death effector domain)와 결합하면, caspase-8이 활성화되고, 결국 세포 사멸을 일으키는 이펙터 (effector) caspase를 활성화시켜 세포 사멸이 유도된다 (문헌 [Marsters, S. A. et al., Curr. Biol. 8:525-528, [1998] 참조).

[0006] FAF1(Fas-associated factor 1)은 Fas antigen에 결합하여 도파민 신경세포의 사멸(apoptosis)을 유도하는 기능을 하는 것으로 알려진 단백질로 파킨슨 병 환자의 전두엽 피질(Frontal cortex)에서 그 발현이 유의하게 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한, 파킨슨 병 환자에서 나타나는 미토콘드리아 복합체 I 억제, 산화 스트레스 및 alpha-synuclein 발현 증가는 FAF1 발현을 특이적으로 증가시킨다고 보고되고 있다. FAF1의 발현 수준이 증가하면 세포 사멸을 유도하고 산화 스트레스, 미토콘드리아 복합체 I 억제 및 프로테아좀 억제를 포함하는 파킨슨병에 관한 스트레스 요인의 독성 효과를 강화시킨다(문헌 [Keting Chu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(25), pp. 11894-11898 (1995)] 참조). 이와 같이 FAF1은 파킨슨 병의 발병 및 진행에 중요한 역할을 하는 단백질이다.

[0007] 그러나, 현재까지 FAF1이 파킨슨병의 환자에서 발현이 증가하고, Fas receptor의 도메인과 상호작용하여 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있으나, FAF1이 세포 외로 분비된다는 것과, 정확한 분비경로 및 분비된 FAF1이 인접한 세포에 세포 사멸을 유도한다는 것을 밝힌 바는 없다.

[0008] 본 발명자들은 파킨슨병의 새로운 치료제를 찾던 중, 파킨슨병 환자에서 과발현된다고 알려진 FAF1 단백질이 세포 외로 분비된다는 것과, 전형적인 단백질 수송 경로가 아닌 다른 경로로 분비된다는 새로운 메커니즘을 규명하고, 이런 경로로 분비된 FAF1 단백질이 인접한 세포에 세포 사멸을 유도한다는 것을 밝혔다. 상기 메커니즘에 기초할 때 FAF1의 세포의 분비를 억제하는 물질은 파킨슨병의 유효한 치료 후보 물질이 될 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 FAF1 단백질이 발현된 세포에서 FAF1 단백질의 세포 외 분비를 억제하는 물질을 스크리닝 하

여, 퇴행성 뇌질환의 치료제를 개발하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0013] 1) FAF1(Fas associated factor 1) 단백질을 발현하는 세포에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0014] 2) 상기 단계 1)의 세포에서 FAF1 단백질의 세포외 분비량을 측정하는 단계; 및
