(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0080954
(43) 공개일자 2010년07월14일

(51) Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
C12N 15/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0081337
(22) 출원일자 2006년08월25일
심사청구일자 2006년08월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
박길홍
서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실
이기호
서울 노원구 공릉동 215-4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
전종학

전체 청구항 수 : 총 11 항

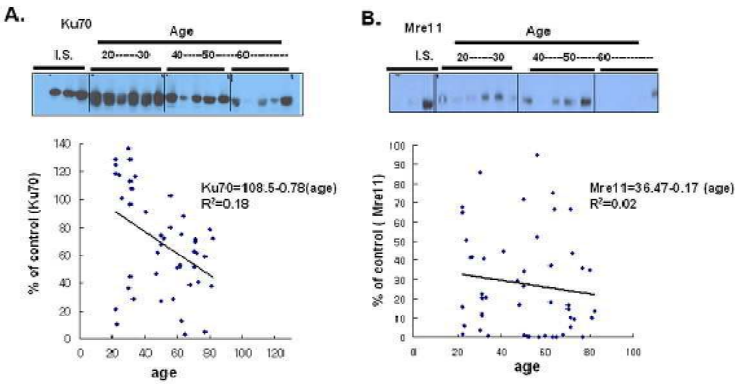
(54) 노화 관련 K u 70 단백질 및 이를 이용한 노화조절 방법

(57) 요 약

본 발명은 노화 관련 Ku70 단백질 및 이를 이용한 노화조절 방법에 관한 것으로서, 노화가 진행되어감에 따라 감소되는 Ku70 단백질을 이용하여, 노화의 방지 방법, 노화방지제 스크리닝 방법, 노화방지제에 관한 것이다.

또한 상기 단백질을 이용하여 노화의 촉진방법, 노화촉진제 스크리닝 방법, 노화촉진제에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

한귀정

경기 수원시 권선구 서둔동 88-2번지

이경미

서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실

주연진

서울 노원구 공릉동 215-4

윤미용

서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실

김태진

서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실

최현미

서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실

안신애

서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실

최유리

서울 성북구 안암동5가 126-1 고려대학교 의과대학 생화학교실

특허청구의 범위

청구항 1

세포내 Ku70 단백질을 증가시키는 것을 특징으로 하는 동물(인간을 제외)의 노화방지방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 Ku70 단백질을 증가시키는 방법은 세포내로 Ku70 단백질을 전달하는 것을 특징으로 하는 동물의 노화방지방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 Ku70 단백질을 증가시키는 방법은 세포내의 Ku70 단백질의 전사를 촉진하는 것을 특징으로 하는 동물의 노화방지방법.

청구항 4

세포내 Ku70 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 노화방지제.

청구항 5

임의 물질을 시험세포에 처리하는 단계;

상기 시험세포의 세포내 Ku70 단백질을 함량을 측정하는 단계; 및

세포내 Ku70 단백질의 함량을 증가시키는 물질을 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 노화방지제 스크리닝 방법.

청구항 6

세포내 Ku70 단백질의 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 동물(인간을 제외)의 노화방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 Ku70 단백질의 활성을 억제시키는 방법은 세포내로 Ku70 단백질 억제제를 전달하는 것을 특징으로 하는 동물의 노화방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 Ku70 단백질의 활성을 억제시키는 방법은 세포내의 Ku70 단백질의 전사를 억제하는 것을 특징으로 하는 동물의 노화방법.

청구항 9

세포내 Ku70 단백질 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 노화제.

청구항 10

임의 물질을 시험세포에 처리하는 단계;

상기 시험세포의 세포내 Ku70 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및

세포내 Ku70 단백질의 활성을 감소시키는 물질을 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 노화제 스크리닝 방법.

청구항 11

Ku70 단백질의 발현량을 측정하는 것을 특징으로 하는 노화정도 측정방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[0013] 인간의 체세포에서 텔로미어는 DNA 말단에서 복제함에 따라 서열을 잃어버려 세포 분열동안에 점진적으로 짧아진다. 텔로미어 DNA의 유지 및 안정화는 이중쇄 절단 (Double strand break; DSB) 복구에 관련된 것을 포함하여, 여러 DNA-결합 단백질의 결합에 의하여 지원된다. 기능적 텔로미어는 연속적인 세포 증식 및 안정적인 유전에 필수적이기 때문에, 염색체의 말단 캡핑의 손실은 노화와 암과 모두 중요성을 가지고 있다(참고문헌 19-21]. DSB는 제대로 복구되지 않으면 유전적 정보를 잃어버리거나, 돌연변이를 일으키거나 세포사멸을 일으킬 수 있는 재해적 부분이 될 수 있다. 포유동물에서는 두개의 큰 경로가 DSB를 복구하기 위해서 존재한다. 동형 재조합(homologous recombination; HR) 및 비동형 말단-결합(nonhomologous end-joining; NHEJ) 경로이다(참고문헌 22). Ku70은 Ku70/ku80의 이형이중체 복합체로 존재하며, DNA-dmlwhs 단백질 키나아제(DNA-PK)의 한성분이다. Ku80 및 DNA-PKcs(DNA-PK 촉매 소단위)와 함께, Ku70은 NHEJ를 통해 DSB 복구에 관여한다. DNA-PK 어떤 성분의 돌연변이는 염색체 사이에 말단-말단 융합이 일어나고, 해로운 말단 재정렬이 일어난다(참고문헌 23). 비슷하게, 텔로미어 융합 및 불활성화가 쥐에서 Ku70 유전자가 손실되었을 때 일어난다고 보고 되었다(참고문헌 23, 24). Mre11은 Rad50 및 Nbs1과 복합체의 형태로 존재한다. Mre11 복합체는 시스터 염색분체 사이의 재조합을 촉진함으로써 재조합적인 DNA 복구에 영향을 준다. Mre11의 부분적인 기능결손(hypomorphic) 돌연변이는 인간의 유전자 불안정성 질병을 일으켰다(참고문헌 25).

