



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0102593

(43) 공개일자 2015년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0024660

(22) 출원일자 2014년02월28일

심사청구일자 2014년02월28일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

오구택

서울특별시 서초구 잠원로 136, 344동 1003호 (잠원동, 신반포아파트)

손성근

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교 종합과학관 C동 301호

양영

서울특별시 용산구 청파로47길 숙명여자대학교 과학관 309호

(74) 대리인

유미특허법인

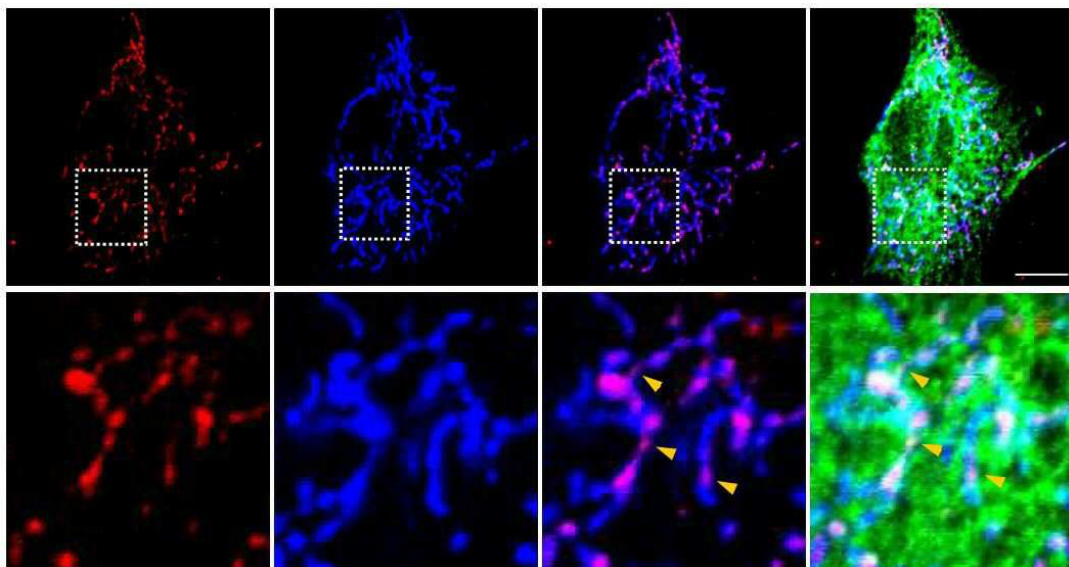
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 CTRP1 억제제를 포함하는 미토콘드리아 이상 질환의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 CTRP1 (C1q/TNF-related protein 1)의 발현 또는 활성을 억제함으로써 미토콘드리아의 역동성을 효과적으로 저해할 수 있는 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 억제하는 약제를 미토콘드리아 분열 및 절단을 억제하는 물질로 결정함으로써, 미토콘드리아 역동성과 관련된 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A3A2026454

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 혈관.면역세포상호작용에의한혈관질환연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2021.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

CTRP1 (C1q/TNF-related protein 1)의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는,
노화 및 신경질환으로 이루어진 군에서 선택되는 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CTRP1 의 발현을 억제하는 물질은 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CTRP1 의 활성을 억제하는 물질은 CTRP1 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

CTRP1 및 비멘틴에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및
상기 세포에서 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는,
미토콘드리아 역동성 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 미토콘드리아 역동성 관련 질환은 노화, 당뇨 또는 신경질환인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 CTRP1 또는 비멘틴에 특이적인 항체를 이용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 면역탁본법, 면역침강법 또는 면역염색법에 의해 검출하는 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 CTRP1 및 비멘틴은 각각 리포터 단백질 연결된 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 리포터 단백질의 신호 크기에 의해 검출하는 것인 방법.

청구항 10

CTRP1 및 비멘틴을 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 치료제 스크리닝용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 미토콘드리아 역동성 관련 질환은 노화, 당뇨 또는 신경질환인 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 본 발명은 CTRP1 (C1q/TNF-related protein 1)의 발현 또는 활성을 억제함으로써 미토콘드리아의 역동성을 효과적으로 저해할 수 있는 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 억제하는 약제를 미토콘드리아 분열 및 절단을 억제하는 물질로 결정함으로써, 미토콘드리아 역동성과 관련된 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

미토콘드리아 기능은 세포에서 에너지 생성, Ca^{2+} 항상성, 활성산소 형성, 그리고 세포 사멸에 관여되어 있다. 특히, 미토콘드리아 동역학 중 미토콘드리아 절단 조절 작용은 노화, 당뇨 및 신경질환에 관여되어 있다 [D. C. Chan, Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241 (2006); H. Chen, D. C. Chan, Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18, 169 (2009); S. C. Correia *et al.*, Mitochondrial importance in Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 724, 205 (2012); Y. Yoon, C. A. Galloway, B. S. Jhun, T. Yu, Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid.Redox Signal.* 14, 439 (2011)].

[0003]

현재까지, 미토콘드리아 절단에는 Drp1(dynamin-related protein 1; 효모에서는 Dnm1로 알려져 있음)이 관여하고, 이 Drp1의 위치에 MF1(mitochondrial fission factor)가 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러나 Drp1가 미토콘드리아 절단을 조절하는 정확한 기전을 알려져 있지 않다.

[0004]

또한, 미토콘드리아와 소포체는 지방 합성, Ca^{2+} 신호전달 그리고 미토콘드리아 절단 등 밀접한 상호작용을 하고 있다. 최근에 액틴 합성을 조절한다는 IFN2(formin2)가 소포체에 존재하면서 미토콘드리아 절단 부분에서 Drp1과 상호작용해서 미토콘드리아 절단을 조절한다고 보고되기도 하였다.

[0005]

한편, CTRP1은 아디포넥틴(adiponectin)과 비슷하게 대사 조절 기능을 가지는 분비 단백질로 보고 되었고, GIP(G protein interacting protein)로 심장근육에 많이 발현한다고 보고 되었다. 그러나, CTRP1과 미토콘드리아 역동성과의 관련성은 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006]

(특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2009-0061727호 (2009. 6. 17)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 하나의 목적은 CTRP1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환

환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 CTRP1 및 비멘틴에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및 상기 세포에서 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 CTRP1 및 비멘틴을 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 치료제 스크리닝용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 미토콘드리아 동역학 조절은 세포 항상성과 죽음 그리고 노화와 신경질환, 그리고 당뇨병에 중요하게 연관이 되어 있다. 미토콘드리아 절단은 Drp1 유전자가 관여하는데 정확한 절단 조절작용은 아직 보고되지 않았다. 본 발명에서는 소포체와 미토콘드리아에 CTRP1 유전자가 존재한다는 것을 확인하였고, 이 유전자는 소포체 막에 존재하면서 미세소관 (microtubule) 및 비멘틴(Vimentin)과 상호작용한다는 것을 확인하였다. 나아가, 본 발명에서는 CTRP1 이 비멘틴과의 상호작용을 통해서 미토콘드리아 유동성을 조절하고, 미토콘드리아 절단을 조절한다는 것을 처음으로 규명하였다.

[0011] 따라서, 본 발명에서 CTRP1은 미토콘드리아의 역동성을 조절하기 위한 신규한 타겟으로 제공된다. 구체적으로, CTRP1의 유전자 발현 또는 이의 단백질의 활성을 억제함으로써 미토콘드리아의 분열 및 절단을 억제할 수 있어, 미토콘드리아의 역동성에 의하여 야기되는 질환들, 예컨대 노화, 당뇨 또는 신경질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0012] 이에, 하나의 양태로서, 본 발명은 CTRP1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0013] 미토콘드리아 역동성 관련 질환이란, 예를 들어, 노화, 당뇨 또는 신경질환을 예시할 수 있으며, 신경질환으로는 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병 등을 예시할 수 있으나, 미토콘드리아 역동성에 의하여 야기되는 질환이라면 상기 예시에 제한되지 않고 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0014] 본 발명에서, CTRP1 유전자의 mRNA 또는 단백질은 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 CTRP1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_030968.3 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_112230 에서 확인할 수 있다.

[0015] 본 발명에서, CTRP1 의 발현을 억제하는 물질은, CTRP1 의 mRNA 에 특이적으로 결합할 수 있는 siRNA, shRNA, 또는 안티센스 핵산을 포함한다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어, "siRNA"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA 는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있다.

