

Multi Targeting을 통한 항 당뇨 효능 탐색

황진택

바이오제론 연구단

Screening of the Antidiabetic Effect Via Multi Targeting

Jin-Taek Hwang

Biogeron Food Technology Research Group

서론

전 세계적으로 약 2억 명 정도가 당뇨병을 앓고 있고, 당뇨로 인한 합병증은 인간의 삶에 있어 막대한 사회적, 경제적 손실을 야기하고 있다(대한당뇨병학회 학술대회, 2008). 이로 인해 우리나라의 경우 20~79세 사이의 당뇨병 환자에게 지불된 의료비는 국민건강보험 총 진료비의 19.25%에 해당하는 비용으로 국가적인 의료비 압박이 심해지고 있는 실정이다(국민건강보험자료, 2003). 특히 서구화된 식습관과 운동 부족으로 인한 당뇨환자는 계속하여 증가하고 있으며, 향후 2020년경에는 14.4%의 국민이 당뇨를 앓을 것으로 추정하였다(건강보험 심사평가원).

따라서 최근에는 막대한 의료비 지출을 막기 위해 당뇨병으로 진행하기 전인 내당 능 장애(공복혈당 100 mg/dl 이상~126 mg/dl 미만) 환자를 타겟으로 한 당뇨예방 소재발굴연구가 전 세계적으로 활발히 이뤄지고 있다.

이처럼 당뇨병이 전 세계적으로 주목받는 이유는 당뇨병은 국가적, 사회적 손실과 더불어 여러 가지 만성 합병증을 유발하여 개인의 삶의 질을 저하시키는 대표적인 요인이 되기 때문이다. 잘 알려진 합병증으로, 당뇨는 혈관질환, 심장질환, 심부전, 뇌졸중 및 말초조직의 괴사 등을 일으키는 심각한 질환을 유발한다.

당뇨병은 크게 두 가지 유형으로 잘 알려져 있는데, 제 1형과 제 2형이 있다. 제 1형은 인슐린 의존성 당뇨병으로서 췌장의 베타세포로



fasting plasma glucose test

oral glucose tolerance test

Fig. 1. Definition of diabetes
(출처: *American Diabetes Association*)

부터 정상인의 경우 적절한 인슐린이 분비되게 되는데, 이 기능이 마비된 것으로 평생 동안 인슐린의 공급을 외부로부터 해 주어야 한다. 제 2형 당뇨병은 절제되지 못한 식습관과 운동부족으로 인해 대표적으로 야기되는 것으로, 대부분의 당뇨병환자가 이에 해당한다(약 90%). 특징으로는 췌장에서 인슐린은 정상적으로 분비되나 각 세포에서 인슐린을 제대로 사용하지 못하므로 결국 인슐린 저항성이 생기고, 이는 곧 결과적으로 다시 베타세포의 부담을 가중시켜 베타세포의 파괴까지 유도하게 된다. 특히 잘못된 식습관과 운동부족 및 심한 스트레스로 인해 비만인구 또한 증가하고 있는데, 비만인의 경우는 대부분이 제 2형 당뇨병을 초래할 위험이 크기 때문에, 식이의 조절과 운동을 통한 비만 예방은 또한 당뇨예방에 있어서 무엇보다 중요하다 할 수 있다. 현재까지 알려진 당뇨를 조절할 수 있는 몇몇의 drug이 있는데 다음과 같다.

Sulfonylurea, Meglitinides: 베타세포의 K_{ATP} channel에 작용하여 insulin의 분비를 촉진시키

는 것으로 쓰여지고 있는데 부작용이 심하다.

Biguanides: Hepatic glucose output을 감소시키고 근육을 포함한 tissue에서의 glucose uptake는 증가시킨다. Metformin, Phenformin 및 Buformin이 있었는데 현재는 Metformin이 부작용이 거의 없어 주로 사용되어 지고 있다.

Thiazolidinediones(TZDs): PPAR, agonist로써, rosiglitazone이 주로 임상적으로 사용되어 지고 있으나 약간의 부작용이 알려져 있다.

Glucagon-like peptide(GLP) analogs and agonists: Membrane GLP receptor와 결합하여 베타세포로부터 인슐린의 분비를 촉진한다.

최근 들어 Herbal extract가 실험적으로 인슐린 감수성을 개선시킬 수 있는 candidate로 보고되어 지고 있는데 Myrcia 및 Cinnamon 등이 대표적으로 알려져 왔고 최근엔 다양한 식품소재로부터 항 당뇨 효능을 가진 활성 물질들이 보고되고 있다.

