



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0119396
(43) 공개일자 2016년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) *A23L 1/305* (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/17 (2013.01)

A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0047674

(22) 출원일자 2015년04월03일

심사청구일자 2016년04월05일

(71) 출원인

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

최원재

경기도 광명시 오리로 801 204동 2303호 (하안동, e편한세상센트레빌아파트)

(74) 대리인

손민

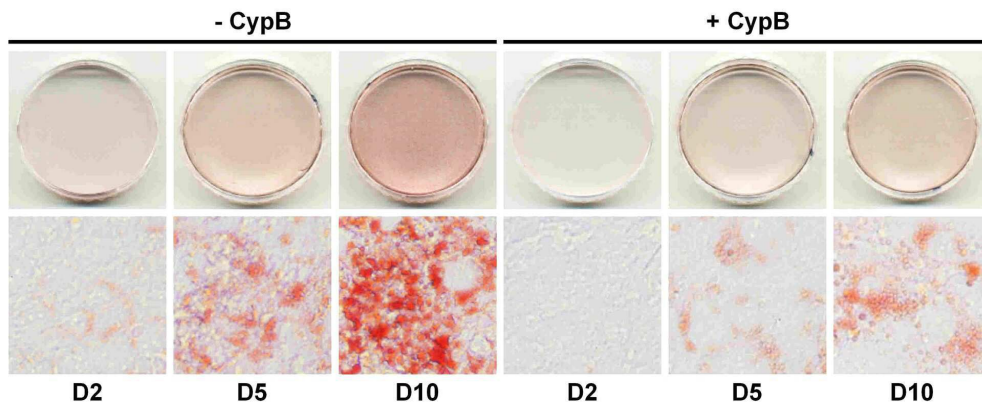
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 CypB 단백질의 GSK-3 β 조절 이상 질환 치료 용도

(57) 요약

본 발명은 CypB(사이클로필린 B) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5c



(52) CPC특허분류

G01N 33/5008 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 15182MFDS456

부처명 식약처

연구관리전문기관 독성평가연구부 독성연구과

연구사업명 독성물질 국가관리연구

연구과제명 치매관련바이오마커규명을위한단백질분석및제어기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2015.02.01 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 GSK-3 β 조절 이상 질환은 대사성 질환 또는 암인 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만, 이상지질혈증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 동맥경화증, 및 비알코올성 지방간을 포함하는 군에서 선택되는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 조성물은 지방세포의 분화를 억제하는 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 CypB 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 CypB 단백질을 코딩하는 핵산은 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 GSK-3 β 조절 이상 질환은 대사성 질환 또는 암인 것인, 방법.

청구항 9

CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 GSK-3 β 조절 이상 질환은 대사성 질환 또는 암인 것인, 건강기능식품.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 건강기능식품은 체지방을 감소시키거나 혈중중성지방을 개선하는 것인, 건강기능식품.

청구항 12

CypB 단백질 발현 세포와 후보 물질을 접촉시키는 제1단계; 및

상기 제1단계에서의 CypB 단백질의 발현량을, 후보 물질과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 제2단계를 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 GSK-3 β 조절 이상 질환은 대사성 질환 또는 암인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 방법은, 제1단계에서의 CypB 단백질의 발현량이 후보 물질과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량에 비해 높을 경우, 상기 후보 물질을 대사성 질환 예방 또는 치료물질로 결정하는 제3단계를 추가로 포함하는 것인, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 CypB(사이클로필린 B) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

대사성 질환 (metabolic disease)은 대사 장애가 만성적 경과를 취할 때 고혈압, 이상지혈증, 비만, 심혈관계

죽상경화증과 같은 여러 가지 질환이 동시에 발생하고 진행되는 (work-in-progress) 것을 의미한다. 복부 비만, 고중성지방혈증(중성지방 150 mg/dl 초과), 저 고밀도지단백-콜레스테롤, 고혈압(130/80 mmHg 초과), 고혈당(공복 혈당 110 mg/dl 이상)인지 여부를 고려하여 대사성 질환 여부를 판단한다. 대사성 질환 환자에게는 탄수화물 조절, 불포화 지방산의 섭취 그리고 이 외에 식이요법을 동반한 체중조절, 운동 등이 권해지나, 현재 대사성 질환의 근본적인 원인 및 예방, 치료법은 밝혀지지 않고 있다.

[0004] 대사성 질환은 도시화된 생활환경으로 인한 운동부족 및 과도한 영양섭취와 부족한 에너지 소모로 그 환자가 급증하고 있다. 현재 미국인의 5명에 1명꼴로 대사성 질환에 속하는 것으로 알려져 있으며 이것은 미국인의 25%에 해당한다. 영국에서도 국민의 25%가 대사성 질환에 해당하며 한국에서는 최근 5년 동안 약 20%의 증가세를 보이고 있으며 특히나 9세 미만 아동의 경우 약 40%의 증가세를 보이고 있다. 따라서 대사성 질환의 효과적인 치료제가 요구되고 있다.

[0006] 한편, 유전자 치료(gene therapy)는 치료 핵산을 체내의 원하는 장기로 전달하여 세포 내에서 새로운 단백질이 발현되도록 하여 질병을 치료하는 것으로, 질병의 증상을 치료하는 것이 아니고 질병의 원인을 치료하여 제거하는 방식이다. 유전자 치료는 일반적인 약물에 의한 치료에 비해서 우수한 선택성을 가질 수 있고 다른 치료법으로는 조절하기 힘든 질병의 치료율 및 치료 속도를 개선하여 오랜 기간 동안 적용할 수 있다.

[0007] 대사성 질환에 대한 유전자 치료 관련 기술로 한국등록특허 제1,266,771호는 DNER를 활성화시키는 기작으로 비만을 개선하거나 비만 관련 질환의 치료 방법에 대하여 기재하고 있으며, 한국등록특허 제1,286,882호는 Ahnak 유전자의 발현을 억제하는 기작으로 비만을 치료하는 방법에 대하여 기재하고 있다.

[0009] 한편, CypB (Cyclophilin b) 단백질은 이뮤노필린(immunophilin) 패밀리에 속하는 하나로, 특히 펩티딜-프롤릴 이성체 (PPIase) 활성이 있다고 보고되고 있다. PPIase 활성은 단백질 폴딩, 세포 사이 트래피킹, 멀티단백질 복합체 안정성의 유지를 촉진하는 분자 샤페론(chaperones)과 같은 역할을 한다. CypB는 소포체로 향하는 신호 서열의 존재에 의해서 다른 Cyp 단백질과 구별되며, 소포체뿐만 아니라 세포의 공간과 핵에서도 발견된다. 소포체로 향하는 25-아미노산 서열을 포함하는 21-kDa 단백질인 CypB는 소포체 스트레스 반응에서 중요한 역할을 하고 ER 스트레스로부터 세포를 보호한다.

[0010] 본 발명자들은 한국공개특허 2012-0030810에서 CypB 단백질이 알츠하이머 (Alzheimer) 질환에서 아밀로이드 베타 펩티드 (amyloid beta peptide) 집합체 형성을 억제하는 것은 물론, 알츠하이머 질환으로부터 유발된 산화스트레스 (oxidative stress) 및 세포자멸사를 억제시킨다고 보고한 바 있다.

[0012] 한편, GSK-3 β 는 세린/쓰레오닌 단백질 키나아제로 세포 기질내에서 세린 및 아미노산에 인산을 첨가하는 역할을 하는 단백질이다. GSK-3은 면역반응 활성화와도 관련이 있다. 전사인자 NF-AT를 탈인산화하여 핵으로의 이동을 촉진하여 초기의 면역반응 유전자의 전사를 활성화시키는 칼시뉴린의 효과와는 반대로 GSK-3은 NF-AT를 인산화하여 핵으로부터 빠져나오는 것을 촉진하여 NF-AT에 의한 면역반응 유전자의 활성화를 초기에 차단하게 된다 (Beals CR., et al., Science, 275, 1930-1934, 1997).

[0013] 그 외에도, GSK-3은 유방암, 대장암, 갑상선암, T 또는 B세포 백혈병 및 여러 바이러스에 의해 유도된 종양 (Eastman Q., et al., Curr Opin Cell Biol., 11, 233-240, 1999), 심장 비대증, 모발 손실 및 비만 등 대사성 질환을 비롯한 많은 질환의 치료에서 중요한 잠재성을 갖는다고 알려져 있다(한국공개특허 2013-0130239).

[0014] 그러나 CypB 단백질과 GSK-3 β 조절 이상 질환과의 관련성에 대해서는 보고된바 없다.

[0016] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 GSK-3 β 조절 이상 질환의 치료 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, CypB로 인한 GSK-3 β 의 저해가, β -카데닌의 안정성을 증가시킴과 동시에 Wnt/ β -카데닌 신호 경로의 활성을 높임을 확인하였으며, 특히 CypB가 지방세포 분화를 억제하여 지방생성을 감소시키므로 비만 등 GSK-3 β 조절 이상 질환을 치료할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 주된 목적은 CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 CypB 단백질 발현 세포와 후보 물질을 접촉시키는 제1단계; 및 상기 제1단계에서의 CypB 단백질의 발현량을, 후보 물질과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 제2단계를 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0023] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명자들은 CypB가 GSK-3 β 를 저해함으로써 β -카테닌 신호 경로의 활성을 높임을 확인하였으며, 특히 CypB가 지방세포 분화를 억제하여 지방생성을 감소시키므로 비만 등 GSK-3 β 조절 이상 질환을 치료할 수 있음을 최초로 확인하였다.
- [0026] 이하, 본 발명에서의 약학 조성물을 구체적으로 설명한다.
- [0028] 상기 GSK-3 β 조절 이상 질환은 일 예로 대사성 질환 또는 암일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 GSK-3 β 조절 이상(abnormality)으로 인하여 발생하는 것으로 알려진 질환이라면 모두 포함될 수 있다.
- [0029] 상기 암은 유방암, 대장암, 갑상선암, T 또는 B세포 백혈병 및 여러 바이러스에 의해 유도된 종양을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 대사성 질환은 비제한적인 일 예로 비만, 이상지질혈증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 동맥경화증, 및 비알코올성 지방간을 의미할 수 있으나, GSK-3 β 조절 이상으로 인하여 발생하거나, 지방생성, 지방세포 분화를 억제함으로써 치료할 수 있는 질환이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0031] 상기 이상지질혈증(dyslipidemia)은 낮은 고밀도지단백 콜레스테롤(HDL-Chol), 높은 중성지방(TG) 농도 및 약간 높거나 또는 정상인 저밀도지단백 콜레스테롤(LDL-Chol) 농도의 조합을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 죽상경화성 이상지질혈증과 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 고지혈증은 혈액 중의 지질이 정상치보다 높은 상태를 의미할 수 있다. 필요 이상으로 많은 지질이 혈액 내에 존재하면서 혈관벽에 쌓여 염증을 일으키고 그 결과 심혈관계질환을 유발하게 된다. 고지혈증은 이상지질혈증의 한 범주에 속한다고 볼 수 있다.
- [0033] 상기 비알코올성 지방간은 간의 지방 유입속도가 간의 지방 제거속도를 능가함으로써 지방축적이 발생하여 발생하며, 간세포에 지방의 과도한 축적만 있는 단순 지방증(simple steatosis), 간세포 괴사와 염증과 섬유화를 동반하는 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 및 더 진행된 형태인 간경변증을 포함하는 일련의 질환군을 의미할 수 있다.

- [0035] 상기 CypB는 지방세포의 분화를 억제하는 것일 수 있으며, C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2의 발현을 억제시키는 것일 수 있다. C/EBP는 지방전구세포의 분화과정에서 발현하는 전사인자군으로, 그 중 C/EBP α 는 지방세포의 분화와 지방침착에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. PPAR γ 는 지방세포로의 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자로, 지방 조직에서 지방산의 저장을 촉진시키는 기능을 담당하며, 지방조직에서 발현이 가장 높다. aP2는 지방세포 분화를 조절하는 지방산 결합 단백질이다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서는 CypB가 지방세포 분화를 억제하여 지방생성 감소시킴을 확인하였으며(도 5b, 도 5c), 재조합 CypB의 농도 증가에 따라 농도의존적으로 지방세포분화관련 지표단백질인 C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2의 단백질 및 전사 수치가 유의하게 감소함(도 5d, 도 5e)을 확인하였다.
- [0037] 이러한 결과는 CypB가 지방세포 분화 및 지방생성을 억제하므로, CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 지방생성과 관련된 질환인 대사성 질환의 치료에 효과적으로 사용할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0039] 상기 CypB 단백질은 GSK-3 β 의 발현을 저해하는 것일 수 있다. GSK-3 β 는 면역반응 활성화, 염증, 당뇨, 퇴행성 신경 질환, 정신질환, 암, 심장 비대증, 모발 손실, 비만 등 다양한 질환과 연관이 있는 것으로 알려져 있으나, GSK-3 β 저해의 매커니즘은 알려진바 없다.
- [0040] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에서 CypB가 Akt 신호전달에 의하여 GSK-3 β 의 프로테아좀 분해를 촉진함을 확인하였으며(도 1a 내지 도 1f). GSK-3 β 발현을 저해함으로써, GSK-3 β -매개된 β -카테닌 유비퀴틴화를 저해하며, β -카테닌과 상호작용하며 β -카테닌의 안정화에 관여함을 확인하였다(도 3a 내지 도 3g).
- [0042] CypB 단백질
- [0043] 본 발명에서 CypB 단백질은 효모, 식물 또는 동물 유래의 모든 CypB 단백질을 포함한다. 야생형(wild type)의 CypB 단백질을 포함하여, GSK-3 β 를 저해함으로써 Wnt/ β -카테닌 신호 경로의 활성을 높이는 기능을 하는 한 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 CypB 단백질의 변이체를 포함할 수 있다. 하나의 구체적 예시로서, 상기 CypB 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어 상기 CypB 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖거나, 상기 서열과 80% 이상, 일 예로 90% 이상, 다른 일 예로 95% 이상, 또 다른 일 예로 98% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서, GSK-3 β 를 저해함으로써 Wnt/ β -카테닌 신호 경로의 활성을 높이는 기능을 하는 CypB 단백질을 코딩하는 한 상기 서열의 치환, 삽입, 결실 변이체도 포함할 수 있다.
- [0044] CypB 단백질의 변이체란 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미할 수 있다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능할 수 있다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 잔기로 이루어지나, 일부의 경우에는 도메인 중 하나가 결실될 수 있는 것과 같이 보다 큰 결실 또한 가능할 수 있다. 이런 변이체는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0045] 또한, CypB 단백질은 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다. 상기 변이체 또는 수식체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이나, 필요에 따라서는 이의 단백질의 특성을 변형시킨 변이체 또는 수식체일 수 있다. 일 예로 아미노산 서열상의 변이와 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질일 수 있다.
- [0046] CypB 단백질은 당 분야에 널리 공지된 방법으로 천연에서 추출 및 정제하여 얻을 수 있다. 달리, CypB 단백질의 서열이 밝혀져 있으므로 화학적 합성(Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963)하거나 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, CypB를 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 CypB가 발현되도록 숙주 세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터

CypB을 회수하는 과정으로 수득할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [0047] CypB 단백질을 발현시키기 위한 발현백터는 통상의 모든 발현 백터를 사용할 수 있다. 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 사용될 수 있는 숙주세포로는 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [0048] 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용할 수 있다.
- [0050] CypB을 코딩하는 핵산
- [0051] 본 발명에서 CypB을 코딩하는 핵산은 CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산으로서, 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 CypB 단백질을 코딩하는 것일 수 있다. 또한 상기 서열 중 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조한 것일 수 있다.
- [0052] CypB 단백질을 코딩하는 핵산을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포라미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.
- [0053] CypB 단백질을 코딩하는 핵산은 일 예로 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것일 수 있고, 다른 일 예로 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 그러나 상기 서열과 80% 이상, 일 예로 90% 이상, 다른 일 예로 95% 이상, 또 다른 일 예로 98% 이상 또는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서, GSK-3 β 를 저해함으로써 Wnt/ β -카테닌 신호 경로의 활성을 높이는 기능을 하는 한 상기 서열의 치환, 삽입, 결실 변이체도 포함할 수 있다.
- [0054] 상기한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0055] 상기 CypB 단백질을 코딩하는 핵산은 이를 발현하는 백터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 백터에 포함되어 제공될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 백터란 목적 유전자를 코딩하는 핵산 서열(예: DNA, RNA 등)을 숙주 세포로 도입하기 위한 수단을 의미한다. 발현 백터란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 백터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미할 수 있다.
- [0057] 상기 백터는 상기 CypB 단백질을 코딩하는 핵산이 작동가능하게 연결되어 포함된 것일 수 있다. 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 백터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [0059] CypB을 코딩하는 핵산을 포함하는 백터
- [0060] 상기 CypB 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 백터는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 사용되는 백터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진

임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계, pET계, pMAL계 또는 pHT계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pMAL-p2x 또는 pHT43 벡터 등을 사용할 수 있다.

[0062] 본 발명의 벡터는 상동재조합을 일으켜서 염색체 내로 삽입될 수 있으므로 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다.

[0063] 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 포함될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

[0064] CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 직접 주사하거나 (Wolff et al., Science, 247:1465-8, 1990; Wolff et al., J Cell Sci. 103:1249-59, 1992), 리포솜(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer)등을 이용하여 GSK-3 β 조절 이상 질환의 치료 또는 예방의 목적으로 환자 세포 안으로 전달될 수 있다. 리포솜은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체가 형성된다 이 복합체는 세포내로 엔도사이토시스 되어 엔도솜 내에 체류하게 되다(Schaefer-Ridder M et al., Science. 215(4529):166-168, 1982; Hodgson et al., Nat Biotechnol., 14(3):339-342, 1996). 엔도솜에서 유입된 유전자가 세포질을 거쳐 핵으로 이동하는 정도가 유전자 전이와 치료 효율을 결정하게 된다. 이런 유전자 전이 방법은 면역원성이 낮아서 반복 투여가 가능하고 안전성이 높은 장점이 있다. 유전자 수송에 사용되는 양이온성 고분자로는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 스퍼민(spermine), 폴리에틸렌민(PEI: polyethylenimine), 키토산(chitosan)등이 있다(Hashida, Br J Cancer., 90(6):1252-1258, 2004; Wiseman, Gene Ther., 10(19):1654-1662, 2003; Koping-Hoggard, Gene Ther., 8(14):1108-1121, 2001).

[0065] 유전자를 양이온성 고분자와 복합체 형태로 체내 투여할 경우 유전자의 체내 체류시간 및 발현 지속시간이 네이키드 DNA(naked DNA)에 비하여 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다.

[0066] CypB을 발현하도록 조작된 재조합 벡터를 환자 세포로 트랜스펙션시킬 경우, 그 발현 효율을 증대시킬 수 있기 때문에 치료 효과가 우수하다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 조성물을 개체에 투여하여 대사성 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0069] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 대사성 질환의 발병 의심 개체에 투여하여 대사성 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0070] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 대사성 질환 치료 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체 (non-naturally occurring carrier)를

포함할 수 있다.