[0014] 노화는 건강한 사람이 연약한 사람으로 변화하는 과정으로, 대부분의 생리적인 시스템의 성능이 감소하고, 질병 및 사망에 대한 감수성이 증가하는 과정이다. 노화 및 최대 인간수명은 종에 따라 다르다. 때문에 최소한 유전적 조절을 받는 것임에 틀림없다(참고문헌 26, 27). 인간 수명에서 변이의 25% 까지는 유전적인 것이고(참고문헌 28, 29), 나머지는 환경적인 노출, 사고 및 상처, 및 우연에 기인한다. 90살 이상까지의 매우 긴 수명은 더욱더 유전적 기초를 가지는 것으로 보이고(참고문헌 30), 100세 이상 또는 100세 근처의 나이를 가지는 사람이 가족으로 클러스터 되는지를 설명한다. 반면에 어린 나이에 노화 및 사망이 촉진되는 조로 증후군(progeroid syndrome)은 유전적 원인이 있음이 밝혀졌다(참고문헌 31, 32). 실제로, 염색체 1, 2, 4, 7, 12 및 17의 여러 지역이 그들 사이에 서로 상호작용하고 환경요인과 상호 작용하여서 평균 수명에 영향을 준다.

[0015] 본 발명자들은 Ku70의 전체 단백질이 인간의 림프구에서 나이가 들어감에 따라 감소하는 것을 발견하였고, 장수하는 사람들 그룹에서 Ku70의 발현을 유지하는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0016] 본 발명을 노화의 방지 방법, 노화방지제 스크리닝 방법, 노화방지제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0017] 본 발명은 노화의 촉진방법, 노화촉진제 스크리닝 방법, 노화촉진제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

[0018] 상기한 목적을 위해서 본 발명은 세포내 Ku70 단백질을 증가시키는 것을 특징으로 하는 동물(인간을 제외)의 노화방지방법을 제공한다. 보다 상세하게는 상기 Ku70 단백질을 증가시키는 방법은 세포내로 Ku70 단백질을 전달하는 것을 특징으로 하는 동물의 노화방지방법 및/또는 세포내의 Ku70 단백질의 전사를 촉진하는 것을 특징으로 하는 동물의 노화방지방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 Ku70 단백질은 Ku70 단백질의 기능적 동등물 및 기능적 유도체를 포함한다. "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 Ku70의 생리활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

[0020] " 기능적 유도체" 는 상기 혈소판 유래 성장 인자 폴리펩타이드의 단편, 상기 단편을 포함하는 단백질, 또는 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질을 말한다. " 단편" 이란 용어는 단백질의 일부에 해당하는 아미노산 서열로서, 본 발명의 범위 내에 속하는 공통의 기원 요소, 구조 및 작용 메카니즘을 가진 것을 말한다. Ku70의 안정성, 저장성, 용해도 등을 변경시키기 위한 변형 또는 예를 들어 Ku70와 상호 작용하는 물질과의 관계를 변경시키기 위해 변형을 가한 유도체도 본 발명의 범위에 포함된다. 상기와 같은 단백질의 기능적 유도체를 만드는 방법은 공지되어 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 형태는 세포내 Ku70 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 노화방지제를 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다.

[0022] 예를 들어, 경구 투여시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합되거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형되거나 식이 중에 직접 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼(wafer) 등의 형태로 사용될 수 있다.

[0023] 상기 정제, 트로키, 환제, 캡슐 등은 검 트라가칸트, 아카시아, 옥수수전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 인산이칼슘과 같은 부형제; 옥수수전분, 감자전분, 알긴산 등과 같은 붕해제; 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제; 및 슈크로스, 락토스 또는 사카린과 같은 감미제; 또는 페퍼민트, 윈터그린 오일 또는 체리향과 같은 향미제를 포함할 수 있다. 투여 유닛 형태가 캡슐인 경우 상기 물질 외에도 액체 담체를 함유할 수 있다. 코팅제 또는 투여 유닛의 물리적 형태를 변화시키는 기타 다양한 물질이 첨가될 수도 있다. 예를 들면, 정제, 환제 또는 캡슐은 쉘락 (shellac), 당 또는 이 2가지 모두에 의해 코팅될 수 있다. 엘릭시르 시럽은 활성 화합물과 함께 감미제로서 슈크로스, 보존제로서 메틸파라벤과 프로필파라벤, 염료 및 체리향이나 오렌지 향과 같은 향미제를 함유할 수 있다. 임의의 투여 유닛 형태를 제조하는데 사용되는 모든 물질은 약학적으로 순수하고 사용되는 양에서 실질적으로 무독성이어야 한다. 또한, 활성 화합물은 서방형 제제로 제조될 수 있다.

[0024] 경구 투여용의 경우, 본 발명의 조성물은 부형제와 혼합하여 비섭취형 구강세척제 및 치약 형태로 사용할 수 있다. 구강 세척제는 활성 성분을 적당한 용매, 예컨대 붕산나트륨 용액(Dobell's Solution)에 필요량만큼 첨가하여 제조할 수 있다. 별법으로, 활성 성분을 붕산나트륨, 글리세린 및 중탄산칼륨을 함유하는 방부 세정제에 첨가하거나, 겔, 페이스트, 파우더 및 슬러리 등의 형태인 치약에 분산시키거나 또는 물, 결합제, 연마제, 향미제, 발포제 및 습윤제를 포함할 수 있는 페이스트 치약에 치료적 유효량으로 첨가할 수 있다.

[0025] 기타 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야에 잘 알려진 서적(예, " Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition)에 기재되어 있거나 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.

