



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0137760
(43) 공개일자 2016년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0070726

(22) 출원일자 2015년05월21일

심사청구일자 2015년05월21일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

최수영

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)

음원식

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

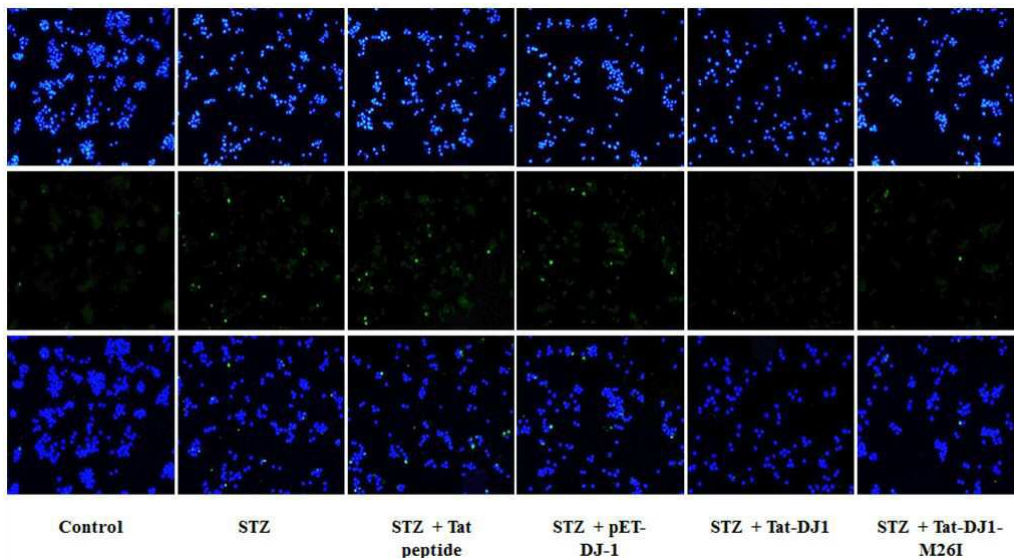
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 세포투과성 DJ-1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 조직 및 세포 내 투과가 가능한 DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C07K 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

박진서

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

한규형

강원도 춘천시 새청말길 26 107동 1402호 (우두동, 강변코아루아파트)

조윤신

강원도 강릉시 화부산로99번길 12 강릉교동롯데캐슬아파트 104동 802호

이근욱

서울특별시 동작구 동작대로39길 22, 113동 805호 (동작동, 이수힐스테이트)

신민재

인천광역시 남구 낙섬중로 18, 1-1201 (용현동, 대림아파트)

권혁일

서울특별시 광진구 능동로1길 15 한강우성아파트 102동 1206호

김대원

강원도 춘천시 칠전서길 15-2 203동 701호 (칠전동, 칠전대우2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093812

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A4A01008026

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 체장 및 간세포 사멸과정에서 DJ-1 단백질의 효능 및 기전규명

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

Tat 단백질 수송 도메인이 DJ-1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성(cell-transducing) DJ-1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질은 서열번호 5, 서열번호 7 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 융합단백질은 DJ-1 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 단백질 수송도메인이 공유결합된 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

DJ-1 단백질 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 제 1항 또는 제2항 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 재조합 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 발현시키기 위하여 상기 4항의 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 발현시키는 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 조직 및 세포 내 투과가 가능한 DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 인슐린 감소로 고혈당이 지속되는 것으로 전 세계인구 중 약 3억 4천 7백만 명의 당뇨병 환자들이 있다[1]. 또한, 당뇨병은 암 및 간 글루코스 생성을 비롯한 다양한 합병증을 일으키는 중요한 대사 질환으로 잘

알려져 있다[2-4]. 당뇨병에 관련된 정확한 메카니즘은 아직 명확하게 밝혀지진 않았지만, 산화적 스트레스는 당뇨병의 주요 원인 중 하나인 것으로 여겨진다. 몇몇 연구 결과 지나친 산화 스트레스는 스트렙토조토신-유도 동물모델에서 췌장 베타세포 사멸에 대한 반응임이 밝혀졌다[5-7].

[0003] DJ-1 단백질은 PARK7으로도 불리는데, 암유전자로 알려져 있으며, 파킨슨병의 열성 상염색체(autosomal recessive gene)로도 알려져 있다. DJ-1은 Thi/Pfp1 슈퍼패밀리에 속하는 호모다이머(homodimer)이며, 인간에서 이.콜라이까지 매우 잘 보존되어(highly conserved) 있으며, 세포질, 핵 및 미토콘드리아에 분포한다(Bonifati et al., 2003; Gupta et al., 2008; Lee et al., 2003; Nagakubo et al., 1997; Wilson et al., 2004). DJ-1 단백질은 항산화 활성, 세포분열-유사 성질 및 전사 조절 등의 다양한 기능을 수행한다(Menzies et al., 2005; Xu et al., 2005; Zhou et al., 2006). 산화 스트레스에 대한 DJ-1의 보호 기능은 파킨슨병에서 잘 알려져 있다. 그러나, DJ-1이 실제로 당뇨병에서 어떠한 기능을 수행하는지는 알려져 있지 않았다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN, Lai YP (2014) Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8+ cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. PLOS One 9: e109961

(비특허문헌 0002) Stattin P, Bjor O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B, Hallmans G, Kaaks R (2007) Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. Diabetes Care 30: 561-567

