(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0077646
(43) 공개일자 2021년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7024 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/50* (2017.01)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7024 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-0177447
(22) 출원일자 2020년12월17일
심사청구일자 2020년12월17일
(30) 우선권주장
62/948,928 2019년12월17일 미국(US)

(71) 출원인
주식회사 프로텍바이오
서울특별시 종로구 대학로 103, 융합관 408호(연건동, 서울대학교의과대학)
(72) 발명자
권용태
서울특별시 종로구 대학로 103, 408호 (연건동)
심상미
서울특별시 종로구 대학로 103, 408호 (연건동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김민정, 김 순 영

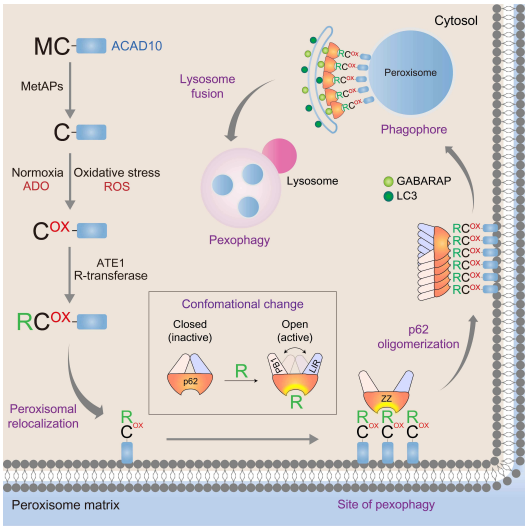
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **N-데그론 경로의 N-말단 아르기닐화에 의한 펙소파지의 조절, PBD 의 예방, 개선 또는 치료하는 물질의 스크리닝 방법, PBD를 진단하는 방법 및 펙소파지 조절, 또는 PBD 의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 펙소파지를 억제하는 새로운 경로의 발견 및 이러한 발견에 의한 퍼옥시좀 형성장애에의 적용에 관한 것으로, 보다 상세하게는 ATE1, ACAD10 및 이들의 상호작용의 억제를 확인하는 것을 통해 PBD 또는 이의 관련 질환에 유효한 약물을 스크리닝하는 방법, N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하여 PBD 또는 이의 관련 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법 및 진단용 조성물, 그리고 탄닌산을 포함하는 펙소파지 억제용, 및 PBD 또는 이의 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도22



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/5044 (2013.01)
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/9108 (2013.01)
(72) 발명자
최하림
서울특별시 종로구 대학로 103, 408호 (연건동)

성기운
서울특별시 종로구 대학로 103, 408호 (연건동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711041214
과제번호	2016R1A2B3011389
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인연구지원
연구과제명	N-말단 아르기닌화에 의한 소포체 단백질 대사 조절
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2016.06.01~2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

탄닌산 또는 이의 염을 포함하는 퍼옥시좀 형성 장애(PBD) 또는 이의 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PBD 관련 질병은 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome), 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease), 신생아형 부신백색질장애(neonatal adrenoleukodystrophy), 및 점상 연골형성이상(rhizomelic chondrodysplasia punctata) (RCDP)로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 약학적 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, PBD 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 PBD 관련 질병은 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome), 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease), 신생아형 부신백색질장애(neonatal adrenoleukodystrophy), 및 점상 연골형성이상(rhizomelic chondrodysplasia punctata) (RCDP)로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 경구 투여; 경피 투여; 및 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 근육 내 투여 및 경비 투여로 이루어지는 군에서 선택되는 비경구 투여의 방법으로 투여하는 것인, 방법.

청구항 6

(a) ATE1 및 ACAD10을 발현하는 세포에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및

(b) 하기 1) 내지 3) 중 어느 하나를 결정하는 단계를 포함하는,

1) ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부,

2) ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부, 및

3) ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부;

PBD 관련 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 7

(a') 분리된 ATE1 및 분리된 ACAD10의 혼합물에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및

(b') ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는,

PBD 관련 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 ACAD10은 N-말단 잔기가 $N\text{-}RC^{OX}$인 것인, 방법;

상기 R은 아르기닌(Arg)이고, 상기 C^{OX}는 산화된 형태의 시스테인(Cys)이다.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 ATE1의 수준, ACAD10의 수준, 및 ATE1 및 ACAD10의 상호작용을 면역블롯팅, 면역침전법, 또는 면역염색법에 의해 검출하는 것인, 방법.

청구항 10

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 ATE1 및 ACAD10은 각각 리포터 단백질에 연결된 것인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 리포터 단백질은 클로람페니콜아세틸트랜스퍼라제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 베타-갈락토시다제 또는 형광 단백질인 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein), 청색 형광 단백질 (blue fluorescent protein), 황색 형광 단백질 (yellow fluorescent protein), 남색 형광 단백질 (cyan fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질 (enhanced green fluorescent protein), 증강된 적색 형광 단백질, 증강된 청색 형광 단백질, 증강된 황색 형광 단백질 또는 증강된 남색 형광 단백질인, 방법.

청구항 13

환자로부터 분리된 시료로부터 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하는 제제를 포함하는, PBD 관련 질병의 진단용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 ACAD10 단백질을 검출하는 제제는, 항 ACAD10 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 PBD 관련 질병은 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome), 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease), 신생아형 부신백색질장애(neonatal adrenoleukodystrophy), 및 점상 연골형성이상(rhizomelic chondrodysplasia punctata) (RCDP)로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 펙소파지를 억제하는 새로운 경로의 발견 및 이러한 발견에 의한 퍼옥시좀 형성 장애에의 적용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미토콘드리아, 소포체 및 퍼옥시좀(과산화소체, peroxisomes)과 같은 단백질 및 세포소기관은 세포 항상성을 유지하거나 다양한 스트레스에 대한 반응으로 항구적(constitutive) 및 스트레스-유발성 분해를 겪는다. 이러한 분해 과정은 주로 유비퀴틴 (Ub)-프로테아좀 시스템 (UPS)과 오토파지-리소좀 (이하 자가포식, 오토파지)에 의해 매개된다. UPS 및 오토파지의 핵심 질문 중 하나는 이러한 기질 각각에 기질의 분해시켜야하는 시기와 위치에 선택적으로 분해 신호 (degradation signals, degrons, 데그론) 태그를 지정하는 방법이다. N-데그론 경로는 단백질의 단일 N-말단 아미노산이 N-데그론이라고 하는 일종의 데그론으로 작용하는 분해 시스템이다. 포유류에서 N- 데그론은 단백질의 N-말단에 노출된 Arg, Lys, His (1형), Phe, Tyr, Trp, Leu, 및 Ile (2형)을 포함한다. UPS에서 이러한 데그론은 UBR1, UBR2, UBR4 및 UBR5와 같은 N-리코그닌의 UBR 상자에 의해 인식되며, 이는 기질 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해를 매개한다. 이들 중 Nt-Arg은 각각 NTAN1 또는 NTAQ1에 의한 Nt-Asn 및

Nt-Gln의 탈아미드화를 통해 생성될 수 있다. 생성된 Nt-Asp 및 Nt-Glu는 ATE1-인코딩된 R-트랜스퍼라아제(R-transferases)에 의해 아미노산 L-Arg와 접합되어 Nt-Arg(R-데그론)을 생성한다. UPS-결합된 N-데그론 경로의 기질은 세포질과 핵에 있는 단기 조절 인자 및 용해성 잘못 접힌 단백질을 포함한다.

[0003] 본 발명자들은 최근 N-데그론 경로가 오토파지 단백질분해 (autophagic proteolysis)를 매개하는 것으로 나타냈다. 여기서 N-데그론은 N-리코그닌 p62에 의해 인식되어 기질을 오토파지로 지정하여 리소좀 분해를 유도한다. N-데그론을 운반하는 오토파지 기질에는 BiP/GRP78, 단백질 이황화 이성질화효소 (protein disulfide isomerase, PDI), calreticulin, GRP94, 및 ERdj5와 같은 ER-상주 분자 샤페론(chaperone)이 포함된다. 이들 단백질은 신호 펩타이드가 ER 내강(lumens)으로의 전위(translocation) 동안 신호 펩티다아제 복합체 (signal peptidase complex)에 의해 공동번역적으로(cotranslationally) 절단될 때 프로-N-데그론(pro-N-degrons)을 획득한다. 세포가 스트레스를 받으면 이러한 ER 샤페론은 세포질로 역이동되며(retrotranslocated), 그 동안 또는 그 후에 프로-N-데그론이 ATE1 R-트랜스퍼라아제에 의해 Nt-아르기닐화된다. 아르기닐화된 단백질의 생성된 Nt-Arg 잔기는 p62의 ZZ 도메인에 결합하여 입체 형태 변화를 유도한다. 이것은 화물과 함께 p62의 자가 중합(self-polymerization)을 자극하는 PB 도메인 및 오토파지 막에서 LC3과의 p62 상호작용을 자극하는 LIR 도메인을 노출시킨다. 이러한 이중 메커니즘은 잘못 접힌 단백질과 그 응집체를 적시에 제거한다.

[0004] 단백질 분해에서 Nt-Cys의 역할은 대체로 불분명하다. 예를 들어, Nt-Cys는 S. cerevisiae에서 안정화되는 반면, 포유류 세포의 Nt-Cys는 UPS 결합 N-데그론 경로를 통해 단백질 분해를 유도 할 수 있다. 기질에는 Nt-Cys2 잔기의 산화 및 아르기닐화 경로를 통해 산소(O_2) 가용성에 의해 대사 안정성이 조절되는 RGS4, RGS5 및 RGS16이 포함된다. 정상 산소 상태에서 이들의 Nt-Met은 Met 아미노펩티다아제(Met aminopeptidases)에 의해 동시번역적으로 절단되어 Nt-Cys2가 노출되며, 이는 차례로 시스테아민 이산소화효소 (cysteamine 2-aminoethanethiol dioxygenase) (ADO)에 의해 산화된다. 생성된 Cys 설핀산 (Cys^{02}) 또는 설폰산 (Cys^{03})은 ATE1에 의해 아르기닐화되어 UBR 상자 함유 N-리코그닌에 의해 인식될 수 있는 Nt-Arg 데그론(R-데그론)을 생성하여 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해를 유도한다. 최근 연구에 따르면 Met-Cys 모티프를 지닌 많은 식물 단백질은 산소 가용성에 따라 Nt-Cys의 산화 및 아르기닐화를 통해 분배된다. 이러한 기질에는 Group VII ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERFVII) 전사 인자, Polycomb 억제 복합체 2 성분 VERNALIZATION2 (VRN2) 및 LITTLE ZIPPER2 (ZPR2) 전사 인자가 포함된다. 이들 기질의 Nt-Cys2는 식물 시스테인 산화 효소 (PCO), PCO1, 및 PCO2 중 하나에 의해 Cys^{o2}로 산화된다. 생성된 Cys^{02}는 ATE1에 의해 아르기닐화되고 프로테아좀 분해를 위해 N-리코그닌 PROTEOLYSIS6 (PRT6)에 의해 유비퀴틴화된다. 일련의 N-말단 변형을 통해 이러한 기질은 일반적으로 분해되지만 침수(submergence) 및 장기 저온 노출과 같은 낮은 산소 조건에서 대사적으로 활성화된다.

[0005] 퍼옥시좀은 50개 이상의 가수분해효소를 포함하는 단일 지질 이중층 막 구조이다. 이러한 효소는 에터 글리세르지질, 담즙산, 콜레스테롤의 형성 및 퓨린, 아미노산의 이화 작용과 같은 다양한 과정을 매개한다. 또한 산화효소는 지방산의 β-산화를 조절하여 활성 산소 종 (ROS)과 활성 질소 종 (RNS)을 생성한다. 이러한 ROS와 RNS는 퍼옥시좀의 카탈라아제와 같은 항산화효소에 의해 물과 산소로 해독된다. 쥐의 간에서 퍼옥시좀은 전체 산소 소비량의 약 20%를 차지하는 전체 H_2O_2의 약 35%를 생성한다. 식물에서 퍼옥시좀의 광호흡 글리콜레이트 산화효소 (glycolate oxidase, GOX)는 미토콘드리아보다 약 50배 더 높은 수준의 H_2O_2를 생성한다. 퍼옥시좀 외에도, 미토콘드리아는 전자 전달 사슬에서 ROS와 RNS를 생성한다. ROS와 RNS를 생성하고 해독하는 동안, 퍼옥시좀과 미토콘드리아는 모두 손상되기 쉬우므로 자가포식을 통한 적시 전환이 필요하다.

[0006] 퍼옥시좀의 수와 크기는 세포 유형 및 외부 환경에 따라 다양하며 융합/분열, 증식 및 전환에 따라 조절된다. 퍼옥시좀의 전환은 산화 스트레스, 기아, 저산소증 또는 퍼옥시좀 기능 장애에 의해 유발되는 펙소파지(pexophagy)라고 하는 선택적 자가포식(autophagy, 오토파지) 분해를 포함한다. 연구에 따르면 퍼옥시좀 단백질 PEX5는 펙소파지동안 수용체로 기능한다. PEX5는 카탈라아제 및 기타 주요 항산화효소와 같은 화물 단백질을 C-말단의 트리펩타이드(tripeptide) 서열인 퍼옥시좀 표적 신호 1 (PTS1)을 인식하여 퍼옥시좀으로 전달한다. 펙소파지동안 PEX5는 E3 효소 PEX10에 의해 단일-유비퀴틴화되어 자가포식 어댑터 NBR1을 모집하기 위한 분자 표지를 생성한다. 단일-유비퀴틴화된 PEX5와 복합체의 NBR1은 자가포식 막에서 LC3을 모집하여 자가포식 표적화 및 퍼옥시좀 막 및 그 내용물의 리소좀 분해를 시작한다.

[0007] 아실-CoA 탈수소효소 (ACAD) 계열은 지방산의 β-산화 및 아미노산의 이화 작용에 관여하는 미토콘드리아 효소를 포함한다. ACAD의 결핍은 근육 피로, 저혈당증 및 간지질증을 포함한 다양한 대사 장애를 유발할 수 있다. 인간 게놈은 기질 특이성이 다른 11개의 ACAD 구성원을 암호화한다. ACAD10은 가수분해효소, 키나아제 및 ACAD

도메인을 포함하고 미토콘드리아와 퍼옥시좀 모두에 국한된 가장 긴 구성원이다. ACAD10의 이상은 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 및 ACAD10 결핍 마우스에서 나타난 것처럼 제2형 당뇨병과 관련이 있다. 제2형 당뇨병 치료제인 메트포르민(metformin)은 ACAD10의 전사를 향상시킨다.

[0008] 자가포식은 화물이 리소좀으로 전달되는 메커니즘에 따라 마이크로오토파지(microautophagy), 샤페론-매개 오토파지(chaperone-mediated autophagy, CMA), 및 매크로오토파지(macroautophagy)로 나눌 수 있다. 이 중 잘못 접힌 단백질과 그 응집체의 표적 분해는 주로 매크로오토파지에 의해 매개된다. 매크로오토파지에서, 화물은 이중 막 자가포식소체(autophagosome)에 의해 분리되며 차례로 리소좀과 융합된다. 자가포식 기질은 p62, NBR1, OPTN, NDP52 및 NIX와 같은 특정 수용체에 의해 인식되고 수집되며, 그 중 p62가 주요 역할을 한다. p62는 단백질 화물에 조립된 유비퀴틴 사슬을 인식하는 UBA (유비퀴틴 관련) 도메인과 자가중합(self-polymerization)을 촉진하여 화물-p62 복합체를 형성하는 PB1 도메인을 포함한다. 화물이 적재된 p62 복합체는 자가포식 막에서 LC3 또는 GABARAP와의 p62 상호작용을 통해 자가포식 액포 (autophagic vacuoles)로 전달된다. 단백질 화물 외에도 매크로오토파지는 미토콘드리아, 퍼옥시좀 및 소포체 (ER)와 같은 다양한 세포소기관의 제거를 용이하게 한다. 기관포식(Organellophagy)은 일반적으로 자가포식 어댑터가 폴리유비퀴틴화된 막 수용체를 자가포식 막의 LC3에 연결할 때 시작된다. 대안적으로, 자가포식 막 상의 LC3은 막 관련 수용체의 LIR 도메인에 직접 동원될 수 있다.

[0009] 본 발명자들은 $R\text{-}C^{OX}$ 모티프가 퍽소파지에서 주요 결정 인자 역할을 함을 새롭게 확인하였다. 이 N-데그론 경로에서 ACAD10의 Nt-Cys2는 ROS 또는 ADO에 의해 산화되고 아르기닐화되어 $R\text{-}C^{OX}$ 모티프를 생성하며, 이는 차례로 ACAD10의 퍽소파지 부위로의 전위(translocation)를 촉진한다. $R\text{-}C^{OX}$ 모티프는 이어서 p62의 ZZ 도메인에 결합하여 ACAD10과 복합체에서 p62의 자가 올리머화(self-oligomerization)를 유도하여 리소좀 분해를 위한 자가포식 막을 모집한다. 탄닌산을 사용한 $R\text{-}C^{OX}$ 경로의 약제학적 억제는 PBD 세포에서 과산화소체 수준을 효율적으로 복원한다. 우리의 결과는 약 350개의 인간 단백질에서 운반되는 Met-Cys 모티프가 ROS의 센서로 작용하여 자가포식을 통해 단백질의 분해와 세포 내 구조를 조절할 수 있음을 시사한다.

[0010] 따라서, 본 발명자들은 탄닌산과 같은 RC^{OX} N-데그론 경로를 표적으로 하는 시약은 현재 사용가능한 약물 없이 수명이 1년 미만으로 제한되는 젤웨어 증후군(Zellweger Syndrome)과 같은 PBD (Peroxisome biogenesis disorder, 과산화소체 형성 장애, 퍼옥시좀 형성 장애) 관련 질병 환자를 치료하는데 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 출원은 탄닌산 또는 이의 염을 포함하는 퍼옥시좀 형성 장애(PBD) 또는 이의 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 다른 예로, 탄닌산 또는 이의 염을 포함하는 퍼옥시좀 형성 장애(PBD) 또는 이의 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, PBD 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료 방법을 제공한다.

[0013] 또 다른 예로, (a) ATE1 및 ACAD10을 발현하는 세포에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및

[0014] (b) 하기 1) 내지 3) 중 어느 하나를 결정하는 단계를 포함하는,

[0015] 1) ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부,

[0016] 2) ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부, 및

[0017] 3) ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부;

[0018] PBD 관련 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 예로, (a') 분리된 ATE1 및 분리된 ACAD10의 혼합물에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및

[0020] (b') ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는,

[0021] PBD 관련 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0022] 또 다른 예로, 환자로부터 분리된 시료로부터 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하는 제제를 포함하는, PBD 관련 질병의 진단용 조성물을 제공한다. 상기 ACAD10 단백질을 검출하는 제제는, 항 ACAD10 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

과제의 해결 수단

[0023] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

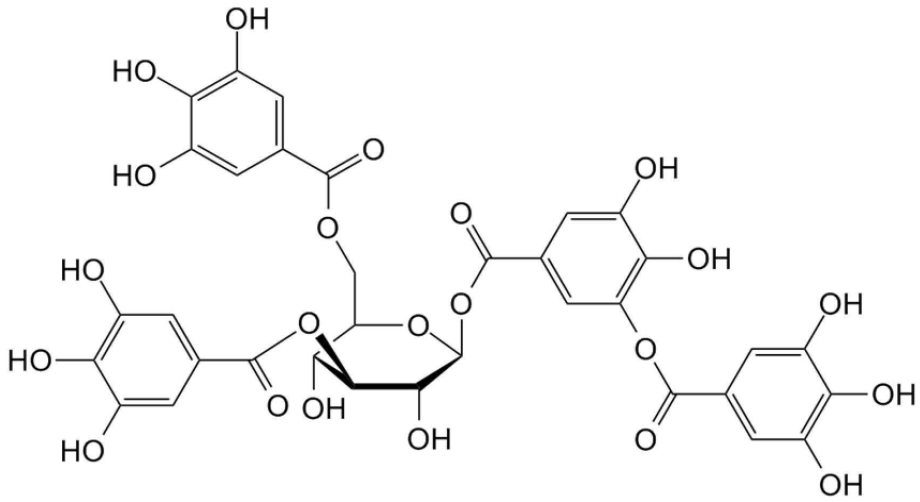
[0025] **탄닌산의 용도**

[0026] 하나의 양태로서, 본 출원은 탄닌산 또는 이의 염을 포함하는 PBD (Peroxisome biogenesis disorder, 과산화소체 형성 장애, 퍼옥시좀 형성 장애) 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 출원에서, 상기 탄닌산 또는 이의 염을 포함하는 약학적 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, PBD 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료 방법을 제공한다.

[0029] 하기 화학식 1로 표현되는 탄닌산(TA, tannic acid, CAS No. 1401-55-4)은 과일, 채소, 올리브, 카카오 등의 식물에서 발견되는 가장 풍부한 폴리페놀 중 하나로서, 근래 탄닌산은 다기능 코팅 분자로 이용되고 있다. 또한 DNA 및 트롬빈, 젤라틴, 콜라겐 및 뮤신과 같은 프롤린이 풍부한 단백질을 포함한 생체거대분자(biomacromolecules)과의 친화력이 뛰어난 분자로 알려져있다. 탄닌산은 페놀성 히드록시기가 풍부한 모이어티(5개의 갈롤 그룹(방향족 고리에 연결된 3개의 -OH기) 및 5개의 카테콜 그룹(방향족 고리에 공유결합으로 연결된 2개의 -OH기))가 표적 단백질과 다중 수소결합 및 소수성 상호작용을 통해 단백질과 결합한다.

[0030] [화학식 1]



[0031]

[0033] 상기 탄닌산 또는 이의 염은 시판되는 것을 구입하거나, 천연물에서 추출 및 분리하여 얻거나, 통상적인 유기합성 방법으로 제조할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0034] 본 출원에서 탄닌산의 염은, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서 생리학상 허용되는 염을 의미할 수 있고, 예컨대, 약학적으로 허용 가능한 염을 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 염은 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 일 예에서, 상기 금속염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고; 유기 염기와의 염은 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이

상일 수 있으며; 무기산과의 염은 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고; 유기산과의 염은 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염은 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고; 산성 아미노산과의 염은 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0036] 본 출원에서, PBD (Peroxisome biogenesis disorder, 과산화소체형성장애, 퍼옥시좀형성장애) 관련 질병은 과산화소체(퍼옥시좀, peroxisome) 형성 장애를 일으키는 유전자의 돌연변이를 원인으로 발생하는 질환으로서, 신생아 초기에 심한 근위약, 높은 이마, 넓은 대천문, 얼굴 중부의 발육부전, 녹내장, 각막혼탁, 백내장, 관절구축, 간비대, 점상연골발육부전 등을 나타내는 치명적인 질환이다. 과산화소체는 모든 진핵세포에서 발견되며, 주로 지방대사의 여러 과정에 관여하는 중요한 세포내 기관이다. PBD 관련 질병은 과산화소체의 형성과 기능에 있어 중요한 퍼옥신(peroxin)이라는 단백질을 암호화하고 있는 12개의 유전자, 예컨대 PEX1, PEX6, PEX10, PEX12 또는 PEX26의 돌연변이로 인해 생기는 상염색체 열성 질환이다. PEX1, PEX6, 또는 PEX26의 돌연변이는 증상에 과도한 퍽소파지를 포함하는 PBD 환자의 약 65~85%를 차지한다. 예를 들어, PEX1 G843D 돌연변이와 PEX6의 상호작용은 야생형 PEX1에 비해 70% 미만으로 감소하여 과도한 퍽소파지 및 퍼옥시좀 손실을 초래한다.

[0037] PBD 관련 질병의 증상으로, 뇌의 수초화(myelination)가 불완전하여 부위적 이상(heteropia)을 보이고, 성상세포 안에 중성지방이 나타난다. 부신피질자극호몬에 대한 부신의 반응이 감소되어 있고, 저장철, 담즙산 전구물질들, 피페콜산(pipecolic acid), 피탄산(phytanic acid), 그리고 초장쇄지방산(very long chain fatty acid, VLCFA)이 증가되어 있으며, 플라스말로겐(plasmalogen)은 감소되어 있다.

[0038] 구체적인 일 예로, 상기 PBD 관련 질병은 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome), 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease), 신생아형 부신백색질장애(neonatal adrenoleukodystrophy, 신생아형 부신백질이영양증이라고도 함), 및 점상 연골형성이상(rhizomelic chondrodysplasia punctata) (RCDP) 로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다. 이들 중 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome)은 가장 심한 증상을 보이는 군을 말하며, 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease, IRD)이 가장 경한 군이고 신생아형 부신백색질장애(neonatal adrenoleukodystophy, NALD)는 중간 정도에 해당된다.

[0039] 일 예에서, 상기 PBD 관련 질병은 PEX1-G843D 돌연변이로 인한 것일 수 있다.