- [0072] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 CypB 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0076] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0079] 다른 양태로서, 본 발명은 *cypB* 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 CypB에 직접 또는 간접적으로 작용하여 CypB의 생물학적 활성을 개선, 유도, 자극, 증가시킬 수 있는 한, 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물, 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 포함할 수 있다. 상기 물질이 CypB를 활성화시키는 기작은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 물질은 전사, 번역 등의 유전자 발현을 증대시키거나, 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작으로 작용할 수 있다.
- [0081] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0082] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 대사성 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0083] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 대사성 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 일 실시예에서는 CypB가 지방세포 분화를 억제하여 지방생성을 감소시킴을 확인하였으며(도 5b, 도

5c), 제조합 CypB의 농도 증가에 따라 농도의존적으로 지방세포분화관련 지표단백질인 C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2의 단백질 및 전사 수치가 유의하게 감소함(도 5d, 도 5e)을 확인하였다.

[0086] 이러한 결과는 CypB가 지방세포 분화 및 지방생성을 억제하므로, CypB 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 지방생성과 관련된 질환인 대사성 질환의 치료에 효과적으로 사용할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0088] 또 다른 양태로서, 본 발명은 CypB 단백질을 코딩하는 핵산, 및 상기 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0089] 본 발명에서 GSK-3 β 조절 이상 질환, 예방의 의미는 상기한 것과 같다.

[0090] 상기 건강기능식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 대사성 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0091] 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0092] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 대사성 질환의 예방 또는 개선 효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0093] 상기 식품보조첨가제는 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 그 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0094] 이때, 상기 식품에 포함되는 추출물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.

[0095] 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1 내지 30g, 바람직하게는 3 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthothenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클라메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[0096] 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

[0097] 상기 건강기능식품은 체지방을 감소시키거나 혈중중성지방을 개선하는 것일 수 있다. 본 발명에서 체지방 감소는 체내에 과도하게 체지방이 축적되어 있는 개체가 기능성 원료를 섭취함으로써 체지방 합성이 저해되거나 체지방 분해가 촉진되어 체지방량이 감소하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 혈중중성지방 개선은 섭취 또는

간에서 합성되어 혈액 속에 있는 혈중 지방의 수치를 감소시키는 것을 의미할 수 있다.

- [0098] 본 발명의 일 실시예에서는 CypB가 지방세포 분화를 억제하여 지방생성을 감소시킴을 확인하였으며(도 5b, 도 5c), 재조합 CypB의 농도 증가에 따라 농도의존적으로 지방세포분화관련 지표단백질인 C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2의 단백질 및 전사 수치가 유의하게 감소함(도 5d, 도 5e)을 확인하였다.
- [0099] 이러한 결과는 CypB가 지방세포 분화 및 지방생성을 억제하므로, CypB를 체지방을 감소시키거나 혈중중성지방을 개선하는 용도로 효과적으로 사용할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0101] 또 다른 양태로서, 본 발명은 CypB 단백질 발현 세포와 후보 물질을 접촉시키는 제1단계; 및 상기 제1단계에서의 CypB 단백질의 발현량을, 후보 물질과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 제2단계를 포함하는, GSK-3 β 조절 이상 질환 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0102] 상기 방법은, 제1단계에서의 CypB 단백질의 발현량이 후보 물질과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량에 비해 높을 경우, 상기 후보 물질을 GSK-3 β 조절 이상 질환 예방 또는 치료물질로 결정하는 제3단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0103] 먼저, 제1단계는 CypB 단백질 발현 세포와 후보 물질을 접촉시키는 단계이다. 상기 후보 물질은 GSK-3 β 조절 이상 질환 예방 또는 치료물질로 의심되는 물질을 의미할 수 있다. 상기 처리 방법은 당업계에서 널리 사용하는 방법을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0104] 상기 제2단계에서, CypB 단백질의 발현량의 차이는 단백질 수준 또는 mRNA 수준에서 확인할 수 있다. 단백질 발현량의 수준은 각각의 단백질을 겔에 로딩한 후 전기 영동을 통해서 확인할 수 있으나, 예를 들어 CypB 단백질에 대한 항체를 이용한 항원-항체 복합체 형성량을 통해 면역검정법으로 확인할 수 있다. 이러한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, RIA, 면역침전 분석법 등이 있다. 상기 검출 방법에서 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 항원-항체 복합체 형성을 검출하기 위해 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법을 이용할 수 있으며, 반드시 이들로만 제한되는 것은 아니다.
- [0105] mRNA 발현량의 수준은 CypB 단백질에 특이적인 프라이머를 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들어 RT-PCR 또는 노던 블롯 등의 방법을 사용할 수 있다. 밴드의 패턴과 강도를 확인함으로써 CypB의 mRNA로의 전사를 정량적으로 측정할 수 있는 간편한 분석방법인 RT-PCR을 사용할 수 있다.
- [0106] 상기 방법에 의하여 스크리닝된 약물은, 세포 내 CypB 발현량을 증가시킬 수 있으며, 예를 들어 지방 세포 내 CypB 발현량을 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0108] 본 발명에 따른 조성물은 GSK-3 β 의 저해를 통하여 지방세포 분화 및 지방생성을 억제하므로 GSK-3 β 조절 이상 질환의 예방, 개선, 또는 치료에 효과적으로 사용할 수 있다.
- [0109] 또한, 본 발명에 따른 스크리닝 방법은 CypB 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 GSK-3 β 조절 이상 질환 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0111] 도 1a 내지 도 1g는 CypB가 Akt 신호전달에 의하여 GSK-3 β 의 프로테아좀 분해를 촉진함을 보여주는 것으로, 도 1a는 CypB의 과발현에 따른 GSK-3 β 의 활성 변화를 나타낸 것이고, 도 1b는 CypB의 억제에 따른 GSK-3 β 의 활성 변화를 나타낸 것이고, 도 1c는 야생형 CypB의 유무에 따른 세포 내 내재된 GSK-3 β 단백질의 분배를 나타낸 것이고, 도 1d는 CypB의 도입으로 인한 GSK-3 β mRNA 수치의 변화를 나타낸 것이고, 도 1e 및 도 1f는 프로테아좀

저해제 MG132 또는/및 단백질 합성 저해제 CHX의 처리에 따른 GSK-3 β 의 변화를 나타낸 것이고, 도 1g는 GSK-3 β 의 반감기를 나타낸 것이다.

도 2a 내지 도 2j는 GSK-3 β 의 N-말단 부위와 CypB의 상호작용을 보여주는 것으로, 도 2a는 GSK-3 β 와 CypB의 공동 면역침강 결과를 나타낸 것이고, 도 2b는 CypB와 GSK-3 β 의 상호작용을 나타낸 것이고, 도 2c는 CypB와 GSK-3 β 의 특이적 결합을 나타낸 것이고, 도 2d는 CypB와 GSK-3 β 의 공존(colocalization)을 관찰하여 나타낸 것이고, 도 2e는 GSK-3 β 인산화가 CypB와 GSK-3 β 의 결합에 미치는 영향을 나타낸 것이고, 도 2f는 CIAP 처리에 따른 GSK-3 β 의 변화를 나타낸 것이고, 도 2g는 CIAP 처리에 따른 CypB와 GSK-3 β 간의 상호작용 변화를 나타낸 것이고, 도 2h 및 도 2i는 GSK-3 β 의 특이적 결합 위치를 나타낸 것이고, 도 2j는 GST 폴다운 어세이 결과를 나타낸 것이다.

도 3a 내지 도 3i는 GSK-3 β 매개 β -카테닌 인산화 및 Wnt 경로에 대한 CypB의 영향을 나타낸 것으로, 도 3a 및 도 3b는 CypB의 변화에 따른 β -카테닌 또는 인산화된 β -카테닌의 수치변화를 나타낸 것이다. 도 3c는 CypB의 변화에 따른 β -카테닌의 유비퀴틴화 수치 변화를 나타낸 것이다. 도 3d 및 도 3e는 CypB와 β -카테닌의 상호작용을 나타낸 것이다. 도 3f 및 도 3g는 CypB의 과발현에 따른 핵 내 β -카테닌의 수치 변화를 나타낸 것이다. 도 3h 및 도 3i는 TOP/FOP 루시퍼라제 리포터 어세이 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 CypB의 역할을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 5b 내지 도 5f는 도 5a의 실험방법에 따른 CypB의 지방세포 형성 저해 효과를 나타낸 것으로, 도 5b는 광학 현미경 관찰 결과를 나타낸 것이고, 도 5c는 Oil Red O 염색 결과를 나타낸 것이고, 도 5d는 분광 광도계 측정 결과를 나타낸 것이고, 도 5e는 CypB 존재 또는 부재에 따른 C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2와 같은 공통적인 지방생성 관련 하위 단백질에 대한 웨스턴블롯 결과를 나타낸 것이고, 도 5f는 이의 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다.

도 6b 및 도 6c는 도 6a의 실험방법에 따른 알츠하이머 질병 모델에서의 CypB와 GSK-3 β 의 관계를 나타내는 것으로, 도 6b는 음성대조군(sham)과 B6C3 마우스 간의 GSK-3 β 의 발현 수치변화를 나타낸 것이고, 도 6c는 해마의 DG, CA1 구역의 GSK-3 β 의 발현을 비교하여 나타낸 것이다.

도 7은 CypB와 GSK-3 β , β -카테닌, Wnt 경로와의 관계를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

실시예 1-9

실시예 1. 플라스미드 및 시약의 준비

전체 RNA로부터 RT-PCR을 통하여 전장 인간 CypB (서열번호 1)를 증폭하였다. 이때 하기의 프라이머를 사용하였고, 상기 인간 CypB를 pCMV-Tag2B 벡터에 도입하였다.

전방향 프라이머

5' -AAAGGATCCATGCTGCGCTCTCCGAA- 3' (BamHI) - 서열번호 3

역방향 프라이머

3' -AAACTCGAGCTCCTTGGCGATGGCAAA- 5' (XhoI)- 서열번호 4

야생형 CypB를 포함하는 야생형 pcDNA3-HA-CypB 및 PPIase (peptidylprolyl isomerase)가 결손된 변이 CypB를 포함하는 변이 pcDNA3-HA-CypB (R95A)를 Oh et al., (Free Radic Biol Med 51, 905-920; 2011)에 기재된 방법으로 제조하였다.

야생형 인간 pcDNA3-HA-GSK-3 β , 항상 활성이 있는 변이된 pcDNA3-HA-GSK-3 β (S9A), 및 효소적으로 불활성한 pcDNA3-HA-GSK-3 β (K85A)는 E. J. Choi로부터 얻었다.

- [0125] QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis 키트 (Stratagene, La Jolla, CA) 를 이용하여 판매자의 프로토콜에 의해 모든 GSK-3 β 변이체 (K201A, K292A, K297A)를 제조하였다. 구체적으로, 상기 야생형 GSK-3 β 컨스트럭트를 기초로 하여 K201, K292, 및 K297의 라이신을 알라닌으로 치환하고, K201A 과 K297A의 A를 AA로 대체하였다. 모든 변이는 시퀀싱에 의하여 확인하였다.
- [0126] pIRES2-EGFP-GSK-3 β , pIRES2-EGFP-GSK-3 β (S9A), 및 pIRES2-EGFP-GSK-3 β (K85A) 는 G. Yoon 으로부터 얻었다. pGEX-KG-CypB 및 pGEX-KG-CypB (R95A) 는 C. V. Clevenger 로부터 얻었고, pcDNA3-HA-Ubiquitin (Ub), 플래그-태그된 pcDNA3- β -카테닌, 항상 활성이 있는 변이된 pcDNA3- β -카테닌 (S33Y) 는 J. Ha로부터 얻었다. pGL3-OT (Topflash) 및 pGL3-OF (Fopflash) 리포터(reporter)는 S. K. Lee로부터 얻었다. N-말단 및 C-말단이 결실된 변이 pDEST27-GSK-3 β (1-37, 344-420) 는 C. Phile로부터 얻었다. N-말단이 결실된 pcDNA3-HA-GSK-3 β 이형 (1-56, 1-85, 1-123, 1-353) 은 T. Ochiya로부터 얻었다. pGEX-KG-GSK-3 β (Plasmid no.15898), pGEX-4T1-Smurf2 (Plasmid no.13504), 및 pRK5-Myc-Smurf2 (Plasmid no.13678) 는 Addgene에서 구입하였다.
- [0127] 프로테아좀 저해제인 MG132는 Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA) 에서 구입하였다. 단백질 합성 저해제인 CHX와 플래그-태그(Flag-tag)는 Sigma (St. Louis, MO) 에서 구입하였다. 지방세포 배양액(adipocyte-conditioned media)으로 사용한 IBMX (isobutylmethylxanthine)와 덱사메타손(dexamethasone)은 Sigma 에서 구입하였다. 인슐린과 말 혈청(horse serum; HS)은 Gibco (Karlsruhe, Germany) 에서 구입하였다. Calnexin 또는 CypB 에 대한 항체, 그리고 마우스 또는 래빗 IgG, 및 VeriBlot HRP(horseradish peroxidase)-결합된 단일클론 또는 다클론 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. 항-actin, 항- α -actinin, 항-Bax, 항-Bcl-2, 항-C/EBP α , GFP-tag, 항-GSK-3 β , 항-GST, HA-tag, 항-Lamin B, OctA-Probe, 항-PPAR γ , 항-PARP, 및 항- β -tubulin 은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Akt, phospho-Akt (Ser473), β -카테닌, phospho- β -카테닌 (Ser33/37/Thr-41), Caspase, phospho-GSK-3 β (Ser9), phospho-GSK-3 β (Y216), PHF-1, Smurf2, 또는 Ubiquitin (Ub) 각각에 대한 항체를 세포 Signaling Technology (Danvers, MA) 에서 구입하였다. 항-Myc 단일클론항체 (9E10) 를 Roche Applied Science (Mannheim, Germany) 에서 구입하였다. 아디포넥틴 (Adiponectin)을 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입하였다.
- [0129] **실시예 2. 세포 배양, 일시적 형질전환(Transient Transfection), TCF/lef 리포터 유전자 에세이**
- [0131] Qbiogene (QBI)-HEK 293 (배아의 신장) 및 SH-SY5Y (신경아세포종; neuroblastoma) 을 10% fetal bovine serum (FBS) 및 100 units/ml penicillin G sodium (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 에서 배양하였다. 배양조건으로 37°C, 5% CO₂ 를 포함하는 습한 환경을 유지하였다. 2달마다 냉동 세포의 새로운 분액으로 교체하였다.
- [0132] 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocyte)를 10% 말 혈청 (HS) 및 100 units/ml 페니실린 G 나트륨을 포함하는 DMEM 증식배지에서 배양하였다. 밀집 2일 후 10% FBS, 500 μ M IBMX, 1 μ M 덱사메타손, 1 μ g/ml 인슐린을 포함하는 배지를 2일 동안 첨가하여 분화가 시작되었다. 다음 8일 후, 이틀에 한번씩 증식배지를 100 nM 인슐린을 포함하는 지방세포화 유도 배지로 교체하였다. 일부 실험에서, 재조합 CypB (0.4 내지 1.2 nM)를 지방세포와 유도 및 분화 배지에 첨가하였다. 섬유아세포의 성숙한 지방세포로의 분화는 Oil Red O 염색(Green 및 Kehinde, 1975)으로 관찰하였다.
- [0133] 서로 다른 DNA 컨스트럭트를 X-tremeGENE HP DNA (Roche Applied Science)를 이용하여 일시적으로 HEK 293QBI 세포에 트랜스펙션하였다. SH-SY5Y 세포의 경우, 제조업자의 프로토콜에 따라 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) 를 이용하여 트랜스펙션하였다. 상기 트랜스펙션은 세포를 플레이팅한 후 24시간 동안 일어났다. 공 벡터인 pcDNA 3.0을 이용하여 모든 트랜스펙션을 정규화하였다. 인간 CypB (5'-CAAAACAGUGGAUAAUUU-3', 서열번호 5) 와 스크램블 서열 (5'-GCGCGCUUUGUAGGAUUCG-3', 서열번호 6) 에 모두 특이적인 siRNA를 Dharmacon (Chicago, IL)에서 제공받았다. 스크램블 siRNA 및 CypB-siRNA 트랜스펙션은 제조업자의 프로토콜에 따라 Lipofectamine™ 2000으로 수행하였다. RNAi 억다운은 트랜스펙션 24시간 후 웨스턴블롯 분석으로 가시화하였다.
- [0134] TCF/lef 리포터 유전자 에세이의 경우, HEK 293QBI 세포를 12-well 플레이트에 도말하고, TCF 리포터 플라스미드 (Topflash)를 포함하는 플라스미드 1 μ g으로 공동트랜스펙션하였다. 이때 변이된 TCF 결합위치를 갖는 리포

터 (Fopflash)를 대조군으로 사용하였다. 루시페라아제(luciferase) 활성 및 단백질 농도를 조절하기 위하여 리포터 활성을 정규화하였다. 루시페라아제 활성은 를 이용하여 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균 증가 배수로 표시하였다.

[0136] 실시예 3. RT-PCR

[0138] 제조업자의 프로토콜에 따라 Trizol (Invitrogen)를 이용하여 배양한 QBI HEK293, SH-SY5Y, 3T3-L1 세포로부터 총 RNA 를 분리하였다. M-MLV 역전사효소(reverse transcriptase) (Fermentas, Hanover, MD)를 이용하여 총 RNA 2 µg 로부터 cDNA 를 제조하였다. 이 때 사용한 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

CypB	전방향	5'-AATTCATCGTGAATCAAGGACTT-3'	서열번호 7
	역방향	5'-CCGCTCGAGCTATTGTAATGACTCAGGG-3'	서열번호 8
GSK-3β	전방향	5'-TCCCTCAAATTAAGGCACATC-3'	서열번호 9
	역방향	3'-CACGGTCTCCAGTATTAGCATCT-5'	서열번호 10
β-카테닌	전방향	5'-GATGCCCTTCTCGTTCCTGAC-3'	서열번호 11
	역방향	5'-TCACCATCCTCATCGTCCTCG-3'	서열번호 12
aP2	전방향	5'-GCCAGATGTTTGGTCGTTTT-3'	서열번호 13
	역방향	5'-AGGCTGGGGAGGTGTAACCT-3'	서열번호 14
C/EBPβ	전방향	5'-ATGTTCTCTACGGGCTTGTTG-3'	서열번호 15
	역방향	5'-CCCAAAAGGCTTTGTAACCA-3'	서열번호 16
PPARγ	전방향	5'-ACCATGGTGGGTTCTCTCTG-3'	서열번호 17
	역방향	5'-TCAAAGGAGTGGGAGTGGTC-3'	서열번호 18
β-actin	전방향	5'-CTCGTCATACTCCTGCTTGCTG-3'	서열번호 19
	역방향	5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3'	서열번호 20

[0142] 조건 (94° C for 45 s; 60° C for 45 s; 72° C for 2 min; 25 cycles; 7 min final extension at 72° C; limited to 25 cycles) 하에 PCR 반응을 2번 수행하였다. 그 후 PCR 산물을 1.5% 아가로스 젤 전기영동으로 가시화하고, β-actin 수치값을 기준으로 Image J 소프트웨어 (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD)를 이용하여 상기 신호를 정량 및 정규화하였다.

