



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0172930  
(43) 공개일자 2023년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 38/18* (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)

*A61P 3/04* (2006.01) *C07K 14/48* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 38/185* (2013.01)

*A23L 33/18* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0073703

(22) 출원일자 2022년06월16일

심사청구일자 2022년06월16일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이수진

대전광역시 서구 둔산남로 127, 305-502(둔산동, 목련아파트)

유아라

대전광역시 유성구 죽동로242번길 46, 203호(죽동)

(74) 대리인

특허법인 공간

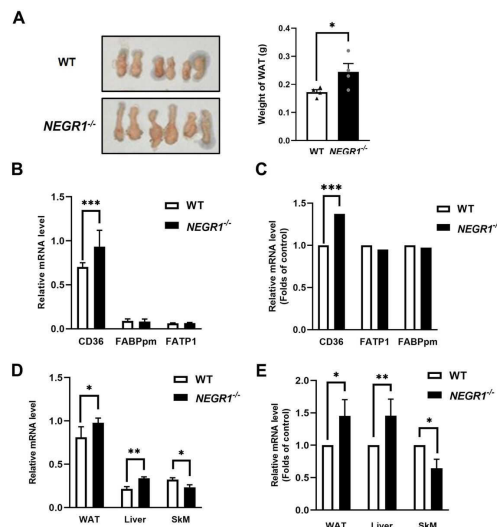
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드가 CD36과 상호작용함으로써 지방세포 또는 간세포에서 지방산의 수송 또는 축적을 감소시켜 비만을 예방 또는 치료할 수 있다.

### 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61P 3/04** (2018.01)

**C07K 14/48** (2013.01)

**A23V 2002/00** (2023.08)

**A23V 2200/332** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                         |
|-------------|-----------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711111966                              |
| 과제번호        | NRF-2020R1A2C201128811                  |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                  |
| 연구사업명       | 중견연구                                    |
| 연구과제명       | 비만 및 우울증 동물 모델에서 조직 간 crosstalk 네트워크 분석 |
| 기 여 율       | 1/2                                     |
| 과제수행기관명     | 충남대학교                                   |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2023.02.28                 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1711169710              |
| 과제번호        | 2020R1A5A8017671        |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                  |
| 연구사업명       | 집단연구지원                  |
| 연구과제명       | 마이크로바이옴 - 뇌신경질환 융합연구센터  |
| 기 여 율       | 1/2                     |
| 과제수행기관명     | 충남대학교                   |
| 연구기간        | 2020.03.01 ~ 2023.02.28 |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드는 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 분화 클러스터 36(cluster of differentiation 36, CD36)과 상호작용하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 지방세포 또는 간세포에서 지방산의 수송 또는 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 조성물.

#### 청구항 5

신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드는 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품.

#### 청구항 7

신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드로서, 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 아미노산 서열 중 하나의 아미노산 서열로 이루어진 항비만 활성을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 펩타이드는 지방세포 또는 간세포에서 지방산의 수송 또는 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항비만 활성을 갖는 펩타이드.

#### 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 항비만 활성을 갖는 펩타이드.

## 청구항 10

신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드로서 서열번호 10으로 표시되는 아미노산을 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로 보다 구체적으로는 CD36과 상호작용하는 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 비만(obesity)은 세포 내 지방 축적의 비정상적 증가를 특징으로 하는, 전 세계적으로 가장 흔한 질병이다. 비만은 고혈당, 고혈압, 고지혈증, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 관절 질환, 생식 관련 질환, 지방간 등을 유발할 수 있으며, 일부 암의 발생 사례도 보고된 바 있다. 비만의 원인은 과다한 음식섭취, 내분비계통 질환, 유전적 요인, 정신적 요인 및 약물 등이 원인이 될 수 있으며, 만성적으로 섭취하는 영양분에 비해 에너지 소비가 적어 여분의 에너지가 체지방의 형태로 축적되어 발생한다. 특히 일반적인 식사를 통해 섭취하는 대부분의 지방인 장쇄 지방산(Long-chain fatty acids, LCFA)은 복잡한 소화·흡수 과정을 통해 체내에 흡수되고, 대사속도가 느리며, 체지방 축적률이 높다. LCFA는 세포 대사 에너지 생성 및 저장에 기여할 뿐만 아니라 유전자 발현을 조절하는 호르몬과 유사한 특성을 가지고 있다(Doege, H., 및 A. Stahl., 2006). 여러 단백질 그룹이 LCFA를 흡수하는 것으로 알려져 있으며, 지방산 트랜스로카제/분화 클러스터 36(CD36/FAT), 지방산 수송 단백질(FATP) 및 원형질 막 지방산 48 결합 단백질(FABPpm)이 여기에 포함된다. 이들 중 특히 분화 클러스터 36(cluster of differentiation 36, CD36)은 지방 조직, 심근 세포 및 골격근 근육 세포와 같은 대사 조직에서 LCFA 흡수에 중요한 역할을 하며 이들 조직에서 지방산 흡수의 50% 이상을 기여하는 것으로 알려져 있다(Hao, J. W., et al., 2020).

[0003] CD36은 척추동물의 많은 세포 표면에서 발견되는 막관통단백질(integral membrane protein)로서, FAT(fatty acid translocase), SCARB3, GP88, gpIV(glycoprotein IV), gpIIb(glycoprotein IIb)으로도 알려져 있으며, 지방산을 세포 안으로 들여놓는 역할을 한다. CD36은 세포 표면에 존재하는 B-2형 스캐빈저 수용체(class B-2 scavenger receptor, SR-B2)로, 헤어핀 모양의 막 토폴로지와 2개의 막관통 영역을 가진 통합 막단백질이다(Glatz, J. F. C., and J. Luiken, 2018). 또한, CD36은 막 지질 뗏목(membrane lipid raft)과 관련되어 있다. 지질뗏목은 세포막상에 존재하는 콜레스테롤(cholesterol), 글리코스핑고리피드(glycosphingolipid), 막결합 수용체 등의 당단백질이나 지질이 풍부한 영역으로, 신호전달에 있어 중요한 역할을 한다. CD36은 또한, 골격 및 심장 근육세포, 대식세포, 내피 세포, 지방세포 및 장 상피 세포를 포함하는 다양한 포유동물 세포 유형에서 편재적으로 발현되며, 주로 지질 대사 및 선천성 면역과도 연관된 것으로 알려져 있다. 특히 세포의 지방산 흡수율은 주로 세포 표면에 있는 CD36 단백질의 양에 의해 조절된다. CD36은 조직 위치에 따라 다양한 기능을 수행하며, 인간의 심장 및 골격근에서 CD36은 세포에 에너지를 공급하는 주요 지방산 수송체로 인식되고 있다. 지방 세포에서 CD36은 주로 LCFA 섭취에 기여하고 지질 저장 과정도 조절하며, 인간 지방세포 전구체의 마커로 간주되어 높은 CD36 수준은 높은 중성지방 축적 가능성을 암시하기도 한다.

[0004] 한편, 신경 성장 조절제 1(Neural growth regulator 1, NEGR1)은 면역글로불린 슈퍼패밀리 세포 접착 분자 하위 그룹 IgLON의 구성원으로, 신경 세포 통신 및 시냅스 형성을 매개하는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 고정 막단백질이다. 이 단백질은 글리코실포스파티딜이노시톨 앵커를 사용하여 막 지질 뗏목과 강하게 연관되어 있다. NEGR1은 신경 세포 인식 및 신경돌기 성장에 중요한 역할을 하는 세포 결합 인자로 기능한다(Kim, H., et al., 2014). NEGR1은 세포막에서 세포 바깥 부분으로 국한된 3개의 C2형 면역글로불린 도메인으로 구성된다. 다양한 게놈 연관 연구(Genome-wide association studies, GWAS)에 따르면 NEGR1의 유전적 변형이 비만, 지적 장애, 정신분열증, 우울증, 알츠하이머병을 비롯한 다양한 인간 질병과 관련되어 있음이 밝혀졌다(Ni, H., et al., 2018). 여러 게놈 관련 연구에서 NEGR1의 변이가 체중 조절과 관련이 있고 보고하고 있으며, NEGR1이 결핍된 마우스는 세포 크기가 증가하면서 백색 지방 조직(white adipose tissue, WAT)이 현저하게 확대되었으며 간

지방 축적 및 골격근 위축 관찰되었다(Joo, Y., et al., 2019).

[0005] 그러나 NEGR1가 세포내 콜레스테롤 수송 및 지질의 세포내 저장에서의 역할은 불분명하며, 특히 NEGR1이 CD36과 상호 작용 및 이와 관련된 인간 질병, 특히 비만에서 NEGR1 및 CD36의 역할에 대한 연구는 아직 전무한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Yao, C. H., R. Fowle-Grider, N. G. Mahieu, G. Y. Liu, Y. J. Chen, R. Wang, M. Singh, G. S. Potter, R. W. Gross, J. Schaefer, S. L. Johnson, and G. J. Patti. 2016. Exogenous Fatty Acids Are the Preferred Source of Membrane Lipids in Proliferating Fibroblasts. *Cell Chem Biol* 23: 483-493.
- (비특허문헌 0002) Doege, H., and A. Stahl. 2006. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21: 259-268.
- (비특허문헌 0003) Hao, J. W., J. Wang, H. Guo, Y. Y. Zhao, H. H. Sun, Y. F. Li, X. Y. Lai, N. Zhao, X. Wang, C. Xie, L. Hong, X. Huang, H. R. Wang, C. B. Li, B. Liang, S. Chen, and T. J. Zhao. 2020. CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis. *Nat Commun* 11: 4765.
- (비특허문헌 0004) Glatz, J. F. C., and J. Luiken. 2018. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *J Lipid Res* 59: 1084-1093.
- (비특허문헌 0005) Kim, H., J. S. Hwang, B. Lee, J. Hong, and S. Lee. 2014. Newly Identified Cancer-416 Associated Role of Human Neuronal Growth Regulator 1 (NEGR1). *Journal of Cancer* 5: 598-608.
- (비특허문헌 0006) Ni, H., M. Xu, G. L. Zhan, Y. Fan, H. Zhou, H. Y. Jiang, W. H. Lu, L. Tan, D. F. Zhang, Y. G. Yao, and C. Zhang. 2018. The GWAS Risk Genes for Depression May Be Actively Involved in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 64: 1149-457 1161.
- (비특허문헌 0007) Joo, Y., H. Kim, S. Lee, and S. Lee. 2019. Neuronal growth regulator 1-deficient mice show increased adiposity and decreased muscle mass. *Int J Obes (Lond)* 43: 1769-472 1782.
- (비특허문헌 0008) Kim, H., Y. Chun, L. Che, J. Kim, S. Lee, and S. Lee. 2017. The new obesity associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 1367-1374.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 달성하기 위하여 본 발명은 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neuronal growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드는 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0010] 상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neuronal growth regulator 1, NEGR1) 유래 펩타이드 또는 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 펩타이드는 분화 클러스터 36(cluster of differentiation 36, CD36)과 상호작용하는 것일 수 있다. 이때 CD36은 서열번호 1 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상의 아미노산 서열 중 하

나의 부위와 상호작용할 수 있다.

- [0011] 상기 펩타이드는 지방세포 또는 간세포에서 지방산의 수송 또는 축적을 감소시키는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(NEGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0013] 상기 "예방"은 상기 조성물의 투여로 비만의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 펩타이드 또는 조성물의 투여로 비만의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0014] 본 발명에서 상기 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다. 그러나 경구 투여 시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다.
- [0015] 본 발명에서 "비만"은 체내에 지방조직이 과다한 상태로, 신체비만지수(체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값)가 25 이상이면 비만으로 정의된다. 비만은 오랜 기간에 걸쳐 에너지 소비량에 비해 영양소를 과다하게 섭취할 경우 에너지 불균형에 의해 유발되는 것이 통상적이다. 비만은 신체 전체에 영향을 미치는 대사질환으로 당뇨병 및 고지혈증에 걸릴 가능성이 높아지고, 성기능 장애, 관절염, 심혈관계 질환의 발병 위험이 커지며 일부의 경우 암의 발생과도 연관이 있다.
- [0016] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 발명에서 "약학적으로 허용"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체는 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0019] 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 펩타이드 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 수막강내, 심실내, 폐, 경피, 피하, 복내내, 비강내, 소화관내, 국소, 설하, 질내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 상기 펩타이드는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로즈 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산 (ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제 (antioxidants), 킬레이팅 물질 (chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제 (stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다.

