(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0014910
(43) 공개일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0108944
(22) 출원일자 2015년07월31일
심사청구일자 2015년07월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
고제상
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 101-2401(여의도동, 여의도자이아파트)
박소담
전라북도 전주시 완산구 강변로 98, 104동 1101호(삼천동1가, 신일강변아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

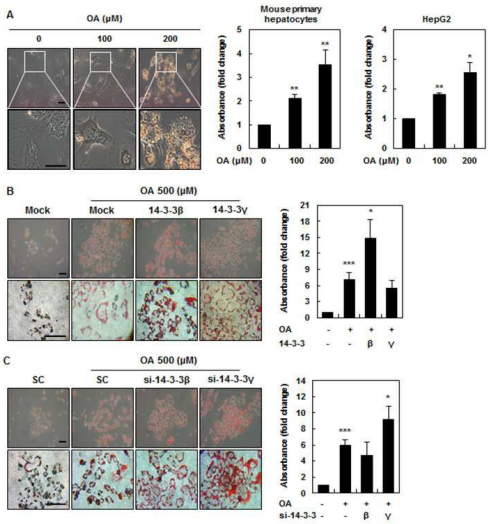
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **비알콜성지방간 조절인자 14-3-3 단백질**

(57) 요 약

본 발명은 비알콜성지방간 조절인자 14-3-3 단백질에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 14-3-3의 두 동형 단백질인 14-3-3β와 14-3-3γ가 서로 다른 조절 인자로서 PPARγ2의 전사 활성을 조절한다. 14-3-3β는 PPARγ2와 결합하여 PPARγ2의 전사 활성을 증가시키는 반면, 14-3-3γ는 PPARγ2의 전사 활성을 감소시키는 역할을 한다. 따라서, 14-3-3β와 14-3-3γ는 PPARγ2의 조절 인자로 지방 대사 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질로서, 지방간 예방 또는 치료를 위한 표적으로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

14-3-3β 유전자에 대한 저해제를 포함하며,

상기 저해제는 14-3-3β 유전자에 대한 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 또는 이를 포함하는 벡터인 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 2

14-3-3β 단백질에 대한 저해제를 포함하며,

상기 저해제는 14-3-3β 단백질에 대한 항체인 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 3

비알콜성 지방간 의심환자의 생물학적 시료로부터 14-3-3β 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는 비알콜성 지방간 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

14-3-3β 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위한 프로브는 상기 mRNA에 대한 핵산 프로브 또는 프라이머인 비알콜성 지방간 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

14-3-3β 의 단백질 수준을 측정하기 위한 프로브는 상기 단백질에 대한 항체인 비알콜성 지방간 진단용 조성물.

청구항 6

14-3-3β의 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고,

상기 후보물질에 의한 상기 유전자 또는 단백질의 발현량 변화를 측정하는 것을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 후보물질이 14-3-3β 유전자 또는 단백질의 발현을 하향조절할 때 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약으로 판별하는,

비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비알콜성지방간 조절인자 14-3-3 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 비알콜성 지방간 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: NAFLD)은 대표적인 간 질환으로 간의 염증과 손상을 유발한다. 비알콜성 지방간이 악화되면 비알콜성 지방간염 (Non-Alcoholic Steatohepatitis: NAS) 으로 발전하고 그 증상으론 경변증과 섬유증이 나타난다. 최근 보고에 따르면 지방간 환자의 간에서 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)γ2 라는 전사인자가 과발현 및 활성화 되어 있다고 알려졌다. 또한, PPARγ2의 활성화에 따라 간의 지질대사에 관여하는 다양한 타겟 단백질의 발현이 유도된다. 이러한 전사인자의 활성에 관여하는 14-3-3이라는 단백질은 7가지의 동형 단백질 (α/β, ε, η, γ, τ/Θ, δ/ζ, 및 σ)로서 존재한다. 14-3-3의 단백질들은 전사인자의 인산화 부분에 결합하여 전사인사의 활성을 조절한다고 알려져 있으며, 대사관련 전사인자의 조절에도 관여한다. 이에 본 발명자들은 지방간 발병 및 조절에 있어서 14-3-3 단백질들의 역할을 조사한 결과, 14-3-3β와 14-3-3γ는 PPARγ2의 조절 인자로 지방 대사 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질들이며, 비알콜성 지방간 치료를 위한 표적으로 이용될 수 있음을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약의 개발을 위한 14-3-3β 및 14-3-3γ의 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 14-3-3β 유전자에 대한 저해제를 포함하며, 상기 저해제는 14-3-3β 유전자에 대한 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 또는 이를 포함하는 벡터인 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 14-3-3γ 유전자 또는 14-3-3γ 단백질을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 지방간 의심환자의 시료로부터 14-3-3β 및/또는 14-3-3γ 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는 비알콜성 지방간 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 14-3-3β 또는 14-3-3γ의 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고, 상기 후보물질에 의한 상기 유전자 또는 단백질의 발현량 변화를 측정하는 것을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 14-3-3β 단백질 및/또는 14-3-3γ 단백질을 PPARγ2 단백질과 함께 후보물질과 접촉시키고, 상기 후보물질에 의한 PPARγ2 에 대한 14-3-3β 단백질 및/또는 14-3-3γ 단백질의 결합 변화를 측정하는 것을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 14-3-3의 두 동형 단백질인 14-3-3β와 14-3-3γ가 서로 다른 조절 인자로서 PPARγ2의 전사

활성을 조절한다. 14-3-3β는 PPARγ2와 결합하여 PPARγ2의 전사 활성을 증가시키는 반면, 14-3-3γ는 PPARγ2의 전사 활성을 감소시키는 역할을 한다. 따라서, 14-3-3β와 14-3-3γ는 PPARγ2의 조절 인자로 지방 대사 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질로서, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료를 위한 표적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1A 내지 도 1C는 PPARγ$_2$와 14-3-3 동형 단백질 과발현 (A) 및 14-3-3β 발현량 (B) 14-3-3γ 발현량 (C)에 따른 전사활성을 확인한 결과를 보여준다. 도 1D 내지 1E는 14-3-3β 발현억제 (D) 및 14-3-3γ 발현억제 (E)에 따른 전사활성을 확인한 결과를 보여준다.

도 2는 PPARγ$_2$의 리간드인 pioglitazone 처리 유·무에 따른 PPARγ$_2$와 14-3-3β (A) 또는 14-3-3γ (B) 의 결합력을 확인한 결과를 보여준다.

도 3은 PPARγ$_2$의 도메인 위치 및 결실돌연변이 (A), GST-pull down assay를 이용한 PPARγ$_2$ 결실돌연변이와 14-3-3β (B) 및 14-3-3γ (C) 간의 결합을 확인한 결과를 보여준다.

도 4는 PPARγ$_2$의 S112A와 S273A 돌연변이에서의 14-3-3β (A) 또는 14-3-3γ (B)의 결합을 확인한 결과 및 PPARγ$_2$ S273A 돌연변이의 전사활성을 확인한 결과를 보여준다.

도 5는 14-3-3γ 발현량 증가에 따른 14-3-3β와 PPARγ$_2$의 결합 (A) 및 14-3-3β 발현량 증가에 따른 14-3-3γ와 PPARγ$_2$의 결합 (B)을 확인한 결과를 보여준다.

도 6은 올레산 처리에 의한 HepG2 (A)와 일차 쥐 간세포(primary mouse hepatocytes)에서의 PPARγ$_2$ 발현(B) 및 HepG2 세포 (C)와 일차 쥐 간세포 (D)에서의 PPARγ$_2$ 타겟 유전자 발현을 확인한 결과를 보여준다.

도 7은 올레산 처리 시 PPARγ$_2$ 타겟 유전자 발현에 대한 14-3-3β와 14-3-3γ의 영향을 보여준다. 도 7A 및 7B는 HepG2 세포 (A) 및 쥐의 간세포 (B)에서 14-3-3β와 14-3-3γ의 발현에 따른 타겟 유전자의 발현을 확인한 결과를 보여준다. 도 7C 및 7B는 ChIP을 이용한 14-3-3β와 14-3-3γ 발현에 따른 FAT/CD36 promoter와의 결합 (C) 및 SREBP-1c 단백질 발현 (D)을 확인한 결과를 보여준다.

도 8은 올레산 처리시 PPARγ$_2$와 14-3-3β 또는 14-3-3γ의 결합력(A와 B) 및 PPAR-RXR 복합체 형성에 대한 14-3-3β와 14-3-3γ의 역할 (C)을 확인한 결과를 보여준다.

도 9는 일차 쥐 간세포와 HepG2 세포에서 지방 축적에 대한 올레산의 영향 (A) 및 14-3-3β와 14-3-3γ의 과발현 (B) 및 발현억제 (C)에 대한 지방 축적 변화를 확인한 결과를 보여준다.

도 10은 일차 쥐 간세포와 HepG2 세포에서 트리글리세리드 축적에 대한 14-3-3β와 γ 과발현의 영향 (A) 및 14-3-3β와 14-3-3γ 발현억제의 영향 (B)을 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0017] 본 발명자들은 14-3-3의 두 동형 단백질인 14-3-3β와 14-3-3γ가 서로 다른 조절 인자로서 PPARγ2의 전사 활성을 조절하는 것을 발견하였다. 14-3-3β는 PPARγ2와 결합하여 PPARγ2의 전사 활성을 증가시키는 반면, 14-3-3γ는 PPARγ2의 전사 활성을 감소시키는 역할을 하였다. PPARγ2가 NAFLD에서 중요한 역할을 하기 때문에 14-3-3β와 14-3-3γ가 지방 축적에 어떠한 영향을 주는지 조사하기 위하여 14-3-3β와 14-3-3γ를 간세포에 과발현 시켰다. 그 결과, 14-3-3β가 과발현 되었을 때는 지방 대사에 관여하는 PPARγ2의 표적 유전자들의 발현이 증가하고 지방 축적을 강화시켰으나, 14-3-3γ가 과발현 되었을 때는 PPARγ2의 표적 유전자들의 발현과 지방 축적이 억제되었다. 즉, 14-3-3β와 14-3-3γ는 PPARγ2의 조절 인자로 지방 대사 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질들이며, NAFLD 치료를 위한 표적단백질로 이용될 수 있음을 규명하였다.