[0144] 실시예 4. 단백질 분별(Fractionation), 면역블로팅, 공동면역침강

[0146] 4-1. 단백질 분별 및 면역블로팅

[0148] 제조업자의 프로토콜에 따라 NE-PER 시약(Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 세포로부터 핵과 세포질 분획을 얻은 후, -80° C에서 보관하였다.

[0149] 세포를 차가운 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 세척하여 총 세포내 단백질 추출액을 얻고, 러버 폴리스 맨(rubber policeman)으로 긁거나 트립신처리하여 세포를 수확하였다. 그 후 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1% Nonidet P-40, 1% 글리세롤, 2 mM NaVO₃, 50 mM NaF, 및 프로테아제 저해제 각테일 제제(protease inhibitor cocktail tablet; Roche Applied Science)를 포함하는 완충용액 RIPA (radio-immunoprecipitation assay buffer)으로 세포를 용해하였다. 그 후 단백질 함량을 Bradford (Bio-Rad) 방법을 이용하여 측정하였다. 6-12% 폴리아크릴아미드 젤(polyacrylamide gel) 상에서 SDS-PAGE를 수행하여 총 단백질 동량(30 µg)을 분리하였다. 상기 젤은 쿠마시 블루(coomassie brilliant blue; Sigma) 로 염색하고 니

트로셀룰로오스 막으로 전이시켰다. 상기 막을 5% 탈지유(skim milk)로 1시간 동안 블로킹하고, 1차 항체와 함께 4°C 에서 밤새 배양한 후, 다시 상온에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 배양하였다. 그 후 개량된 화학발광 시약(Santa Cruz)을 이용하여 신호를 감지하였다. 면역블로팅에서 액틴 단백질을 대조군으로 사용하였다.

[0151] 4-2. 공동면역침강 및 면역블로팅

[0153] 공동면역침강을 위하여, 수집한 세포를, 용해 완충용액(lysis buffer; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 및 프로테아제 억제제 카테일 타블렛)을 이용하여 얼음에서 용해시켰다. 세포 용해물을 프로테인 A/G PLUS-아가로오스 비즈(Santa Cruz)로 1시간 동안 전세척하고, 정해진 항체로 4시간 동안 4°C 에서 공동면역침강하였다. 용해 완충용액으로 4회 세척한 후, 침강물을 Lin et al.(1997)의 방법에 따라 용출시켰다. 그리고 HRP-결합된 항-HA, 항-flag, 또는 항-Myc 항체로 면역블로팅하였다. 내재된 CypB와 GSK-3β의 연관관계를 단일클론 IgG, 항-CypB, 항-GSK-3β 항체를 이용하여 가시화하였다.

[0155] 실시예 5. 인비보 유비퀴틴화(*In Vivo* 유비퀴틴화)

[0157] HA-Ub를 포함하는 벡터를 포함 또는 포함하지 않는 플라스미드를, HEK 293QBI 세포에 일시적으로 공동트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 24시간 후, 25 μM MG132 의 유무를 달리하여 세포를 4시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 세포 용해 완충용액으로 용해시킨 후, 유비퀴틴화된 GSK-3β를 감지하기 위하여 항-HA, 항-GFP, 항-GSK-3β 항체로 면역침강시키고, CypB를 감지하기 위하여 항-flag 항체로 면역침강시켰다. 상기 면역침강물에 대하여 SDS-page와 면역블로팅을 수행하였다.

[0159] 실시예 6. GST 단백질 정제 및 GST 풀다운 어세이(Pull-Down Assay)

[0161] 6-1. GST 단백질 정제

[0163] GST 융합 단백질(GST 및 GST-CypB), GST-CypB (R95A), GST-GSK-3β, GST-Smurf2을 대장균(*Escherichia coli* BL21) 균주로부터 정제하여 얻었다. 밤새 35 °C 에서 세균배양한 후, 최종 농도가 1 mM가 될 때 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 첨가하고 4시간 동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 그 후 4°C 에서 4,000 rpm 으로 20분간 원심분리하여 세포를 수집하였다. 세포 펠렛을 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, 10% 글리세롤, 1 mg/ml 리소자임(lysozyme), 및 프로테아제 억제제 카테일(protease inhibitor cocktail)을 포함하는 아이스-콜드 1X PBST 에 현탁하고, 15분 동안 4,000 rpm 에서 원심분리하였다. 그 후 상등액을 분리, 글루타치온-아가로오스 비즈(glutathione-agarose beads, Sigma) 와 함께 밤새 배양하였다. 상기 비즈를 1X PBST 로 3회 세척하였다. 단백질의 순도를 전기영동 및 쿠마시블루 염색에 의하여 평가하였다.

[0165] 6-2. GST 풀다운 어세이

[0167] GST 풀다운 어세이를 위하여, 50 μl의 글루타치온-아가로스 비즈를 GST, GST-CypB, GST-CypB (R95A), GST-GSK-3β, 또는 GST-Smurf2와 커플링하였다. 그 후 이를 4 °C에서 밤새도록 1 mg의 QBI HEK293 또는 SH-SY5Y 추출액과 혼합하였다. 배양된 비즈를 원심분리하고 1ml 완충용액(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 125 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40, 1 M DTT, 및 10% glycerol)으로 3회 세척하였다. 그 후 웨스턴블롯 분석을 위하여 비즈를 2X 샘플 버퍼에 용해하였다.

[0169] **실시예 7. 면역형광 현미경 관찰(Immunofluorescence Microscopy)**

[0171] 공초점 레이저 주사현미경 (LSM. 510, Carl Zeiss, Thornwood, NY)으로 패턴(Differential sublocalization patterns)을 관찰하였다. 분석결과와 정량은 3세트 이상으로 행하였다.

[0173] **실시예 8. 동물 및 뇌 실험**

[0175] 동종번식 수컷 야생형 B6C3 마우스와 APP/PS1 이중 유전자 이식 마우스 250g (strain name B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1dE9) 85Dbo/J; (Stock no. 004462) developed by Jackson Laboratory) 을 일본 SLC, Inc., (Shizuoka, Japan) 에서 얻고 국립암센터(고양, 한국)에서 보관하였다. 상기 마우스를 6개월령부터 실험에 사용하였고, 온도와 명암주기(12y12)를 일정하게 유지하고, 식이와 물에 대한 접근은 자유롭게 하여 키웠다. 상기 마우스를 2개 그룹(n=6)으로 분류하고, 1개 그룹은 대조군으로, 1개 그룹에는 CsA 10 mg/kg 를 이틀에 한번씩 1달 동안 복강내 주사(IP)하였다. 그 후 마우스를 희생시키고, 뇌 조직 절편으로 면역조직화학(IHC) 및 웨스턴블롯 분석을 수행하였다. 모든 실험은 국립암센터 시설 내 연구 심사위원회에 의해 승인받은 방법에 의하여 진행하였다. 마우스에 행하는 주사 및 처리는 고통을 최소화하는 방법으로 수행하였다.

[0177] 웨스턴블롯 분석을 위하여, 뇌를 재빠르게 해부하고, 드라이아이스에서 냉동하고, 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 해마 일부 영역 (CA1 및 dentate gyrus)을 재빨리 분리하고, 용해 완충용액(100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM Tris at pH 7.5, protease inhibitor tablet)으로 4℃에서 균질화하였다.

[0178] 상기 균질물을 25분 동안 12,000 x g 으로 원심분리한 후, 단백질 농도를 측정하기 위하여 12% SDS-PAGE 으로 뇌 상등액 부분 표본을 분리하였다.

[0180] 면역조직화학 연구를 위하여, Oh et al.(Free Radic Biol Med 51, 905-920; 2011)에 기재된 방법으로, 파라핀에 침지된 뇌 조직을 글래스 커버슬립에 도말하였다. 구체적으로, 5-μm 두께의 조직 절편에서 자일렌으로 파라핀을 제거하고, 에탄올 및 증류수로 다시 수화하였다. 모든 슬라이드를 3% (v/v) 과산화수소수 (H₂O₂ in H₂O)로 10분 동안 처리하여 내재된 퍼옥시다제 활성을 차단하였다.

[0181] 이를 마이크로웨이브(20분, 200W) 처리한 시트레이트 버퍼(pH.7.0) (Scy Tek Laboratories, Logan, UT)로 전처리하여 항원을 회수하였다. 그 후 이를 1차 GSK-3β (1:500) 또는 2차 항체 (biotinylated polylink; DAKO, Hamburg, Germany) 과 함께 2시간 동안 각각 배양하였다. Dako REAL Envision™ Detection System 을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 면역반응성(immunoreactivity)을 측정하였다. 상기 조직 절편을 헤마톡실린(haematoxylin)으로 대조염색하고, 탈수, 세척하여 조직 봉입제(National Diagnostics, Atlanta, Ga)로 고정하였다.

[0183] **실시예 9. 통계분석**

[0185] 모든 결과값은 3회 이상의 독립적인 실험을 거쳐 평균±표준편차(SD)로 나타내었다. 복수 비교를 위한 Scheffe post hoc 테스트를 하고, 단일 비교를 위해서는 Student's t 테스트를 한 후(SPSS; Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0, IBM Software, Somers, NY, USA), ANOVA (one-way analysis of variance)를 통해 통계 분석을 수행하였다.

[0186] 밴드 강도의 정량 및 조직 염색은 Image J 소프트웨어로 분석하였다. 별다른 언급이 없다면, p<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 고려한 것이다.

[0188] 실험예 1-5. CypB의 역할 확인실험

[0190] 실험예 1. CypB는 프로테아좀 분해를 통하여 GSK-3 β 의 발현을 저해한다

[0192] CypB가 Akt 신호전달에 의하여 GSK-3 β 의 발현 및 활성을 저해하는지를 확인하기 위하여 하기의 실험을 진행하였다.

[0193] 먼저 인간 야생 CypB (WT) 및 PPIase 결손된 CypB 변이체 (R95A)를 포함하는 발현 벡터를 QBI-HEK293 또는 SH-SY5Y 세포 각각에 도입하여 형질전환시킨 후, GSK-3 β 및 Akt의 발현양 변화를 면역블로팅을 이용하여 관찰하였다. pcDNA 3.0 벡터를 대조군으로 사용하였다.

[0194] 그 결과, 도 1a와 같이 CypB (WT)의 과발현으로 인하여 QBI-HEK293 및 SH-SY5Y 세포 모두에서 GSK-3 β 의 발현양이 감소하였다. 또한 Ser473-Akt 과 Ser9-GSK-3 β 에서의 인산화(p-GSK-3 β (S9)로 표시)는 증가한 반면, Tyr216-GSK-3 β 에서의 인산화(p-GSK-3 β (Y216)로 표시)는 감소하는 것으로 나타났다. 반면 CypB 변이체 (R95A)의 경우 과발현되더라도 GSK-3 β 의 활성화에 영향을 거의 미치지 않았다.

[0196] 한편, CypB가 Akt/GSK-3 β 신호전달경로를 타겟팅하는지 확인하기 위하여, QBI-HEK293 세포와 SH-SY5Y 세포를 CypB siRNA (siCypB)으로 트랜스펙션 시켰다(대조군 siRNA: siCon).

[0197] 그 결과, CypB의 억제로 인하여 Tyr216-GSK-3 β 의 인산화는 증가한 반면 Ser473-Akt 및 Ser9-GSK-3 β 의 인산화는 현저히 감소하였다(도 1b).

[0198] 이러한 결과는 CypB가 GSK-3 β 의 효소활성을 감소시키고, Akt 인산화를 통하여 GSK-3 β 의 기능을 하향 조절함을 시사하는 것이다. 또한, CypB의 PPIase 활성이 Akt 및 GSK-3 β 조절에 중요함을 보여준다.

[0200] 야생형 CypB의 유무에 따라 세포 내 내재된 GSK-3 β 단백질의 분배를 관찰하기 위하여, QBI-HEK293 세포를 Flag-CypB 또는 CypB-siRNA (siCypB)으로 트랜스펙션 시켰다. 24시간 후, 세포를 4시간 동안 프로테아좀 저해제인 MG132 (25 μ M)으로 처리하였다. 그 후 세포를 항-GSK-3 β (green) 및 항-Flag (red)으로 이중염색하고, 핵은 DAPI (blue)로 염색하고 공초점 현미경으로 관찰하였다. scale bar는 100 μ m이다.

[0201] 그 결과, 도 1c에 나타난 것과 같이, CypB-양성 세포에서는 내재된 GSK-3 β 의 발현이 감소한 반면, siCypB는 GSK-3 β 의 발현을 다소 증가시켰다(녹색 표시).

[0203] 한편 상기 결과를 통하여 CypB의 도입으로 인하여 GSK-3 β 의 전사 또는 번역이 억제된 것으로 예측하고 GSK-3 β mRNA의 수치 변화를 관찰하였다. 그러나 도 1d와 같이 GSK-3 β mRNA의 양의 변화는 QBI-HEK293 또는 SH-SY5Y 세포 모두에서 실제 거의 나타나지 않았다.

[0205] 한편, GSK-3 β 의 발현 감소가 단백질의 안정성 때문인지 여부를 확인하기 위하여, MG132 (25 μ M)와 CHX(cycloheximide) 20 μ M을 상기 CypB-양성 세포에 첨가하였다.

[0206] 그 결과, 도 1e와 같이 프로테아좀 저해제인 MG132의 처리로 인하여, CypB 과발현 결과(Ser473-Akt 및 Ser9-GSK-3 β 의 인산화 증가)가 반대로 바뀌는 것을 확인하였다. 반면 도 1f에 도시된 것과 같이 단백질 합성 저해제인 CHX의 처리에 따라 Ser473-Akt 및 Ser9-GSK-3 β 의 인산화가 증가하였다. MG132와 CHX를 동시에 처리할 경우, CHX에 의한 영향은 크게 억제되는 것으로 나타났다.

[0208] 한편, CHX 처리 후 초기 시점부터 GSK-3 β 의 반감기를 관찰하였다. 그 결과, 도 1g와 같이, CypB 과발현은 GSK-3 β 의 반감기를 약 45분까지 감소시킨 반면, 음성대조군의 경우 90분의 반감기를 나타내었다.

- [0210] 이러한 결과는 모두 CypB 가 GSK-3 β 의 프로테아좀 분해를 촉진함을 시사하는 것이다.
- [0212] **실험예 2. GSK-3 β 의 N-말단 부위와 CypB 의 상호작용 (인산-의존적 방식)**
- [0214] 본 발명자들은 GSK-3 β 가 CypB와 직접 또는 간접적으로 상호작용 할 것이라고 가정하고, QBI-HEK293 (도 2a에 HEK293로 표시) 및 SH-SY5Y 세포 추출액을 이용하여 공동 면역침강실험(co-IP)을 진행하였다. 먼저, 야생형 인간 플래그(flag)-CypB 및 HA-GSK-3 β 를 QBI-HEK293 세포로 일시적 공동 트랜스펙션 시켰다. 그 후 용해물(lysate)을 HA 또는 Flag 항체로 각각 공동 면역침강시켰다.
- [0215] 그 결과, 흥미롭게도 GSK-3 β 는 CypB와 공동 면역침강됨을 확인하였다(도 2a). 한편 IgG 경쇄는 (*)으로 표시하였다.
- [0217] 또한, 이러한 CypB와 GSK-3 β 의 상호작용이 내인성 수치에서 감지되는지를 확인하기 위하여, 내인성(내재된) CypB 또는 GSK-3 β 를 CypB 또는 GSK-3 β 항체와 함께 QBI-HEK293 세포 추출액으로부터 면역침강시켰다. 그 결과, 도 2b와 같이 CypB와 GSK-3 β 의 상호작용이 감지되었다. 한편 IgG 경쇄는 (*)으로, 비특이적 결합은 (#)로 표시하였다.
- [0219] 이러한 결과가 CypB와 GSK-3 β 의 직접적인 결합을 보여주는 것인지를 확인하기 위하여, 먼저 CypB, CypB (R95A), 또는 GSK-3 β 과 GST 융합 컨스트럭트를 제조하여 대장균에서 발현된 융합 단백질을 정제하였다. 그 후, 상기 융합 단백질, HA-표지된 CypB 또는 GSK-3 β 가 과발현된 QBI-HEK293 또는 SH-SY5Y 세포의 추출액을 이용하여 CypB 또는 GSK-3 β 에 대한 GST 풀다운 어세이를 진행하였다. 그 후, CypB 또는 GSK-3 β 항체로 각각 웨스턴 블롯을 진행하였다.
- [0220] 그 결과, 도 2c와 같이, 야생형 CypB 또는 GSK-3 β 융합 단백질은 CypB 또는 GSK-3 β 에 특이적으로 결합한 반면, 음성 대조군(GST 단독)에는 특이적으로 결합하지 않았다.
- [0221] 또한 PPIase 결손 CypB (R95A) 변이체와 GSK-3 β 의 상호작용은 동일하게 강하게 나타났는데, 이는 CypB의 PPIase 활성이 GSK-3 β 와의 물리적 결합에 필수적이지는 않음을 보여주는 것이다(도 2c, lane 3, 6, 9).
- [0223] 한편, CypB와 GSK-3 β 간의 상호작용의 추가적인 증거로서 CypB와 GSK-3 β 의 공존(colocalization)을 관찰하기 위하여 공초점 현미경을 이용하였다.
- [0224] 먼저, QBI-HEK293 세포를 Flag-CypB 또는 HA-GSK-3 β 으로 트랜스펙션 시킨 후, 항-Flag 및 항-HA 항체로 면역 염색하였다. 도 2d와 같이, 합쳐진 이미지는 MG132가 처리된 세포 내에서 CypB (red)가 GSK-3 β (green)와 같은 위치에 존재함을 보여주고 있다. 또한, 공초점 현미경 분석결과, CypB와 GSK-3 β 의 공존은 QBI-HEK293 세포 중 주로 ER막에서 이루어짐을 확인하였다(미도시).
- [0226] 키나아제가 주로 (Ser/Thr)-Pro 모티프를 인산화시키고, GSK-3 β 의 Ser/Thr 인산화는 그 입체구조를 변경함으로써 단백질의 기능을 조절하는 것으로 보인다(Doble and Woodgett, 2003). 따라서 GSK-3 β 인산화에 문제가 있을 경우 CypB와 GSK-3 β 의 결합에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)로 GSK-3 β 의 탈인산화할 경우, Ser9 및 Y216 인산화가 모두 약 80% 감소하였다(도 2e).
- [0228] 또한 QBI-HEK293 세포를 CypB와 GSK-3 β 로 각각 트랜스펙션 시킨 후, GSK-3 β 로 트랜스펙션된 세포의 추출액을 CIAP와 함께 인큐베이션하였다. 이를 용해시키고 공동 면역침강한 후 CIAP를 처리한 결과, GSK-3 β 밴드가 감지되지 않았다(도 2f, lane 4).