[0026] 투여 용량은 치료 환자의 상태에 따라 다양할 수 있으며, 투여를 담당하는 사람이라면 각 환자에게 적합한 적당 용량을 결정할 수 있다. 또한, 인체 투여용의 경우, 제제는 식품의약품안전청의 기준에 부합하는 멸균성, 발열

성, 일반 안전 및 순도 기준을 충족하는 것이어야 한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 형태는 임의 물질을 시험세포에 처리하는 단계; 상기 시험세포의 세포내 Ku70 단백질을 함량을 측정하는 단계; 및 세포내 Ku70 단백질의 함량을 증가시키는 물질을 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 노화방지제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0028] 단백질 함량을 측정하는 방법은 단백질을 전기 영동하여 표준시료와 비교하여 측정하는 방법, 특이적 항체를 사용하여 측정하는 방법, 임의 리포터와 융합단백질을 생산하도록 하여 측정하는 방법 등이 있다.

[0029] Ku70의 단백질의 전사량을 측정하는 방법은 Ku70 조절 프로모터를 가진 재조합 벡터를 이용할 수 있다.

[0030] 프로모터의 발현을 확인하는 방법은 리포터 유전자를 이용하여 할 수 있다. 리포터 유전자는 특정한 유전자로 제한되지 않는다. 용이하게 측정할 수 있는 생성물을 발현하는 어떠한 유전자라도 이용되어질 수 있다. 적합한 리포터 유전자는 본 기술 분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 리포터 유전자의 예로는 CAT(클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제), 루시퍼라아제, 베타-갈락토시다아제와 같은 다른 효소검출시스템; 세균성 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제 및 녹색형광물질(GFP)이 포함되나 이들로 제한되는 것은 아니다. 리포터 유전자의 검출은 본 기술 분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 리포터 유전자가 그의 효소활성에 의해 검출되는 경우에는, 일반적으로 효소를 그의 적절한 기질과 함께 제공하고, 반응생성물(예를 들어 루시퍼라아제에 의해 생성된 빛)을 검출하는 단계를 포함한다. 검출은 리포터 유전자 생성물의 존재 또는 부재를 간단히 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 방법으로는 리포터 유전자 생성물의 발현 레벨의 정량화를 포함할 수도 있다. 정량화하는 방법은 절대적 정량화일 수 있거나, 하우스키핑 유전자의 발현 레벨에 비교하여 정량화 할 수 있다. 이러한 검출은 수동으로 수행될 수 있거나, 고 처리량(high-throughput)선별 시스템에서와 같이 자동으로 수행될 수 있다.

[0031] 유전자 발현의 존재, 부재 또는 정량화에 대한 고 처리량 시험방법은 본 기술 분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국특허 제 5,559,410호에는 단백질에 대한 고 처리량 선별방법이 기술되어 있고, 미국 특허 제 5,585,635호에는 핵산결합에 대한 고 처리량 선별방법이 기술되어 있다. 또한 미국특허 제 5,576,220호 및 5,541,061호에는 리간드/항체 결합에 대한 고 처리량 선별 방법이 기술되어 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 형태는 세포내 Ku70 단백질의 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 동물(인간을 제외)의 노화촉진방법을 제공한다. 보다 상세하게는 상기 Ku70 단백질의 활성을 억제시키는 방법은 세포내로 Ku70 단백질 억제제를 전달하는 것 및/또는 세포내의 Ku70 단백질의 전사를 억제할 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 형태는 세포내 Ku70 단백질 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 노화제를 제공하는 것이다.

[0034] 본 발명의 또 다른 형태는 임의 물질을 시험세포에 처리하는 단계; 상기 시험세포의 세포내 Ku70 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 세포내 Ku70 단백질의 활성을 감소시키는 물질을 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 노화제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0035]

[0036] 본 발명의 또 다른 형태는 Ku70 단백질의 발현량을 측정하는 것을 특징으로 하는 노화정도 측정방법을 제공하는 것이다.

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 아래의 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정이 되는 것은 아니다.

[0038] [실시예 1] Ku70 및 Mre11 단백질의 나이 증가에 따른 발현감소

[0039] DNA 이중쇄 절단(double-strand break; DSB) 복구에서 나이 관련 감소[참고문헌 17]와 나이 의존적 텔로미어 감소는 인간의 림프구에서 알려졌다[참고문헌 18]. DSB 복구 단백질의 발현이 나이 관련 변화를 보이는지 확인하였다. 이를 위해, 대한민국 서울의 20에서 80살 노인에 이르는 100명의 다른 자원자로부터 혈액을 수집하였다. 이들 개개인은 모두 건강하였고, 외견상 어떤 질병의 표시가 없었다. 텔로미어 결합 단백질 Ku70, Ku80, Sir2, TRF1, Mre11의 발현을 텔로미어에 결합하는 특이한 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 통해서 모니터 하였다

[0040] 인간의 CD4 임파구의 분리

[0041] 인간의 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)는 제주지역으로부터의 80대의 건강한 자원자 및 서울지역의 나이가 20 내지 80 사이의 48명의 건강한 자원자로부터 얻어졌다. 모든 지원자들은 혈액 기부에 대해서 서면 통지된 동의를 하였고, 시험 과정에 대해서 충분하게 이해했다. 모든 시험 프로토콜을 기관윤리위원회(institutional review board)에 의해 승인 받았다.

[0042] CD4 양성 T 세포는 말초혈액 임파구(peripheral blood lymphocytes; PBL)로부터 분리하였다. 간략하게 설명하면, 50ml의 혈액이 시험자로부터 모아졌고, PBL을 Ficoll-paque™ PLUS (아머샴 바이오사이언스)를 사용하여 밀도 구배 원심분리 방법으로 분리하였다. CD4 양성 T-세포는 네가티브 디플리션 키트(negative depletion kit; 밀텐이 바이오텍)을 사용하여 분리하였다. CD4 T 세포의 순수도는 셀퀘스트 프로 소프트웨어(Becton Dickinson, NJ)와 함께 형광표지세포분리기(Fluorescence Activated Cell Sorter; FACS)를 이용하여 시험하였다.