[0018] 이에 본 발명은 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물의 제조를 위한 14-3-3β 와 14-3-3γ 의 용도를 제공한다.

[0019] 보다 구체적으로, 본 발명은 14-3-3β 유전자에 대한 저해제를 포함하는 벡터인 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물, 지방간 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 상기 저해제의 용도, 상기 저해제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 지방간 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 지방 대사에 관여하는 PPARγ2의 전사 활성을 조절하는 타겟으로 이용되는 14-3-3β는 14-3-3β 유전자를 의미하거나 14-3-3β 단백질을 의미하는 것으로 해석된다. 따라서 14-3-3β 에 대한 저해제는 14-3-3β 유전자 및 14-3-3β 단백질에 대한 저해제를 모두 포함하는 것으로 해석된다.

[0021] 상기 14-3-3β 단백질, 상기 14-3-3β 유전자 등에는 이들과 실질적으로 동일한 활성을 갖는 이들의 변이체 또는 단편이 포함되는 것으로 해석된다.

[0022] 한 구체예에서, 14-3-3β 유전자에 대한 저해제는 상기 유전자의 발현을 저해하여 14-3-3β 단백질 발현 저해에 의한 PPARγ2과의 결합을 차단하는 저해제 일 수 있다. 14-3-3β 유전자는 이를 코딩하는 DNA 또는 이로부터 전사되는 mRNA 일 수 있다. 따라서, 상기 유전자에 대한 저해제는 유전자 자체에 결합하여 전사를 방해하거나 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여 mRNA의 해독을 방해하는 저해제일 수 있다.

[0023] 한 구체예에서, 14-3-3β 유전자에 대한 저해제는 14-3-3β 유전자에 대한 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 또는 이를 포함하는 벡터일 수 있다. 이러한 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제작할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 '벡터'는 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 내로 삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명과 관련된 벡터는 상기 유전자를 저해하는 핵산 서열이 게놈 내로 삽입된 벡터로서, 이들 벡터는 DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 효모 벡터, 또는 바이러스 벡터를 예로 들 수 있다.

[0024] 한 구체예에서, 14-3-3β 단백질에 대한 저해제는 14-3-3β 단백질과 결합하여 14-3-3β 단백질과 PPARγ2과의 결합을 차단하는 저해제일 수 있다. 예컨대, 이러한 저해제는 14-3-3β 단백질과 결합하는 펩타이드 또는 화합물 등일 수 있다. 이러한 저해제는 단백질 구조 분석 등의 하기 예시된 스크리닝 방법을 통해 선정될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 설계될 수 있을 것이다. 한 구체예에서, 상기 저해제는 14-3-3β 단백질에 대한 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 이러한 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 항체 제작 방법을 이용하여 제작할 수 있다.

[0025] 14-3-3γ가 과발현되면 PPARγ2의 표적 유전자들의 발현과 지방 축적이 억제되므로 14-3-3γ 유전자 또는 14-3-3γ 단백질은 그 자체로도 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있다.

[0026] 따라서, 본 발명은 14-3-3γ 유전자를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0027] 의약 조성물의 유효성분으로서 포함되는 유전자는 유전자 자체 또는 해당 유전자를 포함하는 벡터의 형태로 의약 조성물 내에 포함될 수 있다. 벡터에 대한 정의는 앞서 설명한 바와 같으며, 이들 벡터의 유형과 제조방법은 당업계에 매우 잘 알려져 있다.

[0028] 본 발명은 또한 14-3-3γ 단백질을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 비알콜성 지방간의 예방 또는 치료용 조성물은 천연형 또는 재조합 14-3-3γ, 이들과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 14-3-3γ 단백질을 포함할 수 있다. 상기 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질에는 천연형/재조합 14-3-3γ 과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.

[0030] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질의 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 14-3-3γ 와 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.

[0031] "기능적 유도체"는 상기 14-3-3γ 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 14-3-3γ 와 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.

[0032] 본 발명의 14-3-3γ 단백질의 유래는 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 척추동물, 바람직하게는 인간, 생쥐, 랫트 등으로부터 기원하는 단백질일 수 있다.

[0033] 일 구체예에 따르면, 본 발명에 사용된 14-3-3γ 은 공지의 서열로부터 당업자에 공지된 유전공학적 방법으로 제조할 수 있다.

[0034] 천연형의 14-3-3γ 를 유전자 재조합 방법에 의하여 단백질을 제조하는 경우 대장균(*E. coli*)이나 곤충 세포를 이용하는 것보다 포유동물 세포를 이용하는 경우가 단백질의 활성도나 용해성 측면에서 천연형의 것과 유사할 것으로 여겨진다.

[0035] 상기 재조합 14-3-3γ 단백질은 통상의 컬럼 크로마토그라피 방법 등을 이용하여 분리할 수 있다. 또한 단백질의 정제 정도는 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE))등으로 확인할 수 있다.

[0036] 본 발명의 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 첨가제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 첨가제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0038] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0039] 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0040] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0041] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료, 또는 뼈 성장 유도 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서, '대상체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 또한, 본 발명은 비알콜성 지방간 의심환자의 시료로부터 14-3-3β 및/또는 14-3-3γ 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정함으로써 비알콜성 지방간의 발병 가능성에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0044] 구체적으로, 본 발명은 비알콜성 지방간 의심환자의 시료로부터 14-3-3β 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는 비알콜성 지방간 진단용 조성물을 제공한다.

[0045] 또한 본 발명은 비알콜성 지방간 의심환자의 시료로부터 14-3-3γ 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는 비알콜성 지방간 진단용 조성물을 제공한다.

[0046] 일 구체예에서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위한 프로브는 상기 mRNA에 대한 핵산 프로브 또는 프라이머일 수 있다.

[0047] 상기 핵산 프로브는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산

(PNA) (M. Egholm *et al., Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O- 알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0048] 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 좋다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0049] 일 구체예에서, 상기 단백질 수준을 측정하기 위한 프로브는 상기 단백질에 대한 항체일 수 있다.

[0050] 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체, 또는 이들의 단편을 사용할 수 있다.

[0051] 상기 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(Zapata *et al., Protein Eng.* 8 (10):1057-1062(1995)); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체 등이 포함된다.

[0052] 항체를 파파인 (papain)으로 분해하면 2개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 단일 항원 결합 부위가 있는 각 "Fab" 단편, 및 그 나머지인 "Fc" 단편이 생성된다. 펩신을 처리하면, 2개의 항원 결합 부위가 있으며 여전히 항원에 교차결합할 수 있는 F(ab ')2 단편이 생성된다. Fv는 완전한 항원인식 및 결합 부위를 포함하는 최소한의 항체 단편이다. 이 부위는 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 영역의 이합체로 구성되며 비공유결합으로 단단히 결합되어 있다.

[0053] 폴리클로날 항체의 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 포유동물에 1회 이상 면역화제를 주입, 필요한 경우 면역보강제와 함께 주입하여 제조할 수 있다. 통상, 면역화제 및(또는) 면역보강제는 포유동물에 피하주사 또는 복강내 주사로 수 회 주입된다. 면역화제는 본 발명의 단백질 또는 이의 융합 단백질일 수 있다. 면역화되는 포유동물에 면역원성이 있는 것으로 공지된 단백질과 함께 면역화제를 주사하는 것이 효과적일 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 모노클로날 항체는 문헌(Kohler et al.,Nature, 256:495 (1975))에 기재된 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국특허 제4,816,576호 참조)으로 제조할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어, 문헌(Clackson *et al., Nature*,352:624-628 (1991) 및 Marks *et al., J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991))에 기재된 기술을 이용하여 파지항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0055] 본 발명에서의 모노클로날 항체는 구체적으로, 목적하는 활성을 발휘한다면 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이 있지만, 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래된 항체 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 또는 그러한 항체의 단편과 동일하거나 상동성이 있는 "키메라" 항체를 포함한다(Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 81:6851-6855 (1984)).

[0056] 비-인간 (예를 들어, 쥐과 동물) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소서열을 포함하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')2 또는 항체의 다른 항원 결합 서열) 이다. 대부분의 경우 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기를 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 생쥐, 쥐 또는 토끼와 같은 인간 이외의 종 (공여자 항체)의 CDR 잔기로 치

환시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체, 또는 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 일반적으로 둘 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 영역에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 영역에 해당한다. 또한, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 일반적으로 인간면역글로불린 영역의 일부를 포함한다 (Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)).

[0057] 본 발명의 비알콜성 지방간 진단용 조성물은 키트의 형태로 포함될 수 있다.

[0058] 상기 키트는 14-3-3β 또는 14-3-3ɣ 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있고, 이들의 정의는 상술한 바와 같다.

[0059] 상기 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus(Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소 보조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며,

[0060] 상기 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 비알콜성 지방간 진단용 조성물은 마이크로어레이의 형태로 포함될 수 있다.

[0062] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 14-3-3β 또는 14-3-3ɣ 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0063] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지될 수 있고, 마이크로어레이 상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명은 상기 14-3-3β 또는 14-3-3ɣ 유전자의 발현수준 또는 그 발현 단백질 수준을 측정하는 방법을 통해 비알콜성 지방간을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데, 보다 구체적으로 상기 방법은, (a) 비알콜성 지방간 의심환자의 생물학적 시료로부터 14-3-3β 또는 14-3-3ɣ 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군 시료로부터 상기 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양을 측정하여 상기 (a) 단계의 측정결과와 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0065] 상기에서 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.

[0066] 상기 생물학적 시료는 비알콜성 지방간의 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있다.