바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0022] 상기 약학적 조성물은 단독 또는 다른 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 비만 예방 또는 치료효과를 나타내는 약학적 제제는 특별히 이에 제한되지 않으나, GLP-1 수용체 아고니스트, 렙틴(Leptin) 수용체 아고니스트, DPP-IV 저해제, Y5 수용체 안타고니스트, MCH (Melaninconcentrating hormone) 수용체 안타고니스트, Y2/3 수용체 아고니스트, MC3/4 수용체 아고니스트, 위/췌장 리파아제(gastric/pancreatic lipase) 저해제, 5HT2c 아고니스트,  $\beta$ 3A 수용체 아고니스트, 아밀린 (Amylin) 수용체 아고니스트, 그렐린 (Ghrelin) 안타고니스트, 및/또는 그렐린 수용체 안타고니스트 등이 될 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0024] 상기 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품의 상기 NGR1 유래 펩타이드는 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.
- [0025] 상기 건강기능식품은 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NGR1) 유래 펩타이드가 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~30중량%, 가장 바람직하게는 0.001~10중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0026] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품류 등이 있다.
- [0027] 본 발명은 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NGR1) 유래 펩타이드로서, 서열번호 5, 6, 7, 9 및 10로 표시되는 아미노산 서열 중 하나의 아미노산 서열로 이루어진 항비만 활성을 갖는 펩타이드를 제공한다.
- [0028] 상기 펩타이드는 지방세포 또는 간세포에서 지방산의 수송 또는 축적을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NGR1) 유래 펩타이드는 바람직하게는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드이다.
- [0030] 본 발명은 또한 신경 세포 성장 조절 인자 1(Neural growth regulator 1, NGR1) 유래 펩타이드로서 서열번호 10으로 표시되는 아미노산을 서열로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0031] 본 발명은 신경 세포 성장 조절 인자 1(NGR1) 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 신경 세포 성장 조절 인자 1(NGR1) 유래 펩타이드가 CD36과 상호작용함으로써 지방세포 또는 간세포에서 지방산의 수송 또는 축적을 감소시킴으로써 비만을 예방 또는 치료할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은  $Negr1^{-/-}$  마우스의 백색지방조직(white adipose tissue, WAT)에서 CD36 발현이 상향 조절된 것을 보여주는 도면이다. (A) 야생형(WT) 및  $Negr1^{-/-}$  마우스의 부고환 WAT의 무게 (\*,  $p < 0.05$ .) (B) WT 및  $Negr1^{-/-}$  마우스의 부고환 WAT의 CD36, FABPpm 및 FATP1의 발현 수준 (\*\*\*,  $p < 0.001$ .) (C) WT 마우스 대비  $Negr1^{-/-}$  마우스 WAT의 상대적 mRNA 발현량. (D) WT 및  $Negr1^{-/-}$  마우스의 WAT, 간 및 골격근(SkM)에서의 CD36 유전자 발현 (E) WT 마우스 대비  $Negr1^{-/-}$  마우스 WAT의 상대적 mRNA 발현량. (오차 막대는  $\pm$  SD, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .)
- 도 2는 NGR1은 CD36과 상호 작용함을 나타내는 도면이다. (A) HA-CD36 및 GFP-NGR1 플라스미드로 형질감염시킨 293T 세포의 세포 용해물을 항-GFP 항체로 CD36과 NGR1 사이의 공동 면역 침전(IP) 후, 항-HA 및 항-GFP 항체로 면역블롯팅(IB)(\*, IgG) (B) HA-CD36 및 GFP-NGR1 플라스미드로 형질감염시킨 293T 세포의 세포 용해물을 항-HA 항체로 IP 후, 항-HA 및 항-GFP 항체로 IB (C) 항-FLAG 항체를 사용하여 SKOV-3-FLAG-NGR1 안정 세포로 IP를 수행 후, 항-FLAG 및 항-CD36 항체로 IB (D) 가용성 NGR1-Fc 단백질을 사용한 결합 분석. SKOV-3

세포를 NEGR1-Fc 또는 Fc(대조군)을 발현하는 293T 세포의 배양 배지와 함께 2시간 동안 인큐베이션 후, 세포를 항-인간 Fc 및 항-CD36 항체로 면역염색. (바 = 20  $\mu$ m). (E) 듀오링크 근접 결찰 분석(PLA) 기술을 사용한 SKOV-3-FLAG-NEGR1 세포로 원위치 PLA 결과. 항-CD36 및 항-FLAG 항체로 2시간 동안 처리한 후, 세포를 PLA 프로브(각각 항-마우스 (-) 및 항-토끼 (+))와 함께 1시간 동안 인큐베이션, 세포의 actin 폴리머를 Alexa Fluor 488 phalloidin으로 염색. (바 = 10  $\mu$ m)

도 3은 듀오링크 PLA 기술을 사용하여 세포 투과성 없이 제자리 근접 결찰 분석(PLA) 결과이다. SKOV-3-FLAG-NEGR1 세포를 항-CD36 및 항FLAG 항체와 함께 인큐베이션한 후 PLA 프로브와 함께 1시간 동안 인큐베이션. (바 = 10  $\mu$ m)

도 4는 NEGR1-CD36 상호작용의 중요 영역 결정을 위한 실험 개략도 및 결과를 나타낸 도면이다. (A) CD36 및 NEGR1 구조의 개략도. 잠재적인 N-당화 부위는 채워진 원으로 표시됨 (B) GST 융합 형태의 CD36 세포외 도메인 (ECD)의 결실 구조의 개략도 및 FLAG-NEGR1 플라스미드와 함께 293T 세포로 형질감염, GST 풀다운 후, 항-FLAG 항체를 사용한 IB를 사용하여 공동 분획화된 NEGR1 검출. (TM, transmembrane; CLESH-1, CD36, LIMP-2, Emp sequence homology; MA, membrnaneassociated; ProR, proline-rich). (C) GST 융합 형태의 NEGR1의 결실 구조의 개략도 및 HA-CD36 플라스미드와 293T 세포로 형질감염, GST 풀다운 후, 항-HA 항체를 사용한 IB를 사용하여 공동 분획화된 CD36 검출.

도 5는 NEGR1 및 CD36의 원형질막에서 공존함을 확인한 도면이다. (A) FLAG-NEGR1 및 HA CD36 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 SKOV-3의 면역형광 현미경. 세포를 항-FLAG 및 항-HA 항체와 함께 인큐베이션한 다음, 항-토끼 Cy3 및 항-마우스 FITC 2차 항체와 함께 인큐베이션. 이미징은 Olympus BX51 현미경을 사용하여 수행됨 (바 = 20  $\mu$ m). (B) SKOV-3-FLAG-NEGR1 안정 세포는 항-FLAG(빨간색) 및 항-CD36(녹색) 항체로 이중 면역염색. (C) 293T 세포를 사용하여 지질 뗏목 분획을 수행하고 GFP 대조군(왼쪽) 또는 GFP-NEGR1(오른쪽)과 함께 HA-CD36 플라스미드로 형질감염시킨 후, Optiprep 구배를 사용하여 부유 방법으로 막 분획. CD36 및 NEGR1은 각각 항-HA 및 항-GFP 항체로 시각화됨. Flotillin-1은 지질 뗏목 마커로 사용됨. (SE, 짧은 노출; LE, 긴 노출).

도 6은 NEGR1 발현이 WAT 및 간에서 CD36 단백질 수준에 미치는 영향을 보여주는 도면이다. (A) HA-CD36 및 GFP-NEGR1 플라스미드로 일시적으로 형질감염시킨 293T 세포에서 동일한 양의 총 단백질(30  $\mu$ g)을 SDS-PAGE 및 항-HA 항체를 사용하여 CD36 단백질을 검출. 이미지의 각 CD36 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화됨 (B) 공백터 또는 NEGR1 발현 3T3-L1-NEGR1-FLAG 안정 세포에서 내인성 CD36 수준의 비교. CD36은 항-CD36으로 IB에 의해 검출(\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .) (C) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> MEF에서 CD36 단백질 수준의 측정. WT 및 NEGR1 결핍 MEF를 정상 배양 조건(-OA) 또는 0.1mM 올레산(+OA)의 존재 하에 24시간 동안 인큐베이션 후 IB를 실시. 내인성 CD36 및 NEGR1은 각 단백질에 대한 특이적 항체로 시각화됨.

도 7은 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 WAT 및 간에서의 CD36 단백질 수준을 조사한 결과이다. (A) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 지방 조직 내 CD36 단백질 수준의 측정. IB는 항-CD36 항체로 수행, 밴드의 강도는 ImageJ를 사용하여 정량화되고  $\beta$ -actin 발현 수준을 사용하여 정규화됨 (\*,  $p < 0.05$ ) (B) WT 또는 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 WAT 조직 절편을 사용하여 면역조직화학 분석. 조직 절편을 항-CD36 항체와 함께 배양한 후 FITC 항-마우스 2차 항체와 함께 배양함. (바 = 50  $\mu$ m). (C) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 간에서의 CD36 발현. 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 결정됨. (\*,  $p < 0.05$ ) (D) 항-CD36 항체를 사용한 면역조직화학 분석을 사용하여 WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 간 조직에서 CD36 발현의 비교. 이미징은 Olympus BX51 현미경을 사용하여 수행됨.

도 8은 WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스 지방세포의 지방산 흡수율 및 세포 ROS 수준을 조사한 결과이다. (A) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 지방 조직으로부터 얻은 1차 지방세포(primary adipocyte)의 지방산 흡수율. 유리 지방산 흡수 검정 키트를 사용하여 485/515 nm에서 형광 마이크로플레이트 판독기 FlexStation 3을 사용하여 40 분까지 형광 신호를 측정 (바 = 100  $\mu$ m). 이미징은 Olympus BX51 현미경을 사용하여 수행됨 (B) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 지방축적 조사. WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 유래 1차 지방세포를 0.1mM 올레산과 함께 24시간 동안 배양한 후, 세포를 BODIPY 493/503 염색 (바 = 50  $\mu$ m). (C) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> MEF의 세포 ROS 수준 조사, DCFDA/H2DCFDA - 세포 ROS 분석 키트를 사용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 올레산을 포함 또는 미포함 조건에서 24시간 동안 사전 배양함. 형광 신호는 485/515 nm에서 측정. (D) WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> MEF에서 활성화된 AMPK 수준 확인. AMPK

및 p-AMPK 수준은 0.1mM 올레산 또는 올레산이 없는 상태에서 세포를 24시간 동안 배양 후 IB으로 검출.

도 9는 NEGR1과 CD36의 연관성에 대한 실험 결과를 요약한 모식도이다. NEGR1 결손 세포에서 CD36의 mRNA 과 단백질 발현이 증가하고 이에 따라 지방산 흡수도 및 지방세포의 크기가 증가하며 ROS의 양 또한 증가함.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명의 발명자그룹은 선행연구를 통하여 인간 NEGR1 유전자가 다양한 인간 종양 조직에서 일반적으로 하향 조절되는 것을 발견하였으며, 이 과정에서 세포내 콜레스테롤 수송 및 지질의 세포 내 저장에 NEGR1이 관여하는 것을 확인하였다. Negr1 결핍 마우스에서 백색 지방 조직(WAT)은 현저하게 확대되었으며, 세포 크기 또한 증가하였다. 또한 Negr1 결핍 마우스에서는 간 지방 축적의 증가 및 골격근 위축이 관찰되었다. 이는 Negr1가 지질 수송과 관련있음을 뒷받침한다. 이러한 선행연구를 바탕으로 본 발명자들은 NEGR1의 세포 내 지질 수송 및 비만에 대한 역할을 규명하는 과정에서 본 발명을 안출하게 되었다.

[0034] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

### [0035] <실시예 1. Negr1 결핍 마우스(Negr1<sup>-/-</sup>)의 지방 조직에서 증가된 CD36 발현 확인>

[0036] 선행연구에서 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스는 부고환의 WAT가 WT 마우스에 비하여 확대되는 것을 확인하였다. 이에 Negr1 관련 지방 조직의 세포막에서 LCFA를 흡수하는 데에 어떤 지방산 수송체가 기능하는지를 조사하였다.

### [0037] 1.1 Negr1 결핍 마우스(Negr1<sup>-/-</sup>)의 백색 지방(WAT) 증가 확인

[0038] Negr1<sup>-/-</sup> 마우스는 텍사스 A&M 유전체 의학 연구소(Texas A&M Institute for Genomic Medicine, College Station, TX, USA)로부터 제공받았으며, 실험 전, 실험 기간 동안 22~24℃ 및 55% 습도의 통제된 환경에서 12시간 명암 주기로 사육 및 유지되었다. 모든 동물 절차는 서울대학교 동물병원 동물관리위원회의 승인을 받았다.

[0039] 10주령의 Negr1<sup>-/-</sup> 및 WT 마우스를 해부하고 부고환의 백색지방조직을 적출한 다음, 무게를 측정하여 도 1A에 나타내었다. 도 1A에서 보는 바와 같이, Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 WAT은 야생형과 비교하여 약 1.4배 증가하였다( $p=0.026$ ).

