



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0068635
(43) 공개일자 2010년06월24일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0127056

(22) 출원일자 2008년12월15일

심사청구일자 2008년12월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

최의주

서울특별시 강남구 도곡동 463-1 우성5차 501-605

윤경완

서울특별시 성북구 돈암1동 돈암삼성아파트
102-1005

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

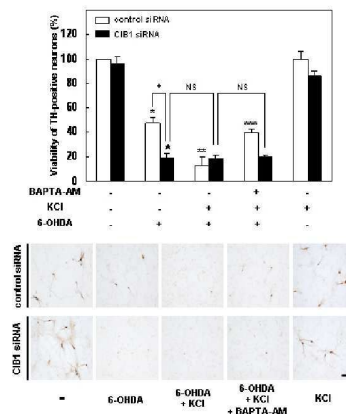
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 인간 CIB 단백질, CIB 유전자 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 세포고사(apoptosis)를 억제하는 CIB1(Calcium and integrin binding protein 1) 단백질, 그 단백질을 코딩하는 CIB1 유전자 그리고 그 용도에 관한 것으로, 구체적으로 효모 2-혼성 스크리닝(yeast 2-hybrid screening)에 의해 세포고사 신호조절 인산화 효소 ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1)과 결합하여 세포고사를 억제하는 CIB1 단백질, CIB1 유전자 및 그 용도에 관한 것으로 칼슘에 의해서 그 성질이 조절된다. 본 발명의 인간 CIB1 단백질 또는 CIB1 유전자는 ASK1에 의해서 매개되는 세포고사의 선택적 저해제로 사용되거나 파킨슨병 등의 퇴행성 신경계 질환 및 면역계 질환 등의 치료, 예방, 진단 또는 그 연구 과정 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6b



(72) 발명자

이재근

서울특별시 송파구 신천동 크로바아파트 1-507

강영희

서울특별시 노원구 공릉동 670-11호 로우폴리스
1102호

김은경

서울특별시 종로구 숭인동 1388 동양파라빌 404호

특허청구의 범위

청구항 1

인간 CIB1(Calcium and integrin binding protein 1) 단백질을 유효성분으로 포함하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1에 기재된 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 2의 유전자에 의하여 코딩되는 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 칼슘과 상호작용하는 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1) 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 세포는 신경세포, 암세포 또는 면역세포인 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 세포관련질환은 뇌신경계 질환, 암 또는 면역 질환인 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 뇌신경계 질환은 퇴행성 뇌신경계 질환인 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제 7항 또는 제8항에 있어서, 상기 뇌신경계 질환은 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 암은 유방암, 간암, 폐암, 위암, 뇌척수종양, 두경부암, 흉선종, 중피종, 식도암, 대장암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종, 및 피부암으로 구성된 군으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 면역 질환은 류마티스 관절염, 건선 및 천식으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포고사(apoptosis)를 억제하는 칼슘 의존적인 CIB1(Calcium and integrin binding protein 1) 단백질, 그 단백질을 코딩하는 CIB1 유전자 및 그 용도에 관한 것으로, 구체적으로 효모 2-혼성 스크리닝(yeast 2-hybrid screening)에 의해서 아포토시스 신호-조절 인산화효소 ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)과 결합하여 세포고사를 억제하는 CIB1 단백질, 그 단백질을 코딩하는 CIB1 유전자 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 미토겐-활성화 단백질 카이네이즈(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 신호기작은 아포토시스성 세포사멸과 밀접하게 연관되어 있다. MAPK 신호기작은 세포외 자극(extracellular stimuli)에 의해 활성화되며 세포사멸 및 생존에 관여하는 수많은 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. MAPK 신호기작에 관여하는 단백질 카이네이즈는 MAPKs, MAPK 카이네이즈(MAPKKs) 및 MAPK 카이네이즈 카이네이즈(MAPKKKs)로 세 종류의 서로 다른 구성성분으로 나뉘어진다. 이들의 작용기작을 살펴보면, 상기 단백질 카이네이즈 중에서 상부 위치의 카이네이즈 또는 접합체 단백질(adaptor protein)에 의해 활성화되는 MAPKKKs가 MAPKKs를 인산화시켜 활성을 유도하게 되고, 이와 같이 유도된 활성형 MAPKKs가 다시 MAPKs를 활성화시키면 활성형 MAPKs가 핵으로 이동하여 다양한 전사인자(transcriptional factor) 또는 하부위치의 카이네이즈들을 활성화시킴으로써 유전자 발현 또는 다른 세포성 사건들을 조절한다. MAPK 신호기작과 같이 아포토시스성 세포사멸과 관련된 신호기작으로 포유동물 세포에서 최소한 3개의 서로 다른 신호경로(signaling pathway)가 밝혀졌는데, 세포외 신호-조절 카이네이즈(extracellular signal-regulated kinase, ERK), c-jun N-말단 카이네이즈/스트레스-활성 단백질 카이네이즈(c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) 및 p38 MAPK가 그것이다.

[0003] ASK1은 MAPKKK의 일종으로 SEK1-JNK 및 MKK3/6-p38 경로를 선택적으로 활성화시켜서(Ichijo et al., 1997, Science 275:90-94), TNF α - 및 Fas-유도성 세포내 신호 캐스케이드(signal cascade)의 매개자로서 싸이토카인 유도성 아포토시스에서 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다 (Bijangi-Vishehsaraei et al., 2005, Blood 106(13): 4124-30; Chang et al., 1998, Science 281: 1860). 이러한 ASK1 의존적인 세포신호전달은 thioredoxin, glutaredoxin, p21, heat shock protein 72, tumor necrosis factor receptor associated factors 2 (TRAF2), Daxx, CIITA, glutathione S-transferase Mu, 14-3-3, and SOCS1 등의 ASK1과 결합하는 다양한 단백질들에 의해서 조절된다(Chang et al. 1998, Science 281: 1860; Nishitoh et al. 1998, Mol. Cell 2: 389-395; Saitoh et al. 1998, EMBO J. 17: 2596-2606; Asada et al. 1999, EMBO J. 18: 1223-1234; Cho et al. 2001, J. Biol. Chem. 276: 12749-12755; Park et al. 2002, EMBO J. 20: 446-456; Song et al. 2002, J. Biol. Chem. 277: 46566-46575; Cho et al. 2003, J. Cell Biol. 163: 71-81; Zhang et al. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8511-8515; He et al. 2006, J. Biol. Chem. 281: 5559-5566).