[0043] 웨스턴블랏 분석

[0044] CD4 양성 T 세포는 인산-완충 생리식염수(PBS)로 세척하였고, 단백질 억제제 칵테일(로슈)와 함께 리파(RIPA) 분해 완충용액(50mM 트리스-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 150mM 소디움 클로라이드, 0.5% 소디움 데옥시콜레이트 및 0.1% SDS)에 분해하였다. 동량(20㎍)의 전체 단백질을 10-12% SDS-PAGE에 올려졌다. 전기 영동 후에, 단백질은 니트로셀룰로오스 막으로 전달되었다. 단백질은 단일클론의 토끼 항-인간 Ku70 또는 항-인간 Mre11 및 양고추냉이(horseradish) 퍼옥사이드-연결 염소 항-토끼 Ig에 의해 웨스턴 블랏팅 루미널 제로 측정하였다(산타 쿠즈 바이오테크놀로지). 블랏은 스트리핑 완충용액(62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 및 100 mM 2-머캅토에탄올)에 의해 스트립되었다. 그리고 나서 다시 재탐침 블랏이 단일클론항체 항-인간 β-액틴으로 관측하였다. 밴드의 밀도는 후직스-바이오-이메이징 분석기 BAS2500(후지 포토 필름)를 이용하여 측정하였다.

[0045] 통계학적 분석

[0046] 본 연구대상에 대한 통계학적 특성을 적절하게 n(%) 또는 평균± 표준편차로 나타냈다. 스튜던트 티 테스트를 제주도 지역에서 연구대상에 대한 대조군 및 장수그룹 사이에 나이 분포를 비교하기 위하여 사용하였다. 서울지역의 연구대상에 대한 Ku70에 대한 나이의 관련성 또는 Mre11에 대한 관련성은 간단한 일차 회귀 분석을 이용하여 만들었다. Ku70에 대한 나이 및 장수하는 그룹의 효과를 다중 회귀 분석을 사용하여 평가되었다. 나이와 Ku70을 발현하고 있는 그룹과 사이에 어떤 상호작용 효과가 없었기 때문에, 주된 효과 회귀 모델이 고려되었다. 최종적으로, Ku70과 텔로미어 길이 사이의 관계가 피어스 상관 분석에 의해 조사되었다. 모든 통계학적 분석은 SAS 버전 9.1(사스 인스티튜트 인크, NC, USA)를 이용하여 수행되었다. 보고된 p-값은 투-사이드 p값이고, $p<0.05$ 가 통계학적으로 의미 있는 것으로 고려되었다.

[0047] 결과

[0048] 조사되어진 단백질 중에서, Ku70 및 Mre11 단백질이 나이에 따라 눈에 띄게 감소하는 것을 보였다. 도 1 에 보이듯이 60살 및 그 이상의 사람에서 Ku70의 수준은 20 내지 30살의 사람들의 단지 50%이었다. Ku70(대조군에 대한 %)의 일차회귀분석 결과는 Ku70 감소의 속도는 -1에 가까웠다(p=0.0027; 표2).

[0049] [표 1] 서울 지역에서의 연구 대상의 특징

[0050]

	서울 지역
숫자	48
나이(년)*	51.5± 19.3

[0051] * 평균 ± 표준편차

[0052] [표 2] 서울 지역에서 Mre11 및 Ku70에 대한 나이의 회귀분석

[0053]

	Ku70			Mre11		
변수*	계수	표준오차	p-값	계수	표준오차	P-값
절편	108.50	13.48	<0.001	36.47	10.92	0.0017
나이	-0.78	0.25	0.0027	-0.47	0.20	0.3906

[0054] *R^2=0.18(Ku70에 대해), 0.02(Mre11에 대해)

[0055] 이는 Ku70의 발현이 나이에 따라 엄격하게 조절되고 있음을 보인다. 비슷하게, Mre11의 발현은 나이에 따라 감소하였다. 그러나 Mre11의 발현은 Ku70의 감소보다도 훨씬 늦었다. 모든 다른 텔로미어 결합 단백질 Ku80, Sir2, TRF1은 나이에 따른 발현수준의 변화를 보이지 않았다(데이타 보이지 않음). 만약에 Ku70의 발현이 Mre11의 발현과 관련되었는지 알아보았다.

[0056] 도 2에서 보이듯이 Ku70의 발현은 Mre11의 발현의 것에 직접적으로 관련되어 있다. 이들 데이터는 나이가 듬에 따라, CD4 림프구가 점점 Ku70 및 Mre11의 높은 수준을 유지하는 능력을 잃어버리고, 이것은 부분적으로 DSB 복구의 손상을 일으키고 텔로미어 단축을 일으킬 것이라는 것을 보인다.

[0057] [실시예 2] 장수하는 사람들의 Ku70의 세포내 수준에서 나이에 따른 감소 지연 확인

[0058] 나이에 따라 Ku70의 세포내 수준이 감소하므로, 만약에 Ku70 발현을 유지하면 부분적으로 인간에게 긴 수명을 유지하는 이유가 되는지 시험하였다. 이것을 확인하기 위하여, 한국에서 가장 높은 평균 수명을 가진 것으로 알려진 찾기 위하여 한국 국립 통계청으로부터의 데이터베이스를 조사했다. 장수그룹에서 40에서 80살의 시험대상자 46명을 100년 이상 같은 공동체에서 거주하고 있는 가족으로부터 조심스럽게 선택하였다. 이와 같은 선택은 장수그룹에서 개개인들에게 노출된 환경 및 스트레스 노출로부터의 영향을 최소화하였다. 비슷한 생활 패턴을 가지고 있으나 매우 짧은 수명을 가지는 대조 시험군을 장수 공동체로부터 100마일 안에서 선택하였다. 대조 시험군으로부터 34명의 시험대상자는 40 내지 80살 사이에 골고루 분포하고 있었다. 모든 조사된 연령에서, 장수그룹에서 Ku70의 발현은 대조군보다 상당히 높았다(도 3 참조).

