



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0048322
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6887 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0130294
(22) 출원일자 2018년10월29일
심사청구일자 2018년10월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
박경수
서울특별시 종로구 대학로 103 (연건동)
박영주
서울특별시 종로구 대학로 103 (연건동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

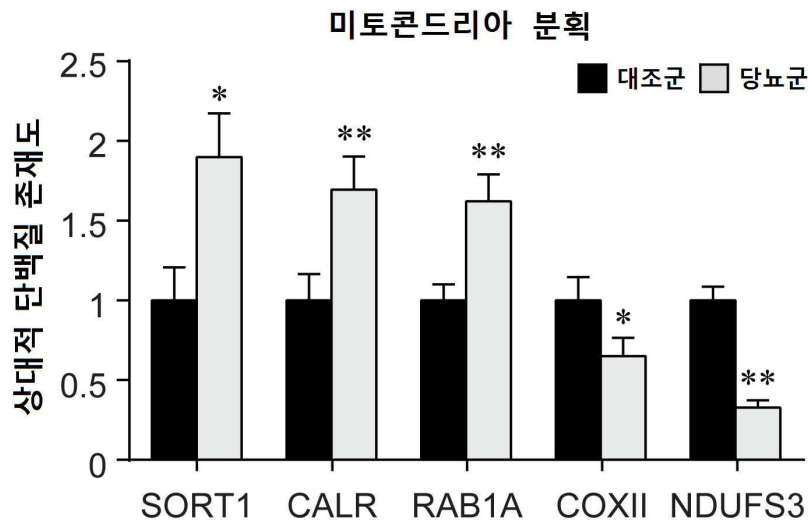
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 당뇨병 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 당뇨병의 진단을 위한 바이오마커의 검출 방법

(57) 요약

당뇨병 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 당뇨병의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 방법을 제공한다. 이에 따르면, 당뇨병, 예를 들어 제2형 당뇨병을 간편하고, 높은 정확도 및 특이도로 진단하는데 이용할 수 있고, 당뇨병의 진행 경과를 예측하는 바이오마커로 이용할 수 있고, 당뇨병 치료의 새로운 치료 표적으로 이용하여 당뇨병의 예방 또는 치료에 효과가 있는 물질을 스크리닝할 수 있다.

대표도 - 도4d



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/042 (2013.01)

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

기초과학연구원

대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)

(72) 발명자

안병용

서울특별시 종로구 대학로 103 (연건동)

구영도

서울특별시 종로구 대학로 103 (연건동)

김수진

서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가)

이영균

경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 (구미동)

황대회

대전광역시 유성구 엑스포로 55 (도룡동)

채세현

대전광역시 유성구 엑스포로 55 (도룡동)

이상원

서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가)

장학철

경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 (구미동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2006-2005410

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 · 의료기술개발

연구과제명 노인 당뇨병의 표적인자 발굴과 미토콘드리아를 표적으로 하는 당뇨병 극복 방안

기 여 율 1/2

주관기관 서울대학교(연건캠퍼스)

연구기간 2006.11.01 ~ 2015.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1277

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성 R&D

연구과제명 맞춤형 암/만성염증 극복을 위한 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축

기 여 율 1/2

주관기관 서울대 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

근육 조직으로부터 유래된 시료로부터, 소르틸린 1(Sortilin 1: SORT1), 칼레티쿨린(Calreticulin: CALR), 및 Ras-관련 단백질 Rab-1A(Ras-related protein Rab-1A: RAB1A)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 시료는 미토콘드리아를 포함한 분획물인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 시클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2: COX2) 및 NADH 데히드로게나제 [유비퀴논] 철-황 단백질 3(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3: NDUF3S)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제제는

상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는

상기 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 동일하거나 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산인 것인 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 핵산은 프라이머 또는 프로브인 것인 조성물.

청구항 8

근육 조직으로부터 유래된 시료로부터, SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병 진단용 키트.

청구항 9

당뇨병이 의심되는 개체로부터 분리된 근육 조직으로부터 유래된 시료에서 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는,

당뇨병의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 측정하는 단계는 상기 시료와, SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 인큐베이션시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 방법은 상기 시료에서 COX2 및 NDUFS3으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 측정하는 단계는 근육생검, 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역염색, 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 노던(Northern) 블로팅, 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 또는 이들의 조합으로 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 당뇨병 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 당뇨병의 진단을 위한 바이오마커 SORT1, CALR, 및 RAB1A의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아는 포도당과 지방산 산화로부터 ATP 생산을 담당하는 세포 내 기관으로 세포 증식 또는 분화와 같은 ATP를 필요로 하는 다양한 세포 활동에 필수적인 세포소기관이다. 한편, 인슐린 분비 감소와 인슐린 저항성 두 가지가 특징적인 제2형 당뇨병의 병인으로 알려져 있다. 췌장 베타 세포에서의 미토콘드리아 기능 장애는 인슐린 분비를 저해하게 되며, 골격근의 미토콘드리아 기능 장애는 지방산 산화의 감소, 세포 내 지질 대사체의 축적 및 인슐린 신호 전달 경로의 억제와 관련되어 있다. 이에 미토콘드리아 기능 저하가 인슐린 분비 및 반응 조직에서의 반응 억제에 모두 관여하여 제2형 당뇨병의 발병 기전에 있어 중요한 역할을 할 것이라는 증거가 점차 증가하고 있다.

[0003] 미토콘드리아 단백질체(proteome) 분석은, 제한된 수의 유전자를 바탕으로 한 유전체(genome) 분석에 비해 수천가지의 미토콘드리아 단백질에 대한 포괄적인 정보를 제공하여 제2형 당뇨병과 관련된 미토콘드리아 기능을 평가할 수 있는 방법이다. 이에 당뇨병 환자나 동물 모델을 대상으로 단백질체(preteome) 연구가 진행되어, 당뇨병에서 발현이 증가하는 단백질을 발견하는 연구들이 진행되어 발표되었다.

[0004] 그러나, 인슐린 반응 조직에서 당뇨군과 비당뇨군을 비교하여 미토콘드리아의 기능을 나타내는 단백질 프로파일(proteome profile)을 확인하기 위한 미토콘드리아 단백질 연구는 시행된 바가 없다.

[0005] 따라서, 이를 통해 당뇨병을 간편하고 진단할 수 있고, 진단의 정확도 및 특이도가 높은 바이오마커를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 당뇨병 진단용 조성물을 제공한다.

[0007] 당뇨병 진단용 키트를 제공한다.

[0008] 당뇨병의 진단을 위해 근육 조직으로부터 유래된 시료에서 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 양상은 근육 조직으로부터 유래된 시료로부터, 소르틸린 1(Sortilin 1: SORT1), 칼레티쿨린(Calreticulin: CALR), 및 Ras-관련 단백질 Rab-1A(Ras-related protein Rab-1A: RAB1A)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 시료는 개체로부터 분리된 근육 조직일 수 있다. 상기 시료는 근육 조직으로부터 분리된 전체 단백질 또는 이로부터 분획된 분획물일 수 있다. 상기 시료는 미토콘드리아를 포함한 분획물일 수 있다. 상기 시료는 근육 조직 미토콘드리아로부터 분리된 폴리펩티드 또는 핵산을 포함한 것일 수 있다.

- [0011] 소르틸린 1(Sortilin 1: SORT1)은 Vps10p(vacuolar protein sorting 10 protein) 패밀리의 제I형 막 당단백질이다. SORT1은 Gp95, LDLCQ6, NT3, 또는 NTR3로도 불릴 수 있다. SORT1은 많은 조직에서 흔히 발현되는 단백질로서 중추신경계에 많이 존재한다. 세포 수준에서, 소르틸린은 골지체, 엔도솜, 리소솜, 및 원형질막 사이의 단백질 수송에 기능을 한다. 또한, 소르틸린은 동맥경화, 관상동맥질환, 알츠하이머병, 및 암과 같은 질환에도 연관되어 있다. 상기 소르틸린 1은 인간에서 Uniprot 번호 Q99523의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 마우스에서 Uniprot 번호 Q6PHU5의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 소르틸린 1은 인간에서 GenBank Accession No. NM_001205228 또는 NM_002959Q99523의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 마우스에서 GenBank Accession No. NM_001271599 또는 NM_019972의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0012] 칼레티쿨린(Calreticulin: CALR)은 칼레굴린(calregulin), CRP55, CaBP3, 칼세퀴스트린-유사 단백질(calsequestrin-like protein), 및 소포체 존재 단백질 60(endoplasmic reticulum resident protein 60)으로도 알려져 있다. CALR은 비활성인 경우 칼슘 이온에 결합하는 다중기능성 단백질이다. CALR은 칼슘 이온에 친화도가 낮지만 높은 능력(capacity)으로 결합하여 칼슘 신호를 전달할 수 있다. CALR은 소포체와 관련된 저장 소기관(storage compartment)에 존재할 수 있다. CALR은 잘못 폴딩된 단백질에 결합하여 이 단백질이 소포체에서 골지체로 수송되는 것을 막을 수 있다. CALR은 또한 핵에 존재하여 전사의 조절에 관여할 수 있다. 상기 CALR은 전신성 루푸스, 쇼그렌 병, 및 암과 관련 있는 것으로 알려져 있다. 상기 CALR은 인간에서 Uniprot 번호 P27797의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 마우스에서 Uniprot 번호 P14211의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 CALR은 인간에서 GenBank Accession No. NM_004343의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 마우스에서 GenBank Accession No. NM_007591의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0013] Ras-관련 단백질 Rab-1A(Ras-related protein Rab-1A: RAB1A)은 CHML, GOLGA2, GOLGA5, MICAL1, RABAC1, 및 CHM과 상호작용하는 단백질일 수 있다. 작은 GTP분해효소(small GTPase) Rab은 수송 소포의 형성에서부터 세포막과의 융합에 이르기까지 세포내 막 수송에 역할을 한다. Rab은 비활성 GDP-결합 형태와 GTP-결합 형태를 순환하는데, GTP-결합 형태는 소포 형성, 이동, 테더링(tethering) 및 융합을 직접 담당하는 신호전달 하류의 물질을 막으로 불러모을 수 있다. RAB1A는 소포체에서 골지체로 그리고 세포 표면으로의 소포성 단백질 수송을 조절하고 IL-8 및 성장 호르몬 분비에 역할을 할 수 있다. 세포막에 존재하는 CASR 수준을 조절합니다. 단백질 수송에서의 기능을 통해, 세포 부착 및 세포 이동에 역할을 할 수 있다. 상기 RAB1A는 인간에서 Uniprot 번호 P62820의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 마우스에서 Uniprot 번호 P62821의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 RAB1A는 인간에서 GenBank Accession No. NM_004161 또는 NM_015543의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 마우스에서 GenBank Accession No. NM_008996의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 조성물은 시클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2: COX2) 및 NADH 데히드로게나제 [유비퀴논] 철-황 단백질 3(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3: NDUF33)로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 체제를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 시클로옥시게나제(Cyclooxygenase: COX)는 프로스타글란딘-엔도퍼옥시드 합성효소(prostaglandin-endoperoxide synthase: PTGS)로도 알려져 있고, 프로스타글란딘 및 트롬복산(thromboxane)을 포함한 프로스타노이드(prostanoid)의 형성을 담당하는 효소이다. 시클로옥시게나제 중 시클로옥시게나제-2(Cyclooxygenase-2: COX2)는 아라키돈산이 프로스타시클린(prostacyclin)의 중요한 전구체인 프로스타글란딘 H2로 전환되는 것에 관련되어 있다. COX2는 대부분의 세포에서 정상 조건 하에서는 저발현되지만 염증 반응 동안 발현이 상승한다. 상기 COX2는 인간에서 Uniprot 번호 P35354의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 마우스에서 Uniprot 번호 Q05769의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 COX2는 인간에서 GenBank Accession No. NM_000963의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 마우스에서 GenBank Accession No. NM_011198의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0016] NADH 데히드로게나제 [유비퀴논] 철-황 단백질 3(NDUF33)는 미토콘드리아 NADH:유비퀴논 산화환원효소(복합체 I) 중 하나의 성분으로서, 이를 암호화하는 유전자의 돌연변이는 미토콘드리아 복합체 I의 이상을 일으키는 레이(Leigh) 증후군과 연관되어 있다. 상기 NDUF33은 인간에서 Uniprot 번호 075489의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 마우스에서 Uniprot 번호 Q9DCT2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 NDUF33은 인간에서 GenBank Accession No. NM_004551의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 마우스에서