[0004] 한편, calmyrin이라고도 알려진 CIB1(calcium and integrin binding protein 1)은 22kDa의 단백질로서, calmodulin, calcineurin, 그리고 신경세포의 칼슘조절 단백질 그룹들과 서열상의 유사성을 보이고 있다. CIB1은 C-말단에는 2개의 칼슘 결합 EF-hand로 구성되어 있으며, N-말단에는 기능을 하지 않는 2개의 EF-hand로 이루어져 있다 (Gentry et al. 2005, J. Biol. Chem. 280: 8407-8415; Blamey et al. 2005, Protein Sci. 14: 1214-1221). Integrin α_{IIB} 의 세포질과 결합하는 단백질로서 혈소판에서 최초로 알려졌으며 (Naik et al. 1997, J. Biol. Chem. 272:4651-4654), 현재 상기 단백질은 presenilin 2 (Stabler et al. 1999, J. Cell Biol. 145: 1277-1292), DNA-dependent protein kinase (Wu and Lieber 1997, Mutat. Res. 385: 13-20), the polo-like kinases Fnk and Snk (Kauselmann et al. 1999, EMBO J. 18: 5528-5539), Rac3 (Haataja et al. 2002, J. Biol. Chem. 277: 8321-8328), 및 Pax3 (Hollenbach et al. 2002, Biochim. Biophys. Acta 1574: 321-328) 등의 다양한 단백질들과 결합을 이루고 있다. 더욱이 CIB1이 칼슘과 결합하면 conformational 변화를 일으켜서 본 단백질과 결합하는 단백질들 예를 들면, integrin, presenilin 2, and PAK과의 결합능 상의 변화를 유도할 수 있음이 보고된 바 있다 (Yamniuk et al. 2004, Biochemistry 43: 2558-2568). 다양한 조직에서 발견되는 CIB1은 세포내에서 다양한 기능을 수행할 것으로 예상되지만, 생물학적 기능에 관한 구체적 규명이 필요한 실정이다 (Shock et al. 1999, Biochem. J. 342: 729-735; Whitehouse et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269: 538-545).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 다양한 종류의 스트레스에 의해서 유도되는 세포고사 활성화에 영향을 미치는 ASK1의 활성을 조절할 수 있는 신규한 물질을 제공하는 것이다. 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 인간 CIB1 단백질 및 이를 코딩하는 cDNA를 제공한다. 또한 본 발명은 인간 CIB1 유전자를 포함하는 유전자 콘스트럭트(gene construct)를 유효성분으로 하는 유전자치료제를 제공한다. 마지막으로, 본 발명은 인간 CIB1 단백질을 포함하는 세포고사 활성 저해제 및 다양한 스트레스에 의해서 유도되는 세포사멸 관련 질환의 치료제를 제공한다.

과제 해결수단

[0006] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인간 CIB1(Calcium and integrin binding protein 1) 단백질을 유효성분으로 포함하는 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 단백질은 통상 알려진 모든 CIB1 단백질 및 그 단백질의 기능을 가지는 그 기능적인 단편을 포함하고, 바람직하게는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가진 것을 특징으로 한다. 또, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해서, 이들 아미노산서열을 가진 단백질이 표시하는 CIB1 단백질의 특성이 손상되지 않는 범위 내에서, 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 및 부가의 적어도 1종의 변이가 도입된 변이 CIB1도 본 발명에 관한 CIB1에 포함된다.

[0008] 또, 본 발명에는 서열번호 1의 아미노산서열을 가진 CIB1 단백질을 코딩하는 CIB1 유전자가 포함되고, 그 유전자서열로서는 서열번호 2으로 표시되는 것을 들 수 있다. 또, 이들 서열번호 2의 염기서열을 변이시켜서 얻어지는 상기한 변이 CIB1 단백질을 코딩하는 변이 CIB1 유전자도 본 발명에 관한 CIB1 유전자에 포함된다.

[0009] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 단백질은 칼슘과 상호작용하는 것이 바람직하고, 상기 단백질은 ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1) 활성을 저해하는 것을 특징으로 하나 이에 한정되지 아니한다.

[0010] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 신경세포, 암세포 또는 면역세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에 있어서, 상기 세포관련질환은 뇌신경계 질환, 암 또는 면역 질환인 것이 바람직하다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 뇌신경계 질환은 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 다른 일 구체예에 있어서, 상기 암은 유방암, 간암, 폐암, 위암, 뇌척수종양, 두경부암, 흉선종, 중

피종, 식도암, 대장암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종, 및 피부암으로 구성된 군으로부터 선택된 암인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0014] 본 발명의 또 다른 일 구체예에 있어서, 상기 면역 질환은 류마티스 관절염, 건선 및 천식으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 한편 본 발명의 세포사멸 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 사용가능한 담체로는 단백질, 폴리펩티드, 리포솜, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 또한 예를 들면, 하이드로콜로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 셀페이트와 같이 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체, 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다.
- [0017] 약제학적으로 허용가능한 담체에 관해서는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 1991]에 기재되어 있다.
- [0018] 상기 예방제 및 치료제는 임상 투여시에 치료해야 할 질환 및 개체의 상태에 따라 경구제, 주사제(예를 들어, 근육주사, 복강주사, 정맥주사, 주입(infusion)경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 특히 비경구 주사 투여가 바람직하다. 투여경로에 따라 통상적으로 사용되고 비독성인, 약제학적으로 허용되는 운반체, 첨가제, 비히클을 포함하는 적당한 투여 유닛 제형으로 제제화될 수 있다. 일정 시간 동안 약물을 지속적으로 방출할 수 있는 데포(depot) 제형 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0019] 본 발명의 단백질 및 그 변이형 단백질의 유효용량은 매일 0.01 ~ 100 mg/kg 체중이고, 바람직하게는 0.1 ~ 10 mg/kg 체중으로 1일 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 예방 또는 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별, 약제조합, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 CIB1은 유전자 치료법에 의하여 투여될 수도 있다. 이를 위해서는 본 발명의 CIB1은 DNA 서열로부터 발현되어 그 자리에서 (*in situ*) 조합될 수 있도록 당분야의 통상적인 유전자 치료법에 따라 환자에게 도입되어야 한다.
- [0021] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0022] 본 발명자들은 ASK1과 물리적으로 결합할 수 있는 단백질을 찾고자 연구한 결과, ASK1-결합 단백질 CIB1(Calcium and integrin binding protein 1)을 동정하였다. 본 발명자들은 CIB1이 ASK1과 직접적으로 결합하여 스트레스- 또는 싸이토카인-유도성 ASK1 활성을 억제함으로써 ASK1-유도성 아포토시스에 의한 세포사멸을 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 따라서, 본 발명의 인간 CIB1 단백질 또는 CIB1 유전자는 ASK1에 의해 매개되는 아포토시스에 대한 선택적인 저해제로 사용하거나 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌신경계 질환, 면역계 질환 등의 치료, 예방, 진단 또는 그 연구 과정 등에 유용하게 이용할 수 있다.
- [0023] 이하, 본 발명의 스트레스에 의한 세포사멸을 치료 또는 예방하기 위한 CIB1 유전자를 이용한 유전자 치료법에 대해 보다 구체적으로 설명한다.
- [0024] 본 발명은 TNF- α 및 6-OHDA 에 의한 아포토시스성 세포사멸과정에서 ASK1 활성화가 주요한 세포사멸의 원인이며, 이 과정이 칼슘에 의해서 특성이 조절되는 CIB1 단백질 및 유전자의 유효성분에 의하여 효과적으로 세포사멸이 억제된다는 놀라운 사실에 기초한다. 더욱이 현재까지 아직 생물적 기능이 밝혀져 있지 않은 CIB1 단백질 및 유전자의 생물학적 기능을 최초로 제시하였다는 사실이 본 발명의 또 다른 의의가 있다고 할 수 있다.
- [0025] 즉, 본 발명에서와 같이 CIB1 유전자의 발현을 증가시킬 경우 아포토시스와 관련된 질환, 예를 들어, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌신경계 질환, 면역계 질환 등을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다. 다만, 본 발명에 따른 유전자요법은 스트레스에 의한 아포토시스성 세포사멸과 관련된 어떠한 질환에도 적용가능하며, 앞서 언급한 퇴행성 뇌신경계 질환, 암, 면역계 질환 또는 염증 등에 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

