



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0092086
(43) 공개일자 2010년08월20일

(51) Int. Cl.

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

A61P 25/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0011273

(22) 출원일자 2009년02월12일

심사청구일자 2009년02월12일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

송민호

대전 중구 문화1동 센트럴파크 306-1202

김성중

대전 중구 문화동 상아아파트 5-101

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 미토콘드리아 기능이상을 동반하는 질환의 예방/치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환의 예방/치료용 조성물에 관한 것으로 더욱 자세하게는 CRIF1 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 DNA 또는 상기 단백질의 mRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환의 예방/치료용 조성물.

본 발명에 의해 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환인 퇴행성 신경질환, 퇴행성 근육질환, 암, 당뇨병, 대사 증후군의 예방이 가능하게 된다.

또한 본 발명에 의하여, 종래 단순한 대증요법에 의한 치료수단만 가능하던 상기 질환들에 대해 근본적인 치료가 가능하게 된다.

또한 본 발명에 의하여, 미토콘드리아와 핵 사이의 신호전달을 수행하는 매개체에 대한 연구가 활성화될 수 있다.

대 표 도 - 도3c



(72) 발명자

박기철

대전 유성구 신성동 대림두레아파트 105-1002

유민정

대구 서구 비산4동 171-46 드림빌라 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10753020001-07N5302-00110

부처명 한국과학재단

연구사업명 바이오기술개발사업-미토콘드리아 대사기능 및 질환조절 연구사업

연구과제명 대사신호 및 핵전사회로에 의한 미토콘드리아의 가소성 조절

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2007.10.01~2009.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

CRIF1 단백질을, 상기 단백질을 암호화하는 DNA 또는 상기 단백질의 mRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환의 예방/치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 질환은 퇴행성 신경질환 또는 퇴행성 근육질환인 것을 특징으로 하는 예방/치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 질환은 암인 것을 특징으로 하는 예방/치료용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 질환은 당뇨병인 것을 특징으로 하는 예방/치료용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 질환은 대사증후군인 것을 특징으로 하는 예방/치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환의 예방/치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아는 지속적인 융합과 분열을 반복하며 세포질에 그물망 형태로 존재하면서, 세포 호흡을 통하여 세포의 생존에 필요한 에너지를 생산하는 세포내 소기관이다. 미토콘드리아는 세포내 에너지 대사의 중추이므로 미토콘드리아의 기능 이상은 다양한 질병을 유발한다. 미토콘드리아의 기능 이상에 의해 발생하는 질병으로는 파킨슨병, 헌팅턴병과 같이 노화에 따라 흔하게 발생 할 수 있는 발병률이 높은 질병이 있고, Barth syndrome, Leigh syndrome, MELAS syndrome과 같은 발병률이 낮은 희귀 질병 등이 있다. 또한 최근의 연구결과에 따르면 미토콘드리아의 이상은 대사성증후군인 제2형 당뇨의 발병원인일 가능성이 있음이 확인되었다.

[0003] 미토콘드리아의 기능 이상에 의해 발생하는 이러한 질환들은 세포의 에너지공급 체계에 이상이 발생하는 것으로 대부분 근 질환과 뇌질환을 동반한다.

[0004] CRIF1 단백질에 의한 미토콘드리아의 기능 조절 기작 연구는 CRIF1을 표적으로 하여 미토콘드리아의 기능을 조

절 할 수 있는 신약개발에의 원천 기술을 제공 할 수 있다. 나아가 상기 질병들, 특히 노령계층에서 쉽게 발병 할 수 있는 파킨슨병이나 유년기에 발병할 수 있는 Leigh syndrome과 같은 질병을 조기에 진단 그리고 치료할 수 있는 새로운 치료제를 개발할 수 있게 된다. 따라서 미토콘드리아의 기능과 안정성 조절에 관한 연구는 미토콘드리아의 기능이상에 의한 질병의 예방과 치료에 매우 중요하다.

[0005] 미토콘드리아를 구성하고 있는 단백질은 약 1500종이며 미토콘드리아는 세포내 다른 소기관들과 달리 자신의 고유한 유전정보를 가지고 있다. 즉, 핵에 존재하며 세포의 모든 유전정보를 담고 있는 게놈 DNA (genomic DNA) 이외에 미토콘드리아는 메트릭스에 자신의 고유한 유전정보를 미토콘드리아 DNA (mtDNA) 형태로 가지고 있다. mtDNA의 크기는 약 1600kbp이며 그 안에 미토콘드리아 호흡 복합체를 구성하는 13종의 단백질을 암호화 하고 있다. 따라서 미토콘드리아 호흡 복합체는 genomic DNA와 mtDNA의 두 유전물질로부터 만들어진 단백질들에 의해 구성되어지므로 다른 세포소기관보다 복잡한 조절기작에 의해 그 형성과정이 조절된다.

[0006] 따라서 미토콘드리아와 핵 사이의 신호전달이 미토콘드리아의 형성과 기능 조절에 매우 중요한 역할을 할 것으로 보이며 그 매개체 역할을 할 수 있는 단백질에 대한 연구가 요청된다.

[0007] 한편, CR6 Interacting Factor 1(CRIF 1) 단백질은 CR6(Gadd45gamma) 단백질과 결합하는 단백질이다. CRIF1 유전자는 암화 과정에서 발현이 증가하는 특성을 갖는다. 즉, CRIF1의 mRNA는 정상 인체로부터 얻은 말포혈액 단핵세포(PBMC)에서는 그 발현이 관측되지 않는데 비해, 아데노바이러스에 의해 암화된 태아 신장 세포주, 전립선암 세포주, 자궁경부암 세포주, 섬유육종 세포주, 융모암 세포주, 인간의 혈액암 세포주, HL-60, K-562, Jurkat, MOLT-4 등에서 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다. 등록특허 제439489호에서는 CRIF1 유전자의 이러한 특성을 이용한 암 진단용 키트가 제시되어 있다.

[0008] CRIF1과 암의 관계는 CRIF1의 핵에서의 역할과 관련이 있으나, CRIF1의 미토콘드리아에서의 기능은 전혀 보고된 바가 없다.

[0009] 본 발명자들은 CRIF1이 미토콘드리아의 기능에 중요한 역할을 함을 발견하고 면밀한 연구를 수행한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명은 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환, 예컨대 퇴행성 신경질환, 퇴행성 근육질환, 각종 암(대장암, 갑상선암, 전립선암 등), 당뇨병, 대사증후군 등의 예방 및 치료에 유용한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0011] 전술한 과제를 해결하기 위한 본 발명은, CRIF1 단백질, 상기 단백질을 암호화하는 DNA 또는 상기 단백질의 mRNA를 포함하는, 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환인 퇴행성 신경질환, 퇴행성 근육질환, 암, 당뇨병, 대사증후군의 예방/치료용 조성물에 관한 것이다.

효 과

[0012] 본 발명에 의하여, 미토콘드리아 기능 이상을 동반하는 질환인 퇴행성 신경질환, 퇴행성 근육질환, 암, 당뇨병, 대사증후군의 예방이 가능하게 된다.

[0013] 또한 본 발명에 의하여, 종래 단순한 대증요법에 의한 치료수단만 가능하던 상기 질환들에 대해 근본적인 치료가 가능하게 된다.