[0041] 본 출원에서, '치료'는 PBD 관련 질병의 증상의 경감, 개선, 완화, 증상의 범위의 감소, 증상 진행의 지연 등을 포괄하거나 이들 중 선택된 어느 하나 이상의 의미로 사용된다. '예방'은 PBD 관련 질병의 증상을 갖지 않는 대상에게 작용하여 상기 증상이 발현하지 않도록 하거나, 그 발현 시기를 늦추는 모든 기작 및/또는 효과를 포함하는 의미로 사용된다. "개선"이란, 일 예에 따른 조성물의 투여로 PBD 관련 질병의 증상이 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 것을 의미할 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 제공되는 탄닌산 또는 이의 염을 포함하는 조성물의 적용 대상은 인간, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 염소, 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하는 포유동물, 예컨대, 인간일 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 제공되는 약학적 조성물 또는 이와 관련된 방법에 있어서, 상기 조성물의 투여 또는 적용 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구 투여, 또는 피부 도포, 경피 투여, 정맥 내 투여 (intravenous administration, 예를 들어 정맥 내 주사(intravenous injection) 또는 정맥 내 점적 주사 (intravenous influsion)), 복강 내 투여 (intraperitoneal administration), 피하 투여 (subcutaneous administration), 피내 투여 (intradermal administration), 근육 내 투여 (intramuscular administration), 경비 투여(intranasal administration) 등과 같은 비경구 투여일 수 있다. 상기 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 현탁액, 에멀젼, 에어로졸, 연고, 패치, 젤 등의 경피제 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 제공되는 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 및/또는 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것일 수 있다. 상기 담체, 부형제, 또는 희석제의 예로서 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐

피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 시럽제, 분말제, 현탁제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 경피제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 사용될 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 제공되는 약학적 조성물은 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서, "약학적 유효량" 또는 "유효량"이란 소망하는 효과 (PBD 관련 질병의 예방, 개선, 또는 치료)에 기여하거나, 상기 효과에 유리한 작용을 나타내거나, 상기 효과를 달성하기 위한 투여량을 의미할 수 있다. 상기 약학적 유효량은 제제화 방법, 적용 대상의 연령, 체중, 성, 증상 정도, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배출 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 유효량은 대상의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태, 증상 정도 등에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0046] 예컨대, 상기 조성물의 1회 또는 1일 투여량은 탄닌산 또는 이의 염의 중량 기준으로, 0.001 내지 10mg/kg, 0.001 내지 8mg/kg, 0.001 내지 6mg/kg, 0.001 내지 5mg/kg, 0.001 내지 4mg/kg, 0.001 내지 3mg/kg, 0.001 내지 2mg/kg, 0.001 내지 1mg/kg, 0.001 내지 0.5mg/kg, 0.001 내지 0.1mg/kg, 0.01 내지 10mg/kg, 0.01 내지 8mg/kg, 0.01 내지 6mg/kg, 0.01 내지 5mg/kg, 0.01 내지 4mg/kg, 0.01 내지 3mg/kg, 0.01 내지 2mg/kg, 0.01 내지 1mg/kg, 0.01 내지 0.5mg/kg, 0.01 내지 0.1mg/kg, 0.1 내지 10mg/kg, 0.1 내지 8mg/kg, 0.1 내지 6mg/kg, 0.1 내지 5mg/kg, 0.1 내지 4mg/kg, 0.1 내지 3mg/kg, 0.1 내지 2mg/kg, 0.1 내지 1mg/kg, 0.1 내지 0.5mg/kg, 0.5 내지 10mg/kg, 0.5 내지 8mg/kg, 0.5 내지 6mg/kg, 0.5 내지 5mg/kg, 0.5 내지 4mg/kg, 0.5 내지 3mg/kg, 0.5 내지 2mg/kg, 0.5 내지 1mg/kg, 1 내지 10mg/kg, 1 내지 8mg/kg, 1 내지 6mg/kg, 1 내지 5mg/kg, 1 내지 4mg/kg, 1 내지 3mg/kg, 1 내지 2mg/kg, 1.5 내지 10mg/kg, 1.5 내지 8mg/kg, 1.5 내지 6mg/kg, 1.5 내지 5mg/kg, 1.5 내지 4mg/kg, 1.5 내지 3mg/kg, 1.5 내지 2mg/kg, 또는 2mg/kg범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 1회 또는 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.

[0049] **스크리닝 방법**

[0050] 본 출원은 ATE1 또는 ACAD10의 수준을 저하시키는 약제 또는 ATE1 및 ACAD10과의 상호작용을 저해시키는 약제를 PBD 관련 질병의 치료제로 결정함으로써, PBD 관련 질병을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0051] 본 출원에서는 N-말단이 산화 및 아르기닐화된 ACAD10 단백질이 퍼옥시좀(과산화소체, peroxisome)의 선택적 자가포식(오토파지, autophagy)인 펙소파지(pexophagy, the selective degradation of peroxisomes by autophagy) 과정에서의 역할을 규명하는 과정에서, ACAD10 단백질 또는 ATE1의 수준을 저하시키는 약제 또는 ACAD10 및 ATE1과의 상호작용을 저해시키는 약제가 펙소파지를 억제하여 PBD 관련 질병의 치료제로 개발될 수 있음을 최초로 규명하였다.

[0052] 상기 Nt-RC^{OX}에서 Nt는 N 말단을 나타내고, R은 아르기닌(Arg)을 나타내며, C^{OX}는 산화된 형태의 시스테인(Cys)를 나타낸다.

[0053] N-데그론(degron) 경로는 단일 N-말단 잔기가 단백질 분해를 위한 신호로서 기능하는 단백질 분해 시스템이다. 본 발명자들은 단백질의 N-말단의 2번째 시스테인(Cys), Nt-Cys2가 ROS(reactive oxygen species) 또는 이산소

화효소(dioxygenase, 또는 2-aminoethanethiol dioxygenase; ADO 유전자에 의해 발현됨)에 의한 화학적 또는 효소적 산화; 및 ATE1(Arginyl-tRNA-protein transferase 1)에 의한 효소적 아르기닐화를 통해 형성된 Nt-RC^{OX} 잔기가 산화 스트레스의 센서로 작용함을 규명하였다.

[0054] 본 발명자들은 산화 및 아르기닐화를 통해 형성된 Nt-RC^{OX} 잔기가 산화 스트레스 하에서 자가포식 단백질 분해를 유도하는 것을 확인하였으며 (실시예 1), 구체적으로 퍼옥시좀의 선택적 자가포식인 펙소파지에 대한 데그론임을 확인하였다 (실시예 2). 펙소파지를 매개하는 Nt-RC^{OX}을 포함하는 단백질을 확인하기 위하여 Met-Cys 프로테옴을 스크리닝한 결과, 인간 단백질의 약 1%가 N-말단에서 Cys2를 노출할 수 있고, 스플라이싱 변형 형태를 포함하여 약 350개의 단백질을 후보 단백질로 압축하였으며, 최종적으로 ACAD10 단백질의 Nt-RC^{OX}가 펙소파지를 매개하는 N-데그론임을 확인하였다 (실시예 4 및 실시예 5).

[0055] ACAD10 단백질은 아실-CoA 탈수소화효소 패밀리(Acyl-CoA dehydrogenase family)에 속하는 단백질로, ACAD10 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다. 전장(full-length) ACAD10 단백질은 정상 조건에서 주로 세포기질(cytosol)에 존재하지만, 세포에 산화 스트레스가 가해지면 대부분의 전장 ACAD10 단백질이 퍼옥시좀 막으로 재배치된다 (실시예 6). 퍼옥시좀 막으로 재배치된 ACAD10 단백질의 N-말단 RC^{OX} 데그론은 p62의 ZZ 도메인에 결합하여 p62의 자가-올리머화(self-oligomerization)를 유도하는데, 이는 리소좀 분해를 위해 자가포식 막에서 GABARAP 또는 LC3을 동원하는 펙소파지 부위를 표시한다 (실시예 7).

[0056] 이상의 결과를 종합하였을 때, 산화 스트레스 하에서 ATE1 효소 및 ACAD10 단백질의 N-말단 Nt-RC^{OX} 잔기가 PBD 관련 질병의 치료를 위한 타겟이며, 나아가 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부; 또는 ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부를 판단하여 PBD 관련 질병의 치료제를 효과적으로 선별할 수 있음을 알 수 있다.

[0057] 따라서, 본 출원은 (a) ATE1 및 ACAD10을 발현하는 세포에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및 (b) 하기 1) 내지 3) 중 어느 하나를 결정하는 단계를 포함하는,

[0058] 1) ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부,

[0059] 2) ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부, 및

[0060] 3) ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부;

[0061] PBD 관련 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0062] 또는, 본 출원은,

[0063] (a') 분리된 ATE1 및 분리된 ACAD10의 혼합물에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및

[0064] (b') ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되었는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는,

[0065] PBD 관련 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0066] 상기 스크리닝하는 방법에 있어서, 상기 ACAD10은 N-말단 잔기가 N-RC^{OX}인 것일 수 있다. 상기 R은 아르기닌(Arg)이고, 상기 C^{OX}는 산화된 형태의 시스테인(Cys)이다.

[0067] 상기 스크리닝하는 방법에 있어서, 상기 ATE1의 수준, ACAD10의 수준, 및 ATE1 및 ACAD10의 상호작용은 면역블롯팅, 면역침전법, 또는 면역염색법에 의해 검출하는 것일 수 있다.

[0068] 상기 스크리닝하는 방법에 있어서, 상기 ATE1 및 ACAD10은 각각 리포터 단백질에 연결된 것일 수 있다.

[0069] 상기 리포터 단백질은 클로람페니콜아세틸트랜스퍼라제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 베타-갈락토시다제 또는 형광 단백질인 것일 수 있다.

[0070] 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein), 청색 형광 단백질 (blue fluorescent protein), 황색 형광 단백질 (yellow fluorescent protein), 남색 형광 단백질 (cyan fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질 (enhanced green fluorescent protein), 증강된 적색 형광 단백질, 증강된 청색 형광 단백질, 증강된 황색 형광 단백질 또는 증강된 남색 형

광 단백질일 수 있다.

[0071] 본 출원에서, '후보 화합물'은 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준을 저하시키거나, ATE1 및 ACAD10의 상호작용을 저해시킬 것으로 예상되는 후보 물질을 의미한다. 이러한 후보 물질에는 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물뿐만 아니라, 단백질, 탄수화물, 핵산분자 (RNA, DNA 등) 및 지질과 같은 고분자 화합물 및 복수의 화합물의 복합체 등이 포함될 수 있다.

[0072] 본 출원에서, "처리" 란 후보 화합물이 ATE1 및 ACAD10 중 어느 하나 이상에 직접적으로 접촉하는 것뿐 아니라, 물질이 세포막에 영향을 미치고 그 세포막으로부터 발생한 신호가 ATE1 및 ACAD10 중 어느 하나 이상에 접촉하거나 영향을 미치는 경우도 포함한다. 따라서 본 발명에 있어서, 상기 후보 화합물에는 세포막 투과성인 물질뿐만 아니라, 세포막에 불투과성인 물질도 포함된다. 이 때, 후보 화합물은 유효량의 범위 내에서 처리할 수 있다. "유효량" 이란 반응을 유도하기에 충분한 양을 의미하는 것으로, 유효량 범위 이하에서는, 정확한 결과를 얻을 수 없으므로, 유효량 범위 내에서 억제능을 측정하는 것이 바람직하다.

[0073] 본 출원에서 "분리된 (isolated)"이란 세포에서 발현되어 분리된 단백질을 의미하고, 당업계에서 공지된 일반적인 분리 기술을 적용하여 분리 가능하다. 세포에서 발현된 단백질을 분리 정제하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 분리된 ATE1 및 분리된 ACAD10은 세포 내가 아니라 시험관 내에서 후보 화합물과 직접적으로 작용하여 반응할 수 있다.

[0074] ATE1 및 ACAD10을 발현하는 세포는, 본래 ATE1 및 ACAD10을 포함하는 세포이거나, 의도적으로 ATE1 및 ACAD10을 발현하는 벡터를 세포에 트랜스펙션하여 제조한 것일 수 있다. 또한, ATE1 및 ACAD10을 발현하는 벡터의 경우 하나의 벡터에 ATE1 및 ACAD10에 대한 서로 다른 프로모터를 포함하고 있어 하나의 벡터로부터 각각 발현될 수도 있고, ATE1을 발현하는 벡터 및 ACAD10을 발현하는 벡터를 공동 트랜스펙션하여 제조할 수도 있다.

[0075] 상기 세포는 인간 또는 소, 염소, 돼지, 생쥐, 토끼, 햄스터, 시궁쥐, 기니피그 등의 동물 기원의 모든 세포를 포함하며, 일차세포, 이차세포, 불멸화된 세포 등을 이용할 수 있다. 또한, ATE1 및/또는 ACAD10 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 세포 내에서 ATE1 및/또는 ACAD10이 세포 내에서 안정적으로 또는 일시적으로 과발현되도록 조작된 세포를 사용할 수 있다.

[0076] 나아가, ATE1 및 ACAD10의 상호작용을 저해시키는 물질의 검출은, 세포 수준뿐만 아니라 생쥐, 토끼, 햄스터, 시궁쥐, 기니피그 등의 실험 동물을 이용하여 생체 내에서 수행할 수 있다.

[0078] 본 출원의 상기 (b) 단계에서, ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 저하되었는지 여부는, i) 생물 시료를 준비하는 단계, ii) 상기 생물 시료에 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상과 상호작용하는 물질을 처리(첨가)하여 반응시키는 단계; 및 iii) 상기 얻어진 반응물을 분석하여 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 단계 i)의 생물 시료를 준비하는 단계는 환자로부터 생물 시료를 얻는 (분리하는) 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 단계 ii)에서 상기 상호작용하는 물질은 ATE1 또는 ACAD10에 특이적으로 결합하는 화합물 (small molecule), 항체, 앱타머; 또는 ATE1 또는 ACAD10을 암호화하는 유전자의 일부 또는 전부에 결합하는 폴리뉴클레오타이드 (예컨대, 프라이머, 프로브, 앱타머 등), 화합물 등일 수 있으며, 이들은 형광 물질, 발색 물질 등의 표지 물질로 표지되거나 표지되지 않은 것일 수 있다.

[0079] 상기 단계 iii)에서, 상기 반응물은 단계 ii)에서 얻어진 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 및 이와 상호작용하는 물질이 상호작용(결합)하여 생성된 복합체(complex)일 수 있으며, 상기 정량하는 단계는 상기 생성된 복합체를 정량하거나, 상기 복합체에 표지된 표지 물질을 측정하거나, 상기 복합체를 시료로부터 분리한 후, 이로부터 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 다시 분리하여 분리된 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 정량하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 ATE1 또는 ACAD10의 정량은 ELISA 등의 통상적인 단백질 정량 방법에 의하여 수행될 수 있으며, ATE1 또는 ACAD10을 암호화하는 유전자의 정량은 qPCR 또는 mRNA 마이크로 어레이 등

의 통상적인 유전자 (DNA 또는 RNA) 정량 방법에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 상기 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 수준은 단백질 또는 유전자와 상호작용하는 물질을 이용하는 통상적인 모든 단백질 분석 방법에 의하여 측정될 수 있다. 상기 ATE1 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상; 또는 ACAD10 및 이를 암호화하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상와 상호작용하는 물질은 ATE1 또는 ACAD10 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 항체, 압타머, 및 ATE1 또는 ACAD10을 암호화하는 유전자의 전부 또는 일부에 결합하는 폴리뉴클레오타이드 (예컨대, 프라이머, 프로브, 앱타머 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 예컨대, 상기 ATE1 또는 ACAD10 단백질의 수준은 상기 ATE1 또는 ACAD10 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 항체, 압타머 등을 이용하는 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통하여 하여 측정될 수 있으며, 구체적으로, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 면역조직화학염색, 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Floresence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 ATE1 또는 ACAD10을 암호화하는 유전자 (DNA, cDNA 또는 mRNA)의 수준은 통상의 유전자 분석 방법을 이용하여 측정할 수 있으며, 예컨대 상기 유전자와 혼성화 가능한 프라이머, 프로브, 또는 앱타머를 사용하는 통상적인 유전자 분석 방법, 예컨대, 폴리머레이즈 연쇄 반응법 (PCR), FISH(fluorescent in situ hybridization), 마이크로어레이법, 등을 이용하여 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에서, 상기 프라이머는 ATE1 또는 ACAD10을 암호화하는 유전자 (전장 DNA, cDNA, 또는 mRNA)의 염기서열 중 연속하는 5 내지 1000bp 예컨대 10 내지 500bp, 20 내지 200bp, 또는 50 내지 200bp의 유전자 단편을 검출할 수 있는 것으로, 상기 유전자 단편의 3'-말단 및 5'-말단 각각의 연속하는 5 내지 100bp, 예컨대, 5 내지 50bp, 5 내지 30bp, 또는 10 내지 25bp 부위와 혼성화 가능한 (예컨대, 상보적인) 염기서열을 포함하는 프라이머쌍일 수 있다. 상기 프로브 또는 앱타머는 ATE1 또는 ACAD10을 암호화하는 유전자 (전장 DNA, cDNA, 또는 mRNA)의 염기서열 중 연속하는 5 내지 100 bp, 5 내지 50bp, 5 내지 30bp, 또는 5 내지 25bp의 유전자 단편과 혼성화 가능한 (예컨대, 상보적) 염기서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 '혼성화 가능'하다 함은 상기 유전자 부위의 염기서열과 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 상보성을 가짐으로써 상보적 결합이 가능함을 의미할 수 있다.

[0082] 본 출원의 상기 (b) 단계 또는 (b') 단계에서, ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되는지 여부는, 단백질-단백질 간 또는 단백질-화합물간의 반응 여부를 확인하기 위하여 당업계에서 통상 사용되는 기술들을 적용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 면역학적 분석법, 형광 분석법, 효모 이중 혼성법 (yeast two-hybrid), ATE1 또는 ACAD10에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리 등을 이용한 HTS (high throughput screening), 드럭 히트 HTS 또는 세포 기반 스크리닝 (cell-based screening) 등을 이용하는 스크리닝 방법 등을 사용할 수 있으나, 이러한 방법에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 바람직한 하나의 구현예로, ATE1 또는 ACAD10에 특이적인 항체를 이용하여 ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되는지 여부를 검출할 수 있다. 예를 들어, 생성된 항원-항체 복합체 형성량을 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에서의 항원-항체 복합체 형성량과 비교하여 저해 여부를 결정할 수 있다. 항원-항체 복합체 형성량의 절대적 또는 상대적 차이는 분자생물학적 또는 조직학적 분석으로 확인 가능하며, 이러한 분석법에는 면역블로팅, 면역탁본법, 면역침전법 및 면역염색법 등이 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0084] 상기 항원-항체 반응을 이용한 검출 방법에서 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨 (detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 본 출원에서 용어, "검출 라벨"은 분광분석적 (spectroscopic), 광화학적 (photochemical), 생화학적 (biochemical), 면역화학적 (immunochemical), 화학적 (chemical), 다른 물리화학적 (physical) 수단에 의해 검출될 수 있는 조성물을 말한다. 이러한 검출 표지체에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 (microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0085] 바람직한 또 하나의 구현예로, ATE1 또는 ACAD10에 각각 리포터 단백질과 연결한 후 상기 리포터 단백질의 신호 크기에 의하여 ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되는지 여부를 검출할 수 있다.

[0086] 상기 리포터 단백질은 루시퍼라제, 클로람페니콜아세틸트랜스퍼라제, 베타-글루쿠로니다제, 베타-갈락토시다제, 알칼라인 포스파타아제, 또는 형광 단백질일 수 있으며, 이 때 형광 단백질은 녹색 형광 단백질 (green

fluorescent protein), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein), 청색 형광 단백질 (blue fluorescent protein), 황색 형광 단백질 (yellow fluorescent protein), 남색 형광 단백질 (cyan fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질 (enhanced green fluorescent protein), 증강된 적색 형광 단백질, 증강된 청색 형광 단백질, 증강된 황색 형광 단백질 또는 증강된 남색 형광 단백질일 수 있다.

[0087] 상기 리포터 단백질을 ATE1 및 ACAD10과 각각 연결된 형태로 발현시키기 위하여, ATE1를 코딩하는 유전자 및 리포터 유전자가 작동가능하게 연결된 발현 벡터, 그리고 ACAD10을 코딩하는 유전자 및 리포터 유전자가 작동가능하게 연결된 발현 벡터를 세포에 공동 트랜스펙션할 수 있다.

[0088] 리포터 단백질이 형광 단백질일 경우 형광 현미경을 이용하여 리포터 단백질의 형광 크기를 측정함으로써 ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되는지 여부를 확인할 수 있으며, 리포터 단백질로 루시퍼라제와 같은 발광 효소를 사용하는 경우 공지된 루시퍼라제 활성 측정법 내지는 루시퍼라제 발광에 따라 ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되는지 여부를 확인할 수 있다. 또한, 리포터 단백질로 클로람페니콜아세틸트랜스퍼라제, 베타-글루쿠로니다제, 베타-갈락토시다제, 알칼라인 포스파타아제 등과 같이 기질을 검출 가능한 광을 발광하는 발색 산물로 전환시킬 수 있는 효소를 사용하는 경우 발색 기질을 이용한 효소 반응에 의하여 얻어지는 광 신호에 의해 ATE1 및 ACAD10의 상호작용이 저해되는지 여부를 확인할 수 있다.

[0090] **<u>진단용 조성물</u>**

[0091] 본 출원은 환자로부터 분리된 시료로부터 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하는 제제를 포함하는, PBD 관련 질병의 진단용 조성물을 제공한다. 상기 R은 아르기닌(Arg)이고, 상기 C^{OX}는 산화된 형태의 시스테인(Cys)이다.

[0092] 상기 진단용 조성물에서, 상기 ACAD10 단백질을 검출하는 제제는, 항 ACAD10 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것일 수 있다.

[0093] 본 출원에서, '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 병리 상태는 PBD 관련 질병을 의미하며, 상기 PBD 관련 질병은 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome), 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease), 신생아형 부신백색질장애(neonatal adrenoleukodystrophy), 및 점상 연골형성이상(rhizomelic chondrodysplasia punctata) (RCDP)로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0094] 상기 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하는 제제는 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정할 수 있는 제제라면 제한 없이 선택하여 이용할 수 있으며, 예를 들어, 상기 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 펩타이드, 압타머 또는 뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 단백질의 발현 여부를 측정하는 제제는 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 의미하고, 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 이들의 조합을 모두 포함한다. 일 예에서, 상기 ACAD10 단백질을 검출하는 제제는 항 ACAD10 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0095] 본 발명의 또 다른 일 예는 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 PBD 관련 질병 진단용 키트에 관한 것이다.

[0096] 상기 진단용 키트는 상기 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머, 항체 등의 검출 제제를 포함할 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0097] 본 출원에서 N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질의 발현 정도를 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리 비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색 효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광 물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(4-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0098] 본 발명은 펙소파지를 억제하는 새로운 경로의 발견 및 이러한 발견에 의한 퍼옥시좀 형성장애에의 적용에 관한 것으로, ATE1, ACAD10 및 이들의 상호작용의 억제를 확인하는 것을 통해 PBD 또는 이의 관련 질환에 유효한 약물을 효과적으로 스크리닝할 수 있고, N-말단 RC^{OX} 잔기를 포함하는 ACAD10 단백질을 검출하여 PBD 또는 이의 관련 질환을 효과적으로 진단할 수 있으며, 본 발명에 따른 탄닌산 및 이의 염을 포함하는 약학적 조성물은 PBD 관련 질병을 효과적으로 예방, 개선, 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0099] 도 1은 Nt-Cys가 산화(oxidation) 및 아르기닐화(arginylation)에 의존하는 자가포식(autophagy) 데그론(degron)을 생성하는 것을 나타낸다.

(A) 토끼에서 RC^{OX} 모티프에 대한 항체 생성의 개략도를 나타낸다.

(B) 100ng의 항원 펩타이드를 사용한 RC^{OX} 항체의 도트 블롯 분석을 나타낸다 (빨간색: 강한 신호, 파란색: 약한 신호).

(C) HeLa 세포를 지정된 시간동안 니트로프루시드 나트륨(sodium nitroprusside)(SNP, 200μM)으로 처리하고 항-RC^{OX} 항체를 사용하여 면역염색하여 분석한 사진을 나타낸다.

(D 및 E) HeLa 세포를 바필로마이신(bafilomycin) A1으로 16시간동안 및/또는 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine, NAC) (D) 또는 탄닌산(40μM) (E)으로 24시간동안 처리하고 항-RC^{OX} 항체를 사용하여 면역염색 면역염색하여 분석한 사진을 나타낸다.

(F) HeLa 세포를 지정된 시간동안 바필로마이신 A1(400nM)으로 처리하고 항- RC^{OX} 항체를 사용하여 면역염색하여 분석한 사진을 나타낸다.

도 2a 및 도 2b는 RC^{OX} 펑타(puncta)가 퍼옥시좀 및 자가포식소체에 공동지역화(colocalizes)하는 것을 나타낸다.

(도 2a의 A, B 및 도 2b의 C) HeLa 세포를 바필로마이신 A1으로 6시간동안 처리하고 항- RC^{OX} 항체 및 PMP70 (A), p62 (B), 또는 GABARAP (C)를 사용하여 면역염색을 수행한 사진을 나타낸다.

도 3은 아르기닐화가 펙소파지(pexophagy)를 통해 퍼옥시좀(peroxisome)을 조절하는 것을 나타낸다.

(A 및 C) 세포를 탄닌산으로 처리하고 면역블롯팅(A) 또는 면역염색(C)으로 분석한 것을 나타낸다.

(B 및 D) HeLa 세포를 48시간동안 ATE1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고, 이를 면역블롯팅(B) 또는 면역염색(D)으로 분석한 것을 나타낸다.

(E) HeLa 세포를 4종의 마우스 ATE1 이소형(isoform), $ATE1^{1A7A}$, ATE^{1A7B}, ATE^{1B7A}, 또는 ATE^{1B7B}를 과발현한 후 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(F) HeLa 세포를 ATE1 K417A 돌연변이로 형질감염시키고, 이를 면역 블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(G) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 ATE^{1A7A}로 형질감염시키고, 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

도 4a 내지 도 4i는 ACAD10의 Nt-Cys2가 RC^{OX} 펑타(puncta) 형성을 담당하는 것을 나타낸다.

(도 4a의 A) 스크리닝 프로세스의 대략도를 나타낸다. Nt-Cys2 단백질을 표적으로 하는 93종의 siRNA를 형질감염시키고 RC^{OX} 항체를 사용하여 세포를 면역염색하였다. $R\text{-}C^{OX}$ 펑타(puncta)는 공초점현미경을 사용하여 분석하였다.

(도 4b의 B) 4개의 선택된 단백질, JUNB, GPR22, MOXD1, 및 ACAD10 및 음성 대조군(NC) 단백질, SULT6B1의 서

열을 나타낸다.

(도 4c의 C) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 JUNB, GPR22, MOXD1, ACAD10, 또는 SUL6B1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고, RC^{OX} 항체를 사용하여 면역염색하여 분석한 사진을 나타낸다.

(도 4d의 D) (C)에서 RC^{OX} 펑타(puncta) 양성 세포의 정량하여 나타낸 그래프이다.

(도 4e의 E) SNP를 시간의존적 방식으로 처리하고 표시된 항체를 사용하여 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4e의 F) HeLa 세포를 MG132(2μM) 및/또는 바필로마이신 A1으로 처리하고 표시된 항체를 사용하여 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4f의 G) 탄닌산을 용량의존적 방식으로 처리하고 표시된 항체를 사용하여 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4f의 H) HeLa 세포에 ADO 또는 CDO를 표적으로 하는 siRNA를 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4g의 I) HeLa 세포를 탄닌산 존재 하에 1시간동안 SNP로 처리하고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4g의 J) HeLa 세포에 ATE1을 표적으로 하는 siRNA를 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4h의 K) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 SNP로 처리하고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4h의 L) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 4종의 마우스 ATE1 이소형(isoform), $ATE1^{1A7A}$, ATE^{1A7B}, ATE^{1B7A}, 또는 ATE^{1B7B}를 과발현한 후 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4i의 M) HeLa 세포를 지정된 시간 동안 사이클로헥시미드(cycloheximide, CHX)의 존재 하에 야생형 ACAD10(WT) 또는 C2V 돌연변이 ACAD10(C2V)으로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 4j의 N 및 O) HeLa 세포를 탄닌산(N) 또는 바필로마이신 A1(O)의 존재 하에 야생형 ACAD10 또는 C2V 돌연변이 ACAD10으로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

도 5a 내지 도 5c는 ACAD10이 Cys2 잔기의 아르기닐화를 통해 퍽소파지를 유도하는 것을 나타낸다.