효 과

[0026] 본 발명의 인간 CIB1 단백질 및 이를 코딩하는 유전자는 아포토시스의 선택적 저해제로서 ASK1과 선택적으로 결합하여, 이는 칼슘에 의해서 조절되며, 아포토시스성 세포사멸을 효과적으로 억제하므로 상기 단백질은 ASK1 단백질을 선택적으로 억제하거나 세포사멸 관련 과정이 관여하는 질병을 치료하는데 있어 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 유전자는 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌신경계 질환, 면역계 질환 등에 대한 유전자요법에 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위하여 하기 실시예 등을 들어 설명한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며 본 발명의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 본 발명의 구체적 이해를 돕기 위해 예시적으로 제공되는 것이다.

[0028] <실시예 1> CIB1과 ASK1의 in vitro 결합 분석

[0029] 본 발명자들은 ASK1 단백질의 어느 위치에서 CIB1 단백질이 결합하는지 조사하기 위해서 다양한 ASK1 결실 돌연변이체의 GST-융합 재조합 단백질들을 제조하였다. 구체적으로, ASK1-N-말단부위 1번부터 377번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1(1-377), ASK1-N-말단부위 378번부터 648번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1(378-648), ASK1-N-말단부위 649번부터 938번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1(649-938), ASK1-N-말단부위 939번부터 1374번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1(939-1374)의 재조합 단백질 제작하고 35 S-메싸이오닌(35 S-methionine)으로 표지한 후 TNT 레티큘로사이트 라이세이트 시스템(TNT reticulocyte lysate system, Promega)을 사용하여 in vitro 전사시켰다. 상기와 같이 분리·정제된 재조합 단백질들을 글루타치온-아가로오스 비드(glutathione-agarose beads) 상에 고정시킨 후 in vitro 전사된 [35 S]메싸이오닌-표지 ASK1 또는 ASK1의 돌연변이체 재조합 단백질들을 완충용액(50 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% NP-40 및 5 mg/ml BSA로 구성된)에서 각각의 CIB1 GST-융합 단백질과 4℃에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응을 종결시킨 후 세척 완충용액(50 mM Hepes[pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Tween 20)으로 세 번 세척하고 각각의 글루타치온-아가로오스 비드로부터 35 S-표지된 단백질들을 용출하여 SDS-폴리아미드 겔 전기영동을 수행하여 분석하였다.

[0030] 그 결과, CIB1 GST 융합단백질은 ASK1-N-말단부위 378번부터 648번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1(378-648)와 직접적으로 결합함을 확인하였다 (도 1a). 이전에 보고된 바와 같이, ASK1의 N-말단을 구성하는 조절도메인이 CIB1과 직접적으로 결합함을 제시한다.

[0031] 세포내에서 ASK1과 CIB1의 결합을 조사하기 위해서 293T 세포주에 ASK1 항체로 면역침강을 수행한 후 상기 침전물들을 CIB1 항체로 웨스턴 블롯을 수행한 결과 ASK1과 CIB1이 결합하고 있음을 확인하였고, H₂O₂ 및 TNF-α 등 스트레스에 의해서 상기 결합이 변하지 않음을 알 수 있다 (도1b).

[0032] <실시예 2> CIB1의 H₂O₂ 및 TNF-α에 의한 ASK1 활성화 억제

[0033] 이전 보고에 따르면, 활성산소를 유발할 수 있는 외부자극 예를 들면, H₂O₂ 및 TNF-α 에 의해서 ASK1이 활성화된다고 알려져 있다 (Saitoh et al. 1998, EMBO J. 17: 2596-2606; Liu et al. 2000, Mol. Cell. Biol. 20: 2198-2208; Takeda et al. 2008, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48: 199-225).

[0034] 따라서 본 발명자들은 H₂O₂ 및 TNF-α 에 의한 ASK1 활성화가 CIB1이 억제할 수 있는지 조사하기 위해서 in vitro kinase assay법을 수행하였다. 포유동물 세포주인 293 세포에 Flag-CIB1 과 HA-ASK1을 각각 혹은 동시에 형질 감염시킨 후 ASK1의 활성을 유도하기 위해서 H₂O₂ 및 TNF-α 를 각각 처리하였다. 상기 형질감염 세포를 완충용액 A(20 mM Tris-HCl[pH 7.4], 150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 12 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium florids, 5mM EGTA 및 1 mM PMSF)를 사용하여 용혈시킨 후 12,000 g로 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 침전물을 제거하고 얻은 라이세이트를 항-HA 항체를 사용하여 면역침강 (immunoprecipitation)시켰다. 상기 반응액에 단백질 G-세파로오스 TM 비드(Protein G sepharose TM bead, Pharmacia)를 첨가한 후 4℃에서 1시간 동안 조심스럽게 혼합하였다. 이로부터 얻은 면역복합체

(immunocomplexes)를 ASK1 활성을 분석하기 위하여 면역복합체 카이네이즈 분석을 수행하였다.