### [0040] 1.2 LCFA 흡수관련 지방산 수송체의 확인

[0041] Negr1와 관련하여 지방 조직의 세포막에서 LCFA를 흡수하는 데에 관여하는 지방산 수송체를 확인하기 위하여 WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 WAT에서 세 가지 주요 수송체 CD36, 막결합 지방산 결합 단백질(fatty acid binding protein, FABPpm) 및 지방산 수송 단백질 1(Fatty Acid Transport Protein 1, FATP1)의 발현 수준을 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(Quantitative-RT-PCR)으로 조사하였다.

[0042] WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 WAT에서 얻은 전체 RNA를 이용하여 CD36, FABPpm 및 FATP1의 발현량을 측정하여 도 1B에 나타내었다. NucleoSpin RNA 추출 키트(Macherey-Nagel, D 117 Üren, Germany)를 사용하여 조직 샘플에서 전체 RNA를 추출하고 SuperScript III 역전사 키트(Invitrogen)를 사용하여 cDNA로 변환했다. 이후 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)을 이용하여 각 수송체의 발현량을 측정하였다. 이때 사용한 CD36에 대한 특정 프라이머는 정방향: 5-GCATGAGAATGCCTCCAAACA-3, 역방향: 5-CGGAAGTGTGGGCTCATTG-3이었으며, 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH)를 표준화를 위한 참조 유전자로 사용하였다. 각 발현량은 GAPDH를 참조 유전자로 사용하여 상대 발현으로 계산하여 나타내었다. 도 1B에서 보는 바와 같이, CD36의 발현 수준은 FABPpm 및 FATP1의 발현 수준보다 현저히 높았으며, 이는 CD36이 지방 조직에서 LCFA를 흡수하는 데에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사했다. 도 1C에는 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스에서의 각 지방산 수송체의 발현량을 WT 마우스와 비교하여 나타내었다. 도 1C에서 보는 바와 같이, CD36 발현만이 WT 마우스에 비해 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스에서 유의하게 증가(1.3배,  $p=0.0007$ )하였으며, FABPpm 및 FATP1은 WT 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스에서 발현량에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

### [0043] 1.3 조직에 따른 CD36 발현량 확인

- [0044] WAT 외 다른 조직에서 CD36 발현을 조사하기 위해 WAT, 간 및 골격근인 비복근(gastrocnemius, GA) 조직의 mRNA를 사용하여 상기 실험과 동일한 방법으로 정량적 RT-PCR을 수행하고 그 결과를 도 1D에 나타내었다. 도 1D에서 보는 바와 같이, CD36의 발현은 간 또는 GA 근육보다 WAT에서 약 3배 더 컸다. 또한, 도 1E에서 보는 바와 같이, *Negr1*<sup>-/-</sup> 마우스에서의 CD36의 발현량을 WT 마우스와 비교하여 WAT 및 간 조직에서 약 1.4배( $p=0.0033$ ) 증가했으나, GA 근육에서는 감소했다(1.6배,  $p=0.024$ ).
- [0045] 상기 결과를 통하여 *Negr1*<sup>-/-</sup> 마우스의 증가된 지방량은 지방세포의 주요 LCFA 수송체인 CD36와 관련됨을 확인하였다.
- [0046] <실시예 2. NEGR1과 CD36의 상호작용 확인>
- [0047] 2.1 NEGR1과 CD36의 결합 확인
- [0048] NEGR1과 CD36이 모두 큰 세포의 영역을 포함하고 원형질막의 막 지질 뗏목과 관련되어 있다는 초기 발견에 기초하여, 이들의 분자 상호작용 가능성을 조사하였다.
- [0049] 먼저 293T 세포의 전체 RNA에서 CD36 유전자의 cDNA를 얻었고 pcDNA3-HA 플라스미드를 사용하여 HA 태그된 CD36 구성(pcDNA3-HA-CD36)을 제작했다. 또한 Kim 등(2014)의 방법에 따라 pEGFP-C1 벡터(Clontech)를 이용하여 막 표적 강화 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein, EGFP)로 태그된 pEGFP-C1-NEGR1을 제작하였다. 이후 pcDNA3-HA-CD36 및 pEGFP-C1-NEGR1 플라스미드를 293T 세포에 형질감염시킨 다음, 이들의 세포 용해물에 항-GFP 항체를 사용하여 공동 면역침전(Co-immunoprecipitation, IP)을 수행하고, 이를 항-HA를 이용하여 면역 블롯팅(Immunoblotting, IB)을 실시하였다. 그 결과, 도 2A에서 보는 바와 같이, CD36-HA이 IgG가 풍부한 대조군에는 나타나지 않았으나, NEGR1이 풍부한 분획에 존재하는 것을 확인하였다. 또한 도 2B에서는 항-HA 항체를 이용하여 같은 실험은 수행하였을 때 NEGR1-GFP가 CD36에 의해 공동분획됨을 보임으로 이를 통하여 NEGR1과 CD36 사이에 상호 작용이 있음을 확인하였다.
- [0050] 상기에서 확인한 NEGR1과 CD36 사이에 상호 작용을 바탕으로, 세포 내 분자 상호작용을 SKOV-3-FLAG-NEGR1 안정 세포를 사용하여 IP를 수행하였다.
- [0051] 먼저, NEGR1 유전자의 신호 서열(아미노산 1-39)과 나머지 서열(40-314) 사이에 3×FLAG 서열을 *Afl*III 및 *Xba*I로 pcDNA4/TO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 서브클로닝하여 pcDNA4-FLAG-NEGR1을 제조하였다. 이후, pcDNA4-FLAG-NEGR1 플라스미드를 SKOV-3세포에 형질감염시킨 후, 제오신(zeocin, 50  $\mu$ g/ml, Invitrogen)으로 선별하여 SKOV-3-FLAG-NEGR1 안정 세포를 수득하였다. 수득한 SKOV-3-FLAG-NEGR1 안정 세포의 세포 용해물을 항-FLAG 항체로 IP를 수행하고 항-CD36 항체를 사용하여 면역 블롯팅을 실시하고 이를 도 2C에 나타내었다.
- [0052] 도 2C에서 보는 바와 같이, 항-FLAG 항체로 IP를 수행한 경우, 항-CD36 항체를 사용한 IB에 의해 고도로 글리코실화된 형태의 CD36가 NEGR1 분획에서 관찰되었다. 즉, 상기 293T 세포 결과와 동일하게 NEGR1과 CD36 사이에 상호 작용이 있음을 확인하였다.
- [0053] 2.2 NEGR1과 CD36의 결합의 세포 상 위치 확인
- [0054] NEGR1-CD36 상호작용이 세포막의 세포외 표면에서 발생함을 명확하게 하기 위하여 NEGR1의 인간 Fc 융합 분비 형태를 사용하여 제자리 결합 분석(in situ binding assay)을 수행하였다.
- [0055] 면역글로불린의 Fc에 유전자 제조합기술로 원하는 단백질을 융합시키는 경우, 목적 단백질을 높은 수준으로 발현하고 분비되는 것으로 알려져 있다. Fc에 NEGR1을 융합시킨 NEGR1-Fc 또는 Fc 대조군 플라스미드로 형질감염시킨 293T 세포를 배양한 후, 그 배양 배지를 각각 수집하였다. 수집한 NEGR1-Fc 또는 Fc 함유 배양 배지를 SKOV-3 세포와 함께 2시간 동안 인큐베이션한 후, 각 세포를 세척한 다음, 항-인간 Fc 항체(적색) 및 CD36 항체(녹색)로 공동 면역염색시키고 그 결과를 도 2D에 나타내었다. 도 2D에서 보는 바와 같이, Fc 신호는 Fc 함유 배지로 처리된 대조군 세포에서 거의 관찰되지 않았다. 이와 대조적으로, NEGR1-Fc 처리된 세포에서 강한 Fc 신호가 관찰되었으며, 이는 CD36 신호와 중첩되었다. 이를 통해 NEGR1이 세포 표면에서 CD36과 상호작용함을 확인하였다.
- [0056] 듀오링크(Duolink® In Situ) PLA를 사용한 SKOV-3-FLAG-NEGR1 세포의 제자리 근접 결합 분석(Proximity Ligation Assays, PLA)을 이용하여 NEGR1-CD36 상호 작용이 세포막에서 발생한다는 점을 재확인하였다.

[0057] 제조사의 프로토콜에 따라 Duolink PLA 시약(Sigma-Aldrich)을 사용하여 SKOV-3-NEGR1-FLAG 세포에서 분석을 수행했다. 상기 실시예 2.1에서 제작한 SKOV-3-FLAG-NEGR1 세포를 고정시킨 후, 0.1% Triton X-100으로 투과시킨 다음, 항-CD36 및 항-FLAG 항체와 함께 2시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 세포를 PLA 프로브(각각 항-마우스 (-) 및 항-토끼 (+)) 및 Alexa Fluor 488 phalloidin(Invitrogen)과 함께 1시간 동안 인큐베이션했다. 이후, 30분 동안 라이제이션 용액, 2시간 동안 증폭 용액과 함께 인큐베이션한 후, 세포를 DAPI가 포함된 마운팅 용액으로 마운트하였다. Olympus BX51 현미경 또는 63x 도립 NX 오일 렌즈가 장착된 Leica TCS SP5 AOBs 공초점 현미경을 사용하여 이미지를 수행하고 이를 도 2E에 나타내었다. 이때 Phalloidin 염색은 세포 형태를 조사하는 데 사용되었다. 도 2E에서 보는 바와 같이, 단일 항체로 처리하면 어떠한 신호도 제공하지 않는 반면, 두 항체로 모두 처리된 세포에서 명확한 형광 신호가 검출되었으며, 이는 이들 단백질이 매우 근접하게 존재함을 나타낸다.

[0058] 상기 KOV-3-FLAG-NEGR1 세포의 제자리 근접 결찰 분석을 비 투과성 조건에서 상기와 동일한 방법으로 수행하고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이, 항-CD36 및 항-FLAG 항체 모두를 처리한 경우, 강한 형광 신호를 관찰할 수 있었다. 이를 통하여 NEGR1-CD36 상호 작용이 세포막에서 발생함을 알 수 있었다.

[0059] <실시예 3. NEGR1 및 CD36 단백질의 결합 영역 결정>

[0060] 상기에서 NEGR1 및 CD36 단백질이 상호작용하는 것을 확인함에 따라 NEGR1 및 CD36 단백질이 결합하는 영역을 결정하였다. 도 4A에 CD36 및 NEGR1 구조의 개략도를 나타내었다. 잠재적인 N-글리코실화 부위는 채워진 원으로 표시되었다. NEGR1은 3개의 연속적인 C2-형 면역글로불린 유사 도메인(C2-type Ig-like domains)을 포함하는 비교적 단순한 구조를 가지고 있지만, CD36의 세포외 영역은 CLESH(CD36, LIMP-2, Emp sequence homology) 도메인(93-155)과 프롤린이 풍부한 도메인(ProR, 243-375)을 제외하고는 명확하게 분리된 도메인을 포함하고 있지 않으며, 원형질막으로 함몰되는 소수성 패치를 포함하여 아미노산 서열 127-279에 지질 결합 포켓을 포함하는 것으로 예측되고 있다.

[0061] CD36-NEGR1 상호작용을 담당하는 단백질 영역을 결정하기 위해 도 4B와 같이 글루타티온(GST)-융합 CD36 결실 구조 CD36 ECD(extracellular domain, ECD, 30-439 a.a 포함, 서열번호 1), N1(30-125 a.a 포함, 서열번호 2), N2(30-242 a.a 포함, 서열번호 3) 및 N3(30-375 a.a 포함, 서열번호 4)를 하기 표 1과 같이 생성하였다.