[0014] 또한 본 발명에 의하여, 미토콘드리아와 핵 사이의 신호전달을 수행하는 매개체에 대한 연구가 활성화될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 첨부된 도면과 사진실험 및 실시예를 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0016] <사전실험>

[0017] 사전실험 1 : CRIF1-HA를 발현하는 아데노바이러스의 제조

[0018] CRIF1-HA를 발현하는 아데노바이러스는 다음과 같은 과정으로 획득하였다.

[0019] 먼저, CRIF1-HA 삽입서열(서열번호 1)을 템플릿과 프라이머 세트(서열번호 2, 서열번호 3)를 이용하여 PCR로 유전자 증폭시킨 뒤 제한효소인 BamHI과 XhoI (TOYOBO)으로 절단하여 pENTR3C 벡터 (invitrogen)에 삽입시킨 뒤 DH-5 α 숙주세포(Real Biotech Corporation)로 형질전환하였다. 이를 kanamycin 배지(Sigma)에 도말하여 37°C에서 배양하고 콜로니로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA를 pAd/PL-DEST 바이러스 벡터(invitrogen)에 치환시킨 뒤 이를 다시 DH-5 α 숙주세포에 형질전환하여 ampicillin 배지(Sigma)에 도말하고 37°C에서 배양하였다. 추출한 바이러스 플라스미드 DNA 10 μ g을 제한효소인 PacI (New England Biolabs)으로 절단한 뒤 아가로스겔을 이용하여 추출하고 293A 세포 주에 리포펙타민(Lipofectamine), 플러스 리에이전트(Plus reagent)를 이용하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 바이러스 플러그의 생성 관찰 후 바이러스가 포함된 배양액을 다수의 293A 세포 주에 감염시킨 뒤 세포를 분쇄시킨 후 CsCl 그라디언트 방법을 이용하여 순수한 바이러스를 추출하였다.

[0020] 사전실험 2 : CRIF1 과발현에 의한 이상 확인

[0021] CRIF1의 과발현이 세포나 미토콘드리아에 미치는 영향을 분석하였다.

[0022] 야생형의 CRIF1의 C-terminal에 HA-tag가 달린 재조합 단백질이 발현되도록 CRIF1 삽입서열(서열번호 4)을 프라이머세트(서열번호 5, 6)를 사용하여 PCR로 유전자 증폭시킨 뒤 제한효소인 EcoRI과 XhoI (TOYOBO)으로 절단하였다. 발현벡터인 pcDNA3.1/Zeo 벡터 (invitrogen)도 EcoRI과 XhoI으로 절단한 뒤 삽입서열과 연결효소(ligase)(TOYOBO)를 넣고 삽입시켰다. 완성된 플라스미드를 DH-5 α 숙주세포에 형질전환시킨 뒤 ampicillin 배지(Sigma)에 도말하여 37°C에서 배양한 뒤 콜로니로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 CRIF1-HA 플라스미드 DNA를 리포펙타민(Lipofectamine), 플러스 리에이전트(Plus reagent)를 이용하여 HeLa 세포 주에 트랜스펙션(transfection)시킨 뒤 24시간 배양하였다. 세포 관찰 45분 전에 미토콘드리아를 염색하는 MitoTracker Red CMXRos (invitrogen)를 50nM로 염색한 후 세 차례 PBS로 세척하였다. MOUNTING MEDIUM (SIGMA)을 이용하여 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0023] CRIF1이 인위적으로 과 발현되는 경우, 미토콘드리아의 형태에 이상이 발견되었다. CRIF1-HA 벡터를 세포에 발현시켰을 때, 핵/미토콘드리아 혹은 미토콘드리아 단독 발현 모두에서 미토콘드리아 막의 공포화(blebbing) 현상이 발생하였다(도 1a, 1c).

[0024] 전자현미경을 통해서도 CRIF1-HA를 발현시키는 아데노바이러스가 감염된 세포에서 미토콘드리아 내막(inner membrane)의 공포화를 확인할 수 있었다(도 1b, 1d).

[0025] 따라서 CRIF1의 과 발현이 미토콘드리아의 형태변형을 유발함을 알 수 있고, 따라서 당연히 기능의 이상도 유발됨을 유추할 수 있다.

[0026] **사전실험 3 : CRIF1 결손 세포의 이상특성 확인**

[0027] CRIF1의 결손이 세포나 미토콘드리아에 미치는 영향을 분석하였다.

[0028] CRIF1 기능이 없는 세포모델인 CRIF1 결손 MEF의 제작은 MEF (마우스 Embryonic Fibroblast)를 이용하였다.

[0029] CRIF1(+/*flox*)와 CRIF1(-/*flox*) MEF 세포 (서울대학교 생명과학과 마우스 유전체 연구실)에 Cre 레트로바이러스 (서울대학교 생명과학과 마우스 유전체 연구실)를 24시간 동안 감염시킨 후 푸로마이신(puromycin) 선택배지 (Sigma)를 이용하여 선택배양을 실시하였다. CRIF1(+/ Δ)와 CRIF1(-/ Δ) MEF 세포주는 각각 CRIF1(*flox*+)와 CRIF1(*flox*-) MEF세포에 MSCV-Cre 레트로바이러스로 유도하여 확립하였고 DMEM 배양액(10% fetal bovine serum, 2 mM 글루타민, 비필수 아미노산, 100 units/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 포함)에서 5% CO₂와 37°C 조건에서 배양하였다.

[0030] 미토콘드리아의 산소 소비율은 BD Oxygen Biosensor Systems (BD Bioscience) 키트를 이용하여 측정하였다. 각 세포별로 4×10^5 개의 세포를 세어 발색 시료가 들어있는 96-well에 넣고 Fluometer(Thermo SCIENTIFIC)로 값을 측정하였다.

[0031] 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소종의 양 측정은 MitoSOX (invitrogen)를 이용하여 측정하였다. 각 세포에 MitoSOX dye를 10 μ M로 10분간 처리 후 FACS 분석을 수행하여 측정하다.

[0032] Oxphos 컴플렉스의 발현정도는 웨스턴-블랏 실험을 통하여 측정하였다. 배양중인 세포를 PBS로 세척 한 뒤 RIPA 버퍼를 이용하여 용해시켰다. 용해된 세포 용해물을 얼음에 넣은 채 20초씩 두 번 초음파분쇄 하였고 원심분리기를 이용하여 4°C에서 13200rpm으로 10분간 침전 시킨 후 상층액을 분리하여 Bradford (BIO-RAD)법으로 정량하였다. 이후 3X SDS 샘플버퍼를 첨가하여 100°C에서 5분간 끓인 후 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동 하였다. 전기영동한 겔을 니트로셀룰로오스막 (Amersham Bioscience)에 이전 후 5% 탈지우유에서 1시간 동안 블로킹하였다. 이후 각 oxphos 컴플렉스 서브유닛을 검출할 수 있는 1차 항체 NDUF9, MTND6, SDHA, SDHB, UQCRC2, COX4, ATP5A (invitrogen), MTCO1 (abcam)과 4°C에서 O/N으로 반응시켰다. 1차 항체와 반응시킨 후 TBS/T로 10분씩 3회 세척하였고 다시 마우스와 토끼 2차 항체 (CELL SIGNALING)와 1~3시간 동안 반응시켰다. 2차 항체와 반응시킨 후 TBS/T로 10분 씩 3회 세척하였고 ECL 용액 (iNtRON)을 이용하여 x-선 감광 필름 (FUJIFILM)에 검출하였다.

