



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109805
(43) 공개일자 2024년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/033 (2014.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0332 (2013.01)
G01N 33/5085 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0001776
(22) 출원일자 2023년01월05일
심사청구일자 2023년01월05일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김경원
강원도 춘천시 방송길 70 온의롯데캐슬스카이크래
스 104동 2202호
최수지
강원도 홍천군 내면 구룡령로 6461
이유리
강원도 춘천시 지석로 64, 603동 1205호
(74) 대리인
특허법인본

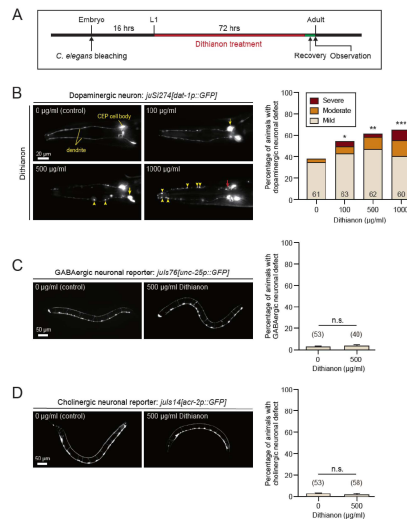
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 디티아논에 의해 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2227/703 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)
G01N 2333/43534 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711159451
과제번호	2019M3C7A1031836
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발
연구과제명	다중 동물모델의 신경생물학적 정밀분석을 통한 환경 유해물질의 뇌발달장애 유발기
전 분석과 진단 및 제어원천기술 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강원대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

디티아논(dithianon)에 의해 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경독성은 도파민 신경세포의 손상에 의한 것인, 예쁜꼬마선충.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 활성산소종의 발현이 증가되는, 예쁜꼬마선충.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 운동능력이 감소된, 예쁜꼬마선충.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 표피 세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도되는, 예쁜꼬마선충.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 *drp-1 mRNA*의 발현량이 증가되는, 예쁜꼬마선충.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 산화스트레스 반응 유전자인 *gst-4* 발현이 증가되는, 예쁜꼬마선충.

청구항 8

하기의 단계를 포함하는, 제1항의 예쁜꼬마선충 제조방법:

예쁜꼬마선충을 대장균이 포함된 성장 배지에서 배양하는 단계;

디티아논을 포함하는 조성물을 예쁜꼬마선충에 처리하는 단계; 및

도파민 신경세포의 손상을 나타내는 예쁜꼬마선충을 스크리닝하는 단계

청구항 9

제9항에 있어서,

상기 스크리닝하는 단계는 형광 광학현미경으로 관찰하여 수행되는, 예쁜꼬마선충 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

표피세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도되는 예쁜꼬마선충을 추가로 스크리닝하는 단계를 포함하는, 예쁜꼬마선충 제조방법.

청구항 11

제1항의 예쁜꼬마선충을 이용한, 도파민 신경 손상 관련 질환의 후보 치료제 스크리닝 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 도파민 신경 손상 관련 질환은 파킨슨병인, 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 후보 치료제는 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물 및 세포 추출액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 1871년에 James Parkinson이라는 의사에 의해 처음 알려진 질병으로, 중뇌 흑질 부분에 존재하는 도파민 신경(Dopaminergic neuron)의 소실로 인해 떨림, 서동, 경직, 보행장애를 포함한 운동성 증상과 치매, 우울증, 변비를 포함한 비운동성 증상을 보이는 대표적인 퇴행성 신경 질환이다. 파킨슨병의 병리학적 특징은 Lewy body와 Lewy neurites 형태의 α -synuclein 응집체가 신경에 축적되어 신경세포 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 전체 파킨슨병 환자 중 15% 만이 DJ-1, SNCA, PARKIN과 같은 파킨슨병-연관 유전자의 돌연변이로 인한 유전적 요인으로 일어나며, 대부분은 주로 환경오염물질에 의한 환경적 요인으로 발생한다. 파킨슨병을 유발하는 환경적 요인은 나노 입자, 금속, 농약 등이 있으며, 특히 농약의 만성적인 노출은 파킨슨병을 유발하는 주요한 요인이다.

[0003] Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride)은 파킨슨병을 유발한다고 알려진 MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium ion)와 화학 구조가 비슷하다고 알려진 제초제이다. Paraquat은 미토콘드리아에서 세포의 산화-환원 불균형을 유발하여 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)를 생성한다. 이렇게 Paraquat에 의해 유도된 활성산소는 전자전달계 complex I을 손상시키고 미토콘드리아의 기능을 억제하여 결국 도파민 신경을 파괴한다. 또한 Paraquat의 급성과 만성적인 노출은 파킨슨병을 2배 이상 증가시킨다. 이러한 위험성으로 인해 대부분의 유럽 국가에서는 금지하고 있으나 아직도 미국을 포함한 100여 국가에서는 Paraquat을 사용하고 있다. 또한 Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)는 Paraquat과 마찬가지로 파킨슨병의 유발을 상당히 증가시키는 것으로 알려진 Organochloride 계열의 살충제이다. 파킨슨병 환자 사후 뇌 조직에서 DDT의 대사산물이 확인되었으며, DDT는 반감기가 최대 30년이기 때문에 과도한 DDT의 축적은 파킨슨병과 같은 심각한 질병을 초래할 수 있다.

[0004] 본 연구에 사용된 농약의 주요 유효성분인 디티아논(dithianon) (5,10-dioxo-5,10-dihydronaphtho[2,3-b][1,4]dithiin)은 quinone 계통의 살균제로써, 채소, 커피, 감귤류, 포도에서 발생하는 각종 곰팡이병을 관리하기 위해 농업에서 광범위하게 사용된다. 이전 연구에 따르면, 디티아논은 *S. cerevisiae* (효모)의 생존을 감소시키고 활성산소 발생을 유발한다. 게다가, Mitochondrial Membrane Potential (MMP)를 감소시키고 결국 necrotic cell death을 유도한다. 또한 디티아논은 bumblebee에서 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (mGPDH)와 succinate dehydrogenase (SDH)를 억제한다. 다시 말해 Electron Transport Chain (ETC) complex II 억제자로써 작용한다.

[0005] 미토콘드리아는 대부분 진핵세포에서 발견되며 주로 ATP 생합성과 apoptosis 등 많은 세포 기능에 관여한다. 또한 신경에서 미토콘드리아는 신경 간의 연결을 형성하고 유지하며 신경에 필요한 대사산물을 생산하는 데 중요한 역할을 한다. 따라서, 미토콘드리아는 fission과 fusion 사이의 균형을 통해 미토콘드리아 수와 형태를 조절하고 mitochondrial dynamics 항상성을 유지한다. 하지만 mitochondrial dynamics는 산화스트레스와 같은 세포 내 스트레스에 의해 쉽게 균형이 깨지게 되는데, 이러한 불균형은 암, 면역 질환, 대사 질환, 퇴행성 신경질환 등 많은 질병에 영향을 미친다. 게다가, 환경적 요인으로 인한 과도한 mitochondrial dynamics의 불균형은 미토콘드리아 fission의 주요 조절자인 outer membrane dynamin-related protein 1 (Drp1)-dependent fission의 증가를 유도하여 활성산소의 생산을 증가시키고 신경 퇴행을 초래한다.