- [0230] 한편, GSK-3 β 로 트랜스펙션 시킨 QBI-HEK293 세포의 전체 세포 용해물을 준비하였다. 각 용해물은 포스파타아제의 양을 증가시키며 처리하였다. 그 후 GST 폴다운 어세이를 통하여 상기 용해물이 GST-CypB에 결합하는 능력을 알아보았다. 그 결과, CIAP의 처리로 인하여 CypB와 GSK-3 β 간의 상호작용이 감소한 것을 확인하였다(도 2g). 이는 GSK-3 β 인산화가 CypB와 GSK-3 β 의 상호작용에 필요함을 시사하는 것이다.
- [0232] GSK-3 β 의 N말단에는 결합 도메인(BD)이 위치하며, 이는 기질 및 단백질들에 대한 GSK-3 β 특이적 결합 위치를 포함하고 있다. CypB와 GSK-3 β 의 결합시의 BD의 역할을 확인하기 위하여, GSK-3 β 의 N말단이 결손된 변이체와 C말단 결손 변이체를 제작하였다(도 2h). 공동 면역침강 실험 결과, 도 2i에 나타난 것과 같이 N말단 1-56 잔기의 결손에도 불구하고 CypB와의 상호작용이 유지된 반면, N말단 1-85 잔기의 결손(1-85) 시에는 이러한 상호작용이 사라졌다. 즉, GSK-3 β 의 N말단의 K85를 포함하는 아미노산 부분이 CypB와의 결합을 유지하는데 중요한 것으로 나타났다.
- [0234] 한편, GSK-3 β 의 N-말단 및 C-말단 도메인에 위치한 결합 부위의 위치를 확인하기 위하여, GST 폴다운 어세이를 진행하였다.
- [0235] 그 결과, 상기 부위 중 어느 것을 결손 시키더라도 CypB와 GSK-3 β 의 결합에는 영향이 없음을 확인하였다(도 2j).
- [0237] 이러한 결과들은 GSK-3 β 의 인산화, 및 GSK-3 β 의 N-말단에 위치한 K85 잔기를 포함하는 결합 도메인(BD)이 CypB와 GSK-3 β 의 결합에 필수적임을 시사하는 것이다.
- [0239] **실험예 3. CypB는 세포질 내 β -카테닌을 안정화하여 Wnt 경로를 표적화한다**
- [0241] GSK-3 β 매개 β -카테닌 인산화는 Wnt- β -카테닌 신호전달에서 중요한 작용으로 알려져있다(Liu et al., 2002). CypB 유도는 GSK-3 β 과의 물리적 상호작용 및 그의 유비퀴틴화에 관여하며, GSK-3 β 로 구성되는 복합체의 파괴에 의한 β -카테닌 분해 조절 매커니즘에 중요한 역할을 한다. 예를 들어, CypB-Smurf2 복합체는 β -카테닌의 안정성을 조절하는데 중추 역할을 한다. 이를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 CypB의 β -카테닌에 대한 영향을 하기와 같이 실험하였다.
- [0242] 먼저, 벡터, CypB(WT) 또는 변이체 CypB(R95A)를 일시적으로 QBI-HEK293 세포에 발현 시켰다. 그 결과, 도 3a에 도시된 것과 같이, CypB(WT)는 인산화된 β -카테닌(p- β -cat.)을 감소시켰으나, 전체 β -카테닌(β -cat.) 수치는 증가시켰다. 이는 CypB가 β -카테닌 분해와 핵 내의 β -카테닌 축적을 저해하는 것과 관련이 있음을 시사하는 것이다. 그러나 변이체 CypB(R95A)는 인산화된 β -카테닌을 증가시키고, 총 β -카테닌을 축적시키는 것으로 관찰되었다.
- [0244] 다음으로, CypB가 총 β -카테닌 수치 및 활성화된 β -카테닌의 수치를 양성적으로 조절함을 확인하기 위하여, siCypB를 이용하여 QBI-HEK293 세포에서 CypB를 녹다운시켰다. 그 결과, 총 β -카테닌은 유의하게 감소하였으나, β -카테닌 단백질 수치는 증가하였다(도 3b).
- [0246] 다음으로, HEK293QBI 세포에서 CypB를 유도하면 GSK-3 β -매개된 β -카테닌 유비퀴틴화를 저해하는지 확인하기 위하여, β -카테닌의 유비퀴틴화 수치를 측정하였다.
- [0247] 그 결과, 도 3c에 도시된 것과 같이 야생형 GSK-3 β 의 과발현은 β -카테닌의 유비퀴틴화를 매개하였다(도 3c, lane 1). 상기 유비퀴틴화는 야생의 CypB 발현에 따라 약해졌다(도 3c, lane 2). 흥미롭게도, GSK-3 β 를 변이체 CypB(R95A)와 공동-발현시킬 경우 β -카테닌의 유비퀴틴화를 촉진하는 효과가 있었다(도 3c, lane 3). 그

러나, HEK293QBI 세포에 LiCl 20 mM를 처리할 경우, 야생형 GSK-3 β , 야생형, CypB 또는 변이체 CypB가 동시에 유도될 때 β -카테닌의 유비퀴틴화가 약해지거나 나타나지 않았다 (도 3c, lane 4, 5, 6). 이는 GSK-3 β 의 불활성화에 LiCl이 역할을 함을 확인해주는 것이다.

[0249] 상기 결과들은 β -카테닌의 조절에 있어서 CypB의 특별한 역할을 뒷받침해주었기 때문에, 이번에는 CypB와 β -카테닌 간의 일어날 수 있는 상호작용을 확인하기 위하여, 항 Flag 또는 항 HA 항체를 이용한 공동-면역침강 분석법을 이용하였다.

[0250] 그 결과, 도 3d에 도시된 것과 같이 CypB는 β -카테닌과 상호작용하며 (lane 4), CypB와 안정한 β -카테닌 (S33Y)의 상호작용을 향상되도록 촉진하는 것으로 나타났다 (도 3e, lane 3). 이에 따라 본 발명자들은 GSK-3 β 인산화 위치인 Ser-33가 결핍되어 항상 활성화된 β -catenin인, 변이된 β -catenin (S33Y)이 보다 안정하기 때문에, CypB- β -catenin (S33Y) 상호작용이 증가되었다고 결론내렸다.

[0252] 다음으로, CypB가 β -카테닌의 안정화에 실제로 참여하는지, 및 핵 내 β -카테닌의 축적을 유도하는지를 확인하기 위하여, 핵 내, 및 세포질 내 세포분획에 대하여 웨스턴 블롯을 진행하였다. GSK-3 β 는 β -카테닌을 인산화하며, β -카테닌이 세포질에 축적되도록 하는 것으로 알려져 있다. 안정화된 β -카테닌은 세포질에서 핵으로 이동할 수 있다. 따라서 특히 CypB 과발현에 따라 β -카테닌이 안정화되는지, 핵에서 감지될 수 있는지 확인하기 위하여, CypB와 GSK-3 β 를 공발현시키고, 핵 내의 β -카테닌의 축적을 측정하였다.

[0253] 그 결과, CypB의 과발현은 핵 내 β -카테닌의 수치를 증가시켰다 (도 3f, 왼쪽 첫번째 패널의 lane 2). 그러나 QBI-HEK293 세포에서 변이체 CypB (R95A)를 발현시킬 경우 세포질 내 β -카테닌의 축적이 관찰되었다 (도 3f, 오른쪽 두번째 패널의 lane 3).

[0255] 한편 공초점 분석을 통하여, CypB가 β -카테닌과 물리적으로 관계되어 있으며, β -카테닌의 안정성을 증가시키는 것을 확인하였다. 내재의 β -카테닌 (green)은 일반적으로 세포질 내에 위치하나, QBI-HEK293 세포에서는 HA-태그된 GSK-3 β 의 과발현(red)에 따라 GSK-3 β 가 β -카테닌과 함께 위치하고, β -카테닌을 인산화 및 분해하였다(도 3g).

[0256] 그 후, CypB 과발현(red)에 따라 내재의 β -카테닌 (green)의 핵으로의 이동이 집중되었다 (도 3g, 2번째 패널). 나아가, N-말단이 결손된 GSK-3 β 변이체 (85)는 β -카테닌의 핵으로의 이동을 더 많이 유도함을 확인하였다. 이는 GSK-3 β 의 키나아제 활성과 CypB에 대한 강력한 결합력이 손실되었기 때문인 것으로 보인다 (도 3g, 3번째 패널). 그러나 주요 유비퀴틴화 위치인 K297가 결손된 GSK-3 β 변이체는 β -카테닌의 핵으로의 이동을 유도하지 못하였다. 이는 K297A 변이로 인하여 GSK-3 β 가 CypB-Smurf2 복합체에 의하여 유비퀴틴화되지 않기 때문에, β -카테닌을 인산화하여 β -카테닌이 세포질 내 축적되도록 하기 때문이다 (도 3g, 마지막 패널).

[0258] 한편, 본 발명자들은 CypB가 Wnt/ β -카테닌 경로에서 어떻게 β -카테닌의 기능을 조절하는지 알아보기 위하여, TOP/FOP 루시퍼라제 리포터 어세이(luciferase reporter assay)를 진행하였다. TOP-FLASH는 TCF 리포터 플라스미드로, Wnt 신호의 활성을 측정한다. TOP-FLASH는 Tcf 결합 위치 및 루시퍼라제 리포터의 3개의 카피를 포함하며, 변이된 Tcf 결합 위치를 포함한다. HA 태그된 야생의 CypB or 변이체 CypB (CypB)의 양을 감소시키면서, 동량의 TOP-FLASH와 FOP-FLASH 리포터 플라스미드를 함께 QBI-HEK293T 세포에 혼합 트랜스펙션(co-transfection)시켰다.

[0259] 그 결과, 야생의 CypB 발현벡터는 Wnt 신호의 활성을 나타내는 TOP-FLASH 활성을 CypB의 농도 의존적으로 유하게 촉진하였다. 반면, 변이체 CypB (R95A)는 TOP-FLASH의 리포터의 활성을 높이지 못하였다 (도 3h).

[0261] 다음으로, CypB와 다양한 GSK-3 β 변이체 단백질이 각각 Wnt 경로를 조절하는 매커니즘을 알아보기 위하여, 야생의 CypB 및 각각 다른 변이체 GSK-3 β 컨스트럭트를 TOP 또는 FOP-FLASH와 함께 QBI-HEK293 세포에 혼합 트랜스펙션시켰다.

[0262] 그 결과, 일시적으로 GSK-3 β 단독으로 트랜스펙션시킨 세포는 Wnt3a에 의해 자극된 TOP-FLASH 활성이 전혀 변화하지 않은 반면, 트랜스펙션 한 경우에는 TOP-FLASH 리포터 활성이 10배 향상되었다 (도 3i, lane 2 와 lane 3 비교). 이러한 결과는, CypB가 GSK-3 β 를 분해함으로써, 결과적으로 표준이 되는 Wnt 신호를 자극함을 시사하는 것이다. 반면, GSK-3 β 결손 변이체 (85)를 CypB 발현 벡터로 트랜스펙션한 결과, 85가 이미 그의 활성을 잃었기 때문에 TOPFlash 활성이 18배 증가하였으며, 나아가 CypB가 TOPFlash 활성 자체를 향상시킨 것을 확인하였다(도 3i, lane 4). 또한, K297를 변이시킨 GSK-3 β 는 유비퀴틴화 위치의 부족과 안정화된 활성으로 인하여, TOPFlash를 활성화시키지 못하였다(도 3i, lane 5). 그러나, 항상 활성을 갖는 GSK-3 β 변이체 (S9A)를 발현시킨 결과, TOPFlash의 활성이 9배 증가하였으며, 이는 CypB-Smurf2-매개 유비퀴틴 결합 시스템이 여전히 GSK-3 β 의 분해를 유도할 수 있기 때문이다(도 3i, lane 6).

[0264] 즉, 상기와 같은 결과들은 CypB로 인한 GSK-3 β 의 저해가, β -카테닌의 안정성을 증가시킴과 동시에 Wnt/ β -카테닌 신호 경로의 활성을 높임을 보여주는 것으로서, CypB가 Tcf/Lef 전사인자를 통하여 기능적으로 Wnt 경로와 관계가 있음을 시사하는 것이다(도 4).

[0266] 실험예 4. CypB 발현은 지방세포 형성을 저해한다

[0268] CypB가 지방생성 조절에서 어떠한 역할을 하는지 확인하기 위하여, 먼저, Oil Red O 분석법으로 CypB의 존재 또는 부재하에서 분화된 3T3-L1 세포를 분석하였다. 총 10일 동안 3T3-L1 지방선구세포(pre-adipocyte)를 MDI 배지 단독에서 분화시키거나, 각각 다른 농도(0.4 내지 1.2 nM)의 재조합 CypB 처리 하에서 분화시킨 후(도 5a), 지방세포 분화 2일차, 5일차 그리고 10일차를 관찰하였다.

[0269] 그 결과, CypB 처리 하, 10일차에서 확연히 많은 지방세포가 분화되는 것을 확인하였다 (도 5b, 첫번째 열). 또한, 광학현미경 관찰 결과, 재조합 CypB를 처리한 군보다 처리하지 않은 군에서 더 많은 지방세포가 분화되는 것으로 보아 CypB가 지방세포 분화를 억제하는 것으로 확인되었다(도 5b, 두번째 열).

[0271] 나아가, 재조합 CypB가 처리된 지방세포는, 처리되지 않은 세포에 비하여 Oil Red O 염색이 유의하게 약하게 나타났다 (도 5c). 또한, OD510 에서 분광 광도계 측정결과, 지방세포에서의 CypB 발현에 따라, 지방세포 분화가 50% 감소된 것으로 나타났다 (도 5d).

[0272] 즉, 이러한 결과는 CypB가 지방생성을 감소시키는 능력을 가짐을 시사하는 것이다.

[0274] 다음으로, 본 발명자들은 CypB 발현이 지방세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2와 같은 공통적인 지방생성 관련 하위 유전자의 단백질 및 mRNA 발현을 측정하였다. CypB 존재 또는 부재 하에서, 상기 세포를 지방생성 유도 배지에서 10일 동안 배양하였다.

[0275] 그 결과, 도 5e (웨스턴블롯 결과, right panel) 및 도 5f (RT-PCR 결과)에 나타난 것과 같이, 재조합 CypB의 농도 증가에 따라 농도의존적으로 C/EBP α , PPAR γ , 및 aP2의 단백질 및 전사 수치가 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 CypB 발현으로 인한 지방세포 분화의 감소 때문이며, CypB가 지방생성의 하향 조절 및 3T3-L1 세포의 지방합성에 필수적임을 보여주는 것이다.

[0277] 실험예 5. 알츠하이머 질병 모델에서의 CypB 와 GSK-3 β 의 관계 확인

[0279] 과발현된 GSK-3 β 가 알츠하이머의 주요특징으로 알려져 있다. 이에, 알츠하이머 질병 모델에서 CypB 와 GSK-3 β 의 관계를 확인하기 위한 실험을 진행하였다(도 6a).

[0280] 구체적으로, 야생형 마우스, APP/PS1 이중-형질전환된 마우스(B6C3)의 생후 150일 차에, 식염수 또는 10mg/kg의 CsA를 복강투여하고, GSK-3 β 의 수치 변화를 관찰하였다. 상기 CsA는 CypB의 저해제, 즉, Cyp와 결합하여 세포

내 CypB의 PPIase 활성을 저해하기 위한 물질로 사용한 것이다. 그 후 30일 동안 5%(v/v) DMSO를 포함하는 식염수(담체) 또는 CsA를 포함하는 담체를 2일에 한번씩 주사한 후 희생시켰다.

[0282] 먼저, 음성대조군(sham)과 B6C3 마우스 간의 GSK-3 β 의 발현 수치변화를 비교하였다. 그 결과, 도 6b에 나타난 것과 같이 B6C3 마우스는 해마 CA1, DG 뉴런에서 GSK-3 β 의 발현이 증가하였으며, PHF(Paired Helical Filament-Tau, Hyperphosphorylated Tau)도 나타났다.

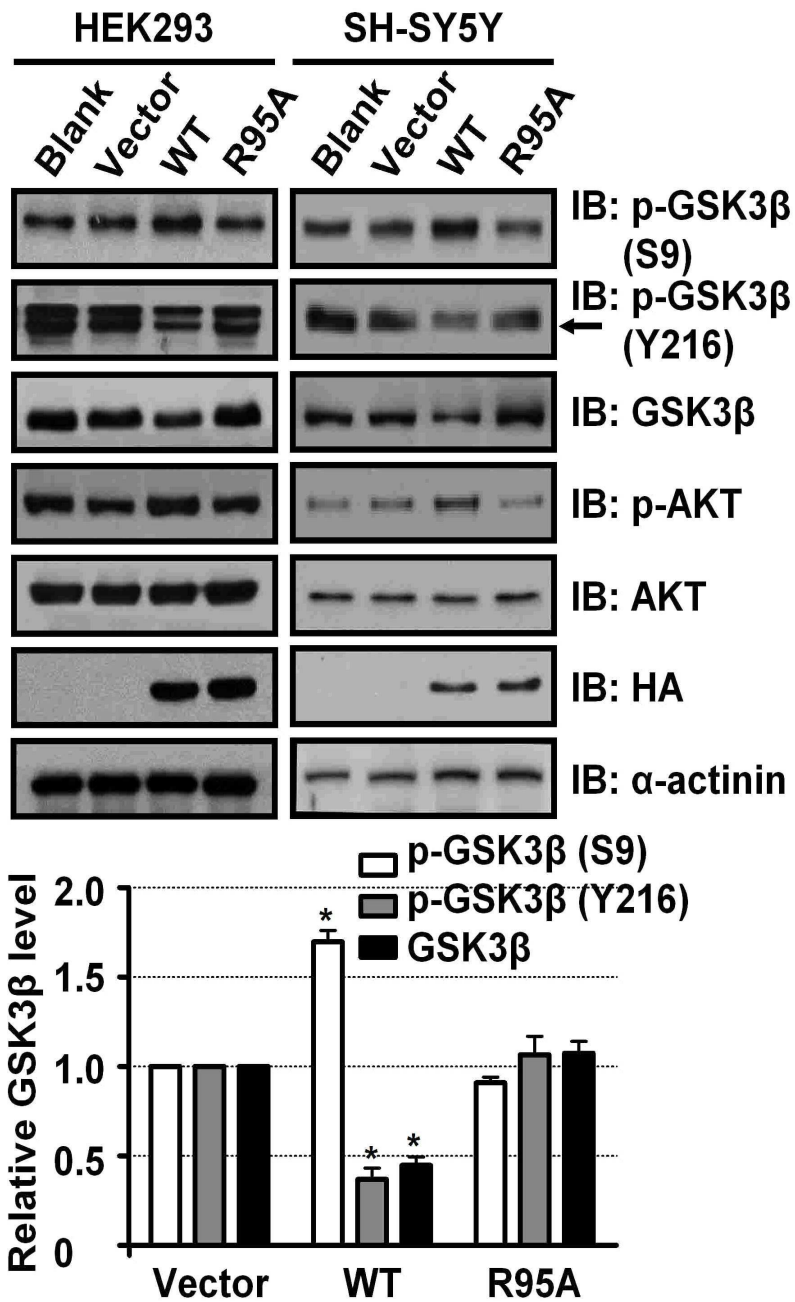
[0284] 다음으로, 상기 마우스의 뇌를 열린 샘플로부터 면역조직화적 방법을 이용하여 해마의 DG, CA1 구역의 GSK-3 β 의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 도 6c에 도시된 것과 같이 식염수를 처리한 그룹의 경우, B6C3 마우스는 음성대조군 대비, GSK-3 β 의 발현이 DG, CA1 구역 모두에서 높게 나타났다. 또한 CsA를 처리한 그룹의 경우에도, B6C3 마우스는 음성대조군 대비, GSK-3 β 의 발현이 DG, CA1 구역 모두에서 유의하게 상승하였다.