[0033] oxphos 컴플렉스의 효소활성은 "Methods in Cell Biology (VOL80, Mitochondria, 2nd Edition)"의 page93-119의 실험방법을 참조하여 측정하였다.

[0034] 미토콘드리아 DNA의 양은 PCR을 수행하여 측정하였다.

[0035] 배양액 젖산농도는 L-락테이 (Megazyme) 키트를 이용하여 측정하였다. 배양액의 일부를 키트의 버퍼와 반응시켜 나타나는 흡광도 값을 UV/VIS 분광광도계 (BECKMAN)를 이용하여 측정하였다.

[0036] 배양액 포도당 농도는 ACCU-CHEK 센서(Roche)를 이용하여 측정하였다.

[0037] CRIF1이 결손된 MEF(마우스 embryonic fibroblasts), 즉 CRIF1 -/- 세포(도 1a)는 대조세포인 CRIF1 +/+ 혹은 +/-에 비해 다음과 같은 이상특성이 확인되었다.

[0038] ① 미토콘드리아에서의 산소 소비율이 현저히 낮으며(도 2b), 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소종의 양이 현저히 증가되었다(도 2c).

[0039] ② CRIF1 -/- 세포는 대조세포에 비해 미토콘드리아 DNA의 양에는 차이가 없다(도 2d). 이는 CRIF1이 미토콘드리아 내막의 호흡복합체 I, III, IV의 결합(assembly)에 결정적인 인자로 작용함을 시사한다.

[0040] ③ oxphos 컴플렉스 I, III, IV 단백질의 발현이 현저히 감소되었을 뿐 아니라(도 2e), 이들의 활성 역시 크게 감소되었다(도 2f).

[0041] ④ 배양액 젖산농도가 현저히 증가하고, 포도당 농도가 더 빨리 감소하며, 수소이온 농도도 현저히 증가하였다(도 2g). 즉, CRIF1의 결손은 세포의 에너지대사가 정상적인 미토콘드리아의 호흡의존적인 시트르산 회로를 통하는 것이 아닌 해당과정 의존적으로 변하게 하였다.

- [0042] ⑤ CRIF1 ^{-/-} 세포는 미토콘드리아 크리스테의 구조적 변형이 심하여 부종이 나타났다(도 2h).
- [0043] 이상의 결과로 보아, CRIF1 단백질은 미토콘드리아에 존재하면서 미토콘드리아 호흡복합체의 안정성을 조절하여 미토콘드리아의 활성을 조절하는 핵심 인자로서 작용함을 알 수 있다.
- [0044] **사전실험 4 : CRIF1 결손과 관련된 질병의 확인**
- [0045] CRIF1의 결손에 관련된 질병을 분석하였다.
- [0046] **(1) 퇴행성 질환**
- [0047] CRIF1 ^{+/-loxP} 마우스(서울대학교 생명과학과 마우스 유전체 연구실)와 CamKII-cre 마우스(서울대학교 생명과학과 마우스 유전체 연구실)를 교배시켜 얻은 CRIF1 ^{+/-} 마우스를 동종교배시켜 뇌에서만 CRIF1이 발현되지 않는 CRIF1 뇌 특이 장애 마우스종(CRIF1 ^{-/-})을 제작하였다. 12주령 된 CRIF1 ^{-/-}의 뇌를 적출하여 피질과 해마(hippocampus)를 분리한 뒤 균질화(homogenization) 버퍼에 넣고 분쇄하였다. 이후 분쇄된 용해물을 이용하여 웨스턴-블롯을 수행하여 oxphos 콤플렉스 서브유닛의 발현량을 측정하였다.
- [0048] CRIF1을 뇌신경 조직에서 특이적으로 결손시킬 경우, 위 사전실험 3에서 확인된 바와 같이, 대조 마우스에 비해 미토콘드리아 oxphos 콤플렉스 I, III, IV의 발현이 감소되었고(도 3a) 신경퇴행이 발생되었다.
- [0049] 따라서 CRIF1 단백질은 신경조직에서 미토콘드리아의 기능이상과 뇌신경 퇴행과 관련이 있음을 알 수 있었다.
- [0050] **(2) 당뇨병 및 대사증후군**
- [0051] C57BL/6J 계통의 렙틴 돌연변이로 비만을 유발시킨 8주령의 ob/+ 헤테로 male 마우스(한국생명공학연구원, KRIBB)와 ob/ob 호모 male 마우스(한국생명공학연구원, KRIBB) 각각 3마리씩과, C57BL/KsJ 계통의 렙틴 수용체 돌연변이로 당뇨를 유발시킨 db/+ 헤테로 마우스(한국생명공학연구원, KRIBB)와 db/db 호모 마우스(한국생명공학연구원, KRIBB) 6주령 male 각각 2마리씩 이용하여 각 장기별 CRIF1의 발현 양을 비교해 보았다.
- [0052] 간, 뇌, 지방조직, 심장, 근육조직 중 장판지근을 떼어 균질기로 분쇄 후 트리졸(Trizol)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 중 20 µg을 1% ATG 아가로스 겔에 로딩하여 1X MOPs 버퍼에서 90V로 2시간 후 10X SSC를 이용하여 나일론 막에 투과시켰다. UV 크로스 링크한 막은 ³²P-CTP로 표시한 CRIF1 DNA로 탐침하여 x-ray 필름에 노출하여 결과를 얻었다.
- [0053] 결과, 대조군보다 당뇨병 및 대사증후군 동물모델의 간, 지방조직, 장판지근에서 CRIF1의 발현이 감소되어 있음을 확인 하였다(도 3b).
- [0054] **<실시예>**
- [0055] **실시예 1 : 당뇨병 및 대사증후군의 치료/조절효과의 확인**
- [0056] 마우스의 간을 트리졸을 이용하여 RNA를 추출한 뒤, cDNA 합성키트를 이용하여 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 주형으로 HA 서열을 포함한 프라이머 (서열번호 7, 서열번호 8)를 이용하여 PCR로 유전자 증폭시킨 뒤 pGEM T Easy 벡터(Promega)에 재조합 시켰다. 이후 T7 프로모터 프라이머 (서열번호 9)를 이용하여 서열분석으로 재조합, 돌연변이의 유무를 확인하였다. 이렇게 HA-tag된 mCRIF1 유전자와 pAdTrack-CMV (promega)를 Not1 효소 반응 후 정제하여 리게이션시켜 재조합 DNA를 만들었다. mCRIF1을 Pme1 효소로 2시간 반응시킨 후 정제한 DNA를 pAdEasy 벡터 (invitrogen)가 들어 있는 BJ5183 숙주세포 (stratagene)에 전기전달방법(Electrophoration)을 이용하여 형질전환 시켰다. mCRIF1은 BJ5183 숙주세포에 들어가 pAdEasy 벡터와 상동성 재조합이 되어 재조합이 되게 된다. 이 DNA를 PacI 효소 반응으로 잘라 정제 후 HEK293 (American Type Culture Collection)에 리포펙타민, PLUS (Invitrogen)를 이용하여 트랜스펙션하고 2주간 키워 얻은 아데노바이러스 원시 스푼(soup)를 얻는다. 이 스푼으로 2번 HEK293에 인펙션하여 증폭시킨 후 세포를 3번 Freezing/Thawing하여 분쇄 후 cesium chloride 그래디언트 방법으로 고농도의 아데노바이러스를 추출한다.
- [0057] 당뇨병 및 대사증후군 동물모델인 ob/ob 마우스와 db/db 마우스 (한국생명공학연구원, KRIBB)를 일주일간 안정