[0006] *Caenorhabditis elegans* (예쁜꼬마선충)는 발달생물학, 신경생물학, 유전학 연구를 위한 주요 동물 모델로, 1960년대 Sydney Brenner에 의해 모델 동물로 도입된 이후 현대 생물학의 다양한 영역에서 활발히 연구되고 있다. 예쁜꼬마선충의 생활사는 한 마리의 자웅동체에서 알을 대략 300개를 생산하는데, 배발생 이후 first larval stage으로 부화하고 탈피를 통한 네 번의 유충시기(L1 - L4)를 거쳐 성체로 성장한다. 예쁜꼬마선충은 신경계 구조가 모두 밝혀져 있으며, 도파민(Dopamine), 가바(gamma-Aminobutyric acid; GABA), 세로토닌(Serotonin), 글루타메이트(Glutamate), 아세틸콜린(Acetylcholine) 등 인간을 포함한 많은 종에서 보존된 신경전달물질을 사용한다. 또한 예쁜꼬마선충은 몸이 투명하기 때문에, 형광 단백질을 이용하여 특정 신경세포와 단백질을 직접 시각화 할 수 있는 장점이 있어 세포 수준에서 관찰하기 쉽다. 따라서, 예쁜꼬마선충은 환경유해물질에 의한 신경독성평가를 하는 데 아주 좋은 실험모델이라고 할 수 있다.

[0007] 파킨슨병은 중뇌 흑색질 부분에 도파민의 소실로 인해 생기는 신경퇴행성 질환으로 신경세포 내 산화스트레스를 유발하여 미토콘드리아 절편화를 유도하고 결국에는 신경 퇴행을 초래하는 것으로 알려져 있다. 농약은 파킨슨병과 같은 인체 뇌 질환을 유발하는 잠재적인 화학유해물질임에도 불구하고 여전히 농업, 레저 등에서 광범위하게 사용되고 있다. 특히 임산부, 유아 또는 농약에 계속 노출되는 농부들의 경우 파킨슨병에 더 취약하다. 하지만 in vivo에서 농약의 만성적인 노출과 파킨슨병 발병 사이에 어떠한 연관이 있는지는 잘 알려지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 예쁜꼬마선충을 이용하여 농약의 주요 유효성분인 디티아논을 만성적으로 각각 노출하였을 때, 신경구조에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고 또한 신경-매개 행동, 산화스트레스 반응, 미토콘드리아 절편화 관찰을 통해 파킨슨병과의 연관성을 연구하였다. 본 연구를 통해 환경유해물질인 농약이 산화스트레스 반응을 유도하고 미토콘드리아 절편화를 증가시켜 도파민 신경독성을 유발하는 것을 확인하였으며, 이러한 결과를 토대로 농약에 의해 유발된 신경독성이 파킨슨병의 유발 기작과 증상이 유사함을 제안하고자 한다.

선행기술문헌

- [0008] 1. Raza, C., R. Anjum, and N.U.A. Shakeel, Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. Life Sci, 2019. 226: p. 77-90.
- [0009] 2. Deng, H., P. Wang, and J. Jankovic, The genetics of Parkinson disease. Ageing Res Rev, 2018. 42: p. 72-85.
- [0010] 3. Islam, M.S., et al., Pesticides and Parkinson's disease: Current and future perspective. J Chem Neuroanat, 2021. 115: p. 101966.
- [0011] 4. Kim, Y., et al., Parkinson's disease in a worker exposed to insecticides at a greenhouse. Annals of Occupational and Environmental Medicine, 2021. 33(1).
- [0012] 5. Richardson, J.R., et al., Neurotoxicity of pesticides. Acta Neuropathol, 2019. 138(3): p. 343-362.
- [0013] 6. Mahmood, I., et al., Effects of Pesticides on Environment, in Plant, Soil and Microbes. 2016. p. 253-269.
- [0014] 7. Alengebawy, A., et al., Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. Toxics, 2021. 9(3).
- [0015] 8. Baltazar, M.T., et al., Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. Toxicol Lett, 2014. 230(2): p. 85-103.
- [0016] 9. Perez-Lucas, G., et al., Environmental Risk of Groundwater Pollution by Pesticide Leaching through the Soil Profile. Pesticides - Use and Misuse and Their Impact in the Environment, 2019.

- [0017] 10. Helley, M.P., et al., Mitochondria: A Common Target for Genetic Mutations and Environmental Toxicants in Parkinson's Disease. *Front Genet*, 2017. 8: p. 177.
- [0018] 11. Tatjana, V., S. Domitille, and S. Jean-Charles, Paraquat-induced cholesterol biosynthesis proteins dysregulation in human brain microvascular endothelial cells. *Sci Rep*, 2021. 11(1): p. 18137.
- [0019] 12. Rossi, M., et al., Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) induced extracellular vesicle formation: a potential role in organochlorine increased risk of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2017. 77(2): p. 113-117.
- [0020] 13. Hatcher, J.M., K.D. Pennell, and G.W. Miller, Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. 29(6): p. 322-9.
- [0021] 14. van den Berg, H., Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(11): p. 1656-63.
- [0022] 15. van den Berg, H., G. Manuweera, and F. Konradsen, Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases. *Malar J*, 2017. 16(1): p. 401.
- [0023] 16. Girones, L., et al., Spatial Distribution and Ecological Risk Assessment of Residual Organochlorine Pesticides (OCPs) in South American Marine Environments. *Curr Environ Health Rep*, 2020. 7(2): p. 147-160.
- [0024] 17. Coleman, M.D., et al., A preliminary investigation into the impact of a pesticide combination on human neuronal and glial cell lines in vitro. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42768.
- [0025] 18. Scariot, F.J., et al., Necrotic cell death induced by dithianon on *Saccharomyces cerevisiae*. *Pestic Biochem Physiol*, 2018. 149: p. 137-142.
- [0026] 19. Syromyatnikov, M.Y., et al., Method for detection of mtDNA damages for evaluating of pesticides toxicity for bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Pestic Biochem Physiol*, 2020. 169: p. 104675.
- [0027] 20. Syromyatnikov, M.Y., et al., Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). *Pestic Biochem Physiol*, 2017. 135: p. 41-46.
- [0028] 21. Santos, D. and S.M. Cardoso, Mitochondrial dynamics and neuronal fate in Parkinson's disease. *Mitochondrion*, 2012. 12(4): p. 428-37.
- [0029] 22. Mandal, A. and C.M. Drerup, Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons. *Front Cell Neurosci*, 2019. 13: p. 373.
- [0030] 23. Westermann, B., Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(12): p. 872-84.
- [0031] 24. Ren, Z., et al., Mitochondrial Dynamics Imbalance: A Strategy for Promoting Viral Infection. *Front Microbiol*, 2020. 11: p. 1992.
- [0032] 25. Yan, X., et al., Abnormal Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, 2020. 14: p. 138.
- [0033] 26. Zhao, Y., et al., Translocation, transfer, and in vivo safety evaluation of engineered nanomaterials in the non-mammalian alternative toxicity assay model of nematode *Caenorhabditis elegans*. *RSC Advances*, 2013. 3(17).
- [0034] 27. Corsi, A.K., B. Wightman, and M. Chalfie, A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 2015: p. 1-31.
- [0035] 28. Youssef, K., A. Tandon, and P. Rezai, Studying Parkinson's disease using *Caenorhabditis elegans* models in microfluidic devices. *Integr Biol (Camb)*, 2019. 11(5): p. 186-207.
- [0036] 29. Haun, F., T. Nakamura, and S.A. Lipton, Dysfunctional Mitochondrial Dynamics in the

Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases. *J Cell Death*, 2013. 6: p. 27-35.