[0059] Ku70에 나이와 그룹사이의 의미 있는 상호작용 효과가 없었기 때문에, 주된 효과 회귀모델을 나이, 그룹 및 Ku70 사이의 관계를 밝히기 위해 사용하였다. Ku70에서 대조군의 백분율은 대조군 및 장수그룹 모두에서 나이가 증가함에 따라 의미 있게 감소하는(p<0.0001) 반면에, 장수그룹이 대조그룹보다 의미 있게 높았다(p=0.0322)(도 4 참조). 이들 결과는 이 들 두 그룹에서 개개에서 본래적인 Ku70의 양은 태어나면서부터 다르다는 것을 의미한다. 따라서 DSB 복구 활동을 유지하는데 필수적인 높은 Ku70 단백질을 가지고 있는 사람들이 장수하고 있다고 볼 수 있다.

[0060] [표 3] 제주 지역에서의 연구 대상의 특징

[0061]

	제주지역에서 장수그룹	제주지역에서대조그룹	p-값†
숫자(%)	46(57.5)	34(42.5)	
나이(년)	59.2± 10.3	63.8± 8.9	0.0401

[0062] * 평균 ± 표준편차

[0063] † 슈트던트 티-테스트

[0064] [표 4] 제주 지역에서의 Ku70에 대한 나이 및 장수그룹의 다중 회귀 분석

[0065]

변수*	계수	표준오차	p-값
절편	202.26	32.24	<0.0001
나이	-2.07	0.49	<0.0001
장수도†	21.54	9.88	0.0322

[0066] *R^2=0.27

[0067] †참조=대조군

[0068] [참고예] Ku70 발현수준과 텔로미어 길이 사이 관련성

[0069] Ku70의 역할은 텔로미어의 보호에 직접적으로 관련하고 있다면, 텔로미어의 길이는 Ku70의 세포내 양에 비례하여야 한다. 이 점을 시험하기 위하여, 장수그룹 및 대조그룹에서 분리되어진 CD4+ T세포로부터 얻어진 평균 텔로미어의 길이를 측정하였다.

[0070] 텔로미어 길이의 측정

[0071] 평균 텔로미어 제한 단편(Telomeric restriction fragment; TRF) 길이를 인간의 T 림프세포에서 측정하였다. 게놈 DNA를 디엔이지 티슈 키트(퀴이겐)로 추출하였고 및 5 ㎍ DNA을 Hinf I 및 Rsa I(뵈링거 만하임)로 다이제스쳔하였다. 그리고 그 다음에 치프 맵퍼 디알III 펄스-필드 젤 전기영동 장치(Bio-rad)를 사용하여 14℃에서 0.5x TBE 완충용액의 1% 아가로스 젤을 통해 전기 영동하였다. 분리조건은 16시간 동안 6 V/cm에서 램프 펄스 속도 1-6초로 하였다. 젤을 0.25M HCl에서 5-10 분간 가수분해하고 0.5M NaOH 및 1.5M NaCl에서 1시간 동안 변성되었다. 상기 젤을 [γ-^{32}P] 레이블된 텔로미어의 올리고뉴클레오타이드 프로브 [γ-^{32}-P-$(CCCTAA)_3$]으로 하이브리드 및 블랏하였다. 세척 후에, 젤은 인(phosphor) 스크린(코닥)에서 30분 동안 오토라디오그래프 되었다. 평균 TRF가 계산되는 레인을 퍼스널 몰레큘러 이메저 FX 시스템(바이오 라드)를 이용하여 스캔하였다. 평균 TRF 길이를 $\Sigma(OD_i)/\Sigma(OD_i/L_i)$로 정의된다. 여기에서 OD_i는 퍼스널 몰레큘러 이메저 FX 시스템 산출물이고 L_i는 위치 i 에서 DNA의 길이이다. 텔로미어 DNA의 양은 퀴언티티 원 소프트웨어(바이오 라드)안에 각각의 스미어의 부피를 합산하여 계산한다.

[0072] 도 5에서 보이듯이, 개개의 개인들에서 측정된 텔로미어의 길이는 5000 내지 8000bp 까지의 어느 곳에 분포하고 있다. 텔로미어의 길이와 Ku70의 수준과는 어떤 관련성이 없었다(r=0.138, p=0.2350). 이것은 Ku70이 텔로미어의 길이를 직접적으로 텔로미어의 길이를 조절하지 않고, 염색체내의 텔로미어 지역 내에서 복구 활동의 다른 면에 영향을 주는 것으로 보인다. 따라서, Ku70 수준을 유지하는 것은 텔로미어의 길이를 길게 하는 것보다는 다른 기작에 영향을 줌으로서 수명을 늘리는데 필수적일 수 있다.

발명의 효과

[0073] 본 발명은 노화가 진행됨에 따라 감소되어지는 Ku70 단백질은 노화의 정도를 측정하거나, 세포로 Ku70 단백질로 보충하여서 노화를 억제하기 위한 약학적 조성물 또는 화장품 조성물로 사용가능하고, 세포내에 Ku70의 전사량을 높여서 동물의 노화를 지연시킬 수 있어서, 동물의 생산성 증가에도 기여할 수 있다. 또한 Ku70 단백질의 함량을 감소시켜서 노화를 촉진시킬 수 있으며, 동물의 수명을 제한할 필요가 있는 경우에 노화촉진을 유발하여

제한하는데 이용 가능하다.

[0074] [참고문헌]

[0075] [1] Prowse, K.R. and Greider, C.W. (1995) Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 4818-4822.

[0076] [2] Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345, 458-460.

[0077] [3] Harley, C. B. (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? Mutat. Res. 256, 271-282. Review.

[0078] [4] Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp R. C., Thomas, R. E. Harley, C. B. and Lansdorp, P. M. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91. 9857-9860

[0079] [5] Jeon, H.Y., Hyun, S.H., Lee, G.S., Kim, H.S., Kim, S., Jeong, Y.W., Kang, S.K., Lee, B.C., Han, J.Y., Ahn, C. and Hwang, W.S. (2005) The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. Mol. Reprod. Dev. 71, 315-320.