(비특허문헌 0003) Connolly GC, Safadjou S, Chen R, Nduaguba A, Dunne R, Khorana AA, Hezel AF (2012) Diabetes mellitus is associated with the presence of metastatic spread at disease presentation in hepatocellular carcinoma. Cancer Invest 30: 698-702

(비특허문헌 0004) Li YG, Ji DF, Zhong S, Lin TB, Lv ZQ (2015) Hypoglycemic effect of deoxynojirimycin-polysaccharide on high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice via regulation of hepatic glucose metabolism. Chem-Biol Interact 225: 70-79

(비특허문헌 0005) Jin L, Xue HY, Jin LJ, Lin SY, Xu YP (2008) Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. Eur J Pharmacol 582: 162-167

(비특허문헌 0006) Kim MJ, Kim DW, Lee BR, Shin MJ, Kim YN, Eom SA, Park BJ, Cho YS, Han KH, Park J, Hwang HS, Eum WS, Choi SY (2013) Transduced Tat-glyoxalase protein attenuates streptozotocin-induced diabetes in a mouse model. Biochem Biophys Res Commun 430: 294-300

(비특허문헌 0007) Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S (2015) The effect of oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. Peptides 63: 47-54.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 DJ-1 단백질을 이용하여 투과성이 높고 효과가 우수한 당뇨병 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 Tat 단백질 수송 도메인이 DJ-1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성(cell-transducing) DJ-1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0007] 또한, 본 발명은 세포 투과성 DJ-1 융합단백질이 서열번호 5, 서열번호 7 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [0008] 또한, 본 발명은 DJ-1 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 단백질 수송도메인이 공유결합된 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명은 DJ-1 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 발현시키는 벡터를 제공한다.
- [0012] Tat-DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 주사형태 또는 도포제로 제형화할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0013] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용(topical application)할 수 있으며, 용량은 일일 투여량이 0.001 μ g~1mg/kg의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 융합단백질을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 Tat-DJ-1 융합단백질을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [0015] 본 발명은 DJ-1 단백질을 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 DJ-1 단백질 분자의 세포 내 전달은 DJ-1 단백질에 HIV-1 Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 세포투과성 수송도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 서열번호 3과 같은 아미노산 서열로 이루어진 Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, HIV-1 Tat 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.
- [0016] 구체적으로, 본 발명은 Tat-DJ-1 융합단백질, 이 융합단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터, 융합단백질을 포함하는 치료, 예방 목적의 약학 조성물 등에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0018] "Tat-DJ-1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 DJ-1 단백질을 포함하며, 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 DJ-1를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-DJ-1" 또는 "DJ-1 융합단백질"과 혼용하였다.
- [0019] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.
- [0020] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는

체의 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.

- [0021] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 펩타이드, 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 Tat 펩타이드 (서열번호 3)를 말한다.
- [0022] 본 명세서의 "목표 단백질"은 Tat 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미하며, 구체적으로는 DJ-1를 의미한다.
- [0023] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.
- [0024] 본 발명은 단백질 수송 도메인이 DJ-1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성(cell-transducing) DJ-1 융합단백질을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 또한, 유전자의 침묵변이(silent change)에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성 전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질이 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 DJ-1 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 DJ-1 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포도입성 융합단백질을 코딩하는 서열번호 6번을 비롯한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 범위는 서열번호 6번의 재조합 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 유전암호의 축퇴(codon degeneracy)에 의한 서열을 갖는 핵산분자들에도 미친다.
- [0029] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 투과성 융합단백질을 발현시키는 벡터에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 DJ-1 융합단백질은 세포 내로 농도 및 시간 의존적으로 투과하였다. 또 본 발명의 투과된 DJ-1 융합단백질은 세포 내 활성산소종 농도를 저하시켰다.
- [0031] 또한, 본 발명의 DJ-1 융합단백질은 췌장 베타세포의 사멸을 효과적으로 억제하여 췌장 세포를 보호하였다.
- [0032] 뿐만 아니라, 스트렙토조토신(Streptozotocin)을 이용한 당뇨동물모델에서도 본 발명의 DJ-1 융합단백질은 효과적으로 활성산소종을 억제하였고, Akt, MAPK 및 NF- κ B 활성을 억제하였다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 DJ-1 단백질의 유전자 확보에 관한 것이다.
- 도 2는 Tat-DJ-1 융합단백질의 발현벡터를 제조한 것이다.
- 도 3은 세포 침투성 Tat-DJ-1 융합단백질의 정제를 나타낸 것이다.
- 도 4는 Tat-DJ-1 융합단백질을 RINm5F 세포 내로 도입한 결과이다. Tat-DJ-1 융합단백질(0.5~3 mM)과 대조군 DJ-1 단백질을 30분간 배양배지에 가하였다(왼쪽). 3mM Tat-DJ-1 융합단백질과 대조군 DJ-1 단백질을 5 ~ 60분

간 배양배지에 가하였다(오른쪽).

도 5는 침투된 Tat-DJ-1 융합단백질의 세포 내 지속성을 알아본 결과이다.

도 6은 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 효과적으로 침투된 것을 공초점 현미경을 통해 확인한 것이다.

도 7은 Tat-DJ-1 융합단백질의 활성산소종 억제 효능을 형광현미경을 통해 확인한 것이다.

도 8은 Tat-DJ-1 융합단백질의 DNA 단편화 억제 효능을 형광현미경을 통해 확인한 것이다.

도 9는 Tat-DJ-1 융합단백질의 MAPK 활성 억제 효능을 웨스턴 블랏 분석으로 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 본 발명의 구성을 아래의 실시예의 기재를 통하여 좀더 상세히 살펴본다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에만 한정된 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 자명하다.