[0285] 이러한 결과는 CypB가 GSK-3 β 의 발현을 저해하는 효과가 있음을 나타내는 것이다.

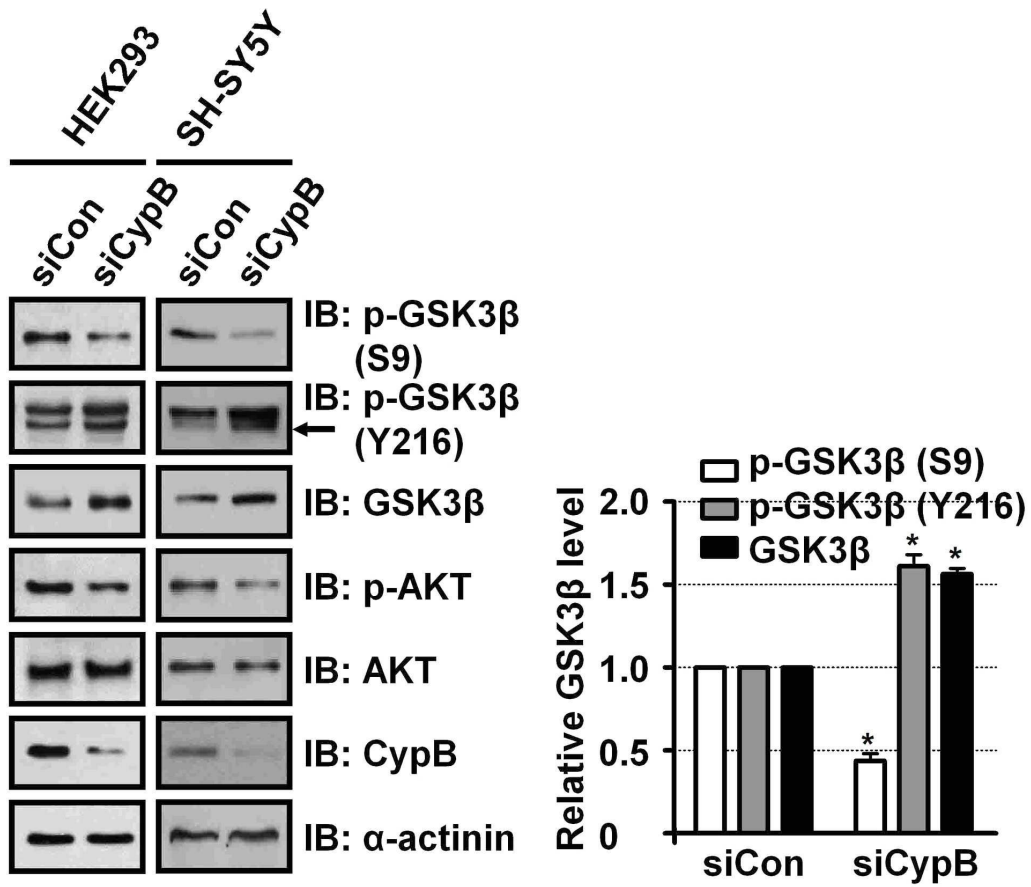
[0287] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

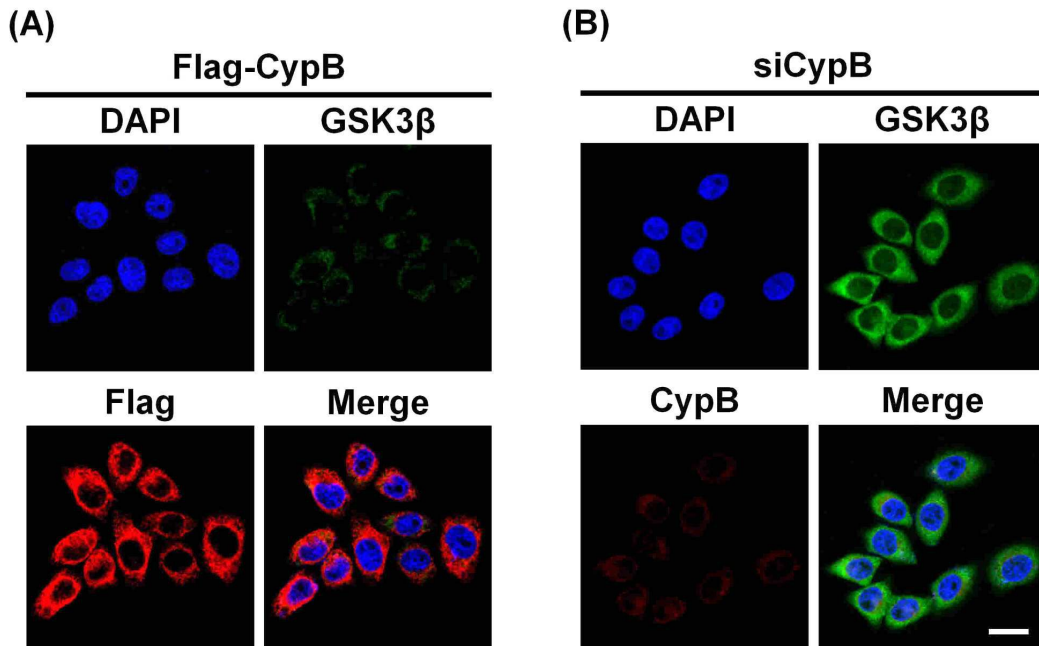
도면1a



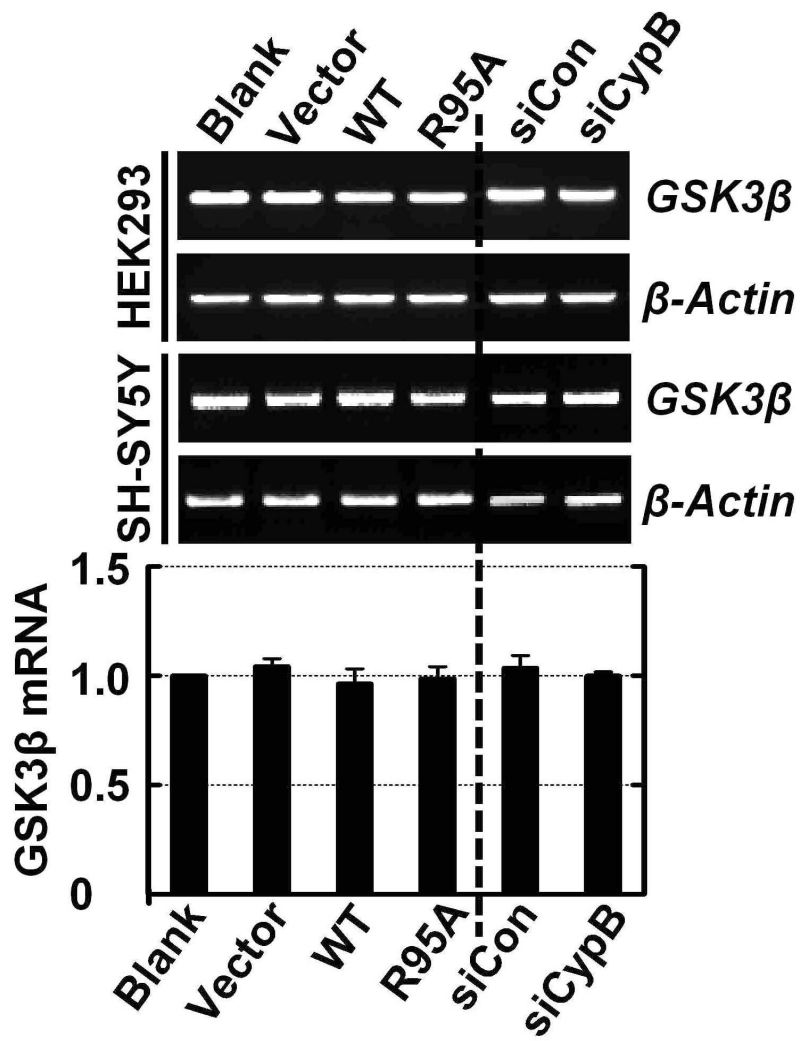
도면1b



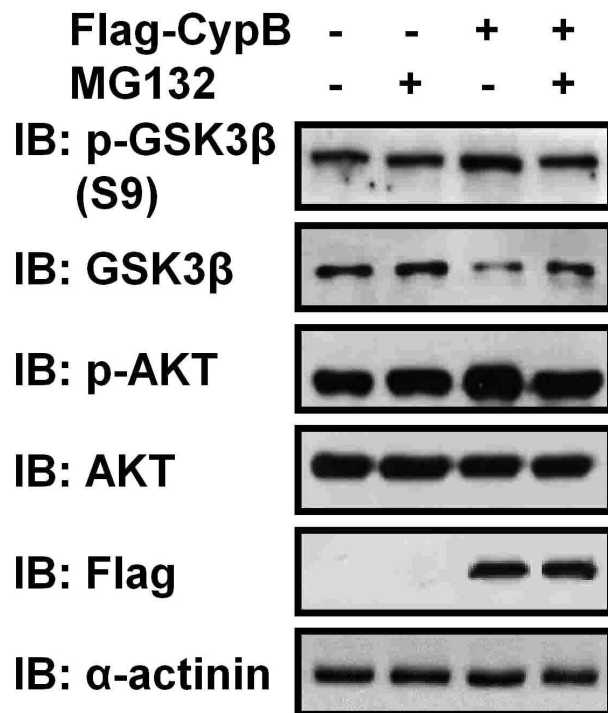
도면1c



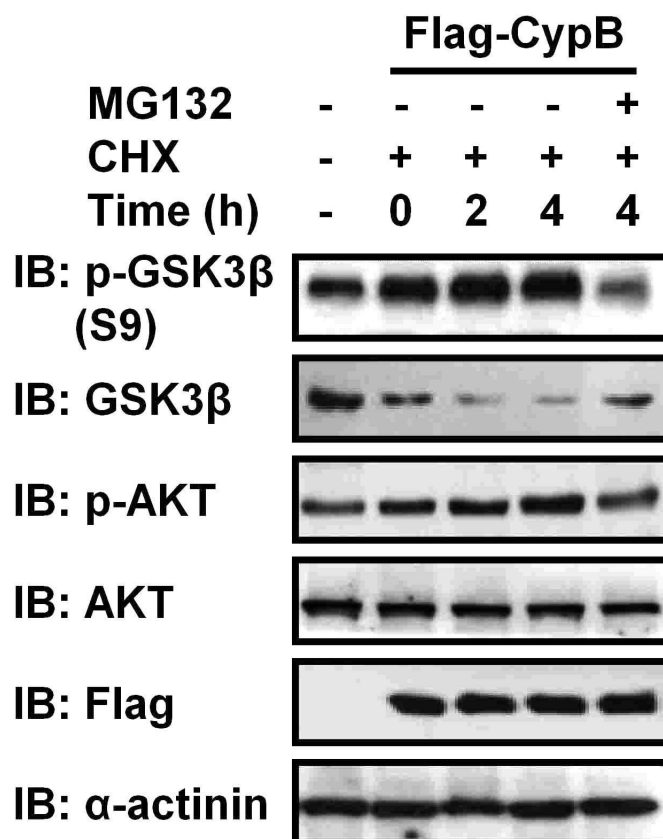
도면1d



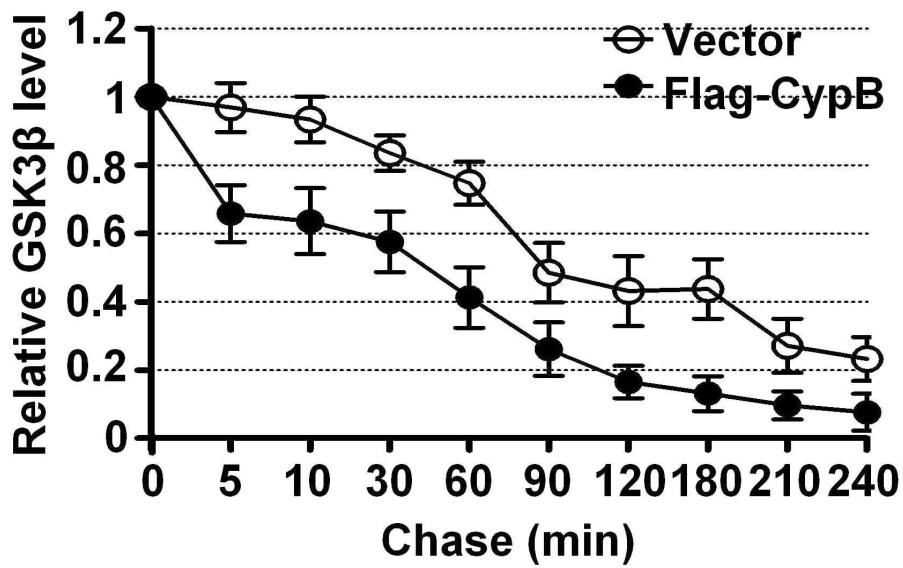
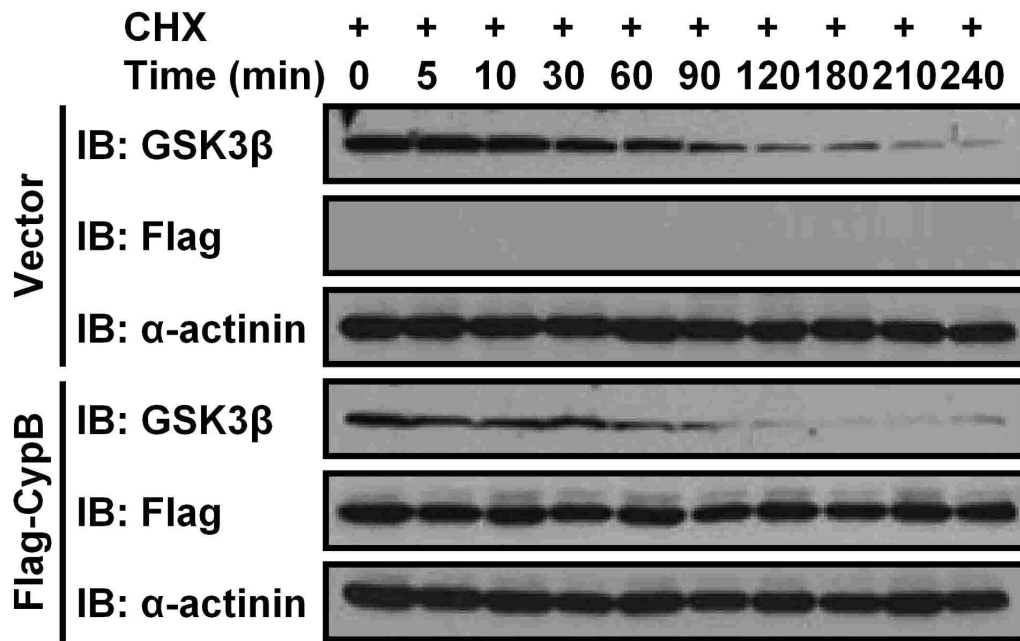
도면1e