- [0015] 3) 상기 단계 2)의 FAF1 단백질의 세포외 분비량이 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 FAF1이 과발현된 세포에서 FAF1 단백질이 세포외로 분비되며, 이는 전형적인 단백질의 분비 경로가 아닌 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 엑소좀(exosome)으로 분비되고, 인접한 세포에 세포 사멸(apoptosis)을 일으키는 확인함으로써, 본 발명의 FAF1 단백질의 세포외 분비를 억제하는 물질을 스크리닝하는 방법을 통해 퇴행성 뇌질환의 치료제를 개발하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 세포외 분비된 FAF1 단백질을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 수행한 도이다.
- media : 배양액
- WCL : Whole Cell lysate(전체 세포 용해물)
- 도 2a는 FAF1 단백질이 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 분비되는지 확인하기 위해 배양액으로 분비된 FAF1 단백질의 상대적인 분비량을 나타낸 도이다
- 도 2b는 FAF1 단백질이 소포체-골지체 단백질 수송 경로로 분비되는지 확인하기 위해 화합물인 Brefeldin A(BFA)를 처리한 군과 처리하지 않은 대조군에서 배양액으로 분비된 FAF1의 상대적인 분비량을 나타낸 도이다.
- 도 3은 FAF1 단백질이 엑소좀을 통해 분비되는지 확인하기 위해 엑소좀의 분비를 증가 또는 감소시키는 화합물을 처리하여 FAF1 단백질의 상대적인 분비량을 나타낸 도이다.
- CMV vector: FAF1을 과발현 시키지 않은 군
- Flag FAF1 : FAF1을 과발현 시킨 군
- 도 4는 FAF1이 엑소좀을 통해 분비됨을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 수행한 도이다.
- 도 5는 공여자 세포로부터 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포로 이동한 것을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 수행한 도이다.
- 도 6은 공여자 세포로부터 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포의 세포 사멸(apoptosis)을 유발한 것을 확인하기 위해 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 세포 사멸 정도를 측정한 도이다.
- 도 7은 공여자 세포(Donor cell)로부터 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포(Recipient cell)로 이동했음을 확인하기 위하여 공초점 현미경을 통해 수여자 세포를 관찰한 도이다.
- GFP-vector : FAF1 단백질을 발현시키지 않은 공여자 세포의 배지를 농축하여 이를 수여자 세포에 처리한 군.
- GFP-FAF1 : GFP가 융합된 FAF1 단백질을 과발현한 공여자 세포의 배지를 농축하여 이를 수여자 세포에 처리한 군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은
- [0023] 1) FAF1(Fas associated factor 1) 단백질을 발현하는 세포에 피검물질을 처리하는 단계;