[0067] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블럿 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0068] 상기 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 상기 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성양은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물질, 리간드, 발

광물질, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블럿, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[0069] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양과 비알콜성 지방간 의심환자에서의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현 양의 정도를 대조군과 비교함으로써 비알콜성 지방간의 발병여부, 진행단계 등을 진단할 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명에 따른 상기 비알콜성 지방간의 진단을 위한 정보 제공방법은 본 발명에 따른 14-3-3β 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양이 정상 대조군 시료에 비해 증가되었을 경우, 비알콜성 지방간이 유발되거나 발병 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다. 역으로, 14-3-3γ의 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양이 정상 대조군 시료에 비해 감소되었을 경우, 비알콜성 지방간이 유발되거나 발병 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0071] 본 발명은 또한 14-3-3β 또는 14-3-3γ의 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포를 후보물질과 인체 외에서 접촉시키고,

[0072] 상기 후보물질에 의한 상기 유전자 또는 단백질의 발현량 변화를 측정하는 것을 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0073] 예를 들어, 상기 후보물질이 14-3-3β 유전자 또는 단백질의 발현을 하향조절할 때 지방간 예방 또는 치료용 의약으로 판별할 수 있다. 다르게는 상기 후보물질이 14-3-3γ 유전자 또는 단백질의 발현을 상향조절할 때 지방간 예방 또는 치료용 의약으로 판별할 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명은 14-3-3β 단백질 및/또는 14-3-3γ 단백질을 PPARγ$_2$ 단백질과 함께 후보물질과 접촉시키고, 상기 후보물질에 의한 PPARγ$_2$ 에 대한 14-3-3β 단백질 및/또는 14-3-3γ 단백질의 결합 변화를 측정하는 것을 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0075] 한 구체예에서, 상기 후보물질에 의한 PPARγ$_2$ 에 대한 14-3-3β 단백질 및/또는 14-3-3γ 단백질의 결합 변화 측정은 PPARγ$_2$ 의 Ser273 잔기에 대한 14-3-3β 단백질 및/또는 14-3-3γ 단백질의 결합 변화를 측정함으로써 수행될 수 있다.

[0076] 상기 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 14-3-3β 및/또는 14-3-3γ 유전자 염기서열에서 mRNA, 단백질로의 전사, 번역을 촉진하거나 억제하는 물질 또는 14-3-3β 및/또는 14-3-3γ의 기능 또는 활성을 증진하거나 억제하는 의약으로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 펩타이드, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

[0077] 이후, 후보물질이 처리된 세포에서 상기 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, 상기 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 증가 또는 감소되는 것이 측정되면 상기 후보물질은 지방간을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로 판단할 수 있다.

[0078] 상기에서 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0079] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 14-3-3β 및/또는 14-3-3γ 유전자 발현을 저해/증진시키거나 단백질의 기능을 저해/증진시키는 활성을 나타내는 후보물질이 지방간 예방 또는 치료용 의약의 후보물질이 될 수 있다.

[0080] 이와 같은 지방간 예방 또는 치료용 의약의 후보물질은 이후의 지방간 치료제 개발과정에서 선도물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 14-3-3β 및/또는 14-3-3γ 유전자 또는 그로부터 발현되는 단백질의 기능을 촉진 또는 억제효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 지방간 치료제를 개발할 수 있다.

[0082] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0084] <실험 재료>

[0085] Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Medium 199 (M199), 우태아혈청 (fetal bovine serum (FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, Opti-MEM은 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였다.

[0086] si-14-3-3β 및 si-14-3-3γ siRNA, 항-PPARγ, 항-GFP, 항-GST, 항-Flag, 항-p-Cdk5(Tyr15), 항-Cdk5 및 항-HA, 항-SREBP-1c 항체, Roscovitine은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, 항-p-PPARγ2(Ser273) 항체는 Rockland immunochemicals Inc.(Limerick,PA,USA)에서 구입하였다.

[0087] E-fection plus reagent는 Lugen Sci. (Seoul, South Korea)에서 구입하였다.

[0088] 루시퍼라제 분석 시스템은 Promega Co. (Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

[0089] 피오글리타존 (pioglitazone)과 올레산 (oleic acid)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0090] 트리글리세리드 분석 시스템은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

[0092] **<실시예 1> PPARγ$_2$의 전사활성을 조절하는 14-3-3β와 14-3-3γ의 확인**

[0093] PPARγ$_2$의 전사활성은 간질환 관련 단백질들의 발현에 중요한 역할을 한다. 따라서 PPARγ$_2$에 의해 조절되는 aP2 프로모터를 이용하여 PPARγ$_2$의 전사활성을 측정하였으며, 7종류의 14-3-3단백질들의 역할을 확인하였다.

[0094] 이를 위해, HEK-293T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰당 1×10^5 세포를 씨딩한 후 0.5 ㎍의 aP2 프로모터 구조물과 14-3-3 동형 단백질(α, β, γ, δ, ε, ζ, η, Θ) (0.5㎍) 또는 si-14-3-3β 및 si-14-3-3γ siRNA (5nM과 10nM, Santa Cruz)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 피오글리타존 (pioglitazon; Pio, Santa Cruz) 10 μM을 24시간 처리하였고 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 리포터 라이시스 버퍼 (Promega, Madison, WI)로 웰당 80 ㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수집하고 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 기기는 Luminometer 20/20^n (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA)를 사용하였다. 표준화(Normalization)를 위해서 pSV40-β-갈락토시다아제를 함께 트랜스펙션(cotransfected)하였다. 수집된 상등액은 β-갈락토시다아제 활성을 측정하여 루시퍼라아제 활성을 보정하여 값을 그래프로 나타내었다. 여기에 β-갈락토시다아제 효소 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)이 사용되었고, DU530 spectrophotometer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA)를 사용하여 분석하였다.

[0095] aP2 프로모터 활성 측정결과, 14-3-3β는 PPARγ$_2$의 전사활성을 증가시키며, 14-3-3γ$_2$ 는 PPARγ$_2$의 전사활성을 감소시키는 것을 확인하였다. 그러나 다른 5종류의 동형 단백질에서는 변화가 없었다(도 1A).

[0096] PPARγ$_2$의 전사활성에 14-3-3β와 14-3-3γ$_2$가 관여하는지 정확하게 확인하기 위하여 14-3-3β와 14-3-3γ$_2$를 농도별로 과발현하여 측정한 결과, 14-3-3β의 농도 의존적으로 PPARγ$_2$의 전사활성이 증가하였다 (도 1B). 그러나 14-3-3γ의 경우 농도 의존적으로 PPARγ$_2$의 전사활성을 감소시켰다 (도 1C).

[0097] 반면에, si-14-3-3β를 이용하여 14-3-3β의 발현을 억제할 경우 PPARγ2의 전사활성이 감소하고 (도 1D), 14-3-3γ 발현억제 시 PPARγ2의 전사활성이 증가하였다 (도 1E).

[0098] 따라서, 본 실험결과에 따르면 14-3-3β는 PPARγ$_2$의 전사활성을 증가시키는데 관여하며, 14-3-3γ는 PPARγ$_2$의 전사활성을 억제하는 역할을 하며 서로 반대로 조절하는 유전자로 판단된다.

[0100] **<실시예 2> 14-3-3β와 14-3-3βγ의 PPARγ$_2$와의 결합 확인**

[0101] 전사활성 실험결과 14-3-3β와 14-3-3γ가 PPARγ$_2$의 전사활성을 조절하는 것으로 보아 14-3-3β와 14-3-3γ가 PPARγ$_2$와 결합할 수 있을 것으로 생각되었다.

[0102] 따라서, GST-pull down assay를 수행하여 14-3-3β와 14-3-3γ가 PPARγ$_2$와 결합을 하는지 확인하고자 하였다.

[0103] 이를 위해, HEK-293T 세포를 100mm 플레이트에 각 웰당 2×10^6 세포를 씨딩한 후 Myc-PPARγ$_2$ DNA (4㎍)와 mGST-14-3-3β (4㎍) 또는 mGST-14-3-3γ (4㎍)을 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 피오글리타존 (pioglitazon; Pio, Santa Cruz) 10 μM을 24시간 처리하였고 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 라이시스 버퍼 (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH 7.5, 프로테아제 저해제 첨가)로 웰당 500 ㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 단백질 추출 후 1000㎍의 단백질을 glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 20㎕와 6시간동안 반응시킨 후 beads를 ice-cold PBS 1㎖로 세척하는 과정을 5번 반복하고 beads를 100℃에서 10분간 끓인 후 10% SDS-PAGE 젤로 분리하여 웨스턴 블랏을 하였다. GST 항체 (Santa Cruz)와 Myc 항체 (자체생산)는 1:3000 비율로 사용하였다. 각 단백질 검출을 위해서 West Pico ECL (Thermo scientific, Rockford, IL)을 사용하여 암실에서 확인하였다.

[0104] 그 결과, PPARγ$_2$와 14-3-3β의 결합이 PPARγ$_2$ 리간드인 pioglitazone 처리시 14-3-3β와의 결합이 더욱 강해졌다(도 2A). 14-3-3β와는 반대로 PPARγ$_2$와 14-3-3γ와의 결합은 감소하였다 (도 2B). 이러한 결과는 PPARγ$_2$의 활성화가 진행될 경우 14-3-3β와의 결합이 증가되며, 14-3-3γ와의 결합은 감소되어 이러한 두 단백질에 의해 PPARγ$_2$의 전사활성을 조절하여 타겟 유전자의 발현을 조절할 것으로 판단되었다.

[0106] **<실시예 3> 14-3-3β와 14-3-3βγ가 PPARγ$_2$와 결합하는 도메인 확인**

[0107] PPARγ$_2$ 단백질은 activation function 1 (AF-1, 아미노산 1-138), DNA-binding domain (DBD, 아미노산 139-203), hinge region (아미노산 204-310), activation function 2 (AF-2, 아미노산 311-505) 도메인으로 되어 있다고 보고된 바 있다 (도 3A). 따라서, PPARγ$_2$의 어떠한 도메인 부분에 14-3-3β와 14-3-3γ가 결합하는지 확인하기 위해 GST-pull down assay를 진행하였다.