- [0035] H_2O_2 및 $TNF-\alpha$ 에 의해서 활성화된 ASK1은 CIB1이 동시에 발현되면 그 활성이 현저히 줄어들음을 확인하였다 (도 2a).
- [0036] ASK1의 활성을 조절하는 CIB1의 내생적 기능을 조사하기 위해서 HeLa 세포에 CIB1 siRNA 및 대조군 siRNA (control siRNA)를 주입하여 세포내 CIB1 발현을 감소시킨 후 ASK1의 활성을 측정하였다. H_2O_2 및 $TNF-\alpha$ 에 의해서 활성화된 ASK1은 CIB1 siRNA를 주입하면 그 활성이 더욱 증가하였으며 (도 2b), ASK1이 매개하는 ASK1-JNK/p38 MAPK 활성도 역시 CIB1 siRNA를 주입하면 더욱 증가하는 경향을 보였다 (도 2c). 따라서 CIB1의 내생적 기능은 H_2O_2 및 $TNF-\alpha$ 에 의해서 활성화된 ASK1의 음성조절자로 작용할 가능성을 제시하고 있다.
- [0037] **<실시예 3> CIB1의 ASK1 활성화 억제 기전**
- [0038] ASK1이 활성화되는 기전에는 크게 3가지 현재까지 보고되어 있는데, 첫째, ASK1간의 동형중합체 (homooligomer) 형성 그리고 TRAF 단백질과 ASK1과의 결합 마지막으로 그 결과 ASK1 kinase 도메인의 threonine 기의 자동인산화 (autophosphorylation)의 과정을 거쳐 ASK1이 활성화됨 보고된 바 있다 (Gotoh and Cooper 1998, J. Biol. Chem. 273: 17477-17482; Liu et al. 2000, Mol. Cell. Biol. 20: 2198-2208; Tobiume et al. 2002, J. Cell. Physiology. 191: 95-104; Noguchi et al. 2005, J. Biol. Chem. 280: 37033-37040; Fujino et al. 2007, Mol. Cell. Biol. 27: 8152-8163).
- [0039] 본 발명자들은 상기 언급된 ASK1 활성화 기전 중 CIB1에 의해서 조절되는 부분을 찾고자 각각의 경우에 대해서 조사하였다.
- [0040] ASK1 동형중합체 형성 과정에 CIB1이 미치는 영향을 조사하기 위해서 면역침강법을 수행한 결과 CIB1의 영향이 없음을 확인하였다. 다음으로 ASK1과 TRAF2 단백질과의 결합능에 CIB1이 미치는 영향을 조사하기 위해서 293 세포에 Flag-CIB1, Flag-TRAF2, HA-ASK1을 도 3a에 제시된 조합으로 형질주입 후 면역침강법을 수행하였다. Flag-TRAF2와 HA-ASK1을 같이 형질주입하면 두 단백질 사이의 결합이 증가하며, 여기에 CIB1을 고발현시키면 증가된 두 단백질 사이의 결합이 현저히 감소하였다 (도 3a). 또 HeLa 세포에 CIB1 siRNA(서열번호 3) 및 대조군 siRNA (control siRNA;서열번호 4)를 주입하여 세포내 CIB1 발현을 억제시킨 후 H_2O_2 를 처리하여 ASK1과 TRAF2 단백질 사이의 결합능을 증가시킨 다음 CIB1의 영향을 조사하였다. H_2O_2 에 의한 상기 두 단백질 사이의 증가한 결합능이 CIB1의 발현을 siRNA로 감소시키면 더욱 결합능이 증가하였다 (도 3b).
- [0041] ASK1 활성화 기전의 마지막 단계인 자동인산화 (autophosphorylation)의 과정에서의 CIB1 역할을 조사하고자 상기 도 3a와 같이 형질주입 후 항 ASK1 항체로 면역침강을 수행하고 항 포스포 ASK1 항체 (pASK1)로 웨스턴 블롯을 실시한 결과 HA-ASK1을 형질주입하면 ASK1의 인산화 과정을 거치지만 Flag-CIB1과 HA-ASK1을 동시에 과발현시키면 이러한 인산화과정이 현저히 줄어든다. 또 이러한 현상은 ASK1의 활성을 올릴 수 있는 환경 예를 들면 H_2O_2 를 처리하면 더욱 극명히 관찰된다 (도 3c). 상기 도 3b처럼 HeLa 세포에 CIB1 siRNA 및 대조군 siRNA (control siRNA)를 주입하여 세포내 CIB1 발현을 억제시킨 후 H_2O_2 를 처리하여 ASK1의 인산화 여부를 조사하였다. 그 결과 CIB1 siRNA를 주입하면 H_2O_2 에 의한 ASK1 인산화가 더욱 증가하였다 (도 3d). 즉 CIB1에 의한 ASK1의 활성억제는 TRAF2와 ASK 단백질 사이의 결합능 및 ASK1 자동인산화 (autophosphorylation)의 과정을 조절함으로써 이루어짐을 암시한다.
- [0042] **<실시예 4> CIB1 발현억제가 6-OHDA 및 $TNF-\alpha$ 에 의한 ASK1 활성화와 ASK1에 의해서 유도되는 아포토시스성 세포사멸에 미치는 영향**
- [0043] 파킨슨병을 유도하는 약물로 잘 알려진 6-Hydroxydopamine (6-OHDA)은 활성산소를 생성해서 도파민성 신경세포를 사멸시키며, 이 고정에 ASK1이 매개한다는 사실이 보고되었다 (Ouyang and Shen 2006, J. Neurochem. 97: 234-244; Pan et al. 2007, Molecular Pharmacology. 72: 1607-1618).
- [0044] 본 발명자는 SH-SY5Y 신경세포주에 CIB1 siRNA 및 대조군 siRNA (control siRNA)를 주입하여, CIB1 발현을 제한한 다음 6-OHDA를 처리하여 ASK1 활성 및 신경세포사멸을 측정하였다.
- [0045] 상기 도 2b에 언급한 방법으로 ASK1 활성도를 측정하면, CIB1 siRNA를 주입하여 세포내 CIB1의 발현을 제한할 경우 대조군에 6-OHDA에 의해 증가한 ASK1 활성이 더욱 증가하였으며, flow cytometry 방법으로 아포토시스성 신경세포사멸을 정량화한 결과 ASK1 활성에서 보이는 결과와 유사하게 6-OHDA에 의한 세포사멸이 CIB1 발현을

제한한 그룹에서 더욱 증가하였다 (도 4a). 다음으로 인간 유방암 세포주인 MCF7 세포에 상기 도 4a에서 마찬가지로 CIB1의 세포내 발현을 억제한 후 TNF- α 를 처리하고 ASK1의 활성화 및 세포사멸을 측정하였다. 상기 도 4a의 결과와 유사하게 TNF- α 에 의해 증가된 ASK1 활성화도는 CIB1 발현을 억제할 경우 더욱 증가하였으며, TNF- α 에 의해 MCF7 세포사멸 역시 더욱 증가함을 확인하였다 (도 4b). 즉 CIB1은 ASK1에 의해서 매개되는 다양한 세포사멸 예를 들면, 6-OHDA에 의한 도파민성 신경세포사멸 및 TNF- α 에 의해 MCF7 세포사멸을 선택적으로 조절할 수있음을 제시하고 있다.