(도 5a의 A) ACAD10은 용량의존적 방식으로 과발현되었고, 이를 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 5a의 B 및 도 5b의 C) ACAD10을 탄닌산(B) 또는 바필로마이신 A1(C)의 존재 하에 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 5b의 D) HeLa 세포에 ACAD10을 표적으로 하는 2종류의 siRNA를 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 5c의 E 및 F) HeLa 세포를 탄닌산(E) 또는 바필로마이신(F)의 존재 하에 pCMV14 빈 벡터(empty vector), 야생형 ACAD10 또는 C2V 돌연변이 ACAD10으로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

도 6a 내지 도 6f는 ACAD10의 Nt-Cys2에서 산화 및 아르기닐화가 올리고머화(oligomerization)를 통해 p62의 과산화소체 표적화(peroxisomal targeting) 및 활성화를 유도하는 것을 나타낸다.

(도 6a의 A) SNP를 HeLa 세포(위) 또는 ACAA1 플라스미드 형질감염된 세포(아래)로 처리하고 면역염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

(도 6b의 B) HeLa 세포를 SNP 존재 하에 야생형 ACAD10 또는 C2V 돌연변이 ACAD10으로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

(도 6c의 C) HeLa 세포에 p62를 표적으로 하는 siRNA를 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 6c의 D) HeLa 세포를 SNP 및 바필로마이신 A1의 존재 하에 야생형 ACAD10 또는 C2V 돌연변이 ACAD10으로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

(도 6d의 E) HeLa 세포를 H_2O_2 및 바필로마이신 A1로 처리하고 항-ACAD10 또는 항-p62 항체를 사용하여 면역침강을 수행한 것을 나타낸다.

(도 6d의 F) HeLa 세포를 H_2O_2 및 바필로마이신 A1의 존재 하에 야생형 ACAD10 또는 C2V 돌연변이 ACAD10으로

형질감염시키고 항- Flag 또는 항-p62 항체를 사용하여 면역침강을 수행한 것을 나타낸다.

(도 6e의 G) HEK293 세포 용해물을 X-ACAD10 펩티드(X는 RC^{03}, C^{03}, C 또는 V)로 풀다운 어세이(pulldown assay)로 분석한 후 면역블롯팅을 수행한 것을 나타낸다.

(도 6e의 H 및 I) 야생형, 연속적으로 결실된 p62 돌연변이(D1, D2, D3, 또는 D4)를 발현하는 HeLa 세포 (H) 또는 ZZ 도메인 결실 돌연변이(ZZ△) (I)를 RC^{03}-ACAD10 펩티드로 풀다운 어세이로 분석한 것이다.

(도 6f의 J) p62로 형질감염된 HEK293 세포 용해물을 X-ACAD10 펩티드(X는 RC^{03}, C^{03}, C 또는 V)와 함께 인큐베이션한 다음 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

도 7a 내지 도 7d는 억제 Nt-Cys-매개 N-데그론 경로가 동물 모델 및 인간 PBDs 세포에서 과산화소체 손실(peroxisomal loss)을 완화하는 것을 나타낸다.

(도 7a의 A) 야행형 또는 ATE1 녹아웃(knockout) ($ATE1^{-/-}$) 마우스에서 12.5일 배아의 면역조직화학염색 사진을 나타낸다.

(도 7a의 B) 야생형 또는 p62 녹아웃 ($p62^{-/-}$) 마우스의 간의 면역조직화학염색 사진을 나타낸다.

(도 7b의 C) PEX1-G843D GFP-PTS1 PBD 섬유아세포를 탄닌산 또는 바필로마이신 A1으로 24시간동안 처리하고 공초점현미경으로 관찰한 사진이다 (왼쪽). 야생형 인간섬유아세포(WT) 또는 PBD 세포를 탄닌산 또는 바필로마이신 A1으로 처리하고 면역블롯팅으로 분석한 것이다 (오른쪽).

(도 7b의 D) 세포에 ATE1을 표적으로 하는 siRNA를 형질감염시키고 면역염색 (왼쪽) 또는 면역블롯팅 (오른쪽)으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 7b의 E) 세포를 ACAD10을 표적으로 하는 2종류의 siRNA를 형질감염시키고 면역염색 (왼쪽) 또는 면역블롯팅 (오른쪽)으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 7c의 F) PBD 세포를 탄닌산의 존재 하에 pCMV14 빈 벡터 (empty vector), 야생형 ACAD10 또는 C2V ACAD10으로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

(도 7c의 G) PBD 세포를 탄닌산의 존재 하에 pCMV14, Cys-nsP4-PTS1 또는 Val-nsP4-PTS1으로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

(도 7d의 H) C57BL/6 마우스에 i.v. 2mg/kg의 탄닌산으로 1개월동안 주당 3회 투여하였다. 간을 수확하여 면역조직화학염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

도 8a 내지 8d는 RCOX 펑타(puncta) 형성이 자가포식(autophagy) 억제제 또는 산화 스트레스에 의해 촉진되는 것을 나타낸다.

(도 8a의 A) HeLa 세포를 MG132(10μM) 또는 바필로마이신 A1(400nM)으로 6시간동안 처리하고 면역염색으로 분석한 사진을 나타낸다.

(도 8b의 B, 도 8c의 C 및 도 8d의 D) HeLa 세포를 L-아르기닌(160μg/ml) (B), H2O2(200μM) (C), 또는 클로피브레이트(clofibrate)(100μM) (D)로 지정된 시간동안 처리하고 면역염색을 수행한 것을 나타낸다.

도 9는 RC^{OX} 펑타(puncta) 형성이 항산화 처리에 의해 억제되는 것을 나타낸다.

(A) HeLa 세포를 SNP로 6시간 및/또는 NAC(1mM)로 24시간동안 처리하고 면역염색을 수행한 것을 나타낸다.

도 10a 내지 도 10c는 ATE1이 RC^{OX} 펑타(puncta) 형성을 중재하는 것을 나타낸다.

(도 10a의 A) HeLa 세포를 SNP 및/또는 탄닌산으로 처리하고 면역염색을 수행한 것을 나타낸다.

(도 10b의 B 및 도 10c의 C) HeLa 세포를 바필로마이신 A1(B) 또는 SNP(C)의 존재 하에 ATE1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시켰다. 면역염색 또는 면역블롯팅으로 세포를 분석한 것을 나타낸다.

도 11a 내지 도 11f는 RC^{OX} 펑타(puncta) 및 다양한 지역화 마커 단백질 사이의 공동지역화(colocalization) 분석을 나타낸다.

(도 11a의 A 내지 도 11f의 F) HeLa 세포를 바필로마이신 A1으로 처리하고 항-RC^{OX} 항체와 MTCO2(미토콘드리아)(A), Rab7(B), LAMP1(C), Clathrin(D), TIA-1(E), 또는 FK2(F) 항체를 사용하여 면역염색을 수행한 것을 나타낸다.

도 12는 LC3으로 공동지역화된 RC^{OX}를 나타낸다.

(A) HeLa 세포를 바필로마이신 A1으로 처리하고 면역염색을 수행한 것을 나타낸다.

도 13은 프로테아좀(proteasome) 활동은 산화 스트레스로 유발된 ACAD10 분해에 참여하지 않는 것을 나타낸다.

(A) HeLa 세포를 MG132의 존재 하에 SNP로 처리하고 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

도 14a 내지 도 14d는 ACAD의 과산화소체 표적화(peroxisomal targeting)이 Nt-Cys2 잔기를 통한 산화 스트레스에 의해 증가하는 것을 나타낸다.

(도 14a의 A) TPpred 2.0 예측 서버 (https://tppred2.biocomp.unibo.it/tppred2)를 사용하여 ACAD10의 미토콘드리아 신호 펩티드의 예측 부위의 개략도를 나타낸다.

(도 14a의 B) HeLa 세포를 SNP 및 바필로마이신으로 6시간동안 처리하고 하기 재료 및 방법 섹션에 설명된 대로 분별 분석(fractionation assay)를 수행하였다. 전체 세포 용해물, 막 (미토콘드리아 분획 포함), 세포질, 과산화소체 분획(peroxisomal fractions)을 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 14b의 C) HeLa 세포를 N-말단 ACAD10 항체(N-말단) 또는 내부 ACAD10 항체를 사용하여 면역염색 분석을 수행한 것을 나타낸다.

(도 14b의 D 및 도 14c의 E) 도 6a의 사진 A(D) 또는 도 6b의 사진 B(E)의 공동지역화(colocalization) 정도의 정량화를 나타낸다.

(도 14c의 F) 과산화소체 분획(peroxisomal fractions)을 하기 재료 및 방법 섹션에 설명된 대로 프로테아제 보호 분석(protease protection assay)을 수행하고 면역블롯팅으로 분석한 것을 나타낸다.

(도 14d의 G) ACAD10의 미토콘드리아 또는 퍼옥시좀으로의 전좌(translocation)의 개략도를 나타낸다. N-말단 ACAD10은 지역화(localization)에 따라 다른 수정 단계를 거친다. 미토콘드리아 ACAD10은 미토콘드리아 막을 통과할 때 신호 펩티드, 1-34 아미노산을 절단하였다. 세포질 ACAD10은 N-데드론 경로, ROS/ADO에 의한 산화 및 ATE1에 의한 아르기닐화를 각각 따랐다. RC^{OX}-ACAD10은 퍼옥시좀(peroxisome)을 표적으로 하고 퍼옥시좀의 세포질 표면에 국한된다.

도 15는 p62 고갈이 펙소파지(pexophagy)를 억제하는 것을 나타낸다.

(A) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 p62를 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진이다.

(B) HeLa 세포를 p62를 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

도 16은 p62 야생형 및 결실(deletion) 돌연변이 플라스미드의 개략도를 나타낸다.

(A) p62-myc의 재조합 야생형(WT) 및 시리얼 C-말단(D1-D4) 결실 돌연변이의 개략도를 나타낸다.

(B) p62-GFP의 재조합 야생형(WT) 및 ZZ 도메인 결실 돌연변이(ΔZZ)의 개략도를 나타낸다.

도 17a 내지 도 17e는 Nt-Cys가 퍼옥시좀(peroxisome)을 표적으로 하는데 필요하다는 것을 나타낸다.

(도 17a의 A) Cys-nsP4, Val-nsP4, Cys-nsP4-PTS1 및 Val-nsP4-PTS1 구축물(constructs)의 개략도를 나타낸다.

(도 17b의 B) HeLa 세포를 Cys-nsP4-PTS1 또는 Val-nsP4-PTS1로 형질감염시키고 용해물을 하기 재료 및 방법 섹션에 설명된 대로 세포분별을 실시하였다. 전체 세포 용해물, 막, 세포질 및 과산화소체 분획(peroxisomal fractions)을 면역블롯팅으로 분석하여 나타내었다.

(도 17b의 C) HeLa 세포를 SNP 및 바필로마이신 A1의 존재 하에 Cys-nsP4-PTS1 또는 Val-nsP4-PTS1로 형질감염시키고, 면역블롯팅으로 분석한 과산화소체 분획을 수집하였다.

(도 17c의 D) HeLa 세포를 SNP 및/또는 탄닌산의 존재 하에 Cys-nsP4-PTS1로 형질감염시키고, 전체 세포 용해물

및 과산화소체 분획을 면역블롯팅으로 분석하여 나타내었다.

(도 17d의 E) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 Cys-nsP4, Val-nsP4, Cys-nsP4-PTS1 또는 Val-nsP4-PTS1로 형질감염시키고, 면역염색으로 분석한 사진이다.

(도 17e의 F) HeLa 세포를 Cys-nsP4-PTS1로 형질감염시키고 과산화소체 분획을 얼음에서 30분동안 단백질분해효소 K(proteinase K) 및/또는 Triton X-100과 함께 배양하였다. 샘플을 면역블롯팅으로 분석하여 나타내었다.

도 18a 및 도 18b는 NBR1이 아르기닐화 의존성 펙소파지를 위한 주요 수용체가 아니라는 것을 나타낸다.

(도 18a의 A) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 NBR1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진이다.

(도 18a의 B) HeLa 세포를 NBR1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 18a의 C) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 p62를 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 항-RC^{OX} 및 항-p62 항체를 사용하여 면역염색을 수행한 사진이다.

(도 18b의 D 및 E) 도 18a의 그림 C(D) 또는 도 18b의 그림 F(E)에서 RC^{OX} 양성 세포를 정량화한 것이다.

(도 18b의 F) HeLa 세포를 바필로마이신 A1의 존재 하에 NBR1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역염색으로 분석한 사진이다.

도 19a 및 도 19b는 p62가 아르기닐화 의존성 펙소파지를 매개하는 것을 나타낸다.

(도 19a의 A) HeLa 세포를 AET1 및/또는 NBR1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 19a의 B) HeLa 세포를 AET1 및/또는 p62를 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(도 19b의 C) HeLa 세포를 $ATE1^{1A7A}$ 야생형(WT) 또는 K417A 돌연변이(KA) 및/또는 p62를 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

도 20은 아르기닐화가 정상 상태에서 펙소파지 수용체로서 중요한 역할을 하는 것을 나타낸다.

(A) HeLa 세포를 PEX5 또는 ATE1을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

(B) HeLa 세포를 PEX5 또는 ACAD10을 표적으로 하는 siRNA로 형질감염시키고 면역블롯팅으로 분석한 것이다.

도 21은 탄닌산의 pK 프로파일을 나타낸다.

(A 및 B) 20-30 g의 수컷 쥐 3 마리에 정맥주사 (IV, 10 mg/kg) (A) 또는 복강주사 (IP, 50 mg/kg) (B)로 탄닌산을 주입한 뒤 피를 뽑아 LC-MS를 이용하여 농도를 측정한 결과를 나타낸다.

(C) 위의 A와 B의 실험 결과를 나타낸 표를 나타낸다.

도 22는 N-데그론 경로에서 ACAD10에서 Cys2의 N-말단 아르기닐화의 새로운 역할을 나타낸다.

N-터미널 ACAD10은 지역화(localization) 에 따라 다른 수정 단계를 거친다. 미토콘드리아 ACAD10은 미토콘드리아 막을 통과할 때 미토콘드리아 처리 펩티다아제에 의해 신호 펩티드, 1-34개 아미노산을 절단하였다. 세포질 ACAD10은 N-데그론 경로를 따랐다. 세포질 ACAD10은 메티오닌 아미노펩티다아제(MetAP)에 의해 Nt-Cys2에 노출되고, ROS/RNS 또는 ADO 효소에 의해 산화되었다. 산화된 ACAD10은 ATE1에 의해 아르기닐화되고, 퍼옥시좀의 세포질 표면을 표적으로 하였다. RC^{OX}-ACAD10은 p62, GABARAP, 및 LC3을 모집하고 펙소파지(pexophagy)에 대한 신호를 보낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100] **1. 재료 및 방법 (Materials and Methods)**

[0101] **1) 플라스미드, 항체 및 기타 시약.**

[0102] 마우스 ATE^{1A7A}, ATE1^{1A7B}, ATE1^{1B7A}, ATE1^{1B7B}를 코딩하는 플라스미드를 pcDNA3.1로 클로닝하였다. 인간 ACAD10은 Jerry Vockley 박사 (University of Pittsburgh, USA)로부터 친절하게 제공되었으며, p3cFLAG-CMV-14 벡터 (Sigma)에 서브클로닝되었다. C2V ACAD10 돌연변이는 다음 프라이머를 사용하여 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)에 의해 생성되었다 (For: ATT AAG CTT ATG GTT GTC AGG AGC TGT, Rev: ACA GCT CCT GAC AAC CAT AAG CTT AAT). p62 및 결실 돌연변이를 pcDNA3.1-myc 또는 pEGFP-C1 벡터에 클로닝하였다. RC^{03}에 특이적인 토끼 폴리클로날 항체는 AbFrontier Inc. (Seoul, South Korea)의 맞춤형 서비스를 통해 펩타이드 서열 RC^{03}XG(X=20종의 아미노산)를 사용하여 생성되었다. 토끼 폴리클로날 mATE1 항체 및 N-말단 아르기닐화 형태의 BiP, R-BiP가 AbFrontier Inc.에서 생성되었다. 다음 항체도 사용되었다: FK2 (Enzo, BML-PW8810), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Abcam, ab9485), p62 (Abcam, ab56416), PMP70 (Sigma, SAB4200181), PEX1 (Santa Cruz, sc-21957), PEX14 (Sigma, SAB4502176), ATE1 (Santa Cruz, sc-271219), NBR1 (Santa Cruz, sc-130380), LC3 (Sigma, L7543), GABARAP (Santa Cruz, sc-377300), Actin (Sigma, A1978), MOXD1 (Abcam, ab153807), GPR22 (Santa Cruz, sc-104287), JUNB (Santa Cruz, sc-8051), ACAD10 (Novus, NBP2-49511, Proteintech, 17161-1-AP), MTCO2 (Abcam, ab3298), Rab7 (Sigma, R8779), LAMP1 (Abcam, ab25630), Clathrin (Abcam, ab2731) 또는 TIA-1 (Abcam, ab170156).

[0104] **2) 세포배양 및 형질감염.**

[0105] HeLa 세포는 American Type Culture Collection에서 구입하였다. 야생형 인간 섬유아세포 및 환자 유래 PBD 세포주(*PEX1*-G843D-PTS1)는 Peter K. Kim 박사 (University of Toronto, Canada)로부터 친절하게 제공되었다. HeLa 및 *PEX1* PBD 환자 세포는 표준 5 % CO_2 인큐베이터에서 풍부한 배지 (DMEM, 항생제 및 10 % 우태아혈청 (FBS))에서 배양되었다. 제조업체의 지침에 따라 Lipo2000 (Invitrogen)을 사용하여 세포를 플라스미드로 형질감염하였다.

[0106]

[0107] **3) RNA 간섭 분석.**

[0108] 제조업체의 지침에 따라 RNAiMAX 시약 (Invitrogen)을 사용하여 사전 설계된 소형 간섭 RNA (siRNA) (100pmol)를 HeLa 세포에 형질감염시켰다. 본 연구에 사용된 siRNA는 다음과 같다: siATE1 (Bioneer, 대한민국, 11101-1), siACAD10 (Bioneer, 80724-1, 80724-2), sip62 (Bioneer, 8878-1), siNBR1 (Bioneer, 4077- 1) siJUNB (Bioneer, 3726-1), siGPR22 (Bioneer, 2845-1), siMOXD1 (Bioneer, 26002-1), siADO (Bioneer, 84890-1), siCDO (Bioneer, 1036-1) 및 siPEX5 (Bioneer, 5830-1).

[0110] **4) 웨스턴 블롯 분석.**

[0111] 세포 용해물은 RIPA 완충액 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate 및 0.1% SDS) (CellNest, 대한민국)에서 초음파 또는 끓임에 의해 준비되었다. 세포 용해물을 SDS-PAGE에 적용하고 Bio-Rad 반건조식 전달 장치 (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막으로 옮겼다. 블롯은 PBS-T 용액(PBS에서 0.5%(w/v) Tween-20)에서 3%(w/v) 무지방 분유로 차단되었다. PBS-T로 두 번 세척한 후, 블롯을 1차 항체와 함께 배양한 다음 양고추냉이 퍼옥시다제(peroxidase)-접합된 2차 항체로 배양하였다. ECL 시약 (Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 면역 반응 밴드를 검출하였다.

[0113] **5) 면역 세포 화학.**

[0114] 세포는 6-웰 플레이트에서 폴리-L-리신 코팅된 슬라이드에서 배양되었다. 세포를 PBS에서 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에 10분동안 실온에서 고정시켰다. PBS로 2회 세척한 후 세포를 차단용액 (PBS에서 5% FBS)으로 1시간동안 처리한 후 1차 및 2차 항체와 함께 배양하였다. 공초점 이미지의 경우 C-Apochromat 40x/NA1.2 수침렌즈가 장착된 LSM700 직립 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (Zeiss)을 사용하였다. 공초점 현미경의 이미지는 Zen Lite 2012 (Black edition, 버전 1.1.13064.302, Zeiss)를 사용하여 분석하였다.

[0116] **6) 세포 분별.**

[0117] 제조업체의 지침에 따라 Peroxisome Isolation Kit (Sigma)를 사용하여 세포막, 세포기질(cytosol), 퍼옥시좀 분획을 분리하였다. 간단히, 세포를 1X 퍼옥시좀 추출 완충액에서 균질화하고 얼음에서 1시간동안 배양하였다. 분해되지 않은 세포를 제거하기 위하여 용해물을 500g에서 10분동안 4℃에서 원심분리하였다. 상등액을 4℃에서 10분동안 2,000g에서 원심분리한 후 수집하였고, 20,000g에서 1시간동안 추가로 원심분리하였다. 펠렛을 미정제(crude) 과산화소체 분획인 1X 퍼옥시좀 추출물 완축액에 재현탁하였다.

[0119] **7) 단백질분해효소(protease) 보호 분석.**

[0120] 미정제 퍼옥시좀 분획은 앞서 설명한 바와 같이 Peroxisome Isolation Kit (Sigma)를 사용하여 분리하였다. 과산화소체 분획을 5분, 15분 및 30분동안 얼음에서 Proteinase K(1㎍/ml) 및/또는 1% Triton X-100과 함께 배양하였다. 용해물은 웨스턴 블롯 분석으로 분석되었다.

[0122] **8) X-펩타이드 폴다운 분석.**

[0123] X-펩타이드 폴다운 분석에서, N-말단 RC^{OX}, C^{O3}, C, V 잔기를 포함하는 11-12-mer X-ACAD10 펩타이드(X-VRSCFQSPRK- 비오틴) 세트는 방정규 박사 (protein synthesizer, KBSI)에 의하여 합성되었다. 이 펩타이드는 C-말단 비오틴을 통해 스트렙타비딘(streptavidin) 아가로스 수지 (안정된 수지 ml당 0.4mg 펩타이드)로 교차결합되었다. X-펩타이드 비오틴 및 스트렙타비딘 아가로스 수지를 5부피의 PBS에 희석하고 4℃에서 밤새 배양하였다. 비드는 1000g에서 3분동안 원심분리하고 3부피의 PBS로 3회 세척하였다. 단백질 추출물을 준비하기 위해, 세포를 hypotonic buffer (10mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 및 10mM HEPES, pH 7.9)에서 프로테아제 억제제 혼합물과 함께 20회 이상 동결 및 해동하고, 4℃에서 20분동안 13000g에서 원심분리하였고, 상층액을 BSA 분석을 사용하여 정량화하였다. 100㎍의 단백질 추출물을 결합 완충액(0.05% Tween 20, 10% 글리세롤, 0.2M KCl, 및 20mM HEPES, pH 7.9)에 X-펩타이드-스트렙타비딘 접합 비드와 혼합하였다. 혼합물을 부드럽게 회전시키면서 4℃에서 2시간동안 배양하였다. 비드는 1000g에서 30초동안 원심분리하여 펠렛화하고, 1ml의 결합 완충액으로 10분동안 가열하였다. 샘플은 SDS-PAGE 및 면역 블롯팅으로 수행되었다.

[0125] **9) 시험관 내 (*in vitro*) p62 응집 분석.**

[0126] 세포를 24시간동안 p62-flag를 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 세포를 lysis buffer (50mM HEPES, pH 7.4, 0.15M KCl, 0.1% Nonidet P-40, 10% 글리세롤 및 프로테아제 억제제(protease inhibitor)와 포스파타제 억제제(phosphatase inhibitor)의 혼합물)에서 최소 20회 동결 및 해동하여 용해시켰다. 세포 용해물을 13000g, 4℃에서 20분동안 원심분리하고 상층액을 BSA 버퍼를 사용하여 정량화하였다. 5㎍의 단백질 추출물을 실온에서 2시간동안 100㎛M 베타스타틴(betastatin) 및 PNPP의 존재 하에 테트라 또는 펜타-펩타이드와 함께 용해 완충액에서 인큐베이션하였다. 샘플을 LDS 샘플 버퍼와 혼합하고 95℃에서 10분동안 가열하였다. 샘플은 4-12% 구배 겔 및 면역 블롯팅을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 수행되었다.

[0128] **10) 면역 조직 화학.**

[0129] 간 조직을 10% 포름 알데하이드에 고정하고 파라핀에 포매(embedded)시켰다. 파라핀이 내장된 간 조직을 5㎛ 두께로 절단하고 자일렌(xylene)에서 파라핀을 제거하고 알코올 수용액으로 재수화하였다. 100℃의 온도에서 15분동안 구연산염 완충액(0.01M, pH 6.0)에서 항원 검색 후, 간 조직 슬라이드를 새로 만든 0.3% 과산화수소에 15분동안 담그었다. 슬라이드를 차단 혈청과 함께 배양하고 1차 항체로 밤새 배양하였다. 5분동안 셰이커(shaker)에 PBS로 슬라이드를 3회 세척하고, 2차 항체용액 (HRP)을 추가하고, 슬라이드를 덮고, 실온에서 1시간동안 배양하였다. 슬라이드를 PBS로 3회 세척하고 슬라이드에 신선한 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 염색 버퍼를 추가하고, 염색 시간을 현미경으로 조정하고, 슬라이드를 물로 세척하여 염색을 중지하였다. 슬라이드를 순차적으로 75% 알코올, 85% 알코올, 무수 에탄올, 무수 에탄올 및 자일렌으로 10분동안 배양하였다. 슬라이드가 마르면 중성 고무를 사용하여 슬라이드를 밀봉한다. 슬라이드를 스캔하고 현미경으로 결과를 확인한다.

[0131] **11) 통계 분석.**

[0132] 데이터는 세 가지 독립적인 실험의 평균±SD로 표시되었다. ANOVA 및 Image J 프로그램에 의해 Prism 6 소프트웨어 (Graph Pad)로 통계 분석을 수행하였다. P <0.05와의 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다 (***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05).

[0134] **2. 결과(Results)**

[0135] **실시예 1) Nt-Cys는 산화 및 아르기닐화에 의존하는 자가포식 데그론(autophagic degron)을 생성한다.**

[0136] Nt-Cys2의 산화 및 아르기닐화는 산화 스트레스 하에서 자가포식 단백질 분해(autophagic proteolysis)를 유도한다는 것을 확인하였다.