- [0037] 30. Chin-Chan, M., J. Navarro-Yepes, and B. Quintanilla-Vega, Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*, 2015. 9: p. 124.
- [0038] 31. Iarkov, A., et al., Strategies for the Treatment of Parkinson's Disease: Beyond Dopamine. *Front Aging Neurosci*, 2020. 12: p. 4.
- [0039] 32. Caldwell, K.A., C.W. Willicott, and G.A. Caldwell, Modeling neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Dis Model Mech*, 2020. 13(10).
- [0040] 33. Fitsanakis, V.A., *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model System for Pesticide Neurotoxicity. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 2012. 01(S4).
- [0041] 34. Giacomello, M., et al., The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020. 21(4): p. 204-224.
- [0042] 35. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(3): p. 205-14.
- [0043] 36. Hemmati-Dinarvand, M., et al., Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. *Neurosci Lett*, 2019. 709: p. 134296.
- [0044] 37. Millichap, L.E., et al., Targetable Pathways for Alleviating Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration of Metabolic and Non-Metabolic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(21).
- [0045] 38. Inoue, H., et al., The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev*, 2005. 19(19): p. 2278-83.
- [0046] 39. Moreno-Arriola, E., et al., *Caenorhabditis elegans*: A useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. 2014: p. 705253.
- [0047] 40. White, J.G., et al., The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1986. 314(1165): p. 1-340.
- [0048] 41. Kim, H., et al., Gene-by-environment interactions that disrupt mitochondrial homeostasis cause neurodegeneration in *C. elegans* Parkinson's models. *Cell Death Dis*, 2018. 9(5): p. 555.
- [0049] 42. Hartman, J.H., et al., Genetic Defects in Mitochondrial Dynamics in *Caenorhabditis elegans* Impact Ultraviolet C Radiation- and 6-hydroxydopamine-Induced Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(13).
- [0050] 43. Zhang, X., et al., Drpl, a potential therapeutic target for Parkinson's disease, is involved in olfactory bulb pathological alteration in the Rotenone-induced rat model. *Toxicol Lett*, 2020. 325: p. 1-13.
- [0051] 44. Labrousse, A.M., et al., *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular cell*, 1999. 4 5: p. 815-26.
- [0052] 45. Qi, X., et al., A novel Drpl inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J Cell Sci*, 2013. 126(Pt 3): p. 789-802.
- [0053] 46. Ray, A., et al., Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neurodegeneration elicited by a bacterial metabolite in a *C. elegans* Parkinson's model. *Cell Death Dis*, 2014. 5: p. e984.
- [0054] 47. Blackwell, T.K., et al., SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*, 2015. 88(Pt B): p. 290-301.
- [0055] 48. Ribas, V., C. Garcia-Ruiz, and J.C. Fernandez-Checa, Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol*, 2014. 5: p. 151.

- [0056] 49. Zecic, A. and B.P. Braeckman, DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and Its Role in Metabolic Remodeling. *Cells*, 2020. 9(1).
- [0057] 50. Nguyen, N.H., G.B. Tran, and C.T. Nguyen, Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J Mol Med (Berl)*, 2020. 98(1): p. 59-69.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0058] 본 발명은 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0059] 본 발명은 또한, 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0060] 본 발명은 또한, 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델을 이용한, 도파민 신경 손상 관련 질환의 후보 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0061] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0062] 본 발명은 디티아논에 의해 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 제공한다.
- [0063] 상기 예쁜꼬마선충은 도파민 신경 손상 관련 질환 동물모델용일 수 있다.
- [0064] 상기 신경독성은 도파민 신경세포의 손상에 의한 것일 수 있다.
- [0065] 상기 도파민 신경세포의 손상은 디티아논에 대해 농도 의존적일 수 있다.
- [0066] 상기 예쁜꼬마선충은 상기 디티아논에 의해 운동능력이 감소될 수 있다.
- [0067] 상기 예쁜꼬마선충은 상기 디티아논에 의해 활성산소종의 발현이 증가될 수 있다.
- [0068] 상기 예쁜꼬마선충은 상기 디티아논에 의해 산화스트레스 반응 유전자인 *gst-4* 발현이 증가될 수 있다.
- [0069] 상기 디티아논에 의해 표피세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도될 수 있다.
- [0070] 상기 디티아논에 의해 *drp-1 mRNA*의 발현량이 증가될 수 있다.
- [0071] 본 발명은 또한, 하기의 단계를 포함하는, 예쁜꼬마선충 제조방법을 제공한다:
- [0072] 예쁜꼬마선충을 대장균이 포함된 성장 배지에서 배양하는 단계; 디티아논을 포함하는 조성물을 예쁜꼬마선충에 처리하는 단계; 및 도파민 신경세포의 손상을 나타내는 예쁜꼬마선충을 스크리닝하는 단계.
- [0073] 상기 스크리닝하는 단계는 모두 형광 광학현미경으로 관찰하여 수행될 수 있다.
- [0074] 상기 제조방법은 표피 세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도되는 예쁜꼬마선충을 추가로 스크리닝하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명은 또한, 상기 예쁜꼬마선충을 이용한, 도파민 신경 손상 관련 질환의 후보 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0076] 상기 도파민 신경 손상 관련 질환은 파킨슨병일 수 있다.
- [0077] 상기 후보 치료제는 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물 및 세포 추출액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명은 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델을 제공할 수 있다.
- [0079] 본 발명은 또한, 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0080] 본 발명은 또한, 신경독성이 유도된 예쁜꼬마선충 동물모델을 이용한, 도파민 신경 손상 관련 질환의 후보 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1은, 디티아논 용량 의존적으로 도파민성 뉴런 손상의 수를 증가시킨 결과를 나타낸 도이다: A는 실험 과정의 개략도; B의 왼쪽 패널은 디티아논 노출 시 손상된 도파민 신경세포[dat-1p::gfp]의 대표적인 이미지(노란색 화살표는 수상돌기 퇴행 표현형을, 빨간색 화살표는 신경세포체 퇴행 표현형을 나타낸다; 축척 막대 = 10 μ m); B의 오른쪽 그래프는 도파민성 뉴런 변성의 백분율을 나타낸다(총 샘플 크기는 막대에 표시되고, 데이터는 평균으로 표시된다. 통계: Fisher의 정확 검정; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001); C와 D는 디티아논 노출 시각 각 가바와 콜린성 신경세포의 손상을 나타낸다(총 샘플 크기는 막대 위에 표시되고, 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계: Fisher의 정확 검정; 중요하지 않음(n.s.))