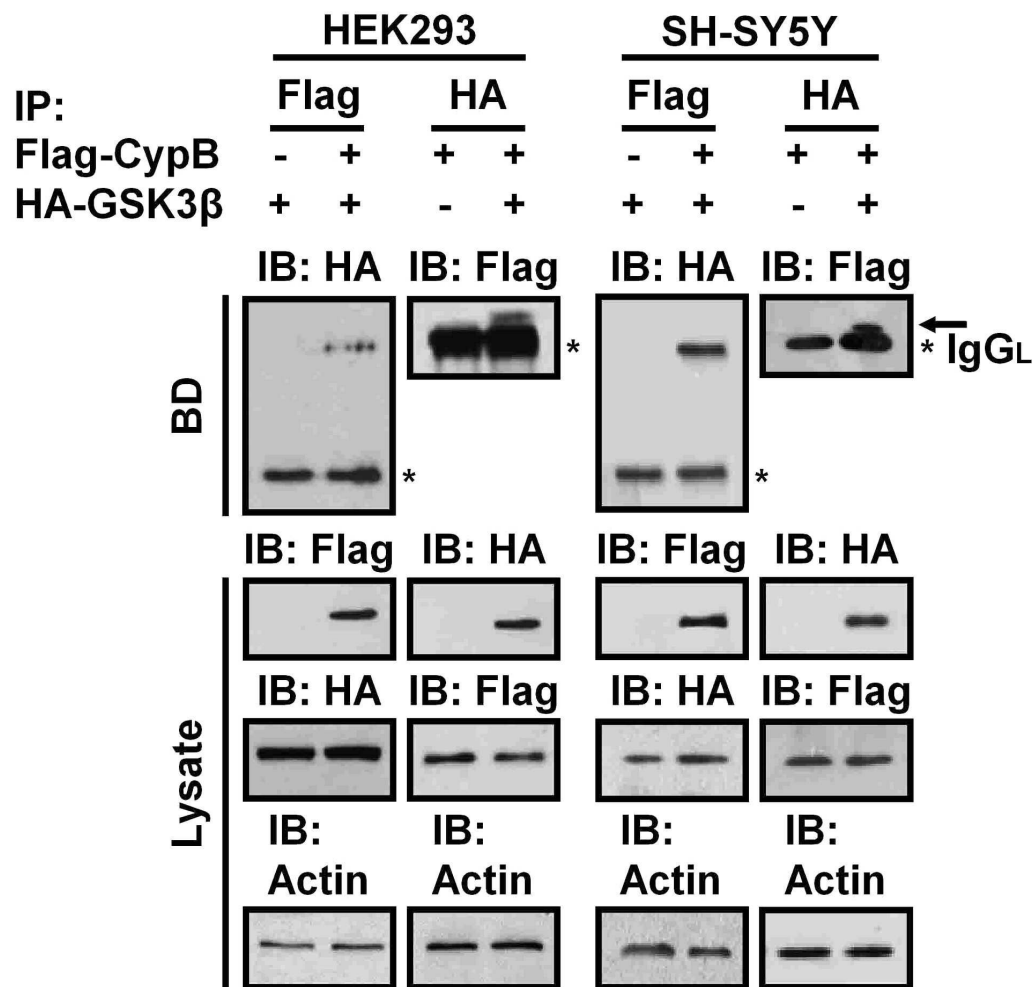
도면1f



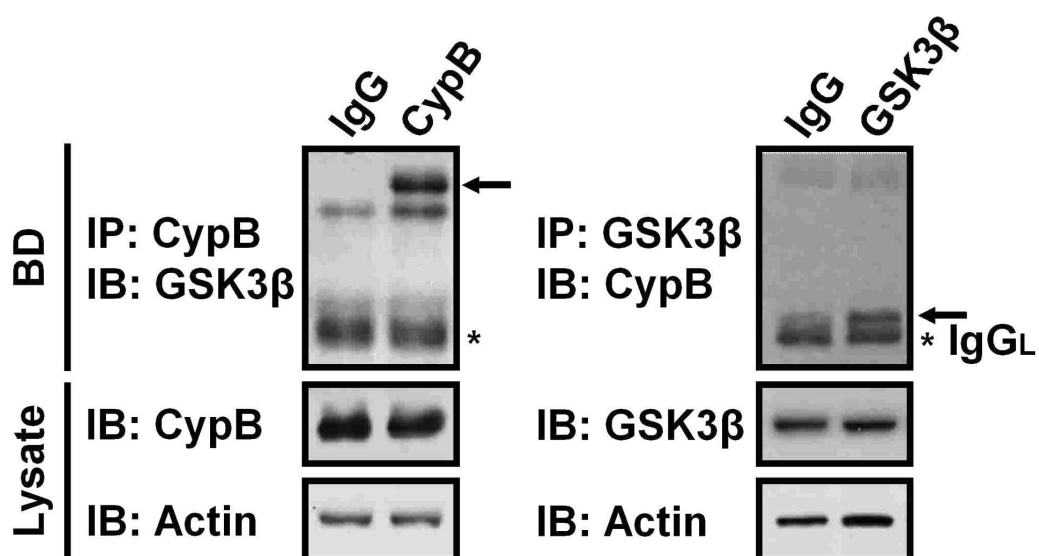
도면1g



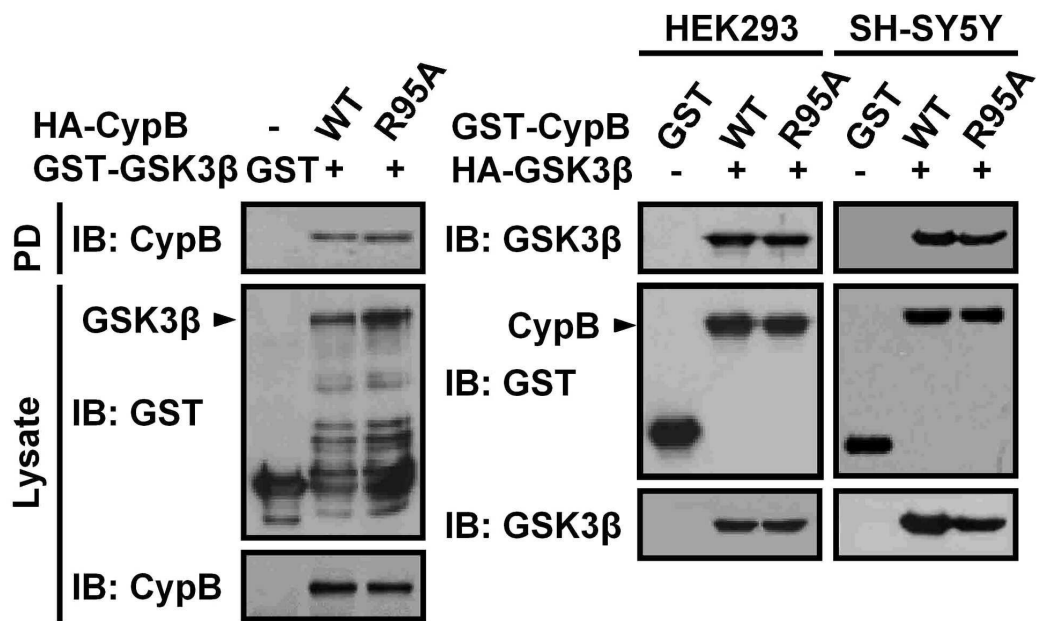
도면2a



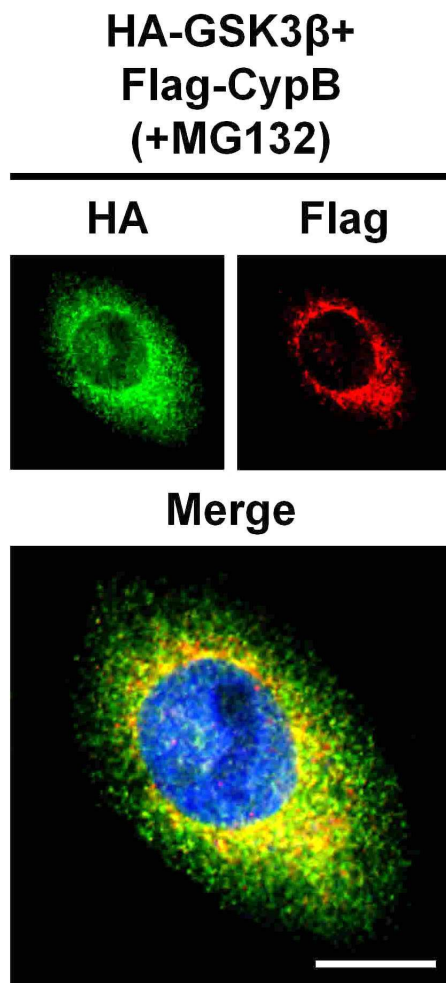
도면2b



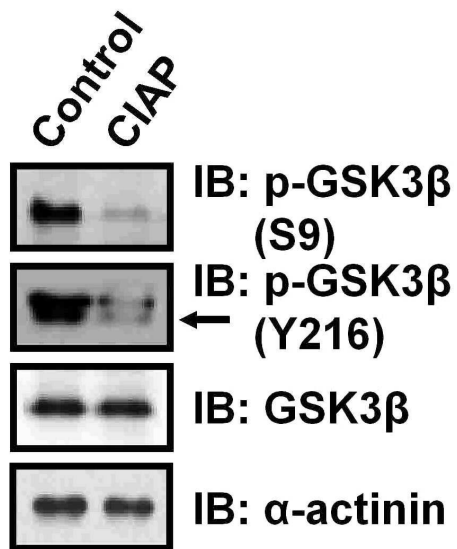
도면2c



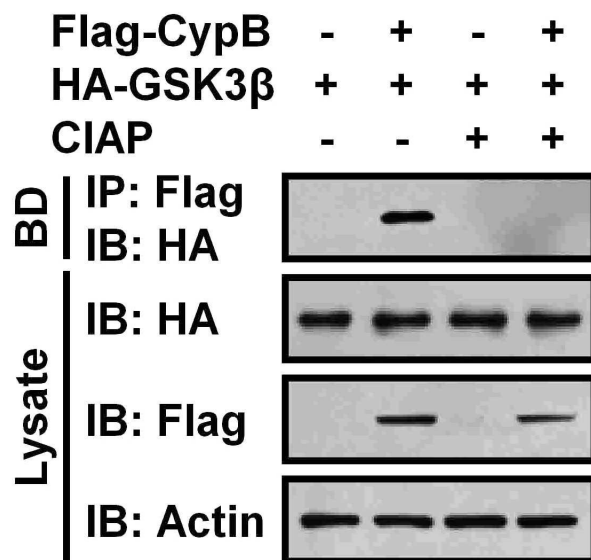
도면2d



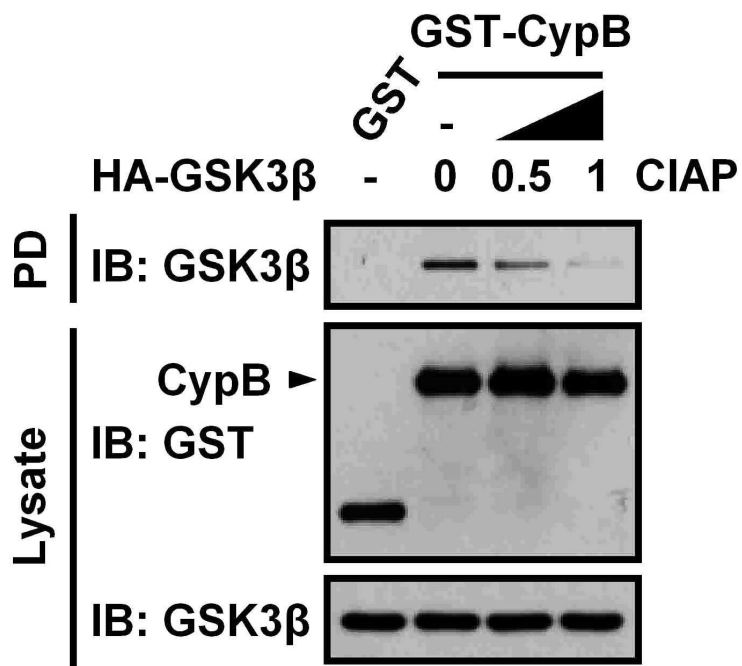
도면2e



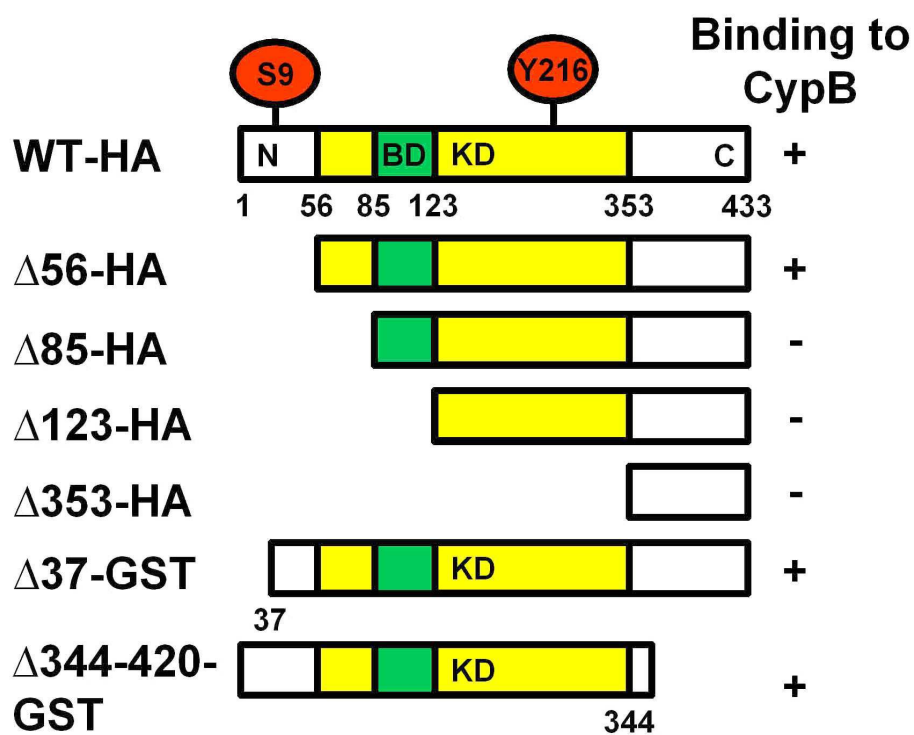
도면2f



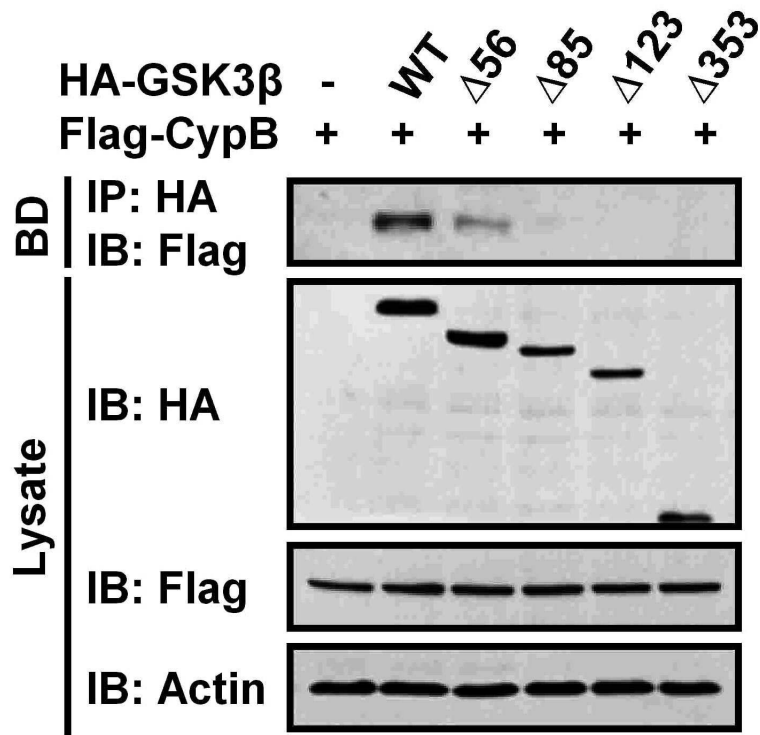
도면2g



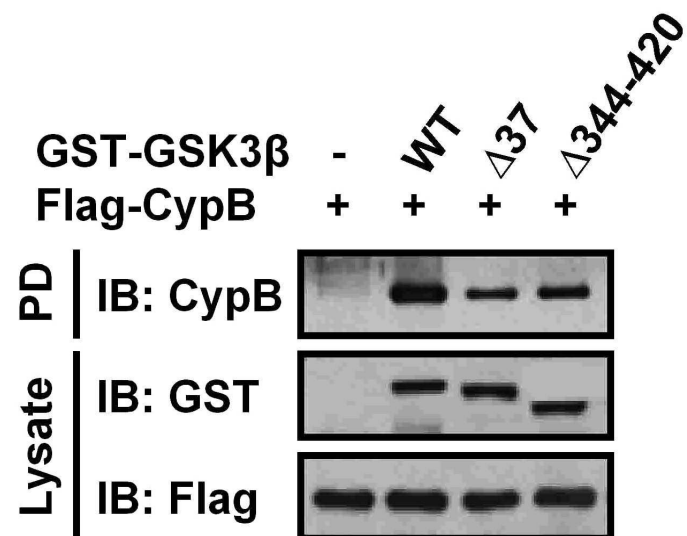
도면2h



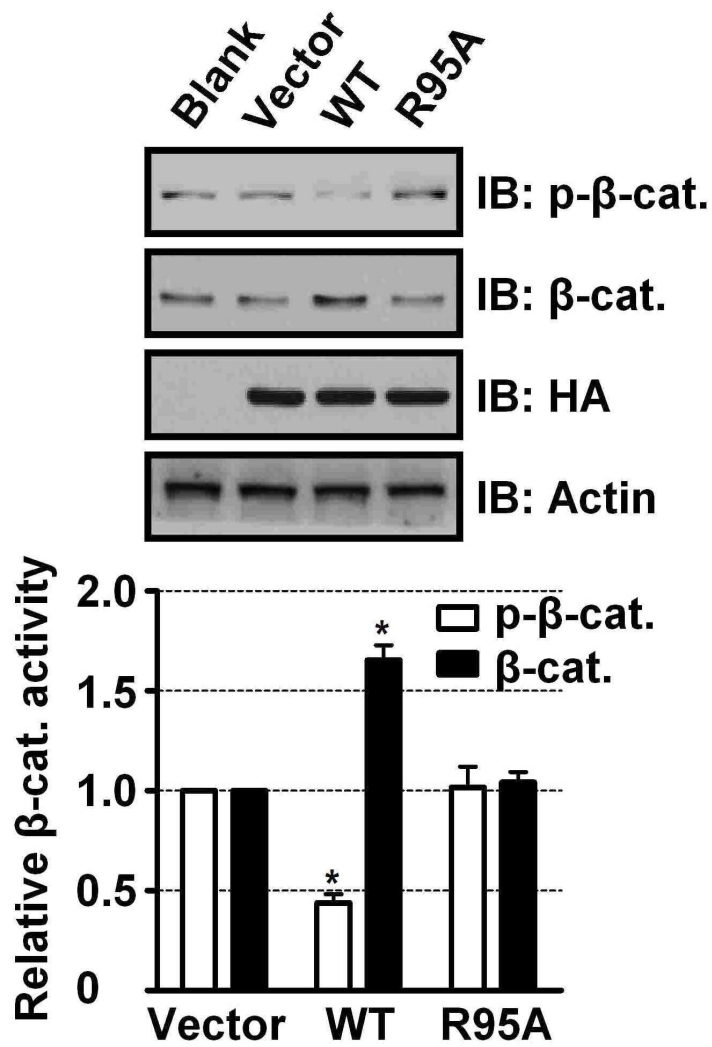
도면2i



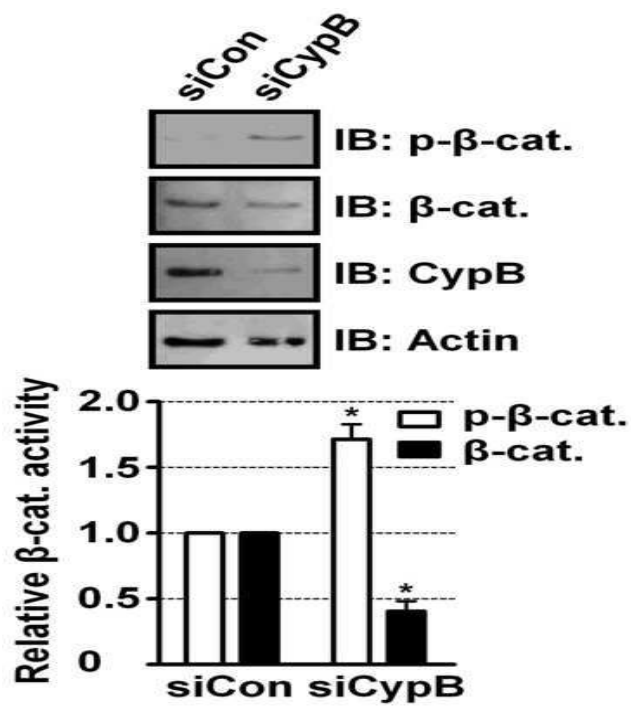
도면2j



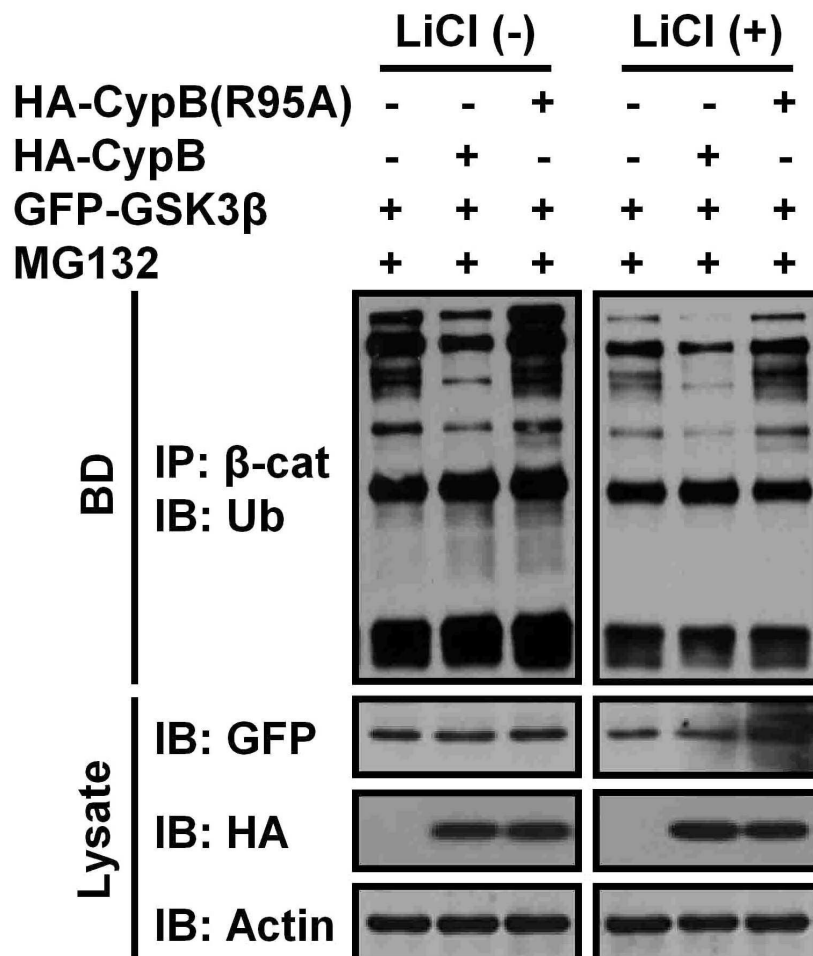
도면3a



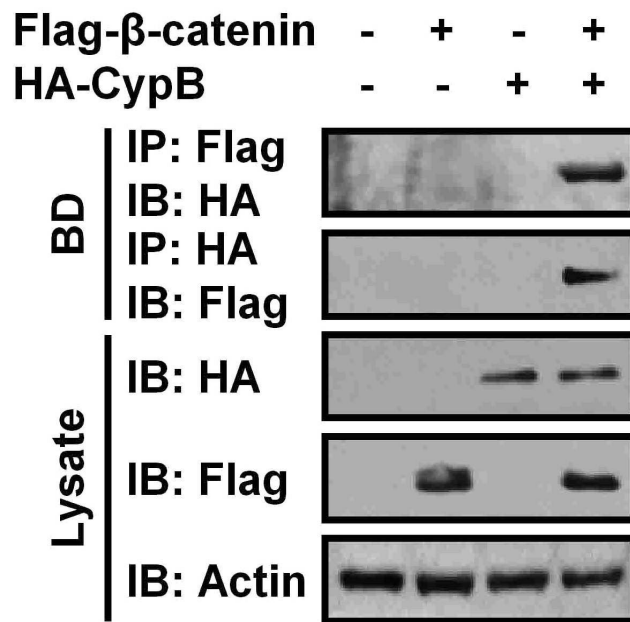
도면3b



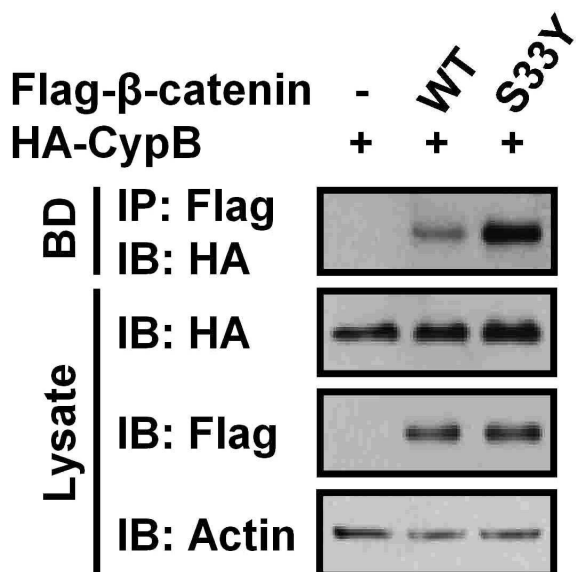
도면3c



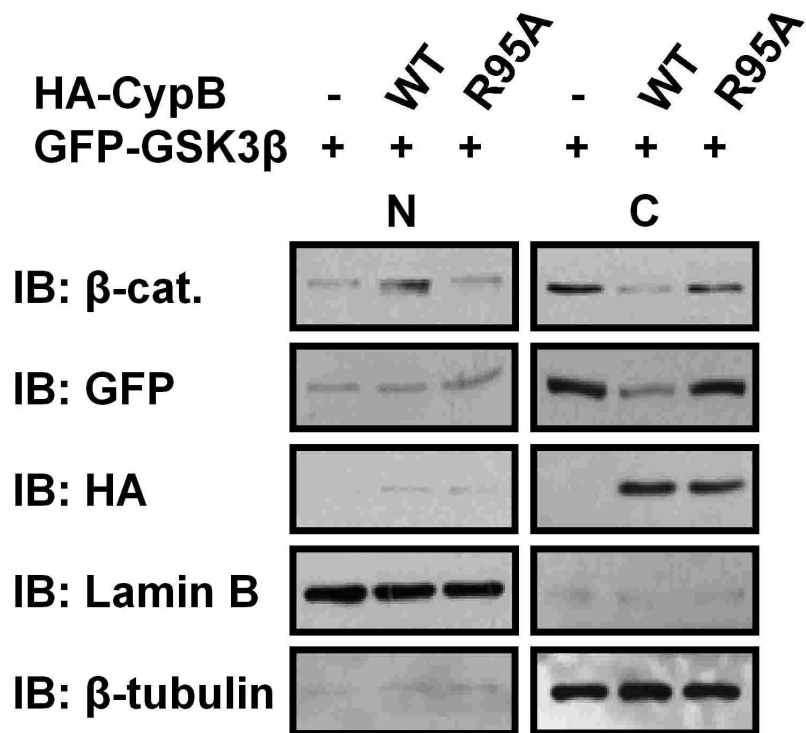
도면3d



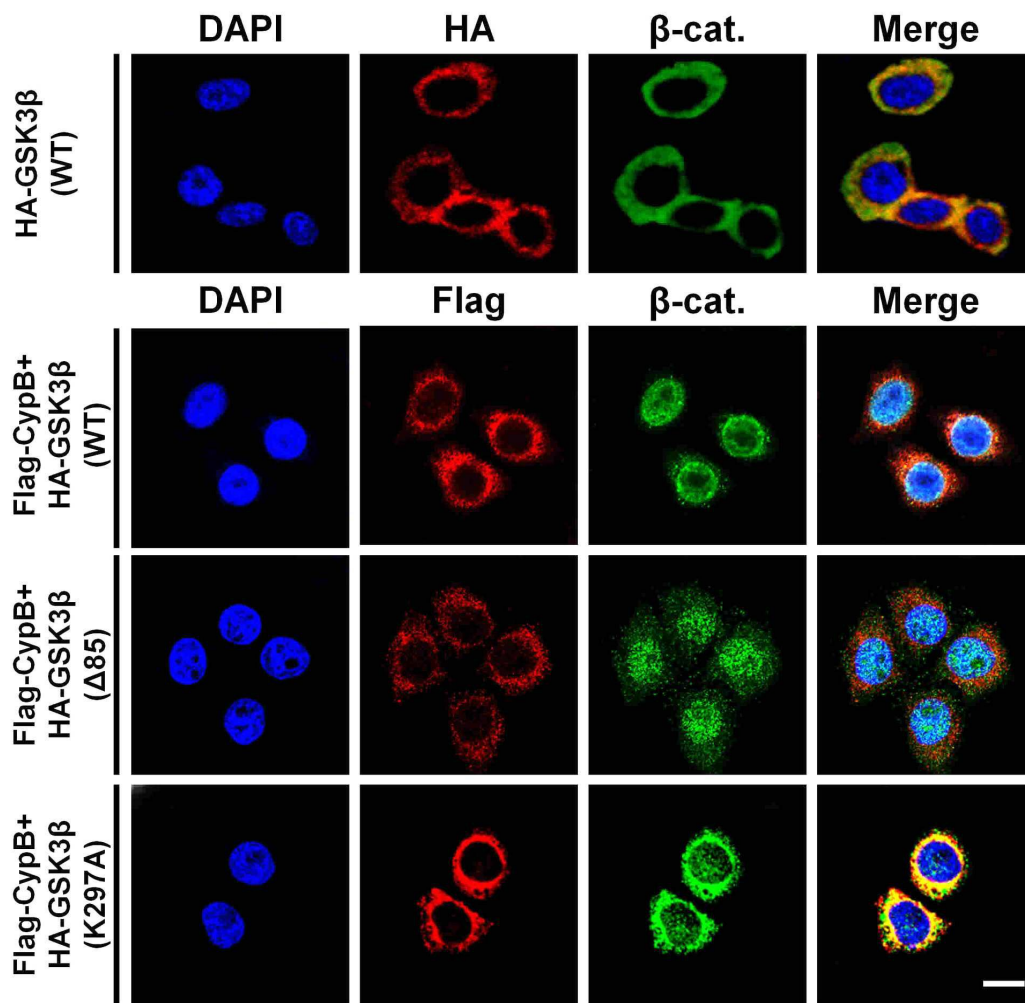
도면3e



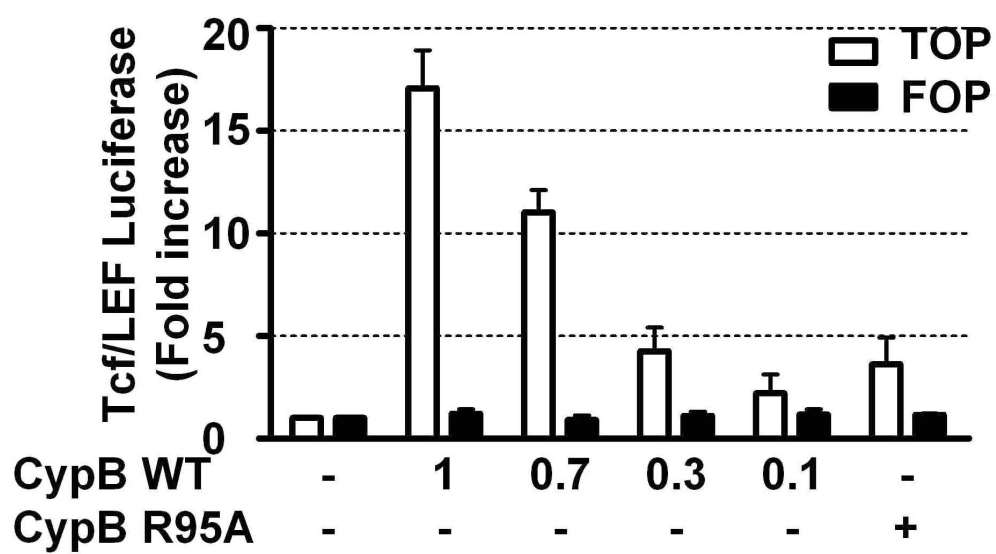
도면3f



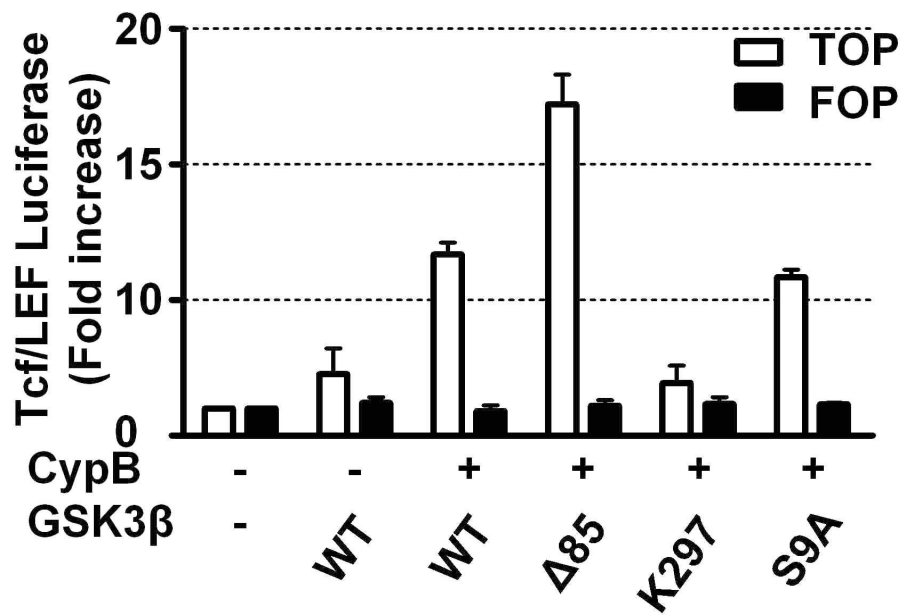
도면3g



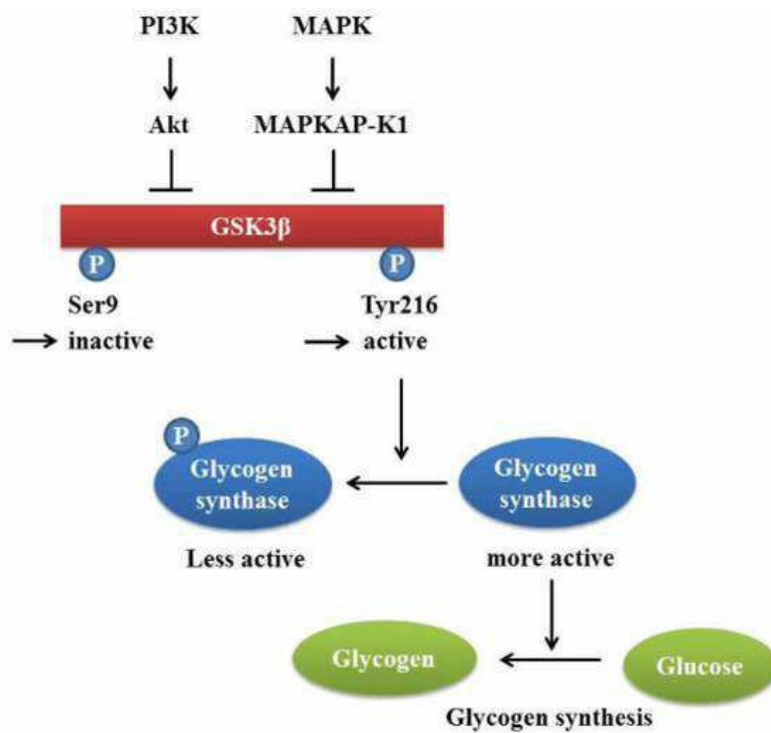
도면3h



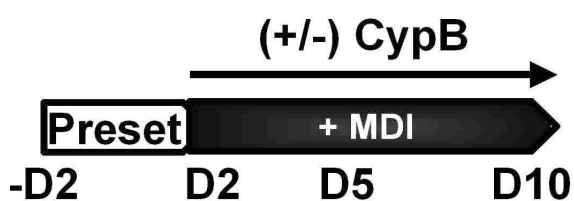
도면3i



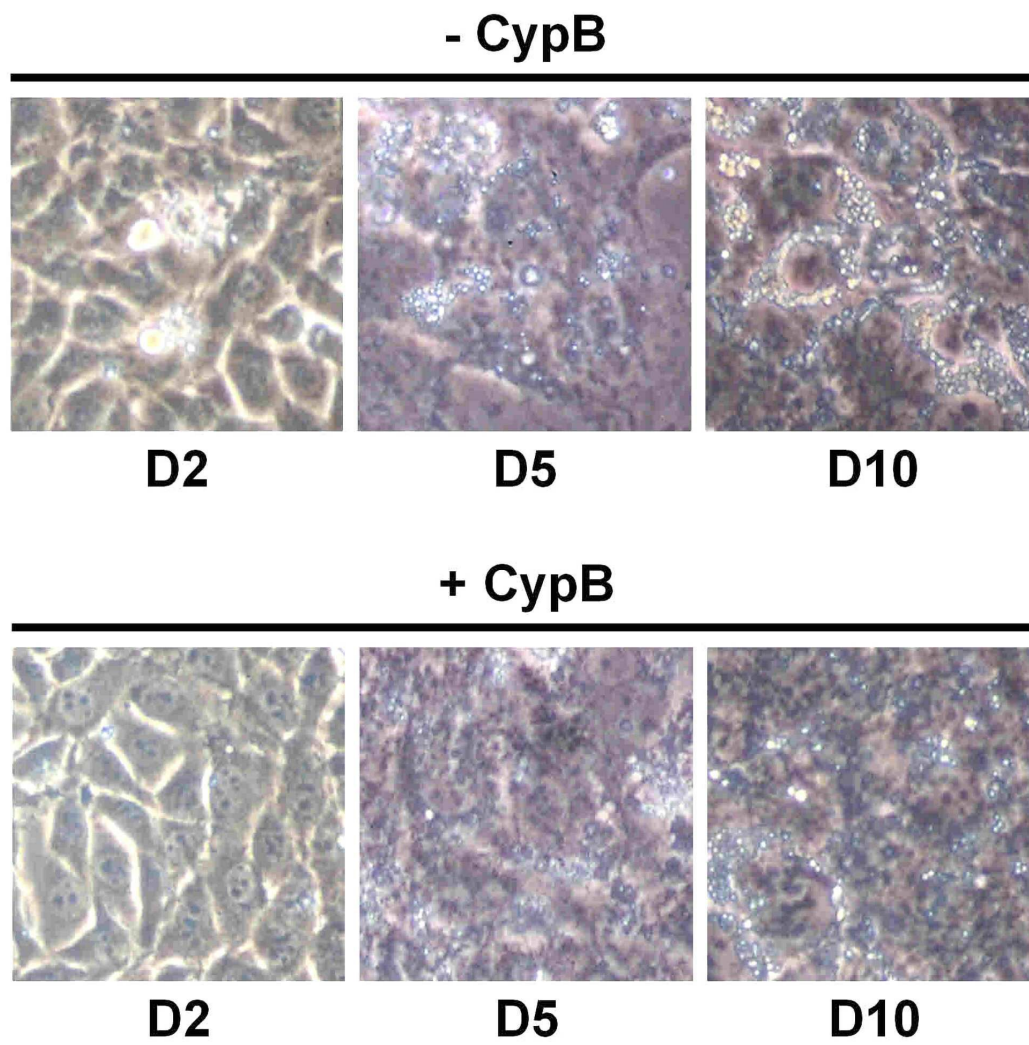
도면4



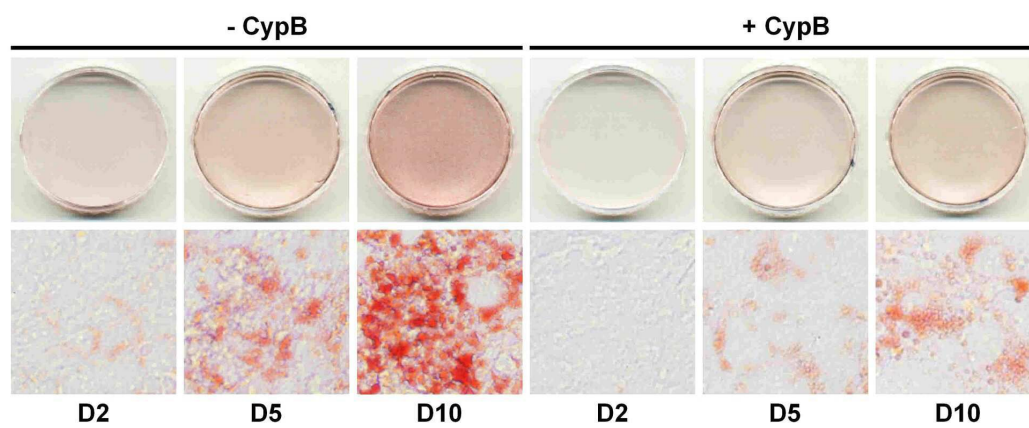
도면5a



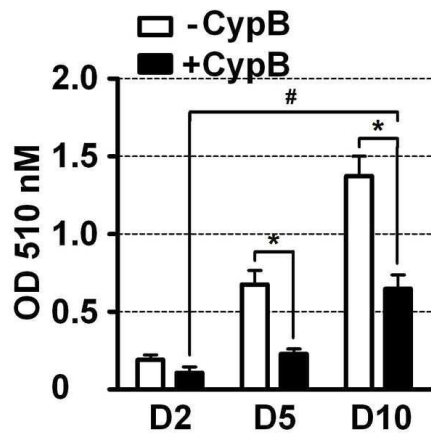
도면5b



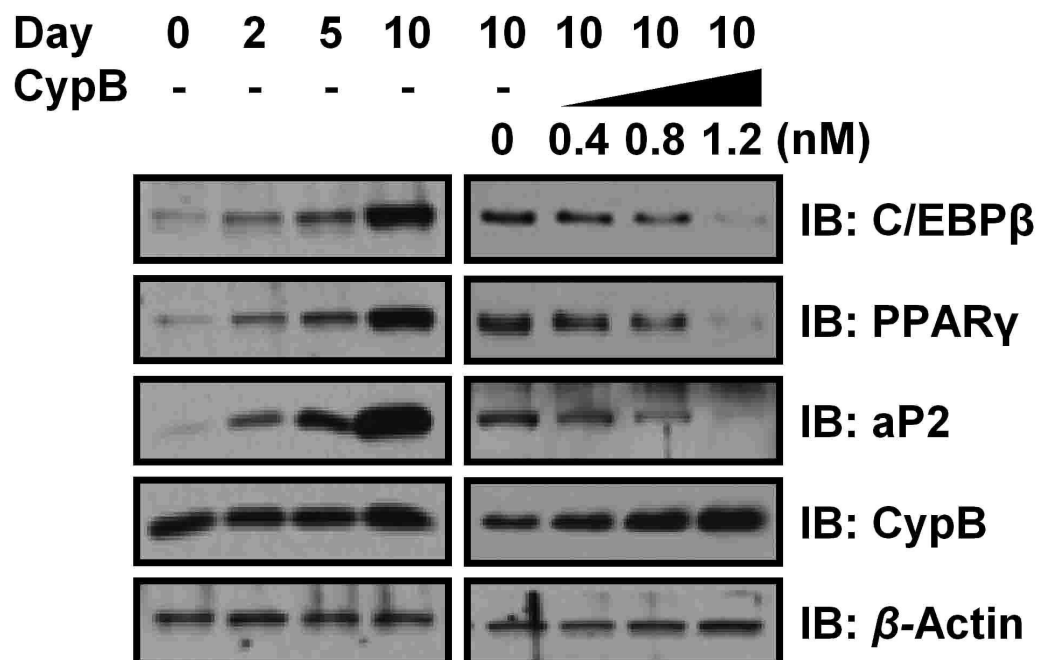
도면5c



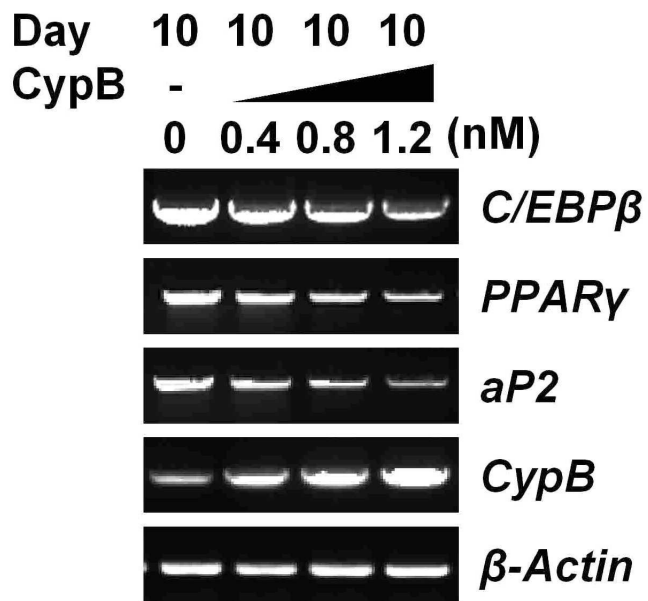
도면5d



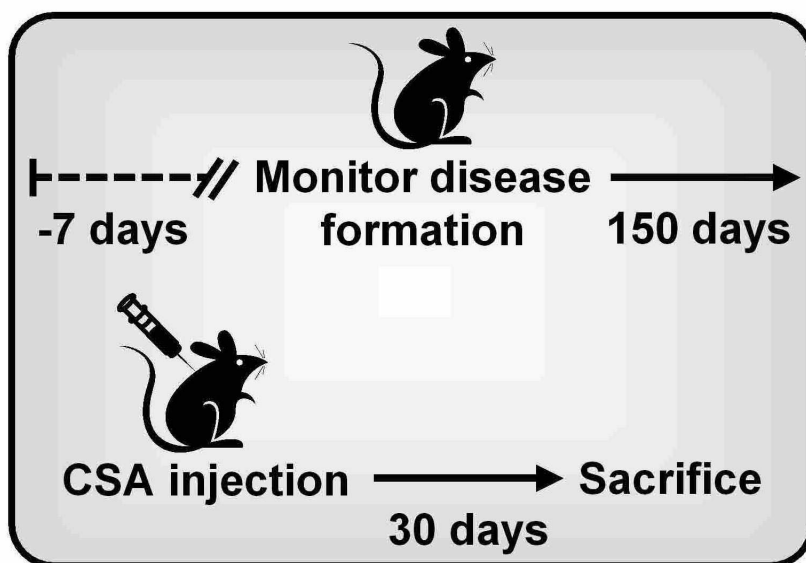
도면5e



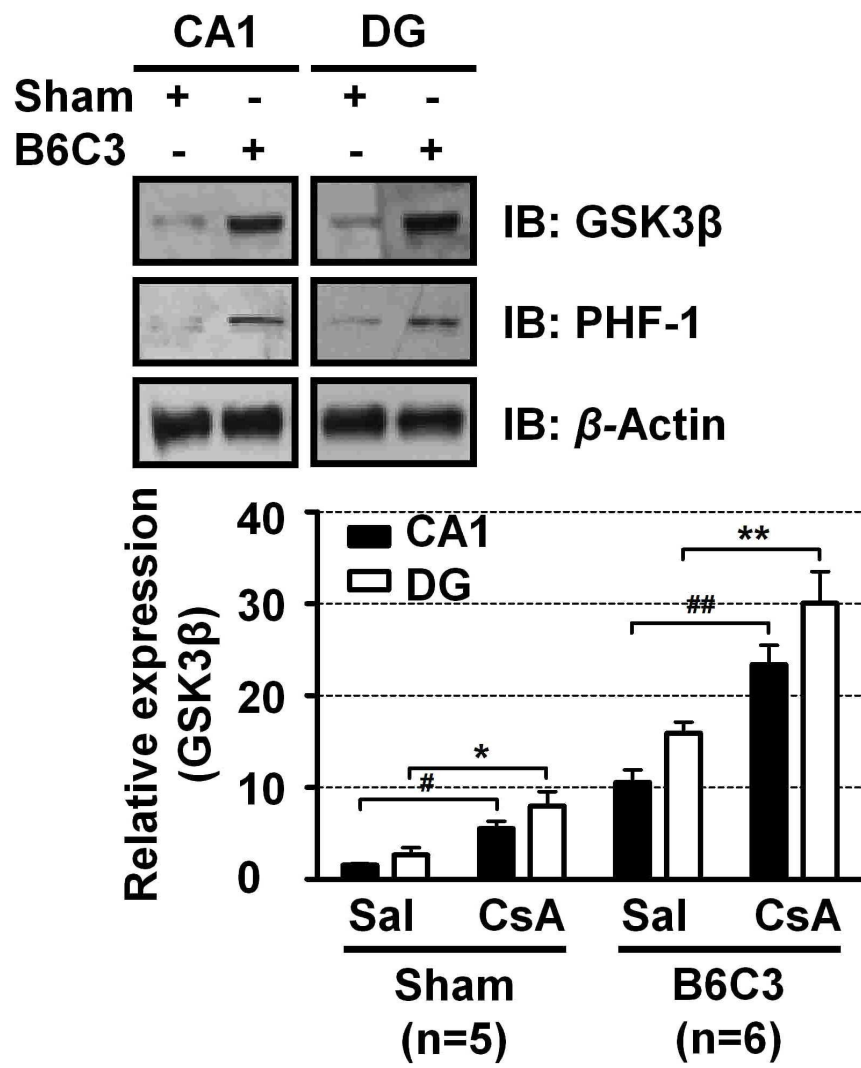
도면5f



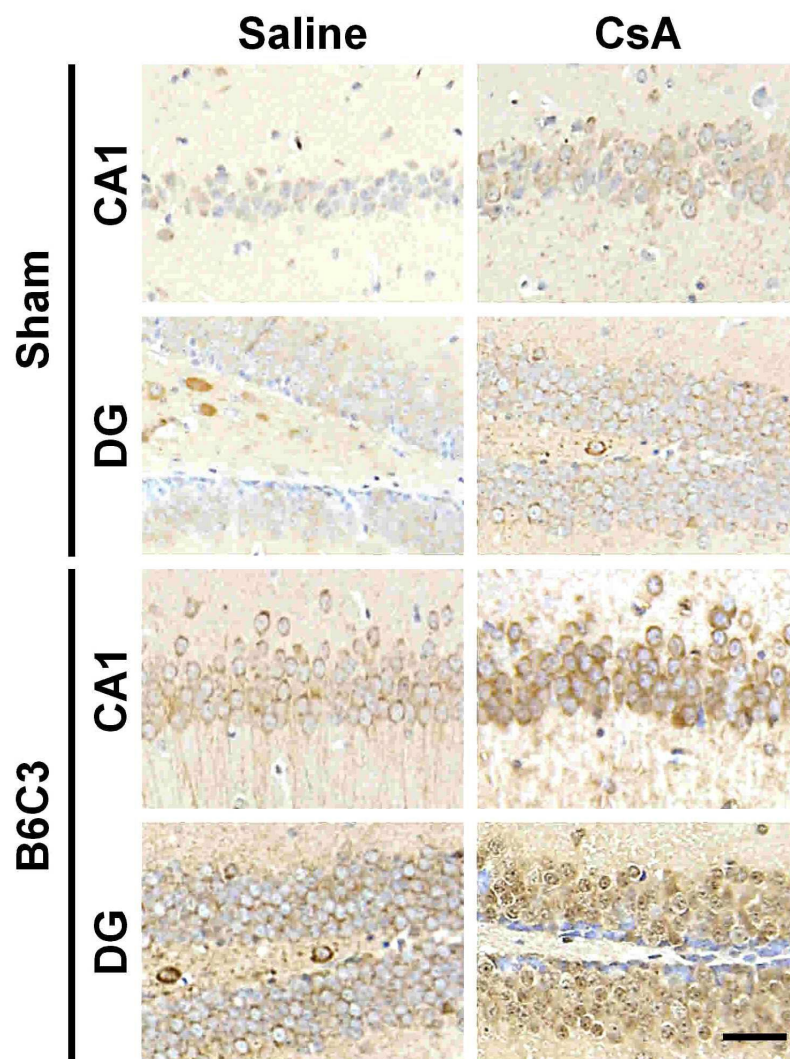
도면6a



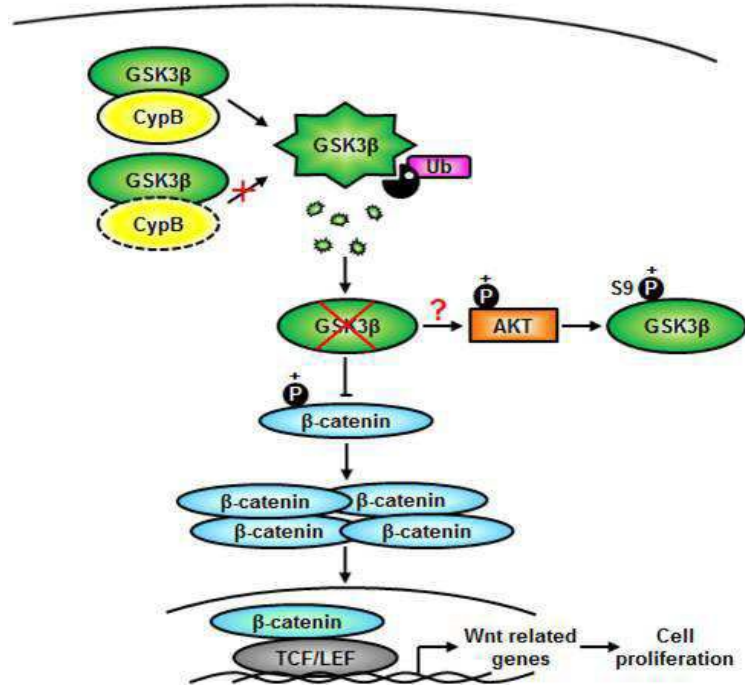
도면6b



도면6c



도면7



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Use of CypB protein for treatment of GSK-3beta related disease
- <130> KPA141333-KR
- <160> 20
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 216
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> cypB
- <400> 1

Met Leu Arg Leu Ser Glu Arg Asn Met Lys Val Leu Leu Ala Ala Ala

1 5 10 15

Leu Ile Ala Gly Ser Val Phe Phe Leu Leu Leu Pro Gly Pro Ser Ala

20 25 30

Ala Asp Glu Lys Lys Lys Gly Pro Lys Val Thr Val Lys Val Tyr Phe

35 40 45

Asp Leu Arg Ile Gly Asp Glu Asp Val Gly Arg Val Ile Phe Gly Leu