[0046] <실시예 5> 6-OHDA에 의한 ASK1 활성화와 아포토시스성 세포사멸에 대한 CIB1의 억제 효과에 칼슘이 미치는 영향

[0047] CIB1 단백질은 두 개의 기능적인 EF-hand motif를 가지는 Ca^{2+} 결합단백질로서, Ca^{2+} 이 결합하면 구조적 변화 (conformational change)를 일으킨다고 보고된 바 있다(Hwang and Vogel 2000, J. Mol. Recognit. 13: 83-92; Yamniuk et al. 2004, Biochemistry 43: 2558-2568).

[0048] 따라서 본 발명자는 Ca^{2+} 의 세포내 유입이 CIB1를 통한 ASK1 활성화 조절기전에 영향을 미치는 조사하기 위해서 신경세포유래 세포주인 SH-SY5Y 세포에 6-OHDA를 단독으로 처리하거나 세포내 Ca^{2+} 의 유입을 유도하기 위해 KCl을 같이 처리하였다. 그리고 이러한 현상이 Ca^{2+} 킬레이터 (chelator)에 의해서 저해되는지 확인하기 위해서 BAPTA-AM을 같이 처리하였다 (도 5a참조). 상기 제시된 조건에서 ASK1 항체로 면역침강을 시킨 후 침강된 라이세트를 CIB1 항체 혹은 TRAF2 항체로 각각 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0049] 6-OHDA 처리에 의한 ASK1과 CIB1의 물리적 결합은 KCl에 의한 막전위 변화에 따른 세포내 Ca^{2+} 의 유입으로 억제되었으며, 이러한 현상은 BAPTA-AM이라는 Ca^{2+} 킬레이터에 의해 회복되었다. 또한 상기 도 3에서 제시한 CIB1의 ASK1 활성화조절기전 가운데 TRAF2 단백질과의 결합을 상기 도 5a에 제시된 처리조건으로 조사한 결과, 6-OHDA 처리에 의한 ASK1과 TRAF2의 물리적 결합은 세포내 Ca^{2+} 의 유입으로 더욱 증가되었으며, 이러한 현상은 BAPTA-AM이라는 Ca^{2+} 킬레이터에 의해 억제되었다.

[0050] 상기 5a에 나타난 현상이 Ca^{2+} 유입으로 인한 CIB1과 ASK1의 물리적 결합능을 조절하는지 확인하기 위해서 SH-SY5Y 세포에 HA-ASK1과 Flag-CIB1 혹은 점돌연변이(point mutation)에 의한 Flag-CIB1(D127N/E172Q)를 각각 형질주입시킨 후 도 5b에 제시된 조합으로 약물들을 처리하였다. 점돌연변이에 의해서 제작된 Flag-CIB1(D127N/E172Q)는 CIB1 EF-hand의 Ca^{2+} 결합능력이 손상된 특징을 보인다. 그런 후 Flag-CIB1과 HA-ASK1의 물리적 결합능의 변화를 조사하고자 Flag 항체로 면역침강을 하고 HA 항체로 웨스턴 블롯을 수행하였다. Ca^{2+} 결합능력이 정상적인 Flag-CIB1과 HA-ASK1을 형질주입한 그룹에서는 6-OHDA 처리에 의한 ASK1과 CIB1의 물리적 결합은 KCl에 의한 막전위 변화에 따른 세포내 Ca^{2+} 의 유입으로 억제되었으며, 이러한 현상은 BAPTA-AM이라는 Ca^{2+} 킬레이터에 의해 회복되었다 (도 5b 참조). 한편 Ca^{2+} 결합능력이 손상된 Flag-CIB1(D127N/E172Q)과 HA-ASK1을 형질주입한 그룹에서는 6-OHDA 처리에 의한 ASK1과 CIB1의 물리적 결합은 KCl에 의한 막전위 변화에 따른 세포내 Ca^{2+} 이 유입되었으나 두 단백질 사이의 물리적 결합에는 아무런 영향이 없었으며, 이러한 현상은 BAPTA-AM이라는 Ca^{2+} 킬레이터를 처리하여도 역시 아무런 변화를 보이지 않았다 (도 5b 참조). 이러한 실험적 결과들은 세포내 Ca^{2+} 의 유입은 CIB1과 ASK1의 물리적 결합을 조절할 수 있다는 사실을 뒷받침하고 있다.

[0051] 세포내 Ca^{2+} 의 유입이 6-OHDA에 의해서 유도된 ASK1의 활성화 및 ASK1에 의한 아포토시스성 세포사멸을 조절할 가능성을 조사하고자 신경세포유래 세포주인 SH-SY5Y 세포에 세포내 CIB1 단백질의 발현을 억제하고자 CIB1 siRNA 혹은 대조군을(control siRNA) 형질 주입한 후 상기 도 5c에 제시된 조합으로 약물처리를 한 후 상기 도 2a에 사용한 동일한 방법으로 in vitro kinase assay 방법으로 ASK1의 활성을 정량화하였다. control siRNA를 주입한 그룹에서는 6-OHDA에 의해서 활성화된 ASK1은 세포내 Ca^{2+} 의 유입에 따라 더욱 활성화되며, 이러한 현상은 BAPTA-AM에 의해서 극적으로 억제되었다. CIB1 siRNA에 따른 ASK1의 활성화 정도는 6-OHDA에 의해서 활성화되지만, 세포내 Ca^{2+} 의 유입 및 이를 억제하기 위한 BAPTA-AM 처리에는 아무런 변화를 보이지 않았다 (도 5c 참조). 세포사멸을 flow cytometry로 정량화한 결과 대조군과 비교하면 CIB1 siRNA를 주입한 세포에서 세포사멸이 더욱

증가하였으나, 세포내 Ca^{2+} 의 유입 및 이를 억제하기 위한 BAPTA-AM 처리하였을 경우 세포사멸에 큰 영향을 보이지 않았다 (도 5d 참조). 한편 대조군에서는 6-OHDA로 유도된 세포사멸은 세포내 Ca^{2+} 의 유입으로 더욱 증가하였으며, 이러한 현상은 BAPTA-AM에 의해서 억제됨을 보였다. 상기 결과들을 통해서, 세포내 Ca^{2+} 의 유입은 CIB1과 ASK1의 물리적 결합을 억제할 뿐만 아니라 ASK1의 활성화 그리고 더 나아가 ASK1이 매개하는 다양한 세포사멸에 영향을 미칠 수 있음을 제시하고 있다.