[0017] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70염기이다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스텝 루프형 구조일 수도 있다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로

로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어, "shRNA"는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어, "안티센스 핵산"이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 CTRP1의 mRNA에 상보적이고 이의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고, CTRP1의 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다.

[0021] 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나, 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명의 조성물은 CTRP1의 siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산 중 1종 이상을 포함하는 외에, siRNA, shRNA 또는 안티센스 핵산 분자의 유입을 촉진시키는 제제, 예를 들어 리포솜을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 테옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류 중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할 수도 있다. 또한 안티센스 핵산은 세포에 의해 흡수되는 펩타이드에 접합시킬 수도 있다. 유용한 펩타이드의 예로는 펩타이드 호르몬, 항원 또는 항체 및 펩타이드 독소 등이 있다.

[0023] 본 발명에서, CTRP1의 활성을 억제하는 물질은, CTRP1의 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다.

[0024] 이러한 항체는 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함될 수 있다. 상기 항체는 CTRP1에 특이적으로 결합하는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0025] CTRP1의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 세포에 주입하는 방법으로는 리포솜이나 유전공학적 기술인 벡터 시스템을 이용하는 방법 등 다양한 형태로 구현될 수 있다. 또는, 약제의 제제 형태로 제조하여 통상적인 방식으로 체내에 투여하는 방법이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우, 상기 조성물 내의 유효성분의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0027] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0028] 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함될 수

있다.

- [0029] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명에서는 CTRP1 이 미토콘드리아의 역동성을 조절함에 있어서 비멘틴과의 상호작용이 중요하다는 것을 처음으로 규명하였다. 따라서, CTRP1 과 비멘틴 간의 상호작용을 이용하여 미토콘드리아의 역동성을 조절하는 물질을 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, CTRP1 과 비멘틴 간의 상호작용을 저해하는 물질을 스크리닝하여 미토콘드리아의 역동성에 의하여 야기되는 질환들, 예컨대 노화, 당뇨 또는 신경질환의 치료제 후보물질로 제공할 수 있다.
- [0031] 이에, 또 하나의 양태로서, 본 발명은 CTRP1 및 비멘틴을 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 치료제 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 또한, 본 발명은 CTRP1 및 비멘틴에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및 상기 세포에서 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명의 스크리닝 방법은 CTRP1 및 비멘틴에 후보 화합물을 처리하는 단계를 포함하며, 이 때, 후보 화합물을 CTRP1 및 비멘틴을 발현하는 세포에 처리하거나, 분리된 CTRP1 및 분리된 비멘틴의 혼합물에 후보 화합물을 직접적으로 처리할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서, 비멘틴 유전자의 mRNA 또는 단백질은 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 비멘틴 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_003380.3 에서, 이에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 Genbank 등록번호 NP_003371.2 에서 확인할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "후보 화합물" 이란 CTRP1 및 비멘틴의 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.
- [0036] 본 발명에서 용어, "처리" 란 후보 화합물이 CTRP1 및 비멘틴 중 어느 하나 이상에 직접적으로 접촉하는 것뿐 아니라, 물질이 세포막에 영향을 미치고 그 세포막으로부터 발생한 신호가 CTRP1 및 비멘틴 중 어느 하나 이상에 접촉하거나 영향을 미치는 경우도 포함한다. 따라서 본 발명에 있어서, 상기 후보 화합물에는 세포막 투과성인 물질 뿐만 아니라, 세포막에 불투과성인 물질도 포함된다. 이 때, 후보 화합물은 유효량의 범위 내에서 처리하도록 한다. "유효량" 이란 반응을 유도하기에 충분한 양을 의미하는 것으로, 유효량 범위 이하에서는, 정확한 결과를 얻을 수 없으므로, 유효량 범위 내에서 억제능을 측정하는 것이 바람직하다.
- [0037] 후보 화합물을 CTRP1 및 비멘틴을 발현하는 세포에 처리하는 경우, 본 발명은
- [0038] (a) CTRP1 및 비멘틴을 발현하는 세포에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0039] CTRP1 및 비멘틴을 발현하는 세포는, 본래 CTRP1 및 비멘틴을 포함하는 세포이거나, 의도적으로 CTRP1 및 비멘틴을 발현하는 벡터를 세포에 트랜스펙션하여 제조한 것일 수 있다. 또한, CTRP1 및 비멘틴을 발현하는 벡터의 경우 하나의 벡터에 CTRP1 및 비멘틴에 대한 서로 다른 프로모터를 포함하고 있어 하나의 벡터로부터 각각 발현될 수도 있고, CTRP1 를 발현하는 벡터 및 비멘틴을 발현하는 벡터를 공동 트랜스펙션하여 제조할 수도 있다.
- [0040] 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, CTRP1 및/또는 비멘틴 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 사용하여 세포 내에서 CTRP1 및/또는 비멘틴이 세포 내에서 안정적으로 또는 일시적으로

과발현되도록 조작된 세포를 사용할 수 있다.

- [0041] 나아가, CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 저해시키는 물질의 검출은, 세포 수준 뿐만 아니라 생쥐, 토끼, 햄스터, 시궁쥐, 기니피그 등의 실험 동물을 이용하여 생체 내에서 수행할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 단계 (b) 에서, CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부는, 단백질-단백질 간 또는 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하기 위하여 당업계에서 통상 사용되는 기술들을 적용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 면역학적 분석법, 형광 분석법, 효모 이중 혼성법 (yeast two-hybrid), CTRP1 또는 비멘틴에 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.
- [0043] 바람직한 하나의 구현예로, CTRP1 또는 비멘틴에 특이적인 항체를 이용하여 CTRP1 및 비멘틴의 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 면역침전 및 면역염색 등이 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기 항원-항체 반응을 이용한 검출 방법에서 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨 (detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 본 발명에서 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.
- [0045] 바람직한 또 하나의 구현예로, CTRP1 또는 비멘틴에 각각 리포터 단백질과 연결한 후 상기 리포터 단백질의 신호 크기에 의하여 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 검출할 수 있다.
- [0046] 상기 리포터 단백질은 루시페라제, 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.
- [0047] 상기 리포터 단백질을 CTRP1 및 비멘틴과 각각 연결된 형태로 발현시키기 위하여, CTRP1 를 코딩하는 유전자 및 리포터 유전자가 작동가능하게 연결된 발현 벡터, 그리고 비멘틴을 코딩하는 유전자 및 리포터 유전자가 작동가능하게 연결된 발현 벡터를 세포에 공동 트랜스펙션할 수 있다.
- [0048] 리포터 단백질이 형광 단백질일 경우 형광 현미경을 이용하여 리포터 단백질의 형광 크기를 측정함으로써 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 확인할 수 있으며, 리포터 단백질로 루시페라제와 같은 발광 효소를 사용하는 경우 공지된 루시페라제 활성 측정법 내지는 루시페라제 발광에 따라 CTRP1 및 비멘틴의 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 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 확인할 수 있다.
- [0049] 한편, 후보 화합물을 분리된 CTRP1 및 분리된 비멘틴의 혼합물에 처리하는 경우, 본 발명은
- [0050] (a') 분리된 CTRP1 및 분리된 비멘틴의 혼합물에 후보 화합물을 처리하는 단계; 및 (b') CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 역동성 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명에서 용어, "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 CTRP1 및 분리된 비멘틴 은 세포 내가 아니라 시험관 내에서 후보 화합물과 직접적으로 작용하여 반응할 수 있다.

[0052]

CTRP1 및 비멘틴의 상호작용이 저해되는지 여부를 확인하는 방법은 상술한 바와 같다.

[0053]

본 발명의 스크리닝 방법으로 획득된 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 억제하는 약제는 미토콘드리아의 분열 과정에서 미토콘드리아 절단을 억제함으로써 미토콘드리아 역동성에 의해 야기되는 각종 질환들을 치료할 수 있다.

발명의 효과

[0054]

본 발명에서 CTRP1 은 미토콘드리아 역동성에 의해 야기되는 각종 질환들을 치료하는 타겟으로 사용될 수 있고, 나아가 CTRP1 과 비멘틴 간의 상호작용을 이용하여 상기 질환들의 치료제 후보물질을 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1은 면역염색을 통하여 MEF 세포 내에서 CTRP1 의 위치를 조사한 결과를 나타낸다. 붉은 색은 항-CTRP1, 초록색은 항-칼레티쿨린, 청색은 항-COX4 항체로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=10 μ m).