GenBank Accession No. NM_026688의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

- [0017] 상기 단편(fragment)은 상기 단백질의 일부로서, 면역원성 폴리펩티드일 수 있다.
- [0018] 당뇨병(diabetes mellitus: DM)은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다. 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병(type 2 diabetes mellitus: T2DM)일 수 있다. 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성(insulin resistance; 혈당을 낮추는 인슐린 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것)을 특징으로 한다.
- [0019] 상기 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체일 수 있다. 용어 "항체(antibody)"는 용어 "면역글로불린(immunoglobulin)"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 항체는 폴리클론 항체 또는 모노클론 항체일 수 있다. 상기 항체는 전장 항체일 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 상기 항원 결합 단편은 단일-도메인 항체(single-domain antibody), Fab, Fab', scFv, 디아바디, 나노바디, 미니바디, 테트라바디, 트리야바디, V_H 도메인, 또는 V_L 도메인일 수 있다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 고체 지지체에 부착된 것일 수 있다. 상기 고체 지지체는 예를 들어, 금속 칩, 플레이트, 또는 웰(well)의 표면이다.
- [0020] 상기 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 동일하거나 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다. 상기 핵산은 프라이머 또는 프로브일 수 있다. 상기 프라이머 또는 프로브는 그의 말단 또는 내부에 형광 물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 또는 방사성 동위원소 등으로 표시된 것일 수 있다.
- [0021] 다른 양상은 근육 조직으로부터 유래된 시료로부터, SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병 진단용 키트를 제공한다.
- [0022] 상기 키트는 당뇨병 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 고체 지지체, 항체 또는 항원 결합 단편의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소, 형광물질로 표시된 2차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 키트는 핵산 검출을 위하여, 중합효소, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다.
- [0023] 다른 양상은 당뇨병이 의심되는 개체로부터 분리된 근육 조직으로부터 유래된 시료에서 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0024] 상기 방법은 당뇨병이 의심되는 개체로부터 분리된 근육 조직으로부터 유래된 시료에서 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0025] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 당뇨병을 앓고 있거나 당뇨병에 걸린 것으로 의심되는 개체일 수 있다.
- [0026] 상기 측정하는 단계는 상기 시료와, SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 인큐베이션시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 방법은 상기 방법은 상기 시료에서 COX2 및 NDUFS3으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 측정하는 단계는 COX2 및 NDUFS3으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 인큐베이션시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 측정하는 단계는 근육생검, 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역염색, 단백질 칩, 면역칩, 마이크로어레이, 노던(Northern) 블로팅, 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 상기 전기영동은 SDS-PAGE, 등전점 전기영동, 2차원 전기영동, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 PCR은 실시간 PCR 또는 역전사 PCR일 수 있다.

- [0029] 상기 방법은 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0030] 상기 방법에서, 측정된 SORT1, CALR, 또는 RAB1A의 발현 수준의 양이 정상 대조군의 발현 수준에 비해 증가할 수 있다. 상기 정상 대조군은 당뇨병에 걸리지 않은 군으로서 음성 대조군을 의미한다. 예를 들어, 검출된 SORT1, CALR, 또는 RAB1A의 양이 정상 대조군의 양 보다 증가하는 경우, 상기 개체는 당뇨병, 예를 들어 제2형 당뇨병에 걸리거나 걸릴 확률이 높은 것으로 진단될 수 있다. 당뇨병, 예를 들어 제2형 당뇨병으로 진단된 개체에게 인슐린 주사, 메트포르민 투여 등의 치료를 수행할 수 있다.
- [0031] 다른 양상은 SORT1, CALR, RAB1A, COX2, 또는 NDUFS3을 당뇨병의 진행 경과를 예측하는 바이오마커를 제공한다. 또다른 양상은 SORT1, CALR, RAB1A, COX2, 또는 NDUFS3을 당뇨병 치료의 새로운 치료 표적으로 이용하여 당뇨병의 예방 또는 치료에 효과가 있는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 일 양상에 따른 당뇨병 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 당뇨병의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 SORT1, CALR, 및 RAB1A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 이의 단편을 검출하는 방법에 따르면, 당뇨병, 예를 들어 제2형 당뇨병을 간편하고, 높은 정확도 및 특이도로 진단하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1a는 골격근 조직에서 당뇨병과 관련된 미토콘드리아 바이오마커를 확인하기 위한 실험의 순서를 나타낸 것이고, 도 1b는 구축된 AMT(accurate mass and time tag) 데이터베이스(DB)에서 정규화된 용출 시간(NET)에 대한 분자량(Da)을 나타낸 그래프이고, 도 1c는 각각의 LC-MS/MS 데이터세트에서 식별된 고유 질량 분류(UMC)를 NET에 대한 분자량(Da)으로 나타낸 그래프이고, 도 1d는 지정된 UMC를 NET에 대한 분자량(Da)으로 나타낸 그래프이다.
- 도 2a는 본 발명과 참조 문헌 Pagliarini et al. 및 Lefort et al.에서 동정된 미토콘드리아 단백질을 비교한 벤다이어그램이고, 도 2b는 식별된 미토콘드리아 단백질의 세포내 위치를 나타내는 그래프이고, 도 2c는 식별된 미토콘드리아 단백질의 미토콘드리아 내 위치 분포를 나타내는 그래프이고, 도 2d는 식별된 미토콘드리아 단백질의 기능을 나타내는 그래프이고, 도 2e는 식별된 미토콘드리아 단백질의 미토콘드리아 복합체 I 내지 V에의 분포를 나타내고, 도 2f는 식별된 미토콘드리아 단백질이 미토콘드리아(MT) DNA에 의해 암호화되는 것인지 또는 핵(Nu) DNA에 의해 암호화되는 것인지를 나타내는 그래프이다.
- 도 3a는 제2형 당뇨병에서 정상 대조군에 비해 상향조절 또는 하향조절되는 단백질을 분석한 그래프이고, 도 3b는 상향조절된 단백질의 세포내 기능을 나타낸 그래프이고, 도 3c는 하향조절된 단백질의 세포내 기능을 나타낸 그래프이고, 도 3d는 상향 또는 하향조절되는 단백질들의 제2형 당뇨병-관련 프로세스를 나타내는 세포내 네트워크 모델의 모식도이고, 도 3e는 상향 또는 하향조절되는 단백질들의 막과 소포체 관련 프로세스를 나타내는 세포내 네트워크 모델의 모식도이다.
- 도 4a는 고지방식이 마우스(HFD) 또는 정상식이 마우스(NCD)의 골격근 유래 총 단백질에서 선별된 바이오마커의 차등발현 수준을 나타낸 그래프이고, 도 4b는 HFD 또는 NCD의 골격근 유래 미토콘드리아 단백질에서 선별된 바이오마커의 차등발현 수준을 나타낸 그래프이고, 도 4c는 인간의 골격근 유래 총 단백질에서 선별된 바이오마커의 차등발현 수준을 나타낸 그래프이고, 도 4d는 인간의 골격근 유래 미토콘드리아 단백질에서 선별된 바이오마커의 차등발현 수준을 나타낸 그래프이다(Mann-Whitney 검정법, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] **실시예 1. 골격근 조직에서 당뇨병과 관련된 미토콘드리아 바이오마커의 확인**
- [0036] **1. 골격근 조직에서 유래된 미토콘드리아 단백질의 고유 질량 분류의 동정**
- [0037] **(1) 시료의 준비**
- [0038] T2DM과 관련된 미토콘드리아 단백체를 조사하기 위해, 분당서울대학교 병원에서 선택 정형외과 수술을 받은 2형 당뇨병(Type 2 diabetes mellitus: T2DM) 환자(n=9; 4 명의 남성 및 5 명의 여성)와 비당뇨병 정상 대조군