도 2는, 디티아논이 thrashing과 BSR(basal slowing response)에 미치는 영향을 실험한 결과이다: A는 스래싱 행동의 개략도. 스래싱 동작은 30초당 C자 모양의 구부림 횟수를 세어 평가한다; B는 디티아논에 노출된 후 스래싱 수를 나타낸다(총 샘플 크기는 막대에 표시되고, 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계: 1-way ANOVA; *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001); C는 BSR의 개략도. BSR은 48시간 동안 디티아논에 노출된 후 먹이가 있거나 먹이가 없는 상태에서 20초 동안 몸의 구부림 횟수를 세어 평가한다; D는 디티아논에 노출된 이후 BSR을 나타낸다(데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계: t-테스트; 중요하지 않음(n.s.), ****p <0.0001)

도 3은, 디티아논이 활성산소종 및 gst-4 발현 수준에 미치는 영향을 실험한 결과이다: A는 실험 과정의 개략도; B의 왼쪽 패널은 전용 농도의 디티아논에 예쁜꼬마선충을 노출시킨 후 활성산소종의 발생을 보여주는 대표적인 이미지 (축척 막대 = 20 μ m); B의 오른쪽 그래프는 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 형광 강도를 측정하였다(데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계: 1-way ANOVA; ****p <0.0001); C의 왼쪽 패널은 산화 스트레스 반응[gst-4p::gfp]을 보여주는 대표적인 이미지(축척 막대 = 50 μ m); C의 오른쪽 그래프는 형광 강도를 측정하였다(데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계: 1-way ANOVA; **p<0.01, ***p<0.001 ****p <0.0001).

도 4는, 디티아논에 의한 표피에서의 미토콘드리아 단편화 유도 실험을 나타낸 도이다: A는 세 가지 유형의 표피 미토콘드리아 단편화 형태[col-19p::mitogfp]를 보여주는 대표 이미지(축척 막대 = 10 μ m); B는 표피에서 각 미토콘드리아 형태를 가진 벌레의 백분율(총 샘플 크기는 막대에 표시되고, 데이터는 평균으로 표시된다. 통계: Fisher의 정확 검정; **p<0.01, ***p<0.001, ****p <0.0001); C는 디티아논이 미토콘드리아 단편화의 주요 조절자인 drp-1의 발현 수준에 미치는 영향을 실험한 결과이다: 디티아논에 노출된 drp-1의 발현 수준(평균 $\pm$ SEM으로 표시된다)

도 5는, 디티아논에 의한 도파민성 신경독성의 제안된 메커니즘.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0084] 실험재료 및 실험 방법

[0085] 1. 실험에 사용한 시약

[0086] 디티아논(dithianon), TRIzol Reagent (Ambion), ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo), KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo), CellROX Deep Red probe staining solution (Invitrogen).

[0088] 2. 실험에 사용한 예쁜꼬마선충 strain

[0089] 실험에 사용한 예쁜꼬마선충 strain은 다음과 같다: N2 (wild type; WT), CZ22632 (*juSi274[dat-1p::gfp::unc-54 3'UTR]* IV), CZ13799 (*juIs76[unc-25p::GFP]*), CZ631 (*juIs14[acr-2p::GFP]*), CL2166 (*dvIs19[gst-4p::gfp::NLS]* III), SHX2157 (*zjuSi197[col-19p::mitogfp]* I).

[0091] **3. 예쁜꼬마선충 배양**

[0092] 실험에 사용한 예쁜꼬마선충은 대장균 OP50을 seeding한 nematode growth medium (NGM: 3.0g/L NaCl, 2.5g/L Peptone, 20.0g/Agar, 10mg/ml Cholesterol, 1M CaCl₂, 1M MgSO₄, 1M KH₂PO₄ pH6.0)에서 성체가 충분히 모일 때까지 20℃에서 배양되었다. 모든 실험은 예쁜꼬마선충 성체를 sodium hypochlorite solution (5% NaOCl, 5M NaOH)을 이용하여 알을 모으고 M9 buffer (3g/L KH₂PO₄, 5.8g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 0.5g/L NaCl, 1g/L NH₄Cl)로 4번 이상 washing 후에 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한 후에 유충 1령 (first larval stage; L1)으로 시기를 맞춘 상태에서 수행하였다.

[0094] **4. 농약의 신경독성 스크리닝**

[0095] 농약의 신경독성 스크리닝은 도파민 신경을 green fluorescent protein (GFP)으로 표지한 strain (CZ22632; *juSi274[dat-1p::gfp]*)을 이용하여 인두 부분에 위치한 CEP 도파민 신경의 손상 정도를 측정하여 이루어졌다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution 이용하여 알을 모으고 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굵은 L1상태가 되면 모든 농약의 주요 유효성분을 각각 0 (DMSO 0.1%에서 용해), 500, 1000 µg/ml의 농도로 72hr 동안 20℃에서 노출시킨다. 이후 신경세포를 관찰하기 위해서, 농약에 노출한 선충을 M9 buffer로 4번 washing한 후 10% agarose gel pad 위에 M9 buffer 2 µl와 함께 10마리 정도의 예쁜꼬마선충을 올린 후에 커버 슬라이드를 덮고 형광 광학현미경으로 관찰했다. LEICA DM 2000 현미경을 이용했고, 이미지는 Leica DFC 7000 GT를 사용하여 얻었다.

[0097] **5. 농약 처리 농도**

[0098] 처리한 단일화합물의 농도는 시중에 판매하고 있는 농약의 사용 농도를 토대로 정하였다. 디티아논은 약 750 µg/ml 정도로 처리하고 있어 750 µg/ml보다 높은 농도인 1000 µg/ml와 낮은 농도인 100, 500 µg/ml으로 실험을 진행하였다.

[0100] **6. 도파민(Dopamine) 신경독성 평가**

[0101] CZ22632(*juSi274[dat-1p::gfp]*) strain에서 GFP 형광으로 표지된 CEP 도파민 신경세포의 손상을 형광현미경으로 관찰하였다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution을 이용하여 알을 모으고 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굵은 L1상태가 되면 0 (K-medium에서 용해), 100, 500, 1000 µg/ml의 디티아논을 72hr 동안 20℃에서 노출시킨다. 이후 신경세포를 관찰하기 위해서, 농약에 노출한 선충을 M9 buffer로 4번 washing한 후 10% agarose gel pad 위에 M9 buffer 2 µl와 함께 10마리 정도의 예쁜꼬마선충을 올린 후에 커버 슬라이드를 덮고 형광 광학현미경으로 관찰했다. 또한 신경의 손상 표현형은 다음과 같이 나누어 평가를 진행하였다. Blebbing; 수상돌기 내에 적어도 한 개 이상의 abnormal branching 또는 puncta formation을 보이는 표현형, Rounding; 세포체가 타원형이 아닌 원형이며 찌그러든 모양, Loss of dendrites; 수상돌기 내에 적어도 한 개 이상의 신경이 완전히 파괴된 경우이다. 이 실험은 각각의 표현형을 보이는 개체의 수를 측정하여 %로 환산하여 분석하였다.

[0103] **7. 행동실험**

[0104] (1) Thrashing assay

[0105] Thrashing assay은 액체에서 선충의 운동능력을 평가하여 정량화 확인할 수 있는 방법으로 N2 (WT)을 사용하여 실험을 진행하였다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution을 이용하여 알을 모으고 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굵은 L1상태가 되면 0 (K-medium에서 용해), 100, 500, 1000 µg/ml의 디티아논을 K-medium에서 48hr 동안 20℃에서 노출시킨다. M9 buffer로 4번 washing한 후 thrashing assay을 진행한다. 먹이가 없는 NGM 배지 위로 예쁜꼬마선충을 옮긴 후 예쁜꼬마선충 위에 M9 buffer를 2 µl 떨어트린다. 2분 동안 적응의 시간을 준다. 개체당 30초 동안의 thrashing 수를 측정하여 평균을 계산하였다.