50 55 60
 Phe Gly Lys Thr Val Pro Lys Thr Val Asp Asn Phe Val Ala Leu Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Glu Lys Gly Phe Gly Tyr Lys Asn Ser Lys Phe His Arg Val
 85 90 95

 Ile Lys Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Thr Arg Gly Asp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe
 115 120 125
 Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val Ser Met Ala Asn Ala Gly
 130 135 140
 Lys Asp Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ala
 145 150 155 160
 Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Leu Glu Gly Met

 165 170 175
 Glu Val Val Arg Lys Val Glu Ser Thr Lys Thr Asp Ser Arg Asp Lys
 180 185 190
 Pro Leu Lys Asp Val Ile Ile Ala Asp Cys Gly Lys Ile Glu Val Glu
 195 200 205
 Lys Pro Phe Ala Ile Ala Lys Glu
 210 215

<210> 2

<211> 1045

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cypB

<400> 2

actatccggc gccgagccgg aggggggaaa cgcgccccgc cgcccgcgcg gagcccgcca 60

gcaaccccag tccccccac ccgcgcgtgg cgcgcccggc tccctagcca ccgcggcccc 120

accctcttcc ggctcagct gtccgggctg ctttcgcctc cgctgtgga tgctgcgcct 180

ctccgaacgc aacatgaagg tgctccttgc cgccgcctc atcgcggggt ccgtcttctt 240

cctgctgctg cggggacctt ctgcggccga tgagaagaag aaggggccca aagtcaccgt 300

caagggtgtat tttagacctac gaatttgaga tgaagatgta ggccgggtga tctttggtct	360
cttcggaaag actgttccaa aaacagtgga taattttgtg gccttagcta caggagagaa	420
aggatttggc tacaaaaaca gcaaattcca tcgtgtaatc aaggacttca tgatccaggg	480
cggagacttc accaggggag atggcacagg aggaaagagc atctacggtg agcgcttccc	540
cgatgagaac ttcaaaactga agcactacgg gcctggctgg gtgagcatgg ccaacgcagg	600
caaagacacc aacggctccc agtttttcat cagcacagtc aagacagcct ggctagatgg	660
caagcatgtg gtgtttggca aagtcttaga gggcatggag gtggtgcgga aggtggagag	720
caccaagaca gacagccggg ataaaccct gaaggatgtg atcatcgag actgcggcaa	780
gatcgaggtg gagaagcct ttgccatgc caaggagtag ggcacaggga catctttctt	840
tgagtgaccg tctgtgcagg ccctgtagtc cgccacaggg ctctgagctg cactggcccc	900
ggtgctggca tctggtggag cggaccact ccctcacat tccacaggcc catggactca	960