(n=9; 5 명의 남성 및 4 명의 여성)을 선별하였다. 미국 당뇨병 협회(American diabetes association: ADA) 기준에 따라 당뇨병으로 진단된 T2DM 환자를 선별하였다. 대조군도 동일한 ADA 기준에 따라 선별하였다. 모든 사람으로부터 서면 동의를 받았고, 본 연구는 헬싱키 선언에 따라 수행되었으며 SNUH[SNUBH IRB # B-0710 / 050-009] 윤리위원회의 승인을 받았다. 연령, 성별, 체질량 지수, 공복 혈당, 및 기타 실험적 수치와 같은 T2DM 환자 및 비 당뇨병 대조군의 특징을 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

	정상군(n=9)	당뇨군(n=9)	p-값
연령	56.4 ± 14.7	61.0 ± 14.8	0.52
성별(남성:여성)	5:4	4:5	
당뇨병 지속 기간		8.4 ± 11.8	
체질량 지수(kg/m ²)	24.7 ± 4.0	27.1 ± 3.7	0.20
수축기 혈압(mm/Hg)	129.2 ± 16.8	136.3 ± 15.1	0.36
확장기 혈압(mm/Hg)	75.3 ± 13.0	77.6 ± 11.2	0.70
공복 혈당(mg/dl)	93.9 ± 7.7	140.6 ± 46.3	<0.01*
헤모글로빈 A1c(%)	5.5 ± 0.3	7.3 ± 1.3	<0.001*
총 콜레스테롤(mg/dl)	177.1 ± 16.8	223.1 ± 68.6	0.07
BUN	14.8 ± 5.4	16.2 ± 6.8	0.62
Cr	1.1 ± 0.4	1.0 ± 0.1	0.41

(데이터는 평균값 ± 표준 편차로 표시, *: p<0.05)

(2) 미토콘드리아의 분리

각 T2DM 환자와 정상 대조군으로부터 골격근 조직을 수득한 후, 수득된 조직을 미토콘드리아 분리 완충액(25 mM Tris-HCl pH7.4 중 250 mM 수크로스 및 1 mM EDTA)에 균질화시켰다. 그 후, 용해물을 1,000g로 원심분리하여 핵 및 세포질성 분획을 분리하고, 세포질성 분획은 4℃에서 10,000g로 더 원심분리하여 조(crude) 미토콘드리아 펠렛을 수득하였다. 분리된 미토콘드리아는 Beckman SW41 로터에서 20000 rpm으로 약 120 분 동안 원심분리하여 10% 내지 40% 퍼콜(percoll) 구배를 통해 더 정제하였다. 구배 중 미토콘드리아 층의 상부 및 하부 분획(각각 P1 및 P3 분획)을 조심스럽게 버렸다. 남은 미토콘드리아 층(P2 분획)을 2회 세척하고, 분리된 미토콘드리아는 사용할 때까지 -70℃에서 보관하였다.

(3) 미토콘드리아 단백질 및 펩티드의 준비

미토콘드리아 생리와 밀접한 관련이 있는 막 단백질을 검출하기 위해, 골격근 조직으로부터 분리된 미토콘드리아를 pH 7.6의 Tris HCl 중 4%(w/v) SDS 용해 완충액에 용해시키고, 그 용액을 2 mm 유리 비드가 함유된 1.5 ml e-tube로 옮겼다. 미토콘드리아 함유 용액을 Mini-BeadBeaterTM 분쇄기(Cole-Parmer Instrument, Vernon Hills, IL)로 1,000 rpm에서 30초 동안 반복 스트로크로 파쇄하고 1 분 동안 얼음으로 냉각시켰다. 이 과정을 펠렛이 보이지 않을 때까지 반복하였다 (약 10 내지 15회). 상층액을 새 튜브로 옮기고 20℃에서 10 분 동안 5,000 rpm으로 원심분리하여 잔해물을 제거하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, Q55 소니케이터(Qsonica, Newtown, CT)를 사용하여 30 초 동안 초음파처리하고, 1 분 동안 냉각시켰다. 초음파 용해를 얼음에서 10 회 반복하였다. 용해물을 20℃에서 14,000g으로 10 분 동안 원심분리하고, 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, BCA 단백질 분석법(Pierce, Rockford, IL) 및 소 혈청 알부민을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다.

미토콘드리아 펩티드 시료는 변형된 FASP(Filter-aided sample preparation) 방법으로 준비하였다. 간단하게 말하면, 100 µg의 단백질 용해물을 37℃에서 45 분 동안 100 µl의 SDT(0.1 M Tris-HCl, pH 7.6 중 SDS 4%(w/v) SDS 및 0.1 M DTT)에서 환원시킨 후 10 분간 끓여 단백질을 변성시켰다. 10 분 동안 초음파처리 후, 시료를 16,000g에서 5 분간 원심분리하였다. 환원된 단백질 시료를 Microcon 필터 YM-30(Millipore Corporation, Bedford, MA)에서 200 µl의 8 M 우레아와 혼합하고, 필터를 14,000g에서 60 분 동안 원심분리하였다. 모든 원심 분리 단계는 20℃에서 수행하였다. 잔여 SDS를 제거하기 위해 0.1 M Tris-HCl(pH 8.5) 중 200 µl의 8 M 우레아를 필터에 가한 후 필터를 14,000g에서 원심분리하였다. 이 세척 단계를 2 회 반복 하였다. 그 후, 알킬화를 위해 농축물에 0.1M Tris-HCl 중 8 M 요소의 50 mM 요오드아세트아미드 100 µl를 가하고 암실에서 25℃에서 25 분 동안 알킬화시킨 후 14,000g에서 30 분 동안 원심분리하여 알킬화 시약을 제거하였다. 얻어진 시료를 0.1 M

Tris-HCl 중 8 M 우레아 200 μ l로 2 회 세척한 다음, 100 μ l의 50 mM NH_4HCO_3 로 2 회 세척하였다. 알킬화된 단백질 시료를 37°C에서 1 분 동안 600 rpm으로 트립신(1:50 효소 대 단백질의 비(w/w), Promega, Madison, WI)을 사용하여 단백질가수분해로 절단시킨 후, thermo-mixer comfort(Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 교반하지 않고 12 시간 동안 밤새 인큐베이션하였다. 두번째 트립신 절단(1:100 효소 대 단백질의 비)를 6 시간 동안 수행하였다. 절단된 펩티드는 14,000g에서 20 분 동안 원심분리하여 용출시켰다. 필터를 60 μ l의 50 mM NH_4HCO_3 로 더 행구고 14,000g에서 30 분간 원심분리하였다. 용리액을 첫번째 용리액과 혼합하였다. 펩티드 시료를 진공농축기 SPD1010 (Thermo, San Jose, CA)에서 건조시키고 -80°C에서 보관하였다.

[0046] (4) LC-MS/MS 분석

[0047] 9명의 T2DM 환자 및 9명의 비당뇨병 대조군으로부터 얻어진 미토콘드리아 단백질 시료 각각에 LC-MS/MS 실험을 3회 반복하여, 54 (18×3) LC-MS/MS 데이터세트를 얻었다.

[0048] 구체적으로, 펩티드를 nanoACQUITY UPLC 시스템의 변형된 버전을 이용하여 분리하였다. 분석 컬럼(75 mm ID×360 mm OD×70 cm 길이)은 아세토니트릴 슬러리를 사용하여 C18 물질(3 mm 직경, 300 Å 포어 크기, Jupiter, Phenomenex, Torrance, CA)로 융합-실리카 모세관(Polymicro Technologies, Phoenix, AZ)을 패키징하여 사내에서 제조하였다. 고체상 추출(solid phase extraction: SPE) 컬럼은 동일한 C18 물질을 내부 감속기(1/16" 내지 1/32", VICI, Houston, TX)의 1 cm 길이의 선형 컬럼(250 mm ID)에 패키징하여 제조하였다. 컬럼 온도는 semi-rigid 가솔린 히터(1/4 "ID, 60cm 길이, WATLOW, Winona, MN)를 사용하여 50°C로 설정하였다. LC 분리 구배는 98%(v/v) 용매 A(H_2O 중 0.1% 포름산)에서 5분, 2%(v/v) 내지 50%(v/v)의 용매 B(99.9% 아세토니트릴 중 0.1% 포름산)에서 115분, 50% 내지 80%(v/v)의 용매 B에서 10 분, 및 80%의 용매 B에서 10분이었다. 이동상의 유속은 400 nL/분으로 설정하였다. 7-테슬라 푸리에 변환 이온 사이클로트론 공명 질량 분석기(FTICR, LTQ-FT, Thermo Electron, San Jose, CA)를 사용하여 질량 스펙트럼을 수집하였다. LC로부터 용출된 펩티드는 2.0 kV의 전자분사 전위에서 이온화하였다. 전자분사 이온화(electrospray ionization: ESI)는 융합-실리카 모세관 이미터(emitter)(20 mm ID×150 mm OD)의 화학적 에칭으로 제조하였다. 탈용매 모세관의 온도는 250°C로 설정하였다. MS 전구체 이온 스캔(m/z 500-2,000)은 1×10^6 의 AGC 표적 값, 1×10^5 의 질량 분해능 및 500 ms의 최대 이온 축적 시간으로 전체 프로파일 모드에서 획득하였다. 질량 분석기는 데이터-의존성 탠덤 MS 모드에서 작동시키고, 전구체 MS 스캔에서 검출된 7 개의 가장 풍부한 이온은 동적 배제 옵션을 포함하는 MS/MS 실험에 대해 동적으로 선별하여(배제 질량 범위 하한= 1.10 Th, 배제 질량 범위 상한= 2.10 Th; 배제 목록 크기= 120; 및 배제 지속시간= 30초) 동일한 펩티드의 MS/MS 스펙트럼의 재수득을 방지하였다. 전구체 이온의 충돌-유도된 해리는 각각 35% 및 3 Th으로 설정된 충돌 에너지 및 분리 폭을 갖는 이온 트랩(LTQ)에서 수행하였다. Xcalibur 소프트웨어 패키지(v. 2.0 SR2, Thermo Electron)를 사용하여 실험 방법을 구축하였다. 모든 LC-MS/MS 데이터는 데이터세트 식별자 PXD004312 및 10.6019/PXD004312(사용자명: reviewer16736@ebi.ac.uk, 비밀번호: F64K10U7)를 갖는 PRIDE 파트너 저장소를 통해 ProteomeXchange 컨소시엄에 기탁하였다.