표 1

| 서열번호 | 서열명칭 | 아미노산 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | N1   | GDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTDQ<br>AEDNTVSFLQPNGAIFEPSSLVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSL INKSKSSMFQVRTLRELLWGYR<br>DPFLSLVPYPVTTTGLFYYPNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWESHCDMINGTDAASFPPFVEK<br>SQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGI PVYRFVLP SKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNCSTSYGVLDISKCKEGR<br>PVYISLPHFLYASPDVSEPIDGLNPNEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLVKPSEKIQVLKNLKNRNYIVPIL<br>WLNETGTIGDEKANMFRSQVTGKIN |
| 2    | N2   | GDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTDQ<br>AEDNTVSFLQPNGAIFEPSSLVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 3    | N3   | GDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTDQ<br>AEDNTVSFLQPNGAIFEPSSLVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSL INKSKSSMFQVRTLRELLWGYR<br>DPFLSLVPYPVTTTGLFYYPNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWESHCDMINGTDAASFPPFVEK<br>SQVLQFFSSDI                                                                                                                                                                                   |
| 4    | N4   | GDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTDQ<br>AEDNTVSFLQPNGAIFEPSSLVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMILNSL INKSKSSMFQVRTLRELLWGYR<br>DPFLSLVPYPVTTTGLFYYPNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWESHCDMINGTDAASFPPFVEK<br>SQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGI PVYRFVLP SKAFASPVENPDNYCFCTEKIISKNCSTSYGVLDISKCKEGR<br>PVYISLPHFLYASPDVSEPIDGLNPNEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLVKPSEKIQVLKN                                         |

[0063] GST-융합 CD36 결실 돌연변이를 pcDNA4-FLAG-NEGR1 플라스미드와 함께 293T 세포에 형질감염시켜 NEGR1과의 결합여부를 GST 폴다운 분석으로 확인하여 도 4B에 나타내었다. 면역 침전 및 GST 폴다운 분석은 Kim, H. 등 (2017)의 방법을 응용하여 항체 또는 글루타티온-세파로스 4B 비드(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 1μg 을 사용하여 수행하였다.

[0064] GST 폴다운 분석 결과, 도 4B에서 보는 바와 같이, CD36의 대부분의 세포외 영역을 포함하는 돌연변이 CD36 ECD 는 NEGR1과 결합하였다. 또한, CD36의 독특한 소수성 패치 이전의 세포외 영역인 N1(30-125 a.a 포함)은 NEGR1 과 성공적으로 상호작용했다. 그러나 소수성 영역을 포함하는 더 큰 구조인 N2(30-242 a.a 포함)은 NEGR1과의

결합 활성을 잃었다. 장기간 반응에도 N2가 풍부하게 포함된 분획에서 NEGR1 신호를 감지할 수 없었다. 이와 달리 3개의 이황화 결합을 포함하는 N3(30-375 a.a 포함)이 포함된 분획에서는 다시 NEGR1 신호가 감지되어 NEGR1과의 결합 활성을 갖는 것을 확인하였다.

[0065] 다른 한편으로, CD36 결합에 참여하는 NEGR1 도메인을 결정했다. 도 4C에서 보는 바와 같이, GST 융합 NEGR1 결실 구조 D1-3(40-323 a.a 포함, 서열번호 5), D1-2(40-215 a.a 포함, 서열번호 6), D2-3(141-323 a.a 포함, 서열번호 7), D1(40-136 a.a 포함, 서열번호 8), D2(141-215 a.a 포함, 서열번호 9) 및 D3(226-323 a.a 포함, 서열번호 10)를 하기 표 2와 같이 제작하였다.

표 2

| 서열번호 | 서열명칭 | 아미노산 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5    | D1-3 | FPWAAVDNMMVRKGD TAVLR CYLEDGASKGAWLNRSSI IFAGGDKWSVDPRVSI STL NKR DYSLQIQNV DVTDDG<br>PYTCSVQTQHTPRTMQVHLTVQVPPKIYD ISNDMTVNEGTNVTLTCLATGKPEPSISWRHISPSAKPFENGQYLD<br>IYGITRDQAGEYECSAENDASFPDVRKVKVVNFAPT IQEIKSGTVTPGRSGLIRCEGAGVPPPAFEWYKGEKKL<br>FNGQQGII IQNFSTRSILTVTNVTQE HFGNYTCVAANKLGT TNASLPLNPPSTAQYGI |
| 6    | D1-2 | FPWAAVDNMMVRKGD TAVLR CYLEDGASKGAWLNRSSI IFAGGDKWSVDPRVSI STL NKR DYSLQIQNV DVTDDG<br>PYTCSVQTQHTPRTMQVHLTVQVPPKIYD ISNDMTVNEGTNVTLTCLATGKPEPSISWRHISPSAKPFENGQYLD<br>IYGITRDQAGEYECSAENDASFPDV                                                                                                                    |
| 7    | D2-3 | IYD ISNDMTVNEGTNVTLTCLATGKPEPSISWRHISPSAKPFENGQYLDIYGITRDQAGEYECSAENDASFPDVR<br>KVKVVNFAPT IQEIKSGTVTPGRSGLIRCEGAGVPPPAFEWYKGEKKLFNGQQGII IQNFSTRSILTVTNVTQE<br>HFGNYTCVAANKLGT TNASLPLNPPSTAQYGI                                                                                                                  |
| 8    | D1   | FPWAAVDNMMVRKGD TAVLR CYLEDGASKGAWLNRSSI IFAGGDKWSVDPRVSI STL NKR DYSLQIQNV DVTDDG<br>PYTCSVQTQHTPRTMQVHLTV                                                                                                                                                                                                        |
| 9    | D2   | IYD ISNDMTVNEGTNVTLTCLATGKPEPSISWRHISPSAKPFENGQYLDIYGITRDQAGEYECSAENDASFPDV                                                                                                                                                                                                                                        |
| 10   | D3   | TIQEIKSGTVTPGRSGLIRCEGAGVPPPAFEWYKGEKKLFNGQQGII IQNFSTRSILTVTNVTQE HFGNYTCVAA<br>NKLGT TNASLPLNPPSTAQYGI                                                                                                                                                                                                           |

[0067] 상기 제조된 각각의 NEGR1 돌연변이와 pcDNA3-HA-CD36 플라스미드로 293T 세포를 형질감염시키고 GST 폴다운 분석한 결과를 도 4C에 나타내었다. 도 4C에서 보는 바와 같이, D3 도메인은 CD36에 대한 우수한 결합 활성을 보인 반면, D1 및 D2 도메인은 CD36과의 결합 친화도가 발견되지 않았다. D1-2도 CD36과 함께 분획화되었는데, 아마도 Ig-유사 도메인 간의 서열 유사성 때문일 수 있다.

[0068] 상기 결과를 종합하면, CD36의 N-말단 영역과 NEGR1의 C-말단 D3 도메인이 그들의 연관에서 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.

#### [0069] <실시예 4. NEGR1 및 CD36의 공동 국소화 확인>

##### [0070] 4.1 SKOV-3 세포에서 NEGR1 및 CD36의 공동 국소화

[0071] NEGR1과 CD36이 세포에 공존하는지 확인하기 위해 면역 형광 염색을 수행했다. 먼저 SKOV-3 세포를 HA-CD36 및 FLAG-NEGR1 플라스미드로 공동 형질감염시키고 항-HA 및 항-FLAG 항체로 면역염색하고 그 결과를 도 5A에 나타내었다. FLAG-NEGR1 및 HA-CD36 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 SKOV-3세포를 Triton-X-100 처리 또는 미처리하여 배양 하였다. 이후, 항-FLAG 및 항-HA 항체와 함께 인큐베이션한 다음, 항-토끼 Cy3-접합체 및 항-마우스 FITC 2차 항체와 함께 배양하였다. 이미징 분석은 Olympus BX51 현미경을 사용하여 수행하였다. 도 5A에서 보는 바와 같이, 0.1% Triton-X-100으로 세포를 투과시킨 경우(도 5A 상단), 두 단백질 모두 세포 내부에서 시각화되었으며 이러한 신호를 중첩하여보면 다음과 NEGR1과 CD36이 같은 ER 및 엔도솜과 같은 내막 시스템에 공동 국소화되는 것을 알 수 있다. 한편 0.1% Triton-X-100을 사용하지 않은 비투과성 세포에서는 NEGR1 및 CD36은 세포막, 특히 세포 경계에서 검출되었다(도 5A 하단).

##### [0072] 4.2 SKOV-3-FLAG-NEGR1 안정 세포에서 내인성 NEGR1 및 CD36 확인

[0073] 내인성 NEGR1 및 CD36의 행태를 관찰하기 위하여 Triton-X 100을 처리 또는 처리하지 않고 SKOV-3-FLAG-NEGR1 안정 세포를 사용하여 면역형광 현미경을 수행하고 그 결과를 도 5B에 나타내었다. 도 5B에서 보는 바와 같이, 두 단백질의 형광 신호는 NEGR1 및 CD36이 세포내 소기관(+Triton-X 100)과 원형질막의 외부 표면(-Triton-X 100) 모두에 공동 국소화되어 있음을 확인하였다.

#### [0074] <실시예 5. NEGR1 및 CD36의 뗏목(raft)에서의 결합 분석>

- [0075] 다음으로, HA-CD36 및 GFP-NEGR1 플라스미드로 형질감염된 293T 세포를 OptiPrep™ 구배를 사용하여 부유 선별 실험을 실시하였다. GFP 또는 GFP-NEGR1과 함께 HA-CD36 플라스미드로 293T 세포를 형질감염시킨 후, Optiprep 구배를 사용하여 부유 방법으로 막 분획을 수행했다. 형질감염된 각 세포 용해물을 32% OptiPrep이 되도록 조정하고 24% 및 20% 아이오딕산 용액으로 순차적으로 중첩시켰다. 이후, 76,000×g 로 4℃에서 18시간 동안 원심 분리하여 분획물을 위쪽부터 No. 1 분획으로 지정하여 수집하여 총 12개의 분획물을 얻었다. CD36 및 NEGR1은 각각 항-HA 및 항-GFP 항체로 시각화되었으며, 플로틸린-1(flotillin-1)은 뱃목 마커로 사용되었다.
- [0076] 그 결과, 도 5C에서 보는 바와 같이, HA-CD36와 EGFP 대조군 벡터로 공동 형질감염된 세포에서, 플로틸린-1이 검출된 No. 3 및 4 분획이 뱃목이 포함된 분획임을 확인하였다. 또한 상기 뱃목분획에서 CD36는 짧은 노출(short exposure, SE)에서는 검출되지 않았으며, 긴 노출(long exposure, LE)에서만 검출되어, CD36 단백질의 극소량만이 뱃목 분획에서 검출되는 것을 확인하였다. 이와 대조적으로, HA-CD36와 GFP-NEGR1으로 공동 형질 감염된 세포의 경우, CD36는 짧은 노출에서도 뱃목 분획에서 확인되었다. 이와 같은 결과는 NEGR1이 지질 뱃목에서 CD36과 상호작용함을 시사한다.
- [0077] <실시예 6. NEGR1의 세포 CD36 단백질 수준에 미치는 영향>
- [0078] NEGR1이 CD36 단백질 수준에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다.
- [0079] 6.1 형질 감염된 293T 세포에서 NEGR1이 CD36 단백질 수준에 미치는 영향
- [0080] HA-CD36 및 농도를 달리한 GFP-NEGR1 플라스미드를 293T 세포에 공동 형질감염시킨 후, 동일한 양의 총 단백질(30 μg)을 SDS-PAGE에 로딩하고 항-HA 항체를 사용하여 CD36 단백질을 검출하였다. 이미지의 각 CD36 밴드 강도는 ImageJ 소프트웨어(오른쪽)를 사용하여 정량화되었다.
- [0081] 도 6A에서 보는 바와 같이, HA-CD36 단백질은 글리코실화 상태가 다른 2개의 주요 밴드로 나타났으며, 두 밴드의 강도는 NEGR1 발현이 증가함에 따라 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 미성숙한 형태인 더 짧은 밴드(60 kDa 근처)는 고도로 글리코실화된 성숙한 형태(85 kDa 근처)보다 NEGR1 증가에 따라 그 발현이 더욱 크게 감소하는 것을 알 수 있었다.
- [0082] 6.2 3T3-L1-NEGR1-FLAG 안정 세포에서 NEGR1이 CD36 단백질 수준에 미치는 영향
- [0083] 이를 다시 확인하기 위해 항-CD36 항체를 사용하여 대조군 세포(벡터만으로 형질전환시킨 세포, WT) 및 3T3-L1-NEGR1-FLAG 안정 세포에서 CD36 단백질 수준을 면역블로팅 방법으로 평가하였다. 도 6B에서 보는 바와 같이, NEGR1이 과발현되는 3T3-L1-NEGR1-FLAG 안정 세포의 CD36 수준은 대조군 세포(WT)에 비해 46% 이하로 감소하였다
- [0084] 6.3 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF에서 CD36 단백질 수준 확인
- [0085] NEGR1 결핍(NEGR1<sup>-/-</sup>) 마우스 13.5일차 배아로부터 얻은 섬유아세포(Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF) (Kim, H. et al., 2017) 에서 NEGR1 수준에 따른 CD36의 발현을 조사하였다. 대조군 세포 및 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF를 0.1mM 올레산이 포함되거나 포함되지 않은 배지에서 24시간 동안 사전 배양한 후, 항-CD36 항체를 사용하여 CD36 단백질 수준을 면역블로팅 방법으로 평가하였다. 내인성 CD36 및 NEGR1은 각 항 CD36 항체 및 항 NEGR1 항체로 시각화되었다. 도 6C에서 보는 바와 같이, 대표적 지방산인 올레산 첨가 유무와 상관없이 대조군 MEF세포에 비해 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF에서 CD36 단백질 수준이 현저히 증가함을 확인할 수 있었으며 이로써 NEGR1이 CD36 단백질 수준을 음성적으로 조절한다는 사실을 증명할 수 있었다.
- [0086] 6.4 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스에서 CD36 단백질 수준 확인
- [0087] 6.4.1 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스 WAT에서 CD36 단백질 수준 확인
- [0088] 다음으로, Negr1<sup>-/-</sup> 마우스의 부고환 WAT에서 CD36 단백질 수준을 조사하였다. 대조군(WT) 마우스 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스를 해부하여 부고환 WAT를 적출하고, 면역 블로팅을 실시하였다. 면역 블로팅은 항-CD36 항체 및 항 NEGR1으로 수행되었으며, 대조군(WT) 마우스 및 Negr1<sup>-/-</sup> 마우스 부고환 WAT의 CD36 발현량은 ImageJ를 사용하여 정량화되고 빈쿨린(Vinculin)으로 표준화하여 도 7A에 나타내었다. 도 7A에서 보는 바와 같이, Negr1<sup>-/-</sup> 마우스 부고환 WAT의 CD36 단백질 수준은 WT 마우스와 비교하여 약 1.3배 증가하였다.