당뇨의 발병기작은 하나의 분자가 원인이 아닌 다양한 단백질들의 조절 이상으로 발병되기 때문에 극복하기 또한 쉽지 않은 실정이다. 또한 발병 후에도 다양한 질병을 유발하는 등 다른 질병에 비해 그 성격이 매우 복잡하므로, 하나의 분자 타겟만을 표적으로 하여 항 당뇨 효능을 탐색하는 것은 효과의 정확성을 기대하기 어려우며, 또한 부작용을 초래할 수도 있기 때문에 매우 위험한 일이다. 따라서 세포의 신호 전달계와 각각에 관여하는 단백질들의 기능을 이해하고, Multi-targeting을 통해 활성 소재를 스크리닝하여 확실한 효능을 보이는 소재를 제시하는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

본 론

In vitro 및 *In vivo* study를 이용하여 당뇨

예방 소재를 발굴하기 위해 탐색해야 하는 세포 내 신호전달 경로는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. Insulin dependent 신호전달 경로와 Insulin independent한 신호전달 경로가 있는데, 이들은 주로 각각에 관여하는 kinase와 phosphatase의 tight한 조절에 의해 조절되게 된다. 우선 Insulin dependent 신호전달 경로는 IR/PI3kinase/Akt로 대표되는데 Fig. 2와 같은 경로를 거쳐 포도당의 흡수를 일으키게 된다.

1. Insulin dependent signal pathways

Insulin receptor: Fig. 2에서와 같이 식후에 췌장의 베타세포로부터 인슐린이 분비되면 혈액내의 인슐린은 근육이나 지방세포 등의 transmembrane receptor인 Insulin receptor에 결합하게 되고 이것은 다시 substrate adaptor인 insulin receptor substrate(IRS) family를 활성화

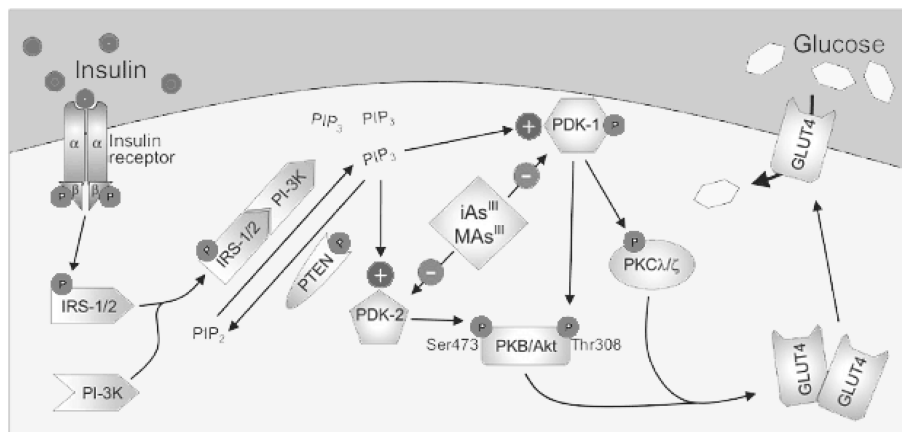


Fig. 2. Insulin dependent signaling pathways
(출처: Paul et al. www.environmentalhealthnews.org)

시키게 된다. Insulin receptor의 tyrosine residues에 인산화가 되어지면 insulin-receptor-substrate molecules(IRS)의 serine residues에 인산화가 일어나게 된다. 그 결과 small G-protein 및 phosphoinositol 3-kinase(PI3 kinase)을 활성화시키게 된다. 그리고 혈액내의 포도당 흡수를 돕기 위한 단백질들의 활성화 또는 발현을 증가시키게 된다. Khan과 그의 동료 연구자들은 Insulin receptor substrate proteins(IRS proteins)의 기능 실험적으로 증명하였는데, 동물실험을 통한 IRS-1의 Knockout은 느린 성장을 나타내었지만, 당뇨병으로의 발전은 일어나지 않았고, 다만 mild한 insulin resistance와 glucose intolerance만이 일어날 뿐이었다. 그런데 IRS-2 genes의 Knockout은 성장에는 영향을 거의 미치지 않았지만 insulin resistance 와 diabetes로의 발병을 일으켰다. 현재까지는 IRS-1, 3가 intracellular insulin signalling에 중요한 것으로

알려져 있다.