- [0024] 2) 상기 단계 1)의 세포에서 FAF1 단백질의 세포외 분비량을 측정하는 단계; 및
- [0025] 3) 상기 단계 2)의 FAF1 단백질의 세포외 분비량이 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0026] 상기 FAF1 단백질은 세포사멸에 관여하는 것으로 알려진 Fas의 세포질 내 도메인과 결합하는 단백질로 DD없이 Fas와 결합하는 대표적인 단백질 중 하나이다. 인간 FAF1 단백질은 Fas 결합 단백질로서 세포질에 위치하고, 핵에서의 기능은 분명히 밝혀진 바는 없지만 자체의 NLS 도메인에 의해 핵에 존재한다는 가능성이 대두되고 있으며, 단백질 키나아제 CK2에 의한 인산화, 글리코실레이션(glycosylation) 등에 의한 FAF1의 변형 가능성이 제시되고 있다. 실제로 FAF1은 유비퀴티네이션(ubiquitination) 경로의 단백질에서 보이는 도메인인 UB 도메인을 2개, X 도메인 1개, UX 도메인 1개를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 UX 도메인은 유비퀴틴과 관련된 메커니즘에 관여하는 도메인으로 알려져 있다. FAF1은 단백질 키나아제 CK2 완전효소(holoenzyme) 또는 CD2alpha 서브유닛에 의해서 289와 291번째 아미노산이 인산화 된다.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병(Parkinson's disease)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 피검물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액 또는 동물 조직 추출액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 피검 물질은 단일 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 항체 또는 펩티드 이거나, 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 SigmaAldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 FAF1 단백질은 엑소사이토시스(exocytosis)로 분비되는 것일 수 있다.
- [0034] 상기 엑소사이토시스(exocytosis)는 에너지 소비 과정으로서, 세포 안의 물질을 세포 바깥으로 배출하는 토세포 현상이다. 이 때 세포 외부로 원형질막이 떨어져 나가게 된다.
- [0036] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 FAF1 단백질은 엑소좀(exosome)으로 분비되는 것일 수 있다.
- [0037] 엑소좀은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭이다. 엑소좀의 직경은 대략 30-100 nm 인 것으로 보고되어 있다. 엑소좀은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것이 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다.
- [0039] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 FAF1 단백질은 다른 세포에 세포 사멸(apoptosis)을 유도하는 것일 수 있다.
- [0040] 상기 세포사멸(apoptosis)은 다세포 생물체에서 볼 수 있는 세포 예정사(programmed cell death)의 일종이다. 세포 사멸은 세포 형태와 내부의 생화학적 변화로 말미암아 세포가 죽는 것으로 정립된다. 이 과정은 세포의 팽창과 균열, 세포막의 변화, 염색질 응축과 염색체 절단, 그리고 해당 세포가 다른 세포에게 먹혀 처리되는 것으로 끝난다. 세포 사멸은 갑작스럽게 세포가 피해를 입어 야기되는 세포사인 괴사(necrosis)와 대조적으로 생물체에 해를 끼치지 않으며 생명주기에 유익한 것이다. 인간 배아의 분화과정에서 손가락과 발가락의 형성은 세포사멸이 작용하는 대표적 사례이다. 또한 세포 사멸은 세포교체, 조직 리모델링, 상해를 입은 세포의 제거에 있어 중요한 메커니즘이다. 다만 세포사멸이 잘못 조절되면 암, 자가 면역 질환, 퇴행성 신경이상, 바이러스 감염 등 각종 질환이 유발된다.
- [0041] 세포사멸의 원인은 유발 인자의 위치에 따라 세포 안, 밖의 두 경우로 나뉜다. 세포 내에서 유발되는 경우(Intrinsic apoptosis)는 세포가 스트레스를 받았을 때 방출되는 세포내부의 신호와, 미토콘드리아 막간공간으로부터 방출되는 단백질에 의해 활성화 된다. 미토콘드리아는 생물에게 매우 중요한 세포소기관으로 미토콘드리아가 없다면 세포는 세포호흡을 멈추게 되고 급속히 죽음에 이르게 된다. 미토콘드리아를 표적으로 삼는 세포사멸 단백질(apoptotic protein)은 다양한 방법으로 미토콘드리아에 영향을 미친다. 이 단백질은 미토콘드리아막 상에 통로(membrane pore)를 만들어 미토콘드리아를 팽창시키거나, 미토콘드리아막의 투과성을 높여 미토콘드리아 막간공간에 있는 세포자살성 물질이 방출되게 한다. 또한 일산화질소(NO)는 미토콘드리아에 형성된 농도