[0080] [6] Hastings, R., Li, N.C., Lacy, P.S., Patel, H., Herbert, K.E., Stanley, A.G. and Williams, B. (2004) Rapid telomere attrition in cardiac tissue of the ageing Wistar rat. Exp. Gerontol. 39, 855-857.

[0081] [7] Haussmann, M.F., Winkler, D.W., O'Reilly, K.M., Huntington, C.E., Nisbet, I.C. and Vleck, C.M. (2003) Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. Proc. Biol. Sci. 270, 1387-1392.

[0082] [8] Von Zglinicki, T. and Martin-Ruiz, C.M. (2005) Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. Curr. Mol. Med. 5, 197-203. Review.

[0083] [9] Benard, C., McCright, B., Zhang, Y., Felkai, S., Lakowski, B. and Hekimi, S. (2001) The C. elegans maternal-effect gene clk-2 is essential for embryonic development, encodes a protein homologous to yeast Tel2p and affects telomere length. Development 128, 4045-4055.

[0084] [10] Bekaert, S., Derradji, H. and Baatout, S. (2004) Telomere biology in mammalian germ cells and during development. Dev. Biol. 274, 15-30. Review.

[0085] [11] Nilsson, P., Mehle, C., Remes, K. and Roos, G. (1994) Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. Oncogene 9, 3043-3048.

[0086] [12] Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J.F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2004) Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. Circ. Res. 94, 768-775.

[0087] [13] Wright, W.E. and Shay, J.W. (2005) Telomere-binding factors and general DNA repair. Nat. Genet. 37, 116-118.

[0088] [14] Karlseder, J., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 295, 2446-2449.

[0089] [15] van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. Cell 92, 401-413.

[0090] [16] Kirkwood, T.B. and Finch, C.E. (2002) Ageing: the old worm turns more slowly. Nature 419, 794-795.

[0091] [17] Mayer, P.J., Lange, C.S., Bradley, M.O. and Nichols, W.W. (1991) Gender differences in age-related decline in DNA double-strand break damage and repair in lymphocytes. Ann. Hum. Biol. 18, 405-

415.

[0092] [18] Weng, N.P., Levine, B.L., June, C.H. and Hodes, R.J. (1995) Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 11091-11094.

[0093] [19] Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M. and Allsopp, R.C. (1992) The telomere hypothesis of cellular aging. Exp. Gerontol. 27, 375-382.

[0094] [20] Artandi, S.E., Chang, S., Lee, S.L., Alson, S., Gottlieb, G.J., Chin, L. and DePinho, R.A. (2000) Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. Nature 406, 641-645.

[0095] [21] DePinho, R.A. and Wong, K.K. (2003) The age of cancer: telomeres, checkpoints, and longevity. J. Clin. Invest. 111, S9-14. Review.

[0096] [22] Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J. and Jasin, M. (1998) Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 5172-5177.

[0097] [23] Bailey, S.M., Meyne, J., Chen, D.J., Kurimasa, A., Li, G.C., Lehnert, B.E. and Goodwin, E.H. (1999) DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 14899-14904.

[0098] [24] d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q. and Jackson, S.P. (2001) Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. Curr. Biol. 11, 1192-1196.

[0099] [25] Stracker, T.H., Theunissen, J.W., Morales, M. and Petrini, J.H. (2004) The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. DNA Repair (Amst) 3, 845-854. Review.

[0100] [26] Miller, R.A., Harper, J.M., Galecki, A. and Burke, D.T. (2002) Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. Aging Cell 1, 22-29.

[0101] [27] Hekimi, S. and Guarente, L. (2003) Genetics and the specificity of the aging process. Science 299, 1351-1354. Review.

[0102] [28] Herskind, A.M., McGue, M., Holm, N.V., Sorensen, T.I., Harvald, B. and Vaupel, J.W. (1996) The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. Hum. Genet. 97, 319-323.

[0103] [29] Mitchell, B.D., Hsueh, W.C., King, T.M., Pollin, T.I., Sorkin, J., Agarwala, R., Schaffer, A.A. and Shuldiner, A.R. (2001) Heritability of life span in the Old Order Amish. Am. J. Med. Genet. 102, 346-352.

[0104] [30] Perls, T., Levenson, R., Regan, M. and Puca, A. (2002) What does it take to live to 100? Mech. Ageing. Dev. 123, 231-242. Review.

[0105] [31] Martin, G.M. (1985) Genetics and aging; the Werner syndrome as a segmental progeroid syndrome. Adv. Exp. Med. Biol. 190, 161-170. Review.

[0106] [32] Fossel, M. (2000) Human aging and progeria. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 16, 1477-1481. Review.

[0107] [33] Gelman, R., Watson, A., Bronson, R. and Yunis, E. (1988) Murine chromosomal regions correlated with longevity. Genetics 118, 693-704.

도면의 간단한 설명

[0001] 도 1은 20에서 80대 연령의 48명의 자원자로부터 얻은 CD4+ T 세포에서 Ku70 및 Mre11의 단백질 발현을 보인다.

[0002] 위쪽패널; 인간의 임파구로부터 분리된 Ku70(A) 또는 Mre11(B)의 총 단백질량을 인간의 Ku70 또는 인간의 Mre11에 대한 토끼 단일클론 항체를 사용하여 웨스턴블랏에 의해 측정하였다. 분석되어진 48개의 시료 중에 각각의

연령대(20-30, 40-50, 60 및 그 이상)에서 5-6개의 단백질 발현을 보인다. I.S 는 Ku-발현 세포주로부터 얻은 내부 표준물질을 나타낸다. A549 인간의 폐암 세포주로부터 얻은 1, 4.5 및 20 ㎍의 분해물이 젤에 올려졌다.