[0049] (5) 펩티드의 식별

[0050] 얻어진 LC-MS/MS 데이터세트에 대해, 탠덤 질량 분석 데이터에 정확한 전구체 (precursor) 질량을 할당하기 위해 iPE-MMR(integrated post experiment monoisotopic mass refinement) 분석 방법을 적용하였다. 간단히 말하면, DeconMSn을 사용하여 전구체 질량을 더 보정하고 PE-MMR을 통해 개선한 MS/MS 데이터(DTA 파일)를 생성하였다. 얻어진 질량-개선된 DTA 파일은 DTARefinery를 이용하여 다변량 질량 오류 교정을 하였다. DTA 파일은 사내 소프트웨어를 이용하여 mgf 파일로 변환하였다. 얻어진 mgf 파일은 UniProt 인간 참조 데이터베이스(2014년 4월, 88,608 항목) 및 179 일반 오염물질의 순방향 및 역방향 단백질 서열을 포함한 복합 표적-디코이(decoy) 데이터베이스에 대한 MS-GF+ (9881 버전)을 이용한 데이터베이스 검색에 이용하였다. MS-GF+ 검색은 하기 파라미터로 수행하였다: 10 ppm의 전구체 질량 허용치(tolerance), 세미(semi)-트립신, 시스템에 대한 카바아미도 메틸화(57.021460Da)의 정적 변형, 및 N-말단에서 메티오닌 및 카르바미드(43.005810Da)에 대한 산화(15.994920Da)의 가변성 변형. 스펙트럼 일치(peptide spectrum match: PSM)는 1%의 오류 발견 비율(false discovery rate: FDR)을 이용하여 수득하였다.

[0051] (6) 펩티드 동정을 위한 MS 강도의 지정

[0052] MS 강도-기반의 무표지 정량 분석법을 LC-MS/MS 데이터세트에 적용하여, 식별된 펩티드를 고유 질량 분류(unique mass class: UMC)에 따라 분류하였다.

- [0053] 간단히 말하면, PE-MMR 분석 동안, LC-MS/MS 실험에서 LC 용출 시간의 기간 동안 출현된 펩티드의 MS 특징은 고유 질량 분류(unique mass class: UMC)로 그룹화하였다. 각 UMC는 전하 상태, 존재도(abundance), 스캔 횟수, 및 측정된 단일동위원소 질량과 같은, 펩티드의 모든 질량 스펙트럼 특성을 포함하였다. 펩티드는 UMC로 대표된다. 각 UMC에 대해, UMC 질량은 모든 UMC 구성요소의 단일동위원소 질량의 강도 가중 평균으로 산출하였고, UMC의 모든 스펙트럼 구성요소에 대한 존재도의 총계(UMC 강도)를 산출하여 상응하는 펩티드의 존재도로 표시하였다. PE-MMR 분석 동안, MS/MS 스펙트럼의 전구체 질량(또는 DTA 파일)은 UMC 질량과 매칭하고 매칭이 확인될 경우 UMC 질량으로 대체하였다. 이 과정에서, DTA 정보는 매칭된 UMC에 링크시켰다. 링크된 DTA 파일이 MS-GF+ 검색 및 표적-디코이 분석 후 $FDR \leq 1\%$ 의 펩티드 서열로 된 경우, 펩티드 ID를 UMC에 기록하고 UMC 강도를 펩티드 ID에 지정하였다. 상이한 LC/MS 실험에서 동일한 펩티드의 LC 용출 시간 편차를 최소화하기 위해, 정규화된 용출 시간(normalized elution time: NET)을 동정된 UMC에 대해 산출하였다.
- [0054] **2. 세포질잡종 세포에서 유래된 미토콘드리아 단백질의 고유 질량 분류의 동정**
- [0055] 야생형 세포질잡종(cybrid) 세포를 Chae S et al., Sci. Signal 2013; 6(264): rs4에 기재된 바와 같이 준비하였다. 실시예 1. (2) 및 (3)에 기재된 바와 같이, 세포질잡종 세포로부터 미토콘드리아를 분리하였다.
- [0056] 분리된 미토콘드리아에 대해 오프겔(offgel) 전기영동으로 미토콘드리아 펩티드의 분획하였다. 구체적으로, 세포질잡종 세포의 P2 미토콘드리아 분획으로부터의 500 μ g의 트립신 절단 펩티드를 제조자의 프로토콜에 따라 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)로 분획하여, 오프겔 분획을 26 분획으로 수행하였다. 24 웰의 트레이를 3 내지 10 범위의 선형 pH 구배(Immobiline DryStrip, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)의 24 cm IPG 겔 스트립으로 사용하였고, 겔 스트립을 웰 당 25 mL의 재수화 용액으로 15 분 동안 재수화하였다. 트립신 절단 펩티드를 0.72 mL 탈이온화된 물에 용해시키고 2.88 mL의 offgel 스톱 용액과 혼합하였다. 각 웰에, 150 mL의 얻어진 용액을 로딩하였다. 포커싱은 20°C에서 500 내지 8,000 V의 전압 범위 및 50 kVh에서 50 mA의 최대 전류로 수행하였다. 포커싱 후, 여분의 산(양극 말단) 및 여분 염기(음극 말단) 분획뿐만 아니라, 24 웰로부터 펩티드 분획을 수집하였다. 글리세롤을 제거하기 위해, 스핀 탈염 컬럼을 사용하였다. 그후, 펩티드를 진공 농축기로 건조시켰다.
- [0057] 수득된 오프겔 분획을 실시예 1.1(4) 내지 (6)에 따라 LC-MS/MS 분석하고, 펩티드를 식별한 후 식별된 펩티드를 UMC에 따라 분류하였다.
- [0058] **3. 미토콘드리아 마스터 정밀 질량 및 시간 태그(accurate mass and time tag: AMT) 데이터베이스(database: DB)의 구축 및 시료간 펩티드의 정렬**
- [0059] 80 개의 LC-MS/MS 데이터세트 모두(18개 시료의 3회 반복의 LC-MS/MS 실험 및 오프겔 분획의 26 LC-MS/MS 실험)의 펩티드 ID를 갖는 UMC의 정보를 마스터 AMT DB에 편집하였다(Oracle Database 10g Enterprise Edition Release 10.2.0.1.0; 도 1a). 단일동위원소 질량 및 NET가 실험적으로 결정된 고유한 펩티드인 AMT의 집합이다. 펩티드를 여러번 측정된 경우, 각 AMT마다 NET의 평균 질량과 중앙값을 기록하였다. 이 과정으로 42,132 펩티드(또는 AMT)를 포함하는 마스터 DB를 얻었다(도 1b의 각 점).
- [0060] 현재의 단백질 분석 플랫폼을 언더샘플링(undersampling) 때문에, LC-MS/MS 실험에서 UMCs의 큰 부분은 MS/MS 실험과 단백질 데이터베이스 검색에 의해 식별되지 않았다. 예를 들어, 개별 LC-MS/MS 데이터세트로부터, 42,132 개의 UMC가 MS 스펙트럼에서 측정되었고, 그중 5,602 UMC가 단백질 데이터베이스 검색에 의해 식별되었다(UMC로 식별됨; 도 1c).
- [0061] MS 스캔에서 검출되었지만 MS/MS 분석의 기회가 없는 펩티드 이온, 또는 단편화되었으나 품질이 낮은 이온은 이러한 미식별 UMC의 주요 원인이다. 미식별된 UMC(도 1c의 빨간색 점)에 펩티드 ID를 배정하기 위해, 질량 및 NET 허용치(즉, 각 ± 10 ppm, ± 0.025 NET, 도 1d) 하에서 마스터 AMT DB와 일치시켰다. 식별되지 않은 UMC에 펩티드 ID를 배정하는 과정은 마스터 AMT DB 정보에 의해 식별된 3,363 개의 추가 UMC로 되고, 이에 의해 펩티드 ID 배정을 가진 UMC의 총 개수를 8,965개(배정된 UMC)로 증가하였다.
- [0062] 시료간 식별된 펩티드를 정렬하기 위해, 마스터 AMT DB를 이용하여, 펩타이드 ID에 미식별된 UMC를 배정한 후, 54 개의 LC-MS/MS 데이터세트(즉, 18 개의 개별 미토콘드리아 펩티드 시료의 3회 반복 LC-MS/MS 데이터세트)로부터 배정된 결과를 각 열이 각 LC-MS/MS 실험으로부터 UMC 강도에 상응하는 펩티드 ID를 포함한 정렬 테이블에 조합하였다. 정렬된 데이터의 사분위수(Quantile) 정규화를 수행하여 개별 LC-MS/MS 데이터세트들 간의 펩티드 존재도(abundance)의 시스템상 편차를 보정하였다.

[0063] 마스터 AMT DB의 42,132 개의 펩타이드 중, T2DM($n \geq 5$) 및 대조군($n \geq 5$) 시료의 절반 이상에서 검출된 7,635 개의 펩티드를 선별하고, 1,711 개의 단백질에 맵핑하였다. 이들 중, 높은 신뢰도를 갖는 미토콘드리아 단백질로 2개 이상의 형제 펩티드를 가진 1,171개의 단백질(1,150 개의 단백질-코딩 유전자)을 선별하였다.

[0064] 4. 미토콘드리아 단백질의 분석

[0065] T2DM 환자와 비당뇨병 대조군 간에 차등 발현된 단백질을 확인하기 위해, 우선 1) 해당 단백질이 2 개 이상의 비중복 펩티드를 갖는 펩티드 세트를 선별하였다. 2) 통계적 예측력(statistical power)을 높이기 위해, 각 그룹의 모든 개체의 50% 이상에서 검출된 펩티드 세트를 선별하였다. 이 선별된 펩티드에 대해, 스튜던트 t-검정과 $\log_2$ -중양값 비율 검정을 통합한 통계적 가설 검정을 수행하였다.