PI3 kinase: IRS로부터 전달 되어진 신호는 PI3 kinase를 먼저 활성화시키게 된다. PI3 kinase는 phosphatidylinositol의 inositol ring의 3position hydroxyl group을 인산화 하는 효소로서 glucose uptake를 조절하기 위해 IRS와 결합하게 되고 관련 신호전달 단백질들을 조절하게 된다.

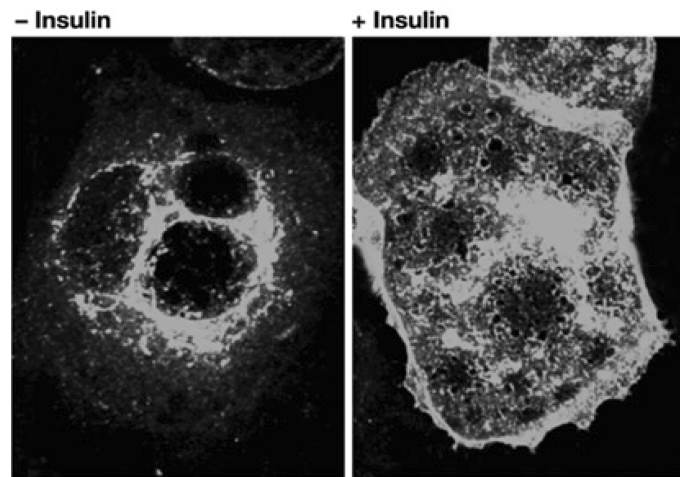
인산화에 의해 활성화되어진 PI3 kinase는 PTEN이라는 phosphatase에 의해 인산기가 떨어져지면서 불활성화 되게 된다. catalytic subunit와 regulatory subunit로 되어 있는데 Table 1과 같다.

Akt/PKB: 인슐린 receptor에 인슐린의 결합에 의한 IRS의 인산화의 결과로 PI3 kinase가 활성화 되면 그것의 downstream protein인 Akt/PKB의 활성화가 일어나게 된다. 활성화된 Akt

Table 1. The structure of PI3 kinase

Group	Gene	Protein	Aliases
catalytic	PIK3CA	PI3K, catalytic, alpha polypeptide	p110- α
	PIK3CB	PI3K, catalytic, beta polypeptide	p110- β
	PIK3CG	PI3K, catalytic, gamma polypeptide	p110- γ
	PIK3CD	PI3K, catalytic, delta polypeptide	p110- δ
regulatory	PIK3R1	PI3K, regulatory subunit 1 (alpha)	p85- α
	PIK3R2	PI3K, regulatory subunit 2 (beta)	p85- β
	PIK3R3	PI3K, regulatory subunit 3 (gamma)	p55- γ
	PIK3R4	PI3K, regulatory subunit 4	p150
	PIK3R5	PI3K, regulatory subunit 5	p101
	PIK3R6	PI3K, regulatory subunit 6	p87

(출처:www.wikipedia.org)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fig. 3. Membrane translocation of glucose transporter stimulated by Insulin
(출처: *Nia J. Bryant et al. Nature Reviews 3, 267-277*)

는 Glycogen synthase kinase-3 beta의 억제를 시키게 되고 결국 glycogen 합성을 촉진하게 된다. human에서는 세 개의 Akt family가 있는데 Akt 1, 2, 그리고 3으로 나뉜다. Akt는 Pleckstrin Homology(PH) domain을 가지고 있는데 이것은 phosphoinositides와 high affinity를 가지고 있다. Akt의 PH domain은 phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate(PtdIns(3,4,5)P3 aka PIP3), 또는 phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate (PtdIns(3,4)P2 aka PI(3,4)P2)과 결합하게 되는데 di-phosphorylated된 phosphoinositide PtdIns(4,5)P2는 PI 3-kinases(phosphoinositide 3-kinase or PI3K)에 의해 인산화 된다. Akt 중 특히 Akt 2가 인슐린 신호전달과정에 관여하게 되는데 인슐린의 결합에 의한 glucose transporter4의

membrane으로의 translocation에 관여하게 된다.

Glucose transporter(Glut): Insulin receptor로부터 시작된 신호전달은 결국 glucose transporter의 membrane으로 translocation을 촉진시키게 되고 glut에 의해서 혈액내의 포도당 흡수가 시작되게 된다.

Glut는 membrane protein의 family로서 대부분의 Mammalian 세포에 분포하고 있는데, 그중에서 Glut4는 인슐린 sensitive한 glucose transporter이다. ATP-dependent한 mechanism에 의해 transport protein은 membrane에 도달하게 되고 포도당 흡수를 마친 후 Glut4는 Golgi apparatus로 돌아와 inactive상태가 된다.