[0035] 재료

[0036] Tat 펩타이드는 펩트론(Daejeon, Korea)에서 합성하고, 쥐 췌장 인슐린종 세포주 RINm5F는 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 스트렙토조토신은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, Ni_2^{+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 구매하였다. FBS는 Lonza(Basel, Switzerland)에서, 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)와 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 인간 DJ-1 cDNA를 PCR 기술로 분리하였다. DJ-1의 M26I 돌연변이는 아주대학교 조은혜 교수에게 제공받았다. 이외의 모든 시약은 특급 제품을 이용하였다.

[0037] Tat-DJ-1 융합단백질의 발현과 정제

[0038] Tat-발현 벡터는 본 발명자들의 종래기술과 같이 제조하였다. 간단히 설명하면, 인간 DJ-1 cDNA를 다음의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 사용한 DJ-1 센스 프라이머: 5'-CTCGAGATGCCGAAGCAGC-3', DJ-1 안티센스 프라이머: 5'-GGATCCCTACTCAAGCCAAGG-3'. PCR을 통하여 얻은 결과물을 TA 벡터에 서브클로닝하고 Tat 발현벡터에 연결하여 Tat-DJ-1 발현 벡터를 제조하였다. 이와 마찬가지로 대조군으로는 Tat 펩타이드를 연결하지 않은 DJ-1 단백질을 제조하였다. 또한, DJ-1의 M26I 돌연변이 유전자를 위와 같은 방식으로 Tat 펩타이드에 연결하였다. 제조합된 Tat-DJ-1 플라스미드를 대장균 BL21(DE3)으로 형질변환시킨 후 0.5mM IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactoside) (Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 유도하여 18℃에서 밤새 배양하였다. 배양한 세포를 초음파 처리로 분쇄하여 Tat-DJ-1 융합단백질을 얻기 위해 Ni_2^{+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼과 PD-10 컬럼 크로마토그래피(Amersham, Piscataway, NY, USA)를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질의 농도는 Bradford 측정법으로 측정하였다.

[0039] Tat-DJ-1 융합단백질의 RINm5F 세포 내 투과

[0040] RINm5F 세포는 2 mM 글루타민, 10% 우태혈청(FBS) 및 항생제(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 100 U/ml 페니실린)를 포함하는 RPMI 1640 배지에 37 °C, 95% 공기 및 5% CO_2 의 습한 조건에서 보관하였다.

[0041] Tat-DJ-1 융합단백질의 세포 투과를 위해, 세포에 30분 동안 Tat-DJ-1 융합단백질을 다양한 농도(0.5~3 μM)로 처리하였고, Tat-DJ-1 융합단백질 3 μM 를 다양한 시간(5~60분) 동안 처리하였다. 그 후 세포를 PBS로 세 번 세척하였다. 세포는 모아 웨스턴블랏 분석하였다.

[0042] 웨스턴블랏 분석

[0043] 동량의 단백질을 15% SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하였다. 전기영동 후, 젤은 나이트로셀룰로스 막으로 이동하였다. 이 막은 5% 탈지유 또는 BSA가 포함된 TBS-T(25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) 완충용액으로 블로킹하였다. 막은 일차 항체 또는 HRP-결합된

항체와 함께 배양하였다. 밴드는 제조사(Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 지시한 대로 화학형광 시약을 이용하여 확인하였다.

[0044] **형광현미경 분석**

[0045] 종래 기술과 같이 공초점 형광 현미경 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, 커버슬립 상에서 배양한 RINm5F 세포에 3 μ M의 Tat-DJ-1 융합단백질을 30분간 처리한 후 PBS로 두 번 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 3분간 실온에서 고정하였다. 1차 항체(anti-His, 1:2000)를 처리하고, Alexafluor 488-결합된 이차항체(1:15000; Invitrogen, CA, USA)를 처리하였다. 핵은 3분간 1 μ g/ml DAPI(Roche applied Science, Germany)로 염색하고, 형광의 분포는 공초점 형광현미경(FV-300; Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

[0046] **세포 생존율 분석**

[0047] MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide} 분석으로 과산화수소 처리한 RINm5F 세포의 생존율을 결정하였다. 세포를 먼저 Tat-DJ-1 융합단백질 (0.1-0.3 μ M)로 두 시간 동안 처리한 후 과산화수소 (1.5 mM)를 배지에 가하여 16시간 처리하였다. ELISA 마이크로플레이트 판독기 (Labsystems Multiskan MCC/340)로 570 nm 흡광도를 측정하고 세포 생존율은 미처리 대조군 세포에 대한 백분율로 나타내었다.

[0048] **세포내 활성산소종 수준 측정**

[0049] DCF-DA를 이용하여 세포내 활성산소종 수준을 측정하였다. DCF-DA는 활성산소종에 의해 형광성 DCF로 변환된다. Tat-DJ-1 융합단백질로 두 시간 동안 처리 또는 미처리한 RINm5F 세포를 리포다당류 (1 μ g/ml)로 30분간, 과산화수소 (2 mM)로 10분간 처리하였다. 세포는 PBS로 두 번 세척하고 DCF-DA (20 μ M)와 함께 30분간 배양하였다.

[0050] **TUNEL 분석**

[0051] 종래 기술과 같이 8-OHdG(8-hydroxydeoxy guanosine; Santa Cruz, CA, USA) 및 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick end labeling staining; Roche applied Science, Germany) 분석을 수행하였다.