[0137] 먼저, 산화 및 아르기닐화의 기질로서 Nt-Cys2의 역할을 특성화하기 위하여, 산화 및 아르기닐화 후 Nt-Arg-Cys^{OX}($R\text{-}C^{OX}$) 모티프를 획득하는 단백질에 특이적인 항체를 생성하였다. 토끼에게 20개의 $RC^{03}XG$ 테트라 펩타이드 (X=모든 20개의 주요 아미노산)의 혼합물을 주입하여 (도 1의 A) 도트 블롯 분석에서 대부분의 20개 펩타이드를 검출하는 $R\text{-}C^{OX}$ 항체를 생산하였다 (도 1의 B).

[0138] $R\text{-}C^{OX}$ 단백질의 세포 내 위치를 결정하기 위하여, 면역 형광 분석을 수행하여 다양한 유형의 점상 구조(punctate structures)를 나타내었다 (도 8a). $R\text{-}C^{OX}$ cytosolic 펑타(puncta, 세포 내 생성되는 반점 모양의 구조)의 형성은 sodium nitroprusside (SNP, 산화 질소 공여자) (도 1의 C), L-아르기닌 (산화 질소의 전구체) (도 8b), 과산화수소(H_2O_2) (도 8c), 및 클로피브레이트(clofibrate) (도 8d)에 의하여 현저하게 촉진되었다.

[0139] 그러나 $R\text{-}C^{OX}$ cytosolic 펑타(puncta)의 형성은 항산화 글루타티온의 전구체인 N-아세틸-시스테인 (NAC)에 의하여 억제되었다 (도 1의 D 및 도 9). 이러한 $R\text{-}C^{OX}$ 펑타(puncta)는 또한 ATE1의 효소 활성을 억제하는 것으로 알려진 수렴성 약물인 탄닌산 (CAS No. 1401-55-4)에 의하여 억제되었다 (Saha et al., 2012) (도 1의 E 및 도 10a). R-transferase 이성질체의 녹다운(knockdown)에서도 유사한 억제가 관찰되었다 (도 10b 및 도 10c).

[0140] 이러한 결과는 산화 스트레스 하에서 N-말단에 노출된 Cys가 ROS에 의해 산화되고 ATE1에 의해 아르기닐화되어 $R\text{-}C^{OX}$ 노출 단백질을 생성하고, 이는 후속적으로 세포 내 구조와 연관됨을 시사한다.

[0142] 다음으로, $R\text{-}C^{OX}$ 단백질의 대사 운명을 모니터링하였다. 면역 염색 분석은 다양한 스트레스 요인에 의해 유도된 $R\text{-}C^{OX}$ 펑타(puncta)가 처리 후 6시간에 분명해졌고, 12시간에 정점에 이르렀고, 18시간에 기저 수준으로 돌아왔음을 나타내었다 (도 1의 C, 도 8b, 도 8c, 도 8d). 이러한 $R\text{-}C^{OX}$ 펑타(puncta)의 분해 플럭스는 오토파지 차단제 (autophagy blocker) 바필로마이신 A1 (bafilomycin A1)에 의해 억제되었지만, 프로테아좀 억제제 MG132에 의해 억제되지 않았다 (도 8a 및 도 1의 F).

[0143] 따라서 Nt-Cys2의 산화 및 아르기닐화는 산화 스트레스 하에서 자가포식 단백질 분해(autophagic proteolysis)를 유도하는 것을 확인하였다.

[0145] **실시예 2) Cys2는 펙소파지(pexophagy)의 데그론(degron)이다.**

[0146] $R\text{-}C^{OX}$ 데그론이 펙소파지에 대한 데그론임을 확인하였다.

[0147] 다양한 마커를 사용한 공동 지역화 분석 (co-localization analyses)은 $R\text{-}C^{OX}$ 단백질이 퍼옥시좀 (마커로 PMP70을 사용하여 결정됨), 미토콘드리아 (MTCO2 사용), 엔도좀 (Rab7 사용), 리소좀 (LAMP1 사용), endocytic vesicles (clathrin 사용), 및 스트레스 과립 (TIA-1 사용)과 같은 다양한 세포 내 구조에 풍부하다는 것을 나

타냈다 (도 2a, 도 11a, 도 11b, 도 11c, 도 11d, 도 11e). 반면, R-C^{OX}-양성 구조는 FK2 항체를 사용하여 검출된 유비퀴틴에 대해 대부분 음성이었다 (도 11f). 이 중 퍼옥시좀에 초점을 맞추었다 (도 2a).

[0148] 이 단일막 구조는 산화 스트레스동안 다양한 역할을 하며, ROS에 의해 손상되어, 펙소파지(pexophagy), 즉 원하지 않거나 손상된 부분의 자가포식 전환(autophagic turnover)이 필요하게 된다. 공동 면역 염색 분석(co-immunostaining analyses)는 R-C^{OX} 신호의 85~90%가 자가포식 수용체 p62 및 막-관련 단백질 GABARAP 모두와 함께 위치(co-localized)한다는 것을 나타내었다 (도 2a 및 2b). R-C^{OX} 신호의 약 10~15%가 LC3에 대하여 양성이었다 (도 12). R-C^{OX} 신호의 동적 변동은 정상 조건 및 자가포식 억제 조건에서 p62, GABARAP 및 LC3의 신호와 시공간적으로 상관관계가 있다. 이러한 결과는 하나 이상의 R-C^{OX} 단백질이 펙소파지(pexophagy) 동안 퍼옥시좀에 동원된다는 것을 시사한다.

[0149] 본 발명자들은 R-C^{OX} 모티프가 펙소파지를 위한 데그론인지 조사하였다. ATE1의 약제학적 억제는 펙소파지를 차단하여 PMP70, PEX1, 및 PEX14와 같은 퍼옥시좀 관련 단백질의 축적을 유도한다 (도 3의 A). 펙소파지는 ATE1 녹다운에 의해 유사하게 억제되었다 (도 3의 B). 일관되게, 면역 염색 분석 결과 퍼옥시좀이 탄닌산 또는 ATE1 siRNA에 의해 대사적으로 안정화된 것으로 나타났다 (도 3의 C 및 D). 퍼옥시좀 단백질의 전환(turnover)은 R-트랜스퍼라아제(R-transferase) 동형체(isoform) (ATE1^{1A7A}, ATE1^{1B7A}, ATE1^{1B7A}, 및 ATE1^{1B7B}) 중 하나를 과발현함으로써 가속화되었다 (도 3의 E). 대조적으로 촉매 활성 돌연변이인 K417A ATE1은 그러한 효능을 나타내지 않았다 (도 3의 F). 더욱이, ATE1-의존적 전환은 바필로마이신 A1에 의해 차단되었다 (도 3의 G). 이러한 결과는 R-C^{OX} 데그론이 펙소파지에 대한 데그론임을 시사한다.

[0151] **실시예 3) ACAD10은 Nt-Cys2에서 산화 및 아르기닐화 기질이다.**

[0152] 펙소파지를 매개하는 R-C^{OX} 기질을 확인하기 위하여, Met-Cys 프로테옴(proteome)을 스크리닝하였다. 생물정보학 분석에 따르면 인간 단백질의 약 1%가 N-말단에서 Cys2를 노출할 수 있으며, 스플라이싱 변형 형태를 포함하여 총 약 350개의 단백질이 존재한다. 이 350개의 Met-Cys 단백질은 퍼옥시좀 과정과의 기능적 관련성을 기반으로 93개로 좁혔다. 93개의 siRNA를 사용한 RNA 간섭 분석은 R-C^{OX} 펑타(puncta)가 32개의 siRNA에 대한 반응으로 하향 조절되었음을 보여준다 (도 4a). 32개의 유전자 중 4개는 C-말단에 퍼옥시좀 표적화 서열 (peroxisomal targeting sequence 1, PTS1)을 포함하였다: JUNB, GPR22(G protein coupled receptor 22), MOXD1, 및 ACAD10 (도 4b). 이러한 Met-Cys 단백질을 하향 조절시키는 것은 바필로마이신 A1 처리와 무관하게 퍼옥시좀 관련 R-C^{OX} 데그론을 하향 조절하였다 (도 4c 및 도 4d). 이러한 결과는 PTS1을 포함하지만 R-C^{OX} 펑타(puncta)에 영향을 미치지 않는 음성 대조군으로 SULT6B1 (sulfotransferase family 6B member 1)을 사용하여 검증하였다 (도 4b 내지 도 4d). 일관되게, 4개의 단백질은 모두 산화 스트레스 하에서 시간에 따라 수명이 짧아졌다 (도 4e의 E). 따라서 우리는 JUNB, GPR22, MOXD1 또는 ACAD10의 대사 운명을 특성화하였다. JUNB, GPR22 및 MOXD1은 프로테아좀 억제에 의해 안정화된 반면, ACAD10 분해는 자가포식 억제에 의해 선택적으로 억제되었다 (도 4e의 F). 더욱이, ACAD10 및 GPR22의 전환은 JUNB와 MOXD1이 아니라 탄닌산에 의해 억제되었다 (도 4f의 G). 이 결과로부터 ACAD10이 Nt-Cys2에서 산화 및 아르기닐화 기질임을 확인하였다.

[0154] **실시예 4) ACAD10의 R-C^{OX}는 자가포식 N-데그론이다.**

[0155] 본 발명자들은 ACAD10이 Nt-Cys2에서 산화 및 아르기닐화의 생체 내 기질인지 여부를 테스트하였다. 최근 N-데그론 경로에서 Cys2의 산화가 포유류에서 ADO 이산소화효소(dioxygenase)에 의해 매개되는 것으로 보고되어, ADO가 ACAD10에 미치는 영향을 테스트하였다. ACAD10은 CDO가 아닌 dioxygenase knockdown, ADO에 의하여 증가되었다 (도 4f의 H). 그러나, ACAD10 분해는 산화 스트레스에 의해 촉진되고 (도 4g의 I), 탄닌산 (도 4g의 I), ATE1 knockdown (도 4g의 J), 또는 바필로마이신 A1 (도 4h의 K)에 의해 억제되었다. 일관되게, ACAD10 분해는 ATE1 과발현에 의해 과속화되었으며, 이는 바필로마이신 A1에 의해 상쇄되었다 (도 4h의 L). 이러한 분석에서 프로테아좀 억제는 SNP-유도 ACAD10 분해에 영향을 미치지 않았다 (도 13).

[0156] 따라서 Cys2가 발린(valine)으로 변경된 C2V-ACAD10 돌연변이를 사용하여 ACAD10의 Cys2가 산화 및 아르기닐화 부위인지 여부를 확인하였다. Cycloheximide 분해 분석은 ACAD10의 반감기가 약 45분이라는 것을 보여주며, $ACAD10^{C2V}$를 사용하면 약 6시간으로 연장되었다 (도 4i의 M). 안정성이 아르기닐화 또는 자가포식 억제에 민감한 야생형 ACAD10과 달리 이미 안정된 $ACAD10^{C2V}$는 큰 변화를 보이지 않았다 (도 4j의 N 및 O). 따라서, ACAD10은 Nt-Cys2 잔기에서 산화 및 아르기닐화의 생체 내 기질이며, 자가포식 N-데그론 경로에 의해 분해된다.

[0158] **실시예 5) ACAD10의 $R\text{-}C^{OX}$는 펙소파지를 위한 N-데그론이다.**

[0159] 본 발명자들은 펙소파지에서 ACAD10과 $R\text{-}C^{OX}$ 잔류물의 생리적 기능을 결정하였다. 면역블롯팅 분석은 ACAD10 과발현이 용량 의존적 방식으로 PMP70, PEX1 및 PEX14와 같은 퍼옥시좀 단백질의 분해를 촉진하였음을 보여주었다 (도 5a의 A). 퍼옥시좀 단백질의 ACAD10에 의한 분해는 탄닌산 또는 바필로마이신 A1에 의해 차단되었다 (도 5a의 B 및 도 5b의 C). 대조적으로, ACAD10의 knockdown은 퍼옥시좀 단백질의 전환 (도 5b의 D)을 방해하여, ACAD10이 퍼옥시좀의 아르기닐화 의존적 자가포식 분해를 유도함을 시사한다.

[0160] 다음으로, ACAD10의 Nt-Cys2가 펙소파지를 위한 데그론 역할을 하는지 여부를 결정하였다. 야생형 ACAD10과 달리, $ACAD10^{C2V}$ 과발현은 퍼옥시좀 단백질의 전환에 영향을 미치지 않으며, 탄닌산 또는 바필로마이신 A1 처리에 대한 반응에서 차이를 보이지 않았다 (도 5c의 E 및 F). 이러한 결과는 ACAD10의 $R\text{-}C^{OX}$ 잔기가 펙소파지에 필수적인 데그론임을 시사한다.

[0162] **실시예 6) $R\text{-}C^{OX}$는 산화 스트레스 동안 ACAD10의 퍼옥시좀으로의 재편재화(re-localization)를 유도한다.**

[0163] R-COX의 역할을 결정하기 위해, 산화 스트레스 상태에서 ACAD10의 세포 내 위치를 확인하는 실험을 수행하였다.

[0164] 연구에 따르면 ACAD10은 미토콘드리아와 퍼옥시좀 모두에 존재한다 (Bloom et al., 2018; He et al., 2011; Ye et al., 2004). 실제로, 생물정보학은 130kDa-ACAD10이 추정 미토콘드리아-표적화 프로-서열(pro-sequence) (#1-34)을 가지고 있다고 예측하였다 (도 14a의 A). ACAD10의 과산화소체 표적화에서 $R\text{-}C^{OX}$의 역할을 결정하기 위해, 우리는 각각 #1-85 (N-말단 항체) 및 #49-285 (내부 항체)에 특이적인 2개의 ACAD10 항체를 사용하는 분획 분석을 사용하였다. 정상 조건에서 내부 항체는 약 100kDa의 ACAD10의 절단된 형태만을 검출하였으며, 이는 미토콘드리아를 포함한 막 분획에서 독점적으로 검색되었다 (도 14a의 A 및 도 14b의 C). 대조적으로, 전장 (full-length) ACAD10은 주로 세포질(cytosol)에서 발견되었다 (도 14a의 A 및 도 14b의 C).

[0165] 그러나 세포를 SNP로 처리시, 전장 ACAD10의 상당 부분이 퍼옥시좀 분획으로 재배치되었고 자가포식 억제 시 축적에 의해 입증된 바와 같이 자가포식 플럭스에 들어갔다 (도 14a의 B).

[0166] 대체 방법으로, 내인성(endogenous) 및 일시적으로 발현된 ACAD10을 검출하는 면역 형광 분석을 사용하였다. 전장 ACAD10은 정상적으로 성장하는 세포에서 산발적인 신호로 나타났다.

[0167] 그러나 세포가 SNP로 처리되었을 때, 전장 ACAD10은 퍼옥시좀에 점상 신호(punctate signals)를 형성하였으며, 퍼옥시좀 막에서 PMP70과 함께 퍼옥시좀 기질에서 ACAA1 (acetyl-coenzyme A acyltransferase 1)과 공존하는 신호를 생성하였다 (도 6a의 A 및 도 14b의 B). 과발현된 ACAD10은 대조군 세포에서 퍼옥시좀과 공동으로 존재하고(colocalized) 퍼옥시좀 ACAD10은 SNP 처리에 의해 증가되었다 (도 6b의 B 및 도 14c의 E). 대조적으로, $ACAD10^{C2V}$은 SNP 처리에 반응하여 퍼옥시좀으로 재배치하지 못하였다 (도 6b의 B 및 도 14c의 E). 이러한 결과는 $R\text{-}C^{OX}$ 산화 스트레스 하에서 ACAD10의 퍼옥시좀 국소화(peroxisomal localization)의 결정 인자임을 시사한다.

[0168] ACAD10의 퍼옥시좀 국소화를 추가로 특성화하기 위해 퍼옥시좀을 분리하였다. 면역블롯팅 분석은 막 분획물이 막 관통 마커 PMP70을 포함하지만 전장 ACAD10은 포함하지 않음을 보여준다 (도 14a의 B). 퍼옥시좀에서 ACAD10의 토폴로지를 결정하기 위해 우리는 단백질분해효소 K(proteinase K)가 세포질(cytosol)에 노출된 단백질을 소화하는 프로테아제 보호 분석(protease protection assays)을 수행하였다. 퍼옥시좀 기질 단백질 카탈라아제(catalase)는 proteinase K에 의해 소화로부터 보호되는 반면 ACAD10 및 PMP70은 완전히 분해되었다 (도 14c의 F). Triton X-100 (도 14c의 F)을 사용하여 막이 용해되었을 때 이러한 모든 단백질은 완전히 분해되었다. 이러

한 결과는 세포질 전장 ACAD10이 산화 스트레스 하에서 퍼옥시좀의 세포질 표면에 동원된다는 것을 시사한다 (도 14d의 G).

[0170] **실시예 7) ACAD10의 R-C^{OX}는 펙소파지에서 p62의 활성화 리간드이다.**

[0171] ACAD10의 R-C^{OX}가 p62와 상호작용하는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다.

[0172] 이전 연구에서, p62가 ER-상주 분자 샤페론(chaperone)인 아르기닐화된 BiP의 Nt-Arg에 결합할 수 있는 N-데그론 경로의 N-리코그닌(N-recognin)으로 확인되었다. 따라서 본 발명자들은 p62가 펙소파지 동안 ACAD10의 R-C^{OX} 데그론을 결합하는 어댑터일 수 있다고 추측하였다. 실제로, ACAD10과 다른 퍼옥시좀 단백질의 분해는 p62의 녹다운에 의해 억제되었다 (도 6c의 C, 도 15의 A, 및 도 15의 B).

[0173] ACAD10의 R-C^{OX}가 p62와 상호작용하는지 여부를 테스트하기 위해 SNP 및 바필로마이신 A1으로 처리된 세포에서 ACAD10 및 p62의 면역 염색 분석을 수행하였다. 정상적으로 성장하는 세포에서 ACAD10과 p62는 중간 정도의 공동지역화(colocalization)를 보였는데, 이는 세포를 SNP와 바필로마이신 A1으로 처리하였을 때 현저하게 증가하였다 (도 6c의 D). 대조적으로, ACAD10^{C2V}은 정상적으로 성장하는 세포뿐만 아니라 SNP 및 바필로마이신 A1으로 처리했을 때도 p62와 거의 공존하지 않았다 (도 6c의 D).

[0174] 더욱이, 공동 면역 침전 분석은 내인성 ACAD10이 p62와 상호작용하고 그들의 상호작용이 H_2O_2 및 바필로마이신 A1 처리에 의해 향상되었음을 보여주었다 (도 6d의 E). 이 발견은 역 면역침전법 (reverse immunoprecipitation)을 사용하여 확인되었다. P62와의 상호작용에서 Nt-Cys2의 중요성을 확인하기 위하여 과발현된 ACAD10 및 ACAD10^{C2V}를 사용하여 면역 침전을 수행하였다. 재조합 ACAD10과 p62의 상호작용은 H_2O_2 및 바필로마이신 A1 처리에 의해 유의하게 증가하였다 (도 6d의 F). 그러나 Nt-Cys2에서 발린으로의 돌연변이는 ACAD10과 p62 사이의 상호작용을 폐지하였으며, 이는 역 면역 침전을 사용하여 확인되었다 (도 6d의 F).

[0175] 본 발명자들은 또한 펩티드 폴다운 분석을 사용하여 Nt-ACAD10의 R-C^{OX}와 p62 사이의 상호작용을 관찰하였다 (도 6e의 G). 이러한 결과는 ACAD10의 R-C^{OX}가 p62에 결합함을 시사한다.

[0176] P62와의 ACAD10 상호작용의 기초가 되는 작용 방식을 이해하기 위해, 우리는 p62의 일련의 절단 돌연변이를 사용하여 공동 면역 침전 분석을 수행하였다 (도 16의 A 및 B). 매핑 분석은 ACAD10의 R-C^{OX}가 p62의 ZZ 도메인에 결합한다는 것을 보여주었다 (도 6e의 H 및 I).

[0177] R-C^{OX}가 p62의 자기 올리고머화(self-oligomerization)를 유도하는지 여부를 테스트하기 위해 시험관 내 올리고머화 분석을 수행하였다. 세포 추출물을 R-C^{OX}-ACAD10 펩타이드와 혼합한 다음 비-환원 SDS-PAGE를 사용하여 p62의 공유 결합체를 단량체 p62에서 분리할 수 있다. 결과는 R-C^{OX}-ACAD10 펩타이드가 p62의 자기 올리고머화를 유도함을 보여주었다. 이러한 결과는 ACAD10의 R-C^{OX}가 ACAD10과 복합체에서 p62의 올리고머화를 유도하여 펙소파지 부위를 표시할 수 있음을 시사한다.

[0179] **실시예 8) R-C^{OX} 데그론에서 퍼옥시좀으로의 공학적 편재화.**

[0180] 퍼옥시좀 표적화를 유도하는데 R-C^{OX} 데그론 만으로도 충분한지 여부를 결정하기 위해, 세포는 Ub-X-nsP4-PTS1 (X = Cys 또는 Val)을 발현하였으며, 탈유비퀴틴화 효소(deubiquitinating enzymes) (DUBs)에 의한 동시 번역 절단 (cotranslational cleavage)이 Ub 및 X-nsP4-PTS1를 얻는다 (도 17a의 A). Cys-nsP4-PTS1과 Val-nsP4-PST1은 모두 세포질 분획에 국한된 반면 (도 17b의 B), Cys-nsP4-PTS1은 퍼옥시좀 분획에서 Val-nsP4-PST1보다 더 편재되었다 (도 17b의 C). 탄닌산 처리는 Cys-nsP4-PTS1의 발현을 증가시켰지만, Cys-nsP4-PTS1의 퍼옥시좀 표적화는 감소하였다 (도 17c의 D). 정상 세포에서 Cys-nsP4-PTS1과 Val-nsP4-PST1는 모두 세포질 전체에서 (diffusive signals) 검출되었다 (도 17d의 E, 아래). 그러나 자가포식 억제 조건 하에서 Cys-nsP4-PTS1은 Val-nsP4-PTS1 및 PST-결여 X-nsP4와는 대조적으로 퍼옥시좀이 풍부해졌다 (도 17d의 E). 프로테아제 보호 분석

은 Cys-nsP4-PTS1이 ACAD10과 같은 퍼옥시좀의 세포질 표면에 동원되었음을 확인하였다 (도 17e의 F). 이러한 결과는 R-C^{OX} 데그론이 퍼옥시좀에 대한 표적화를 향상시키는데 필요함을 시사한다.

[0182] **실시예 9) 펙소파지는 ATE1$^{-/-}$ 및 p62$^{-/-}$ 마우스 배아에서 손상되었다.**

[0183] 동물 모델을 사용하여 이러한 결과를 확인하기 위하여, ATE1$^{-/-}$ 마우스 배아(서울대학교 의과대학 의생명 동물자원연구센터, 129SJ/C57BL/6 strain, 배아12.5일 연령)에서 퍼옥시좀 생물 발생을 관찰하였다. 배아 12.5일(E12.5)에 야생형 및 ATE1$^{-/-}$ 배아를 수확하고 퍼옥시좀의 면역 염색 분석을 수행하였다. 퍼옥시좀의 발현수준이 야생형 배아에 비해 ATE1$^{-/-}$ 배아에서 유의미하게 증가하였다 (도 7a의 A).

[0184] p62가 펙소파지에서 N-리코그닌 (N-recognin)이라는 점을 감안할 때, 본 발명자들은 p62$^{-/-}$ 마우스(서울대학교 의과대학 의생명 동물자원연구센터, C57BL/6 strain, 6개월 연령)에서도 퍼옥시좀을 관찰하였다. 조직의 면역 염색 분석은 간 조직에서 증가된 퍼옥시좀 수준을 명확하게 입증하였다 (도 7a의 B). 이러한 결과는 R-C^{OX}-p62 경로에 의한 펙소파지가 마우스에서도 작용함을 입증한다.

[0185] **실시예 10) 펙소파지의 화학적 조절은 PBD에서 퍼옥시좀을 복원한다.**

[0186] PBD는 통제되지 않은 펙소파지를 포함하는 상염색체 열성 질환으로, 과산화소체 손실을 초래한다. 대부분의 PBD 환자는 10세를 넘기지 못한다. 따라서 우리는 R-C^{OX} 경로의 억제가 *PEX1*-G843D를 발현하는 PBD 환자 유래 섬유아세포를 사용하여 과도한 펙소파지를 정상 수준으로 회복시킬 수 있는지 연구하였다. PEX1 G843D 돌연변이는 PBD의 주요 원인이며 펙소파지를 증가시켜 퍼옥시좀 손실을 유발한다. 예상대로, 퍼옥시좀 마커 GFP-PTS1의 면역 염색 분석은 퍼옥시좀 손실을 나타내는 세포질 전체에 걸쳐 확산 신호를 나타내었다 (도 7b의 C, 왼쪽). 특히, 세포를 탄닌산으로 처리하였을 때, GFP-PTS1이 퍼옥시좀에 재분배되어 퍼옥시좀 생합성이 회복되었음을 시사한다 (도 7b의 C, 왼쪽). 일관되게, 퍼옥시좀 생합성은 바필로마이신 A1 처리에 의해 유사하게 회복되었다 (도 7b의 C, 왼쪽). 면역블롯팅 분석은 또한 정상적인 인간 섬유아세포뿐만 아니라 PBD 환자 유래 섬유아세포(PBD 세포)에서도 탄닌산 처리 시 더 높은 수준의 퍼옥시좀 단백질을 검출하였다 (도 7b의 C, 오른쪽). ATE1의 녹다운으로 유사한 퍼옥시좀 회복이 일어났다 (도 7b의 D). 퍼옥시좀 생합성을 복구하는 대안으로 PBD 세포에서 ACAD10을 조절하였다. 실제로, ACAD10의 녹다운은 PBD 환자 유래 섬유아세포에서 퍼옥시좀의 수준을 증가시켰다 (도 7b의 E). 대조적으로, ACAD10을 과발현하면 PBD 세포에서 퍼옥시좀의 전환이 가속화되었다.

[0187] 그러나 Cys2에서 Val로의 돌연변이는 ACAD10에서 이러한 펙소파지-유도 효능을 폐지하였다 (도 7c의 F). Cys-nsP4-PTS1은 Val-nsP4-PTS1과 대조적으로 ACAD10과 유사한 효능을 나타내었다 (도 7c의 G).

