

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0021105 (43) 공개일자 2012년03월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 33/04 (2006.01) A61K 31/198 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)	
(21) 출원번호 10-2010-0085158	(72) 발명자 서영록 서울특별시 성북구 오패산로 90, 삼성래미안 107 동 1102호 (하월곡동)	
(22) 출원일자 2010년08월31일 심사청구일자 2010년08월31일	정화진 부산광역시 금정구 수림로85번길 2 (장전동) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인다나	

전체 청구항 수 : 총 10 항

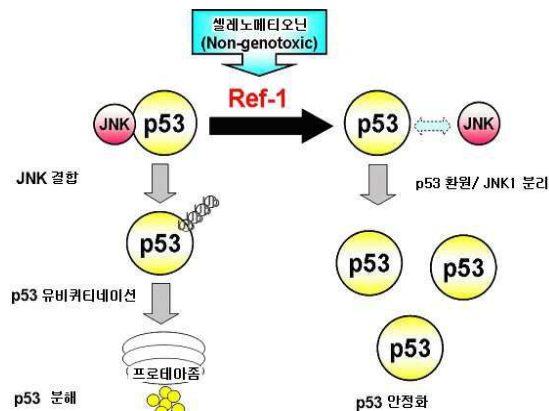
(54) 발명의 명칭 p 53 단백질 안정화용 조성물 및 안정화 방법

(57) 요약

본 발명은 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물 및 세포내 p53 단백질의 안정화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 셀레늄을 포함하는 조성물은 유전독성(genotoxic)을 유발하지 않으면서 세포내 p53 단백질을 안정화시킬 수 있으며, 이러한 세포내 p53 단백질의 안정화를 통해 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김혜림

강원도 원주시 동진골1길 84, 정상하이츠 4층 (일산동)

류재천

서울특별시 종로구 통일로18길 9, 107동 203호 (무악동, 인왕산아이파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0076880

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 항산화제 SeMet 의 새로운 암 예방 기전 연구 : 레독스 인자 Ref-1을 중심으로한 항종양인자 p53의 protein stability 조절

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2010.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 포함하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

셀레늄 화합물은 셀레노메티오닌인 것을 특징으로 하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 p53 단백질의 안정화는 p53 단백질의 탈유비퀴틴화에 의한 것인 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 p53 단백질의 안정화는 JNK1 또는 Ref-1 단백질의 활성화에 의한 것인 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물인 것을 특징으로 하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

셀레늄 또는 셀레늄 화합물은 상기 조성물 내에서 10 내지 40 μM 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물.

청구항 7

셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 대상체에 투여하는 것을 특징으로 하는 세포내 p53 단백질의 안정화 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 p53 단백질의 p53 단백질의 탈유비퀴틴화에 의한 것인 세포내 p53 단백질의 안정화 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 p53 단백질의 안정화는 JNK1 또는 Ref-1 단백질의 활성화에 의한 것인 세포내 p53 단백질의 안정화 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 셀레늄 화합물은 셀레노메티오닌인 세포내 p53 단백질의 안정화 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물 및 세포내 p53 단백질의 안정화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] p53 단백질은 핵 내에 존재하는 인산화 단백질로서 게놈(genome)의 안정성을 유지하는데 필수적인 역할을 수행한다. 세포에서 p53이 그 기능을 상실하는 경우에는 게놈의 안정성이 무너지면서 암세포화되어 자율적으로 과잉 증식을 하고 돌연변이가 쉽게 발생하여 악성 암으로 진행하게 된다. 실제로 암 환자의 종양세포의 절반 가량에서 p53의 돌연변이가 관찰되며 빈도의 차이만 있을 뿐 거의 모든 종류의 암에서 p53의 돌연변이가 발견된다. 따라서 세포 내에서 정상 p53 단백질의 유도는 각종 암에 대한 효과적인 예방 및 치료법이 될 수 있다.

[0003] p53단백질의 유도는 두 상호 연결된 절차, 즉 단백질의 안정화 (프로테아좀-의존성 분해로부터의 탈출)와 활성화(불활성 형태로부터 타겟 유전자의 특정 DNA 서열에 높은 친화력을 갖는 활성 형태로의 전환)로 이루어지는 것으로 보고되었다(Nelson and Kastan, 1994, Cell Biol. 14, 1815-1823; Oren, 1999, Biol. Chem. 274, 36031-36034).