[0107] (2) 도파민-의존 행동 실험 - Basal Slowing Response (BSR) assay

[0108] BSR assay는 먹이를 찾는 행동을 확인할 수 있는 실험으로 N2 (WT)을 사용하여 실험을 진행하였다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution을 이용하여 알을 모으고 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굶은 L1상태가 되면 0 (K-medium에서 용해), 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 디티아논을 K-medium에서 48hr 동안 20℃에서 노출시킨다. M9 buffer로 4번 washing 한 후 먹이가 있는 NGM 배지 또는 먹이가 없는 NGM 배지로 옮겨 20초 동안의 body bend 수를 측정하여 평균으로 계산하였다.

[0110] 8. 산화스트레스 반응 측정

[0111] CellROX Deep Red probe staining solution 혹은 oxidative stress response reporter CL2166(*dvIs19[gst-4p::gfp]*)를 사용하여 산화스트레스에 대한 반응으로 *gst-4* 유전자의 발현을 유발하는지 확인하였다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution 이용하여 알을 모으고 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굶은 L1상태가 되면 0 (K-medium에서 용해), 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 디티아논과, 0 (0.1% DMSO에서 용해)을 K-medium에서 48hr 동안 노출시킨다. M9 buffer로 4번 washing한 후 10%의 agarose gel pad를 만들어 M9 buffer 2 μl 를 떨어트린 다음 10마리 정도의 예쁜꼬마선충을 올린 후에 커버 슬라이드를 덮고 형광 광학현미경으로 관찰한다. 형광은 LEICA DM 2000 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 이미지는 Leica DFC 7000 GT를 사용하여 얻었다. 형광 밝기는 눈으로 관찰되는 형광의 세기를 기준으로 0에서 4까지 점수를 매겨 평가하였다.

[0113] 9. 미토콘드리아 절편화 실험

[0114] 예쁜꼬마선충 성체 표피의 미토콘드리아를 GFP 형광으로 표지한 strain SHX2158(*zjuSi197[col-19p::mitogfp]*)을 사용하여 미토콘드리아 절편화를 확인하였다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution을 이용하여 알을 모으고 20℃에서 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굶은 L1상태가 되면 먹이가 있는 NGM 배지로 옮겨 48hr 후인 4령 유충(L4) 시기에 0 (K-medium에서 용해), 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 디티아논을 K-medium에서 24hr 동안 20℃에서 노출시킨다. 농약에 노출한 선충을 M9 buffer로 4번 washing한 후 10% agarose gel pad 위에 M9 buffer 2 μl 와 함께 10마리 정도의 예쁜꼬마선충을 올린 후에 커버 슬라이드를 덮고 형광 광학현미경으로 관찰했다. 형광은 LEICA DM 2000 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 이미지는 Leica DFC 7000 GT 카메라를 사용하여 얻었다. 또한, mitochondrial fragmentation의 표현형은 다음과 같은 기준으로 평가하였다. "Tubular"는 미토콘드리아들이 그물 모양처럼 이어져 있는 형태로 WT과 차이가 없다. "Fragmented"는 미토콘드리아가 모두 fission 되어 원형의 형태를 보인다. "Intermediate"는 Tubular와 Fragmented 한 표현형이 모두 존재하는 경우를 나타낸다. Tubular, Intermediate, Fragmented 순으로 mitochondrial fragmentation이 진행된 상태이며, 이 실험은 각각의 표현형을 보이는 개체의 수를 측정하여 퍼센트(%)로 환산하여 분석하였다.

[0116] 10. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

[0117] 산화스트레스 반응 유전자와 미토콘드리아 절편화 관련 유전자의 발현량을 확인하였다. 약 1000마리 정도의 성체를 sodium hypochlorite solution 이용하여 알을 모으고 overnight (약 20hr)으로 배양한다. 굶은 L1상태가 되면 0 (K-medium에서 용해), 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 디티아논을 K-medium에서 48hr 동안 노출시키고 M9 buffer로 4번 정도 washing한다. Total RNA는 TRIzol Reagent (Ambion), chloroform, isopropanol, 그리고 ethanol을 이용하여 추출하였고, RNA의 순도와 농도는 nanodrop (Thermo Fisher)을 통해 정량화 하였다. RNA는 각 처리 샘플에서 500ng의 농도로 맞추어 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qPT-PCR은 KOD SYBR qPCR Mix를 사용하여 Bioneer exicycler 96에서 수행하였다. 실시 온도는 다음과 같다. pre-denaturation 과정은 98℃에서 2분, denaturation 과정은 98℃에서 10초, annealing 과정은 60℃에서 10초, extension 과정은 68℃에서 30초로 수행하였다. dynamin-related protein 1 (*drp-1*)과 superoxide dismutase 3 (*sod-3*)에 대한 상대적인 RNA의 발현량은 RQ ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)값으로 계산하였다. qPT-PCR에서 사용한

Primer는 표 1에 정리하였다.

표 1

Gene	Gene function	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(3'-5')
gpd-1	Housekeeping gene	GGACCAATGAAGGGAATCCTC	CATTGTCGTACCAAGAGACGAG
drp-1	Mitochondrial dynamics regulator	GAAAGAGCGCAGCTACAACC	TCTTGTGGGGACGTCTTGCT

11. 통계 분석

모든 실험은 condition당 각각 독립적으로 3번 이상 진행하였으며, 각 condition 당 total sample number는 그 래프 아래에 표시하였다. 통계적 유의성 분석은GraphPad의 Fisher's exact test, T-test 또는 1-way ANOVA를 이용하여 분석하였다.

결과

결과 1. 디티아논은 도파민 신경 손상의 개체 수를 농도 의존적으로 증가시킨다.

환경유해물질인 농약은 만성적으로 인체에 노출될 경우, 신경계 질환을 유도하는 것으로 알려져 있는데, 특히 중뇌 흑질 부분에 도파민 소실로 인해 발생하는 파킨슨병과 연관이 있다. 이에, 예쁜꼬마선충 인두 부분에 도파민 신경을 형광단백질로 표지한 strain [*dat-1p::gfp*]을 사용하여 도파민 신경의 형태를 관찰하여 도파민 신경 독성을 유발하는지 확인하였다(도 1). 도 1A에서 요약한 방법과 같이 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리한 후 도파민 신경의 손상을 관찰하였는데, 모든 처리 농도에서 신경독성의 표현형인 blebbing과 rounding을 확인하였다(도 1B). 신경독성은 신경손상 정도에 따라 Mild, Moderate, Severe로 기준을 정하였다. Mild는 Blebbing 또는 Rounding이 있는 표현형, Moderate는 blebbing과 rounding이 모두 보이는 표현형, Severe는 신경이 손실되어 형광 발현이 보이지 않는 표현형을 의미한다(도 1B). 또한 이 실험은 각각의 표현형을 나타내는 선충의 수를 측정하고 퍼센트로 환산하여 분석하였다. 디티아논을 처리한 예쁜꼬마선충에서 도파민 신경 손상을 나타내는 선충의 수가 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다(도 1B). 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 Mild와 Moderate 표현형을 나타내는 선충의 수는 농약을 처리하지 않은 0 $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 증가하였다. 게다가, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 도파민 신경 손상도가 가장 심각한 표현형인 loss of dendrite을 나타내는 선충의 수 또한 증가하였다(도 1B). 위의 결과를 미루어 볼 때, 예쁜꼬마선충에서 환경유해물질의 만성적인 노출은 농도 의존적으로 도파민 신경의 손상, 더 나아가 신경 결손을 유도한다. 도파민 신경세포와 달리 운동 신경세포의 경우에는 디티아논에 의한 신경손상이 거의 나타나지 않았다(도 1C, 도 1D). 따라서, 디티아논은 도파민 신경세포 특이적인 신경 독성을 유발하는 경향을 나타낸다.