울기를 감소시켜 미토콘드리아 막의 투과성을 높여 세포자살을 유도한다.

- [0042] 세포 외에서 유발되는 경우(Extrinsic apoptosis)는 Intrinsic apoptosis와는 다른 몇 가지 특이성을 보이고 있다. 이 경우 미토콘드리아의 영향을 거의 받지 않고 세포 사멸을 유도할 수 있으며, 면역세포나 주변세포 혹은 스스로 발현시키는 사이토카인에 의해 유도되는 세포사멸이라고 할 수 있다. 그렇기 때문에 전자의 경우와는 다른 인자들이 관여하고 있으며 특정 사이토카인을 세포가 인식하여야 하기 때문에 수십 개의 수용체 family가 발견된다.
- [0044] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 분비량은 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 면역침강법(immunoprecipitation assay), 이중 루시퍼라제 측정법(dual luciferase reporter assay), 효소면역분석법(ELISA) 및 면역조직화학법으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 FAF1 단백질이 세포외로 분비되는지 확인하기 위하여, SH-SY5Y 세포에 pcDNA 3.1-3x Flag tag-FAF1 발현 벡터를 형질 도입하여 FAF1을 과발현 시킨 다음, 웨스턴 블랏팅으로 배양액의 단백질을 분석하여, FAF1 단백질이 세포 외로 분비됨을 확인하였다(도 1).
- [0047] 또한, 본 발명자들은 FAF1을 과발현 시킨 세포에서 엑소사이토시스(exocytosis)를 억제하는 온도인 18℃와 생체 내 온도인 37℃의 두 가지 온도 조건에서 분비된 FAF1 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏팅으로 측정한 결과, 18℃에서 FAF1 단백질의 분비가 억제됨을 확인하여 FAF1이 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 분비됨을 확인하였다(도 2a).
- [0048] 또한, 본 발명자들은 FAF1을 과발현 시킨 세포에서 소포체-골지체 경로의 단백질 수송을 억제하는 화합물인 Brefeldin A(BFA)를 처리하여, FAF1 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏팅으로 측정한 결과, BFA의 처리와는 관계없이 FAF1 단백질의 발현량이 일정함을 확인하여, FAF1 단백질은 전형적인 단백질 수송 경로를 통해 분비되지 않음을 확인하였다(도 2b).
- [0049] 또한, 본 발명자들은 FAF1을 과발현 시킨 세포에서 엑소좀의 분비를 증가 또는 감소시키는 두 가지 화합물을 처리하여, FAF1 단백질의 분비량을 측정한 결과, 엑소좀의 분비를 증가시키는 물질을 처리한 경우 FAF1 단백질의 분비량이 증가하고, 엑소좀의 분비를 감소시키는 물질을 처리한 경우 FAF1 단백질의 분비량이 감소함을 확인하여, FAF1 단백질은 엑소좀을 분비에 따라 분비량이 조절됨을 확인하였다(도 3).
- [0050] 또한, 본 발명자들은 FAF1을 과발현 시킨 세포를 배양한 배지에서 엑소좀을 분리하고, 이를 웨스턴 블랏팅으로 측정한 결과, FAF1 단백질이 존재함을 확인하여 FAF1 단백질은 엑소좀을 통해 분비됨을 확인하였다(도 4).
- [0051] 또한, 본 발명자들은 FAF1을 과발현 시킨 공여자 세포에서 수여자 세포로 FAF1 단백질이 이동하는지 확인하기 위해 공여자 세포의 배지를 농축하고 이를 수여자 세포에 처리하여 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과, Flag tag가 부착된 FAF1 단백질이 존재함을 확인하여 공여자 세포로부터 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포 내로 이동함을 확인하였다(도 5).
- [0052] 또한, 본 발명자들은 공여자 세포가 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포의 세포 사멸(apoptosis)을 일으키는지 여부를 확인하기 위해, 공여자 세포의 농축한 배지를 처리한 수여자 세포를 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 분석한 결과, 공여자 세포에서 FAF1을 과발현 시킬수록 사멸한 세포의 비율이 증가하는 것을 확인하여 공여자 세포가 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포의 세포 사멸을 유도함을 확인하였다(도 6).
- [0053] 또한, 본 발명자들은 공여자 세포가 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포 내부로 이동하는지 확인하기 위해, 농축한 공여자 세포의 배지를 수여자 세포에 처리하여 공초점 현미경으로 관찰한 결과, GFP(Green fluorescent protein)로 표지된 FAF1 단백질이 관찰됨을 확인하여 공여자 세포가 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포 내로 이동함을 확인하였다(도 7).
- [0054] 따라서, 신경세포사멸을 유도하는 것으로 보고된 FAF1 단백질이 일반적인 단백질 수송 경로가 아닌 엑소좀에 포함된 형태로 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 분비되어, 다른 세포에 세포 사멸(apoptosis)을 유도하므로, FAF1 단백질의 세포외 분비를 억제할 수 있는 물질을 선별하는 과정은 파킨슨병으로 대표되는 퇴행성 뇌질환의 치료 후보 물질 스크리닝에 활용될 수 있다.
- [0056] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0057] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