도 2는 10 나노 골드 입자를 연결한 항-CTRP1 항체(붉은 화살표)를 처리한 MEF 세포를 전자 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. ER 은 소포체, Mit 는 미토콘드리아를 나타낸다(Scale bar=200nm).

도 3은 초원심세포분획법(subcellular fractionation)으로 MEF 세포의 세포소기관을 분리한 후, 웨스턴 블랏을 이용하여 CTRP1, 튜불린, 칼넥신, ACSL4 및 COX4 를 검출한 결과를 나타낸다. ER 은 소포체 분획, Mit 는 미토콘드리아 분획, MAM은 미토콘드리아가 연결된 ER 멤브레인(mitochondria associated ER membrane) 분획, P-Mit 는 순수-미토콘드리아 분획(pure-mitochondrial fraction)을 나타낸다.

도 4는 MEF 세포에서 분리한 소포체에 버퍼, Na₂CO₃, 트립톤 X-100을 각각 처리한 후 펠렛(P)과 상층액(S) 분획에서 CTRP1 및 칼레티쿨린을 각각 검출한 결과를 나타낸다.

도 5는 MEF 세포에서 분리한 소포체에 트립신을 처리한 경우와 그렇지 않은 경우 각각에서 CTRP1 과 칼레티쿨린의 존재를 검출한 결과를 나타낸다.

도 6은 CTRP1^{f1/f1} 및 Cre⁺CTRP1^{f1/f1} 세포를 각각 MitoTracker 로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=10 μ m).

도 7은 도 6의 결과에서 미토콘드리아의 길이를 정량화하여 나타낸 결과이다 (n=256~427 미토콘드리아; Error bars, 데이터는 평균±표준편차를 나타냄; * 는 p<0.001).

도 8은 CTRP1^{f1/f1} 및 Cre⁺CTRP1^{f1/f1} 세포를 각각 항-Drp1 항체(초록색) 및 MitoTracker(적색)으로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=10 μ m).

도 9는 도 8의 결과에서 미토콘드리아 길이 당 Drp1 puncta 를 정량화하여 나타낸 결과이다 (n=67~88 미토콘드리아; Error bars, 데이터는 평균±표준편차를 나타냄).

도 10은 U2OS 세포에 대조군 siRNA, CTRP1 siRNA 또는 Drp1 siRNA를 처리하고 각각 항-Drp1 항체(초록색) 및 MitoTracker(적색)으로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=10 μ m).

도 11은 도 10의 결과에서 미토콘드리아의 길이를 정량화하여 나타낸 결과이다 (n=185~278 미토콘드리아; Error bars, 데이터는 평균±표준편차를 나타냄; * 는 p<0.001).

도 12는 도 10의 결과에서 미토콘드리아 길이 당 Drp1 puncta 를 정량화하여 나타낸 결과이다 (n=45~63 미토콘드리아; Error bars, 데이터는 평균±표준편차를 나타냄; * 는 p<0.001).

도 13은 Flag-벡터(레인 1) 또는 Flag를 붙인 CTRP1(레인 2)를 293T 세포에 트랜스펙션한 후 항-Flag-비드 pull down assay 한 결과를 나타낸다. 침전된 단백질은 SDS-PAGE 로 분리하였고 은염색법(silver staining)으로 검출하였다. 질량분석법을 통해 비멘틴 및 튜불린이 확인되었다(화살표머리). 별표(*)는 이뮤노글로불린 G 중쇄를 나타낸다.

도 14는 내생적 CTRP1 및 비멘틴의 상호작용을 나타내는 것으로, 293T 세포의 전세포 용해물(whole cell lysates)을 대조군 또는 항-CTRP1 항체로 면역침강시킨 후 항체로 검출한 결과를 나타낸다. 293T 세포는 Flag-CTRP1 및 Myc-his-비멘틴으로 공동트랜스펙션하였고, 전세포 용해물은 항-Flagbead 로 면역침강시킨 후 항-Myc 항체로 면역블랏팅하였다. 별표(*)는 이뮤노글로불린 G 중쇄를 나타낸다.

도 15는 U2OS 세포를 항-CTRP1 및 항-비멘틴 세포로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=10 μ m).

도 16은 U2OS 세포를 비멘틴에 특이적인 siRNA 로 트랜스펙션하거나, 비멘틴 합성을 억제하는 오카다산(okadaic acid; 1 μ M) 또는 칼리쿨린(Calyculin; 5 μ M)을 처리하고 MitoTracker 로 염색한 결과를 나타낸다.

도 17은 도 16의 결과에서 미토콘드리아의 길이를 정량화하여 나타낸 결과이다 (n=258~296 미토콘드리아; Error bars, 데이터는 평균±표준편차를 나타냄).

도 18은 U2OS 세포를 비멘틴에 특이적인 siRNA 로 트랜스펙션한 후 항-Drp1 항체(초록색) 및 MitoTracker(적색)으로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=10 μ m).

도 19는 적색 형광(REP)으로 연결한 미토콘드리아, 녹색 형광(GFP)으로 연결한 CTRP1로 트랜스펙션된 USOS 세포의 타임랩스(Time-lapse) 이미지를 나타낸다(Scale bar=5 μ m).

도 20은 적색 형광(REP)으로 연결한 미토콘드리아, 녹색 형광(GFP)으로 연결한 비멘틴으로 트랜스펙션된 USOS 세포의 타임랩스(Time-lapse) 이미지를 나타낸다(Scale bar=5 μ m).

도 21은 대조군 siRNA, 비멘틴 siRNA 또는 CTRP1 siRNA 로 트랜스펙션된 USOS 세포의 미토콘드리아 타임랩스(Time-lapse) 이미지를 오버랩한 결과를 나타낸다. 각 컬러는 각 시간에서의 미토콘드리아 유동성 변화를 확인한 결과이다(Scale bar=5 μ m).

도 22는 U2OS 세포에서 미토콘드리아 타임랩스(Time-lapse) 이미지를 오버랩한 결과를 나타낸다. 화살표는 분열 중의 미토콘드리아를 나타낸다 (Scale bar=5 μ m).

도 23은 적색 형광(REP)으로 연결한 미토콘드리아, 녹색 형광(GFP)으로 연결한 비멘틴으로 트랜스펙션된 USOS 세포의 타임랩스(Time-lapse) 이미지를 나타낸다(Scale bar=5 μ m).

도 24는 적색 형광(REP)으로 연결한 미토콘드리아, 녹색 형광(GFP)으로 연결한 비멘틴, 청색 형광(BFP)으로 연결한 CTRP1 또는 소포체(ER)로 트랜스펙션된 USOS 세포의 타임랩스(Time-lapse) 이미지를 나타낸다. 화살표는 미토콘드리아 절단 부위를 나타내고 화살표머리는 미토콘드리아 분열 부위를 나타낸다 (Scale bar=5 μ m).

도 25는 미토콘드리아 분열 부위에서 CTRP1, 비멘틴 및 ER 가 함께 존재(colocalize)하는 퍼센테이지를 나타낸다 (n=31).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 마우스제작

CTRP1^{f1/f1} 마우스는 KOMP (KnockOut Mouse Project, USA)에서 CTRP1 녹아웃 컨스트럭트 (conditional knockout construct)를 구입하여 마우스 줄기 세포(E 14 clone)에 전기충격으로 주입하고 배양하여 마우스 포배기 때 미세 주입하여 CTRP1 녹아웃(conditional knockout) 마우스를 제작하였다. CTRP1 유전자의 Exon 2번을 cre recombinase가 작용하면 결실(deletion)되게 디자인 하였다.

마우스 genotyping 프라이머 정보를 [표 1]에 나타내었다.