결과 2. 예쁜꼬마선충의 운동능력과 도파민-매개 움직임은 디티아논에 의해 감소된다.

파킨슨병은 운동기능의 장애를 유발하며 이는 신경계의 기능과 연관이 있다. 본 연구에서는 두 가지 신경-매개 행동 실험을 하였다. 첫번째로, Thrashing assay는 일반적인 신경 기능을 확인할 수 있는 기본적인 실험방법이다(도 2). 선충이 액체에 놓이게 되면 빠르게 mid-body bending의 방향을 반대로 계속 바꾸면서 머리를 흔드는 모습을 보이는 데 이를 thrashing 한다고 표현한다(도 2A). 이 분석법은 농약과 같은 약물을 처리한 선충에서 신경 기능장애를 평가할 수 있다. 따라서, 도 2A에서 요약한 방법과 같이 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리한 후 thrashing assay를 진행하였다(도 2B). 그 결과, 디티아논을 처리한 예쁜꼬마선충의 thrashing 수는 모두 농도 의존적으로 감소하였다(도 2B). 두번째로, 도파민 신경의 결손을 측정할 수 있는 행동 실험인 Basal Slowing Response (BSR)을 진행하였다(도 2C). 예쁜꼬마선충은 먹이가 있는 곳에서는 도파민 매개 움직임이 둔화되는 모습을 보인다. 이를 basal slowing response (BSR)이라고 지칭한다. 도파민 신경이 손상된 경우, 먹이가 있음에도 불구하고 지속적으로 먹이를 찾는 행동을 보인다. 따라서, 도파민 신경이 손상된 경우, 먹이가 있는 배지에서 예쁜꼬마선충의 body bending 수가 증가하는 표현형을 보이며, 먹이가 없는 배지에서의 body bending 수와 비교하였을 때, 차이가 줄어들게 된다. 따라서, 도 2C에서 요약한 방법과 같이 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리한 후, BSR 실험을 통해 도파민 신경의 손상으로 인해 실제로 BSR이 감소하는지 확인하였다(도 2D). 그 결과, 디티아논을 처리한 예쁜꼬마선충의 BSR은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 0 $\mu\text{g/ml}$ 과 차이가 없었으나 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 BSR이 감소한 표현형을 보였다(도 2D). 위의 결과를 미루어 볼 때, 디티아논은 예쁜꼬마선충에서 신경행동

결손을 초래한다.

[0127] **결과 3. 디티아논은 산화스트레스 증가를 유도한다.**

[0128] 산화스트레스는 미토콘드리아 절편화, 파킨슨병과 밀접한 관계가 있다. 세포 내 과도한 활성산소의 생산은 pro-oxidant/antioxidant 항상성 불균형을 초래하여 산화스트레스를 유발하고 이는 도파민 신경세포의 손상과 세포 사멸로 이어진다. 또한 활성산소로 인한 심각한 산화적 손상은 산화스트레스 반응 유전자의 발현을 증가시킨다. 활성산소종 발생을 직접 측정하기 위해 ROS sensor인 CellROX deep red reagent를 사용하였고, 그 결과 디티아논의 농도에 의존적으로 활성산소종 발생이 증가하는 것을 확인하였다 (도 3B). 예쁜꼬마선충에서 산화스트레스에 대한 스트레스 반응 기작 중에 하나인 skinhead-1/NF-E2-related factor (SKN-1/Nrf)은 전사인자로 작용하여 핵 내로 들어가 Glutathione S-transferase 4 (*gst-4*)와 같은 산화스트레스 해독 유전자를 발현시킨다. 따라서, Oxidative stress response reporter [*gst-4p::gfp*]를 사용하여 도 3A에서 요약한 방법과 같이 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리한 후 상대적인 형광 밝기를 측정하여 *gst-4*의 발현을 확인하였다(도 3C). 그 결과, 디티아논을 처리한 예쁜꼬마선충은 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 와 0 $\mu\text{g/ml}$ 의 GFP의 형광 밝기를 비교하였을 때, *gst-4*의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다(도 3C).

[0129] **결과 4. 디티아논은 표피세포에서 미토콘드리아 절편화를 유도한다.**

[0130] 이전 연구에 따르면 Paraquat, Rotenone를 포함한 많은 농약에 의해 유도된 파킨슨병은 미토콘드리아의 절편화로 인한 미토콘드리아 조절장애와 관련이 있다. 따라서, 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경독성 메커니즘을 규명하기 위해 도 4A에서 요약한 방법과 같이 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리한 후 mitochondrial dynamics를 확인하였다(도 4). Mitochondrial dynamics는 예쁜꼬마선충의 표피에서 절편화 정도에 따라 Tubular, Intermediate, Fragmented의 세 가지 표현형으로 평가하였다(도 4A). 그 결과, 표피에서 디티아논을 처리한 예쁜꼬마선충은 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0 $\mu\text{g/ml}$ 보다 Intermediate와 Fragmented 표현형이 증가되었다(도 4B). 심지어, 가장 높은 농도인 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 Intermediate 표현형은 감소되었으나 Intermediate보다 손상된 표현형인 Fragmented는 유의미하게 증가하였다(도 4B). DRP-1은 Mitochondrial dynamics regulator로서, 미토콘드리아 절편화에 필수적이다. DRP-1은 미토콘드리아 표면에 결합하여 둘러싸고 미토콘드리아를 분리시키는 역할을 한다. 이러한 DRP-1발현의 증가는 과도한 미토콘드리아 절편화를 유도하며, 결국 파킨슨병을 유발한다는 연구결과가 있다. 이에, 앞서 발견한 미토콘드리아 절편화의 증가가 DRP-1 발현의 증가로 인해 나타나는지 확인하고자 하였다. DRP-1 유전자 발현의 변화를 확인하기 위해 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리한 후 qRT-PCR 분석법을 사용하여 *drp-1 mRNA*의 발현량을 측정하였다(도 4C). 그 결과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 디티아논을 처리한 예쁜꼬마선충에서 *drp-1*의 발현량이 증가하였다(도 4C). 위의 결과를 미루어 볼 때, 디티아논은 *drp-1*의 발현을 조절해서 미토콘드리아 절편화를 유도할 것으로 추측된다.