[0188] 동물 모델에서 펙소파지가 약제학적으로 조절될 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 탄닌산을 12주령 수컷 마우스 (n=3) (서울대학교 의과대학 의생명 동물자원연구센터, C57BL/6 strain) 에 2mg/kg으로 1개월동안 주당 3회 주사하였다. 간과 같은 다양한 조직의 면역 염색 분석으로 퍼옥시좀 수준이 현저하게 증가함을 확인하였다 (도 7d의 H). 이러한 결과는 R-C^{OX} 경로가 PDB의 치료 표적임을 확인하였다.

[0190] **실시예 11) R-C^{OX}-p62 및 PEX5-NBR1 경로에 의한 펙소파지의 이중 조절.**

[0191] 연구에 따르면 자가포식 수용체 NBR1이 PEX5에서 단일-유비퀴틴을 인식하여 자가포식 막에서 LC3을 모집할 때 펙소파지가 시작한다. 현재까지 펙소파지에서 p62의 역할은 논란의 여지가 있다. 따라서 본 발명자들은 p62 및 NBR1의 상대적 기능을 조사하였다. 보고된 연구와 달리, 면역블롯팅 및 면역 염색 분석은 펙소파지가 NBR1 또는 p62 녹다운에 의해 유의미하게 억제되는 것으로 나타났다 (도 15의 A 및 B, 도 18a의 A 및 B). 특히, 퍼옥시좀에 대한 R-C^{OX} punctate 신호는 p62 siRNA (도 18a의 C 및 도 18b의 D)에 의해 폐지되었지만, NBR1 siRNA (도 18b의 E 및 F)에 의해 폐지되지는 않았다.

[0192] 다음으로, 이중 녹다운 분석을 사용하여 R-C^{OX}와 p62 및 NBR1의 기능적 관계를 결정하였다. ATE1 및 p62 (도 19a의 B)에 비해 ATE1 및 NBR1의 이중 녹다운 (도 19a의 A)에서 더 강력한 억제 효과가 관찰되었으며, 이는 R-

C^{OX} 데그론이 p62에서는 작동하지만 NBR1에서는 작동하지 않음을 시사한다. 일관되게, ATE1 과발현 세포에서 과속화된 퍽소파지는 K417A 돌연변이 (도 19b의 C, 오른쪽)와 대조적으로, p62 siRNA (도 19b의 C, 왼쪽)에 의해 효율적으로 상쇄되었다. 따라서, 퍽소파지는 R-C^{OX} 데그론-p62 및 PEX5-NBR1 경로라는 두 가지 별개 시스템에 의해 매개된다.

[0193] 다음으로, 본 발명자들은 R-C^{OX}-p62 및 PEX5-NBR1 경로의 상대적 중요성을 비교하였다. RNA 간섭 분석은 PEX5 녹다운과 비교하여 퍼옥시좀의 전환이 ACAD10 또는 ATE1 녹다운에 의해 더 현저하게 억제되었음을 보여준다 (도 20의 A 및 B). 이러한 결과는 R-C^{OX}-p62 경로가 산화 스트레스 하에서뿐만 아니라 정상 상태에서도 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0195] **실시예 12) 탄닌산의 pK 프로파일(profile) 확인**

[0196] 탄닌산을 PBD 관련 질병의 치료 용도로 사용하기 위하여, 쥐를 이용하여 pK 프로파일(profile)을 확인하였다. 투여 방법으로 정맥주사 (IV)와 복강주사 (IP) 두 가지 방법을 이용하여 측정한 결과를 도 21에 나타내었다. 상기 실험 결과는 Medicilon社에 의뢰하여 측정한 결과이다.

[0198] 도 21에 나타난 바와 같이, 탄닌산의 혈액 내 노출 농도가 높음을 확인하였다. 또한 정맥주사와 복강주사 모두 24시간까지도 혈액 내에 5-10 uM의 농도로 남아 있음을 확인하였다.

[0199] 그러므로 동물 모델을 이용하여 확인한 탄닌산의 pK는 치료제로 사용하기에 문제가 없음을 알 수 있다.

[0201] **3. Discussion.**

[0202] N-데그론 경로는 단일 N-말단 잔기가 단백질 분해를 위한 N-데그론으로 기능하는 단백질 분해 시스템이다. 이전 연구에 따르면 Nt-Asp 및 Nt-Glu는 아르기닐화되어 N-데그론 Arg을 생성할 수 있으며, 이는 차례로 유비퀴틴화(ubiquitination) 및 프로테아좀 분해(proteasomal degradation)를 위해 UBR 상자-함유 E3 리가아제(BUR box-containing E3 ligase)에 의해 인식된다. 본 출원에서, 본 발명자들은 Nt-Cys가 ROS 또는 ADO에 의한 화학적 또는 효소적 산화와 ATE1에 의한 효소적 아르기닐화를 통해 산화 스트레스의 센서로 작용함을 보여준다. 퍽소파지에서 ACAD10의 R-C^{OX} 데그론은 손상된 퍼옥시좀으로의 전좌(translocation)를 촉진하고 이후 p62의 ZZ 도메인에 결합한다. R-C^{OX}의 결합은 ACAD10과 복합체에서 p62의 자가-올리고머화(self-oligomerization)을 유도하는데, 이는 리소좀 분해를 위해 자가포식 막에서 GABARAP 또는 LC3을 동원하는 퍽소파지 부위를 표시한다. 본 발명자들은 R-C^{OX} 데그론을 표적으로 하는 탄닌산이 퍼옥시좀 손실과 관련된 PBD 환자의 치료약으로 활용될 수 있음을 보여준다 (도 22). 이러한 결과는 약 350개의 인간 단백질에서 발견되는 Met-Cys 모티프가 다양한 생물학적 과정에서 R-C^{OX} 데그론을 생성할 수 있음을 시사한다.

[0204] 단백질 N-말단에 노출된 Nt-Cys 잔기의 기능은 많은 분리된 연구를 제외하고는 논란의 여지가 많고 대체로 불분명하다. 이전 연구에 따르면 Nt-Cys를 운반하는 모델 기질은 S. cerevisiae에서 안정화되지만 포유류 세포에서는 불안정하다. 본 발명자들은 초기에 Met-Cys 시퀀스를 산소 감지 시스템으로 운반하는 RGS 단백질 세트(RGS4, RGS5 및 RGS16)를 확인하였다. 정상 산소 상태에서는 Nt-Met 잔기가 절단되어 Nt-Cys2가 노출되고, Nt-Cys2는 ADO에 의해 산화되고 ATE1에 의해 아르기닐화된다. 생성된 R-C^{OX} 데그론은 UBR1 및 UBR2의 UBR 상자에 의해 인식되며, 이는 기질 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해를 촉진한다. O_2-의존적 분해는 기본 수준에서 이러한 RGS 단백질을 억제한다. 그러나 저산소상태에서 기질은 대사적으로 안정화되고 원형질막으로 이동하여 G 단백질 신호를 하향 조절한다. 다른 연구에 따르면 Met-Cys 서열을 운반하는 많은 식물 단백질도 ERFVII, VRN2 및 ZPR2와 같은 Nt-Cys2의 산화 및 아르기닐화를 통해 분해된다는 것이 밝혀졌다. 정상 산소 상태에서 Nt-Cys2는 PCOs에 의해 산화되고 ATE1에 의해 아르기닐화된다. 생성된 R-C^{OX} 데그론은 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해에 대해 N-리코그닌 (N-recognin) PRT6에 의해 인식된다. 그러나 기질은 침수(submergence)와 같은 낮은 산소 조건에서

대사적으로 안정화되어 저산소증 반응 유전자를 유도하여 정상 산소 상태에서 저산소 대사로 재프로그래밍된다. 본 출원에서 본 발명자들은 ACAD10의 $R\text{-}C^{OX}$ 데그론이 다음과 같이 펙소파지에서 다발성 역할을 한다는 것을 나타냈다:

[0205] (1) 산화 스트레스 센서,

[0206] (2) ACAD10에 대한 과산화물 트랜스-국소화 신호 (peroxisomal trans-localization signal)

[0207] (3) 활성화 리간드 p62의 ZZ 도메인, 및

[0208] (4) ACAD10에 대한 오토파지 시스-데그론 및 퍼옥시좀 및 관련 단백질에 대한 트랜스-데그론.

[0209] ADO 또는 PCO에 의한 효소 산화를 통해 생성된 RC^{OX} 데그론은 UPS를 통해 '급성' 분해를 유도하는 반면, ROS에 의해 화학적 산화를 통해 생성된 동일한 데그론은 비-단백질 분해 과정을 조절하여 오토파지를 통해 '만성' 분해를 유도한다. RC^{OX} 데그론은 두 가지 다른 방식으로 기능을 어떻게 실행할까? 한 가지 가능성은 UPS에서 N-리코그닌 UBR1 및 UBR2와 자가포식에서 N-리코그닌 p62의 활동과 특이성이 정상 산소 상태 및 산화 스트레스 하에서 차별적으로 조절될 수 있다는 것이다. 또 다른 가능성은 $R\text{-}C^{OX}$ 데그론이 정상 산소 상태 및 산화 스트레스 하에서 추가적인 구조적 특징(signatures)을 가질 수 있으며, 이는 Lys48 연결에서 Lys63-연결 Ub 체인으로 Ub 코드 재프로그래밍을 포함할 수 있다. N-리코그닌의 비교 구조 분석과 기질상의 Ub 사슬에 대한 단백질체 분석이 상기 질문에 답하기 위하여 필요하다.

[0211] 매크로오토파지(macroautophagy)는 잘못 접힌 단백질 및 세포기관과 같은 다양한 세포질 구성요소의 격리 및 분해를 매개한다. PINK1-Parking 경로에 의해 예시된 바와 같이, 미토파지(mitophagy)와 비교하여, 펙소파지(pexophagy)와 같은 다른 유형의 기관 포식(organellophagy)의 기본 메커니즘은 대체로 잘 알려져 있지않다. 퍼옥시좀은 미토콘드리아에 이어 ROS를 생성하고 해독하는 주요 세포 기관으로, 손상막과 그 내용물을 적시에 제거해야 한다. 연구에 따르면 PEX5는 Cys11의 단일-유비퀴틴화가 오토파지 수용체를 가져와서 차례로, 자가포식막에서 LC3을 모집하는, 펙소파지의 수용체로 확인되었다. 흥미롭게도 PEX5는 과산화소체 단백질을 위한 화물 어댑터(cargo adaptor)이며, PEX14와 복합체를 형성하여 기공을 형성하여 화물이 퍼옥시좀 내강으로 운반된다. 또한 PEX5의 활성은 산화가 단일-유비퀴틴화에 대응하여 PEX5-의존성 펙소파지를 방해하는 Cys11을 포함하여 잔기가 산화될 때, 산화 스트레스 하에서 손상된다. 다면체 기능과 산화 민감도를 고려할 때, PEX5가 어떻게 펙소파지를 매개하는지에 대해 논란이 있다. 또 다른 의문점은 오토파지 수용체가 있는 단일-유비퀴틴화된 PEX5의 KD 값이 540 μM이라는 발견으로, 이러한 낮은 친화성으로 수용체 선택성이 어떻게 달성되는지에 대한 의문이 제기되었다. 본 출원에서, 본 발명자들은 오토파지가 PEX5-NBR1 및 $R\text{-}C^{OX}$-p62 경로의 두 가지 다른 메커니즘에 의해 매개된다는 것을 보여준다.

[0213] PBD는 PEX1, PEX6, PEX10, PEX12 및 PEX26 유전자의 돌연변이로 인한 퍼옥시좀의 손실과 관련된 대사 장애이다. 이 중에서 PEX1, PEX6 및 PEX26은 PTS1 및 PTS2를 운반하는 퍼옥시좀 화물의 수입과 퍼옥시좀 막에서 세포질로의 PEX5의 수출을 매개하는 AAA+ ATPase 복합체를 형성한다. 따라서 이 복합체는 단일-유비퀴틴화된 PEX5를 수출함으로써 펙소파지를 억제한다. 일관되게, PEX1, PEX6, 또는 PEX26의 돌연변이는 증상에 과도한 펙소파지를 포함하는 PBD 환자의 약 65% ~ 85%를 차지한다. 예를 들어, PEX1 G843D 돌연변이와 PEX6의 상호작용은 야생형 PEX1에 비해 70% 미만으로 감소하여 과도한 펙소파지 및 퍼옥시좀 손실을 초래한다. 광범위한 연구가 PBD에서 펙소파지를 늦추는 약제학적 수단에 추점을 맞추었다. 실제로, 오토파지의 화학적 억제는 PBD에서 퍼옥시좀 분해 및 매트릭스 단백질 수입을 완화하는 것으로 나타났다. 대안적인 접근법으로, 퍼옥시좀 및 미토콘드리아 단백질을 탈유비퀴틴화(deubiquitinates)하는 탈유비퀴틴화 효소 (deubiquitinating enzyme, DUB) USP30의 과발현은 펙소파지를 억제할 수 있었다. 그러나 USP30뿐만 아니라 오토파지의 표적화는 심각한 부작용을 수반하여 약물 표적으로 이용하기에 어려웠다. 본 출원에서 본 발명자들은 수렴제로 사용되는 탄닌산 (CAS No. 1401-55-4)을 사용하여 펙소파지를 효율적으로 억제하여 과산화소체 수준을 크게 증가시킬 수 있음을 입증하였다 (도 3 및 도 7a 내지 도 7 d). 중요하게도, 5-20 μM 또는 2mg/kg 주입 시 탄닌산은 PBD 유래 세포에서 퍼옥시좀 항상성을 각각 정상 수준으로 또는 마우스에서, 효율적으로 복원하였다 (도 7a 내지 도 7 d). 식물에서 추출한 천연물인 탄닌산은 구순 포진, 발열 물집, 기저귀 발진, 인후통, 설사, 기침 등 다양한 증상을 치료하는데

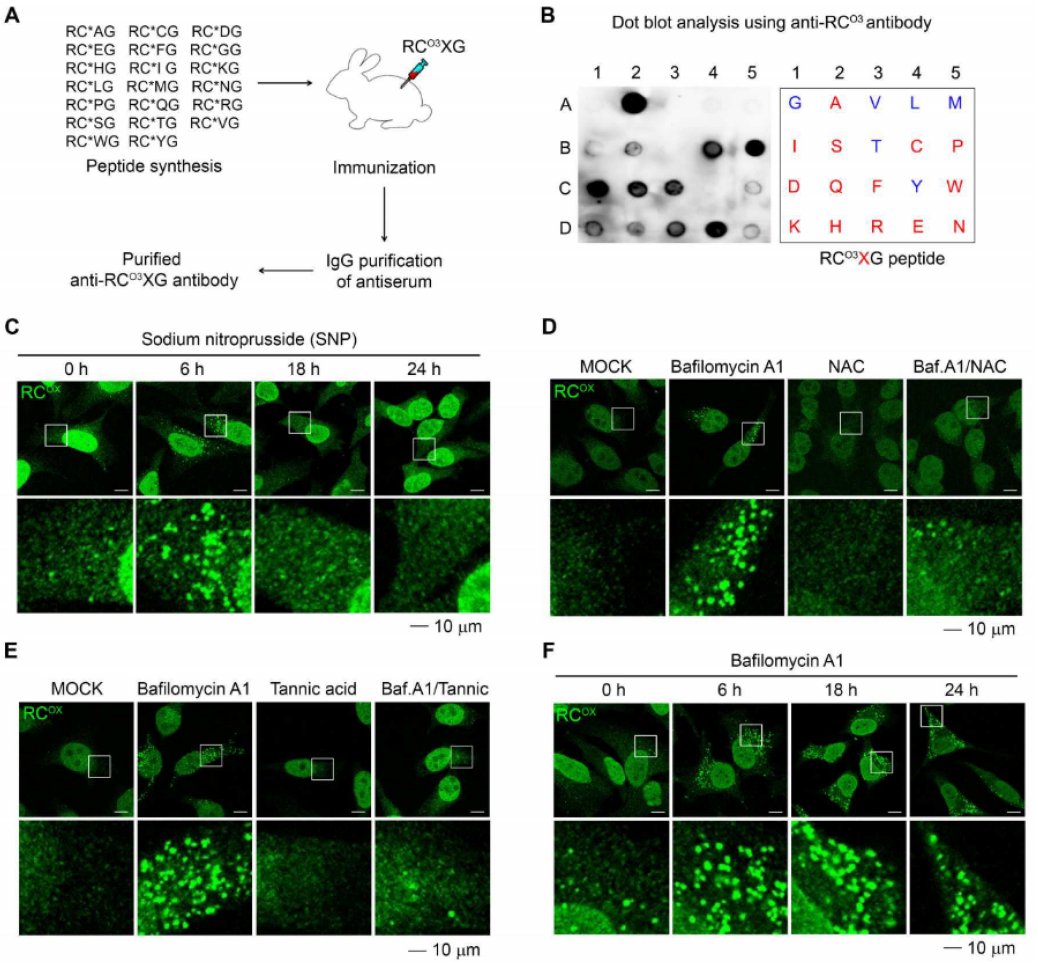
사용된다. 탄닌산과 같은 RC^{OX} N-데그론 경로를 표적으로 하는 시약은 현재 사용가능한 약물 없이 수명이 1년 미만으로 제한되는 젤웨거 증후군을 포함한 PBD 환자를 치료하는데 이용될 수 있음을 제안한다.

[0214] N-데그론 경로는 UPS를 통해 N-데그론을 운반하는 단기 조절기의 선택적 분해를 매개하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들의 최근 연구는 경로가 잘못 접힌 단백질 및 그 응집체와 같은 관련 오토파지 화물과 함께 N-데그론 함유 단백질 기질의 오토파지 분해에 역할을 한다는 것을 나타냈다. 보다 최근에, 본 발명자들은 경로가 ER 스트레스 하에서뿐만 아니라 정상적인 조건에서 ER-파지(ER-phagy)를 매개한다는 것을 나타내었다 (여기서 단백질의 Nt-Asp 또는 Nt-Glu에서 생성된 R 데그론이 중요한 결정인자이다.). 이 경로는 UPR-유도 분자 샤페론(chaperones) 및 ER 내강(lumens)에 축적되는 잘못 접힌 단백질 응집체와 같은 내용물과 함께 손상된 ER 막의 적시 제거를 촉진한다. 현재 연구에서 본 발명자들은 N-데그론 경로가 Nt-Cys2에서 생성된 $R\text{-}C^{OX}$ 데그론을 통해 퀙소파지를 매개한다는 것을 보여준다. 두 개의 N-데그론 경로의 기계적 세부 사항이 구별되어 N-데그론의 다양한 역할을 나타낸다. 한 가지 질문은 N-데그론 경로가 지방포식(lipophagy) 및 이종포식(xenophagy)과 같은 다른 유형의 기관 포식(organellophagy)을 매개하는지 여부이다.

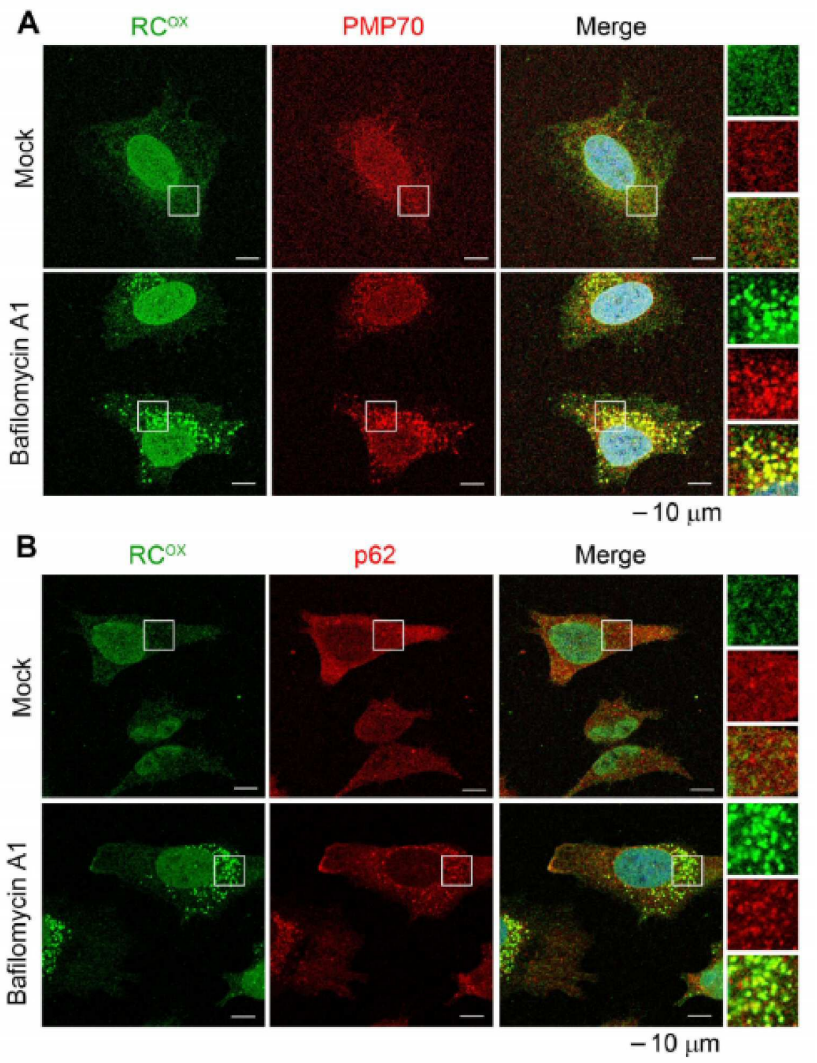
[0216] 상기 명세서가 다양한 예시적이고 실증된 실시예에 적용되는 바와 같이 본 발명의 몇 가지 새로운 특징을 도시, 설명 및 식별하였지만, 실시예는 예시의 목적 및 설명의 용이성을 위한 것임을 이해할 것이다. 본 발명의 범위 및 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 실시예의 형태 및 내용에 대한 다양한 생략, 대체 및 변경이 가능하다. 따라서, 본 발명은 설명되고 예시되고 예시된 실시예로 제한되는 것으로 고려되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의된다.

도면

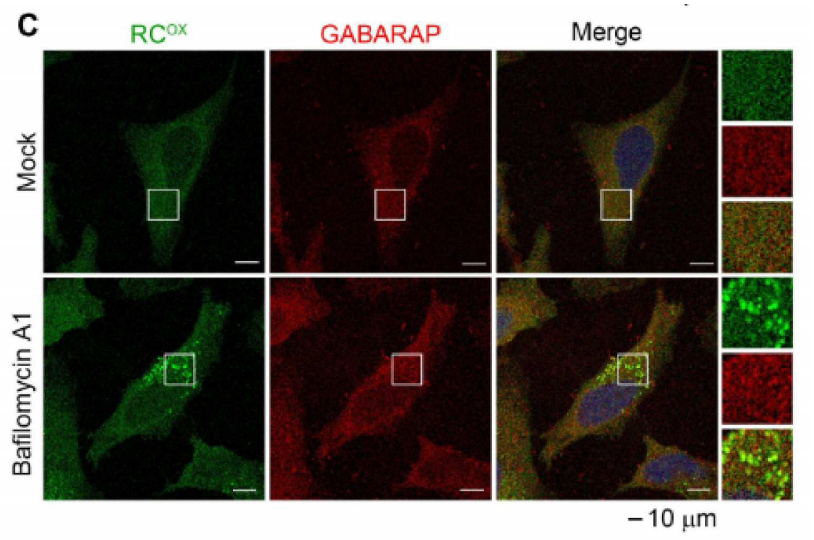
도면1


A
RC*AG RC*CG RC*DG
RC*EG RC*FG RC*GG
RC*HG RC*I G RC*KG
RC*LG RC*MG RC*NG
RC*PG RC*QG RC*RG
RC*SG RC*TG RC*VG
RC*WG RC*YG
Peptide synthesis
RC^O3XG
Immunization
IgG purification of antiserum
Purified anti-RC^O3XG antibody
B
Dot blot analysis using anti-RC^O3 antibody
1 2 3 4 5
A
B
C
D
G A V L M
I S T C P
D Q F Y W
K H R E N
RC^O3XG peptide
C
Sodium nitroprusside (SNP)
0 h
6 h
18 h
24 h
RC^ox
— 10 μm
D
MOCK
Bafilomycin A1
NAC
Baf.A1/NAC
RC^ox
— 10 μm
E
MOCK
Bafilomycin A1
Tannic acid
Baf.A1/Tannic
RC^ox
— 10 μm
F
Bafilomycin A1
0 h
6 h
18 h
24 h
RC^ox
— 10 μm

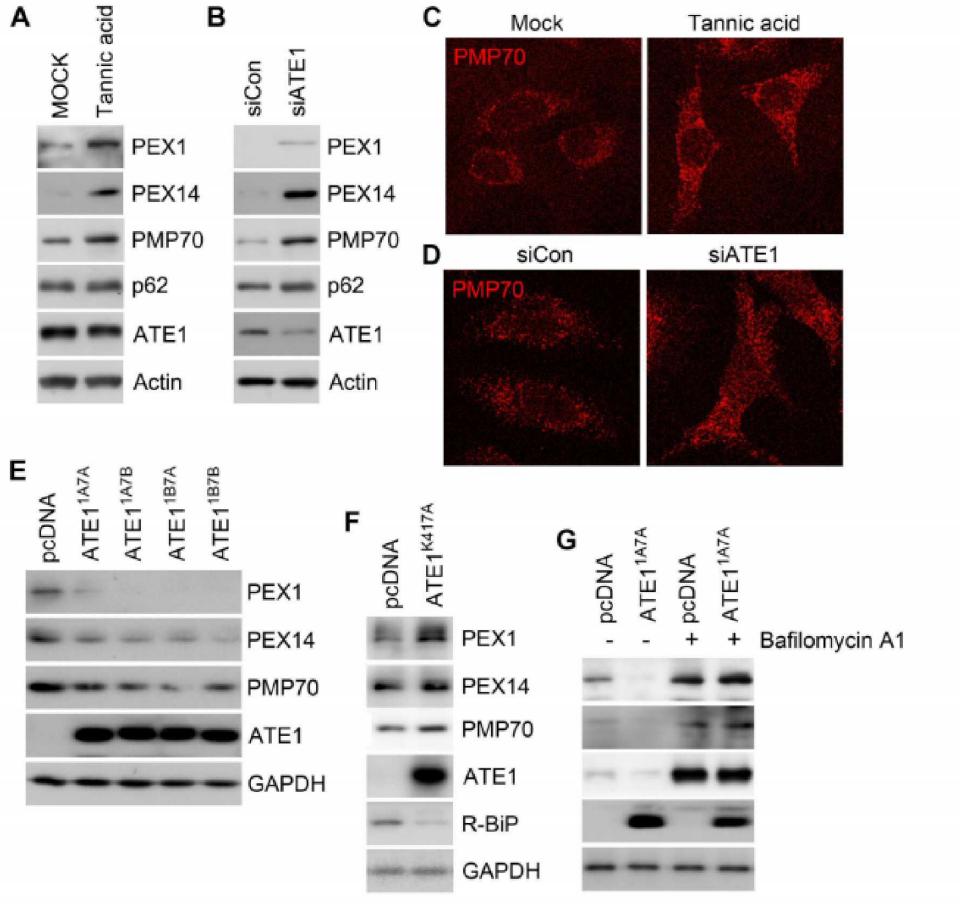
도면2a


A
RCox
PMP70
Merge
Mock
Bafilomycin A1
10 μm
B
RCox
p62
Merge
Mock
Bafilomycin A1
10 μm