화 시킨 뒤 mCRIF1 아데노바이러스를 총 1×10^9 의 농도로 1cc 주사기로 꼬리정맥에 주입하였다. 바이러스를 주입한지 1주일, 2주일 이후에 16시간 절식시킨 후 공복혈당을 측정한 결과 대조군 바이러스를 주입한 마우스에 비해 상기 동물모델 마우스의 공복혈당이 감소됨을 확인하였다. 몸무게에는 크게 변화가 없었다. 또한 2주일째 당부하 검사를 한 결과 대조군 바이러스 주입한 마우스에 비해 mCRIF1이 과 발현된 마우스에서 당내성이 개선되는 것을 확인하였다(도 3b, 도 3c, 도3d).

[0058] 장기 적출 시 간을 떼어 포르말린 고정 후 수세, 포메 과정 후 파라핀 블록을 만들어 10 μ m의 두께로 잘라 슬라이드를 만들어 헤마톡실린(Hematoxylin) & 에오신(Eosin)염색을 했을 때 mCRIF1의 과 발현으로 간의 지방축적이 억제 되어 있는 현상이 확인되었다(도 3f). 또한 크리오(cryo) 블록을 만들어 5 μ m의 두께로 잘라 오일 레드(Oil red) O 염색을 해 보았을 때도 같은 현상이 관찰 되었다(도 3e).

[0059] 결과적으로, CRIF1의 미토콘드리아 활성 조절은 세포수준에서 뿐만이 아니라 in vivo 수준에서도 작용함을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1a~1d는 CRIF1의 과발현이 미토콘드리아의 형태를 변화시킴을 보여주는 도표 및 사진.

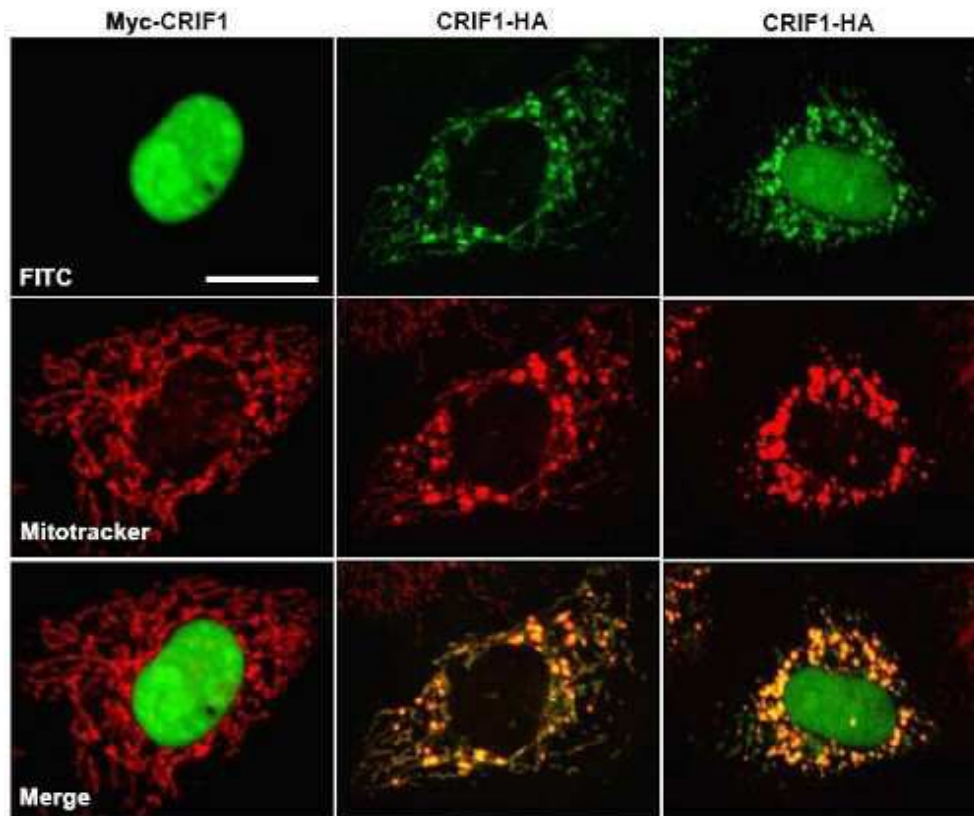
[0061] 도 2a~2h는 CRIF1의 결손이 미토콘드리아의 기능 및 형태에 영향을 미치고, 미토콘드리아 호흡복합체 I, III, IV를 감소시키며 에너지 대사의 변화를 유발함을 보여주는 도표 및 사진.

[0062] 도 3a~3d는 대사성증후군 동물모델에서 CRIF1의 발현이 변화되어 있으며 CRIF1 과발현이 대사성증후군 동물의 혈당을 감소시킴을 보여주는 도표 및 사진.

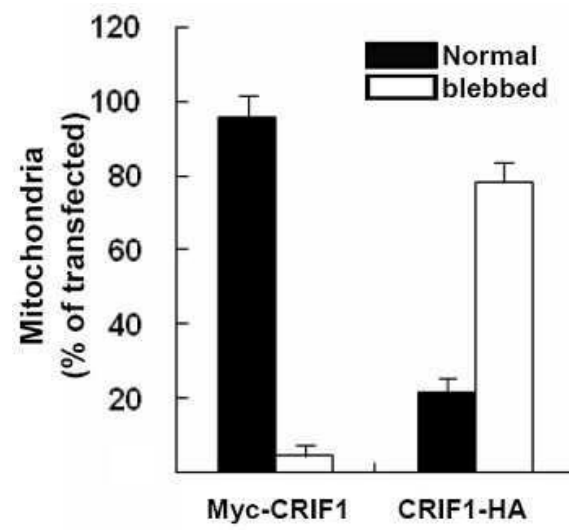
[0063] 도 3e~3f는 대사성증후군 동물모델에서 CRIF1의 과 발현으로 간의 지방축적이 억제됨을 보여주는 사진.