[0108] HEK-293T 세포를 100mm 플레이트에 각 웰당 2×10^6 세포를 씨딩한 후 Flag-PPARγ$_2$ (1-505) DNA (4㎍), Flag-PPARγ$_2$ (1-310) DNA (4㎍), Flag-PPARγ$_2$ (139-505) DNA (4㎍)와 mGST-14-3-3β (4㎍) 또는 mGST-14-3-3γ (4㎍)을 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. Flag-PPARγ$_2$ (1-310) DNA, Flag-PPARγ$_2$ (139-505) DNA는 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭한 DNA 단편을 *XhoI*과 *ApaI* 제한효소를 이용하여 pCMV-3Tag-1 vector에 클로닝하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 라이시스 버퍼 (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH 7.5, 프로테아제 저해제 첨가)로 웰당 500 ㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 단백질 추출 후 1000㎍의 단백질을 glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 20㎕와 6시간동안 반응시킨 후 beads를 ice-cold PBS 1㎖로 세척하는 과정을 5번 반복하고 beads를 100℃에서 10분간 끓인 후 10% SDS-PAGE 젤로 분리하여 웨스턴 블랏을 하였다. GST 항체 (Santa Cruz)와 Flag 항체 (Santa Cruz)는 1:3000 비율로 사용하였다. 각 단백질 검출을 위해서 West Pico ECL (Thermo scientific, Rockford, IL)을 사용하여 암실에서 확인하였다.

[0109] PPARγ$_2$ 유전자의 야생형 및 2가지의 결실돌연변이와 14-3-3β 또는 14-3-3γ 결합을 확인한 결과, PPARγ$_2$ (1-310) 결실돌연변이와 PPARγ$_2$ (139-505) 결실돌연변이에서 14-3-3β (도 3B)와 14-3-3γ (도 3C)가 결합하였다. 이러한 결과는 14-3-3β와 14-3-3γ는 PPARγ$_2$의 DBD 또는 hinge region과 결합을 의미한다.

[0111] **<실시예 4> 14-3-3β와 14-3-3γ가 결합하는 PPARγ$_2$의 잔기 확인**

[0112] 14-3-3 단백질은 타겟 단백질의 인산화된 잔기에 결합한다고 알려져 있다. PPARγ$_2$의 활성에 관련된 인산화 잔기는 serine 112와 serine 273으로 알려져 있다. 이에 Serine 112와 serine 273 잔기가 인산화 되지 않는 PPARγ$_2$의 돌연변이(PPARγ$_2$ S112A와 S273A)를 제작하여 14-3-3 단백질과의 결합을 GST-pull down assay를 통하여 확인하였다.

[0113] HEK-293T 세포를 100mm 플레이트에 각 웰당 2×10^6 세포를 씨딩한 후 Flag-PPARγ$_2$(WT) DNA (4㎍), Flag-PPARγ$_2$(S112A) DNA (4㎍), Flag-PPARγ$_2$(S273A) DNA (4㎍)와 mGST-14-3-3β (4㎍) 또는 mGST-14-3-3γ (4㎍)을 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. Flag-PPARγ$_2$(S112A) DNA, Flag-PPARγ$_2$(S273A) DNA는 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 증폭한 DNA 단편을 Flag-tagged vector에 클로닝하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 라이시스 버퍼 (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH 7.5, 프로테아제 저해제 첨가)로 웰당 500㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 단백질 추출 후 1000㎍의 단백질을 glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 20㎕와 6시간동안 반응시킨 후 beads를 ice-cold PBS 1㎖로 세척하는 과정을 5번 반복하고 beads를 100℃에서 10분간 끓인 후 10% SDS-PAGE 젤로 분리하여 웨스턴 블랏을 하였다. GST 항체 (Santa Cruz)와 Flag 항체 (Santa Cruz)는 1:3000 비율로 사용하였다. 각 단백질 검출을 위해서 West Pico ECL (Thermo scientific, Rockford, IL)을 사용하여 암실에서 확인하였다.

[0114] 또한, HEK-293T 세포를 12-웰 플레이트에 각 웰당 1×10^5 세포를 씨딩한 후 aP2 프로모터 구조물 (0.5㎍)과 Flag-PPARγ$_2$(S112A) DNA (0.5㎍) 또는 Flag-PPARγ$_2$(S273A) DNA (0.5㎍)와 mGST-14-3-3β DNA (0.5㎍) 또는 mGST-14-3-3γ DNA (0.5㎍)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 리포터 라이시스 버퍼 (Promega, Madison, WI)로 웰당 80 ㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수집하고 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 기기는 Luminometer 20/20^n (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA)를 사용하였다. 표준화(Normalization)를 위해서 pSV40-β-갈락토시다아제를 함께 트랜스펙션(cotransfected)하였다. 수집된 상등액은 β-갈락토시다아제 활성을 측정하여 루시퍼라아제 활성을 보정하여 값을 그래프로 나타내었다. 여기에 β-갈락토시다아제 효소 분석 시스템 (Promega, Madison, WI)이 사용되었고, DU530 spectrophotometer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA)를 사용하여 분석하였다.

[0115] 그 결과, PPARγ$_2$ S273A 돌연변이에서 14-3-3β와 14-3-3γ의 결합이 모두 억제되었다(도 4A와 4B). 또한 14-3-3β의 과발현에 따라 증가된 PPARγ$_2$의 전사활성이 PPARγ$_2$ S273A 돌연변이의 경우 전사활성에 변화가 없었다(도 4C). 또한, 14-3-3γ 과발현시 감소된 PPARγ$_2$의 전사활성이 PPARγ$_2$ S273A 돌연변이의 경우 전사활성에 변화가 없었다(도 4D). 따라서 PPARγ$_2$의 serine 273 잔기에 14-3-3β와 14-3-3γ가 결합하여 PPARγ$_2$의 전사활성을 조절하는 것으로 확인되었다.

[0117] **<실시예 5> 14-3-3β와 14-3-3γ의 PPARγ$_2$와의 경쟁적 결합 확인**

[0118] 이전 실험결과를 통해 14-3-3β와 14-3-3γ가 인산화 된 PPARγ$_2$의 serine 273 잔기에 결합하는 것을 확인하였으며, 동일한 잔기에서의 결합은 두 단백질이 경쟁적으로 결합할 것으로 판단되었다. 따라서, PPARγ$_2$와의 결합에서 14-3-3β와 14-3-3γ가 경쟁적인 결합을 하는지 확인하기 위해 GST-pull down assay를 진행하였다.

[0119] HEK-293T 세포를 100mm 플레이트에 각 웰당 2×10^6 세포를 씨딩한 후 mGST-PPARγ$_2$ DNA (4㎍)와 GFP-14-3-3β DNA (4㎍) 또는 GFP-14-3-3γ DNA (4㎍) 및 HA-14-3-3β DNA (2와 4㎍) 또는 HA-14-3-3γ DNA (2와 4㎍)을 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 피오글리타존 (pioglitazon; Pio,

Santa Cruz) 10 μM을 24시간 처리하였고 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 라이시스 버퍼 (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH 7.5, 프로테아제 저해제 첨가)로 웰당 500㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 단백질 추출 후 1000㎍의 단백질을 glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 20㎕와 6시간동안 반응시킨 후 beads를 ice-cold PBS 1㎖로 세척하는 과정을 5번 반복하고 beads를 100℃에서 10분간 끓인 후 10% SDS-PAGE 젤로 분리하여 웨스턴 블랏으로 각각 (GST, GFP, HA : Santa Cruz)의 항체를 사용해 단백질을 확인하였고, 모든 항체는 1:3000 비율로 사용하였다.

[0120] 그 결과 14-3-3ɣ의 발현량이 증가함에 따라 14-3-3β와 PPARɣ$_2$의 결합이 감소(도 5A)하고, 14-3-3β의 발현량이 증가함에 따라 14-3-3ɣ와 PPARɣ$_2$의 결합이 감소하였다(도 5B). 이는 14-3-3β와 14-3-3ɣ는 인산화 된 PPARɣ$_2$의 serine 273 잔기에 경쟁적으로 결합한다는 것을 보여준다.

[0122] **<실시예 6> 올레산 (Oleic acid)에 의한 PPARɣ$_2$의 발현증가 및 PPARɣ$_2$ 타겟 유전자의 발현 조절**

[0123] 비만 쥐의 간에서 PPARɣ$_2$의 발현 및 활성도가 증가되어 있으며, 그 타겟 유전자의 발현이 증가되어 있다고 알려져 있다. *In vitro* 실험에서 이러한 비만환경을 만들기 위해 지방산의 한 종류인 올레산(Oleic acid: OA)을 처리하여 PPARɣ$_2$ 및 14-3-3β와 14-3-3ɣ의 mRNA 발현량을 확인하였다.

[0124] HepG2와 일차 쥐 간세포를 6-웰 플레이트에 각 웰당 4×10^5 세포를 씨딩한 후 올레산 (oleic acid; OA) 200 μM을 72시간 처리하였다. mRNA추출은 해당 세포를 Trizol (Invitrogen)로 웰당 1㎖를 사용하여 세포를 용해시킨 후 클로로폼 (chloroform) 200 ㎕를 첨가하여 잘 섞은 후 상온에 5분간 두었다가 12,000×g에 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 아이소프로판올 (isopropanol) 500㎕와 섞은 후 10분간 얼음에 두었다가 12,000×g에 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액 (supernatant)을 제거하고 펠릿 (pellet)을 디에틸피로카르본산 (DEPC) 처리된 3차 증류수로 녹였다. 2㎍의 mRNA를 Superscript First Strand cDNA Synthesis Kit (Bioneer, Daejeon, South Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하고 이것을 주형으로 인간의 PPARɣ$_2$, 14-3-3β, 14-3-3ɣ, SREBP-1c, SCD-1, ACC, FABP, FAT/CD36, β-액틴 특이적인 프라미머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭하였고, 쥐의 PPARɣ$_2$, 14-3-3β, 14-3-3ɣ, SREBP-1c, FAT/CD36, GAPDH 특이적인 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 통해 증폭하였다. β-액틴과 GAPDH는 각 세포의 mRNA를 동일량으로 비교한 것인지 알 수 있는 대조군으로서 사용하였다.