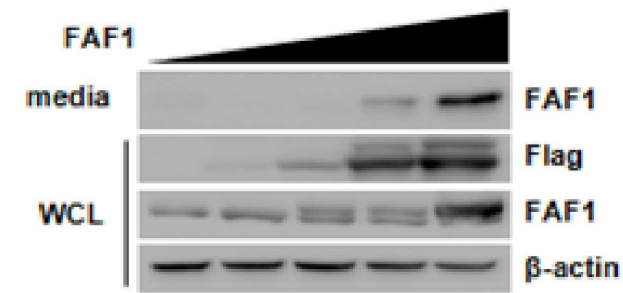
- [0059] <실험예 1> 세포 외 분비된 FAF1 단백질의 확인
- [0060] 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에 FAF1 유전자를 도입한 발현 벡터를 형질도입(transfection)하여 FAF1 단백질이 세포외로 분비되는지 확인하였다.
- [0061] 인간 신경모세포종(neuroblastoma) SH-SY5Y 세포 5×10^5 개를 60mm 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양 하였다. 세포 내에 도입할 pcDNA 3.1-3x Flag tag-FAF1 발현 벡터 0, 0.25, 0.5, 1 및 2 μ g 과 각 발현 벡터 양의 1.5배의 바이오티(BioT)를 혈청이 없는 200 μ l의 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지와 혼합하여, 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 혼합물을 배양된 SH-SY5Y 세포에 형질도입(transfection)하고 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척하였다. 그 후, 혈청이 없는 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지로 교체한 다음 24시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 15ml 튜브로 옮겨 1500rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 수득한 상층액을 Amicon Ultra -4 Centrifugal Filter에 넣고 4000 x g, 4℃에서 15분간 다시 원심분리하여 필터에 의해 여과된 단백질을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 분석하였다.
- [0062] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 세포에 형질 도입한 발현 벡터의 양이 증가할수록 FAF1 단백질의 발현량이 증가하였고, 이는 배양액(media)으로 FAF1 단백질이 분비되었을 가능성을 제시한다(도 1).
- [0064] <실험예 2> FAF1 단백질의 분비 경로 탐색
- [0065] <2-1> FAF1 단백질이 엑소사이토시스(exocytosis)에 의해 분비되는지 여부 확인
- [0066] 상기 실험예 1에서 배지에 존재하는 것으로 확인된 FAF1 단백질이 세포 손상이나 세포 사멸에 의한 것이 아닌 세포의 내인성(endogenous) 조절 기작, 즉 엑소사이토시스를 통해 일어나는 것인지 확인하였다.
- [0067] 구체적으로, SH-SY5Y 세포 5×10^5 개를 60mm 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양 하였다. 배양한 SH-SY5Y 세포에 3x Flag tag-FAF1 발현 벡터 2 μ g를 형질 도입하여 FAF1 단백질을 과발현 시키고 24시간 동안 배양한 후, PBS buffer로 세척하였다. 그 후, 혈청이 없는 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지로 교체한 다음 18℃와 37℃의 온도조건에서 24시간 동안 세포 배양기에서 추가 배양하였다. 배양 후, 배지를 15ml 튜브로 옮겨 1500rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 수득한 상층액을 Amicon Ultra -4 Centrifugal Filter에 넣고 4000 x g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 필터에 의해 여과된 단백질을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 분석하였다.
- [0068] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 37℃ 에서 배양된 세포에 비해 엑소사이토시스(exocytosis)가 억제되는 온도인 18℃에서 배양된 세포로부터 FAF1의 분비량이 유의하게 감소하였다(도 2a). 이 결과는 FAF1 단백질이 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 분비됨을 제시한다.
- [0070] <2-2> FAF1 단백질의 분비 경로 확인
- [0071] FAF1 단백질이 전형적인 단백질 분비 경로인 소포체-골지체 경로(ER-Golgi pathway)로 분비되는지 혹은 비전형적인 경로로 분비되는지 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.
- [0072] 구체적으로, SH-SY5Y 세포 5×10^5 개를 60mm 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양 하였다. 배양한 SH-SY5Y 세포에 3x Flag tag-FAF1 발현 벡터 2 μ g를 형질 도입하여 FAF1 단백질을 과발현 시키고 24시간 동안 배양한 후, PBS buffer로 세척하였다. 그 후, 혈청이 없는 DMEM(Dulbecco/s Modified Eagle's Medium) 배지로 교체하고, 소포체-골지체 경로를 통한 단백질 분비를 억제하는 화합물인 Brefeldin A(BFA) 10 μ M을 처리하여 24시간 동안 세포 배양기에서 추가 배양하였다. 배양 후, 배지를 15ml 튜브로 옮겨 1500rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 수득한 상층액을 Amicon Ultra -4 Centrifugal Filter에 넣고 4000 x g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 필터에 의해 여과된 단백질을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 분석하였다.
- [0073] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, Brefeldin A(BFA)를 처리한 군과 처리하지 않은 군의 FAF1 단백질의 발현량의 차이가 없어 FAF1 단백질은 전형적인 단백질 수송 경로인 소포체-골지체 경로가 아닌 다른 경로를 통해 분비됨을 확인하였다(도 2b).