표 1

프라이머	서열	서열번호
loxP site primer	LR - 5'-ACT GAT GGC GAG CTC AGA CC -3'	1
Genomic primer	DF - 5'-GCA CAC CTG TAT ACC AGA CA -3'	2
Genomic primer	DF2 - 5'-GCA CAC CTG TAT ACC AGA CA -3'	3
Genomic primer	DR - 5'-GAG GGA GAG AAG AAA GCC TA -3'	4

실시예 2. 세포 배양 및 트랜스펙션과 약물 처리

MEF, 293T, Hela 그리고 U2OS 세포는 10% FBS가 들어있는 DMEM (Dulbeco's Modified Eagles Medium)배지에 배

양하였고, 트랜스펙션은 리포펙타민 2000 (invitrogen) 을 사용하여 세포에 특정 플라스미드와 siRNA를 트랜스펙션하였다. 실험에 사용한 10 μ M 노코다졸 (Sigma), 1 μ M 오카다산(OKA; Sigma) 또는 5 nM 칼리쿨린-A (Cal-A; Sigma)는 배양 세포에 1시간 정도 처리하였고, DMSO (dimethyl sulfoxide)는 대조군으로 처리하였다.

사용한 siRNA 정보를 [표 2]에 나타내었다.

표 2

프라이머	서열	서열번호
CTRP1 siRNA (h) (Santa Cruz Biotechnology)		
target sequence A	5'-CAGTTGAGACTCTGCTTAAtt -3'	5
target sequence B	5'-GAAACTACC TCTGGCTTAAtt -3'	6
target sequence C	5'- GAAGTACACGTCCCAATCAtt -3'	7
Drp1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology)		
target sequence	5'- AACGCAGAGCAGCGAAAGAGtt -3'	8
Vimentin siRNA (Santa Cruz Biotechnology)		
target sequence	5'- ATGGAAGAGAACTTTGCCG -3'	9
Silencer Negative Control siRNA (Ambion)		

실시예 3. 세포 소기관 분리

세포내 소기관 분리를 위해 MEF 또는 U2OS 세포를 PBS (Ca^{2+} and Mg^{2+} free)로 세척한 후에 isolation buffer (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EGTA and 250mM sucrose)에 넣고 glass Dounce homogenizer로 세포를 lysis 시킨 후에 원심분리기로 10분 동안 800g 속도로 핵과 잔여 세포를 제거하고, 상층액만 분리하여 8000g 속도로 분리하였다. 그 결과 수득한 침전물은 crude mitochondrial fraction에 해당하고 상층액을 100,000g 속도로 분리하여 나온 침전물은 LM fraction 해당한다. crude mitochondrial fraction은 30% Percoll density gradient in isolation buffer (IB)에 넣고 95,000g에 30분간 원심 분리하면 2개의 밴드 중 상층에 있는 밴드는 MAM (mitochondria associated ER membrane) fraction에 해당하고 하층액은 mitochondrial fraction에 해당한다.

실시예 4. 면역침강(Immunoprecipitation)과 웨스턴 블랏

면역침강 실험을 위해 해당 플라스미드 DNA를 24전에 트랜스펙션하고 whole-cell extract buffer (10 mM HEPES, pH 7.9; 400 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 5% glycerol; 1 mM DTT; and protease inhibitors)에 넣고 세포를 용해시켰다. Non-treated cell 용해물 또는 항-CTRP1 항체 (1 μ g)를 세포 용해물에 처리하고, TEG 반응 버퍼 (20 mM Tris-HCl at pH 7.4, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, and 150 mM NaCl) 에서 항-Flag 태그된 아가로스 (Sigma) 또는 Protein A 아가로스 (Upstate Biotech, Lake Placid, NY)와 3시간 또는 하룻밤 동안 반응시켰다. TEG 세척 버퍼 (TEG reaction buffer containing 0.1% Triton-X 100)로 세척한 후 비드에서 단백질을 분리하여 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

웨스턴 블랏 실험을 위해 whole-cell extract buffer 또는 homogenizer로 세포를 용해시킨 후에 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 사이즈 별로 분리 후에 니트로셀룰로스 막 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)으로 단백질을 transfer 하였다.

사용한 1차 항체로는 CTRP1 (R&D systems), Drp1 (BD bioscience), Bip, 칼레티쿨린(calreticulin), 칼넥신(calnexin), 키넥틴1(kinectin1), 프로히비틴(prohibitin), ACSL4 (Santa Cruz Biotechnology), 튜불린(tubulin), 비멘틴(Vimentin), Flag (Sigma), Myc 및 COX4 (Abcam)에 대한 항체를 사용하였고, 2차 항체로는 플루오레신에 결합된 항-토끼 IgG, 항-마우스 IgG, 항-염소 IgG (invitrogen)를 사용하였다. 웨스턴 블랏의 2차 항체로는 항-토끼, 항-마우스, 항-염소 항체를 각각 horseradish peroxidase (Zymed Laboratories)와 결합시켜 사용하였다. 단백질과 항체 복합체의 확인은 ECL Plus system (Amersham Biosciences)을 사용하였다.

실시예 5. 면역염색

세포를 면역염색하기 위해서 상온에 20분 동안 PBS (4% formaldehyde)에 처리하여 세포를 고정하고, PBS로 세척

한 후 15분 동안 PBS (0.1% Triton X-100)를 처리하여 permeabilization을 해주었다. 1차 항체를 1~3시간 정도 처리하고, PBS로 세척한 후 2차 항체를 1시간 처리하여 Vectashield (VECTOR)을 이용하여 mounting하였다.

[0074] 실시예 6. 실시간 관찰 현미경과 공초점 현미경

[0075] spinning disc confocal system (A1C; Nikon)을 이용하여 살아 있는 세포에 형광 표지된 신호를 37℃, 5% CO₂ by LCI chamber (chamlide TC; LCI)을 이용하여 60x NA 1.4 oil objective 렌즈로 관찰하였다. 고정된 세포는 laser scanning Confocal microscope (LSM780; Carl Zeiss)를 이용하여 63x oil objective (NA 1.4) 렌즈로 관찰하였고, 이미지는 Photoshop (Adobe), IMARIS (Bitplane AG), 또는 ImageJ (National Institutes of Health) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0076] 실험결과

[0077] CTRP1 기능을 연구하기 위해 CTRP1 녹아웃 마우스를 제작하였고, CTRP1 유전자 없으면 정상적인 초기 배아 발생을 못함을 확인하였다. 이는 CTRP1이 세포 수준에서 중요한 기능을 가질 수 있음을 보여준다.

[0078] 구체적으로, 본 발명에서는 우선 세포 내 CTRP1의 위치를 조사한 결과, CTRP1은 미토콘드리아와 소포체에 부분적으로 위치함을 확인 하였다 (도 1). 5 nano와 10 nano 골드 입자를 연결한 CTRP1을 처리한 세포를 전자 현미경으로 관찰하면 소포체와 미토콘드리아 사이에 존재함을 다시 한번 확인 하였다 (도 2). 세포소기관 분리실험을 통해서 CTRP1은 세포질과 소포체에 존재함을 알게 되었다 (도 3). 분리한 소포체에 트립신(Trypsin) 처리 실험을 통해 CTRP1이 소포체 막 단백질을 확인 하였다 (도 4, 5). 이를 통해 CTRP1은 소포체와 미토콘드리아 사이에 존재하는 소포체 막 단백질임을 알 수 있다.

[0079] CTRP1 세포 내 기능을 규명하기 위해 CTRP1 conditional knockout 마우스에서 CTRP1 conditional knockout mouse embryonic fibroblasts (MEF) 제조 하였다. CTRP1 conditional MEF 세포에 Cre lentivirus를 처리하여 CTRP1 발현을 못하게 하거나 U2OS 세포에 CTRP1 siRNA를 처리하여 CTRP1 발현을 억제시키고 소포체와 미토콘드리아 형태변화를 조사해 보면 미토콘드리아가 길어지는 형태를 관찰 하였다 (도 6, 10). 그대신 소포체와 골지체의 형태는 변화가 없었다. 대조군에 비해 평균적으로 Mitochondria 길이가 유의적으로 증가 했음을 확인하였다 (도 7, 11). 이는 CTRP1이 미토콘드리아 절단에 관여할 수 있음을 보여 준다. Drp1은 미토콘드리아 절단에 중요한 단백질로 Drp1 단백질의 발현 문제나 미토콘드리아의 위치에 문제가 생기면 미토콘드리아 절단 조절에 문제가 생겨 미토콘드리아가 길어지는 현상이 생긴다. CTRP1 발현이 억제된 세포에서 Drp1과 Drp1의 localization에 관여하는 MFF의 위치를 관찰했지만 대조군과 차이가 없음을 확인 하였다 (도 8, 9, 10, 12). 이와 같은 결과는 CTRP1은 Drp1이 관여하는 미토콘드리아 절단 조절작용과 독립적으로 미토콘드리아 절단에 관여할 수 있음을 보여준다.