[0125] 올레산 농도 의존적으로 PPARɣ$_2$의 mRNA 발현이 증가하였다. 그러나 14-3-3β와 14-3-3ɣ의 mRNA 발현량에는 변화가 없었다(도 6A와 B). 또한 올레산 농도 의존적으로 PPARɣ$_2$ 타겟 유전자인 지방대사 관련 유전자들의 mRNA 발현도 증가하였다(도 6C와 D). 본 실험결과 올레산은 PPARɣ$_2$와 PPARɣ$_2$의 타겟 유전자의 발현을 증가시키며, 14-3-3β와 14-3-3ɣ 발현에는 영향이 없었다. 이 결과로부터 14-3-3β와 14-3-3ɣ의 발현보다는 활성화된 PPARɣ$_2$의 인산화 잔기에 14-3-3β와 14-3-3ɣ의 결합에 의한 전사활성 조절이 중요한 것으로 판단되었다.

[0127] **<실시예 7> 올레산에 의한 PPARɣ$_2$의 타겟 유전자 발현 조절에서 14-3-3β와 14-3-3βɣ의 역할**

[0128] HepG2 세포를 6-웰 플레이트에 각 웰당 4×10^5 세포를 씨딩한 후 GFP-14-3-3β DNA (4㎍) 또는 GFP-14-3-3ɣ DNA (4㎍)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 올레산 (oleic acid; OA) 200 μM을 72시간 처리하였고 mRNA추출은 해당 세포를 Trizol (Invitrogen)로 웰당 1㎖를 사용하여 세포를 용해시킨 후 클로로폼 (chloroform) 200 ㎕를 첨가하여 잘 섞은 후 상온에 5분간 두었다가 12,000×g에 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 아이소프로판올 (isopropanol) 500 ㎕와 섞은 후 10분간 얼음에 두었다가 12,000×g에 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액 (supernatant)을 제거하고 펠릿 (pellet)을 디에틸피로카르본산 (DEPC) 처리된 3차 증류수로 녹였다. 2㎍의 mRNA를 Superscript First Strand cDNA Synthesis Kit (Bioneer, Daejeon, South Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하고 이것을 주형으로 인간의 PPARɣ$_2$, 14-3-3β, 14-3-3ɣ,

SREBP-1c, FAT/CD36, β-액틴 특이적인 프라미머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭하였고, 쥐의 SREBP-1c, FAT/CD36, GAPDH 특이적인 프라이머를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 통해 증폭하였다. β-액틴과 GAPDH는 각 세포의 mRNA를 동일량으로 비교한 것인지 알 수 있는 대조군으로서 사용하였다.

[0129] 또한, 크로마틴 면역침강 분석법 (chromatin immunoprecipitation; ChIP)은 HepG2 세포를 100mm 플레이트에 각 웰당 4×10^6 세포를 씨딩한 후 Flag-PPARγ$_2$ DNA (4㎍)와mGST-14-3-3β DNA (4㎍) 또는 mGST-14-3-3γ DNA (4㎍) 및 si-14-3-3β (20μM, Santa Cruz) 또는 si-14-3-3γ (20μM, Santa Cruz)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 해당 세포를 0.75% 포름알데히드를 15분간 상온에서 처리 후 글리신 (glycine)을 첨가하고 ice-cold PBS에 세포를 긁어내어 1,000×g에 4℃에서 3분간 원심분리하여 상층액 (supernatant)을 제거하고 펠릿 (pellet)을 FA lysis buffer (50 mM HEPES, 150mM NaCl, 2mM EDTA pH8.0, 1% Triton-X100, 0.1% NaDeoxycholate) 400 ㎕로 푼 후 초음파 파쇄기 (sonicator)를 이용하여 high voltage, 30초 파쇄-30초 휴식 조건으로 10분씩 2번 반복 파쇄하였다. 항-Flag 항체 (Santa Cruz)를 이용하여 DNA-단백질 복합체를 면역침강시킨 후 FAT/CD36 프로모터 특이적인 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통해 증폭하였다.

[0130] 또한, HepG2 세포를 6-웰 플레이트에 각 웰당 5×10^5 세포를 씨딩한 후 HA-14-3-3β DNA (1㎍) 또는 HA-14-3-3γ DNA (1㎍)을 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 올레산 (oleic acid; OA) 200 μM을 72시간 처리하였고 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 라이시스 버퍼 (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH 7.5, 프로테아제 저해제 첨가)로 웰당 80 ㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 단백질 추출 후 30㎍의 단백질을 10% SDS-PAGE 젤로 분리하여 웨스턴 블랏으로 각각 (HA, SREBP-1c : Santa Cruz)의 항체를 사용해 단백질을 확인하였고, 모든 항체는 1:3000 비율로 사용하였다.

[0131] 올레산에 의해 증가된 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)와 Fatty acid translocase (FAT)/CD36의 mRNA 발현이 14-3-3β 과발현에 의해 더 증가하였다. 그러나 14-3-3γ 과발현 시 SREBP-1c와 FAT/CD36의 mRNA의 발현이 감소하였다(도 7A 및 도 7B).

[0132] 또한, 크로마틴 면역침강법 (ChIP assay)을 이용하여 FAT/CD36 프로모터에 존재하는 PPARγ$_2$의 결합사이트로 알려진 PPRE (PPAR response element)를 이용하여 PPARγ$_2$의 결합 및 14-3-3β와 14-3-3γ의 발현에 따른 결합력을 확인하였다. 그 결과 FAT/CD36 프로모터에 PPARγ$_2$의 결합이 14-3-3β 과발현에선 증가하며, 14-3-3γ의 과발현시 그 결합이 억제되었다(도 7C, 상단).

[0133] 그러나 14-3-3β의 발현을 억제할 경우 PPARγ$_2$와 14-3-3β의 결합이 떨어지며 14-3-3γ의 발현 억제시 결합력이 증가함을 확인하였다(도 7C, 하단).

[0134] 이 결과는 CD36 유전자의 발현조절을 위해 프로모터 지역에 결합하는 PPARγ$_2$가 14-3-3β에 의해 증가하며 14-3-3γ의해 감소함을 알 수 있다.

[0135] 이러한 PPARγ$_2$의 타겟 유전자의 mRNA 발현조절이 단밸질의 발현에서도 동일하게 나오는지 확인하기 위하여 SREBP-1c 단백질 발현량을 웨스턴 블랏 방법으로 확인하였다. 실험 결과, 14-3-3β 과발현에 의해 SREBP-1c의 단백질 발현이 증가되고 14-3-3γ 과발현에 의해서 감소됨을 확인하였다(도 7D).

[0136] 따라서, 위 실험결과로부터, 지방산의 자극에 의해 PPARγ$_2$ 발현 및 활성화가 증가되고, 증가된 PPARγ$_2$의 전사활성을 14-3-3β와 14-3-3γ가 서로 반대로 조절함을 확인하였다.

[0138] **<실시예 8> PPARγ$_2$ 활성화에 따른 14-3-3β와 14-3-3βγ와의 결합**

[0139] HEK-293T 세포를 100mm 플레이트에 각 웰당 2×10^6 세포를 씨딩한 후 mGST-PPARγ$_2$ DNA (4㎍)와 HA-14-3-3β DNA

(4㎍) 또는 HA-14-3-3γ DNA (4㎍)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 올레산 (oleic acid; OA) 200 μM을 72시간 처리하였고 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 및 라이시스 버퍼 (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 25 mM tris-HCl, pH 7.5, 프로테아제 저해제 첨가)로 웰당 500㎕를 사용하여 세포를 용해시킨 후 10,000×g에 4℃에서 10분간 원심분리하여 단백질 추출 후 1000㎍의 단백질을 glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 20㎕와 6시간동안 반응시킨 후 beads를 ice-cold PBS 1㎖로 세척하는 과정을 5번 반복하고 beads를 100℃에서 10분간 끓인 후 10% SDS-PAGE 젤로 분리하여 웨스턴 블랏으로 각각 (GST, HA : Santa Cruz)의 항체를 사용해 단백질을 확인하였고, 모든 항체는 1:3000 비율로 사용하였다.

[0140] 올레산 처리 시 PPARγ$_2$와 14-3-3β의 결합이 증가(도 8A)되지만 14-3-3γ와의 결합은 감소되었다(도 8B). 현재까지 알려진 보고에 따르면 PPAR-RXR 복합체는 대사조절 및 대사관련 유전자 발현에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 PPAR와 RXR의 복합체형성에 있어서 14-3-3β와 14-3-3γ의 과발현이 영향을 미치는지 확인한 결과, PPARγ$_2$-RXRα의 복합체 형성에는 영향을 주지 않았다(도 8C). 즉, 올레산에 의해 활성이 증가된 PPARγ$_2$는 14-3-3β와의 결합이 증가되며, 14-3-3γ와의 결합은 감소하고, PPARγ$_2$와 RXRα의 복합체 형성에는 관여하지 않았다.

[0142] **<실시예 9> 올레산 처리에 의한 간세포 지방 축적에서 14-3-3β와 14-3-3γ의 역할**

[0143] HepG2 세포와 일차 쥐 간세포를 6-웰 플레이트에 각 웰당 4×10^5 세포를 씨딩한 후 GFP-14-3-3β DNA (1㎍) 또는 GFP-14-3-3γ DNA (1㎍) 및 si-14-3-3β (10μM, Santa Cruz) 또는 si-14-3-3γ (10μM, Santa Cruz)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 올레산 (oleic acid; OA) 200 μM을 72시간 처리하였고 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 후 4% 파라포름알데히드를 이용하여 세포를 고정하였고 6시간동안 실온에서 0.35% Oil Red-O 용액으로 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 아이소프로판올 (isopropanol) 1㎖으로 탈색하여 550 nm 파장으로 DU530 spectrophotometer (Beckman Instruments, Palo Alto, CA)를 사용하여 분석하였다.