cttttgaac aaactcctac caacactgac caataaaaaa aaatgtgggt tttttttttt	1020
ttaatataaa aaaaaaaaaa aaaaa	1045
<210> 3	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
aaaggatcca tgctgcgcct ctccgaa	27
<210> 4	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
aaactcgagc tccttggcga tggcaaa	27
<210> 5	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> siRNA	

<400>	5	
caaaaacagu ggauauuuu		19
<210>	6	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	6	
gcgcgcuuug uaggauucg		19
<210>	7	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>		
	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer (CypB)	
<400>	7	
aattccatcg tgtaatcaag gactt		25
<210>	8	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer (CypB)	
<400>	8	
ccgctcgagc tattgtaatg actcaggg		28
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer (GSK-3beta)	
<400>	9	
tccctcaaat taaggcacat c		21
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer (GSK-3beta)

<400> 10

cacggctctcc agtattagca tct 23

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer (beta-catenin)

<400> 11

gatgcccttc tcgttcctga c 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer (beta-catenin)

<400> 12

tcaccatcct catcgctctc g 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer (aP2)

<400> 13

gccagatgtt tggtcgtttt 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer (aP2)

<400> 14

aggctgggga ggtgtaactt 20

<210> 15

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer (C/EBPbeta)
 <400> 15
 atgttcctac gggtttgttg 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer (C/EBPbeta)
 <400> 16
 cccaaaaggc ttgttaacca 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer (PPAR gamma)
 <400> 17
 accatggtgg gttctctctg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer (PPAR gamma)
 <400> 18
 tcaaaggagt gggagtggtc 20
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer (beta-actin)
 <400> 19

ctcgtcatac tcctgcttgc tg

22

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer (beta-actin)

<400> 20

cgggacctga ctgactacct c

21