- [0089] WT 마우스 및  $Negr1^{-/-}$  마우스 부고환 WAT의 CD36 발현량을 면역염색으로 확인하였다. 항 CD36 항체로 WAT 조직 섹션을 면역염색하고 그 결과를 도 7B에 나타내었다. 도 7B에서 보는 바와 같이,  $Negr1^{-/-}$  마우스 부고환 WAT의 CD36 발현량이 WT 마우스의 부고환 WAT의 CD36 발현량과 비교하여 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0090] **6.4.2 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스 간에서 CD36 단백질 수준 확인**
- [0091] 상기 실시예 6.4.1과 동일한 방법으로 대조군(WT) 마우스 및  $Negr1^{-/-}$  마우스의 간 조직에서 CD36 단백질 수준을 확인하고 그 결과를 도 7C 및 도 7D에 나타내었다. 도 7C 및 도 7D에서 보는 바와 같이, 면역블롯팅(도 7C)에서  $Negr1^{-/-}$  마우스의 CD36 발현량은 WT 마우스의 신호의 약 2.2배였으며, 조직 섹션 염색(도 7D)에서도  $Negr1^{-/-}$  마우스 간조직의 CD36 단백질 수준이 대조군(WT) 마우스보다 높은 것이 확인되었다.
- [0092] 이러한 결과를 통하여, CD36 단백질 수준이 NEGR1 결핍 세포에서 증가되었음을 확인할 수 있었다.
- [0093] **<실시예 7. NEGR1이 지방산 흡수 및 활성산소(ROS) 수준에 미치는 영향 확인>**
- [0094] **7.1 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스의 지방산 흡수**
- [0095] NEGR1<sup>-/-</sup> 세포에서 CD36 발현이 증가한 상기 결과에 기초하여, NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스에서 나타난 지방 축적이 CD36와 관련된 지방산 흡수 증가와 관련되었는지 평가하였다.
- [0096] 대조군(WT) 마우스 및 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스로부터 부고환 WAT를 적출하여 1차 지방세포를 분리한 후, 유리 지방산 흡수 검정 키트(Fatty Acid Uptake Assay Kit, ab176768, Fluorometric, Abcam, UK)로 제조사의 방법에 따라 지방산 흡수율을 측정하였다. 485/515 nm에서 형광 마이크로플레이트 판독기 FlexStation 3을 사용하여 40분동안 형광 신호를 측정하여 도 8A에 나타내었다. 이미징은 Olympus BX51 현미경을 사용하여 수행되었다. 도 8A에서 보는 바와 같이, NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스 부고환 WAT의 지방세포는 지방산 흡수가 WT보다 ~1.5배 더 높게 나타났다( $p=0.000008$ ).
- [0097] 또한, WT 및 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스의 1차 지방세포를 0.1mM 올레산의 존재하에 24시간 동안 인큐베이션하고 지질 방울을 BODIPY 493/503 염색으로 시각화한 결과, 도 8B에서 보는 바와 같이, NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스의 지방세포는 WT 마우스보다 높은 지질 함량을 나타내었다. 이를 통해 NEGR1<sup>-/-</sup> 마우스에서 지방산 흡수 및 저장이 증가된 것을 확인하였다.
- [0098] **7.2 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF의 ROS 수준 조사**
- [0099] 지방산 활용이 종종 세포 산화 스트레스 생성과 관련되어 있다는 점을 고려하여 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF에서 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 수준을 확인하였다. WT 및 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF를  $H_2O_2$  0, 100, 150 및 200  $\mu M$ , 또는 올레산(Oleic acid, OA) 0, 50 및 100  $\mu M$ 과 함께 24시간 배양한 후, DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit(ab113851, Abcam, UK)를 제조사의 프로토콜에 따라 ROS 수준을 조사하였다. 형광 신호는 485/515 nm에서 측정되었으며, 그 결과를 도 8C 및 도 8D에 나타내었다.
- [0100] 도 8C 및 도 8D에서 보는 바와 같이, WT 및 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF의 ROS 수준은 정상 조건( $H_2O_2$  0  $\mu M$ )에서는 차이가 없었으나,  $H_2O_2$  또는 올레산을 첨가하는 경우, NEGR1<sup>-/-</sup> MEF의 ROS 수준이 WT 세포의 ROS 수준보다 더 많이 증가했다. 이러한 차이는  $H_2O_2$  또는 올레산의 농도가 증가함에 따라 점차 커져 150  $\mu M$   $H_2O_2$ 에서 ~1.2배( $p=0.00002$ ), 올레산 100  $\mu M$ 에서는 더욱 크게 증가하였다. 이러한 결과는 NEGR1 결핍 세포가 더 높은 수준의 산화 스트레스를 갖는다는 것을 시사한다.
- [0101] **7.3 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF의 AMP-활성 단백질 인산화효소(AMP-activated protein kinase, AMPK)의 활성 조사**
- [0102] AMPK 활성화가 지방산 이용 및 세포 산화 스트레스와 밀접한 관련이 있는 점에서, NEGR1<sup>-/-</sup> MEF에서 AMPK의 활성화를 조사했다. 상기 실시예 7.2와 동일한 방법으로 WT 및  $Negr1^{-/-}$  MEF의 배양배지에 0 또는 0.1mM 올레산을 첨

가하고 24시간 동안 인큐베이션한 후 항 CD36 항체, 항 pAMPK 항체 및 항 AMPK 항체를 이용하여 면역블롯팅으로 검출하였다. 도 8E에서 보는 바와 같이, 정상적인 배양 조건에서 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF의 p-AMPK 수준은 CD36 단백질 수준의 상승에도 불구하고 WT 세포의 그것보다 낮았으며, 0.1mM 올레산과 함께 배양한 경우, CD36과 p-AMPK 수준이 모두 상향 조절되었다. 그러나 활성화된 AMPK 비율(pAMPK/AMPK)은 NEGR1<sup>-/-</sup> MEF에서 여전히 낮았으며, 이는 CD36 수준과 반비례했다. 종합적으로, 상기 결과는 증가된 산화 스트레스에도 불구하고 AMPK 활성화가 NEGR1이 고갈된 세포에서 약화되었음을 시사한다.

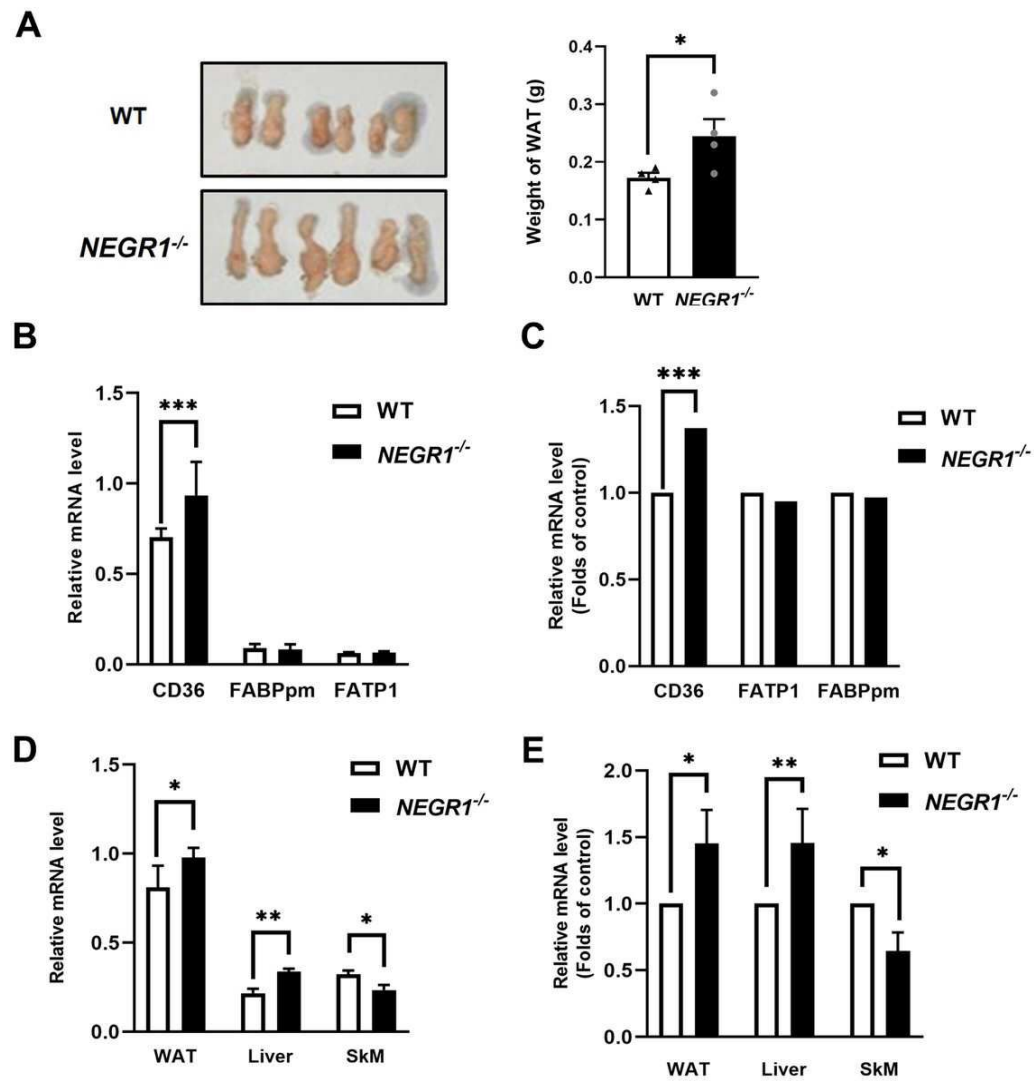
[0103] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 NEGR1 결손 마우스에서 지방조직이 증가하였으며, 특히 간 및 지방 조직에서 CD36의 mRNA와 단백질 수준이 모두 증가하는 점에서 착안하여 NEGR1과 CD36의 영향을 연구하는 과정에서 NEGR1과 CD36의 상호작용을 처음으로 규명하였다. 또한, NEGR1과 CD36의 상호작용에 관여하는 각 NEGR1과 CD36의 아미노산 서열을 최초로 확인하였다.

[0104] 즉, CD36은 세포 내부에 N 말단과 C 말단이 모두 있는 머리핀 모양을 포함하는 통합 막 단백질로, CD36 ECD(30-439 a.a) 뿐만 아니라, 작은 N-말단 단편N1(30-125 a.a)으로 NEGR1과의 상호작용에 충분하다는 것을 보여주었다.