[0004] 본 발명자들은 이전 연구에서 셀레늄 화합물의 한 형태인 셀레노메티오닌(SeMet)에 의한 p53 단백질의 활성화 메커니즘을 밝혀낸 바 있다(Seo et al. 2002, Oncogene 21, 3663-3669; Seo et al. 2002, Proc Natl Acad Sci USA 99, 14548-14553). 셀레노메티오닌은 셀레늄을 함유하는 화합물의 한 형태로서 식용 셀레늄의 주요 성분인데, 셀레노메티오닌에 의해 레독스 인자인 Ref-1 단백질이 활성화되면 p53의 산화환원체계의 변화에 의해 p53 단백질이 활성화됨을 밝혔다.

[0005] 셀레늄은 활성산소를 억제하는 항산화 기능이 탁월해 노화방지에 효과가 있을 뿐만 아니라 암의 유력한 화학적 예방(chemopreventive) 제제로도 알려져 왔으며, 특히 암세포의 세포자멸(apoptosis)을 유도함으로써 항암효과를 갖는 것으로 알려졌다. 그러나 셀레늄의 p53 단백질 안정화 메커니즘에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 유전독성(genotoxic)을 유발하지 않고 세포내 p53 단백질을 안정화시킬 수 있는 셀레늄의 새로운 용도를 제공함을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 셀레늄을 포함하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물 및 셀레늄을 이용한 세포내 p53 단백질의 안정화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 셀레늄을 포함하는 조성물은 유전독성을 유발하지 않으면서 세포내 p53 단백질을 안정화시킬 수 있으며, 이러한 세포내 p53 단백질의 안정화를 통해 궁극적으로는 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 셀레노메티오닌에 의한 p53 단백질의 안정화 메커니즘을 도식화하여 나타낸다.

도 2는 셀레노메티오닌의 처리에 의한 p53의 유비퀴틴화를 면역블로팅법을 사용하여 분석한 결과이다.

도 3은 mock 처리한 세포와 JNK1 siRNA 처리한 세포에서 p53의 유비퀴틴화를 면역블로팅법을 사용하여 분석한 결과이다.

도 4는 mock 처리한 세포와 Ref-1 siRNA 처리한 세포에서 JNK1과 p53의 상호작용을 웨스턴블로팅법을 사용하여 분석한 결과이다.

도 5는 전체 세포 용해물에서의 JNK1 및 p53 레벨을 웨스턴블로팅법을 사용하여 분석한 결과이다.

도 6은 공초점현미경을 사용하여mock 처리한 세포와 Ref-1 siRNA 처리한 세포의 형광강도를 측정한 결과를 나타

낸다.