[0080] CTRP1 발현이 억제된 세포에서 미토콘드리아가 길어지는 표현형을 분석하기 위해 CTRP1 결합 인자를 조사 하였다. Flag를 붙인 CTRP1과 결합하는 단백질을 아크릴 아마이드 젤로 분리하고 실버 염색을 하여 megamass로 분석을 통해 미세소관(microtubule)과 비멘틴이 CTRP1과 결합한다는 결과를 얻었다 (도 13). 면역침강 (Immunoprecipitation) 실험으로 CTRP1과 비멘틴이 결합함을 증명하였다 (도 14). 비멘틴은 type III intermediate filament로 mitochondrial mobility와 morphology dynamics에 관여한다고 보고 되었는데 자세한 기작은 아직 알려진 게 없다. 비멘틴 발현을 억제시킨 세포에서 CTRP1과 같은 길어진 미토콘드리아를 관찰할 수 있고, 비멘틴 합성을 억제하는 오키다산(okadaic acid)와 칼리쿨린(Calyculin)을 처리하면 똑같이 길어진 미토콘드리아를 관찰하였다 (도 16, 17). 역시 CTRP1과 같이 Drp1의 미토콘드리아 위치는 변함이 없음을 확인 하였다 (도 18).

[0081] 미토콘드리아 동역학 조절에서 CTRP1과 비멘틴의 상호작용을 조사하기 위해 GFP (녹색 형광), RFP (적색 형광) 또는 BFP (청색 형광)를 연결한 CTRP1과 비멘틴을 실시간 영상을 찍어 미토콘드리아 절단이 일어나는 곳에서 CTRP1과 비멘틴의 역할을 관찰했다. CTRP1은 미토콘드리아 절단이 일어나는 곳에 위치하고, 비멘틴은 미토콘드리아 절단이 일어날 때 미토콘드리아 절단이 일어나는 곳을 둘러쌘을 관찰할 수 있다 (도 19, 20). 비멘틴은 미토콘드리아 유동성에 관여하는데 비멘틴 발현을 억제하면 미토콘드리아 유동성이 높아지고, CTRP1도 미토콘드리아 유동성이 증가함을 확인하였다 (도 21). 이는 CTRP1과 비멘틴이 미토콘드리아를 고정시키는 역할을 할 수 있음을 보여준다. 절단이 일어나지 않는 미토콘드리아에 비해 절단이 일어나는 미토콘드리아는 어느 정도 유동성

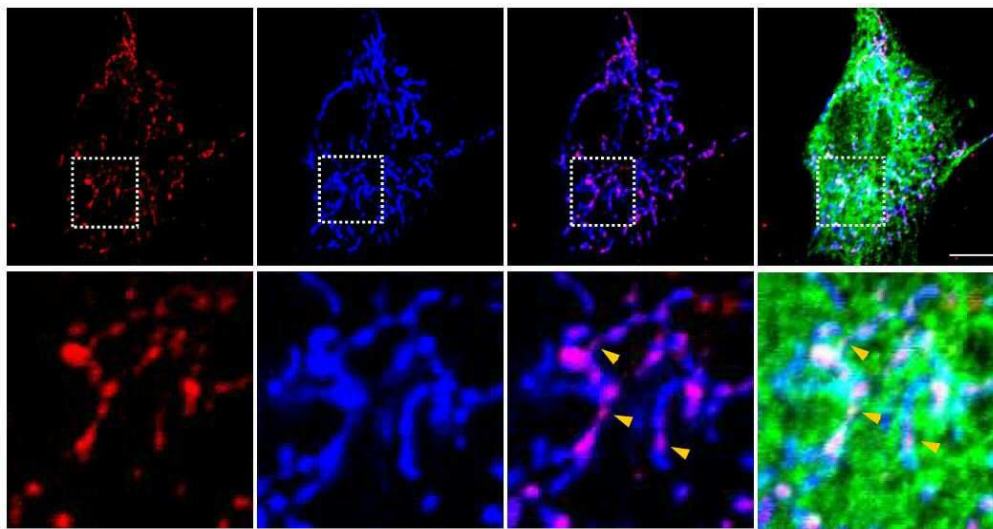
이 감소함을 알 수 있다 (도 22). 미토콘드리아 절단이 일어날 때 비멘틴이 시간에 따라 미토콘드리아 절단이 일어나는 곳을 둘러싸는 현상을 통해 다시 한번 비멘틴이 미토콘드리아 절단 과정에 관여함을 알 수 있다 (도 23). 최근 보고에 의하면 소포체에 존재하는 IFN2 단백질이 액틴 합성을 통해 미토콘드리아 절단이 일어날 때 Drp1의 위치에 관여하여 미토콘드리아 절단을 조절한다고 보고 하였다. 지금까지 미토콘드리아 절단과정은 Drp1 단백질이 중요하게 관여한다고 알려져 있었지만 그 과정은 아직 자세히 알지 못하고, 여러 과정이 존재할 것으로 예상하고 있다. 따라서 Drp1과 IFN2에 의한 액틴 합성을 통한 미토콘드리아 절단 조절 외에 새롭게 CTRP1과 비멘틴이 작용해서 미토콘드리아 절단이 조절되는 과정이 있음을 증명하였다.

[0082]

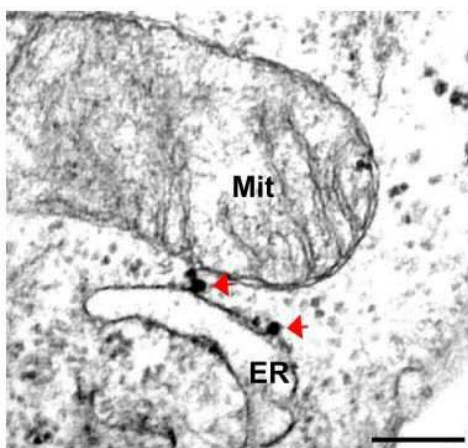
CTRP1과 상호작용하는 비멘틴은 다양한 질병에 관여하는데 특히 미토콘드리아 유동성에 관련 있는 질병인 알츠하이머병(Alzheimer's disease)와 헌팅톤병(Huntington's Disease)에 관련이 있다는 보고가 있다. 이는 CTRP1이 비멘틴과 상호작용 또는 단독으로 신경질환에 중요하게 관여할 수 있음을 보여준다.