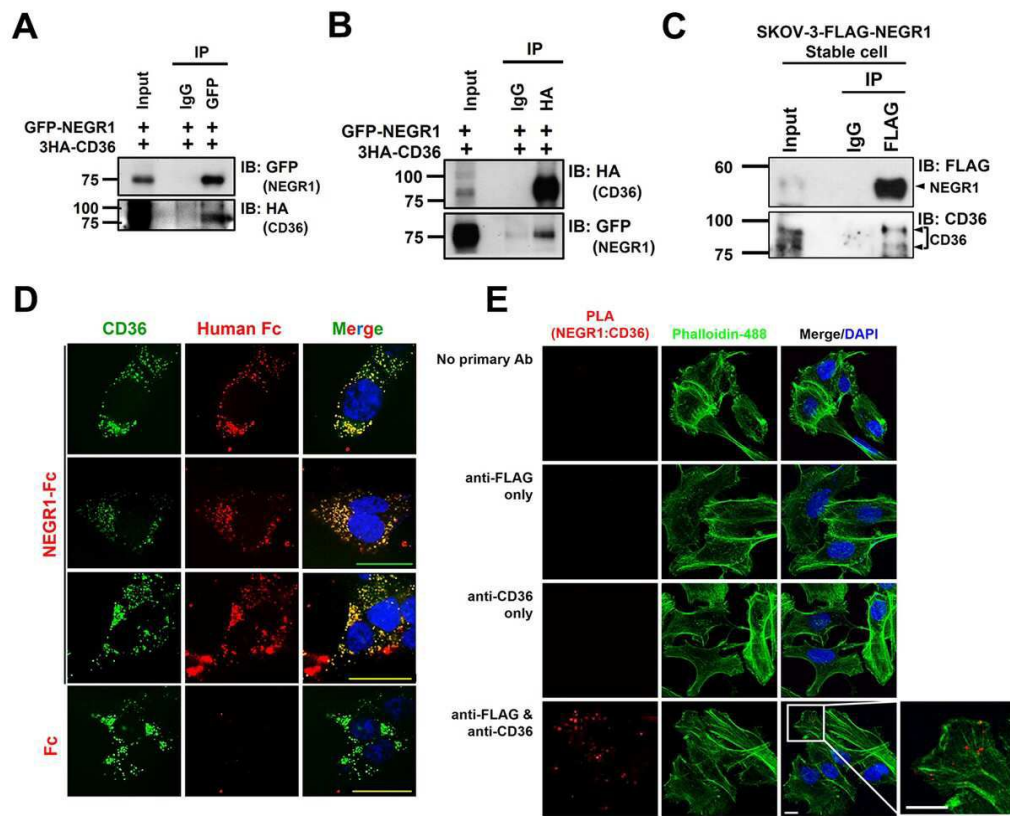
[0105] 또한 CD36 결합에 참여하는 NEGR1 서열 연구에서 GST 융합 NEGR1 결실 구조 D1-3(40-323 a.a), D1-2(40-215 a.a), D2-3(141-323 a.a), D1(40-136 a.a), D2(141-215 a.a) 및 D3(226-323 a.a) 중, D3 단편이 CD36에 대한 우수한 결합 활성을 보임으로써 98개의 아미노산 서열만으로 CD36과 상호작용을 통해 CD36 관련 질환을 조절할 수 있음을 확인하였다. 특히, NEGR1 활용을 통하여 CD36과 관련된 지방산의 수송과 축적을 감소시킴으로써 비만의 예방 또는 치료에 활용할 수 있다.