도 7 은 Quantity One Basic 소프트웨어(Bio-Rad, Hercules, CA,USA)를 사용하여 형광 강도를 정량화한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명은 셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 포함하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명에서 사용되는 "단백질 안정화"란 단백질의 분해, 변형, 응집 또는 생물학적 활성의 손실로부터 단백질을 보호하는 것을 의미한다.
- [0012] 본 발명에서 사용되는 "p53 단백질의 안정화"란 프로테아좀에 의한 p53 단백질의 분해를 억제하여 p53 단백질을 보호하는 것을 의미한다. 더욱 구체적으로는, p53 단백질의 유비퀴티네이션을 억제함으로써 프로테아좀에 의한 p53 단백질의 분해로부터 p53 단백질을 보호하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 "셀레늄 또는 셀레늄 화합물"이라는 용어는 임의의 공지된 셀레늄 함유 화합물을 의미하는 것으로 셀레늄, 그 염 및 유도체를 포함한다. 셀레늄은 원소 형태 또는 기타의 유기 또는 무기 셀레늄 화합물들로 존재할 수 있다. 그와 같은 화합물들에서, 셀레늄은 -2, 0, +2, +4, 및 +6의 산화 상태들을 가질 수 있다. 무기 셀레늄 화합물들로서, 이산화셀레늄, 셀레논산, 셀레산 및 그들의 염류, 특히, 금속 셀레나이드류 또는 아셀레산염류(예를 들면, 포타슘 셀레나이드, 소듐 셀레나이드, 아셀레산 나트륨, 징크 셀레나이드, 아셀레산 바륨, 아셀레산 리튬, 아셀레산 칼슘 및 다른 금속 셀레나이드류 또는 아셀레산염류)와 같은 화합물들이 사용될 수 있다. 또한, 셀레늄은 셀레노-아미노산, 예를 들면, 메틸셀레노시스테인, 메틸로셀레닌산, 셀레노메티오닌, 셀레노시스테인과 같은 그의 유기 형태들로 사용될 수 있다. 기타의 유용한 유기 셀레늄 화합물들의 예로써 디메틸 셀레나이드, 모든 다른 유기 셀레나이드류, 셀레노글루타치온, 유기-셀레늄 복합 인자 3(organo-selenium complex Factor 3) 등이 있다. 셀레늄은 광범위한 식품류에서 다양한 양들로 자연적으로 발생하며 또한 황-함유 아미노산류의 천연 형태에서 불순물로서, 예를 들면 셀레노메티오닌으로서 메티오닌과 함께 혼합된 형태로 존재하는데, 이는 황과 셀레늄의 화학적 성질 및 반응성이 매우 유사하기 때문이다. 셀레늄은 비유전독성(non-genotoxic) 제제로서, 셀레늄을 포함하는 p53 단백질 안정화용 조성물은 유전독성을 유발하지 않으면서 세포내 p53 단백질을 안정화할 수 있다.
- [0013] 바람직하게, 상기 셀레늄 화합물은 유기 셀레늄 화합물일 수 있다. 유기 셀레늄 화합물은 무기 셀레늄 화합물보다 독성이 없거나 적은 것으로 알려져 있어 세포 보호제로서의 사용 가능성이 높다. 그 예로 셀레노-아미노산, 예를 들면, 메틸셀레노시스테인, 메틸로셀레닌산, 셀레노메티오닌, 셀레노시스테인 등이 있으며 기타의 유용한 유기 셀레늄 화합물들의 예로써 디메틸 셀레나이드, 모든 다른 유기 셀레나이드류, 셀레노글루타치온, 유기-셀레늄 복합 인자 3(organo-selenium complex Factor 3) 등이 있다.
- [0014] 더욱 바람직하게, 상기 셀레늄 화합물은 셀레노메티오닌일 수 있다. 셀레노메티오닌은 셀레늄 화합물 중에서도 특히 비독성이면서 DNA를 손상시키지 않으며 식용 셀레늄의 주요 성분인 것으로 알려져 있다.
- [0015] 본 발명자들은 하기 실시예를 통해 셀레노메티오닌이 p53 단백질의 유비퀴티네이션을 억제함으로써 프로테아좀에 의한 p53 단백질의 분해를 저해하여 세포내 p53 단백질을 안정화시킬 수 있음을 밝혔다.
- [0016] 따라서 본 발명은 상기 셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 포함하는 세포내 p53 단백질의 탈유비퀴틴화용 조성물을 제공한다.
- [0017] p53 단백질의 유비퀴티네이션은 p53의 음성 조절자(negative regulator) 중 하나인 JNK1에 의해 나타난다. p53의 일부 음성 조절자들은 비자극 세포 내에서 p53 단백질에 결합하여 p53 단백질의 유비퀴티네이션을 유도함으로써 프로테아좀을 통해 p53 단백질을 분해시킨다. 주요 음성 조절자 중 하나인 JNK1(c-Jun-NH2-kinase)은 비자극 세포에서 불활성 형태로 프로테아좀에 의한 분해를 위해 p53의 97-116 잔기에 결합하는 단백질로서, JNK1은 비자극 세포 내에서 p53 단백질의 기초 레벨 조절자로서 중요하게 작용하는 것으로 알려졌다(Fuchs et al. 1998, Genes & Development 12, 2658-2663; Fuchs et al. 1998, Oncogene 17, 1483-1490). 비자극 세포 내에서 JNK1과 p53의 복합체는 p53 단백질의 유비퀴티네이션을 유도하고 결과적으로 프로테아좀을 통한 p53 단백질의 분해를 유도한다.
- [0018] 본 발명자들은 셀레노메티오닌이 레독스 인자인 Ref-1 단백질을 활성화시킴으로써 p53 단백질의 산화환원체계의 변화를 유도하고, 이를 통해 JNK1과 p53의 복합체를 해리시킴으로써 p53 단백질의 유비퀴티네이션을 억제하여, 결과적으로 p53 단백질의 프로테아좀-의존성 분해를 억제함으로써 p53 단백질을 안정화시키는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