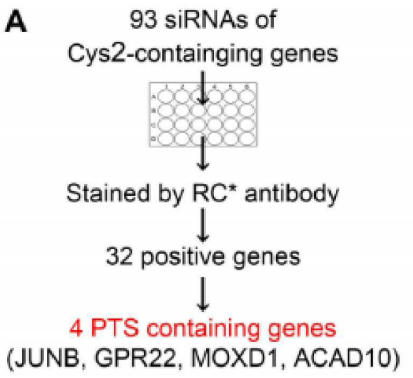
도면2b


C
RCox
GABARAP
Merge
Mock
Bafilomycin A1
10 μm

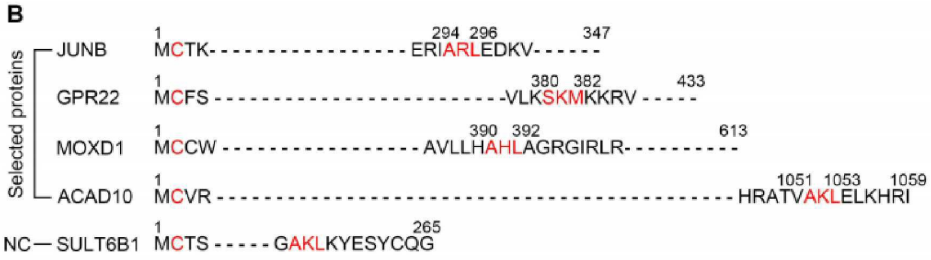
도면3



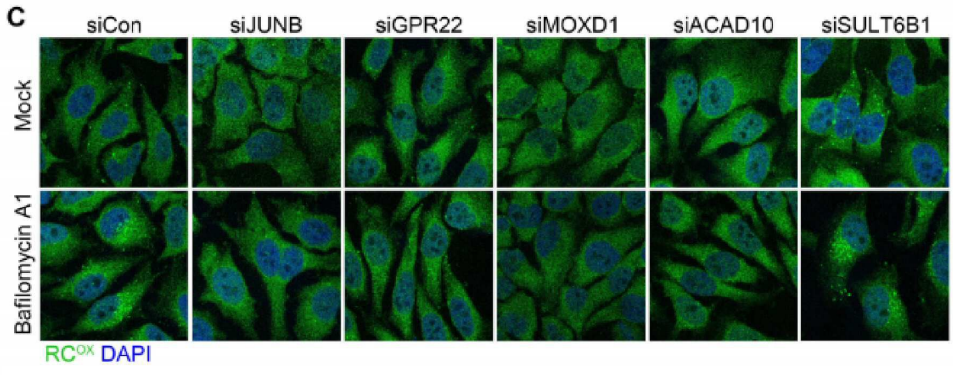
도면4a



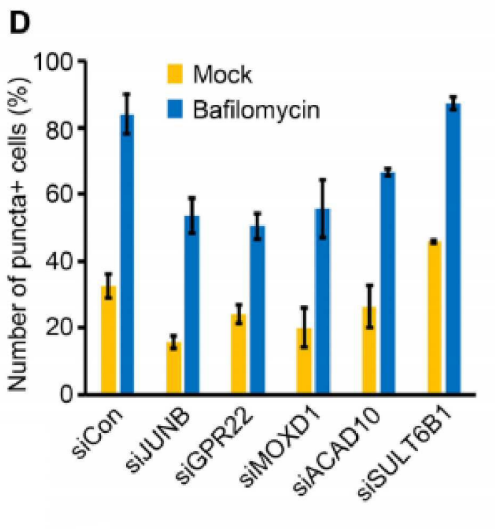
도면4b



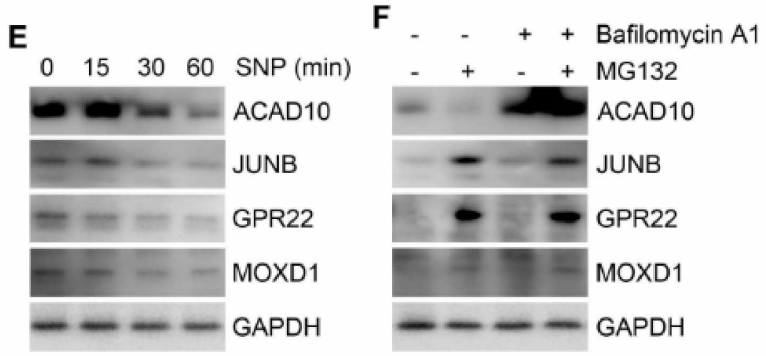
도면4c



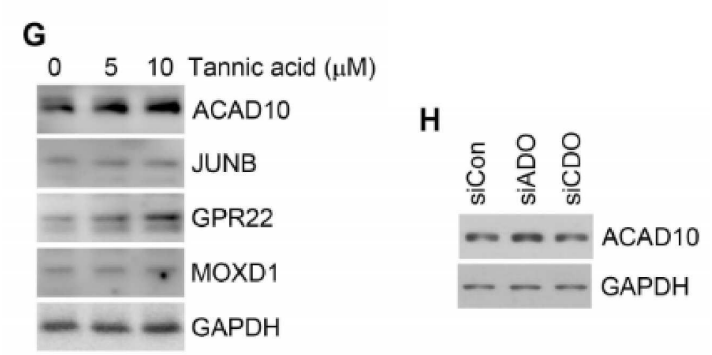
도면4d



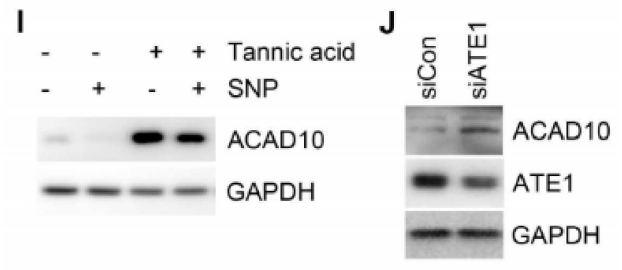
도면4e



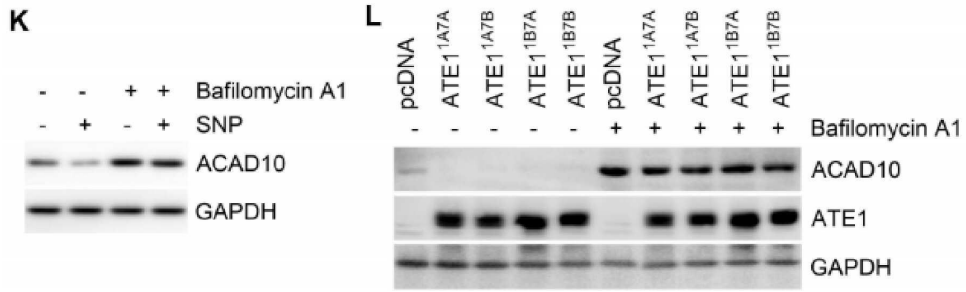
도면4f



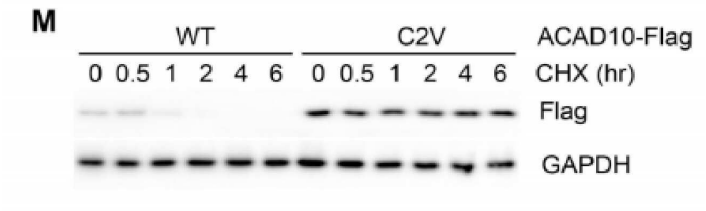
도면4g



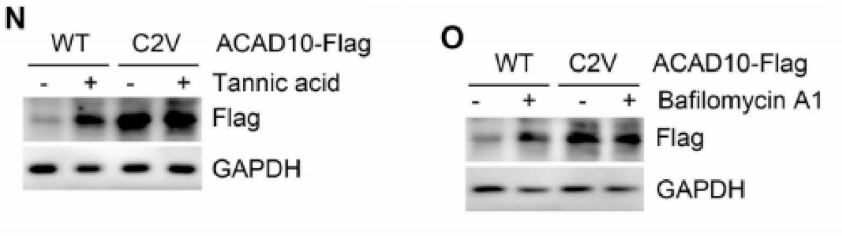
도면4h



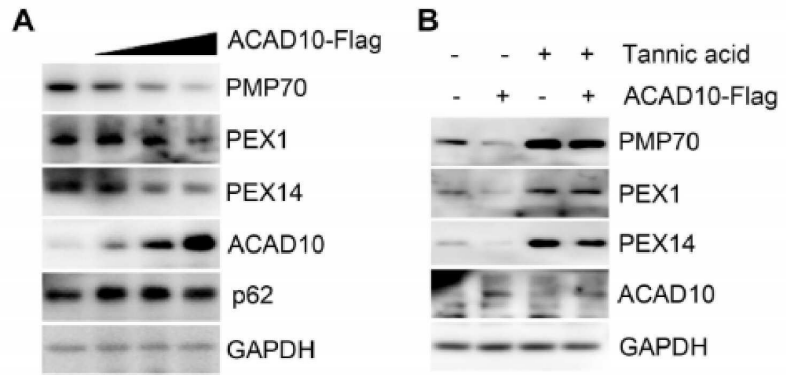
도면4i



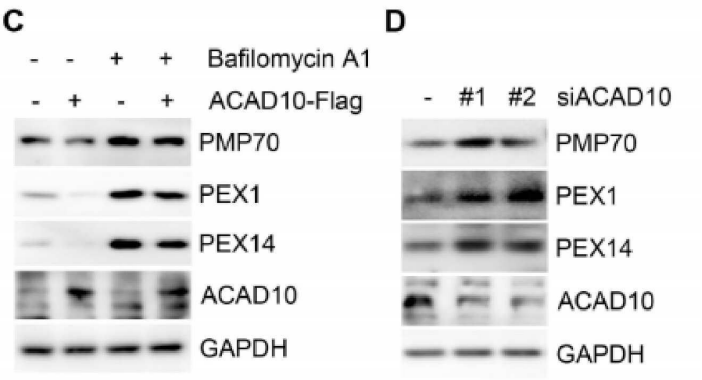
도면4j



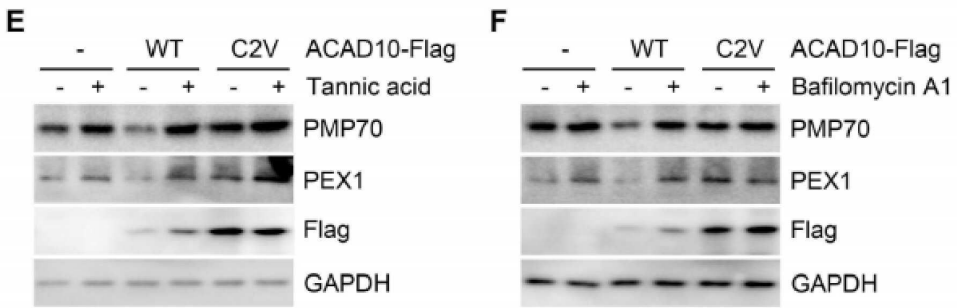
도면5a



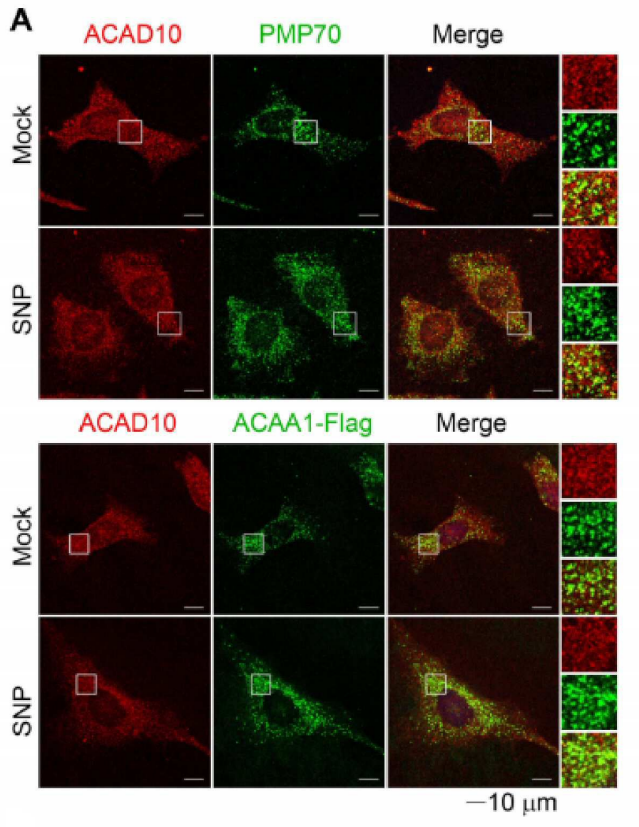
도면5b



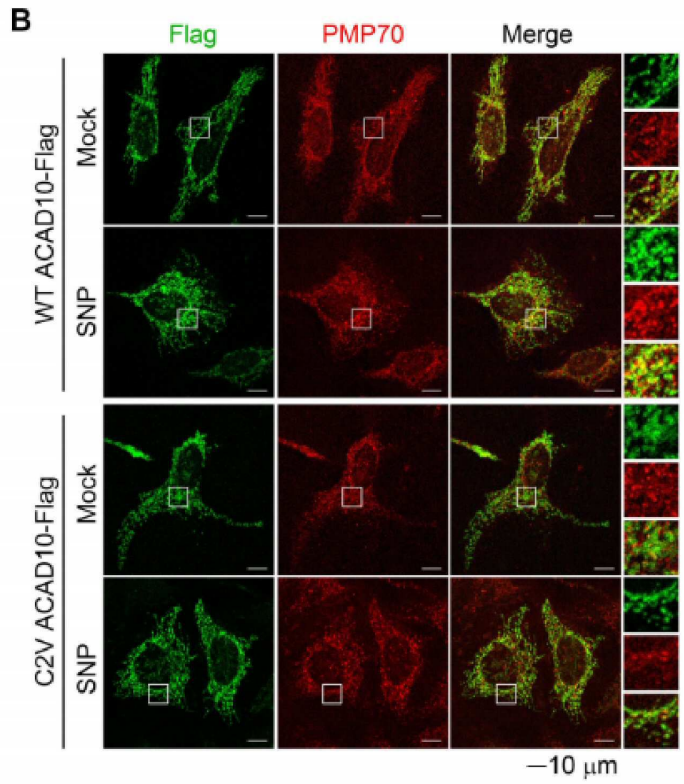
도면5c



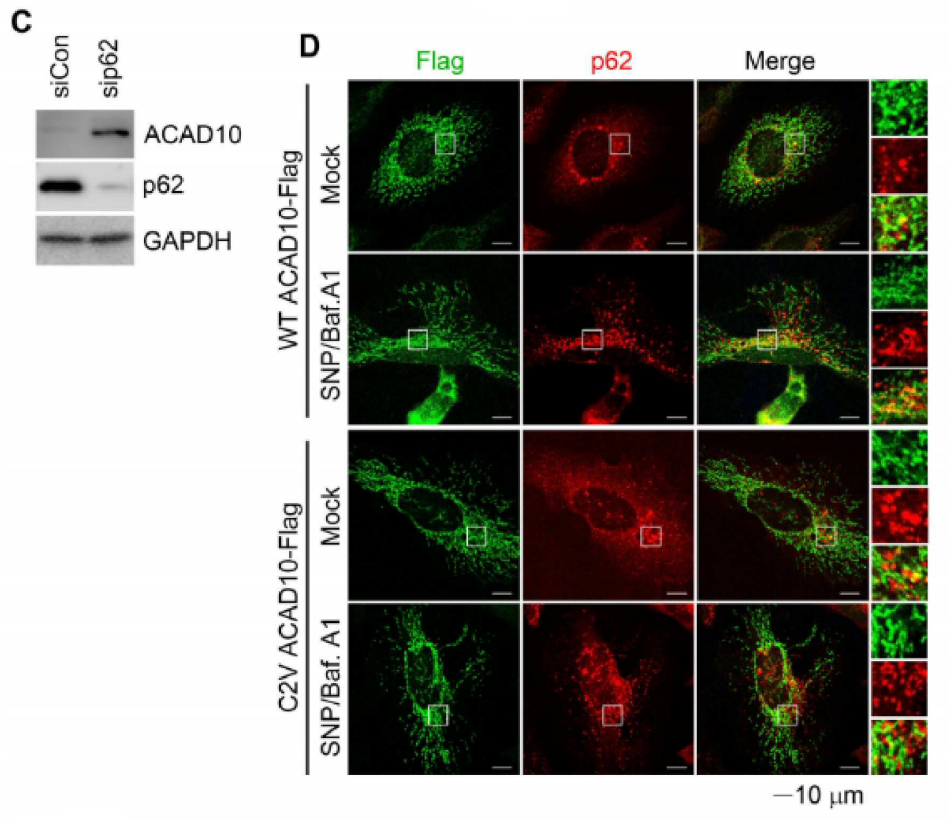
도면6a


A
ACAD10
PMP70
Merge
Mock
SNP
ACAD10
ACAA1-Flag
Merge
Mock
SNP
—10 μm

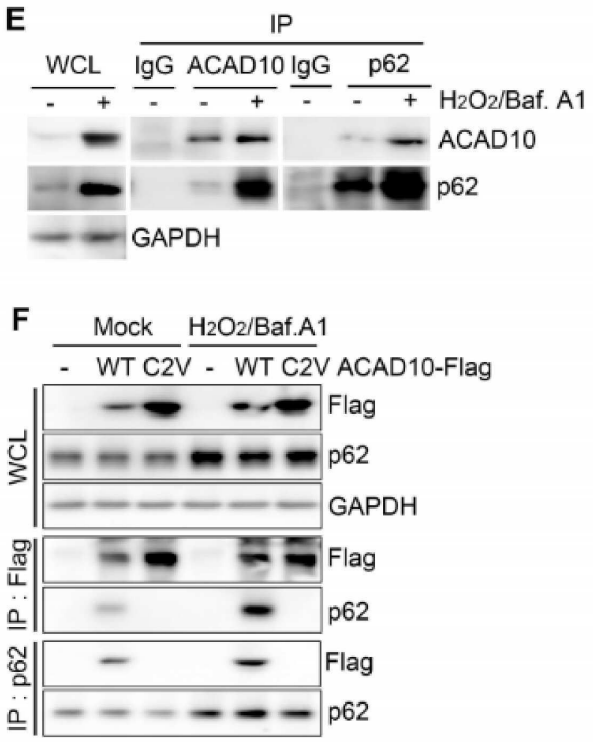
도면6b


B
Flag
PMP70
Merge
WT ACAD10-Flag
Mock
SNP
C2V ACAD10-Flag
Mock
SNP
—10 μm

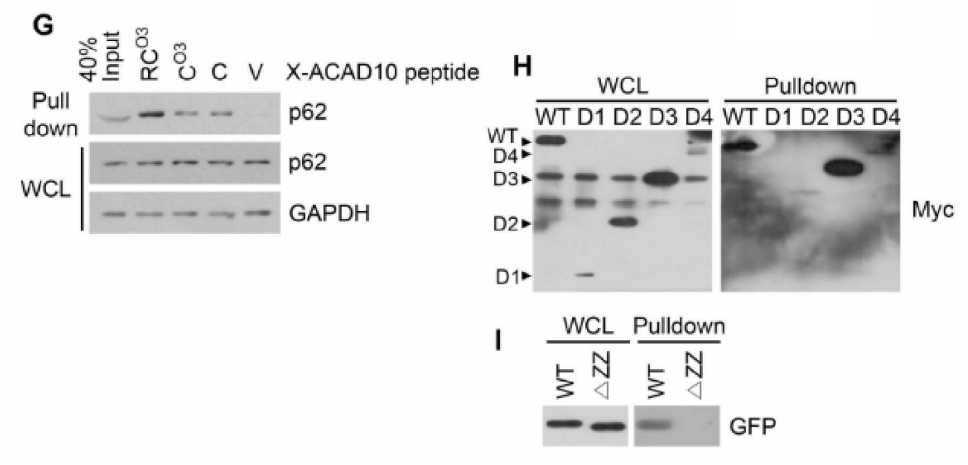
도면6c


C
siCon
sip62
ACAD10
p62
GAPDH
D
Flag
p62
Merge
WT ACAD10-Flag
Mock
SNP/Baf.A1
C2V ACAD10-Flag
Mock
SNP/Baf. A1
10 μm

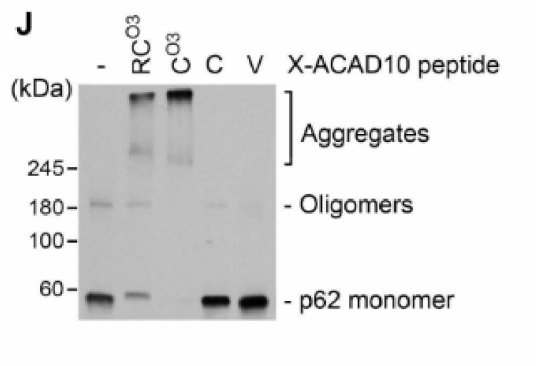
도면6d


E
IP
WCL
IgG
ACAD10
IgG
p62
- + - - + - - +
H2O2/Baf. A1
ACAD10
p62
GAPDH
F
Mock
H2O2/Baf.A1
- WT C2V - WT C2V ACAD10-Flag
WCL
Flag
p62
GAPDH
IP : Flag
Flag
p62
IP : p62
Flag
p62

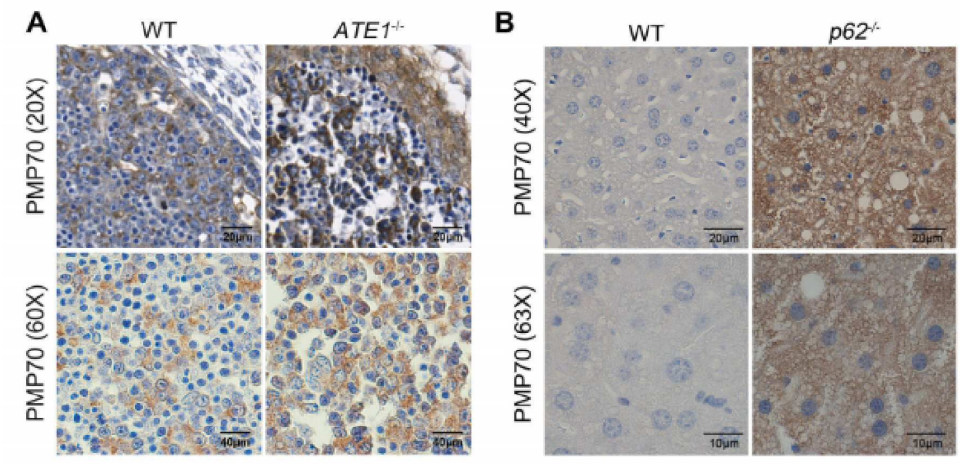
도면6e



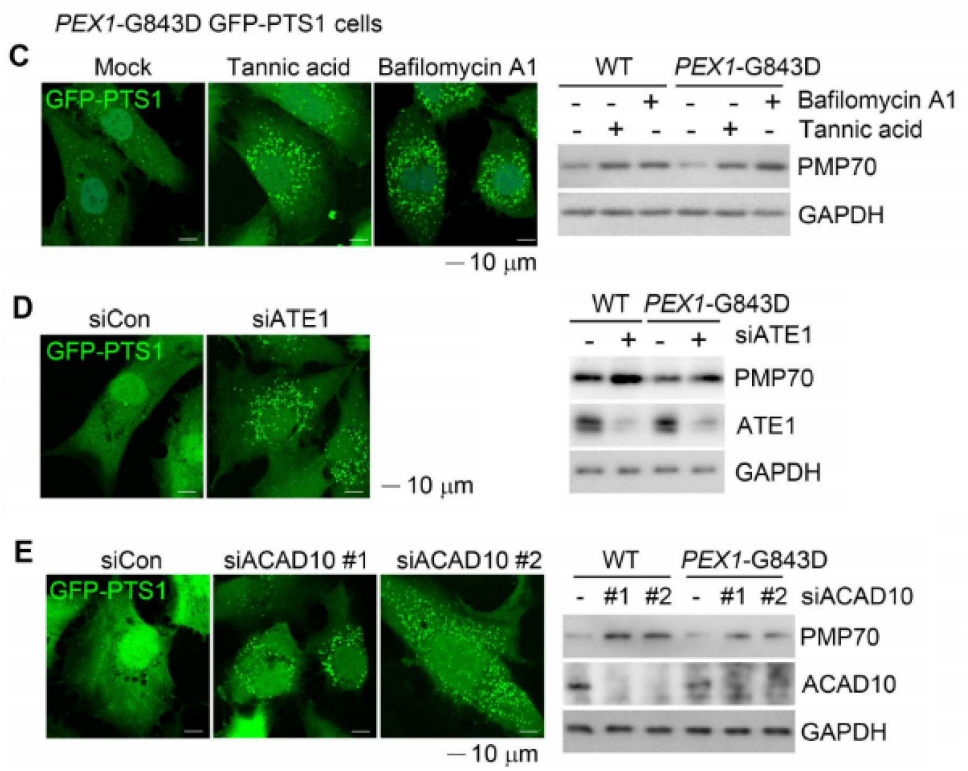
도면6f



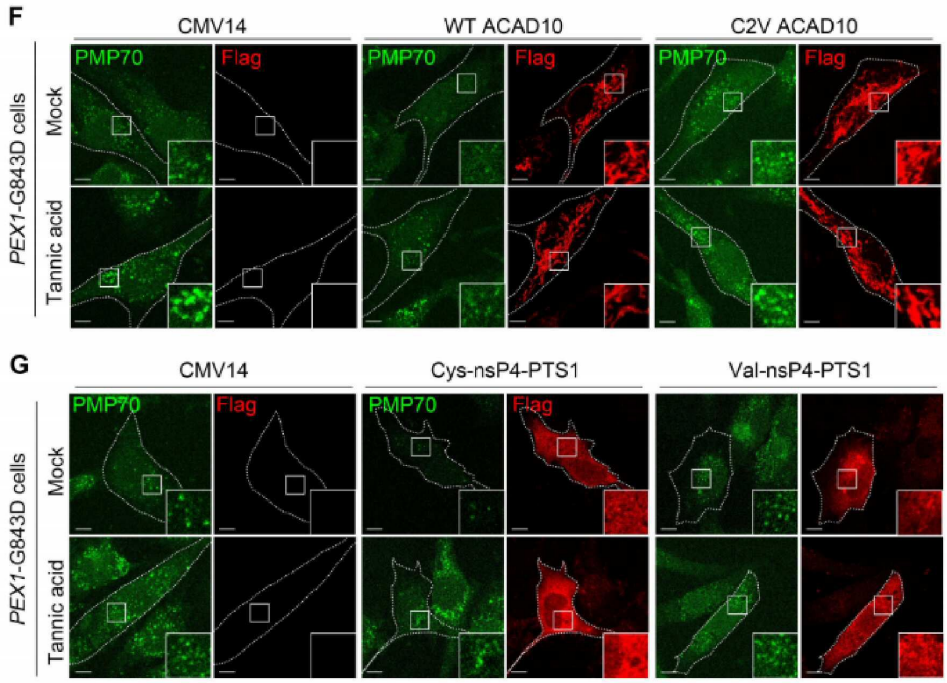
도면7a



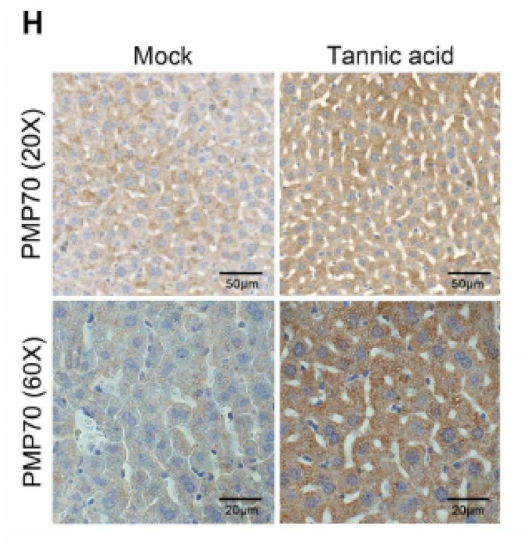
도면7b


PEX1-G843D GFP-PTS1 cells
C
Mock
Tannic acid
Bafilomycin A1
GFP-PTS1
10 μm
WT
PEX1-G843D
Bafilomycin A1
Tannic acid
PMP70
GAPDH
D
siCon
siATE1
GFP-PTS1
10 μm
WT
PEX1-G843D
siATE1
PMP70
ATE1
GAPDH
E
siCon
siACAD10 #1
siACAD10 #2
GFP-PTS1
10 μm
WT
PEX1-G843D
siACAD10
PMP70
ACAD10
GAPDH