도면

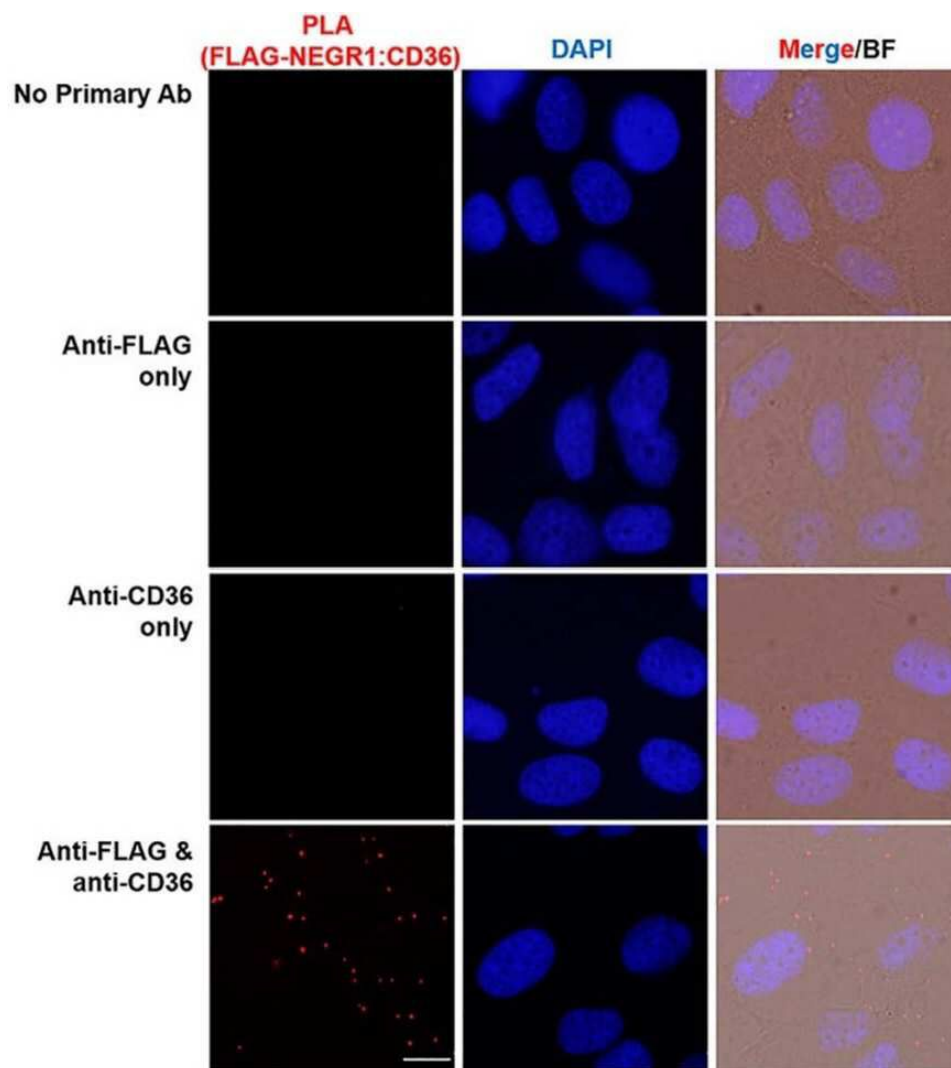
도면1



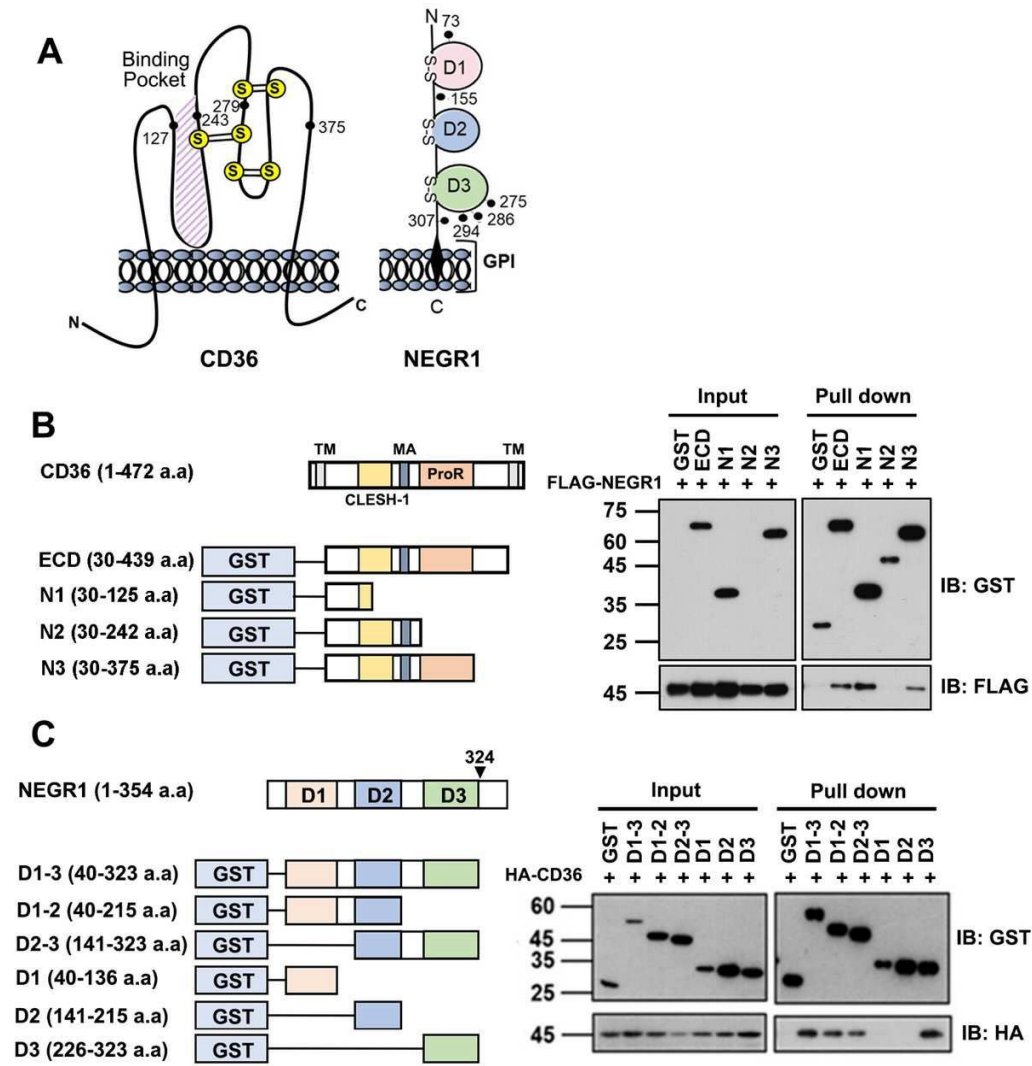
도면2



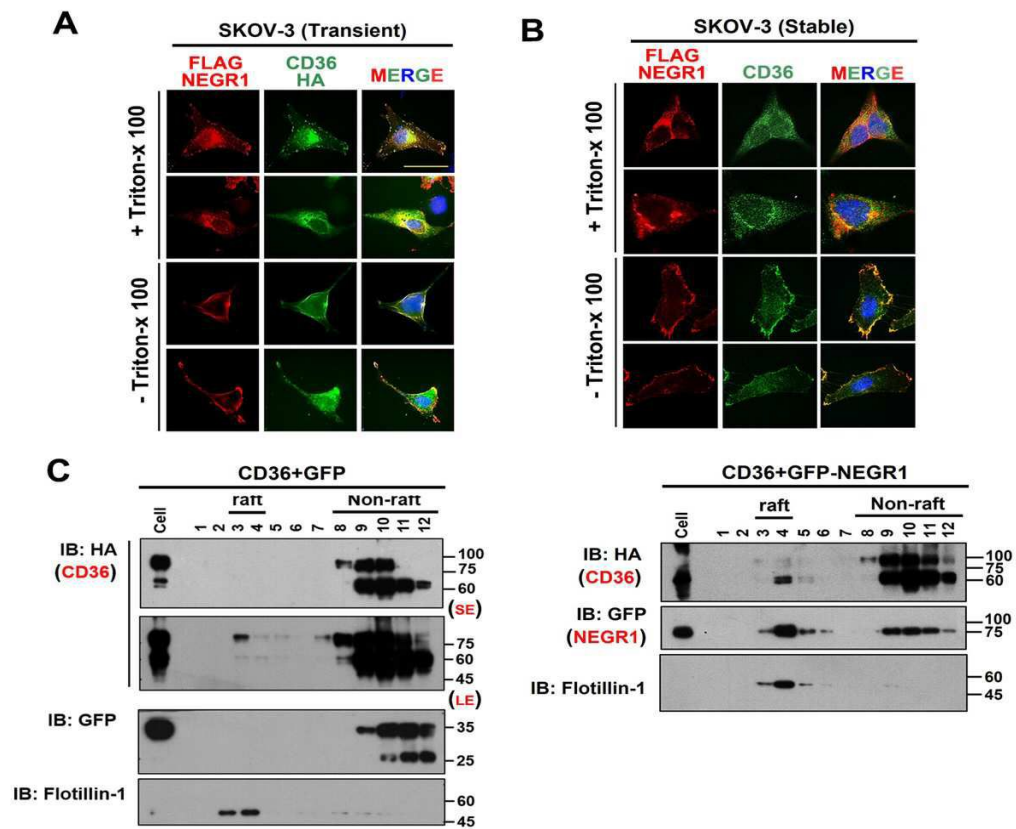
도면3



도면4

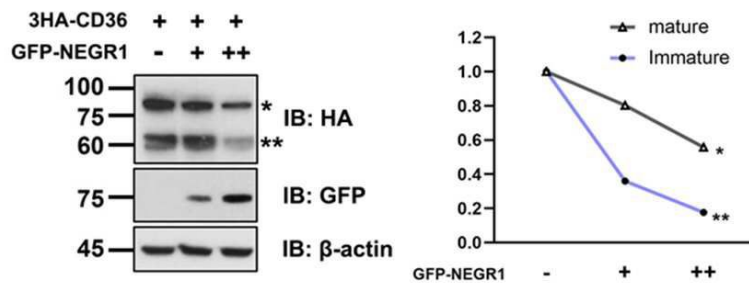


도면5

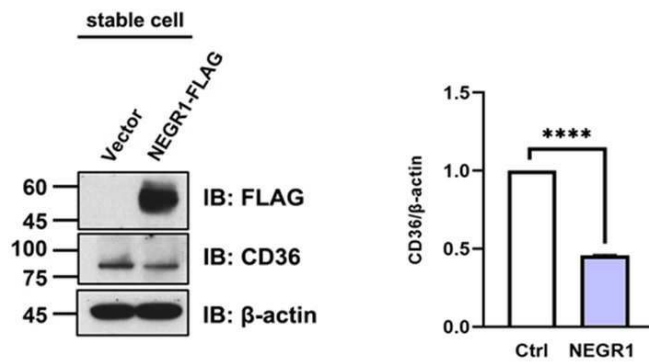


도면6

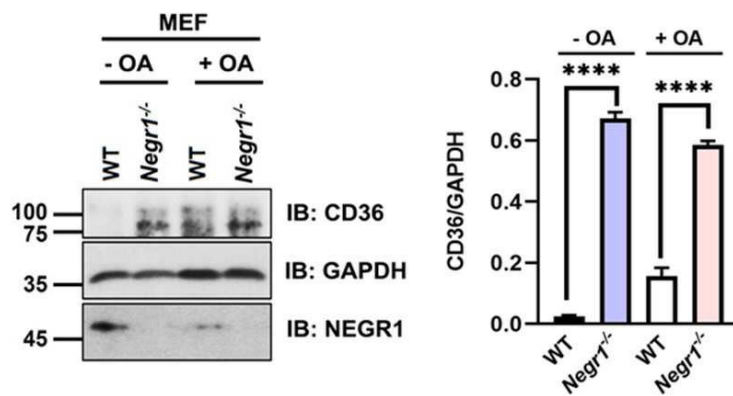
A



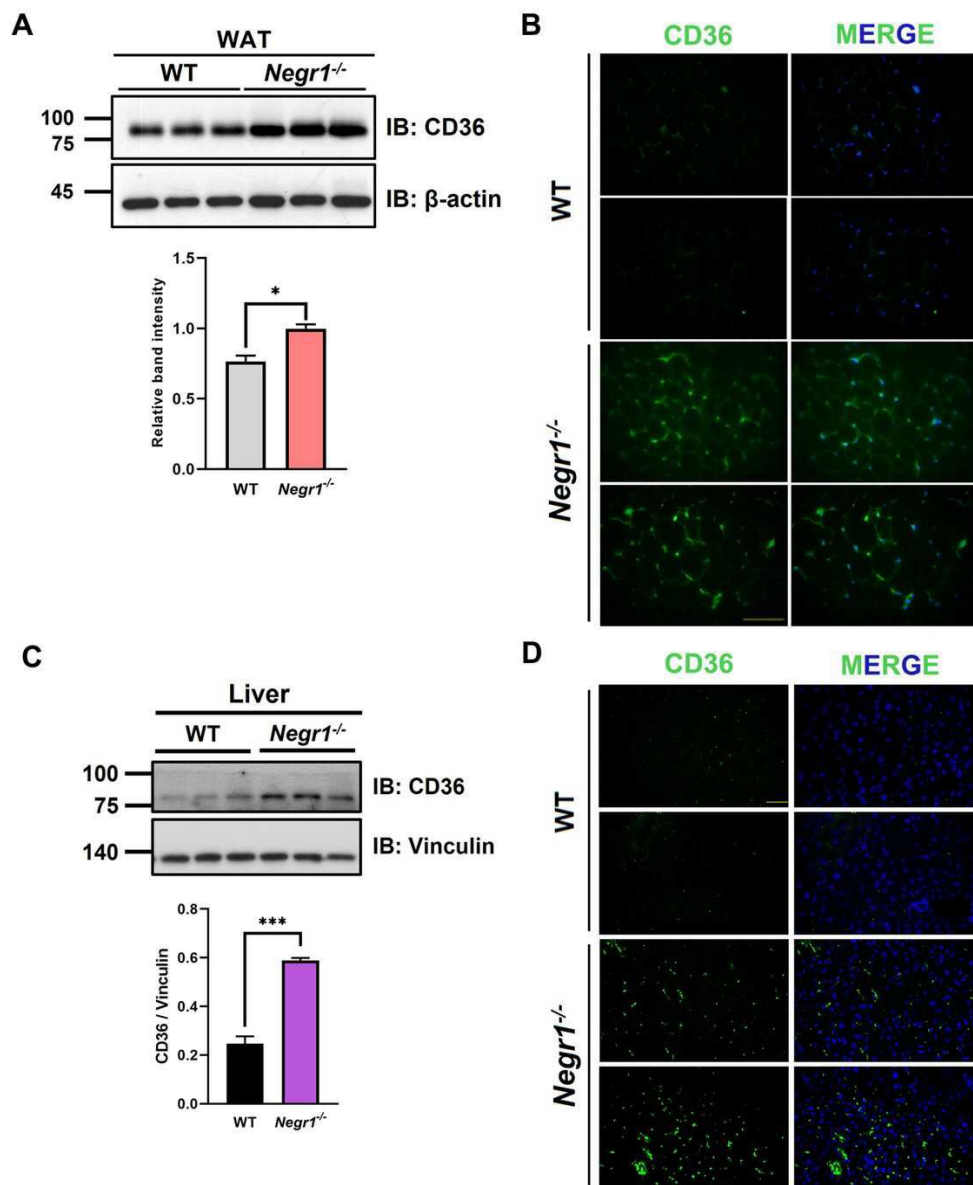
B



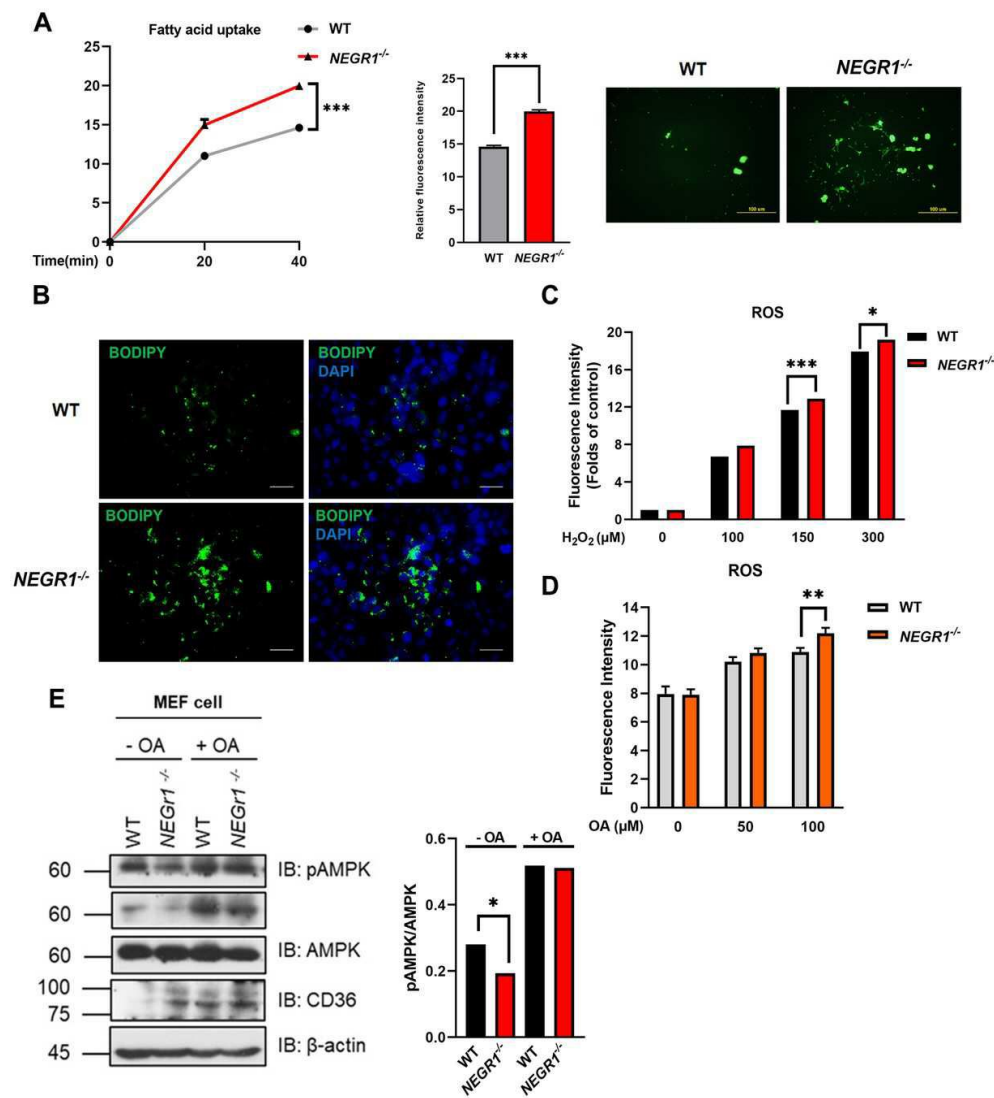
C



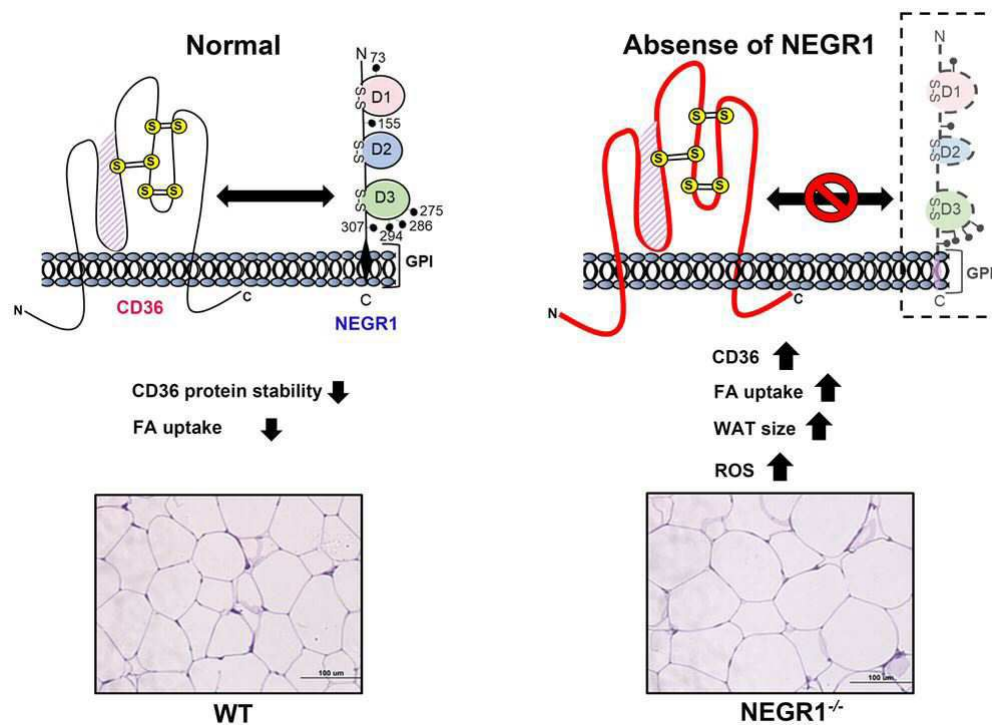
도면7



도면8



도면9



## 서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for preventing or treating of obesity comprising peptides derived from Neuronal growth regulator 1(NEGR1)

<130> DPC-22-0029

<160> 10

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 410

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Asp Leu Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu

1 5 10 15

Glu Gly Thr Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val

20 25 30

Tyr Arg Gln Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met

35 40 45

Met Asn Ser Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr

50                      55                      60  
 Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp  
 65                      70                      75                      80  
 Asn Thr Val Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser  
                          85                      90                      95  
  
 Leu Ser Val Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala  
                          100                      105                      110  
 Val Ala Ala Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile  
                          115                      120                      125  
 Leu Asn Ser Leu Ile Asn Lys Ser Lys Ser Ser Met Phe Gln Val Arg  
                          130                      135                      140  
 Thr Leu Arg Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Arg Asp Pro Phe Leu Ser Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Val Pro Tyr Pro Val Thr Thr Thr Val Gly Leu Phe Tyr Pro Tyr Asn  
  