[0066] 간단히 말해, 선별된 펩티드에 대해, 1) 스튜던트 t-검정과 $\log_2$ -중양값 비율 검정을 적용하여 T-값 및 $\log_2$ -중양값 비율을 계산하고, 2) 이전에 기재된 무작위 순열 실험으로부터 추정된 2 가지 검정에 대한 경험적 영점(null) 분포를 이용하여 각 펩티드에 대한 보정된 T-값 및 $\log_2$ -중양값 비율을 산출하고, 3) 각 펩타이드에 대해 Stouffer 방법을 이용하여 2가지 검정으로부터 보정된 P-값을 통합하고, 4) Storey의 방법을 이용하여 통합된 P-값에 대한 FDR을 계산한 후 $FDR \leq 0.1$ 및 발현 비율 ≥ 1.5 배를 만족하는 차등 발현된 펩티드를 선별한 후, 차등 발현된 펩티드를 포함하는 단백질 군을 (differentially expressed DEP)를 선별하였다. 또한, DEP와 관련된 세포 기능을 이해하기 위해, 세포 내 기능 농축 분석 툴인 DAVID 소프트웨어를 사용하여 DEP에 의해 대표되는 세포 내 기작 (GOBP)을 확인하였다. DEP에 의해 변화를 보이는 GOBP는 $P \leq 0.05$ 인 기작들을 선별하였다.

[0067] 5. 골격근 유래 단백질의 특성

[0068] 골조직 유래 미토콘드리아 단백질의 포괄성을 평가하기 위해, 이전 논문에서 보고된 가장 포괄적인 마우스 및 인간 미토콘드리아 단백질체와 1,150 개의 단백질을 비교하였다. Pagliarini et al., Cell 2008; 134(1): 112-23 은 1) 14 마리의 마우스 조직으로부터 분리된 미토콘드리아의 LC-MS/MS 프로파일, 2) 이전 문헌에서 보고된 미토콘드리아 단백질, 및 3) GFP 태그 현미경 데이터의 통합 분석으로부터 유래된 1,098개의 단백질-코딩 유전자의 미토콘드리아 개요를 제공했다. 1,098 개의 유전자는 Mouse Genome Informatics 데이터베이스의 인간-마우스 이종상동성(orthology) 정보를 기반으로 1,012 개의 인간 이종상동성을 맵핑하였다. Lefort et al., J Proteomics 2009; 72(6): 1046-60은 인간 골격근으로부터 분리된 미토콘드리아의 단백체를 프로파일링한 후 823 개의 단백질을 규명했으며, 803 개의 단백질-코딩 유전자에 맵핑하였다. 비교 결과, 1,150 개의 미토콘드리아 단백질-코딩 유전자는 각각 14 개의 마우스 조직과 인간 골격 근육 조직에서 확인된 397개(1,012개의 39.2 %)와 481개(803개의 60.0%)의 단백질-코딩 유전자(총 558 개)를 포함하였다(도 2a). 1,150개의 단백질-코딩 유전자 중 나머지 592개는 2개의 이전 미토콘드리아 단백질체에서 보고되지 않았다.

[0069] 미토콘드리아 단백질의 특징을 이해하기 위해, Gene Ontology Cellular Components(GOCCs)에 기반하여 1,150개의 단백질의 세포내 위치를 조사하였다. 가장 많은 수의 단백질(1,150개 중 455 개; 39.6 %)이 미토콘드리아에 위치하고, 원형질막과 세포질/세포골격이 그 다음으로 나타났다(도 2b). LC-MS / MS에 의해 검출된 미토콘드리아 단백질체의 비교는 GOCC에 기반하여 미토콘드리아로 주석된 단백질의 분획(39.6%)이 앞서 언급한 Pagliarini et al. 및 Lefort et al.에서 보고된 바와 유사한 것으로 나타났다. 또한, 미토콘드리아 455개 단백질의 위치 분포는 미토콘드리아 외막(outer membrane) 및 내막(inner membrane)에서 내부 막 공간(intermembrane space) 및 미토콘드리아 기질(matrix)에 이르는, 하위-미토콘드리아 구획의 전체 스펙트럼에 위치한 단백질을 포함하는 것으로 나타났다(도 2c). 다음으로, DAVID 소프트웨어를 이용하여 Gene Ontology Biological Processes (GOBP)의 농축(enrichment) 분석을 수행하여 1,150개의 단백질에 의해 대표되는 세포 내 기능을 조사하였다. 미토콘드리아 단백질체에 의해 유의하게($P < 0.05$) 나타나는 세포 과정은 산화성 인산화(oxidative phosphorylation: OXPHOS), 해당과정(glycolysis) 트리카르복시산(tricarboxylic acid: TCA) 사이클, 미토콘드리아 조직(organization)/수송, 지방산 베타-산화, 산화적 스트레스에 대한 반응, 및 번역과 같은, 골격근에서 T2DM-연관 미토콘드리아 기능에 관련된 과정을 포함한다(도 2d). OXPHOS 복합체의 경우, 단백질체는 미토콘드리아 또는 핵-암호화된 OXPHOS 단백질(도 2f)과 관계없이, 5 개 복합체 모두에서 단백질체의 포괄적인 커버리지(48 내지 100%)를 제공하였다(도 2e). 이러한 데이터는 포괄성 외에, 미토콘드리아 단백질체가 하부-미토콘드리아 구획에서 발생하는 다양한 병리학적 과정에 관여하는 광범위한 미토콘드리아 프로테옴을 제공한다는 것을 확인한다.

[0070] 6. T2DM에서 변화된 골격근의 미토콘드리아 단백질

[0071] 골격근에서, T2DM는 미토콘드리아 단백질체의 존재도에서의 변화를 수반한 미토콘드리아 이상과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 존재도가 비당뇨병 대조군과 비교하여 T2DM에서 변화한 미토콘드리아 단백질을 식별하기 위

해, 54 LC-MS/MS 데이터세트(9명의 T2DM 환자에 대해 27개 및 9명의 비당뇨병성 대조군에 대해 27개)에서 측정된 펩티드를 정렬한 후, 실시예 1.3에 기재된 바와 같이 T2DM과 비당뇨병성 대조군 간에 차등발현된 523개의 펩티드를 식별하였다.

[0072] 523개의 펩티드를 포함하는 335개 단백질을 T2DM과 비당뇨병성 대조군 간의 차등발현된 단백질(differentially expressed protein: DEP)로 선별하였다. 335개의 DEP 중, 135개의 단백질이 비당뇨병 대조군과 비교하여 T2DM에서 상향조절되었고, 200개의 단백질이 하향조절되었다(도 3a). DEP와 T2DM의 기능적 연관성을 이해하기 위해, DAVID 소프트웨어를 이용하여 상향 및 하향 조절된 단백질이 나타내는 세포 내 기작을 확인하였다.

[0073] 이 분석 결과 135개의 상향조절된 단백질은 주로 분자 수송 (칼슘 이온 수송, 단백질 수송, 및 칼슘 이온 항상성)과 세포골격 조직(근육 수축, 액틴 필라멘트-기반 과정, 및 액틴 세포골격 조직)(도 3b), 분자 수송 및 세포골격 조직과 관련된 과정에 주로 관련된다는 것을 나타내었고, 이는 분자 수송 및 세포골격 조직(cytoskeleton organization)이 T2DM 병인에 관여되어 있다는 이전 연구 결과와 일치한다. 반면에, 200개의 하향조절된 단백질은 포도당 대사 (해당 과정), 지방산 대사 과정(지방산 베타-산화) 및 TCA회로와 같이 대사 과정에 주로 관여하였으며, 이는 T2DM 병인에 크게 기여할 수 있다(도 3c). 특히, 상향조절된 단백질과 하향조절된 단백질(각각 6개와 16개의 단백질) 모두가 유의하게 OXPHOS를 나타냈다. OXPHOS 단백질의 상반되는 변화 패턴은 이전 연구에서 OXPHOS 유전자에 대해 발견된 패턴과 일치했다.

[0074] T2DM-관련 프로세스의 총괄적인 기능을 탐색하기 위해, 분자 수송, 대사, 및 세포골격 조직과 관련된 GOBP에 수반된 DEP들간의 상호작용을 설명하는 네트워크 모델 분석을 수행하였다. 구체적으로, DEP에 대한 네트워크 모델 분석을 위해, DEP에 의해 대표되는 T2DM-관련 GOBP에 속하는 DEP중 일부를 선별한 다음, 4 개의 단백질-단백질 상호작용체(interactome) 데이터베이스로부터 선별된 DEP에 대한 단백질-단백질 상호작용 정보를 수집하였다: BIND (Biomolecular Interaction Network Database), HPRD (Human Protein Reference Database), BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets), 및 MINT (Molecular INTERaction Database). 초기 네트워크 모델은 시각화 툴인Cytoscape를 이용하여 선별된 DEP와 상호작용 정보로 구축하였다. 그후 각 단백질과 연관된 GOBP및 세포 내 신호경로에 따라 노드(node)를 배열하여 유사한 기능을 가진 노드가 가까이 배치되도록 하였다. 동일한 GOBP와 관련된 노드들의 그룹은 상응하는 GOBP로 라벨링하였다. 재구성된 네트워크 모델은 도 3d 및 도 3e에 나타내었다. 도 3d의 네트워크 모델은, 해당과정 경로(HK1, GPI, PGM1, ENO3, 및 PKM), TCA 사이클 (ACO2, IDH3A, OGDH, DLST, SUCLA2, SDHA, FH, 및 MDH1), 및 지방산 β산화(ACADM, DECR1, ECH1, HADH, 및 HADHB) 관련 단백질들의 발현이 T2DM에서 비당뇨병 대조군에 비해 유의하게 하향조절되었다는 것을 나타낸다. 이러한 경로의 하향조절과 뿐만아니라, 포도당 및 아스파르산염(SLC25A12), 피루베이트(MCP1/2), 말산염 및 α-케토글루타르산염(SLC25A11), 및 지방산(ACSL1과 CPT1B/2)의 수송도 T2DM에서 하향조절되었는 것을 나타낸다. 또한, 5개의 OXPHOS 복합체의 단백질은 T2DM에서 크게 하향조절되는 반면, 여러 단백질(ATP50 및 NDUFA6/A7/A12/AB1/S6)이 역으로 상향조절되어, T2DM에서 OXPHOS 시스템의 복잡한 변화 패턴을 시사한다. 또한, 미토콘드리아 단백질 수송(TIMM44)은 분자 샤프론(HSPA1A/D1)와 함께, T2DM에서 하향조절되었다. 또한, 네트워크 모델은 칼슘 (MICU1 및 VDAC1/3) 및 ATP 수송 (SLC25A4 및 VDAC1/3)의 하향 조절을 또한 나타내었다. 총괄하면, 네트워크 모델에서 이러한 주요 미토콘드리아 대사과정의 하향 조절은 비당뇨병 대조군에 비해 T2DM에서 미토콘드리아 대사의 전반적인 활성이 감소되어있다는 것을 나타낸다.