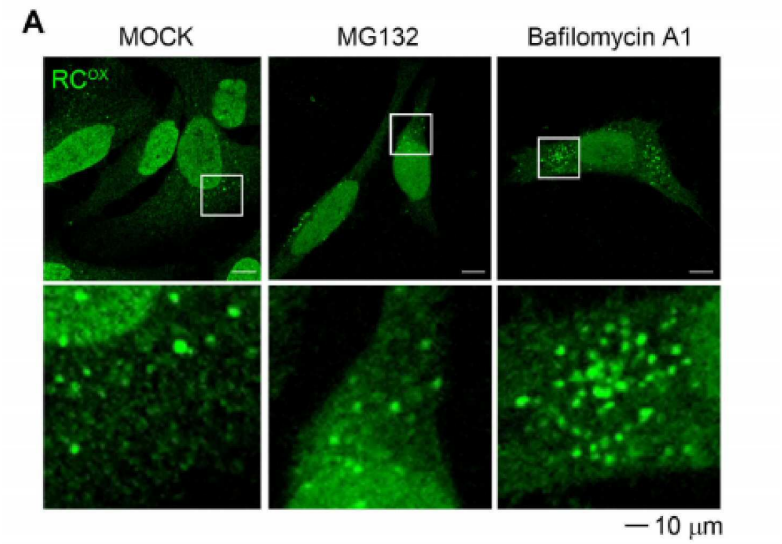
도면7c


F
CMV14
WT ACAD10
C2V ACAD10
PEX1-G843D cells
Mock
Tannic acid
PMP70
Flag
G
CMV14
Cys-nsP4-PTS1
Val-nsP4-PTS1
PEX1-G843D cells
Mock
Tannic acid
PMP70
Flag