도면

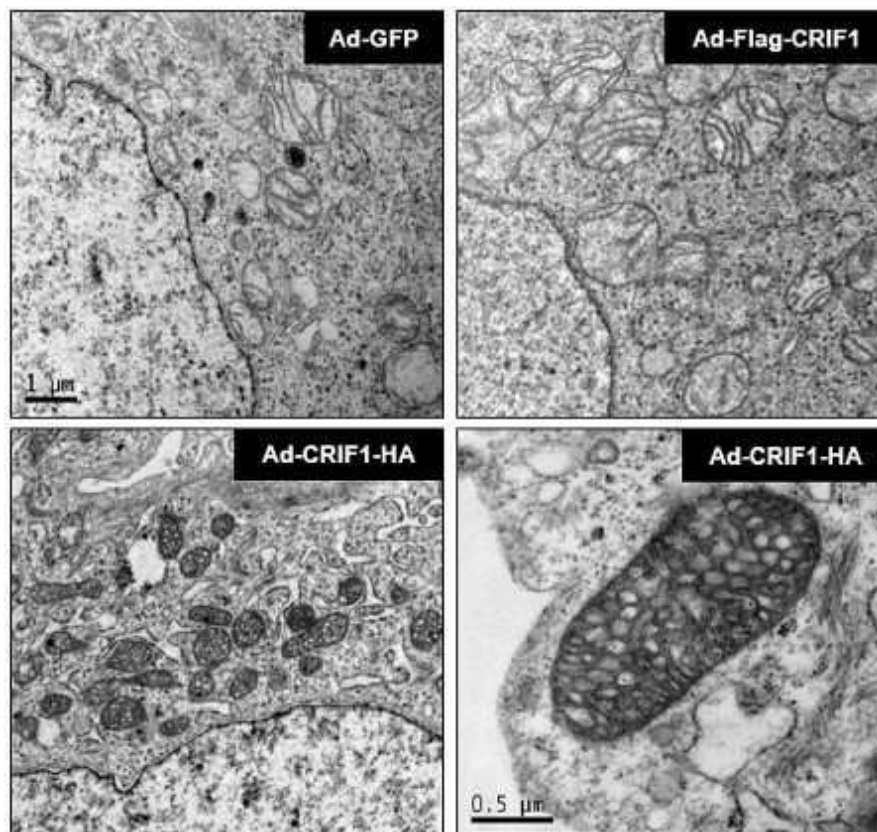
도면1a



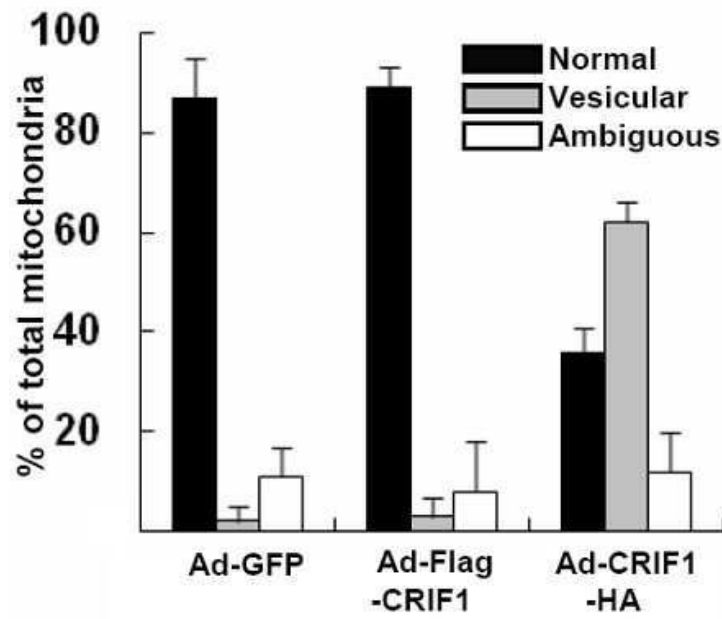
도면1b



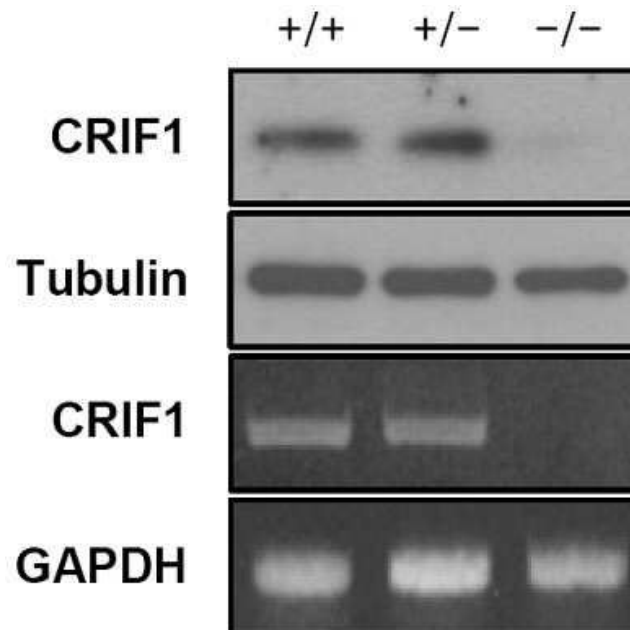
도면1c



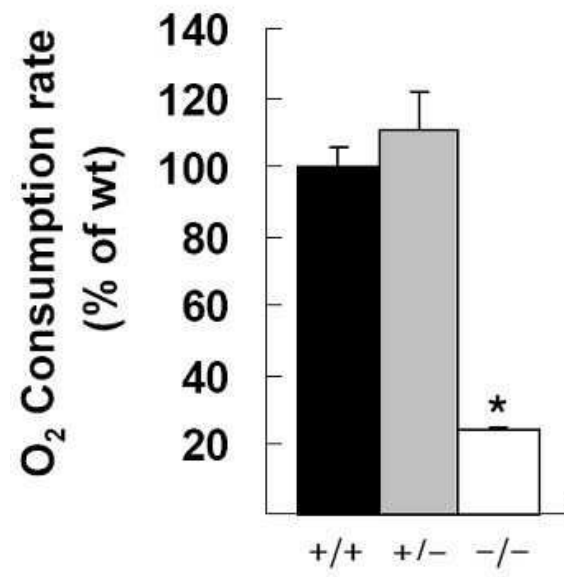
도면1d



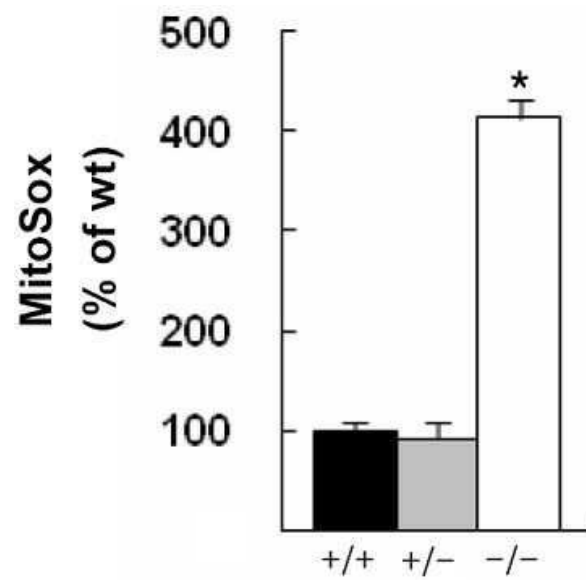
도면2a



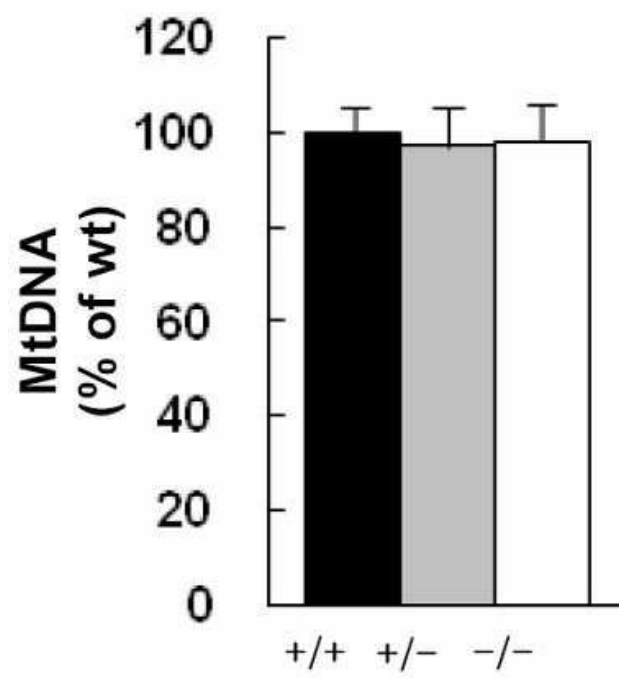
도면2b



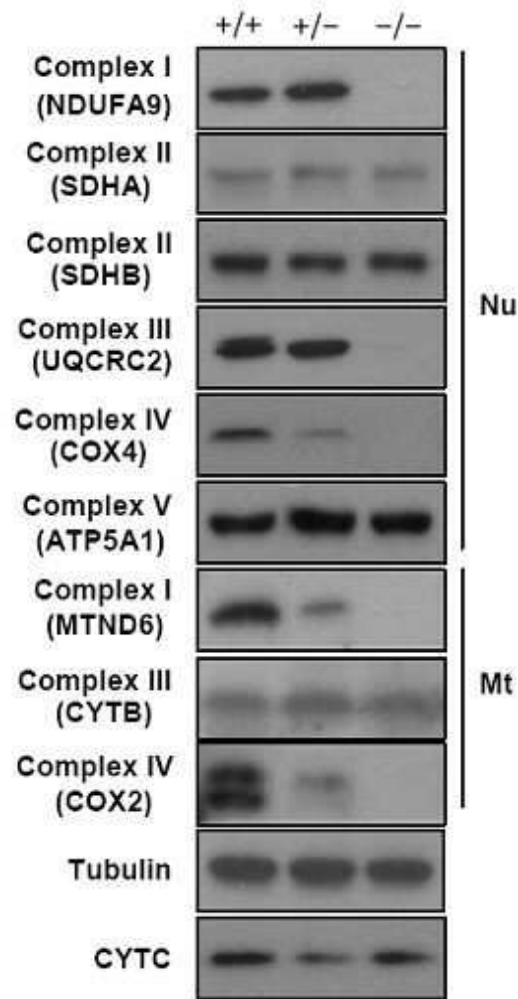
도면2c



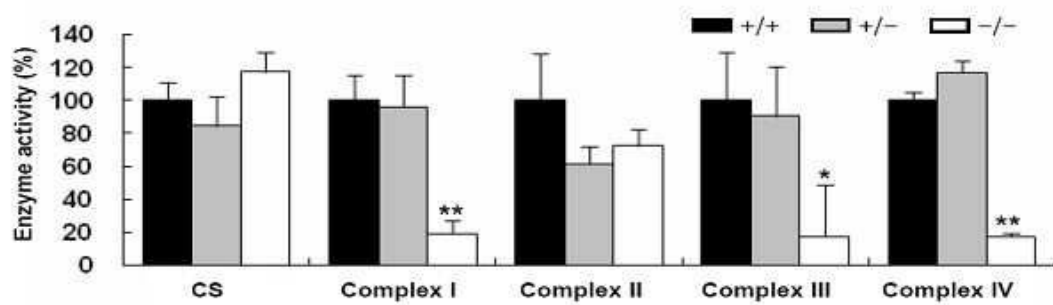
도면2d



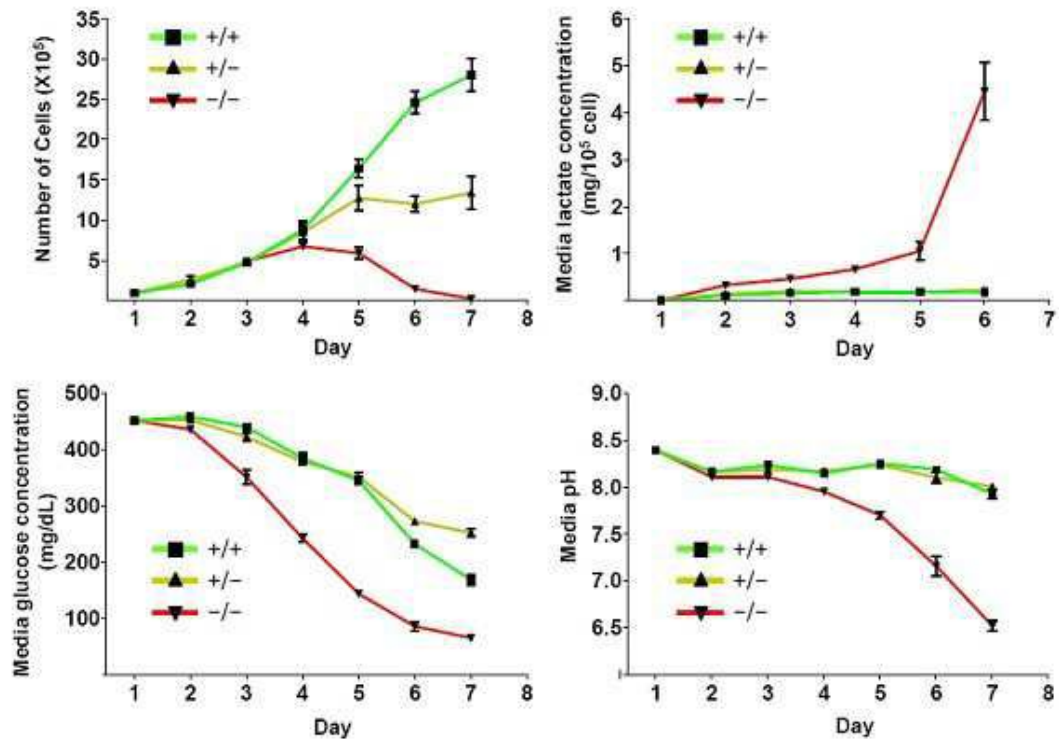
도면2e



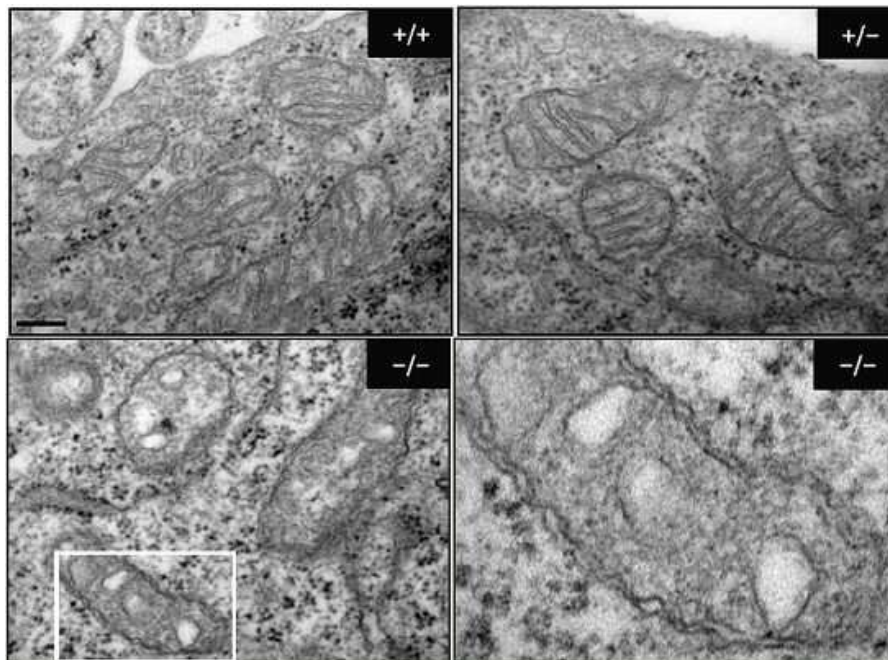
도면2f



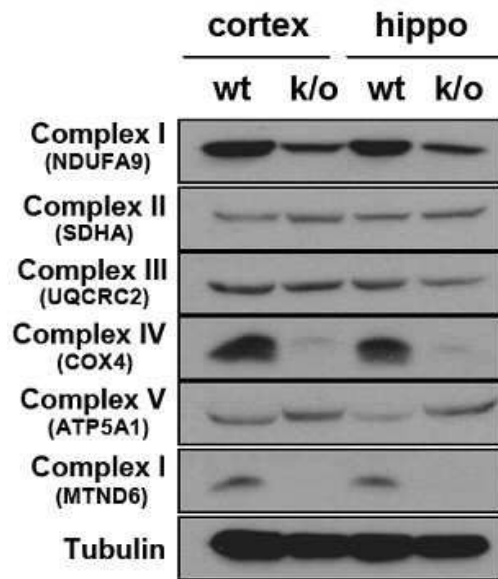
도면2g



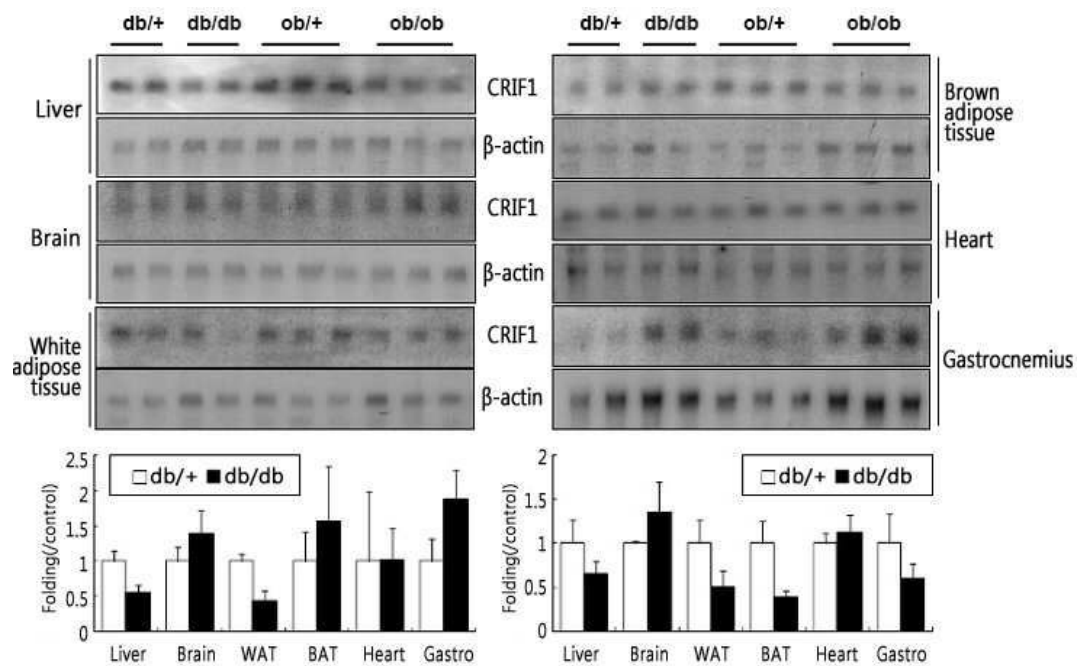
도면2h



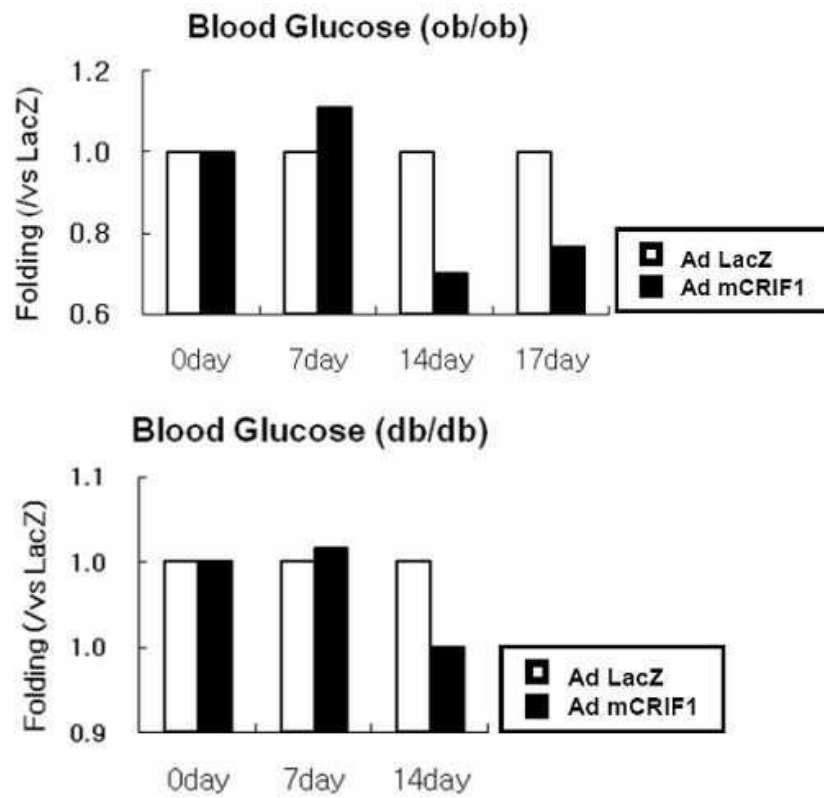
도면3a



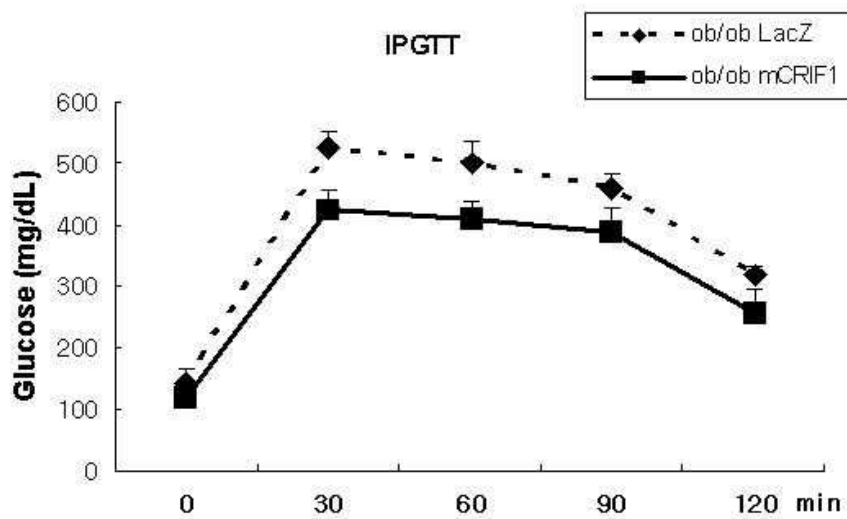
도면3b



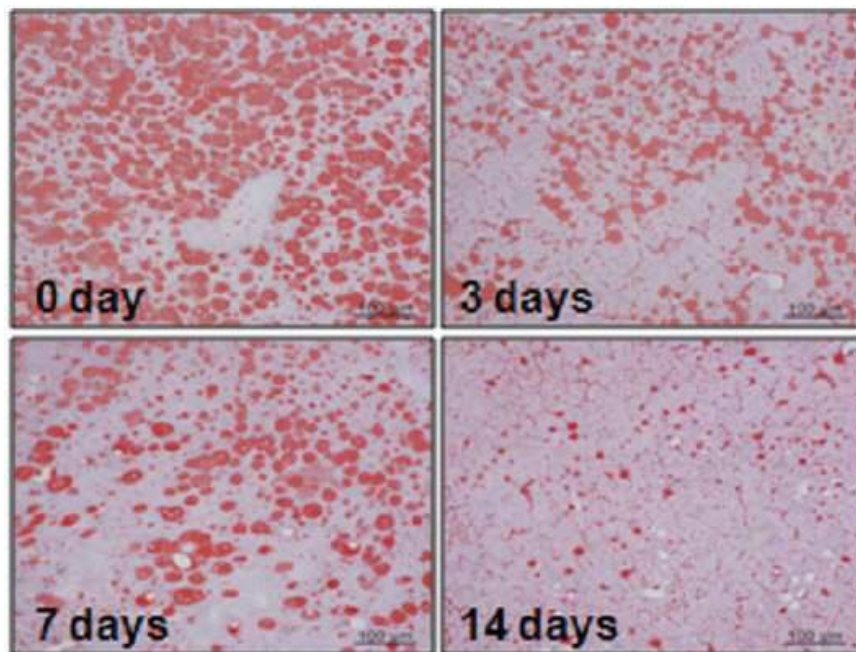
도면3c



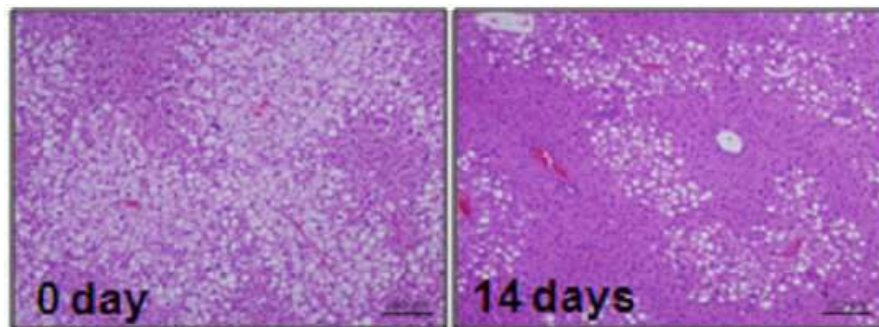
도면3d



도면3e



도면3f



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> Composition for Disease caused by Mitochondrial Dysfunctions