[0075] 한편, 도 3e에 도시된 네트워크 모델은 원래 소포체 (ER)와 관련된 것으로 보고된 몇몇 과정의 상향 조절을 나타내었다: ER 칼슘 수송 (RYR1 및 ATP2A1/A3) (도 3e의 위) 및 ER폴딩되지 않은 단백질 반응 (PDIA3/4 및 ERP29) 및 소포-매개 단백질 수송 (SORT1, RAB1A/10, STX7, 및 COPB1)(도 3e의 중간). T2DM에서 상향 조절된 미토콘드리아 단백질로 대표되는 이러한 ER 세포 과정은 T2DM에서 미토콘드리아 기능과 ER의 잠재적 연관성을 의미한다.

[0076] 도 3e의 네트워크 모델은 비당뇨병 대조군에 비해 T2DM에서 세포골격 구성 경로(ITGB1, RHOA, MYLPPF, DOCK2, PDLIM3, ACTN4, DES, DYNC1H1 및 TPM1)의 상향 조절을 보인 반면, 경로의 여러 분자(FINA, ACTA1/C1, ACTN2, 및 TNNC1)는 역으로 하향조절되었다.

[0077] 최근, 미토콘드리아의 서브세트가 ER과 밀접한 관계가 있으며, 미토콘드리아-연관 ER 막(mitochondria-associated ER membrane: MAM)이라고 불리는 경계면을 형성하고, 병리학적 조건 하에서 미토콘드리아 기능이 감소된 경우 MAM의 기능이 증가하는 것으로 보고되었다. 여러 연구에서 이전에 보고된 MAM 단백질 중에서, 이들 중 상당 부분(40.1 %; 이전 MAM 단백질 37개 중 15개)이 미토콘드리아의 단백질체에서 검출되었다. 이러한 데이터는 실시예 1.1에서 준비된 미토콘드리아 시료가 MAM를 포함하고, 상향 조절된 MAM 단백질(도 3e)은 또한 T2DM-

연관 미토콘드리아의 기능을 나타내는 미토콘드리아 프로파일로 사용할 수 있는 것을 나타낸다.

[0078] **7. T2DM 병태생리를 나타내는 미토콘드리아 단백질 프로파일**

[0079] T2DM에 걸린 인간 개체와 설치류의 골격근에서, 미토콘드리아 기능이상은 인슐린 저항성 상태로 관찰되었다. 기능이상은 손상된 OXPHOS, 해당과정, 및 TCA주기와 관련되어 있고, 비당뇨병 대조군에 비해 T2DM에서 이러한 과정의 하향조절과 일치한다(도 3c 내지 도 3d). 이 데이터에 기반하여, T2DM-관련 미토콘드리아 기능을 나타내는 미토콘드리아 단백질 프로파일로서, 처음에 하향조절된 OXPHOS에 대한 하기 대표적인 단백질을 선별하였다: 1-2) 하향조절된 NDUFS3 (복합체 I) 및 COX2 (복합체 IV). 이러한 하향조절된 과정과 달리, 상향조절된 세포 과정의 기전적 연결고리는 불분명했다(도 3e).

[0080] 반면에, 미토콘드리아 기능이상은 손상된 칼슘 수송과 연결되어, 그후 이는 MAM에서 칼슘 항상성을 변화시킬수 있는 것으로 나타났다. 이와 동일하게, 도 3e의 네트워크 모델은 MAM에서 상향조절된 칼슘 수송을 나타내었다.

[0081] 또한, 미토콘드리아 기능이상은 미토콘드리아로의 단백질 수송을 감소시키는 결과를 초래하여, 그 후 MAM 에서 단백질 수송을 변화시키는 것으로 보고되었다. 이와 동일하게, 도 3e의 네트워크 모델은 MAM에서 단백질 수송이 상향조절되는 것을 나타냈다. 이러한 데이터에 기반하여, T2DM-연관 미토콘드리아 기능을 나타내는 추가적인 미토콘드리아 단백질 프로파일로서 칼슘 및 단백질 수송을 위한 하기 대표적인 단백질을 추가로 선별하였다: 3) 칼슘 수송을 위한 상향 조절된 CALR 및 4-5) 단백질 수송을 위한 상향 조절된 SORT1.

[0082] **8. T2DM을 나타내는 선별된 미토콘드리아 단백질 프로파일의 검증**

[0083] 실시예 1.7에 기재된 바와 같이 선별된 단백질의 유효성을 실험적으로 검사하기 위해, 먼저 당뇨병 마우스 모델, 고지방 식이(high fat diet: HFD)-유도 비만 모델에서 웨스턴 블로팅 분석을 이용하여 5종의 선별된 단백질의 차등 발현을 확인했다.

[0084] HFD 마우스(6 주령)에서 체중, 지방량, 혈당 수치, 및 혈중 인슐린 수준이 일반식이 사료를 먹은 생쥐에 비해 현저히 높다는 것을 확인하였다. 면역블로팅 분석을 위해, HFD 마우스의 골격근 조직 및 대조군으로서 정상 식이를 한 마우스의 골격근 조직으로부터 총 용해물 및 조 미토콘드리아를 준비하였다. 총 용해물을 준비하기 위해, 조직을 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 1% NP-40, 및 프로테아제 저해제 콕테일($10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 아프로티닌, $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류페틴 및 1 mM PMSF)을 함유한 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에 용해시켰다. 용해물을 15초 동안 2회 초음파처리하고, 세포 잔해물을 4°C에서 30 분 동안 원심분리(13,000 rpm)으로 제거하였다. 조 미토콘드리아를 준비하기 위해, 조직을 4°C에서 미토콘드리아 분리 완충액(250 mM 수크로스, 25 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA)에 균질화하였다. 그후, 용해물을 1000g에서 원심분리하여 핵 및 세포질성 분획을 분리하고, 세포질성 분획은 4°C에서 10000 g으로 더 원심분리하여 조 미토콘드리아 펠렛을 수득하였다. 펠렛을 단백질 용해 완충액에 용해시켰다. 약 20 내지 30 μg 의 총 용해물 및 조 미토콘드리아를 SDS-PAGE에서 분리하였다. 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 멤브레인(Whatman, Dassel, Germany)에 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 Tris-완충 염수-Tween20 (TBS-T) 중 5% 스킵 밀크로 실온에서 1~2 h 동안 블로킹한 후, 선별된 미토콘드리아 단백질에 대한 특이적 항체로 4°C에서 밤새 탐침하였다. 밴드 강도를 정량하고, 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, LC-MS/MS 데이터와 유사하게, SORT1, CALR, 및 RAB1A는 HFD-마우스의 골격근 조직(도 4a)과 골격근 조직으로부터 분리된 미토콘드리아(도 4b) 모두에서, 정상-식이를 한 마우스의 시료에 비해, 유의하게 상향조절되었다($P < 0.05$). 또한, HFD-마우스의 골격근 조직 및 이로부터 분리된 미토콘드리아(도 4B) 모두에서 COXII와 NDUFS3가 유의하게 하향조절됨을 확인하였다($P < 0.05$).

[0085] 또한, 인간 골격근 조직에서 5종의 선별된 단백질의 차등발현을 확인하기 위해, 실시예 1.1(1)에 기재된 바와 동일한 기준에 근거하여, 14명의 T2DM 환자와 12명의 비 당뇨병 대조군의 독립적인 세트로부터 골격근 조직을 수집하였다. 연령, 성별, 체질량 지수, 공복 혈당, 및 기타 실험적 수치와 같은 T2DM 환자 및 비 당뇨병 대조군의 특징을 하기 표 2에 요약하였다.

표 2

[0086]

	정상군(n=12)	당뇨군(n=14)	p-값
연령	56.1 ± 16.5	70.0 ± 12.8	0.03*
성별(남성:여성)	6:6	3:11	
체질량 지수(kg/m^2)	26.1 ± 2.4	25.0 ± 3.3	0.36
수축기 혈압(mm/Hg)	129.8 ± 9.7	127.2 ± 17.6	0.95

확장기 혈압(mm/Hg)	74.8 ± 8.3	70.6 ± 13.0	0.33
공복 혈당(mg/dl)	100.1 ± 18.3	151.5 ± 65.5	0.01*
헤모글로빈 A1c (%)	5.6 ± 0.3	6.7 ± 1.4	0.02*
총 콜레스테롤 (mg/dl)	186.8 ± 43.9	180.1 ± 42.1	0.69
BUN	14.5 ± 5.5	18.7 ± 6.2	0.08
Cr	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.01*