- [0075] <2-3> FAF1 단백질이 엑소좀(exosome)을 통해 분비되는지 여부 확인
- [0076] 엑소좀은 생체 내 세포 간의 정보전달자 역할을 하는 나노 크기의 소포체(extracellular vesicle)로 FAF1 단백질이 엑소좀을 통해 분비되는지 확인하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.
- [0077] 구체적으로, SH-SY5Y 세포 5×10^5 개를 60mm 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양하였다. 배양한 SH-SY5Y 세포에 3x Flag tag-FAF1 발현 벡터 2μg를 형질 도입하여 FAF1 단백질을 과발현 시키고 24시간 동안 배양한 후, PBS buffer로 세척하였다. 그 후, 혈청이 없는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교체하고, 엑소좀 분비를 증가시키는 Monensin 화합물 10uM과 엑소좀 분비를 감소시키는 GW4869 화합물 10uM을 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 15ml 튜브로 옮겨 1500rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 수득한 상층액을 Amicon Ultra -4 Centrifugal Filter에 넣고 4000 x g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 필터에 의해 여과된 단백질을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 관찰하였다.
- [0078] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, GW4869 화합물을 처리한 군은 FAF1 분비량이 대조군에 비해 감소하였고, Monensin 화합물을 처리한 군은 대조군에 비해 FAF1 분비량이 유의하게 증가하여 FAF1 단백질은 엑소좀을 통해 분비됨을 확인하였다(도 3).
- [0080] <2-4> 엑소좀 분리를 통한 엑소좀 내의 FAF1 단백질 확인
- [0081] 세포 외로 분비된 엑소좀 내에 FAF1 단백질이 존재하는지 확인하기 위해, 하기의 실험을 수행하였다.
- [0082] 구체적으로, SH-SY5Y 세포를 150mm 배양 접시의 약 70%의 면적을 차지할 때까지 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양 하였다. 배양한 SH-SY5Y 세포에 3x Flag tag-FAF1 발현 벡터 7μg를 형질 도입하여 FAF1 단백질을 과발현 시키고 24시간 동안 배양한 후, PBS buffer로 세척하였다. 그 후, FBS로부터 유래한 엑소좀이 제거된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교체하고, 48시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 15ml 튜브로 옮겨 2000 x g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 수득한 상층액을 10000 x g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻은 뒤, 다시 140000 x g에서 70분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 버린 뒤 PBS buffer 1 ml를 넣어 재부유 시켜 튜브의 3/4를 채우고 140000 x g에서 70분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 침전물에 RIPA buffer 80μl를 첨가하고 재부유 한 뒤 EP 튜브에 옮겼다. EP 튜브의 침전물을 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로 관찰하였다.
- [0083] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, FAF1을 과발현하지 않은 세포의 엑소좀에서는 FAF1 단백질이 검출되지 않았지만 FAF1을 과발현한 세포의 엑소좀에서는 FAF1 단백질이 검출되어 FAF1은 엑소좀을 통해 분비됨을 확인하였다(도 4).
- [0085] <실험예 3> 공여자 세포로부터 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포에 미치는 영향 확인
- [0086] <3-1> 공여자 세포의 배지 농축
- [0087] 공여자 세포가 세포 외로 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 공여자 세포의 배지를 농축하여 배지 내의 FAF1 단백질을 확인하였다.
- [0088] 구체적으로, SH-SY5Y 세포 5×10^5 개를 60mm 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 12시간 동안 계대 배양하였다. 세포 내에 도입할 3x Flag tag-FAF1 발현 벡터 0, 1, 2 및 4 μg 과 각 발현 벡터 양의 1.5배의 바이오 티(BioT)를 혈청이 없는 200μl의 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지와 혼합하여, 실온에서 5분간 반응시켰다. 상기 혼합물을 배양된 SH-SY5Y 세포에 형질 도입(transfection)하고 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척하였다. 그 후, 혈청이 없는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교체한 다음 24시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 15ml 튜브로 옮겨 1500rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 수득한 상층액을 Amicon Ultra -4 Centrifugal Filter에 넣고 4000 x g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 Filter에 의해 걸러진 단백질을 EP 튜브로 옮겨 농축된 조건 배지를 수득하였다. 배양접시에 존재하는 공여자 세포는 웨스턴 블랏팅을 수행하였다(도 5).
- [0089] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 세포 내에 도입한 발현 벡터의 양이 증가할수록 공여자 세포에서 FAF1 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