[0052] <실시예 6> 중뇌 도파민성 신경세포에 6-OHDA에 의한 ASK1 활성화와 아포토시스성 세포사멸에 대한 CIB1의 억제 효과에 칼슘이 미치는 영향

[0053] 본 발명자들이 위에서 제시한 Ca^{2+} 의존적인 CIB1에 의한 ASK1 활성화 및 ASK1 매개성 세포사멸 억제기전의 생리적 의미를 더욱 공고히 하기위해서 상기 도 5에서 제시한 유사한 실험을 세포주가 아닌 중뇌 도파민성 신경 세포배양모델에서 실시하였다. 즉 세포내 Ca^{2+} 의 유입이 6-OHDA에 의해서 유도된 ASK1의 활성화 및 ASK1에 의한 아포토시스성 세포사멸을 조절할 가능성을 조사하고자 배양된 중뇌 도파민성 신경세포에 세포내 CIB1 단백질의 발현을 억제하고자 CIB1 siRNA(서열번호 5) 혹은 대조군을 (control siRNA; 서열번호 6) 형질 주입한 후 상기 도 6a에 제시된 조합으로 약물처리를 한 후 상기 도 2a에 사용한 동일한 방법으로 in vitro kinase assay 방법으로 ASK1의 활성을 정량화하였다.

[0054] control siRNA를 주입한 그룹에서는 6-OHDA에 의해서 활성화된 ASK1은 세포내 Ca^{2+} 의 유입에 따라 더욱 활성화되며, 이러한 현상은 BAPTA-AM에 의해서 완전히 억제되었다. CIB1 siRNA에 따른 ASK1의 활성화 정도는 6-OHDA에 의해서 활성화되지만, 세포내 Ca^{2+} 의 유입 및 이를 억제하기 위한 BAPTA-AM 처리에는 아무런 변화를 보이지 않았다 (도 6a 참조). 배양된 중뇌 도파민성 신경세포에 상기 도 6b에 제시된 조합으로 약물처리한 후 도파민성 신경세포의 세포사멸을 정량화하기 위해서 도파민성 신경세포의 표지항체인 TH(tyrosine hydroxylase) 항체로 염색한 후 TH 항체에 양성인 세포만을 세었다. 대조군과 비교하면 CIB1 siRNA를 주입한 세포에서 세포사멸이 더욱 증가하였으나, 세포내 Ca^{2+} 의 유입 및 이를 억제하기 위한 BAPTA-AM 처리하였을 경우 세포사멸에 큰 영향을 보이지 않았다. 한편 대조군에서는 6-OHDA로 유도된 세포사멸은 세포내 Ca^{2+} 의 유입으로 통계적상 유의적으로 증가하였으며, 이러한 현상은 BAPTA-AM에 의해서 억제됨을 보였다 (도 6b). 상기 결과로 본 발명자들이 제시한 CIB1 단백질이 보이는 ASK1의 활성화 및 ASK1을 통한 세포사멸 억제 및 세포보호효과는 단지 세포주 모델 뿐만 아니라 중뇌 도파민성 신경세포배양모델에서도 재현됨을 확인함으로써 퇴행성 뇌신경계 질환, 암, 면역계 질환 또는 염증을 치료하기 위한 유전자 치료제로서의 가능성을 더욱 확고히 하고 있다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 CIB1과 ASK1 단백질 사이의 결합을 나타내는 도면이다.

[0056] 도 2는 H2O2 혹은 $\text{TNF-}\alpha$ 에 의한 ASK1 활성화에 CIB1이 미치는 영향을 나타낸 도면이다.

[0057] 도 3은 CIB1의 ASK1 활성화 조절 기전을 제시한 도면이다.

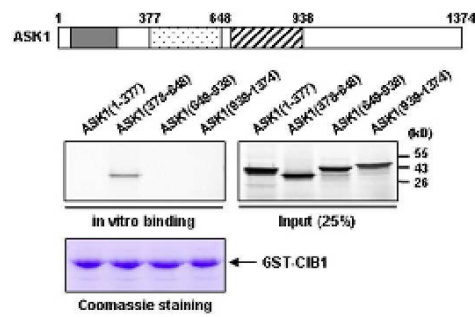
[0058] 도 4는 ASK1 매개성 세포사멸에 CIB1 단백질이 미치는 효과를 제시한 도면이다.

[0059] 도 5는 세포내 Ca^{2+} 유입에 따른 CIB1에 의한 ASK1 활성화 및 ASK1 매개성 세포사멸을 억제에 대한 효과를 보여주는 도면이다.

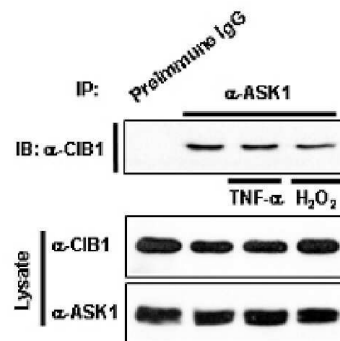
[0060] 도 6은 세포내 Ca^{2+} 유입에 따른 CIB1의 성질 변화를 중뇌 도파민성 신경세포배양모델에서 확인한 도면이다.