<160> 9

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> insertion sequence for CRIF1-HA

<400> 1
atggcggcgt ccgtgcgaca ggcacgcagc ctactagggtg tggcggcgac cctggccccg 60

ggttcccggtg gctaccgggc gcggccgccc ccgcgccgca ggccgggacc ccggtggcca 120

gaccccgagg acctcctgac cccgcgggtgg cagctgggac cgcgctacgc ggctaagcag 180

ttcgcgcgtt acggcgccgc ctccgggggtg gtccccggtt cgttatggcc gtcgccggag 240

cagctgcggg agctggaggc cgaagaacgc gaatgttacc cgagcctggc gaccatgcag 300

gagtcgctgc gggatgaagca gctggccgaa gagcagaagc gtcgggagag ggagcagcac 360

atcgcagagt gcatggccaa gatgccacag atgattgtga actggcagca gcagcagcgg 420

gagaactggg agaaggccca ggctgacaag gagaggaggg cccgactgca ggctgaggcc 480

caggagctcc tgggctacca ggtggacceca aggagtcccc gcttccagga gctgctccag 540

gacctagaga agaaggagcg caagcgcctc aaggaggaaa aacagaaacg gaagaaggag 600

gcgcgagctg ctgcattggc tgcagctgtg gctcaagacc cagcagcctc tggggcaccc 660

agctccctcg aggggtatcc gtacgatgtg cccgactatg cttaa 705

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> forward primer

<400> 2
ggatccatgg cggcgtccgt g 21

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> reverse primer

<400>	3	
ctcgagttaa gcatagtcgg gc		22
<210>	4	
<211>	669	
<212>	DNA	
<213>	insertion sequence for CRIF1	
<400>	4	
atggcggcgt ccgtgcgaca ggcacgcagc ctactagggtg tggcggcgac cctggccccg		60
ggttcccggtg gctaccgggc gcggccgccc ccgcgccgca ggccgggacc ccggtggcca		120
gaccccgagg acctcctgac cccgcgggtgg cagctgggac cgcgctacgc ggctaagcag		180
ttcgcgcgtt acggcgccgc ctccgggggtg gtccccggtt cgttatggcc gtcgccggag		240
cagctgcggg agctggaggc cgaagaacgc gaatggtacc cgagcctggc gaccatgcag		300
gagtcgctgc gggigaagca gctggccgaa gagcagaagc gtcgggagag ggagcagcac		360
atcgagagt gcatggccaa gatgccacag atgattgtga actggcagca gcagcagcgg		420
gagaactggg agaaggccca ggctgacaag gagaggaggg cccgactgca ggctgaggcc		480
caggagctcc tgggctacca ggtggacceca aggagtcccc gcttcagga gctgctccag		540
gacctagaga agaaggagcg caagcgcctc aaggaggaaa aacagaaacg gaagaaggag		600
gcgcgagctg ctgcattggc tgcagctgtg gctcaagacc cagcagcctc tggggcaccc		660
agctcctga		669
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	forward primer	
<400>	5	
actcgagatg gcggcgtccg tg		22

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> reverse primer

<400> 6
 ccccgtaggt cgaggccta agt 23

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> forward primer

<400> 7
 aaaagatggc ggcgctcg 18

<210> 8
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> reverse primer

<400> 8
 agtgtctggt gaaccagct ccatgtacc atacgatgtt ccagattacg ct 52

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> T7 promoter primer

<400> 9
 taatacgact cactataggg 20