- [0019] 따라서 본 발명은 또한 셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 포함하는 세포내 p53 단백질의 JNK1 또는 Ref-1 단백질의 활성화용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 p53 단백질의 산화환원체계의 변화는 p53 단백질의 시스테인 잔기를 환원시킴으로써 일어남을 특징으로 한다.
- [0021] 도 1은 셀레노메티오닌에 의한 p53 단백질의 안정화 메커니즘을 도식화한 것이다. 비자극 세포 내에서는 불활성 상태의 JNK1과 p53이 결합하여 복합체를 형성함으로써 p53 단백질의 유비퀴티네이션을 유도하고 결국 프로테아좀에 의해 p53 단백질이 분해된다. 그러나 셀레노메티오닌을 첨가하면 Ref-1 단백질의 활성화에 의해 p53 단백질의 산화환원체계가 변화함에 따라 JNK1과 p53 복합체가 해리되어 p53 단백질의 유비퀴티네이션이 억제되고, 결과적으로 프로테아좀에 의해 p53 단백질이 분해되는 것을 막을 수 있다.
- [0022] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물은 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물로 이용할 수 있다. 따라서 본 발명은 셀레늄의 암의 예방 또는 치료를 위한 용도, 셀레늄을 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물, 및 치료상 유효량의 셀레늄을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 또한 바람직하게 상기 셀레늄은 셀레노메티오닌일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 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. 예컨대, 성인의 경우, 셀레늄을 포함하는 세포내 p53 단백질 안정화용 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 셀레늄을 0.01mg/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, "대상체"는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0027] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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.
- [0028] 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 증, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 셀레늄 또는 셀레늄 화합물은 조성물 내에서 10 내지 40 μM 농도로 포함될 수 있다. 셀레늄 또는 셀레늄 화합물이 10 μM 보다 적으면 본 발명에 따른 세포내 p53 단백질 안정화 효과를 발휘하기 어렵고, 40 μM 보다 많으면 세포 독성을 유발할 염려가 있다.
- [0031] 또한 본 발명은 셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 대상체에 투여하는 것을 특징으로 하는 세포내 p53 단백질의 안정화 방법을 제공한다.
- [0032] 이 때 상기 셀레늄 또는 셀레늄 화합물은 세포내 p53 단백질을 안정화시키기 위한 유효량으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 세포내 p53 단백질의 안정화는 p53 단백질의 탈유비퀴틴화에 의한 것일 수

있다. 따라서 본 발명은 유효량의 셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 대상체에 투여하는 것을 특징으로 하는 p53 단백질의 탈유비퀴틴화 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 p53 단백질의 안정화는 JNK1 또는 Ref-1 단백질의 활성화에 의한 것일 수 있다. 따라서 본 발명은 유효량의 셀레늄 또는 셀레늄 화합물을 대상체에 투여하는 것을 특징으로 하는 JNK1 또는 Ref-1 단백질의 활성화 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 셀레늄 화합물은 전술한 바와 같으며, 특히 셀레노메티오닌인 것이 바람직하다.

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0037] 하기의 실험예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0038] <실험예>

[0039] 야생형 p53을 갖는 인간 결장암 RKO 세포의 배양

[0040] 야생형 p53 갖는 인간 결장암 RKO 세포를 RPMI 1640 배지(Gibco, USA)에 10% FBS(Gibco, USA)와 항생물질들을 넣고 배양하였다. RKO 세포를 37℃에서 16시간 동안 셀레노메티오닌(10, 20 및 40 μ M) 및 5% CO₂로 처리하였다.