도면

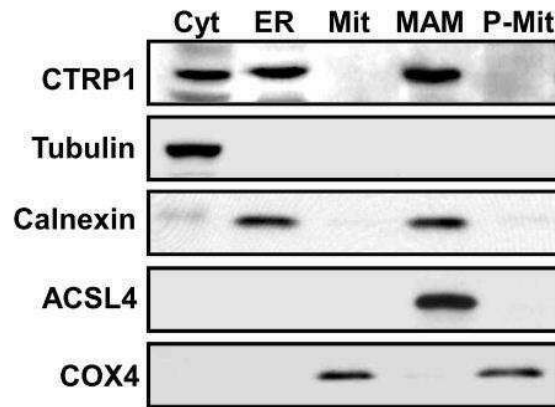
도면1



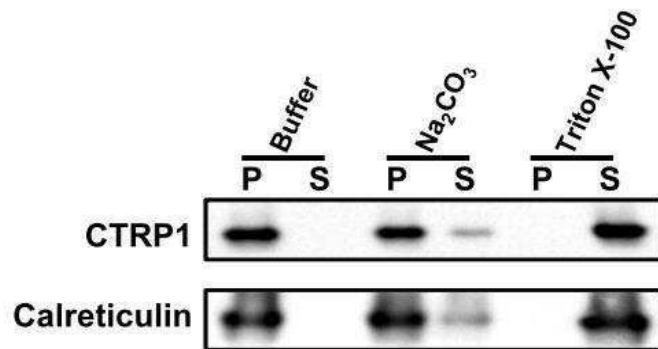
도면2



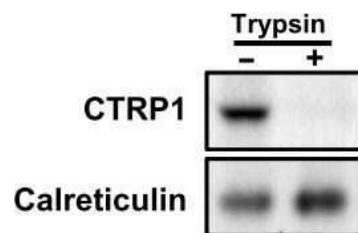
도면3



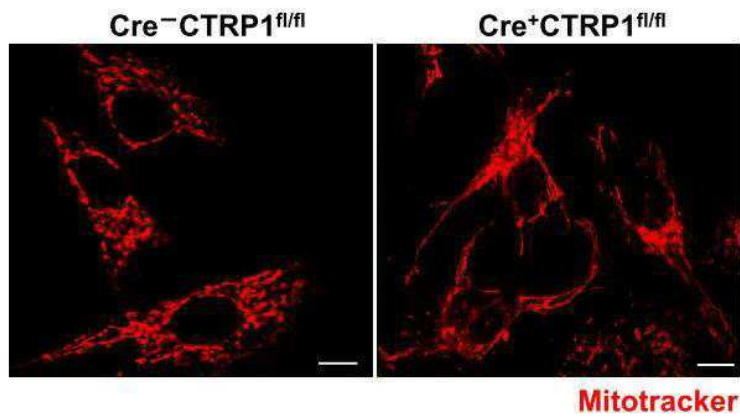
도면4



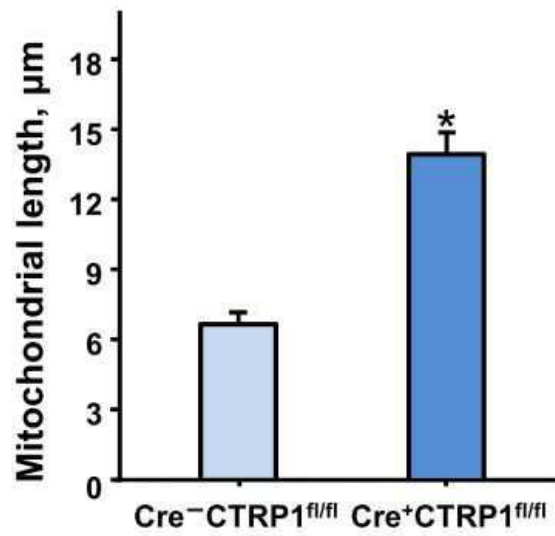
도면5



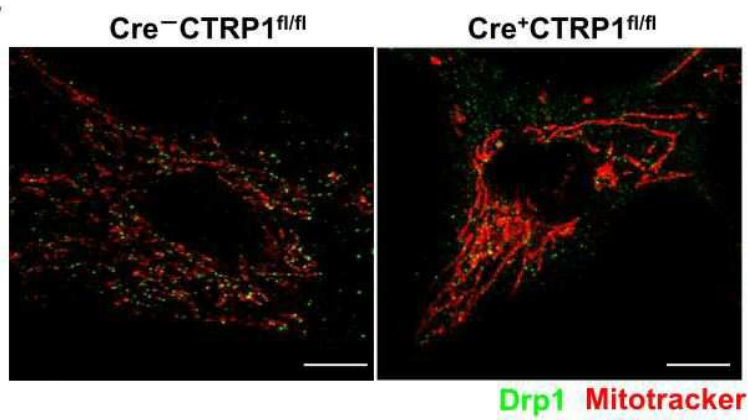
도면6



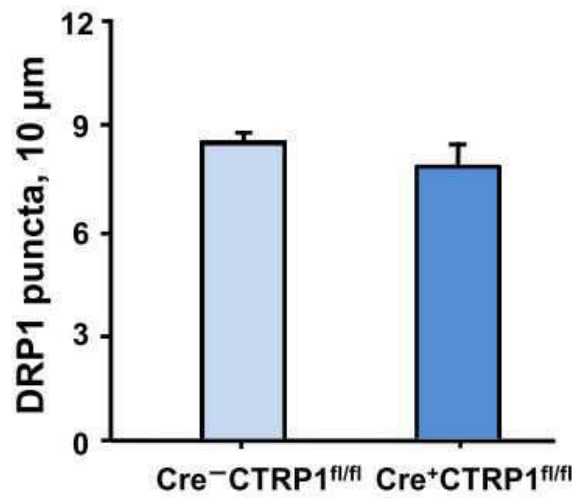
도면7



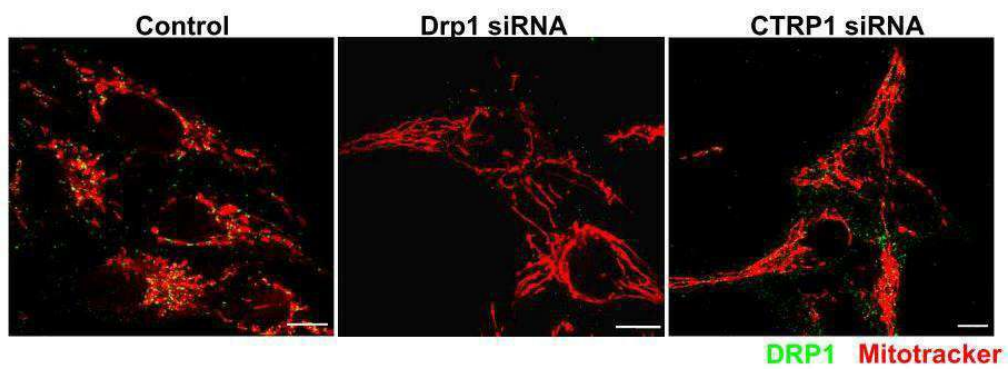
도면8



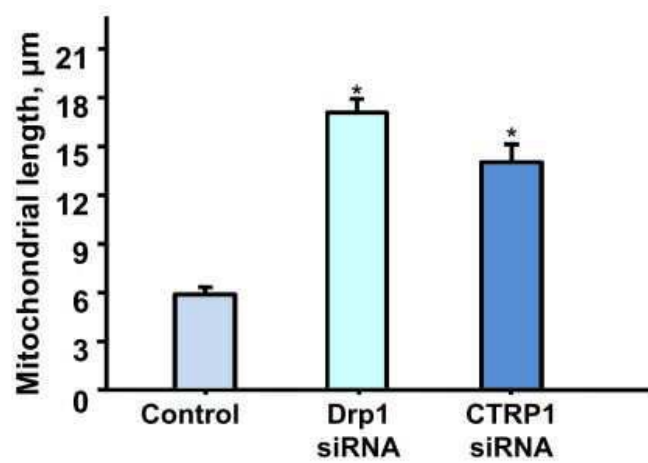
도면9



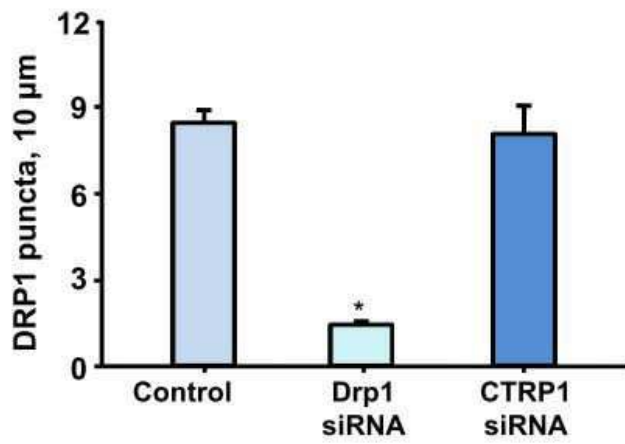
도면10



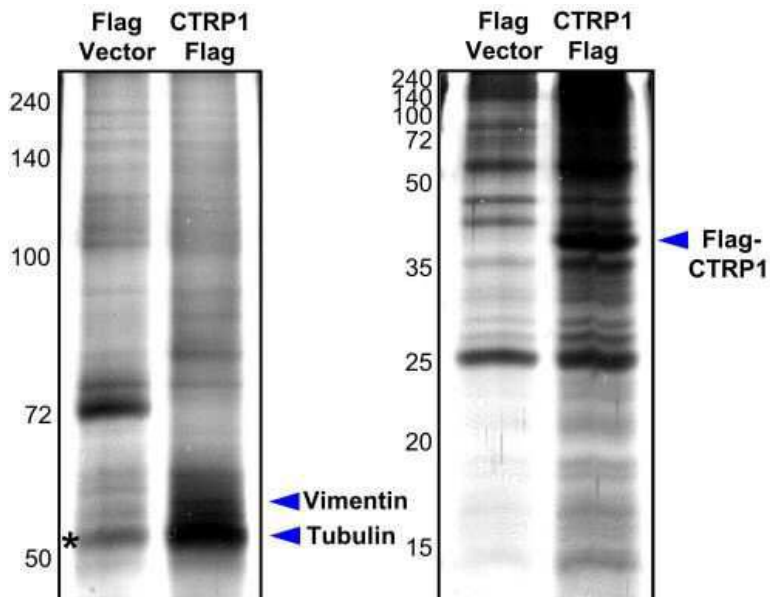
도면11



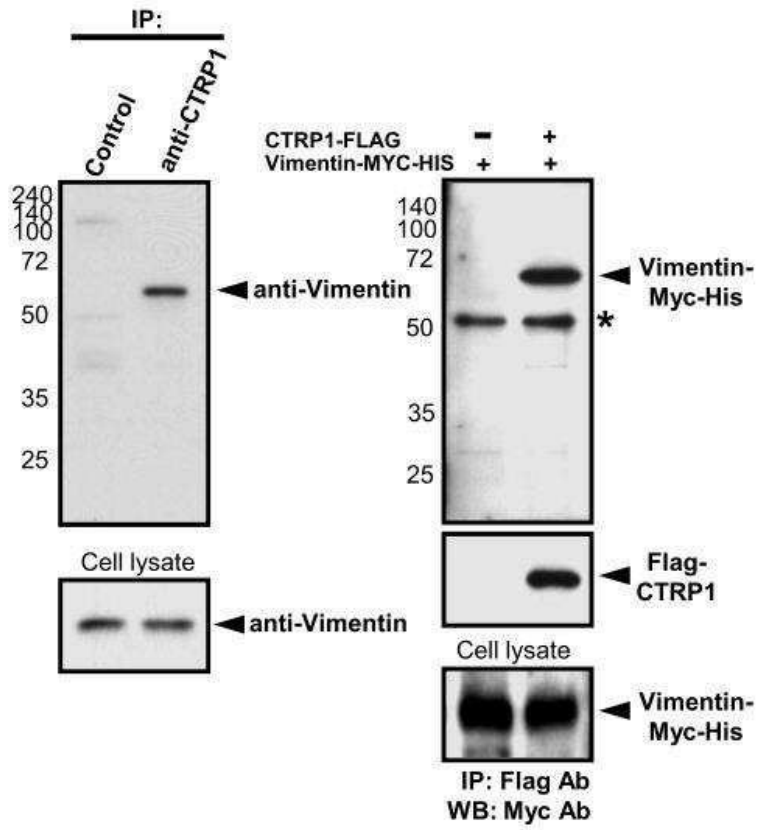
도면12



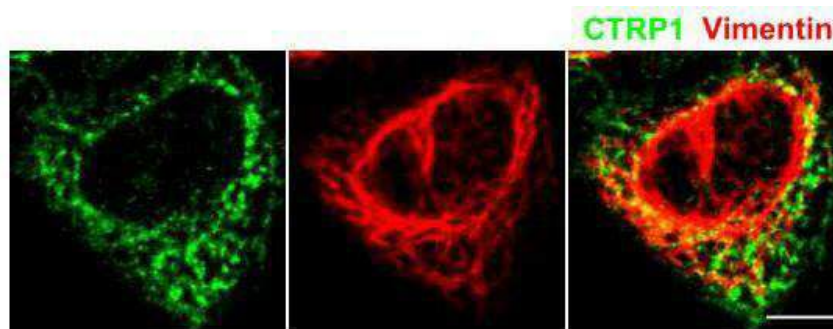
도면13



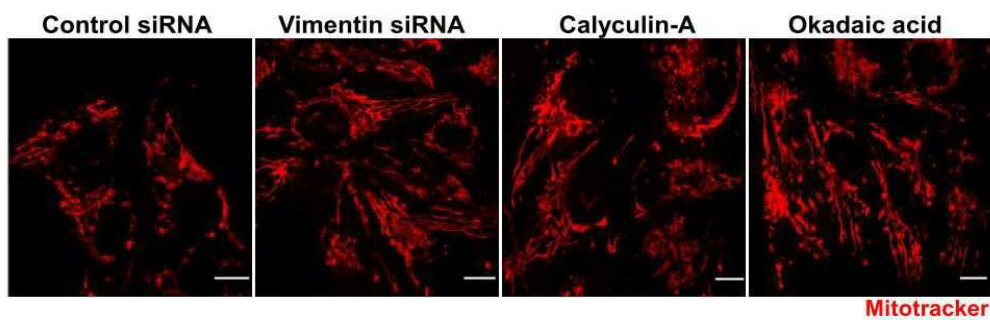
도면14



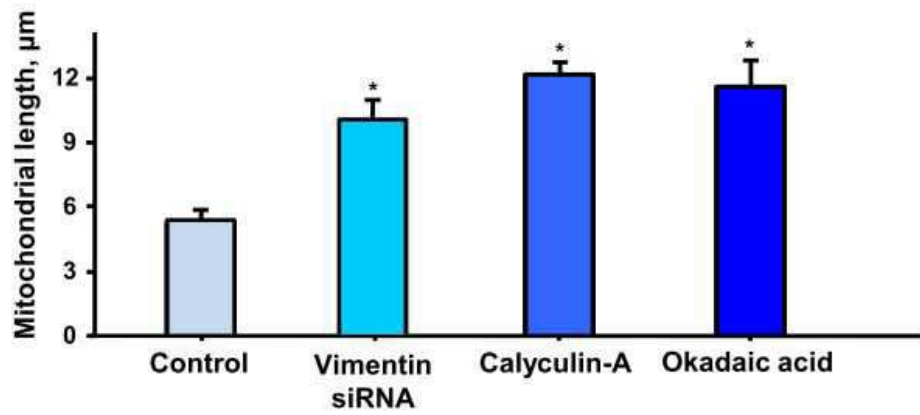
도면15



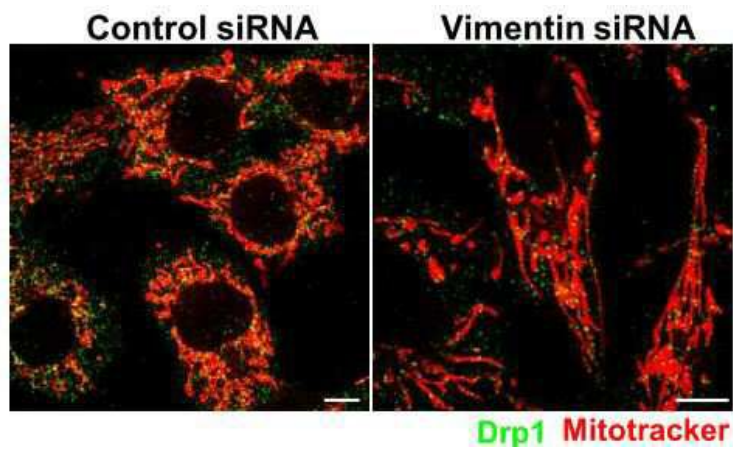
도면16