도면

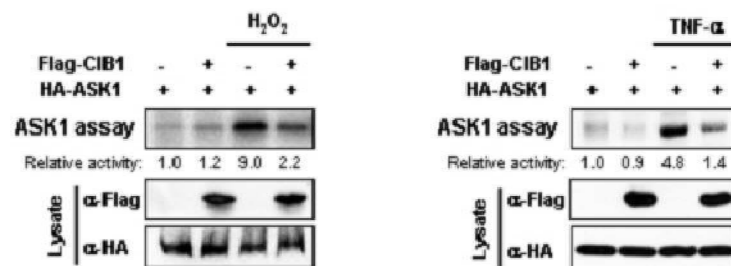
도면1a



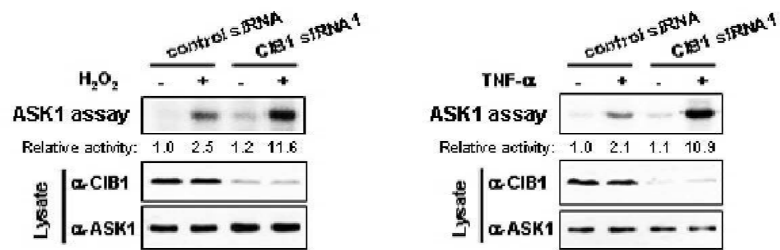
도면1b



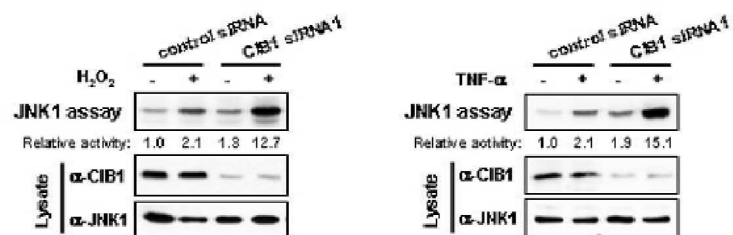
도면2a



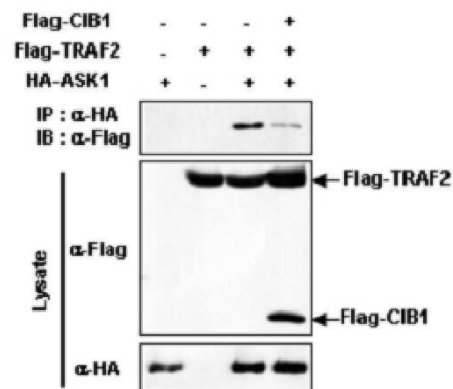
도면2b



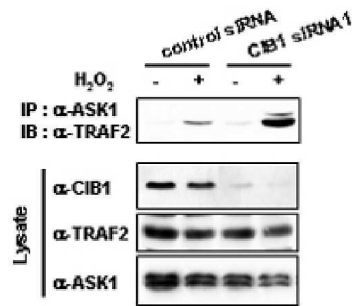
도면2c



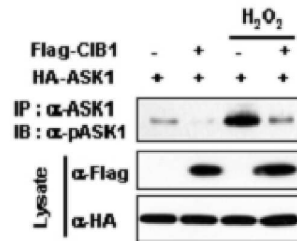
도면3a



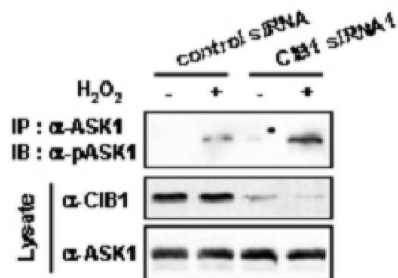
도면3b



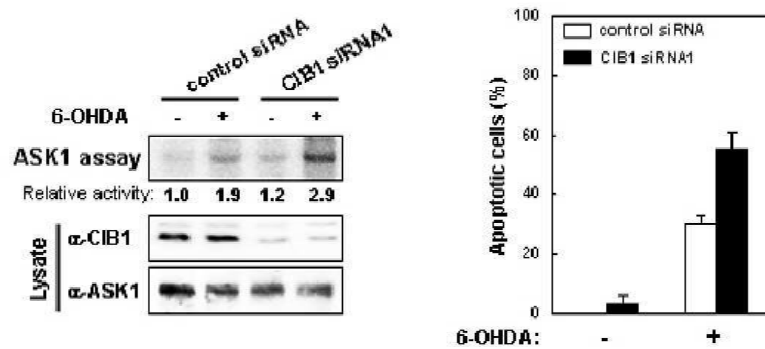
도면3c



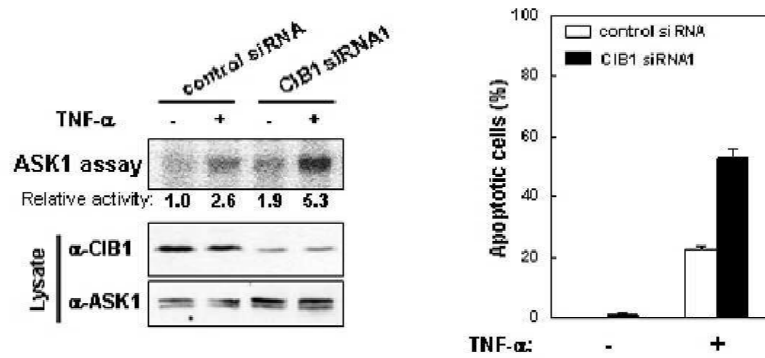
도면3d



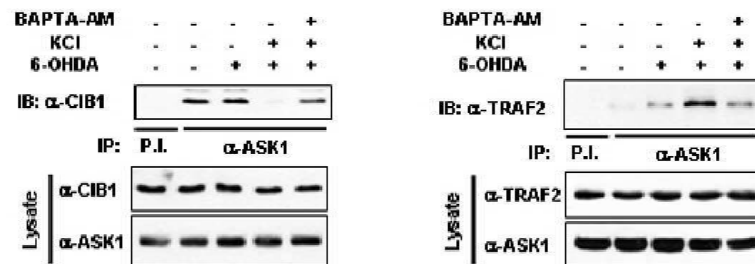
도면4a



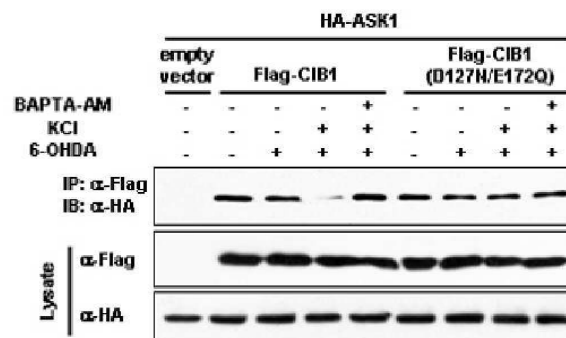
도면4b



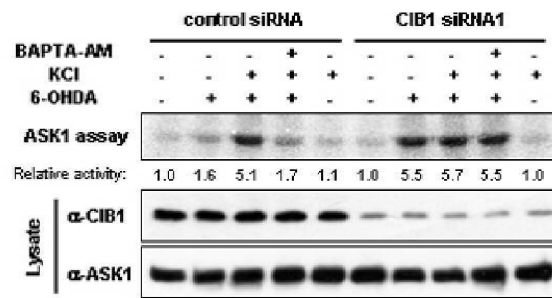
도면5a



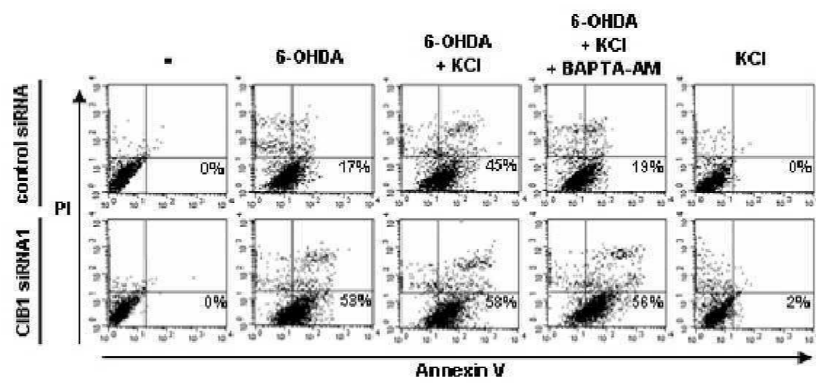
도면5b



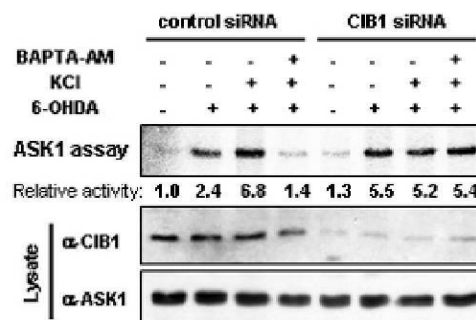
도면5c



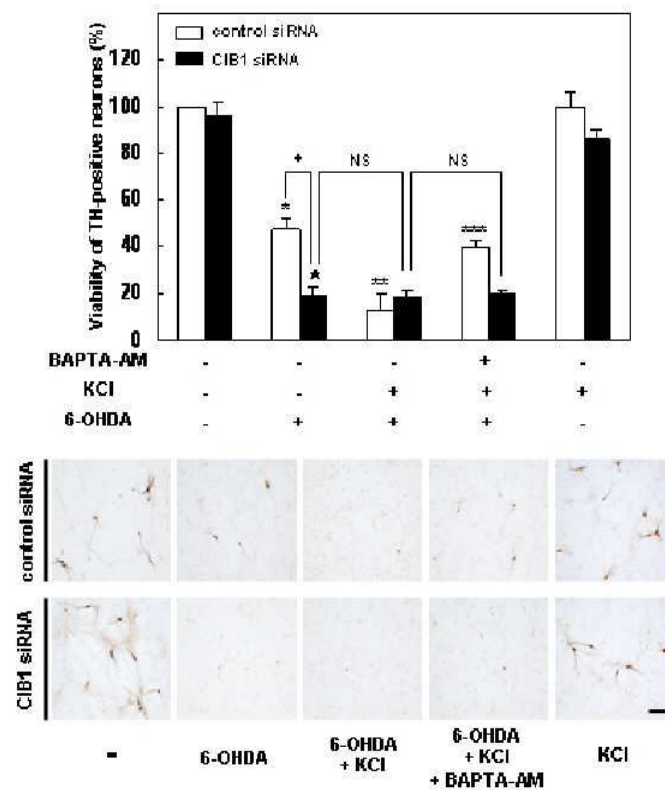
도면5d



도면6a



도면6b



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> Human CIB protein and CIB gene thereof preventing stress-induced cell death

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CIB1

<400> 1
 Met Gly Gly Ser Gly Ser Arg Leu Ser Lys Glu Leu Leu Ala Glu Tyr

1	5	10	15
Gln Asp Leu Thr Phe Leu Thr Lys Gln Glu Ile Leu Leu Ala His Arg	20	25	30
Arg Phe Cys Glu Leu Leu Pro Gln Glu Gln Arg Ser Val Glu Ser Ser	35	40	45
Leu Arg Ala Gln Val Pro Phe Glu Gln Ile Leu Ser Leu Pro Glu Leu	50	55	60
Lys Ala Asn Pro Phe Lys Glu Arg Ile Cys Arg Val Phe Ser Thr Ser	65	70	75
Pro Ala Lys Asp Ser Leu Ser Phe Glu Asp Phe Leu Asp Leu Leu Ser	85	90	95
Val Phe Ser Asp Thr Ala Thr Pro Asp Ile Lys Ser His Tyr Ala Phe	100	105	110
Arg Ile Phe Asp Phe Asp Asp Asp Gly Thr Leu Asn Arg Glu Asp Leu	115	120	125