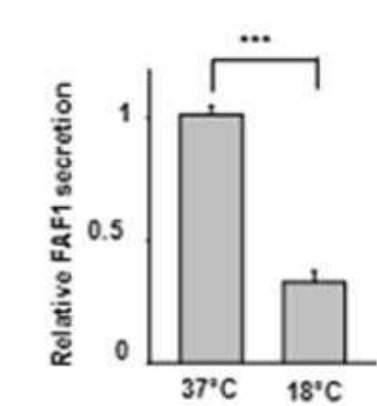
- [0091] <3-2> 공여자 세포에서 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포로 이동하여 세포 사멸(apoptosis) 유발하는지 여부 확인
- [0092] 공여자 세포가 세포 외 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포로 이동하여 세포 사멸(apoptosis)을 유발하는지 확인하기 위해, 상기 실험에 3-1에서 수득한 공여자 세포의 농축된 배지를 수여자 세포에 처리하여 하기의 실험을 수행하였다.
- [0093] 구체적으로, SH-SY5Y 세포 5×10^5 개를 60mm 배양 접시에 분주한 후, 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 12시간 동안 계대 배양하였다. 상기 실험에 3-1에서 수득한 농축한 공여자 세포의 배지를 배양한 세포에 48시간 동안 처리하였다. 그 후 세포를 수득하여 일부는 웨스턴 블랏팅을 수행하고(도 5), 일부는 PBS buffer 1ml를 넣은 후 EP 튜브에 50μg/ml의 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI) 100μl를 분주하고 유세포 분석기(flow cytometry, FACS)를 통해 세포 사멸 정도를 측정하였다(도 6).
- [0094] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 공여자 세포에 처리한 발현 벡터의 양에 비례하여 수여자 세포에서 Flag tag의 발현의 증가가 확인되어 공여자 세포에서 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포 내로 이동했을 가능성을 확인하였다.
- [0095] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 공여자 세포에 처리한 발현 벡터의 양에 비례하여 공여자 세포에서 세포 사멸이 유도되는 것과, 공여자 세포의 농축 배지를 수여자 세포에 처리한 결과, 처리된 공여자 세포의 농축 배지의 양에 의존적으로 수여자 세포의 세포 사멸이 유도되는 것을 확인하였다(도 6).
- [0097] <3-3> 공여자 세포가 세포 외 분비한 FAF1 단백질이 수여자 세포 내로 이동하는지 여부 확인
- [0098] 공여자 세포에서 세포 외부로 분비된 FAF1 단백질이 실제 수여자 세포 내부로 이동하는지 여부를 확인하기 위해 세포를 염색하여 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.
- [0099] 구체적으로, SH-SY5Y 세포를 150mm 배양 접시의 약 70%의 면적을 차지할 때까지 항생제와 10% FBS(Fetal bovine serum)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 의 조건으로 24시간 동안 계대 배양 하였다. 세포 내에 도입할 pEGFP-GFP-FAF1 발현 벡터 0, 1, 2 및 4μg 과 각 발현 벡터 양의 1.5배의 바이오티(BioT)를 혈청이 없는 200μl의 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지와 혼합하여, 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 혼합물을 배양된 SH-SY5Y 세포에 형질 도입(transfection)하고 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척하였다. 그 후, 혈청이 없는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교체한 다음 24시간 동안 추가 배양하였다. 배지를 15ml 튜브로 옮겨 1500rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 수득한 상층액을 Amicon Ultra -4 Centrifugal Filter에 넣고 4000 x g, 4℃에서 15분간 다시 원심분리하여 필터에 의해 여과된 단백질을 EP 튜브에 옮겨 공여자 세포의 농축된 배지를 수득하였다.
- [0100] 수여자 세포는 Poly-D-lysine으로 코팅한 18mm x 18mm 커버 슬립에 6×10^4 개씩 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 공여자 세포의 농축된 배지를 수여자 세포에 처리하고 24시간 동안 추가 배양하였다. 이후, 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde, PFA)를 실온에서 15분간 처리하여 세포를 고정하고, 4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 10분간 처리하여 세포의 핵을 염색하였다. 커버 슬립을 PBS buffer로 10분 동안 3회 세척한 후, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane(DABCO)가 처리된 커버 글라스를 슬라이드 글라스에 씌워 봉입하고 공초점 현미경으로 관찰하였다.
- [0101] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, GFP로 표지된 FAF1 단백질이 수여자 세포에서 관찰되므로 공여자 세포로부터 분비된 FAF1 단백질이 수여자 세포 내로 이동했음을 확인할 수 있었다(도 7).