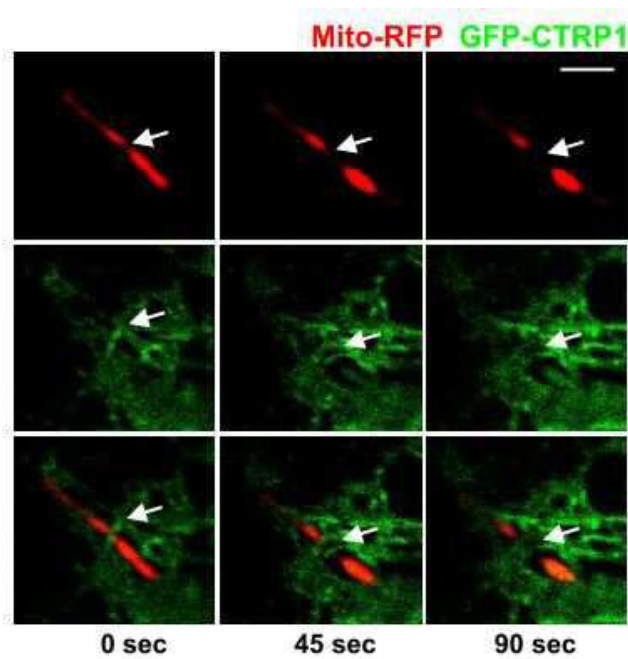
도면17



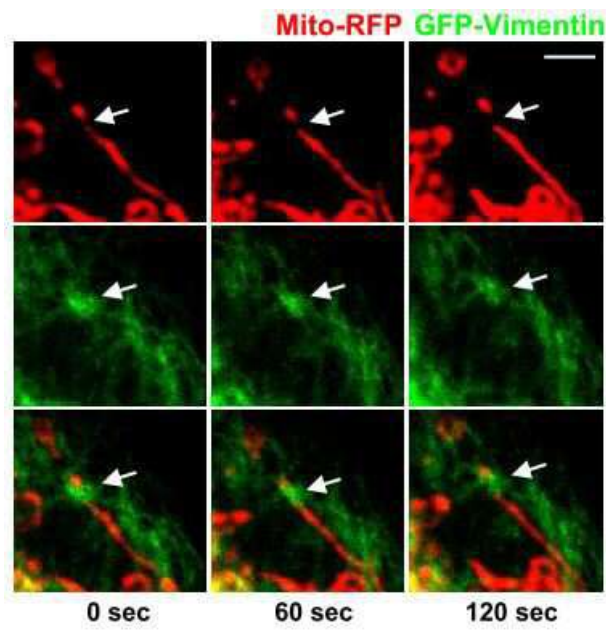
도면18



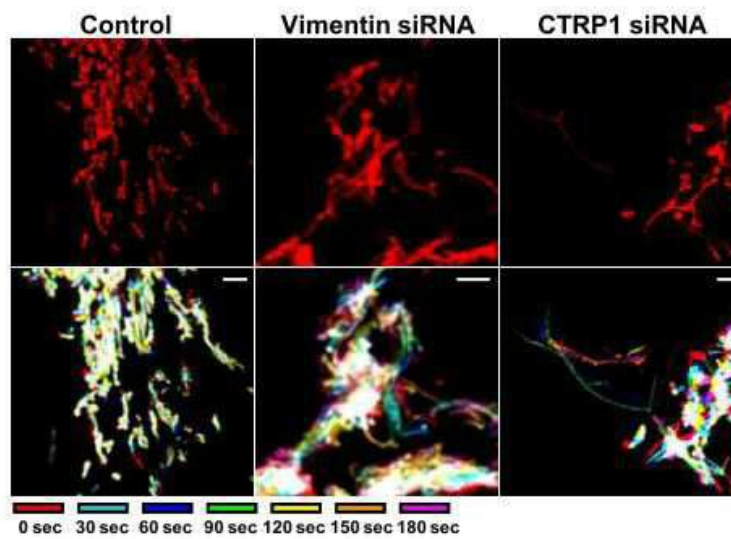
도면19



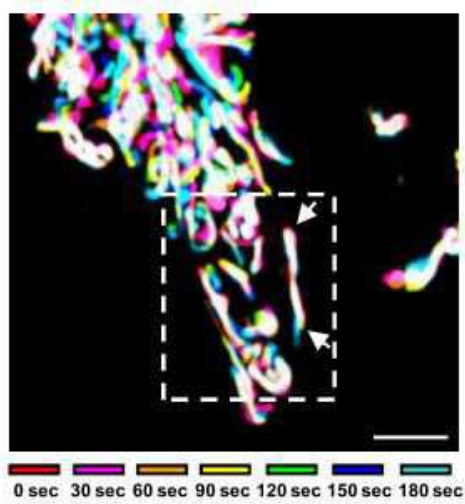
도면20



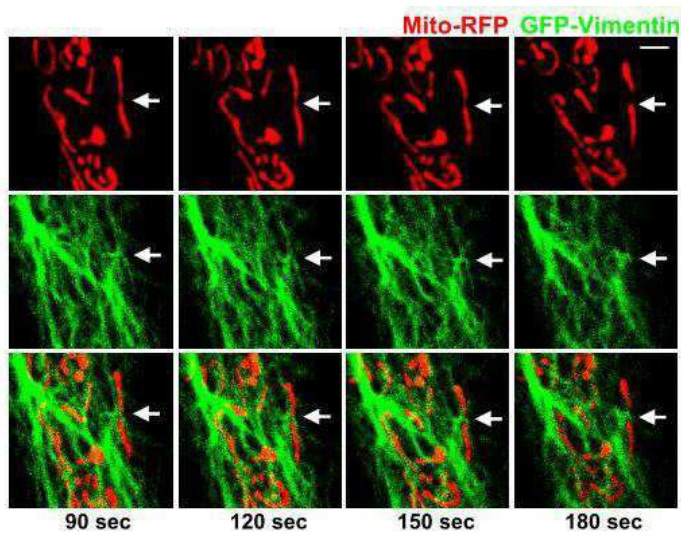
도면21



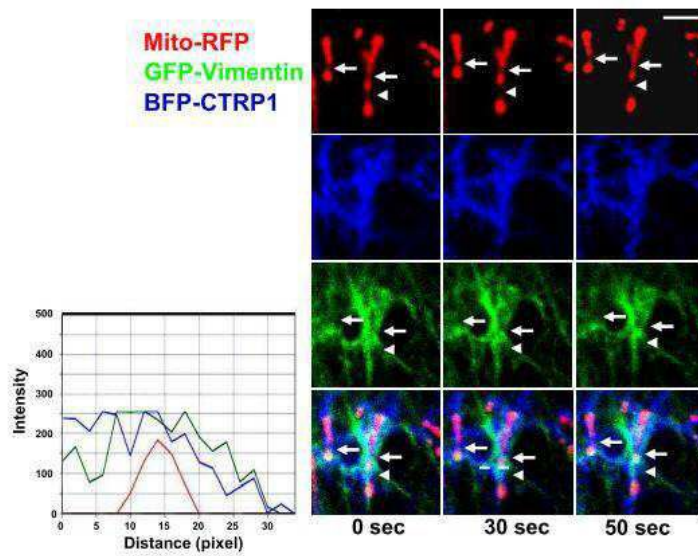
도면22



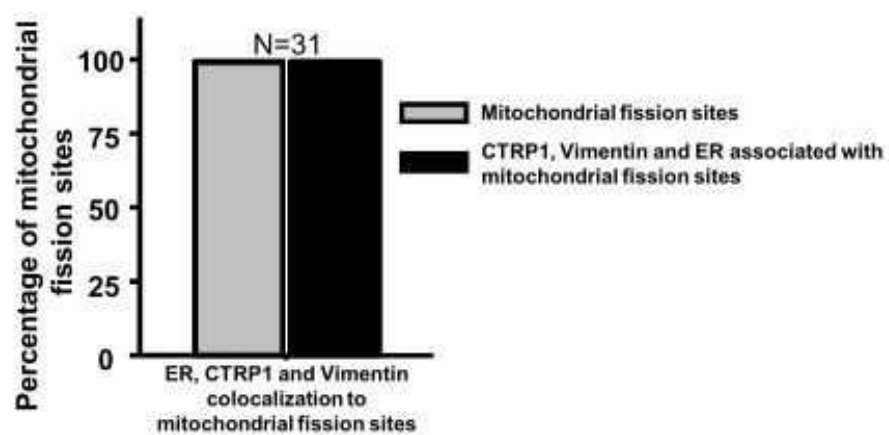
도면23



도면24



도면25



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Composition for treating mitochondrial dysfunction diseases comprising CTRP1 inhibitor
- <130> DPP20140104KR
- <160> 9
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> loxP site primer
 <400> 1
 actgatggcg agctcagacc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Genomic primer
 <400> 2
 gcacacctgt ataccagaca 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Genomic primer
 <400> 3
 gcacacctgt ataccagaca 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Genomic primer
 <400> 4
 gagggagaga agaaagccta 20
 <210>
 > 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> target sequence A of CTRP1 siRNA
 <400> 5
 cagttgagac tctgcttaat t 21
 <210> 6
 <211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	target sequence B of CTRP1 siRNA	
<400>	6	
	gaaactacct ctggcttaat t	21
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	target sequence C of CTRP1 siRNA	
<400>	7	
	gaagtacacg tccaatcat t	21
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	target sequence of Drp1 siRNA	
<400>	8	
	aacgcagagc agcggaaaaga gtt	23
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	target sequence of Vimentin siRNA	
<400>	9	
	atggaagaga actttgccg	19