2. Insulin independent signal pathway

AMPK: Amp-activated protein kinase는 serine/threonine protein kinase로서 특히 운동에 의해 대표적으로 활성화되게 되는데, 운동에 의한 ATP의 감소 및 AMP의 증가에 의해 세포 내 에너지 수준을 감지하고 대사경로를 조절하여 세포의 항상성 유지에 도움을 주는 중심의 단백질이다.

구조적으로는 알파, 베타, 그리고 감마의 3개 subunit로 구성되어 있고 알파 subunit가 catalytic subunit로서 작용하게 된다. 베타 subunit는 AMPK의 scaffolding 역할을 하고 감마 subunit는 regulator로서 작용하는데 최근에 감마 subunit가 AMPK의 활성화에 역할을 한다는 보고가 이어지고 있다. 최근에 AMPK를 활성화 시킬 수 있는 upstream kinase가 밝혀졌는데 LKB1/STK11 kinase가 ATP-depletion 조건에서 AMPK를 direct하게 인산화 시킨다고 밝혀지게 되었다.

외부의 스트레스 조건에 의해 AMPK가 활성화되면 세포의 항상성을 유지하기 위하여 ATP를 소비하는 경로를 차단하게 되고 반대로 ATP를 생성하는 경로를 활성화 시키게 되는데, Glucose uptake & Glycolysis, Lipolysis 같은 ATP를 만들어 내는 경로는 활성화되게 되고 반대로 Gluconeogenesis, Fatty acid synthesis 같은 ATP를 소모하는 합성경로는 차단하게 된다. 최근 들어 AMPK는 혈액의 glucose uptake를 수행하기 위한 glucose transporter의 최종 조절

자인 AS160을 인산화 시켜 glucose transporter의 membrane으로의 translocation을 용이하게 만드는 것으로 알려지게 되어 AMPK가 혈당 흡수를 어떻게 용이하게 하는지에 대한 구체적인 답이 제시되고 있다.

현재까지 알려진 식품 소재 중 AMPK 활성화를 경유하여 혈당조절을 할 수 있는 candidates로 선발된 소재로는 Epigallocatechin gallate(EGCG), Resveratrol, Berberine, 그리고 Caffeic acid phenyl ester(CAPE) 등이 있다. 이들은 각각 Fig. 4처럼 down stream molecule들을 활성화 또는 억제시켜 glucose uptake를 용이하게 만드는 것으로 밝혀지게 되었다.

3. Other targets for Insulin sensitivity

PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs)는 nuclear receptor protein으로서 transcription factors로 작용한다. PPARs는 cellular differentiation, development, 그리고 metabolism(carbohydrate, lipid, and protein)에 중요한 역할을 한다. 알파, 베타, 감마 및 델타 등의 type으로 있으며, 감마가 특히 glucose metabolism에 중요한 역할을 한다.

대표적인 당뇨병 치료제인 Thiazolidinediones (glitazones)이 PPAR의 agonist로써 glitazone에 의해 Peroxisome Proliferator Responsive Elements(PPRE)가 활성화되면 insulin sensitive genes 발현을 증가시키게 된다. 현재 주로 사용되어지는 glitazone 약물은 rosiglitazone(Avandia),

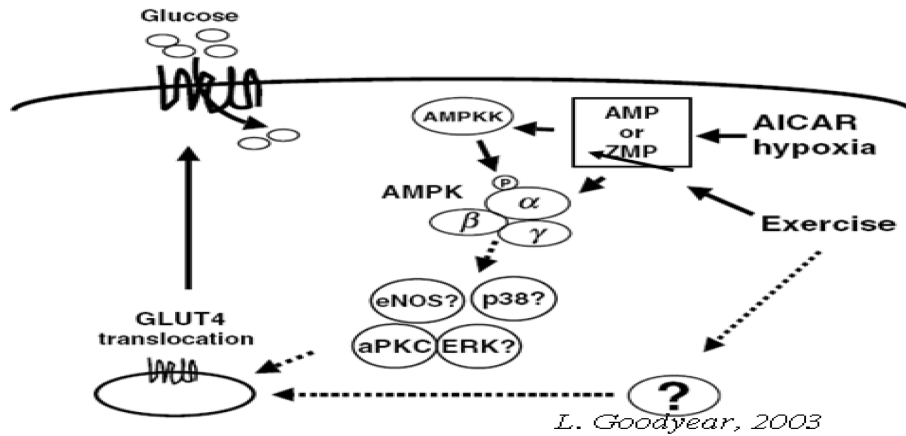


Fig. 4. Insulin independent signaling pathways

pioglitazone(Actos) 그리고 troglitazone(Rezulin) 등이 있다

RBP4: Retinol binding protein-4(RBP-4)는 Retinol(Vitamin A)을 liver로부터 peripheral tissue로 운반하는 역할을 한다. 조직으로 운반된 Retinol은 retinoic acid로 대사되게 된다.