[0052] RINm5F 세포를 3 μ M의 Tat-DJ-1 융합단백질로 30분간 선처리하고 스트렙토조토신 3 mM로 24시간 동안 처리하였다. 이미지는 형광현미경(Nikon eclipse 80i, Japan)을 통해 확인하였다. 형광 강도는 Fluoroskan ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다(Labsystems Oy, Helsinki, Finland).

[0053] **통계 분석**

[0054] 데이터는 각각의 세번의 독립된 실험에서 얻은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 평균값 간의 차이는 일방 ANOVA를 이용하여 분석하였다. 차이는 $p < 0.05$ 일 때 유의미한 것으로 하였다.

[0055] **결과 1 : Tat-DJ-1 융합단백질의 구축 및 정제**

[0056] 세포침투성 융합단백질인 Tat-DJ-1 융합단백질을 제조하기 위해서 먼저, PCR를 이용하여 인간 야생형 및 돌연변이형 (M26I) DJ-1 cDNA를 확보하였다. 확보된 유전자를 이용하여 세포침투 능력이 있는 Tat 펩타이드를 부착하여 Tat-DJ-1 융합단백질 발현벡터를 제조하고 유전자 분석을 통하여 확인하였다(도 1, 2).

[0057] 제조한 Tat-DJ-1 융합단백질 발현벡터를 대장균에서 과발현시킨 뒤 이를 Ni^{2+} -나이트릴로삼초산 세파로즈 친화 크로마토그래피 컬럼으로 정제하였고, SDS-PAGE를 이용한 겔 염색법과 웨스턴블랏 분석을 통해 순수하게 정제된 단백질을 히스티딘 항체를 통해 확인하였다(도 3).

[0058] **결과 2 : RINm5F 세포로 Tat-DJ-1 융합단백질의 투과**

[0059] 정제된 융합단백질인 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 잘 침투되는지를 확인하기 위하여 단백질을 세포 내로 농도 및 시간-의존적으로 침투시켜 그 효능을 확인하였다. 실험에 사용한 세포는 인슐린 분비 세포인 RINm5F 세포를 이용하였다. 먼저, 세포침투성 Tat-DJ-1 융합단백질을 세포 내로 침투시킨 결과 농도 및 시간 의존적으로 효과적으로 침투되는 것을 히스티딘 항체를 통해 웨스턴블랏 분석으로 확인할 수 있었다. 반면, 세포침투 효능을 가지는 Tat 펩타이드가 융합되지 않은 DJ-1 단백질은 침투 효능을 갖지 못한다는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0060] 다음으로 침투된 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내에서 최대 24시간까지 안정적으로 유지되는 것을 웨스턴블랏 분석을 통해 확인하였다. 하지만 돌연변이 Tat-DJ-1 단백질은 12시간 이내로 빠르게 저하되는 것을 알 수 있었다(도 5).

[0061] 또한, 세포침투 능력을 갖는 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 효과적으로 침투되는 것을 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 공초점 현미경은 세포 내 단면을 레이저를 통해 촬영하는 것으로, Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 효율적으로 침투되었다는 것을 확인하기에 적합한 장비이다. 도 6에서 보는 바와 같이 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 효과적으로 침투되었음을 확인할 수 있다.

[0062] **결과 3 : Tat-DJ-1 융합단백질의 활성산소 억제 효과**

[0063] 세포 내로 효율적으로 침투되는 Tat-DJ-1 융합단백질의 세포 보호효능을 확인하기 위하여 스트렙토조토신 및 사이토카인을 처리하여 MTT 분석을 수행하였다. 스트렙토조토신 및 사이토카인을 세포 내에 처리하였을 경우 살아 있는 세포의 수가 약 50% 이상 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 세포 침투성 단백질인 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포의 사멸을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 그러나 돌연변이형 Tat-DJ-1 융합단백질은 야생형에 비해 세포보호 효능이 떨어짐을 알 수 있었다(데이터 표시하지 않음).

[0064] 세포 내에 스트렙토조토신 및 사이토카인을 처리하게 되면 발생하는 활성산소종(ROS)은 DCFDA 염색법을 통해 확인하였다. 세포 내 활성산소종이 유도되면 2',7'-DCFDA(dichlorofluorescein diacetate)는 불투과성의 2',7'-DCFDA(dichlorofluorescein diacetate)로 가수분해되어 저장되는데 이것은 스트렙토조토신 및 사이토카인에 유도된 활성산소와 반응하여 산화되면서 2',7'-DCF(dichloro-fluorescein)를 형성하여 녹색을 띄게 된다. 반면에, 세포침투성 Tat-DJ-1 융합단백질을 세포 내에 전처리하였을 경우 세포 내의 활성산소종이 억제되는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다(도 7).