[0144] 올레산의 농도 의존적 처리 결과, 일차 쥐 간세포와 HepG2 세포에서 지방 축적이 증가되었다(도 9A). 14-3-3β의 과발현은 올레산에 의한 지방축적을 증가시키고, 14-3-3γ의 과발현은 지방 축적을 감소시켰다(도 9B). 또한, si-14-3-3β를 통해 14-3-3β의 발현을 억제할 경우 지방 축적이 감소되고, 14-3-3γ 발현억제시 지방 축적이 증가되었다(도 9C).

[0145] 본 실험결과는 올레산에 의해 증가된 PPARγ$_2$의 활성을 14-3-3β가 더욱 증가시켜 지방축적이 증가하며, 14-3-3γ는 PPARγ$_2$ 활성을 감소시켜 지방 축적을 감소시킴을 증명한다.

[0147] **<실시예 10> 트리글리세리드 축적에 있어서의 14-3-3β와 14-3-3γ의 역할**

[0148] 트리글리세리드 (Triglyceride; 중성지방)는 지방산의 한 형태로 이는 지방량의 지표로 이용됨. 트리글리세리드를 측정하여 생화학적인 지질검사를 진행함.

[0149] HepG2 세포와 일차 쥐 간세포를 6-웰 플레이트에 각 웰당 4×10^5 세포를 씨딩한 후 GFP-14-3-3β DNA (1㎍) 또는 GFP-14-3-3γ DNA (1㎍) 및 si-14-3-3β (10μM, Santa Cruz) 또는 si-14-3-3γ (10μM, Santa Cruz)를 E-fection plus reagent (Lugen)를 이용하여 트랜스펙션하였다. DNA와 E-fection plus reagent의 비율은 1:2로 사용하였으며 방법은 제조업체의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 트랜스펙션 후 올레산 (oleic acid; OA) 200 μM을 72시간 처리하였고 triglyceride colorimetric assay kit (Cayman Chemical)를 이용하여 트리글리세리드 양을 측정하였다. 해당 세포를 ice-cold PBS로 세척 후 standard diluent assay reagent로 세포를 긁어내고 초음파 파쇄기로 20번 반복하여 세포를 파쇄 후 enzyme buffer solution과 15분간 반응시킨 후 550 nm 파장으로 ELISA reader (Bio-Rad Laboratories, Inc)를 이용하여 측정하였다.

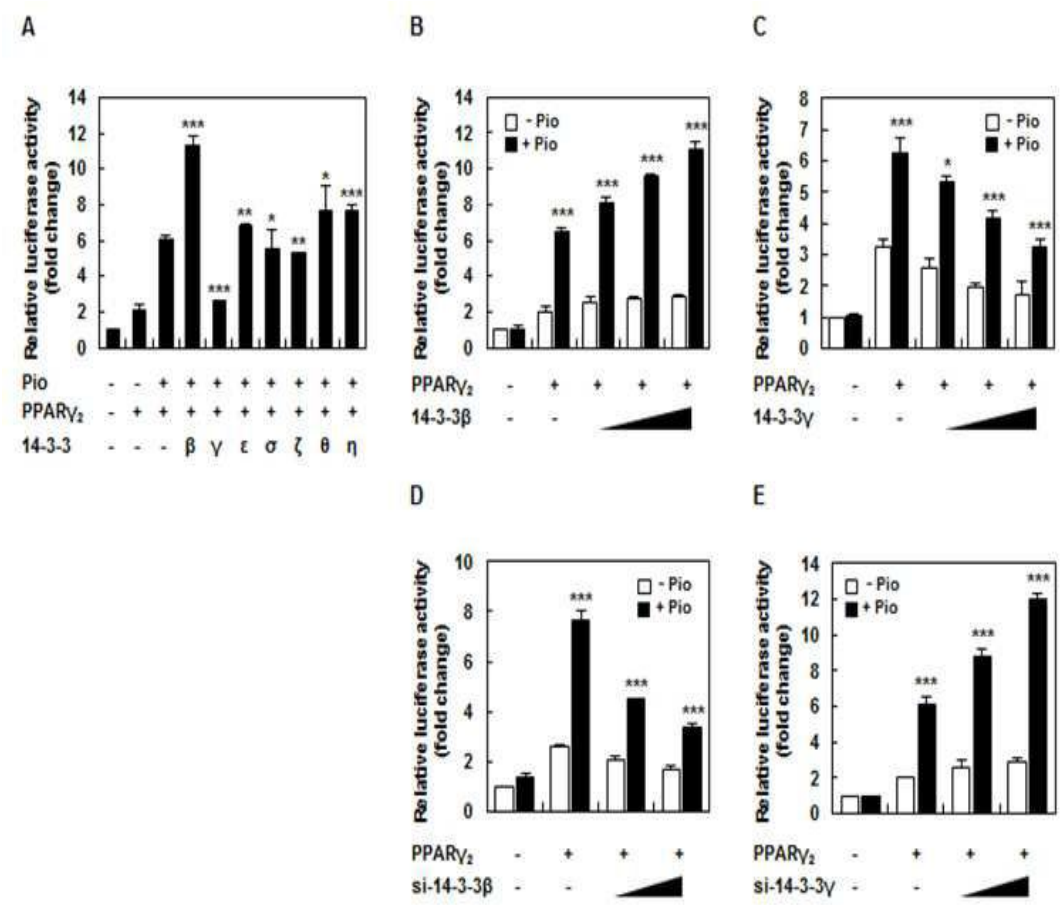
[0150] 지방 축적 결과와 같이 일차 쥐 간세포 올레산 처리시 트리글리세리드 축적이 증가하였으며 14-3-3β 과발현 따

라 트리글리세리드 축적이 더욱 증가되고. 14-3-3γ의 과발현은 트리글리세리드의 축적을 감소시켰다(도 10A). 또한, 14-3-3β 발현억제는 트리글리세리드 축적을 감소시켰고, 14-3-3γ 발현억제는 축적을 증가시켰다(도 10B).

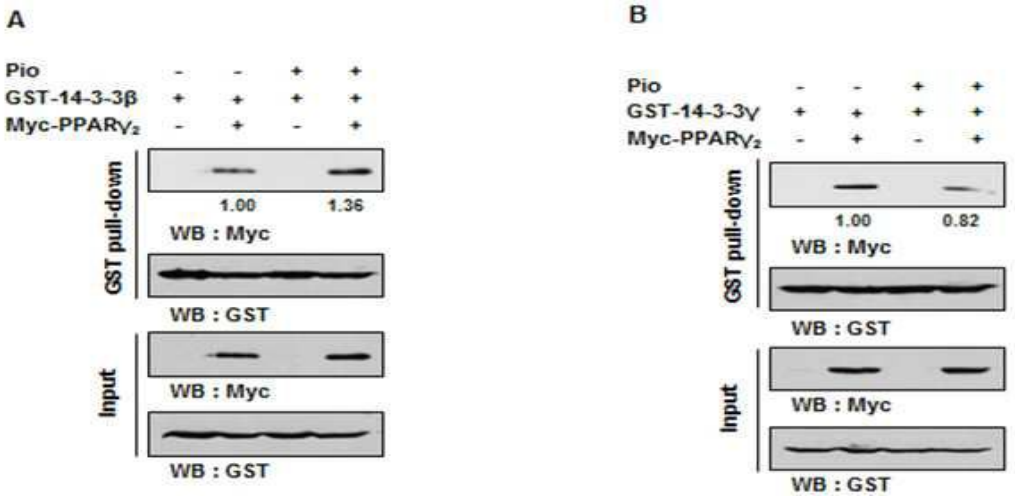
[0152] 상기 모든 결과를 토대로 종합해보면, 14-3-3β와 14-3-3γ는 PPARγ$_2$의 같은 잔기에 결합하여 서로 다르게 PPARγ$_2$의 활성을 조절하고 그 조절은 서로 경쟁적으로 작용함을 알 수 있다. 기초 조건에서는 PPARγ$_2$ S273 잔기에 14-3-3β와 14-3-3γ의 결합이 균형을 이루는 기초대사유지를 하고 지방산이 많은 조건에서는 PPARγ$_2$ S273 잔기에 대한 14-3-3β 결합이 증가하여 지방 축적이 증가하여, 이에 따라 비알콜성 지방간으로 발전하는 것으로 예상된다. 따라서, 14-3-3β와 14-3-3γ 발현량 조절을 통해 PPARγ$_2$ 활성을 조절하면 비알콜성 지방간 예방, 치료할 수 있다.