[0041] JNK1과 Ref-1 의 siRNA 감염

[0042] JNK1과 Ref-1을 타겟으로 하는 siRNA를 디자인하여 Dharmacon(Chicago, IL, USA)으로 합성하였다. RKO 세포의 감염은 올리고펙타민 시약(Oligofectamine Reagent, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)을 사용하여 단일가닥 센스, 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드로 수행하였다(인간 Ref-1 센스 RNA: 5'-AUAUUGCUUCGUGGGUGA-3"; 인간 Ref-1 안티센스 RNA: 5'-UCACCCACCGAAGCAAUAUdTdT-3"). 각각의 웰에서, 5nmol의 siJNK1 5 μ l 을 170 μ l 의 Opti-MEM(invitrogen)으로 희석하였다. 그 후 4 μ l의 올리고펙타민(invitrogen)을 희석하여 15 μ l의 무혈청 RPMI 1640 배지에서 10분간 배양하였다. 두 용액을 실온에서 20분간 혼합하였다. 각각의 RKO 세포들에서 4시간의 트랜스펙션 후에, 트랜스펙션된 세포들을 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

[0043] 면역블롯팅 (Immunoblotting)

[0044] 모든 면역블롯팅은 Jung et al.(2007, Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells. Oncogene 26: 7517-7525)과 같이 수행하였다. 항체는 다음과 같다: p53((DO-1, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); 유비퀴틴 (Labfrontier, 한국); JNK1 (C-17, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); APE1/Ref-1 (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany, USA); 및 GAPDH (Labfrontier, Seoul, South Korea). 검출은 양고추냉이 페록시다제 접합된 2차 항체 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 와 enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA)로 수행하였다.

[0045] 면역침강법 (Immunoprecipitation)

[0046] 세포는 프로테아제 억제제(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 포함하는 면역침강 버퍼(1% Nonidet P 40, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 7.8), 150mM NaCl, 1mM DTT, 0.5mM EDTA)로 4℃에서 30 분 동안 용해시켰다. 샘플들은 5초간 초음파분해 하였다. 가용성 단백질 추출액의 동일량을 20 μ l 단백질 A/G 아가로스 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)에서 4℃로 30분간 흔들어 배양하여 미리 준비해두었다. 면역침강을 위하여 상등액을 나누어 1 μ g의 마우스 anti-p53 항체(DO-1, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 마우스 anti-유비퀴틴 항체 (Labfrontier, 한국)를 넣고 4℃에서 6시간 동안 배양하였다. 1차 항체와 함께 6시간 배양한 후에, 면역 복합체를 20 μ l 단백질 A/G 아가로스 비드(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 함께 밤새 모아 IP 버퍼로 세 번 세척하였다. 면역침강 단백질들은 4x 샘플 버퍼에 다시 넣고, 10% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)로 분석하였고, 적절한 항체들로 면역블로팅하기 전에 세포막으로 전기이동(electrotransfer) 시켰다.

[0047] **In vivo 유비퀴티네이션 분석**

[0048] In vivo 유비퀴티네이션 분석을 위해서 셀레노메티오닌의 존재 하에서 RKO 세포에 MG132(25 μ M)를 8시간 처리하였다. 그 후 세포들을 프로테아좀 억제제 MG132 (25 μ M)와 프로테아제 억제제(CompleteTM, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 포함하는 변형된 RIPA 버퍼 (1% Nonidet P 40, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 7.8), 150mM NaCl, 1mM DTT, 0.5mM EDTA)로 용해시켰다. 용해물들은 마우스 anti-p53 항체(DO-1, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)로 면역침강하였고 anti-JNK1 항체(C-17, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 사용하여 면역블로팅하여 분석하였다.

[0049] **세포내 ROS 검출**

[0050] 세포를 PBS로 세척하고 CM-H₂DCFDA를 5 μ M 농도로 처리하여 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후에 세포들을 PBS로 세척하고 즉시 형광현미경 Leica DMIRB (Wetzlar, Germany)로 관찰하였다. 형광 강도는 각 그룹에서 무작위로 얻은 10개의 공초점 이미지들로부터 NIS-Elements BR 3.0 소프트웨어(Nikon, Japan)를 사용하여 측정하였다.

[0051] **<실시예 1> 셀레노메티오닌에 의한 p53 단백질의 유비퀴티네이션의 감소**

[0052] 프로테아좀 억제제 MG132(25 μ M, 8시간)의 존재 또는 부재 하에서 인간 결장암 RKO 세포에 셀레노메티오닌을 10, 20 및 40 μ M 처리하여 유비퀴티네이션 분석을 수행하였다.