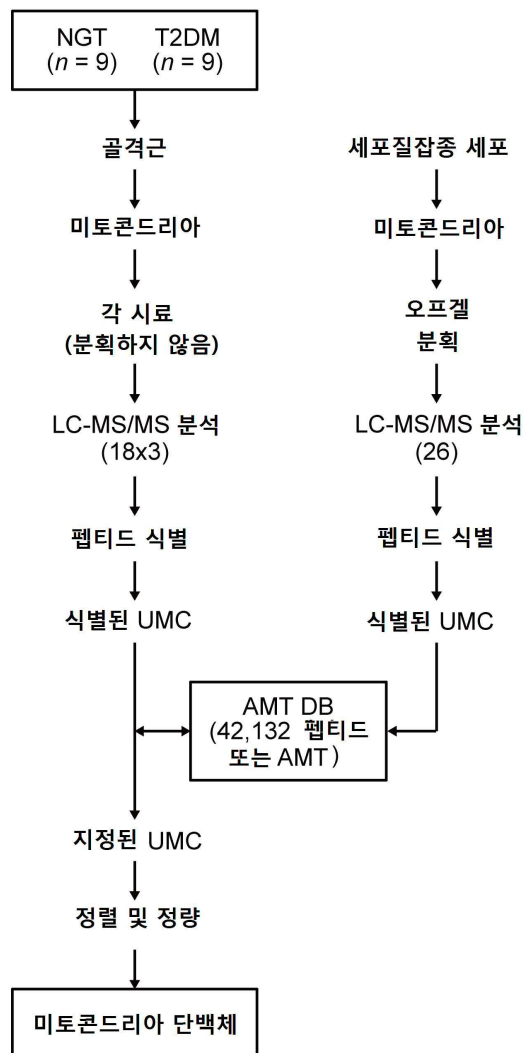
[0087] (데이터는 평균값 ± 표준 편차로 표시, *: p<0.05)

[0088] 수집된 조직으로부터 미토콘드리아를 분리하고, 면역블로팅을 수행한 결과를 도 4c 및 도 4d에 나타내었다. 도 4c 및 도 4d에 나타난 바와 같이, LC-MS/MS 데이터와 유사하게, SORT1, CALR 및 RAB1A는 T2DM 환자의 골격근 조직(도 4c) 및 이로부터 분리된 미토콘드리아(도 4d) 모두에서 유의하게 상향조절된 패턴을 나타내었다(P < 0.05). 이와 유사하게, COX2와 NDUFS3는 비당뇨병 대조군과 비교하여, T2DM 환자의 골격근 조직(도 4c) 및 이의 미토콘드리아(도 4d) 모두에서 유의하게(P < 0.05) 하향조절된 패턴을 나타내었다(P < 0.05).

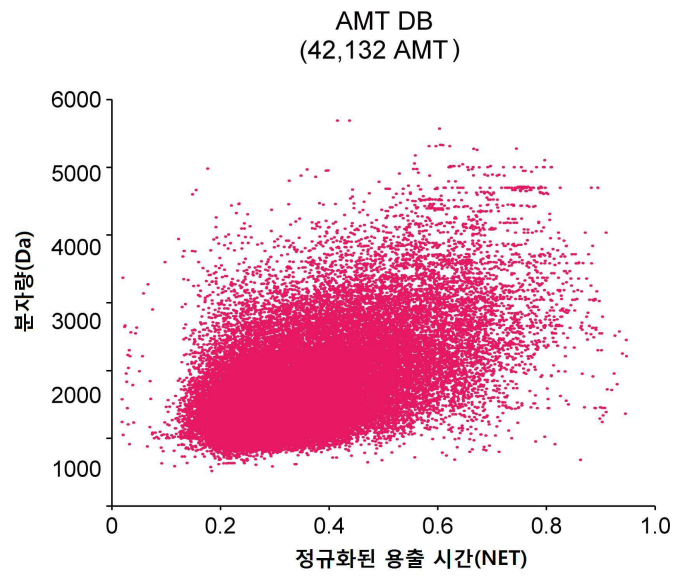
[0089] 따라서, 선별된 미토콘드리아 단백질 프로파일이 미토콘드리아 기능의 T2DM-연관 조절이상, MAM 기능의 상향조절 및 OXPHOS의 하향조절의 표지자로서 작용할 수 있음을 확인하였다.