도면

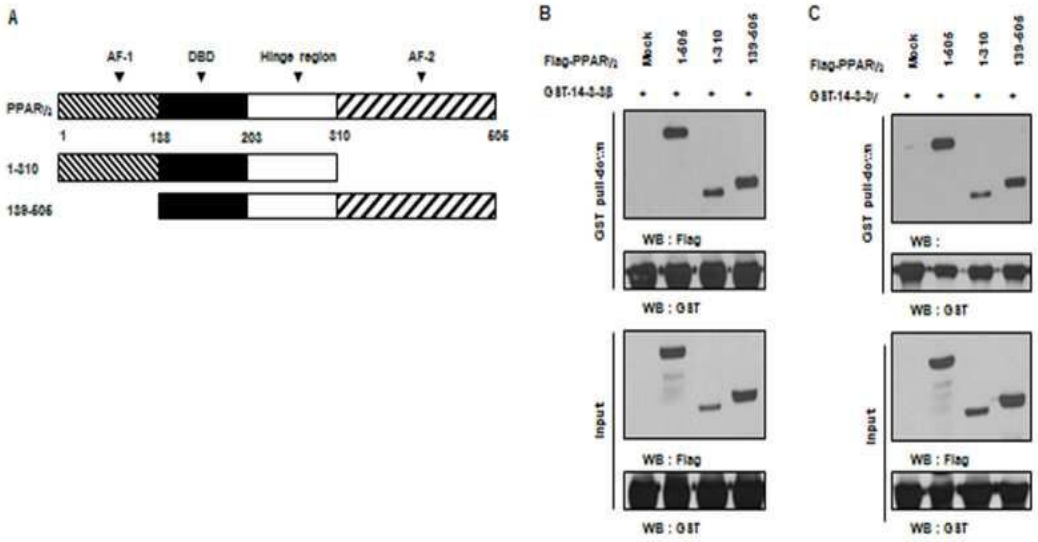
도면1



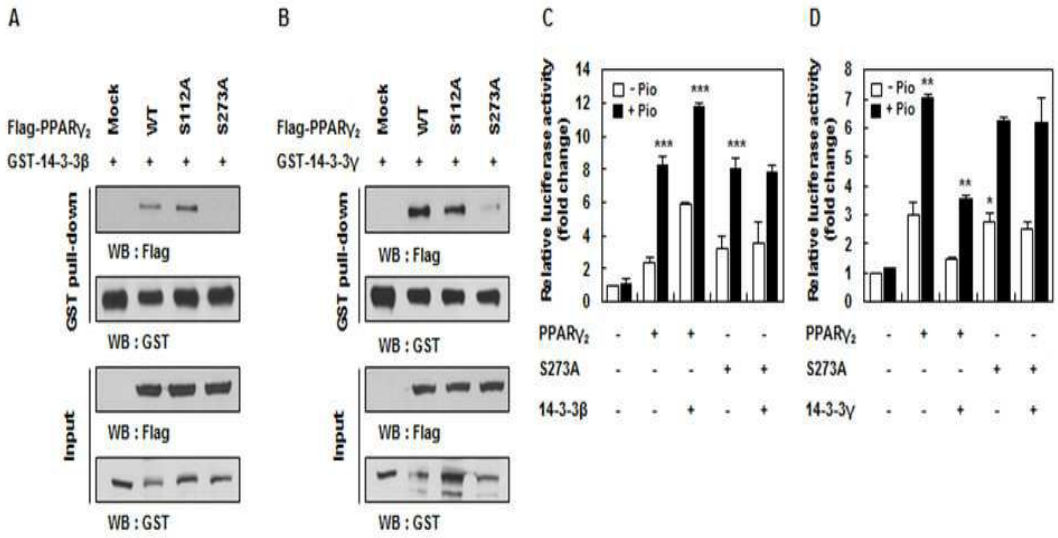
도면2


A
Pio
GST-14-3-3β
Myc-PPARγ2
GST pull-down
1.00
1.36
WB : Myc
WB : GST
Input
WB : Myc
WB : GST
B
Pio
GST-14-3-3γ
Myc-PPARγ2
GST pull-down
1.00
0.82
WB : Myc
WB : GST
Input
WB : Myc
WB : GST

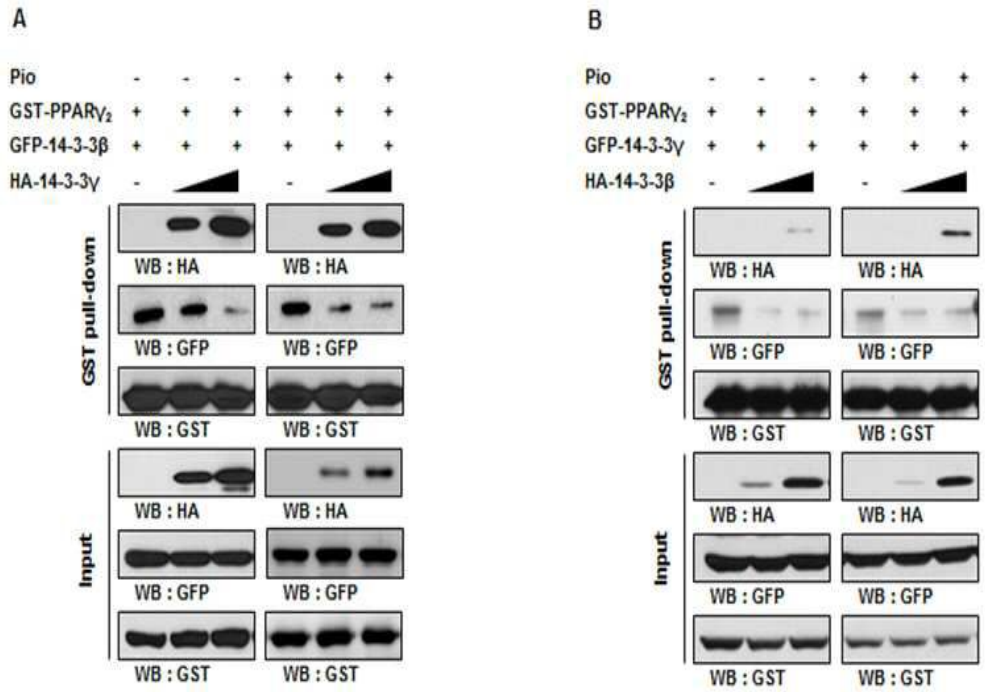
도면3


A
AF-1
DBD
Hinge region
AF-2
PPARγ2
1
138
203
310
606
1-310
139-606
B
Flag-PPARγ2
Mock
1-606
1-310
139-606
GST-14-3-3β
GST pull-down
WB : Flag
WB : GST
Input
WB : Flag
WB : GST
C
Flag-PPARγ2
Mock
1-606
1-310
139-606
GST-14-3-3γ
GST pull-down
WB :
WB : GST
Input
WB : Flag
WB : GST

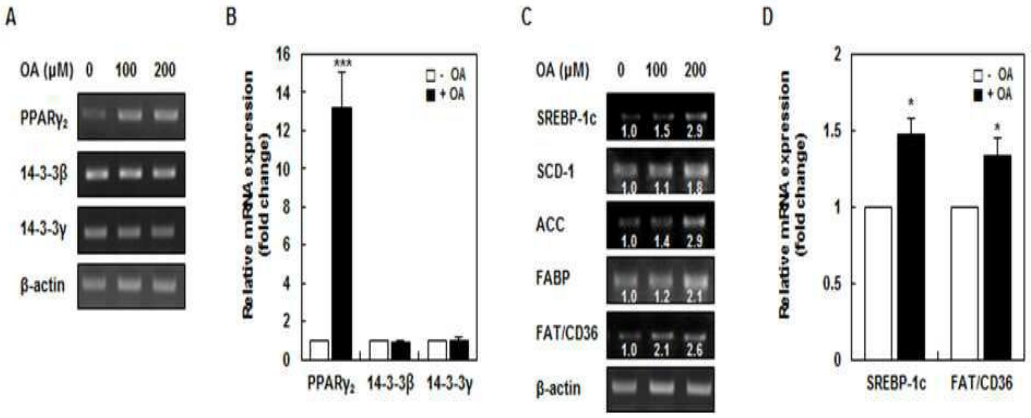
도면4


A
B
C
D
Flag-PPARγ2
GST-14-3-3β
GST-14-3-3γ
Mock
WT
S112A
S273A
GST pull-down
Input
WB : Flag
WB : GST
Relative luciferase activity (fold change)
- Pio
+ Pio
PPARγ2
S273A
14-3-3β
14-3-3γ

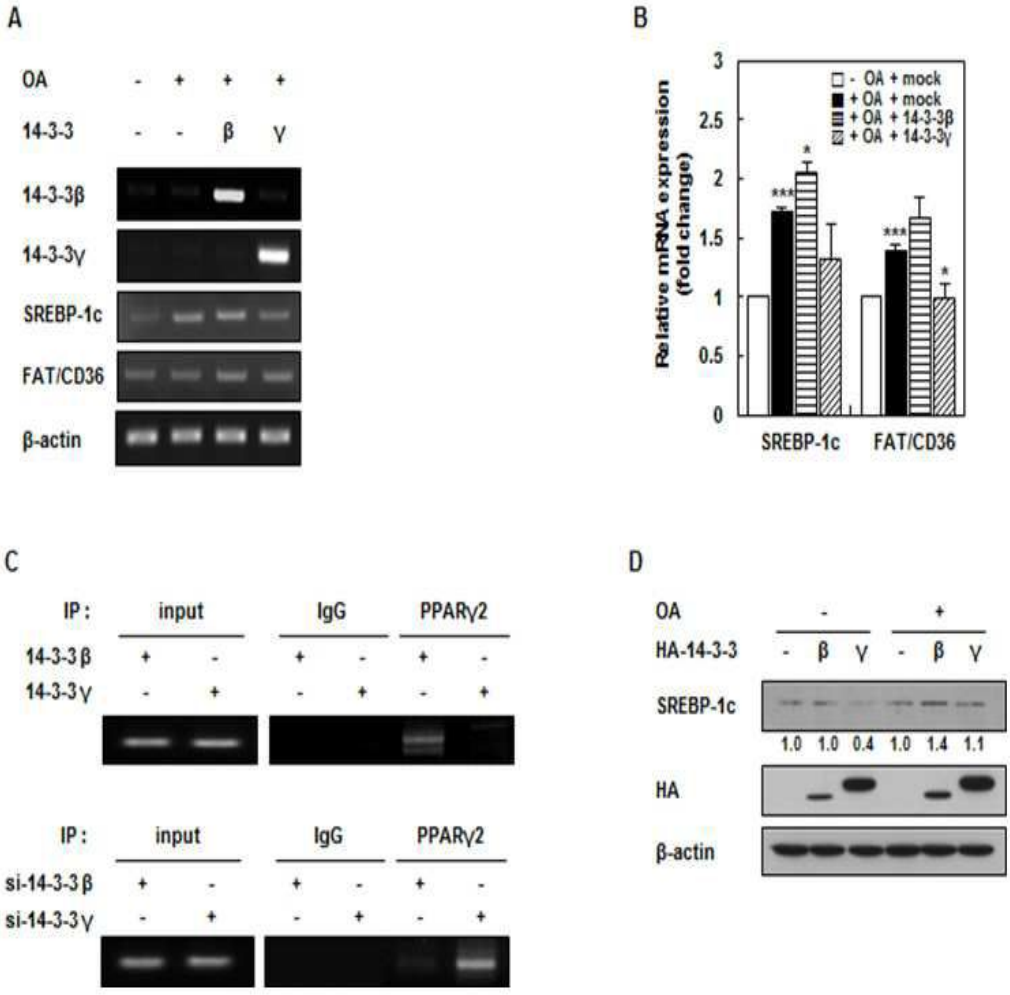
도면5


A
B
Pio
GST-PPARγ2
GFP-14-3-3β
GFP-14-3-3γ
HA-14-3-3γ
HA-14-3-3β
GST pull-down
Input
WB : HA
WB : GFP
WB : GST