도면

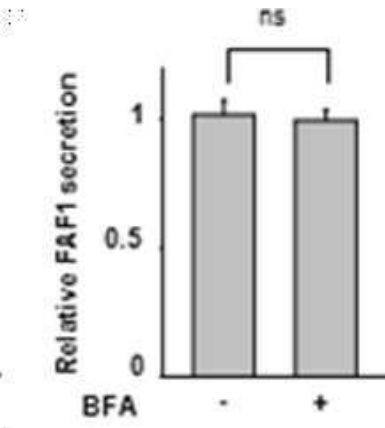
도면1



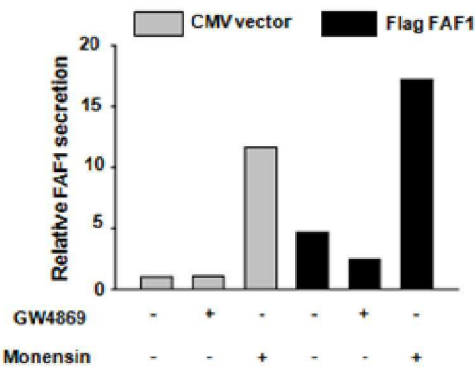
도면2a



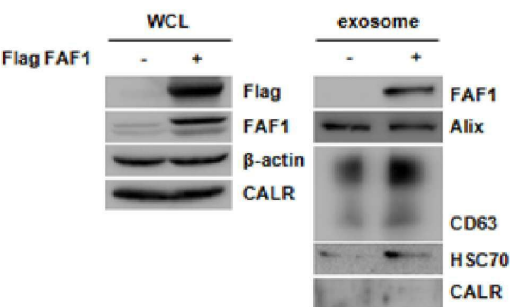
도면2b



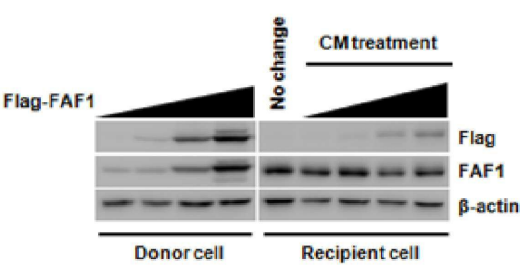
도면3



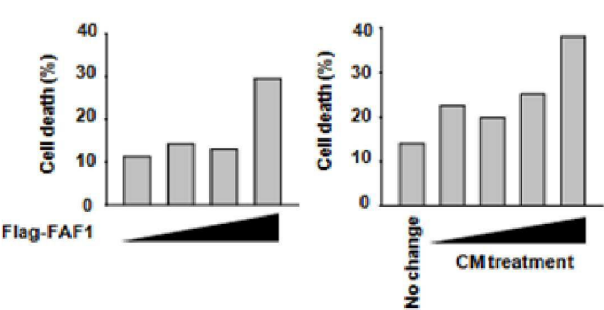
도면4



도면5



도면6



도면7