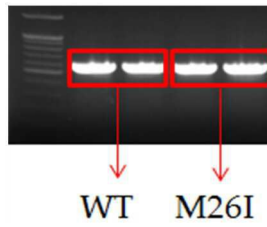
[0065] 또한, 스트렙토조토신 및 사이토카인이 세포사멸을 유도함으로써 세포 내 핵이 응축되어 DNA 단편화를 촉진시키는데 이 과정을 TUNEL 분석을 통하여 확인하였다. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 분석은 조직의 구조를 유지하면서 개개의 세포에서 일어나는 사멸체(apoptotic body)를 관찰할 수 있다. 이러한 사멸체(apoptotic body)가 생화학적으로 세포 핵 안의 DNA가 분해되는 과정을 거친다는 점에 착안한 것으로 이때 노출되는 3'-OH 기에 TdT 효소를 이용하여 디곡시게닌(digoxigenin)이 표지(labelled)된 UTP(uridine triphosphate)를 DNA 조각에 붙인 후 발색을 하게 된다. 신경 세포에 스트렙토조토신 및 사이토카인을 처리하게 되면 핵이 응축됨으로써 녹색형광을 띄는 사멸체(apoptotic body)를 관찰할 수 있는 반면, 융합단백질인 Tat-DJ-1을 전처리하였을 경우 세포의 사멸을 억제함으로써 핵의 응축 또한 억제되는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다(도 8). 이러한 결과로부터 세포침투성 융합단백질 Tat-DJ-1이 스트렙토조토신 및 사이토카인으로 유도된 세포사멸을 억제함으로써 체장세포의 보호 효능을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] **결과 4: Tat-DJ-1 단백질의 세포사멸 억제 효과**

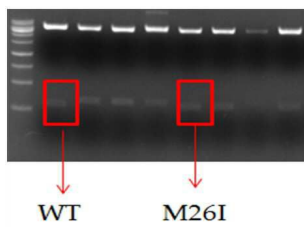
[0067] MAPK 및 NF- κ B 활성화는 세포 수명에 매우 중요하게 관여하는 것으로 잘 알려져 있기 때문에 스트렙토조토신 및 사이토카인에 의한 MAPK 및 NF- κ B 활성화가 Tat-DJ-1 융합단백질에 의한 억제 효과가 있는지 확인하여 보았다. 현재, 스트렙토조토신 및 사이토카인에 의한 MAPK 및 NF- κ B 활성화, 그리고 Tat-DJ-1 융합단백질에 의해 Akt, MAPK 및 NF- κ B 활성화가 억제되는 조건을 확립하였으며, Akt, MAPK 및 NF- κ B 활성화억제 효능을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다. 그 결과, 세포침투성 융합단백질 Tat-DJ-1이 스트렙토조토신 및 사이토카인으로 유도된 세포사멸에 대하여 MAPK 활성화를 억제하였다(도 9).