[0053] 도 2는 MG132의 존재하에 셀레노메티오닌을 처리한 경우 p53-유비퀴틴 복합체의 양이 상당히 감소되었음을 보여준다. 이는 셀레노메티오닌에 의해 p53 단백질의 유비퀴티네이션이 억제되고 결과적으로 프로테아좀에 의한 p53 단백질 분해가 억제될 수 있음을 나타낸다.

[0054] **<실시예 2> 셀레노메티오닌에 의한 JNK1-의존성 p53 유비퀴티네이션의 감소**

[0055] RKO 세포를 JNK1 siRNA로 24시간 감염시킨 후 20 μ M 셀레노메티오닌을 16시간 동안 처리하였다. 25 μ M MG132로 8시간 처리한 후에 in vivo 유비퀴티네이션 분석을 위한 전체 세포의 용해물을 수득하였다. 전체 단백질 추출물로 면역침강하기 위하여 anti-p53 항체를 사용하였다. p53 유비퀴티네이션은 면역블로팅 방법으로 anti-유비퀴틴 항체를 사용하여 조사하였다.

[0056] 도 3은 프로테아좀 억제제 MG132(25 μ M, 8시간)의 존재 하에서, 유비퀴티네이션된 p53의 양이 mock-처리된 세포에 비해 JNK1 siRNA 처리된 세포에서 상당히 감소되었음을 보여준다. 이는 JNK1 단백질이 p53 단백질의 유비퀴티네이션을 유도함을 의미한다.

[0057] **<실시예 3> 셀레노메티오닌에 의한 Ref-1-조절된 JNK1과 p53 복합체의 해리**

[0058] Ref-1 siRNA 처리된 세포와 mock-처리된 세포에서 면역침전법을 이용하여 셀레노메티오닌에 의한 JNK1과 p53의 상호작용의 변화를 시험하였다. RKO 세포를 Ref-1 siRNA 또는 mock로 24시간 트랜스펙션시킨 후 20 μ M의 셀레노메티오닌을 16시간 동안 처리하였다. 전체 단백질 추출액을 anti-p53 항체(DO-1)로 면역침강하였고, 면역침강은 anti-JNK1 항체를 이용하여 웨스턴블롯으로 분석하였다.

[0059] 도 4에서 Anti-p53 항체로 면역침강한 후 이를 anti-JNK1으로 웨스턴블롯을 수행한 결과 나타난 밴드는 JNK1과 p53의 복합체를 의미하며, 도 4는 JNK1과 p53 복합체의 형성이 mock-처리된 세포에 비해 Ref-1 siRNA 처리된 세포에서 증가됨을 보여준다. 이는 Ref-1 단백질이 JNK1-p53 복합체의 해리를 유도함을 의미한다.

[0060] 전체 세포 용해물에서의 p53과 JNK1의 레벨은 웨스턴 블롯에 의해 측정하였다. Gapdh 검출은 로딩 컨트롤로 사용하였다.

[0061] 도 5는 p53의 레벨이 Ref-1 siRNA 처리된 세포에서 감소됨을 보여주는데, 이는 Ref-1이 p53의 분해를 억제할 수 있음을 의미한다. 반면, 전체 세포 용해물에서 JNK1의 레벨은 Ref-1 siRNA 처리에 의해 변하지 않았다.