[0003] 아래쪽 패널: 나이에 대한 Ku70(A) 또는 Mre(B) 단백질 레벨에 대한 분산 그림(scatter plot) 여러 다른 노인들로부터 Ku70 또는 Mre11의 단백질 퍼센트 정도가 위에 보인 20㎍ 내부 표준물질의 정도로 나누어서 얻었다.

[0004] 도 2는 20대와 80대 사이의 사람들에서 Ku70과 Mre11 발현의 상관 분석을 보인다. Ku70 과 Mre11 발현의 분산 그림은 Ku70 과 Mre11 사이에 의미 있는 일차적 상관관계를 보인다. (피어슨 상관 계수, r=0.5472, p<0.0001)

[0005] 도 3은 장수 시험군과 대조시험군으로 얻은 CD4+ T 세포에서 Ku70의 발현을 보인다.

[0006] A.장수군으로부터 얻어진 80 샘플로부터의 Ku70의 단백질 수준과 대조군의 단백질 수준이 대조군의 퍼센트로 표현되었다(도 1 참조). 그리고 나이에 대해서 막대그래프 형태로 그려졌다.

[0007] B. 60 대 및 70 대의 노인들로서의 시료에서 Ku70 단백질 발현은 항-Ku-70 면역블랏으로 보였다.

[0008] 도 4는 제주지역의 대조군 및 장수그룹의 나이에 따른 Ku70의 감소 패턴.

[0009] 나이에 대한 Ku70이 발현의 분산 그림을 장수군 및 대조군에 대해 각각 보였다. 개인에서 Ku70의 퍼센트는 도 1에서와 같이 구했고 나이에 대해서 그려졌다.

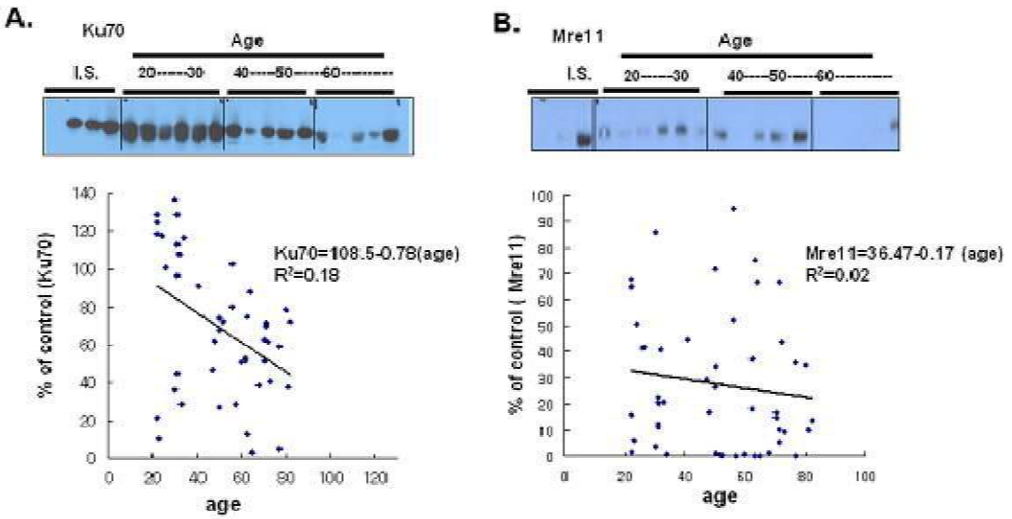
[0010] 도 5는 제주지역에서 텔로미어의 길이와 Ku70 발현의 분산 그림을 보인다.

[0011] CD4+ T세포에서 텔로미어의 길이가 측정되었고, Ku70의 발현에 대해서 그려 졌다(피어슨 상관 계수는 r=0.1379, p=0.2350).

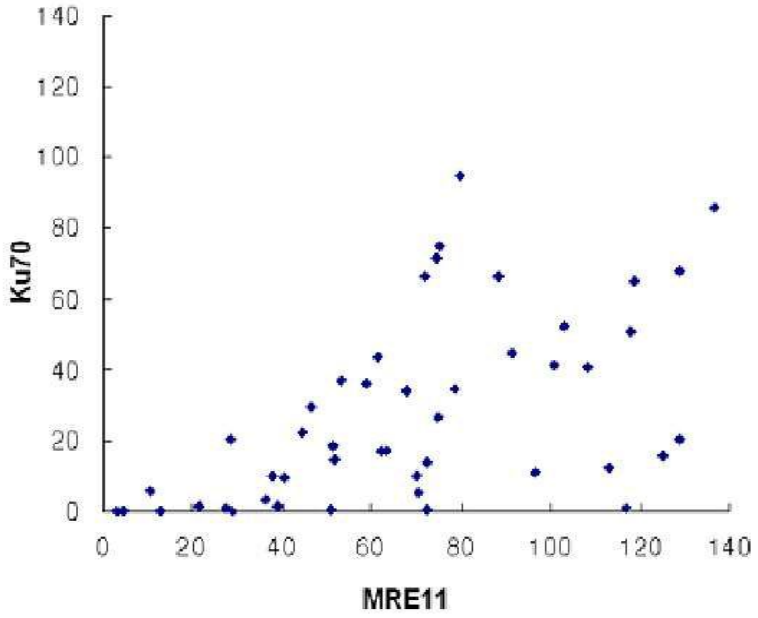
[0012] Ku70 수준과 텔로미어의 길이 사이에는 통계적으로 의미 있는 관계가 없었다.