도면

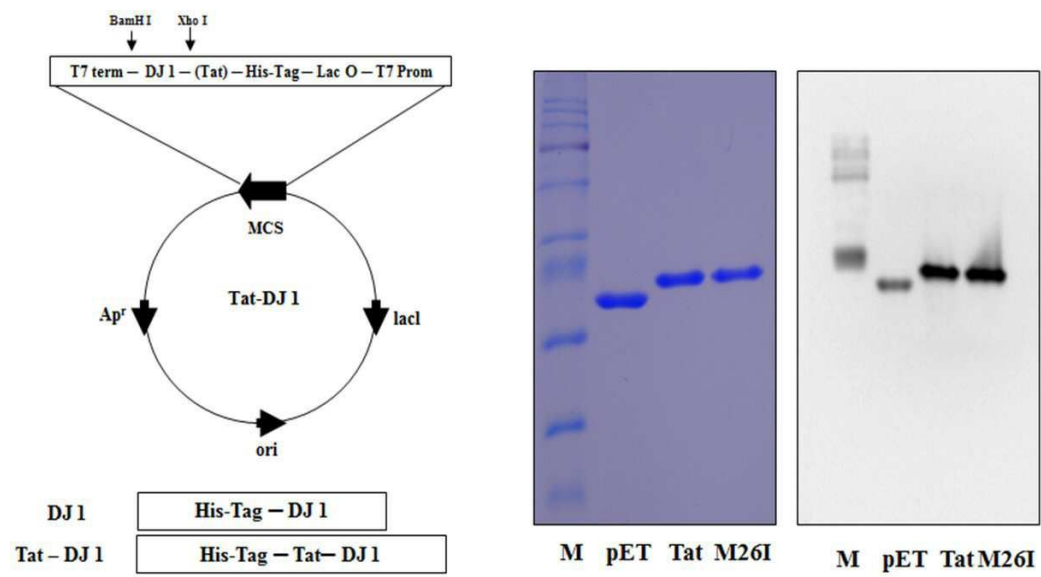
도면1



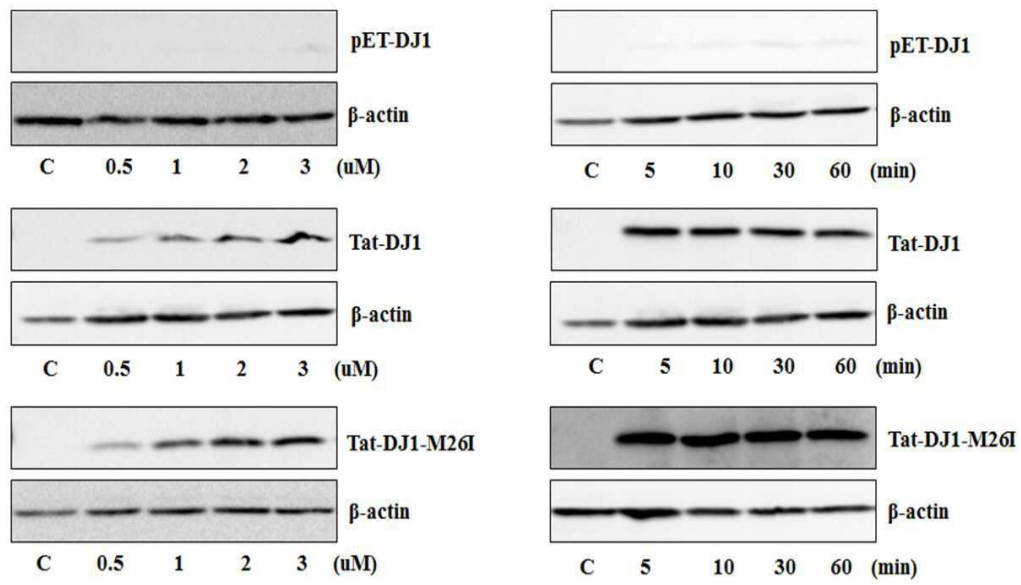
도면2



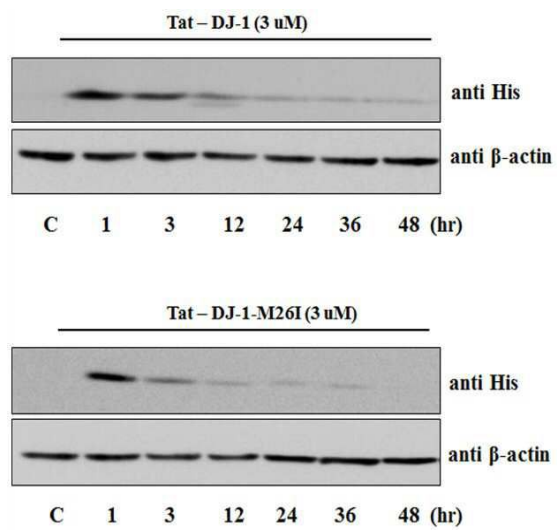
도면3



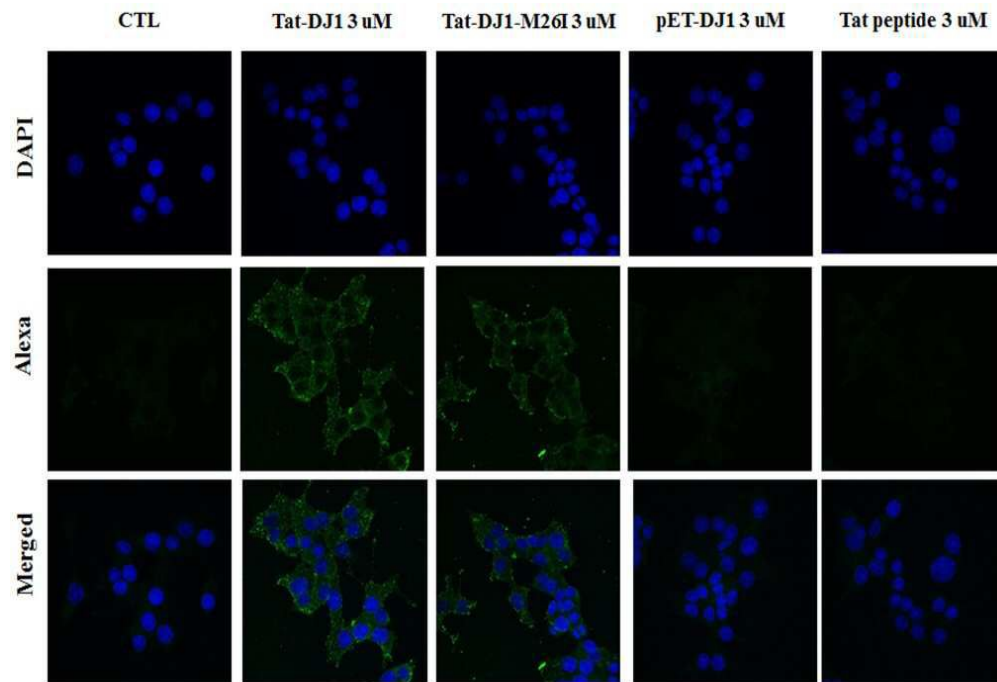
도면4



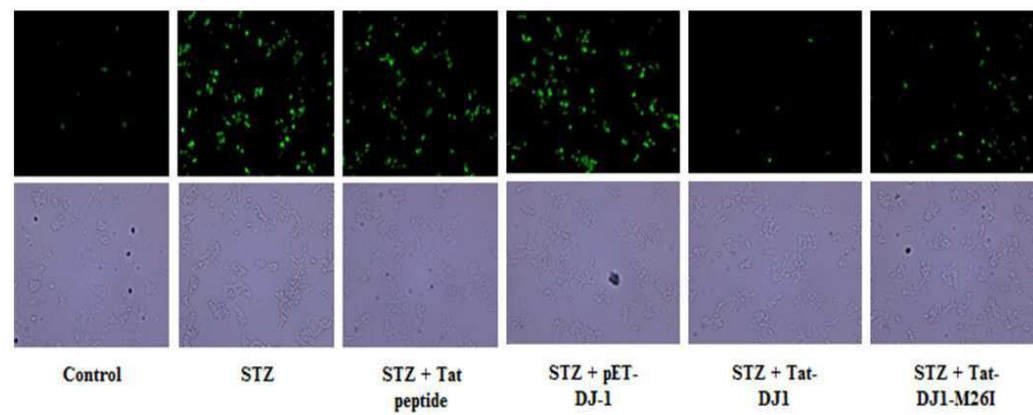
도면5



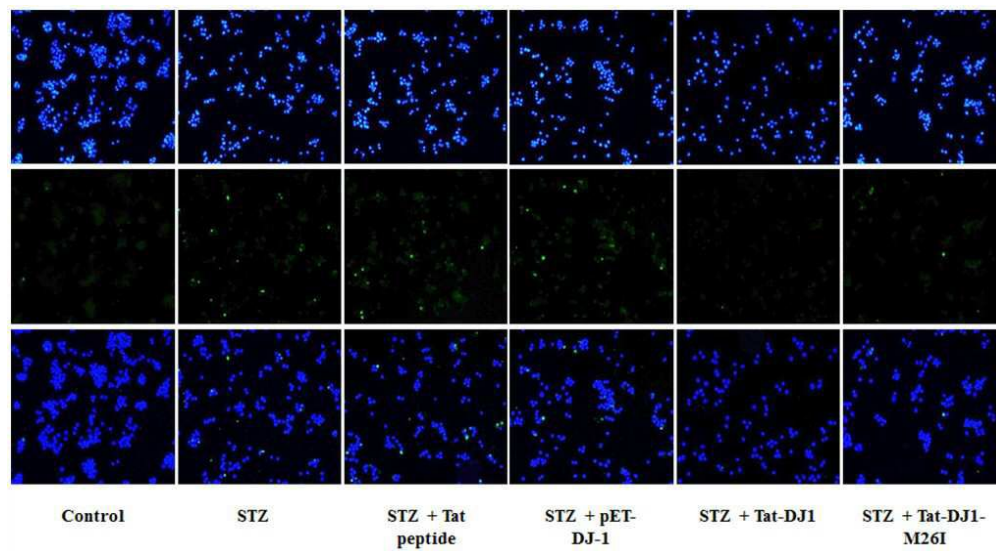
도면6



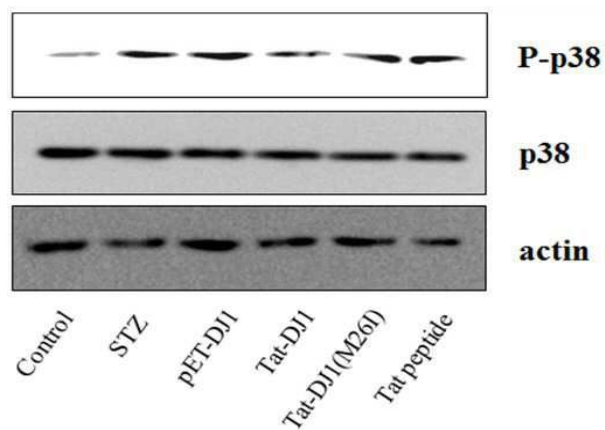
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for preventing and treating diabetes
containing cell-transducible DJ-1 fusion protein
- <130> hallym-sychoi-DJ-1-diabetes
- <160> 9
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> sense primer of human DJ-1 protein

<400> 1
ctcgaggctt ccaaaagagc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of human DJ-1 protein

<400> 2
ggatccctag tctttaagaa 20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> HIV

<400> 3
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 4

<211> 651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide encoding Tat-DJ-1 fusioin protein

<400> 4
catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60

agacagcgac gaagactcga gatggttcc aaaagagctc tggatcatcct ggctaaagga 120

gcagaggaaa tggagacggt catccctgta gatgtcatga ggcgagctgg gattaaggtc 180

accgttgcag gcctggctgg aaaagaccca gtacagtgtg gccgtgatgt ggtcatttgt 240

cctgatgccg gccttgaaga tgcaaaaaaa gagggacat atgatgtggt ggttctacca 300

ggaggtaatc tgggcgcaca gaatttatct gagtctgtg ctgtgaagga gatactgaag 360

gagcaggaaa accggaaggg cctgatagcc gccatctgtg caggctctac tgctctgttg 420

gtcatgaaa taggctgtgg aagtaaagtt acaacacacc ctcttgctaa agacaaaatg 480