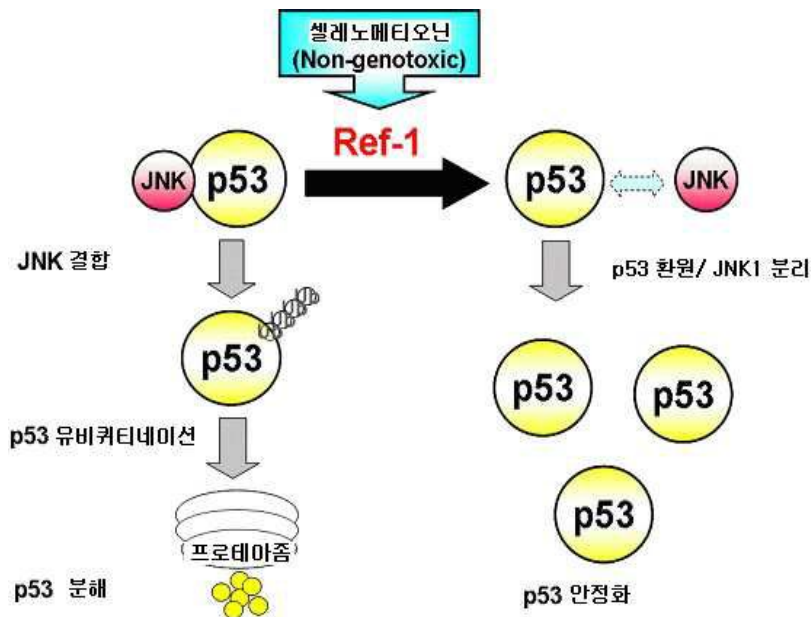
[0062] Ref-1 활성이 셀레노메티오닌의 항산화 기능과 관련이 있는지를 밝히기 위해, 세포내 ROS 레벨을 나타내는 10 μ M H₂O₂의 존재 또는 부존재 하에서 Ref-1 siRNA 처리된 세포를 CM-H₂DCFDA로 염색하여 형광 강도를 측정하였다. CM-H₂DCFDA는 그 자체로서는 무색이지만 세포 내로 들어가면 세포내 에스테라아제에 의해 절단되고 세포내 산화촉진제에 의해 형광 화합물로 산화되어 형광을 나타내는 세포 투과성 염료이다. 형광 강도는 세포 내에 존재하는 ROS 레벨에 정비례한다.

[0063] 도 6은 공초점현미경 분석 결과를 나타내며, 도 7은 상기 형광 강도를 Quantity One Basic 소프트웨어(Bio-Rad, Hercules, CA,USA)를 사용하여 이미지 분석을 통해 형광 정량화한 결과를 나타낸다.

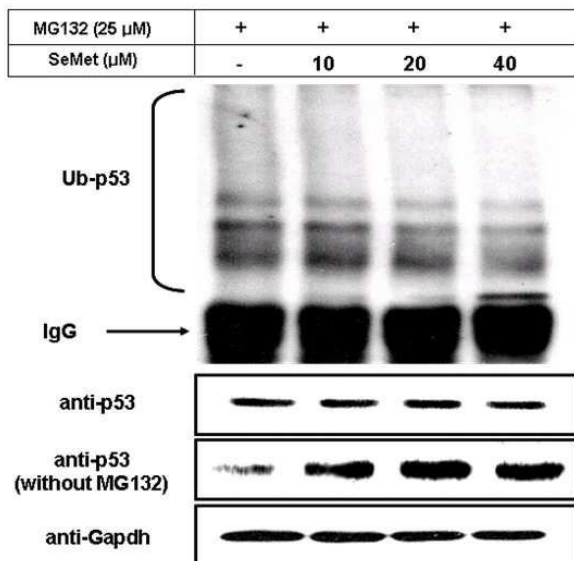
[0064] 도 6 및 도 7은 mock-처리한 세포에 비해 Ref-1 siRNA 처리된 세포에서 형광 강도가 상당히 높았음을 보여주며, 이는 Ref-1이 항산화 활성을 가짐을 의미한다. 특히 H₂O₂ 만을 처리한 것에 비해 셀레노메티오닌과 H₂O₂를 함께 처리한 경우에 mock-처리한 세포에서의 형광 강도가 훨씬 낮아졌는바, 셀레노메티오닌이 Ref-1을 활성화하여 Ref-1의 항산화 효과가 증가하였음을 알 수 있다. 결국 셀레노메티오닌에 반응한 Ref-1의 활성이 세포내 산화환원체계의 조절에 있어서 항산화 작용의 핵심 인자일 수 있음을 의미한다.