[0131] **결론**

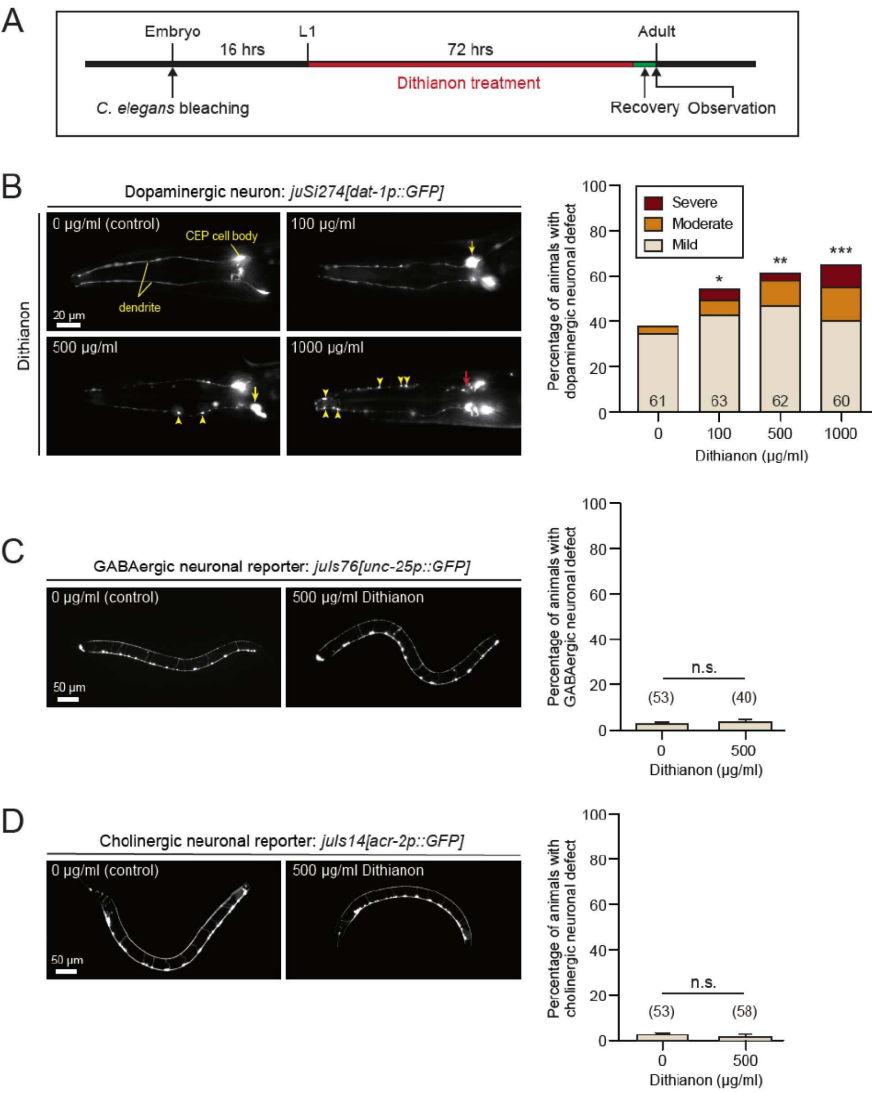
[0132] 농업에서 흔히 사용되는 살균제의 주요 유효성분인 디티아논은 예쁜꼬마선충의 도파민 신경독성을 유발하였다(도 1). 예쁜꼬마선충에서 도파민 신경의 기능은 대부분 기계적 감각을 감지하는 mechanosensor의 역할을 하며 특히 먹이를 찾는 행동에 관여한다. 실제로 디티아논에 만성적으로 처리된 예쁜꼬마선충은 먹이를 찾는 행동에 장애를 보였다(도 2). 농약에 의해 유도된 도파민 신경손상과 도파민-매개 행동의 결손은 도파민의 소실로 인해 유발되는 떨림, 서동, 경직, 보행장애를 포함한 운동성 증상을 보이는 파킨슨병과 유사함을 보였다. 흥미롭게도, 가바 신경에 비해 도파민 신경이 디티아논에 더 취약하였다(도 1). 본 연구에서 관찰한 도파민 신경의 경우, 먹이를 찾기 위해 사용되기 때문에 수상돌기가 인두 바깥쪽으로 나와있는 형태로 존재하여 농약에 직접적으로 노출되기 쉽다. 그에 반해, 가바 신경은 직접적으로 농약과 접촉할 수 없는 곳, 다시 말해 몸 속에 존재하므로 가바 신경에 비해 도파민 신경에 더 많은 영향을 줄 수 있을 것으로 추측한다.

[0133] 본 연구에서는 디티아논이 표피세포에서 미토콘드리아 절편화를 유도한다는 것을 보여주었다(도 4). 신경 안에 존재하는 미토콘드리아는 대부분 세포체에 존재하며 크기는 5-10 μm 정도이다. 신경 세포체 안에 존재하는 미토콘드리아는 너무 촘촘하게 뭉쳐 있어 절편화를 확인하기에는 어려움이 있다. 따라서, 이러한 한계점을 극복하기 위해 수많은 미토콘드리아를 포함하고 형태학적으로 관찰하기에 용이한 표피세포에서 미토콘드리아 절편화 관찰 실험을 진행하였다. 특히 신경세포에서 미토콘드리아의 조절장애는 미토콘드리아 절편화를 증가시키고 결국, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이전 연구에 따르면, 농약 중 하나인 Rotenone은 도파민 신경에서 미토콘드리아 절편화를 유도하였으며, 운동 능력과 도파민이 현저하게 감소하는 parkinsonian 특징을 보였다. 따라서, 디티아논에 의해 유도된 미토콘드리아 절편화는 도파민 신경독성을 유발하는 원인으로 추측된다.