RBP-4는 transthyretin과 복합체를 이루어 혈액 내를 순환하게 되는데 이는 사구체 여과되는 것을 막아 안정화를 꾀할 수 있다. 최근에 Khan group에서 RBP4가 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있는 타겟이 될 수 있음을 제안하였는데, 마우스 실험에서 RBP4의 과 발현이 인슐린 저항성을 초래하는 결과를 낳고, 반대의 경우는 인슐린 감수성을 증가시킬 수 있음을 밝혀내게 되었다. 임상적 실험에서는 당뇨병 환자의 혈청에서 RBP4의 농도가 증가되어 있는 것을 발견하였다.

결론

인슐린 의존성 또는 비의존성 신호전달을 타겟으로 한 당뇨 예방 소재의 탐색은 preclinical study에 있어서 필수적이며, 보다 명확한 작용 기작을 이해하는 데 도움을 준다. 위에서 언급한 바와 같이 인슐린 감수성을 높이는 세포내 기작은 복잡하고 다양하며, 현재까지도 과학자들에 의해서 계속하여 발견되어지고 있다.

인슐린 신호전달경로에 각각 관여하는 단백질들은 인슐린 민감성을 개선하는 역할이 중심이 되지만, 이들 단백질들은 세포 타입에 따라 복잡한 신호전달 단백질에 영향을 주게 된다. 예를 들어 Akt 단백질은 암 세포에서 암의 성장을 촉진하는 역할을 하게 되고 apoptosis에 관여하는 단백질들의 활성을 억제하게 된다. 또한 PI3 kinase의 인산화를 탈 인산화 하는 PTEN은 tumor suppressor로서 잘 알려져 있다. PPAR-

gamma는 agonist에 의해서는 인슐린 감수성을 개선시키지만, 반대로 antagonist에 의해서는 비만을 개선시킬 수 있는 특징을 가지고 있다.

따라서 단백질간의 상호작용 및 신호전달 경로의 활성화 또는 억제 등과 같은 다양하고 복잡한 세포내부의 특성 때문에, 하나의 분자를 타겟으로 하는 당뇨예방 소재의 탐색은 향후 임상에 적용하는데 있어 매우 위험한 결과를 초래할 수 있다. 또한 동물실험을 통해 하나의 활성화소재가 혈당을 개선시키는 현상을 보였다 하더라도, 제시된 기본적인 분자들을 확인함으로써 보다 명확한 효과와 더불어 과학적인 근거를 제시하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

각각의 단백질들의 활성화 또는 억제를 확인하기 위해서는 Kinase activity assay, Western blot analysis, RT-PCR, Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Transcriptional activity assay, Immunostaining, Flow Cytometer, Immunoprecipitation 등의 분자생물학적 기법을 이용

하여 detection할 수 있다.

참고문헌

1. Bryant NJ, Govers R, James DE, Regulated transport of the glucose transporter Glut4, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**(4), 267-277, 2002
2. Hardie DG, AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**(10), 774-785, 2007
3. Korea diabetes proceeding journal, **32**, 1-232, 2008
4. Musi N, Goodyear LJ, AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake, *Acta Physiol. Scand.*, **178**(4), 337-345, 2003
5. www.diabetes.org
6. www.environmentalhealthnews.org
7. Wikipedia, PI3 kinase, www.wikipedia.org

황진택 이학박사

- 소속 한국식품연구원 바이오제론연구단
- 전문분야 식품으로부터 비만/당뇨를 예방할 수 있는 소재의 발굴 및 생리작용기전 연구, 식품소재로부터 항비만 target 단백질의 activator 발굴, Type 2 당뇨 예방 식품 소재 발굴 및 세포 내 신호전달경로 탐색, 식품으로부터 암 예방 소재의 발굴 및 복합항암요법 적용가능성연구, 전통장류의 기능성 규명 및 생리작용기작연구
- E-mail jthwang@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9315