도면

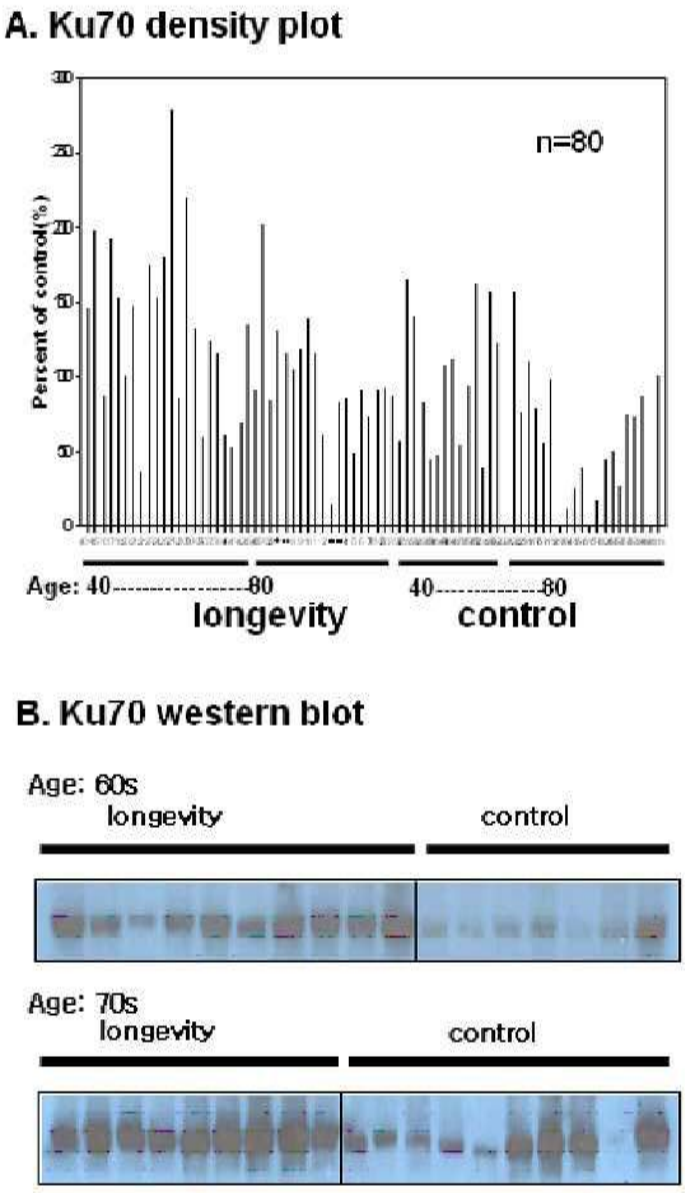
도면1



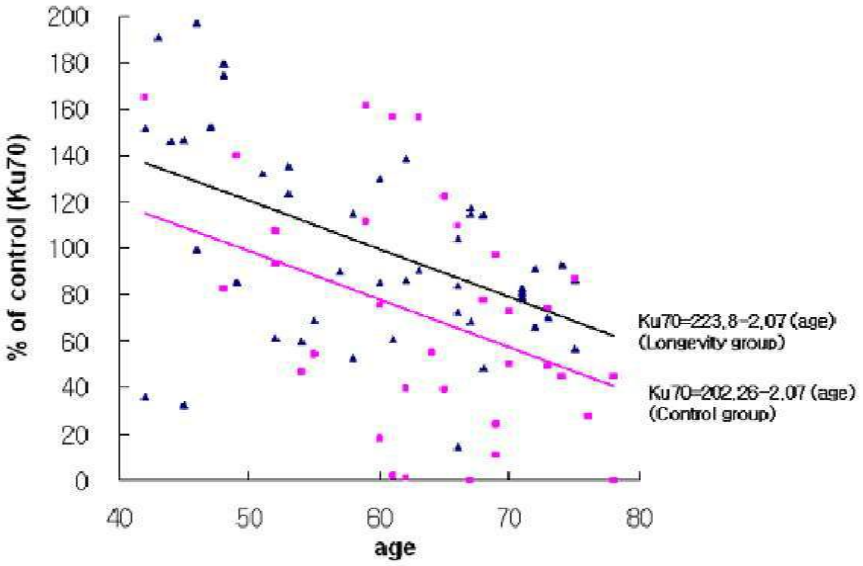
도면2



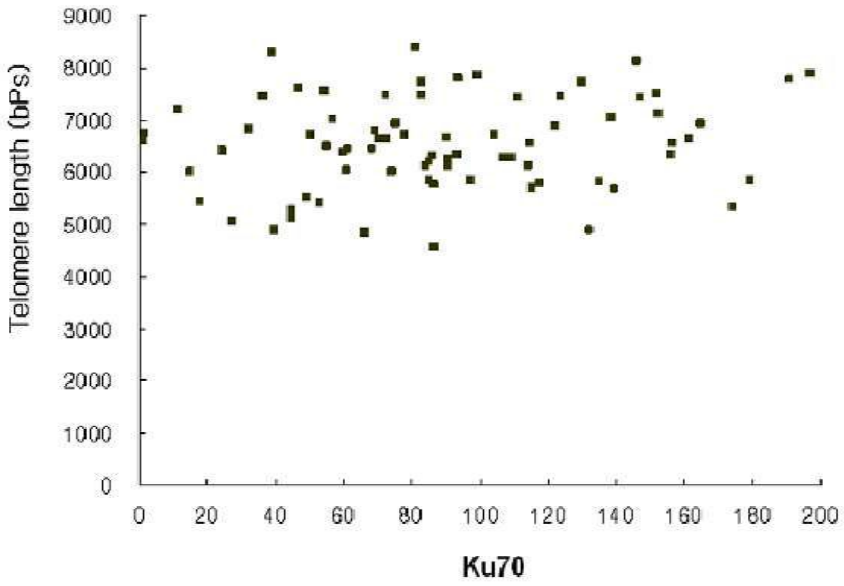
도면3


A. Ku70 density plot
n=80
Percent of control(%)
Age: 40----------80
longevity
40----------80
control
B. Ku70 western blot
Age: 60s
longevity
control
Age: 70s
longevity
control

도면4


% of control (Ku70)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
40
50
60
70
80
age
Ku70=223.8-2.07 (age)
(Longevity group)
Ku70=202.26-2.07 (age)
(Control group)

도면5


Telomere length (bPs)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Ku70