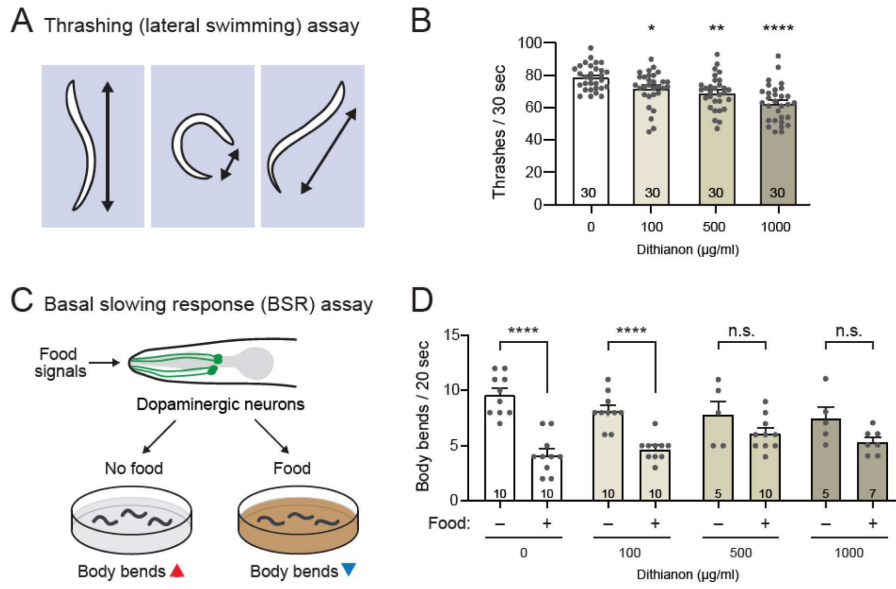
- [0134] 또한 미토콘드리아 절편화는 mitochondrial dynamics 조절자인 DRP-1에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. DRP-1은 예쁜꼬마선충에서 근육, 장, 신경에 주로 존재하며 그 중에서도 특히 머리 쪽 신경에서 강하게 발현된다. 본 연구에서는 디티아논이 *drp-1* mRNA의 발현을 증가시킨다는 것을 보여주었다 (도 4). 이에 앞서 확인한 농약의 의해 유도되는 미토콘드리아 절편화는 *drp-1* 상향조절을 통해 일어나는 것으로 추정된다(도 4). 하지만 농약에 의해 유도된 미토콘드리아 절편화와 *drp-1*의 상향조절 사이의 인과관계를 확인하기 위해서는 *drp-1*를 억제하였을 때, 미토콘드리아 절편화가 실제로 감소하는지 확인해야 한다. 이전 연구에 따르면, 사람의 파킨슨병 cell line에서 Drp1 억제제를 사용하여 Drp1을 억제하였을 때, 미토콘드리아 절편화와 활성산소의 생성을 억제하고 apoptosis를 감소시켜 최종적으로 도파민 신경을 보호하였다. 이는 *drp-1*의 상향조절이 미토콘드리아 절편화를 유도하는 것을 시사하며, 본 연구결과와 상응한다.
- [0135] 디티아논은 ETC complex II 억제자로 작용하여 미토콘드리아 조절장애를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 미토콘드리아 조절장애는 활성산소의 생산을 증가시켜 신경세포의 손상을 초래한다. 예쁜꼬마선충에서는 산화스트레스에 대한 반응으로 skinhead-1/NF-E2-related factor (SKN-1/Nrf) 경로가 활성화되는데, SKN-1은 전사인자로서 작용하여 핵으로 국소화되고 *gst-4*와 같은 산화스트레스 해독 유전자를 발현시키는 역할을 한다. 이렇게 발현된 *gst-4*는 Glutathione (GSH)을 Glutathione disulfide (GSSG)으로 바꾸면서 과산화수소를 물과 산소로 바꾸는 역할을 한다. 본 연구에서, 디티아논은 *gst-4*의 발현을 상향조절을 하였다(도 4). 이를 통해 디티아논이 산화스트레스를 유발한다는 것을 간접적으로 알 수 있었으며, 산화스트레스를 해독하기 위해 *gst-4*의 발현을 증가시키는 것으로 보인다.
- [0136] 즉, 디티아논은 직접적으로 산화스트레스를 유발하거나 또는 과도한 미토콘드리아 절편화를 유도하여 활성산소의 생산을 증가시키고 이로 인해 산화스트레스를 유발하는 것으로 보이며 결국에는 파킨슨병을 유발할 것으로 생각된다.
- [0137] 요약하자면, 디티아논은 직접적으로 산화스트레스를 유발하거나 또는 간접적으로 *drp-1* 매개 미토콘드리아 절편화의 증가를 유도함으로써 산화스트레스를 유발하는 것으로 추정된다. 또한, 디티아논에 의해 유도된 과도한 미토콘드리아 절편화는 결국 도파민 신경 손상을 유도하고, 나아가 도파민 매개 행동의 장애를 유발한 것으로 보인다. 따라서, 이 결과를 토대로 디티아논에 의해 유발된 신경독성이 파킨슨병의 유발 기작과 증상이 유사함을 제안하고자 한다(도 5).

도면

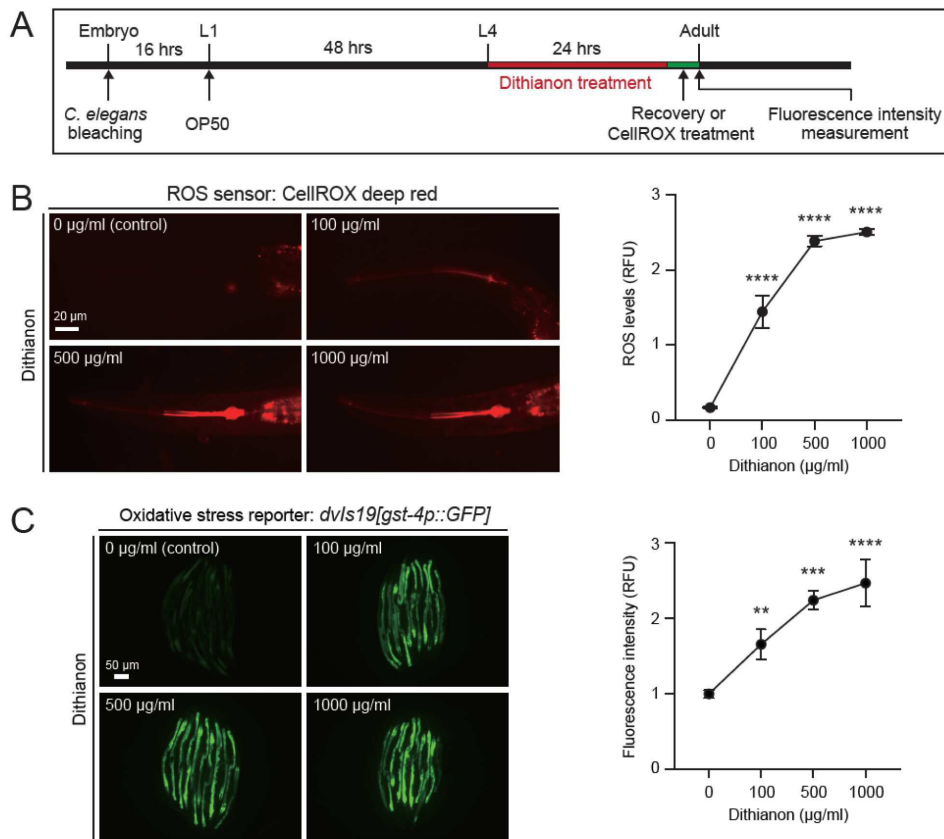
도면1



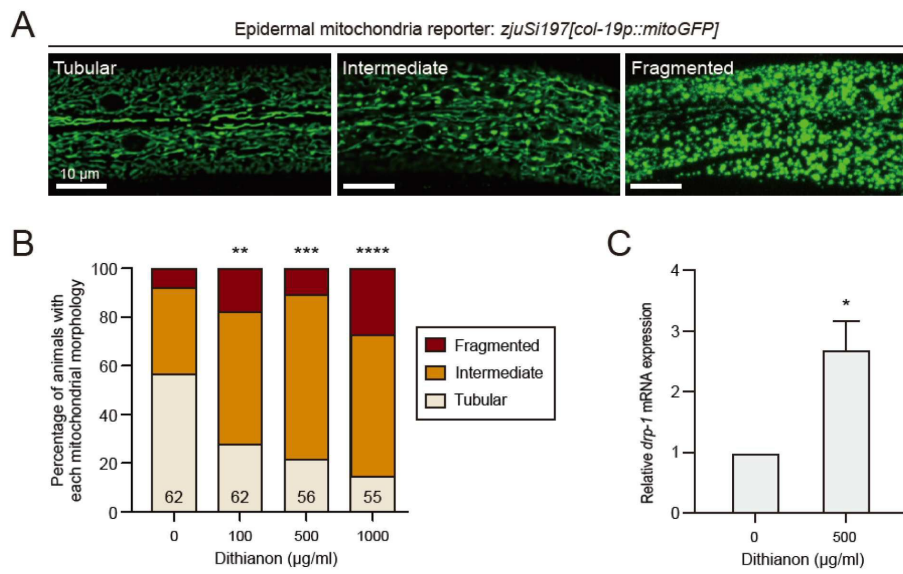
도면2



도면3



도면4



도면5