Ser Arg Leu Val Asn Cys Leu Thr Gly Glu Gly Glu Asp Thr Arg Leu	130	135	140
Ser Ala Ser Glu Met Lys Gln Leu Ile Asp Asn Ile Leu Glu Glu Ser	145	150	155
Asp Ile Asp Arg Asp Gly Thr Ile Asn Leu Ser Glu Phe Gln His Val	165	170	175
Ile Ser Arg Ser Pro Asp Phe Ala Ser Ser Phe Lys Ile Val Leu	180	185	190

<210> 2
 <211> 576
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> CIB1

<400> 2

atggggggct cgggcagtcg cctgtccaag gagctgctgg ccgagtacca ggacttgacg	60
ttcctgacga agcaggagat cctcctagcc cacaggcggt tttgtgagct gtttccccag	120
gagcagcggg gcgtggagtc gtcacttcgg gcacaagtgc ctttcgagca gattctcagc	180
cttcagagc tcaaggccaa ccccttcaag gagcgaatct gcagggtctt ctccacatcc	240
ccagccaaag acagccttag ctttgaggac ttcctggatc tcttcagtgt gttcagtgac	300
acagccacgc cagacatcaa gtccattat gccttcgca tctttgactt tgatgatgac	360
ggaaccttga acagagaaga cctgagccgg ctggtgaact gcctcacggg agagggcgag	420
gacacacggc ttagtgcgtc tgagatgaag cagctcatcg acaacatcct ggaggagtct	480
gacattgaca gggatggaac catcaacctc tctgagttcc agcacgtcat ctcccgttct	540
ccagactttg ccagctcctt taagattgtc ctgtga	576

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CIB1 siRNA1

<400> 3

aaagacagcc ttagctttga g	21
-------------------------	----

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GFP siRNA, control

<400> 4
 ggctacgtcc aggagcgcac c 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CIB1 siRNA

<400> 5
 aagagtcact gcataccga g 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GFP siRNA

<400> 6
 ggctacgtcc aggagcgcac c 21