도면

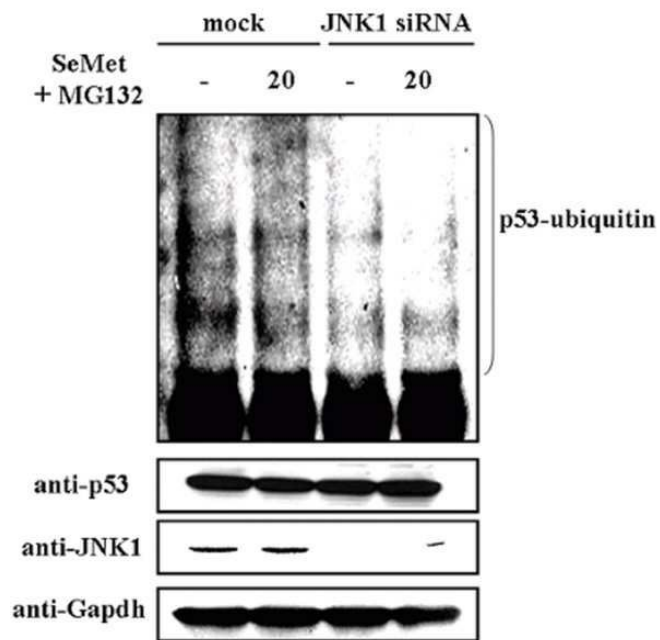
도면1



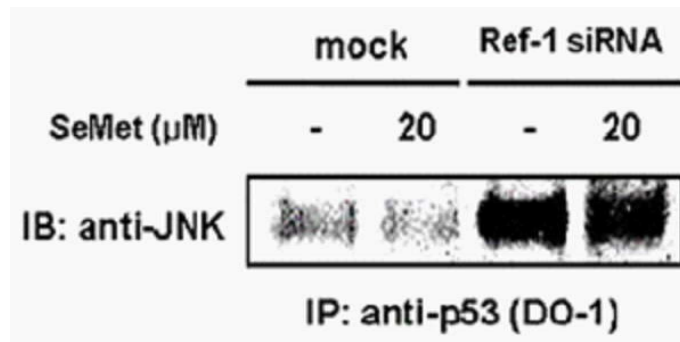
도면2



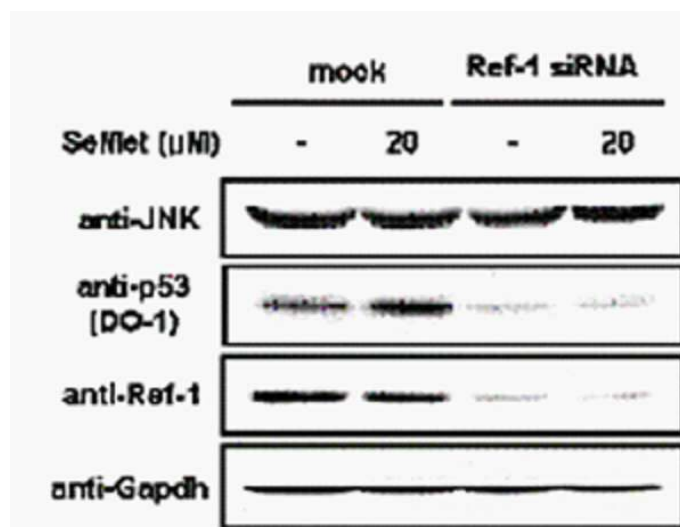
도면3



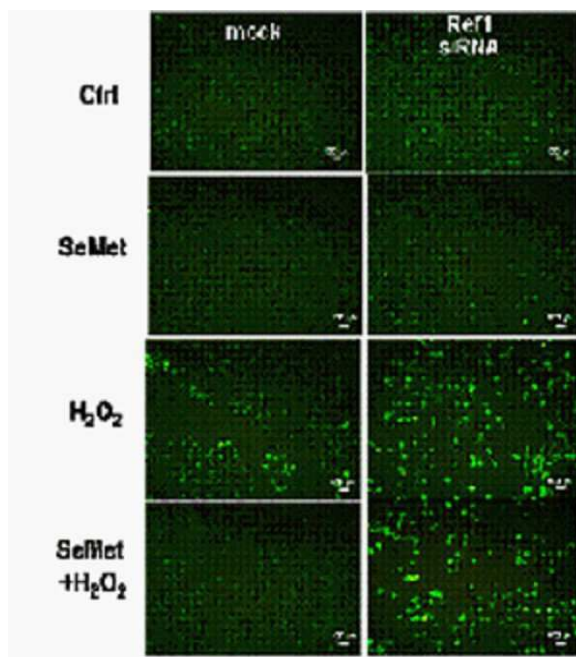
도면4



도면5



도면6



도면7