atgaatggag gtcattacac ctactctgag aatcgtgtgg aaaaagacgg cctgattctt 540

acaagccggg ggccctgggac cagcttcgag ttgctgttg caattgttga agccctgaat 600

ggcaaggagg tggcggctca agtgaaggct ccacttggtc ttaaagacta g

651

<210> 5

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-DJ-1 fusioin protein

<400> 5

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Ser Lys Arg

1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Leu Ala Lys Gly Ala Glu Glu Met Glu Thr Val Ile

20 25 30

Pro Val Asp Val Met Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Thr Val Ala Gly

35 40 45

Leu Ala Gly Lys Asp Pro Val Gln Cys Ser Arg Asp Val Val Ile Cys

50 55 60

Pro Asp Ala Ser Leu Glu Asp Ala Lys Lys Glu Gly Pro Tyr Asp Val

65 70 75 80

Val Val Leu Pro Gly Gly Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Ser Glu Ser

85 90 95

Ala Ala Val Lys Glu Ile Leu Lys Glu Gln Glu Asn Arg Lys Gly Leu

100 105 110

Ile Ala Ala Ile Cys Ala Gly Pro Thr Ala Leu Leu Ala His Glu Ile

115 120 125

Gly Cys Gly Ser Lys Val Thr Thr His Pro Leu Ala Lys Asp Lys Met

130 135 140

Met Asn Gly Gly His Tyr Thr Tyr Ser Glu Asn Arg Val Glu Lys Asp

145 150 155 160

Gly Leu Ile Leu Thr Ser Arg Gly Pro Gly Thr Ser Phe Glu Phe Ala

165 170 175

Leu Ala Ile Val Glu Ala Leu Asn Gly Lys Glu Val Ala Ala Gln Val

180 185 190

Lys Ala Pro Leu Val Leu Lys Asp

195 200

<210> 6

<211> 653

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide encoding DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 6