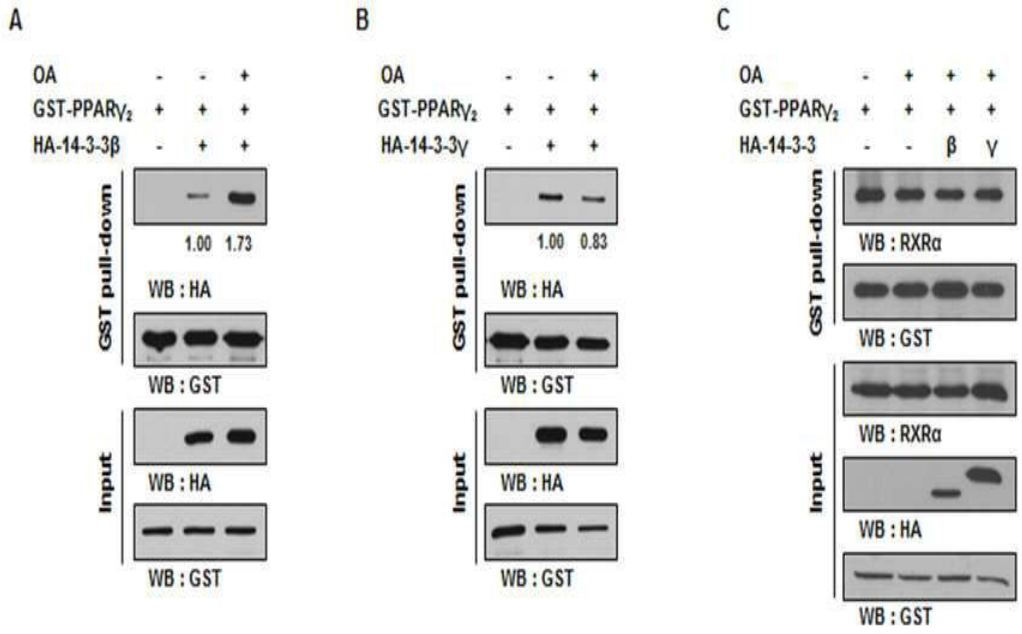
도면6


A
OA (μM) 0 100 200
PPARγ2
14-3-3β
14-3-3γ
β-actin
B
Relative mRNA expression (fold change)
- OA
+ OA
PPARγ2 14-3-3β 14-3-3γ
C
OA (μM) 0 100 200
SREBP-1c
SCD-1
ACC
FABP
FAT/CD36
β-actin
D
Relative mRNA expression (fold change)
SREBP-1c FAT/CD36

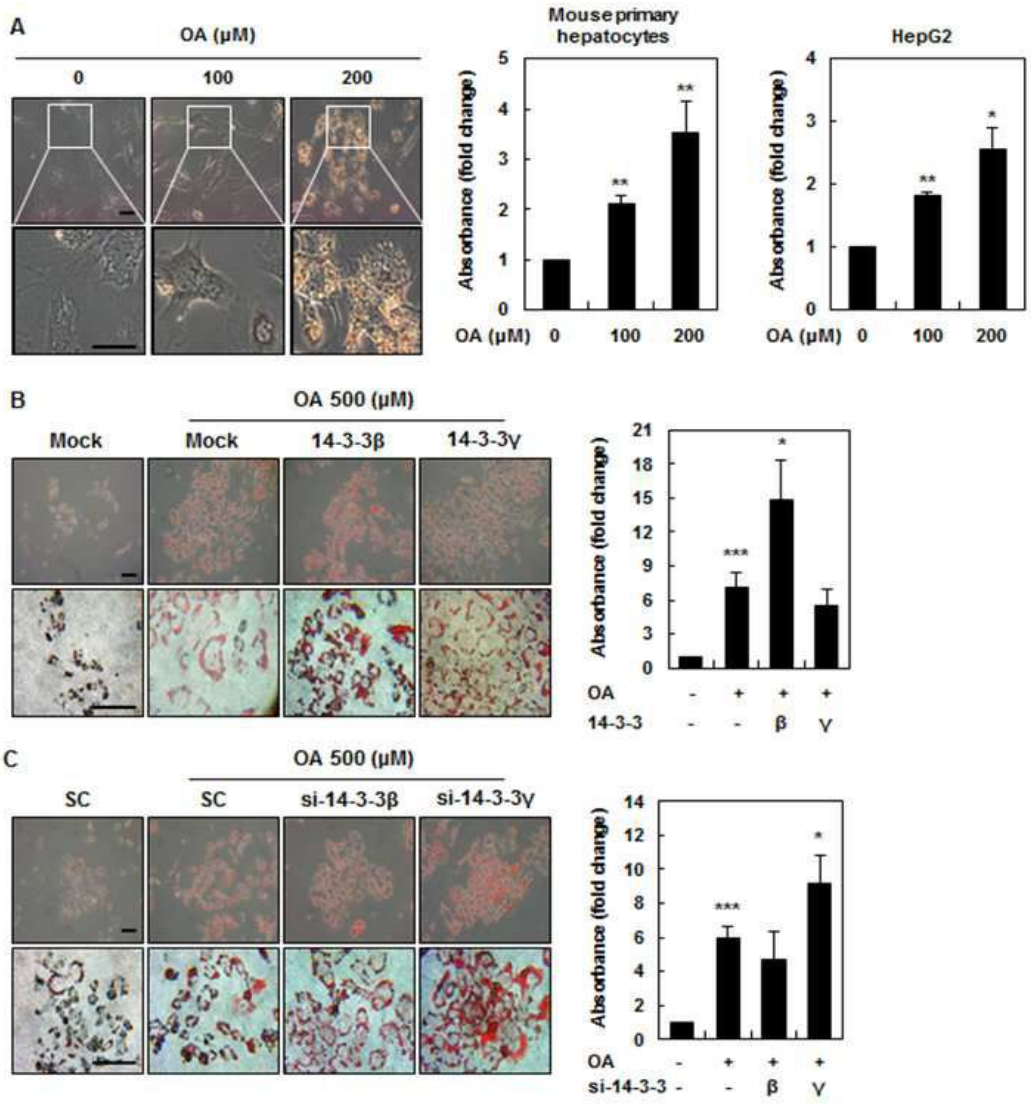
도면7


A
OA
14-3-3
14-3-3β
14-3-3γ
SREBP-1c
FAT/CD36
β-actin
B
Relative mRNA expression (fold change)
- OA + mock
+ OA + mock
+ OA + 14-3-3β
+ OA + 14-3-3γ
SREBP-1c FAT/CD36
C
IP : input IgG PPARγ2
14-3-3β
14-3-3γ
IP : input IgG PPARγ2
si-14-3-3β
si-14-3-3γ
D
OA
HA-14-3-3
SREBP-1c
1.0 1.0 0.4 1.0 1.4 1.1
HA
β-actin

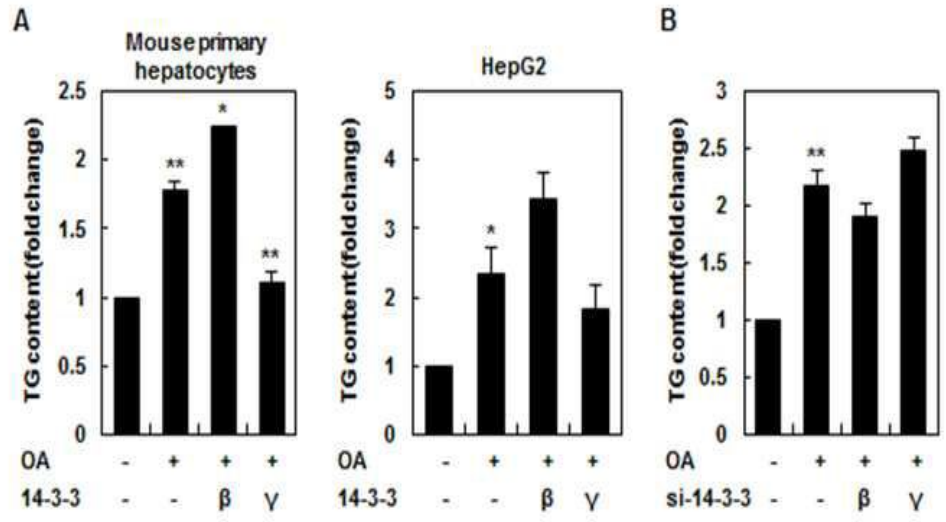
도면8


A
OA - - +
GST-PPARγ2 + + +
HA-14-3-3β - + +
GST pull-down
1.00 1.73
WB : HA
WB : GST
Input
WB : HA
WB : GST
B
OA - - +
GST-PPARγ2 + + +
HA-14-3-3γ - + +
GST pull-down
1.00 0.83
WB : HA
WB : GST
Input
WB : HA
WB : GST
C
OA - + + +
GST-PPARγ2 + + + +
HA-14-3-3 - - β γ
GST pull-down
WB : RXRα
WB : GST
Input
WB : RXRα
WB : HA
WB : GST

도면9


A
OA (μM)
0
100
200
Mouse primary hepatocytes
HepG2
Absorbance (fold change)
OA (μM) 0 100 200
B
OA 500 (μM)
Mock
Mock
14-3-3β
14-3-3γ
OA
14-3-3
C
OA 500 (μM)
SC
SC
si-14-3-3β
si-14-3-3γ
OA
si-14-3-3

도면10


A
Mouse primary hepatocytes
HepG2
TG content(fold change)
OA
14-3-3
B
OA
si-14-3-3