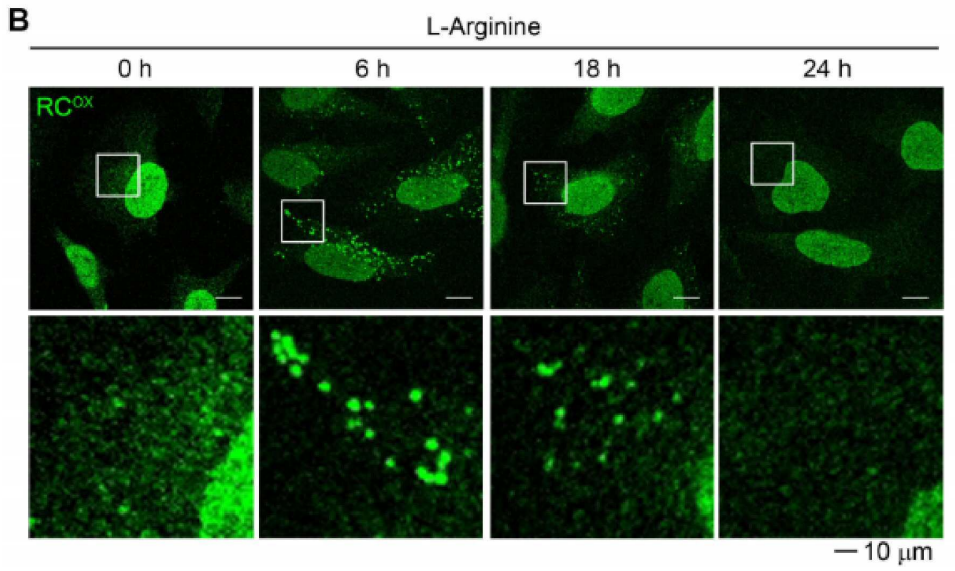
도면7d


H
Mock
Tannic acid
PMP70 (20X)
PMP70 (60X)
50μm
50μm
20μm
20μm

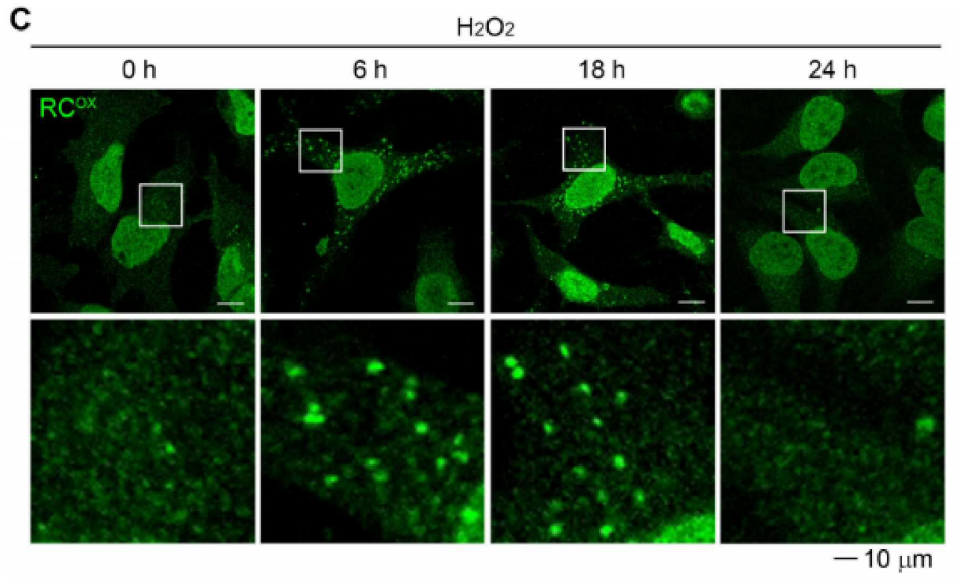
도면8a


A
MOCK
MG132
Bafilomycin A1
RCox
10 μm

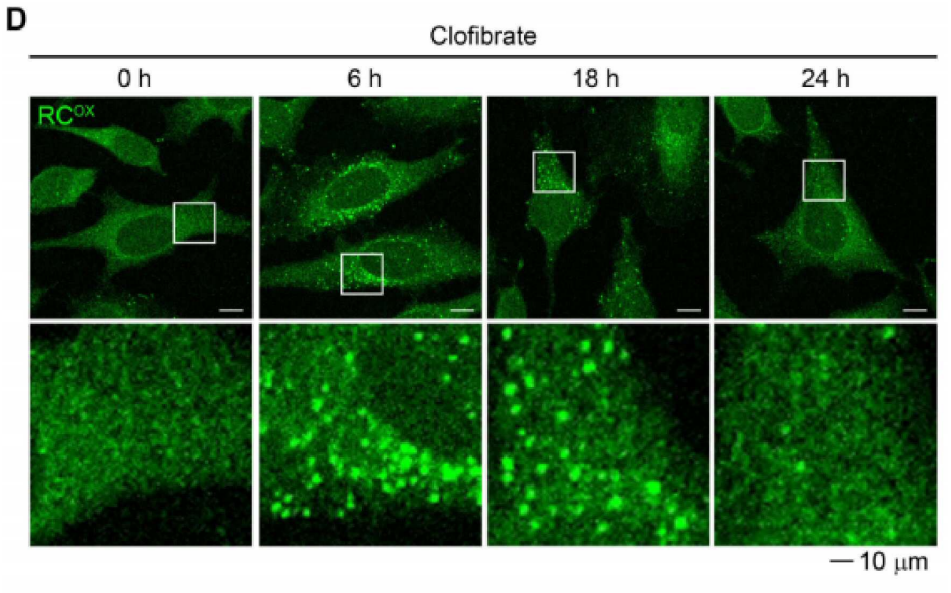
도면8b


B
L-Arginine
0 h
6 h
18 h
24 h
RCox
10 μm

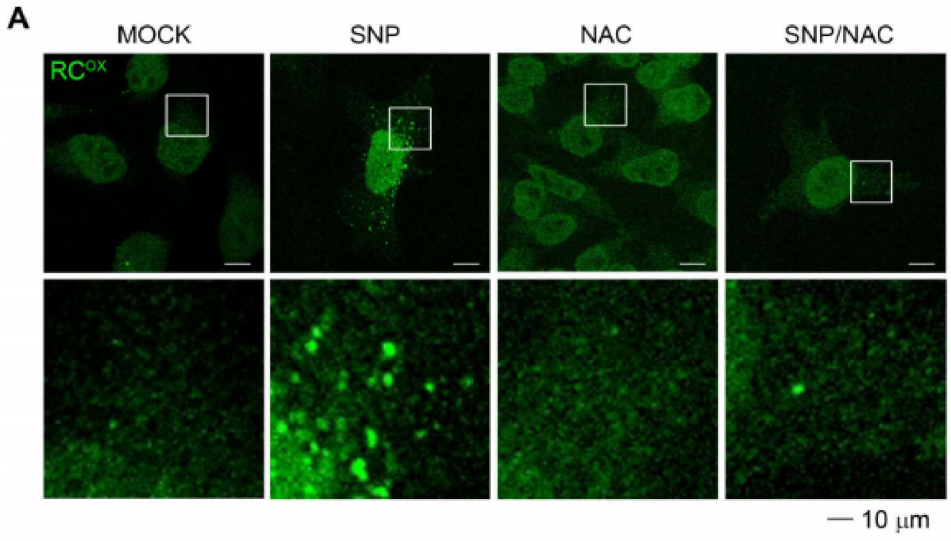
도면8c


C
H2O2
0 h
6 h
18 h
24 h
RCox
10 μm

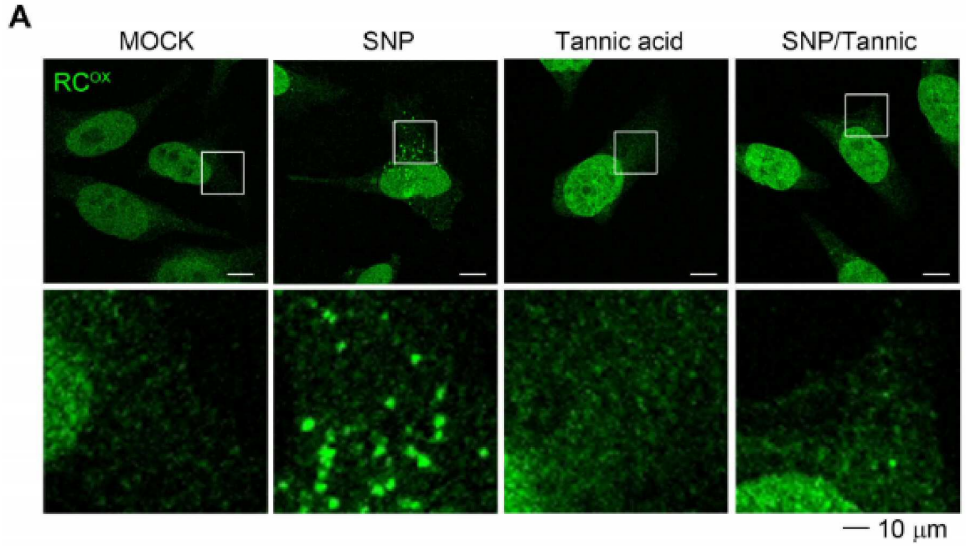
도면8d


D
Clofibrate
0 h
6 h
18 h
24 h
RCox
10 μm

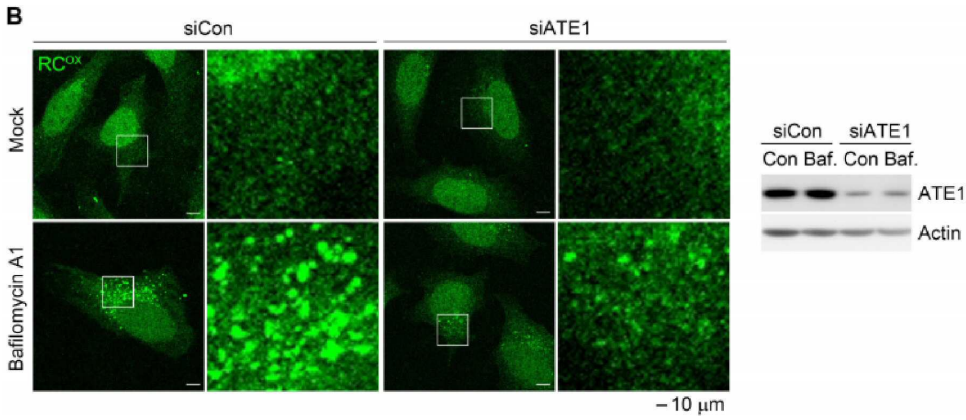
도면9


A
MOCK
SNP
NAC
SNP/NAC
RCox
10 μm

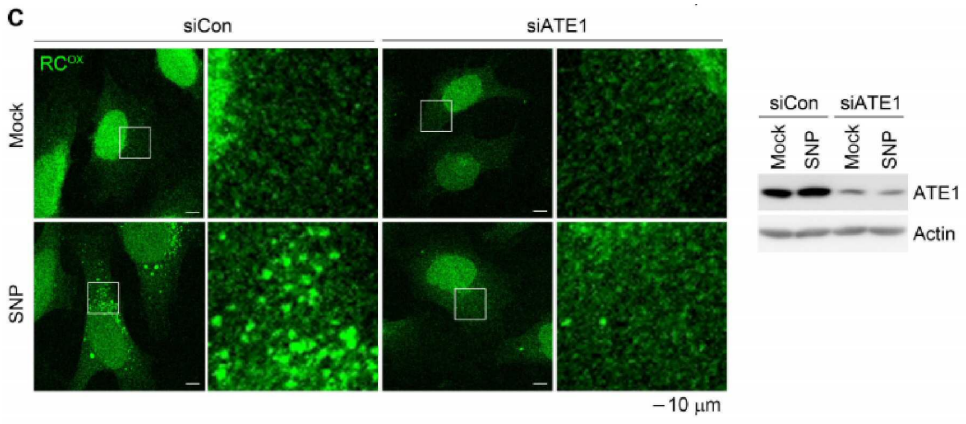
도면10a



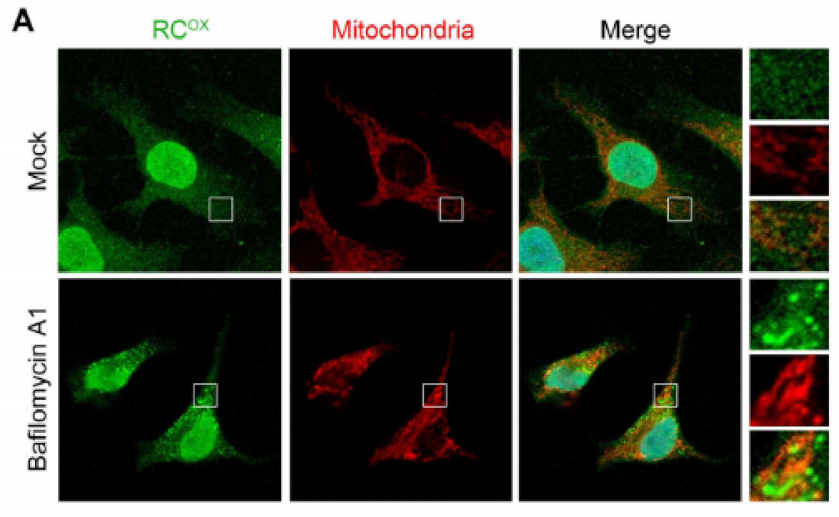
도면10b



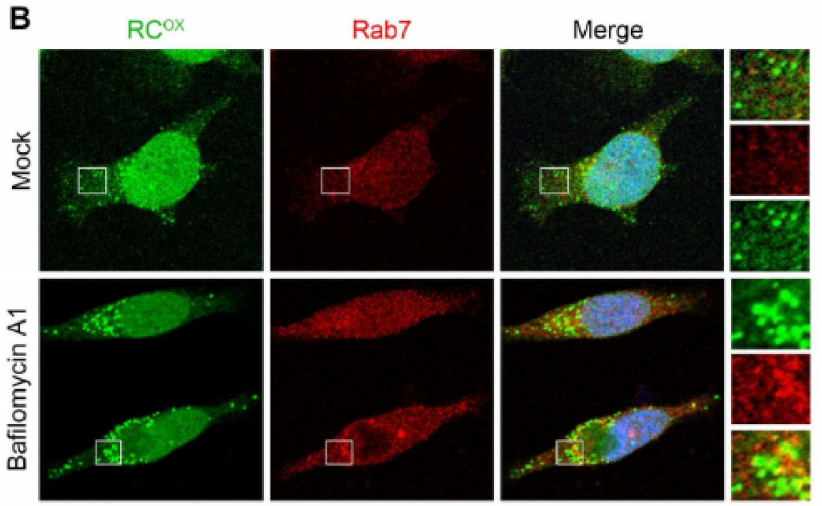
도면10c



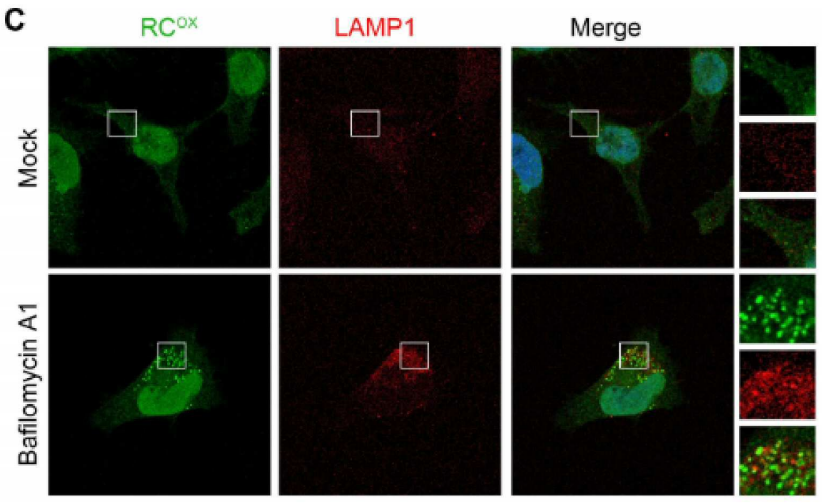
도면11a



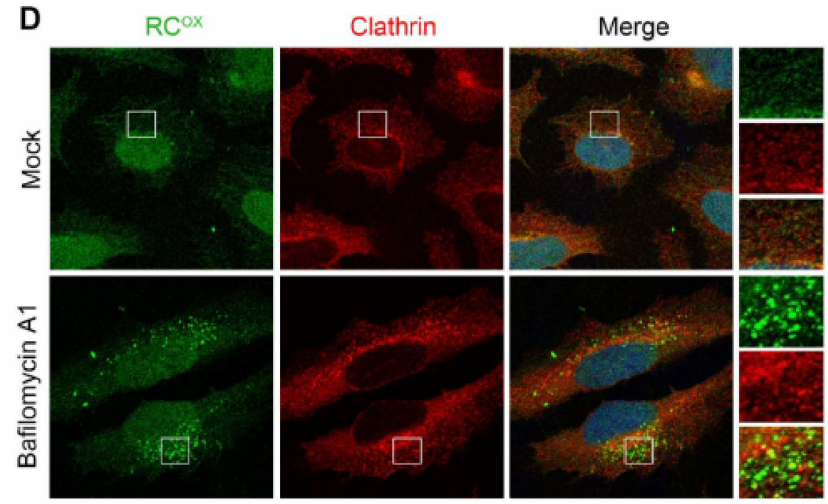
도면11b



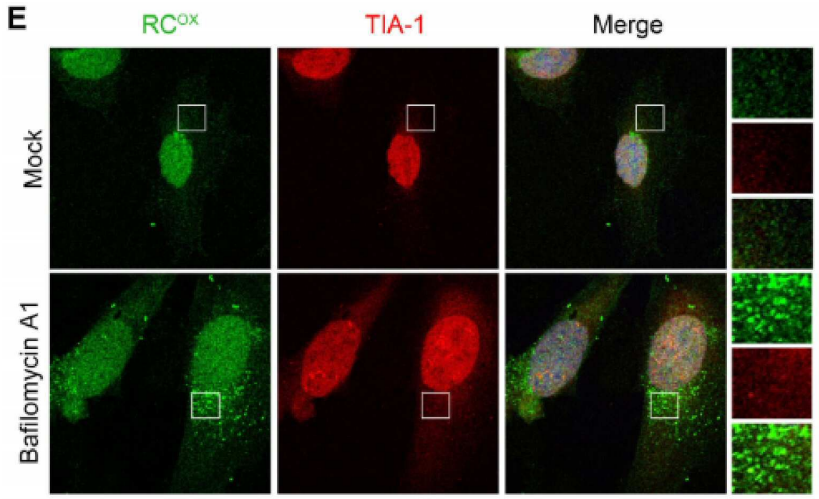
도면11c



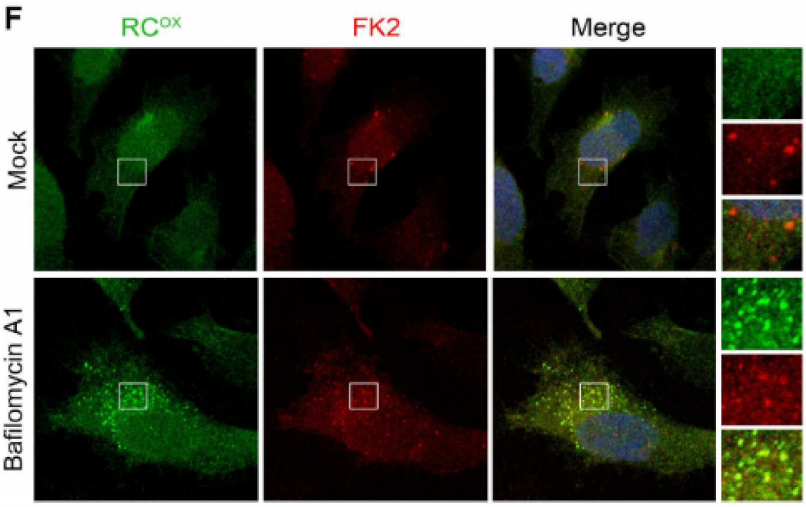
도면11d



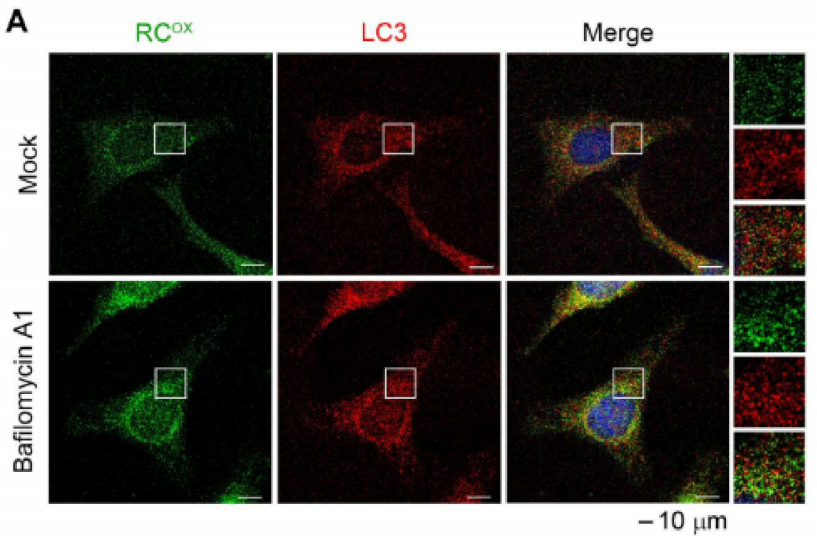
도면11e



도면11f



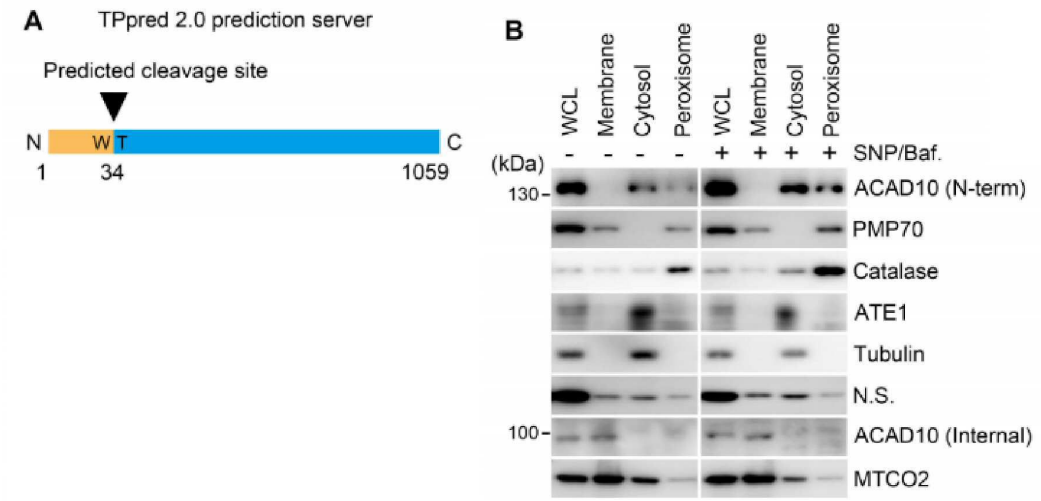
도면12



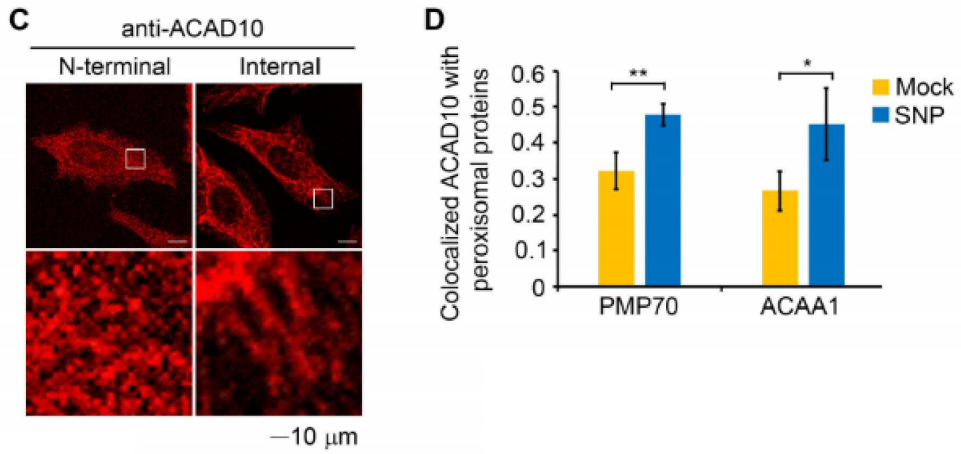
도면13



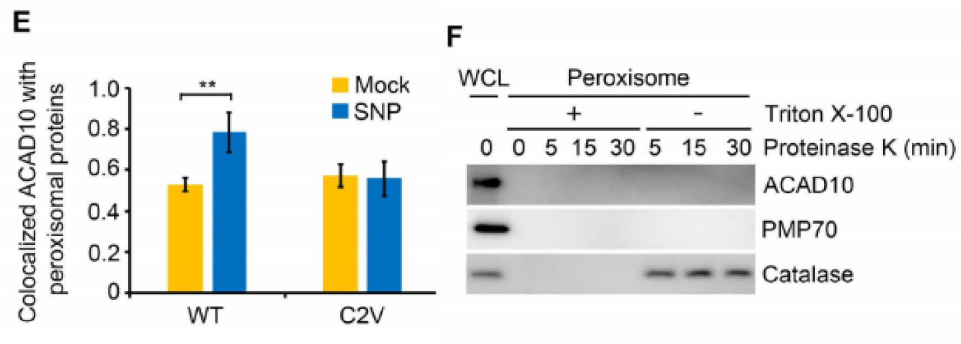
도면14a



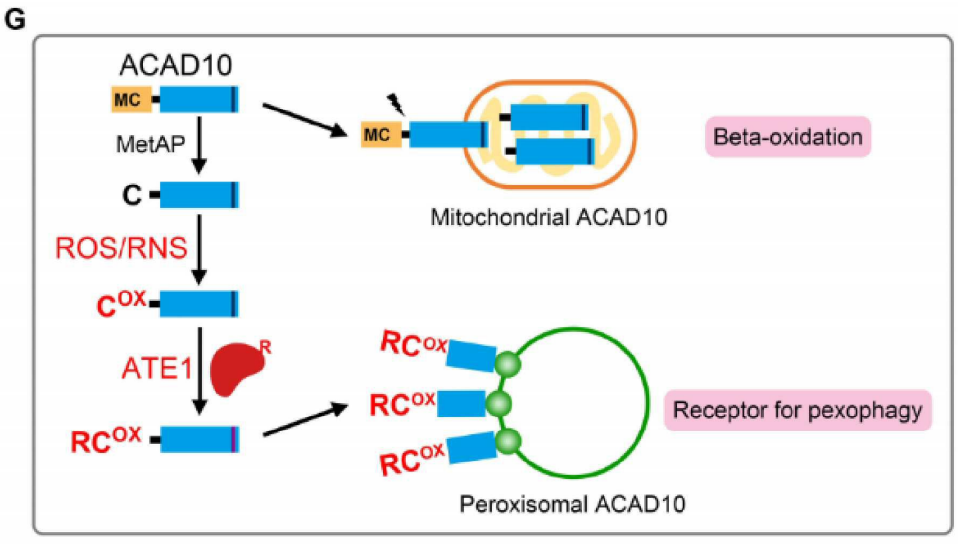
도면14b



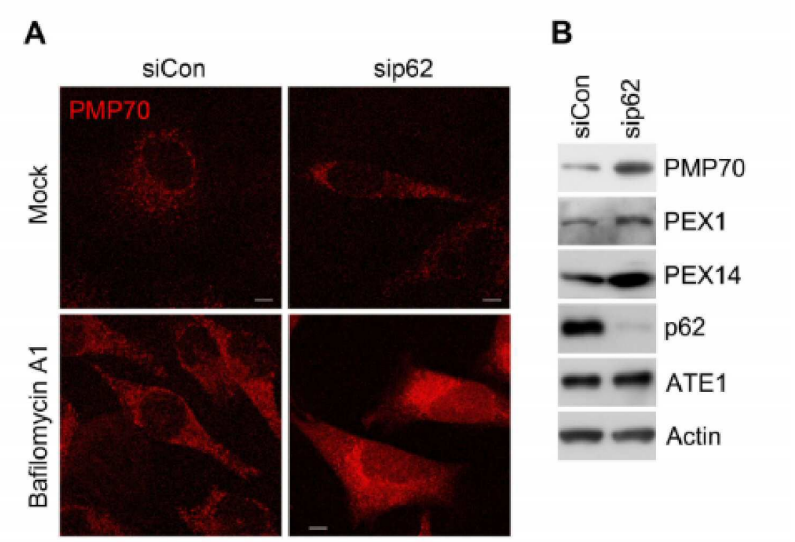
도면14c



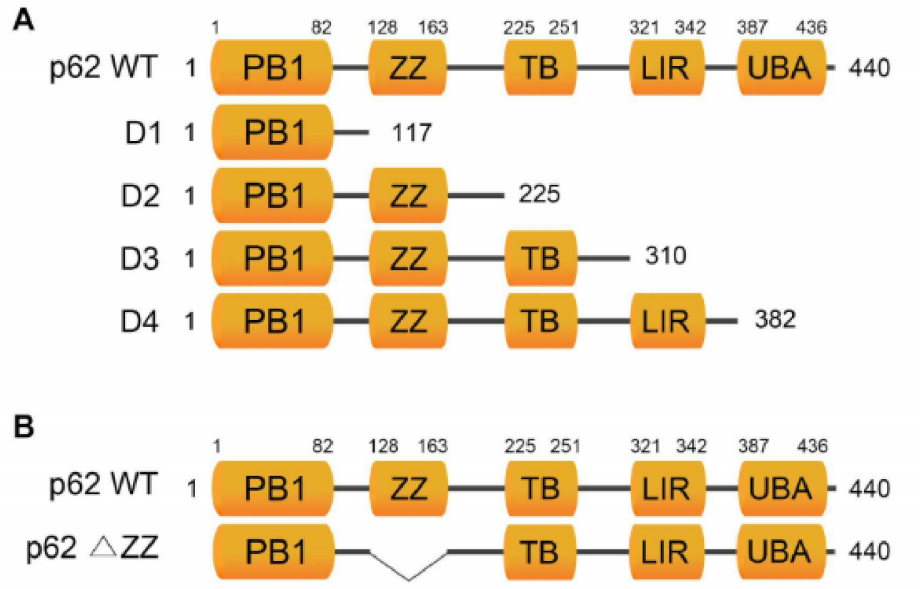
도면14d



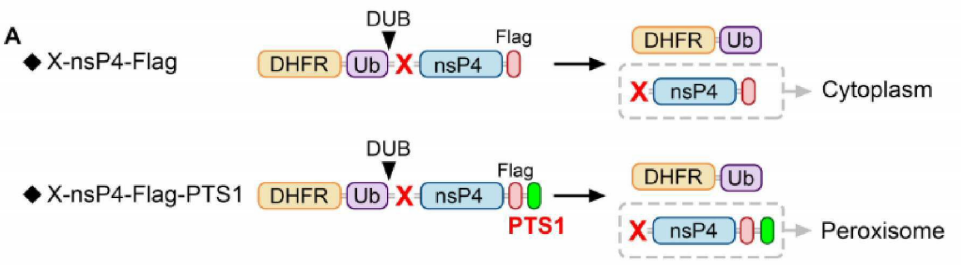
도면15



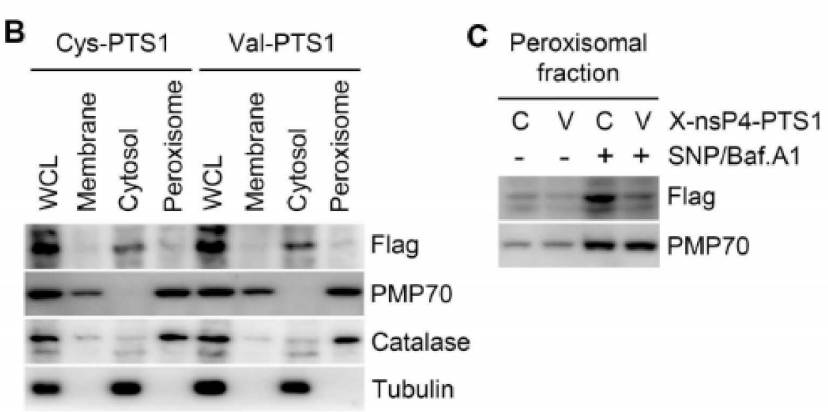
도면16



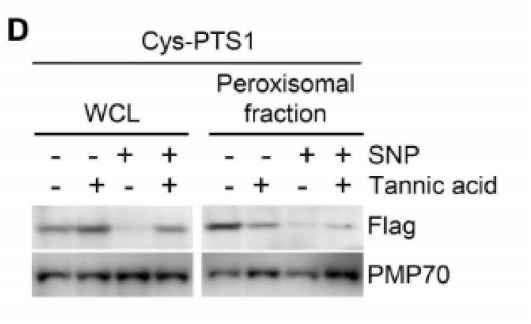
도면17a



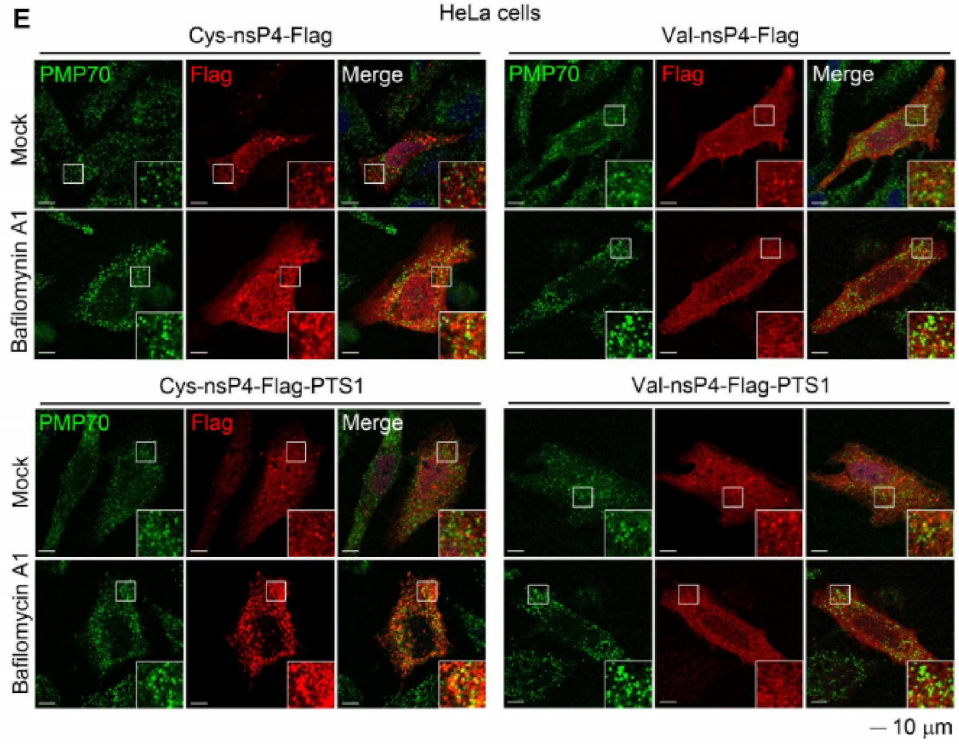
도면17b



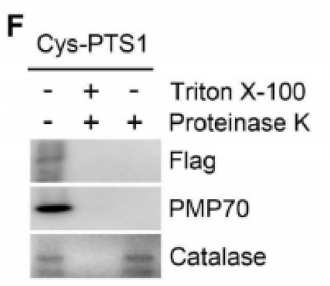
도면17c



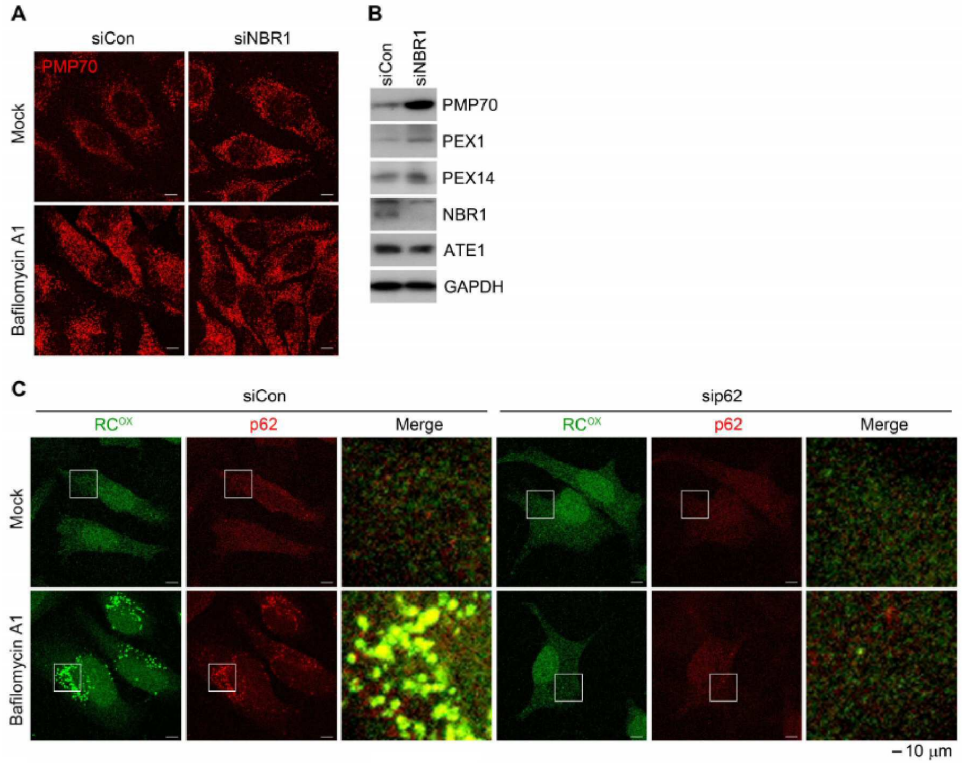
도면17d



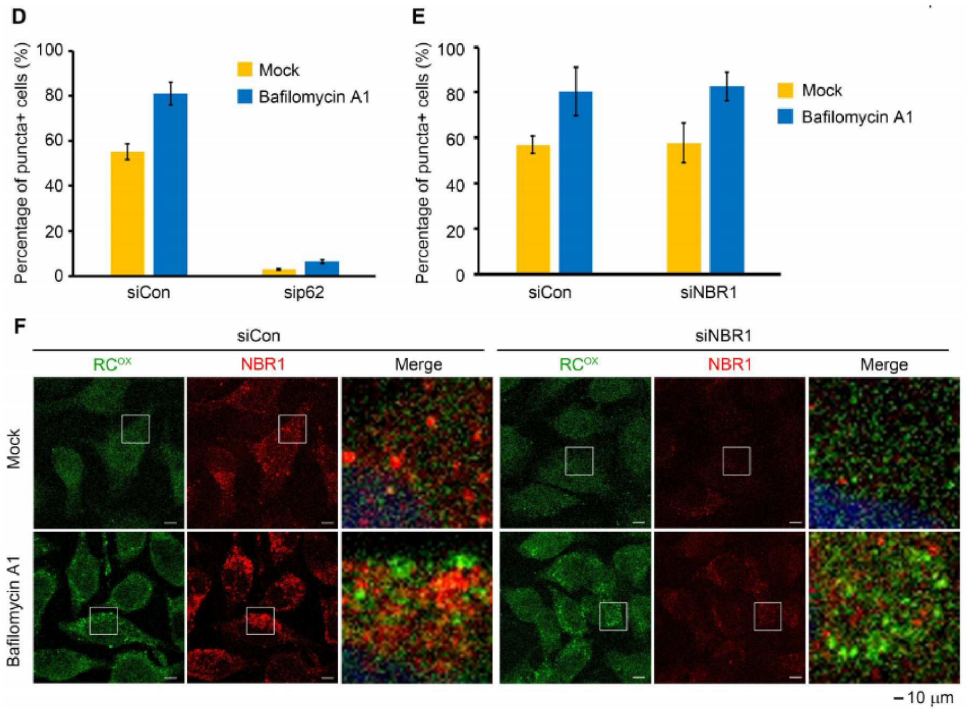
도면17e


F
Cys-PTS1
- + - Triton X-100
- + + Proteinase K
Flag
PMP70
Catalase

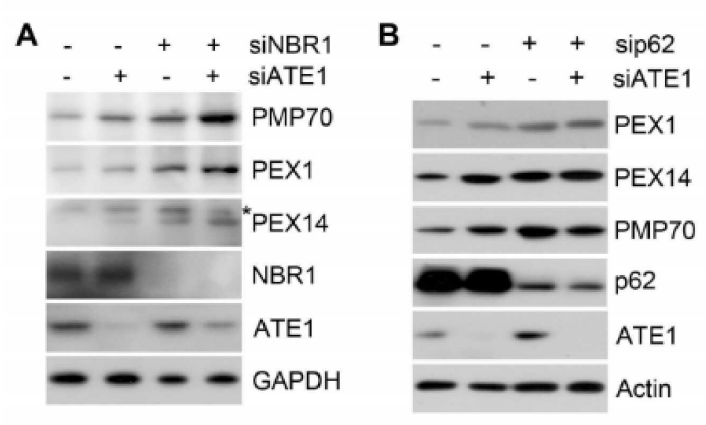
도면18a


A
siCon
siNBR1
PMP70
Mock
Bafilomycin A1
B
siCon
siNBR1
PMP70
PEX1
PEX14
NBR1
ATE1
GAPDH
C
siCon
sip62
RCox
p62
Merge
Mock
Bafilomycin A1
10 μm

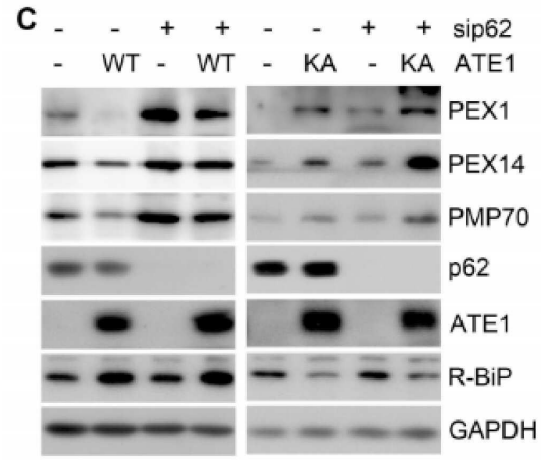
도면18b



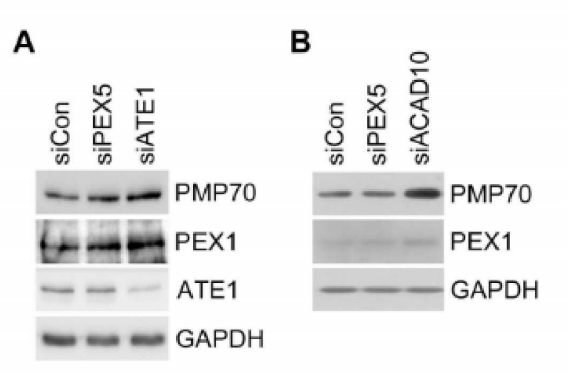
도면19a



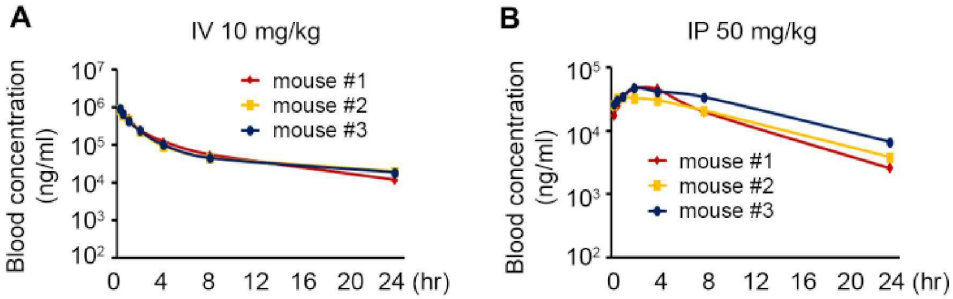
도면19b



도면20



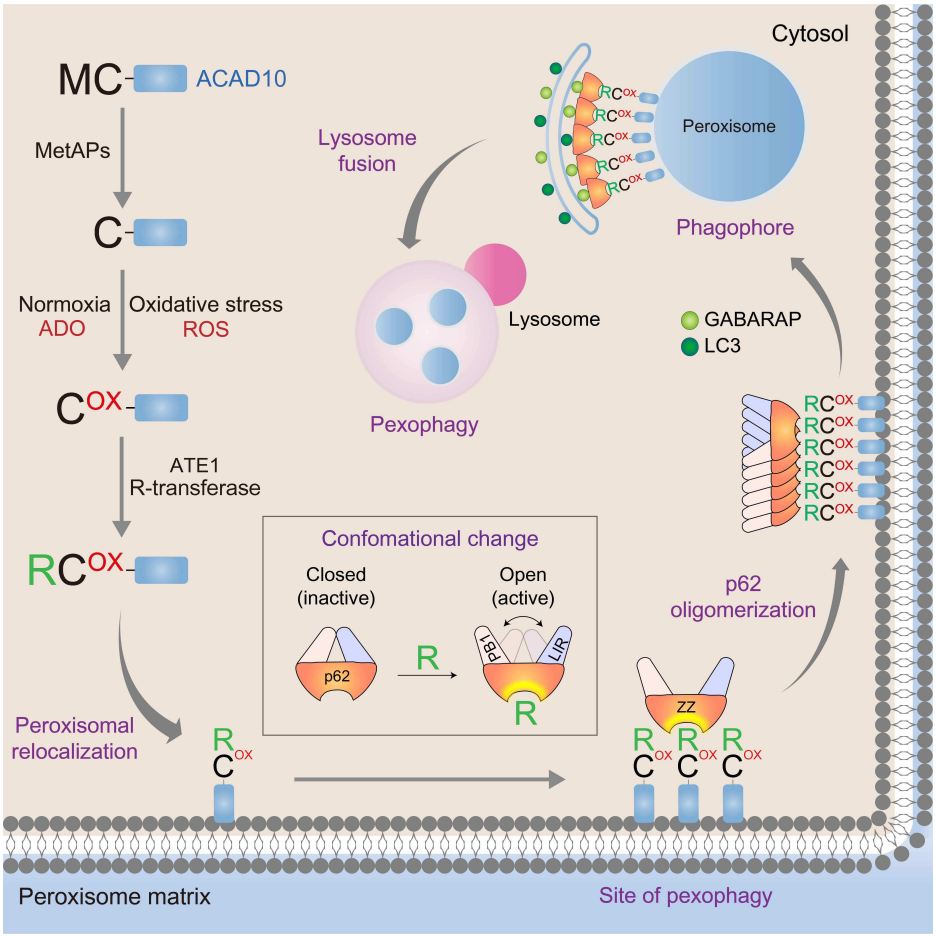
도면21



C Summary of pK data of tannic acid

Injection route	Dose (mpk)	Cmax		AUC(0-t)		Tmax (hr)
		ng/ml	μM	h*ng/ml	μM	
IV	10	875,032	514	2,275,373	1338	0.25
IP	50	43,236	25	510,997	300	1.67

도면22


Cytosol
MC-
ACAD10
MetAPs
C-
Normoxia
ADO
Oxidative stress
ROS
COX-
ATE1
R-transferase
RCOX-
Lysosome fusion
Peroxisome
Phagophore
Lysosome
Pexophagy
GABARAP
LC3
Confomational change
Closed
(inactive)
Open
(active)
p62
R
PB1
LIR
p62
oligomerization
ZZ
Peroxisomal
relocalization
Peroxisome matrix
Site of pexophagy