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccggcgg cagccactcg agatggcttc 60

caaaagagct ctggtcaccc tggctaaagg agcagaggaa atggagacgg tcatccctgt 120

agatgtcatg aggcgagctg ggattaaggt caccgttgca ggcctggctg gaaaagaccc 180

agtacagtgt agccgtgatg tggtcatttg tcctgatgcc agccttgaag atgcaaaaaa 240

agagggacca tatgatgtgg tggttctacc aggaggtaat ctgggcgcac agaatttattc 300

tgagtctgct gctgtgaagg agatactgaa ggagcaggaa aaccggaagg gcctgatagc 360

cgccatctgt gcaggtccta ctgctctgtt ggctcatgaa ataggctgtg gaagtaaagt 420

tacaacacac cctcttgcta aagacaaaat gatgaatgga ggctattaca cctactctga 480

gaatcgtgtg gaaaaagacg gcctgattct tacaagccgg gggcctggga ccagcttcga 540

gtttgcgctt gcaattgttg aagccctgaa tggcaaggag gtggcggctc aagtgaaggc 600

tccacttggt cttaaagacg gatcctagga agaagcggag acagcgacga aga 653

<210> 7

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 7

Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Leu Glu Met Ala Ser Lys

1 5 10 15

Arg Ala Leu Val Ile Leu Ala Lys Gly Ala Glu Glu Met Glu Thr Val

20 25 30

Ile Pro Val Asp Val Met Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Thr Val Ala

35 40 45

Gly Leu Ala Gly Lys Asp Pro Val Gln Cys Ser Arg Asp Val Val Ile

50 55 60

Cys Pro Asp Ala Ser Leu Glu Asp Ala Lys Lys Glu Gly Pro Tyr Asp
65 70 75 80

Val Val Val Leu Pro Gly Gly Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Ser Glu
85 90 95

Ser Ala Ala Val Lys Glu Ile Leu Lys Glu Gln Glu Asn Arg Lys Gly

100 105 110
Leu Ile Ala Ala Ile Cys Ala Gly Pro Thr Ala Leu Leu Ala His Glu

115 120 125
Ile Gly Cys Gly Ser Lys Val Thr Thr His Pro Leu Ala Lys Asp Lys

130 135 140
Met Met Asn Gly Gly His Tyr Thr Tyr Ser Glu Asn Arg Val Glu Lys

145 150 155 160
Asp Gly Leu Ile Leu Thr Ser Arg Gly Pro Gly Thr Ser Phe Glu Phe

165 170 175

Ala Leu Ala Ile Val Glu Ala Leu Asn Gly Lys Glu Val Ala Ala Gln
180 185 190

Val Lys Ala Pro Leu Val Leu Lys Asp Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
195 200 205

Arg Arg

210

<210> 8

<211> 682

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide encoding Tat-DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 8

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60

agacagcgac gaagactcga gatggcttcc aaaagagctc tggatcatcct ggctaaagga 120

gcagagggaaa tggagacggg catccctgta gatgtcatga ggcgagctgg gattaaggctc 180

accgttgcag gcctggctgg aaaagacca gtacagtga gccgtgatgt ggtcatttgt 240

cctgatgccg gccttgaaga tgcaaaaaaa gagggacat atgatgtggt ggttctacca 300

ggaggtaatc tgggcgcaca gaatttatct gactctgctg ctgtgaagga gatactgaag 360

gagcaggaacc accggaaggg cctgatagcc gccatctgtg caggctctac tgctctgttg 420
gctcatgaaa taggctgtgg aagtaaagtt acaacacacc ctcttgctaa agacaaaatg 480
atgaatggag gtcattacac ctactctgag aatcgtgtgg aaaaagacgg cctgattctt 540

acaagccggg ggccctgggac cagcttcgag ttgctgttg caattgttga agccctgaat 600
ggcaaggagg tggcggctca agtgaaggct ccacttggtc ttaaagacgg atcctaggaa 660
gaagcggaga cagcgacgaa ga 682

<210> 9

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 9

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Ser Lys Arg

1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Leu Ala Lys Gly Ala Glu Glu Met Glu Thr Val Ile

20 25 30

Pro Val Asp Val Met Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Thr Val Ala Gly

35 40 45

Leu Ala Gly Lys Asp Pro Val Gln Cys Ser Arg Asp Val Val Ile Cys

50 55 60

Pro Asp Ala Ser Leu Glu Asp Ala Lys Lys Glu Gly Pro Tyr Asp Val

65 70 75 80

Val Val Leu Pro Gly Gly Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Ser Glu Ser

85 90 95

Ala Ala Val Lys Glu Ile Leu Lys Glu Gln Glu Asn Arg Lys Gly Leu

100 105 110

Ile Ala Ala Ile Cys Ala Gly Pro Thr Ala Leu Leu Ala His Glu Ile

115 120 125

Gly Cys Gly Ser Lys Val Thr Thr His Pro Leu Ala Lys Asp Lys Met

130 135 140

Met Asn Gly Gly His Tyr Thr Tyr Ser Glu Asn Arg Val Glu Lys Asp

145 150 155 160

Gly Leu Ile Leu Thr Ser Arg Gly Pro Gly Thr Ser Phe Glu Phe Ala

165

170

175

Leu Ala Ile Val Glu Ala Leu Asn Gly Lys Glu Val Ala Ala Gln Val

180

185

190

Lys Ala Pro Leu Val Leu Lys Asp Gly Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln

195

200

205

Arg Arg Arg

210