도면

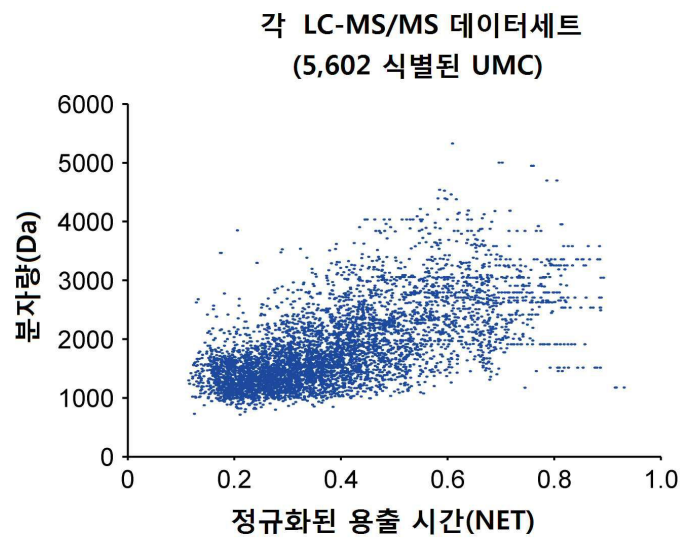
도면1a



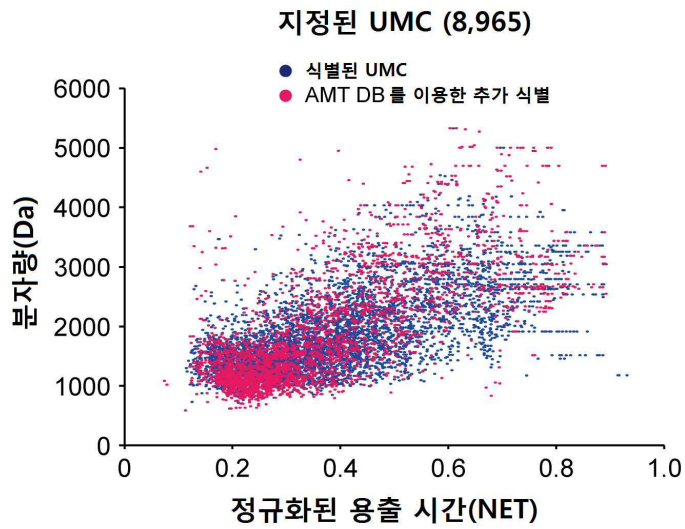
도면1b



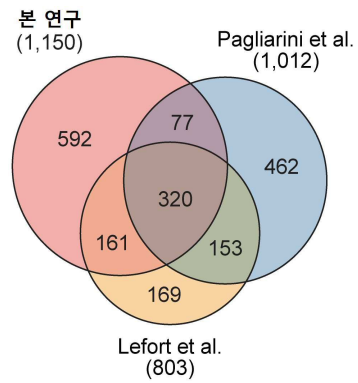
도면1c



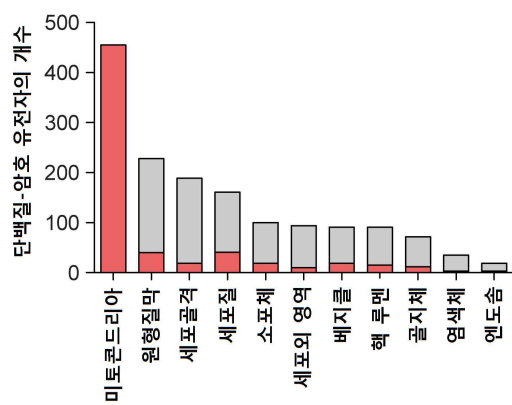
도면1d



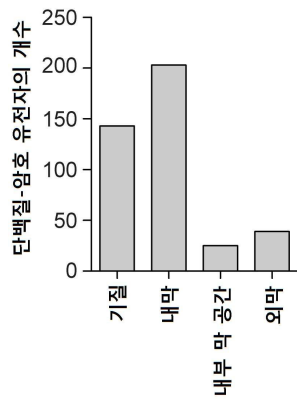
도면2a



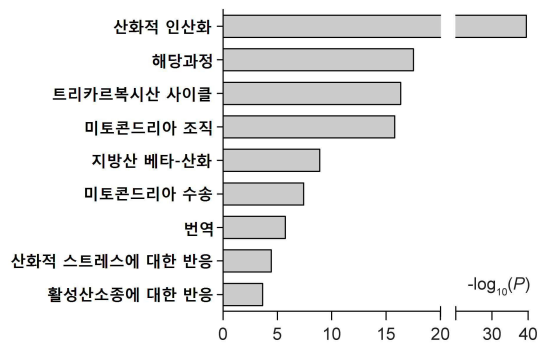
도면2b



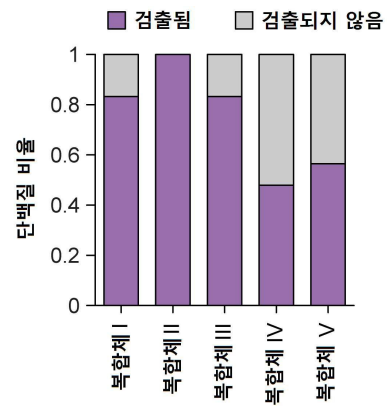
도면2c



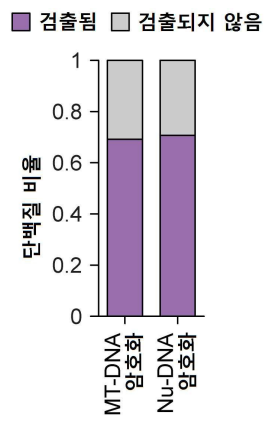
도면2d



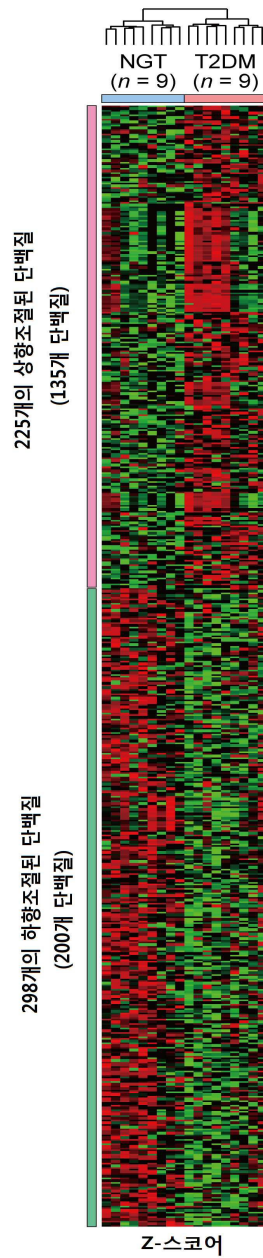
도면2e



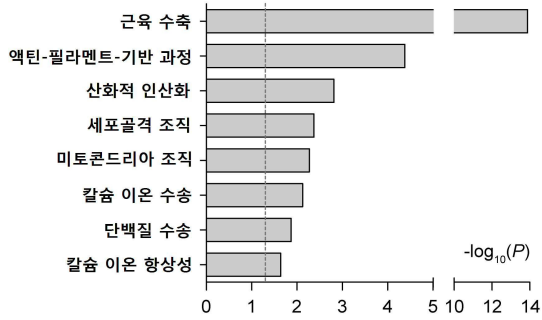
도면2f



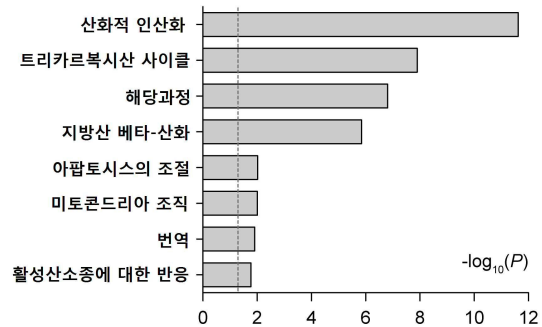
도면3a



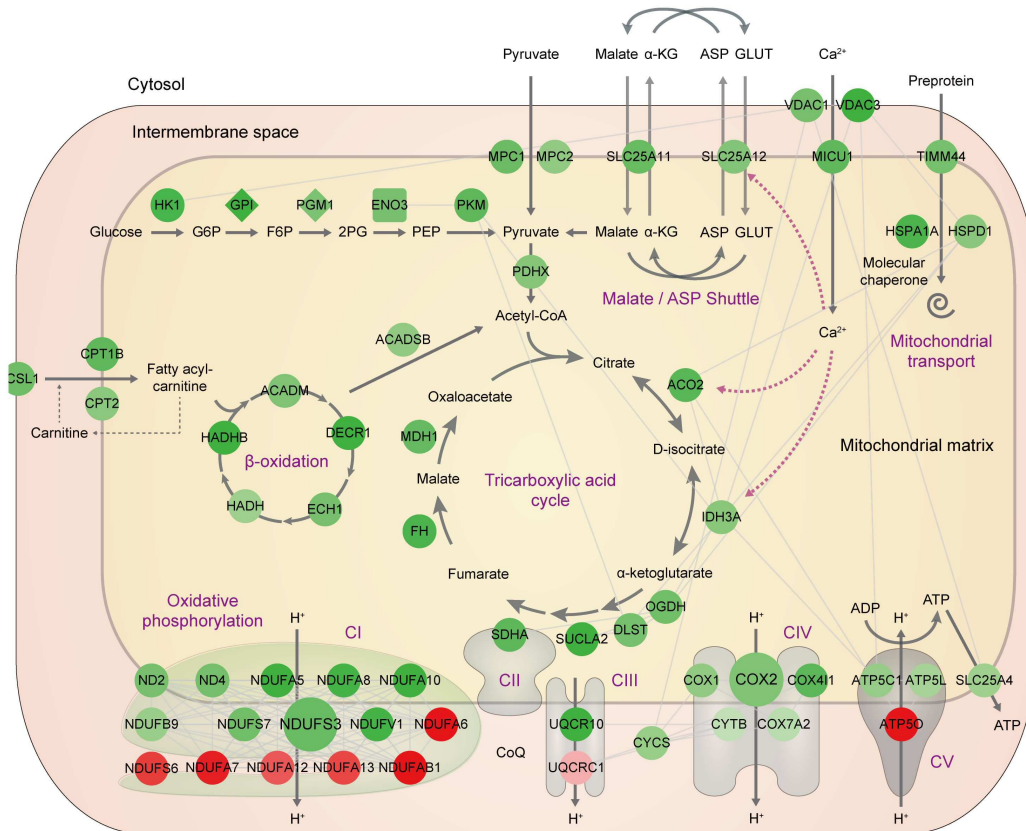
도면3b



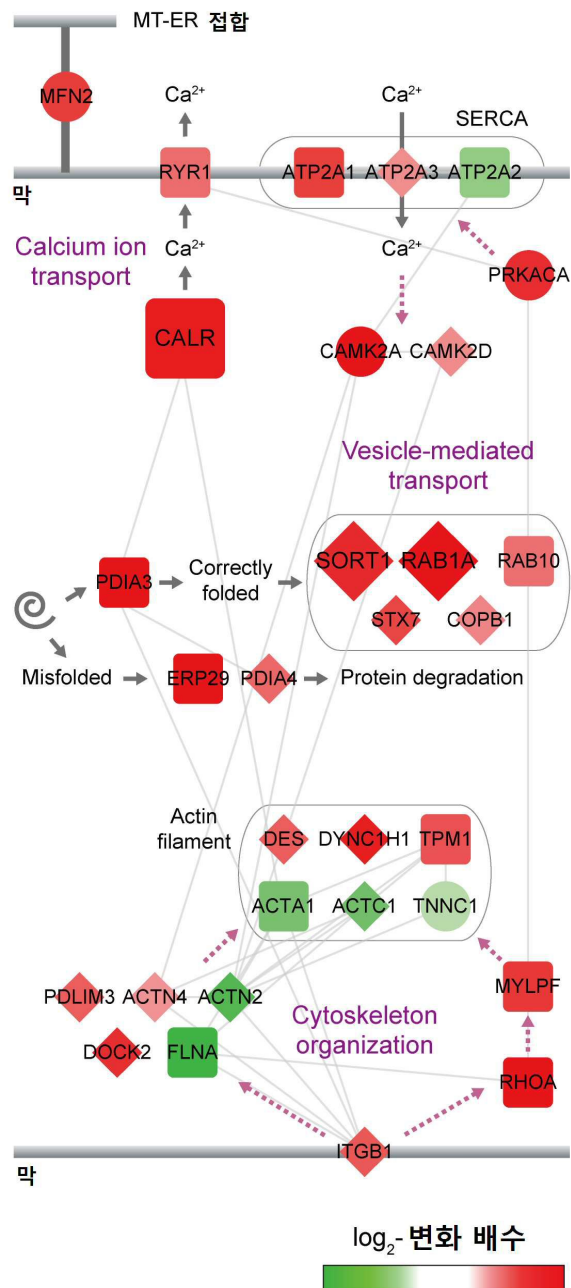
도면3c



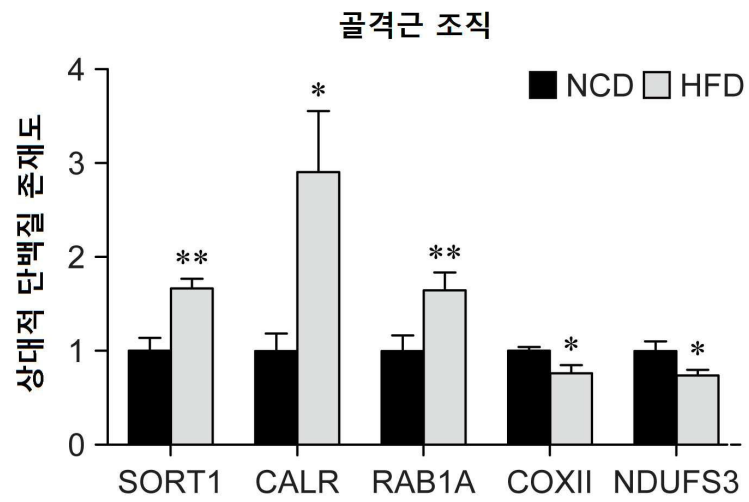
도면3d



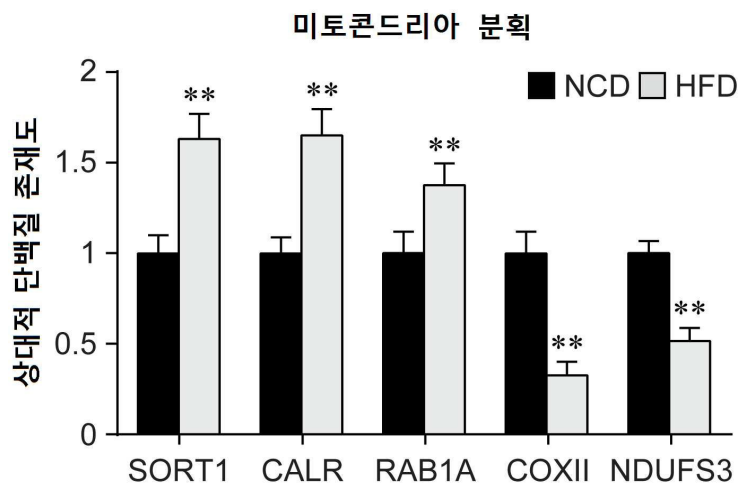
도면3e



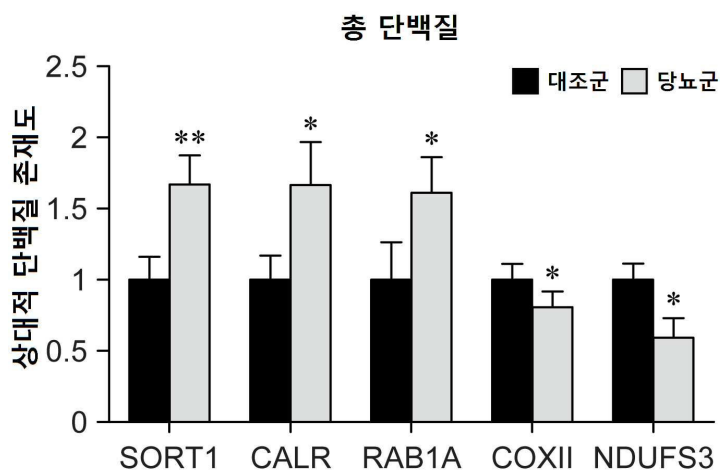
도면4a



도면4b



도면4c



도면4d