                          165                      170                      175  
 Asn Thr Ala Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile  
                          180                      185                      190  
 Ser Lys Val Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu Ser  
                          195                      200                      205  
 Tyr Trp Glu Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala Ser  
                          210                      215                      220  
 Phe Pro Pro Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser Ser  
 225                      230                      235                      240  
  
 Asp Ile Cys Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe Glu Ser Asp Val Asn Leu  
                          245                      250                      255  
 Lys Gly Ile Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu Pro Ser Lys Ala Phe Ala  
                          260                      265                      270  
 Ser Pro Val Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys Phe Cys Thr Glu Lys Ile  
                          275                      280                      285  
 Ile Ser Lys Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Ile Ser Lys Cys  
                          290                      295                      300

Lys Glu Gly Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu Pro His Phe Leu Tyr Ala

305 310 315 320

Ser Pro Asp Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly Leu Asn Pro Asn Glu Glu

325 330 335

Glu His Arg Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro Ile Thr Gly Phe Thr Leu

340 345 350

Gln Phe Ala Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu Leu Val Lys Pro Ser Glu

355 360 365

Lys Ile Gln Val Leu Lys Asn Leu Lys Arg Asn Tyr Ile Val Pro Ile

370 375 380

Leu Trp Leu Asn Glu Thr Gly Thr Ile Gly Asp Glu Lys Ala Asn Met

385 390 395 400

Phe Arg Ser Gln Val Thr Gly Lys Ile Asn

405 410

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Asp Leu Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu

1 5 10 15

Glu Gly Thr Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val

20 25 30

Tyr Arg Gln Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met

35 40 45

Met Asn Ser Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr

50 55 60

Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp

65 70 75 80

Asn Thr Val Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser

85 90 95

Leu Ser Val Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala

100 105 110

Val Ala Ala Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val

115 120 125

<210> 3

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Asp Leu Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu

1 5 10 15

Glu Gly Thr Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val

20 25 30

Tyr Arg Gln Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met

35 40 45

Met Asn Ser Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr

50 55 60

Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp

65 70 75 80

Asn Thr Val Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser

85 90 95

Leu Ser Val Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala

100 105 110

Val Ala Ala Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile

115 120 125

Leu Asn Ser Leu Ile Asn Lys Ser Lys Ser Ser Met Phe Gln Val Arg

130 135 140

Thr Leu Arg Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Arg Asp Pro Phe Leu Ser Leu

145 150 155 160

Val Pro Tyr Pro Val Thr Thr Thr Val Gly Leu Phe Tyr Pro Tyr Asn

165 170 175

Asn Thr Ala Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile

180 185 190  
Ser Lys Val Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu Ser  
195 200 205  
Tyr Trp Glu Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala Ser  
210 215 220  
Phe Pro Pro Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser Ser  
225 230 235 240  
Asp Ile

<210> 4  
<211> 375  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
Gly Asp Leu Leu Ile Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Glu  
1 5 10 15  
Glu Gly Thr Ile Ala Phe Lys Asn Trp Val Lys Thr Gly Thr Glu Val  
20 25 30  
Tyr Arg Gln Phe Trp Ile Phe Asp Val Gln Asn Pro Gln Glu Val Met  
35 40 45  
Met Asn Ser Ser Asn Ile Gln Val Lys Gln Arg Gly Pro Tyr Thr Tyr  
50 55 60  
Arg Val Arg Phe Leu Ala Lys Glu Asn Val Thr Gln Asp Ala Glu Asp  
65 70 75 80  
Asn Thr Val Ser Phe Leu Gln Pro Asn Gly Ala Ile Phe Glu Pro Ser  
85 90 95  
Leu Ser Val Gly Thr Glu Ala Asp Asn Phe Thr Val Leu Asn Leu Ala  
100 105 110  
Val Ala Ala Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe Val Gln Met Ile  
115 120 125  
Leu Asn Ser Leu Ile Asn Lys Ser Lys Ser Ser Met Phe Gln Val Arg

130                                      135                                      140  
 Thr Leu Arg Glu Leu Leu Trp Gly Tyr Arg Asp Pro Phe Leu Ser Leu  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Val Pro Tyr Pro Val Thr Thr Thr Val Gly Leu Phe Tyr Pro Tyr Asn  
 165                                      170                                      175  
 Asn Thr Ala Asp Gly Val Tyr Lys Val Phe Asn Gly Lys Asp Asn Ile  
 180                                      185                                      190  
 Ser Lys Val Ala Ile Ile Asp Thr Tyr Lys Gly Lys Arg Asn Leu Ser  
 195                                      200                                      205  
 Tyr Trp Glu Ser His Cys Asp Met Ile Asn Gly Thr Asp Ala Ala Ser  
  
 210                                      215                                      220  
 Phe Pro Pro Phe Val Glu Lys Ser Gln Val Leu Gln Phe Phe Ser Ser  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Asp Ile Cys Arg Ser Ile Tyr Ala Val Phe Glu Ser Asp Val Asn Leu  
 245                                      250                                      255  
 Lys Gly Ile Pro Val Tyr Arg Phe Val Leu Pro Ser Lys Ala Phe Ala  
 260                                      265                                      270  
 Ser Pro Val Glu Asn Pro Asp Asn Tyr Cys Phe Cys Thr Glu Lys Ile  
 275                                      280                                      285  
  
 Ile Ser Lys Asn Cys Thr Ser Tyr Gly Val Leu Asp Ile Ser Lys Cys  
 290                                      295                                      300  
 Lys Glu Gly Arg Pro Val Tyr Ile Ser Leu Pro His Phe Leu Tyr Ala  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Ser Pro Asp Val Ser Glu Pro Ile Asp Gly Leu Asn Pro Asn Glu Glu  
 325                                      330                                      335  
 Glu His Arg Thr Tyr Leu Asp Ile Glu Pro Ile Thr Gly Phe Thr Leu  
 340                                      345                                      350  
 Gln Phe Ala Lys Arg Leu Gln Val Asn Leu Leu Val Lys Pro Ser Glu  
  
 355                                      360                                      365  
 Lys Ile Gln Val Leu Lys Asn  
 370                                      375

<210> 5  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Phe Pro Trp Ala Ala Val Asp Asn Met Met Val Arg Lys Gly Asp Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Val Leu Arg Cys Tyr Leu Glu Asp Gly Ala Ser Lys Gly Ala Trp  
 20 25 30  
 Leu Asn Arg Ser Ser Ile Ile Phe Ala Gly Gly Asp Lys Trp Ser Val  
 35 40 45  
 Asp Pro Arg Val Ser Ile Ser Thr Leu Asn Lys Arg Asp Tyr Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Ile Gln Asn Val Asp Val Thr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Cys Ser  
 65 70 75 80  
 Val Gln Thr Gln His Thr Pro Arg Thr Met Gln Val His Leu Thr Val  
 85 90 95  
 Gln Val Pro Pro Lys Ile Tyr Asp Ile Ser Asn Asp Met Thr Val Asn  
 100 105 110  
 Glu Gly Thr Asn Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Thr Gly Lys Pro Glu  
 115 120 125  
 Pro Ser Ile Ser Trp Arg His Ile Ser Pro Ser Ala Lys Pro Phe Glu  
 130 135 140  
 Asn Gly Gln Tyr Leu Asp Ile Tyr Gly Ile Thr Arg Asp Gln Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Tyr Glu Cys Ser Ala Glu Asn Asp Ala Ser Phe Pro Asp Val Arg  
 165 170 175  
 Lys Val Lys Val Val Val Asn Phe Ala Pro Thr Ile Gln Glu Ile Lys  
 180 185 190  
 Ser Gly Thr Val Thr Pro Gly Arg Ser Gly Leu Ile Arg Cys Glu Gly  
 195 200 205  
 Ala Gly Val Pro Pro Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Lys Lys

210 215 220  
 Leu Phe Asn Gly Gln Gln Gly Ile Ile Ile Gln Asn Phe Ser Thr Arg  
 225 230 235 240  
 Ser Ile Leu Thr Val Thr Asn Val Thr Gln Glu His Phe Gly Asn Tyr  
 245 250 255  
 Thr Cys Val Ala Ala Asn Lys Leu Gly Thr Thr Asn Ala Ser Leu Pro

260 265 270  
 Leu Asn Pro Pro Ser Thr Ala Gln Tyr Gly Ile

275 280

<210> 6  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Phe Pro Trp Ala Ala Val Asp Asn Met Met Val Arg Lys Gly Asp Thr

1 5 10 15

Ala Val Leu Arg Cys Tyr Leu Glu Asp Gly Ala Ser Lys Gly Ala Trp

20 25 30

Leu Asn Arg Ser Ser Ile Ile Phe Ala Gly Gly Asp Lys Trp Ser Val

35 40 45

Asp Pro Arg Val Ser Ile Ser Thr Leu Asn Lys Arg Asp Tyr Ser Leu

50 55 60

Gln Ile Gln Asn Val Asp Val Thr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Cys Ser

65 70 75 80

Val Gln Thr Gln His Thr Pro Arg Thr Met Gln Val His Leu Thr Val

85 90 95

Gln Val Pro Pro Lys Ile Tyr Asp Ile Ser Asn Asp Met Thr Val Asn

100 105 110

Glu Gly Thr Asn Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Thr Gly Lys Pro Glu

115 120 125

Pro Ser Ile Ser Trp Arg His Ile Ser Pro Ser Ala Lys Pro Phe Glu

130 135 140

Asn Gly Gln Tyr Leu Asp Ile Tyr Gly Ile Thr Arg Asp Gln Ala Gly  
145 150 155 160  
Glu Tyr Glu Cys Ser Ala Glu Asn Asp Ala Ser Phe Pro Asp Val  
165 170 175  
<210> 7  
<211> 182  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 7  
Ile Tyr Asp Ile Ser Asn Asp Met Thr Val Asn Glu Gly Thr Asn Val  
1 5 10 15  
Thr Leu Thr Cys Leu Ala Thr Gly Lys Pro Glu Pro Ser Ile Ser Trp  
20 25 30  
Arg His Ile Ser Pro Ser Ala Lys Pro Phe Glu Asn Gly Gln Tyr Leu  
35 40 45  
Asp Ile Tyr Gly Ile Thr Arg Asp Gln Ala Gly Glu Tyr Glu Cys Ser  
50 55 60  
Ala Glu Asn Asp Ala Ser Phe Pro Asp Val Arg Lys Val Lys Val Val  
65 70 75 80  
Val Asn Phe Ala Pro Thr Ile Gln Glu Ile Lys Ser Gly Thr Val Thr  
85 90 95  
Pro Gly Arg Ser Gly Leu Ile Arg Cys Glu Gly Ala Gly Val Pro Pro  
100 105 110  
Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Lys Lys Leu Phe Asn Gly Gln  
115 120 125  
Gln Gly Ile Ile Ile Gln Asn Phe Ser Thr Arg Ser Ile Leu Thr Val  
130 135 140  
Thr Asn Val Thr Gln Glu His Phe Gly Asn Tyr Thr Cys Val Ala Ala  
145 150 155 160  
Asn Lys Leu Gly Thr Thr Asn Ala Ser Leu Pro Leu Asn Pro Pro Ser  
165 170 175  
Thr Ala Gln Tyr Gly Ile

180  
 <210> 8  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 Phe Pro Trp Ala Ala Val Asp Asn Met Met Val Arg Lys Gly Asp Thr  
 1 5 10 15

Ala Val Leu Arg Cys Tyr Leu Glu Asp Gly Ala Ser Lys Gly Ala Trp  
 20 25 30  
 Leu Asn Arg Ser Ser Ile Ile Phe Ala Gly Gly Asp Lys Trp Ser Val  
 35 40 45  
 Asp Pro Arg Val Ser Ile Ser Thr Leu Asn Lys Arg Asp Tyr Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Ile Gln Asn Val Asp Val Thr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Cys Ser  
 65 70 75 80  
 Val Gln Thr Gln His Thr Pro Arg Thr Met Gln Val His Leu Thr Val

85 90 95  
 <210> 9  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 Ile Tyr Asp Ile Ser Asn Asp Met Thr Val Asn Glu Gly Thr Asn Val  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Cys Leu Ala Thr Gly Lys Pro Glu Pro Ser Ile Ser Trp  
 20 25 30  
 Arg His Ile Ser Pro Ser Ala Lys Pro Phe Glu Asn Gly Gln Tyr Leu  
 35 40 45  
 Asp Ile Tyr Gly Ile Thr Arg Asp Gln Ala Gly Glu Tyr Glu Cys Ser  
 50 55 60  
 Ala Glu Asn Asp Ala Ser Phe Pro Asp Val

65 70

<210> 10

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Ile Gln Glu Ile Lys Ser Gly Thr Val Thr Pro Gly Arg Ser Gly  
1 5 10 15  
Leu Ile Arg Cys Glu Gly Ala Gly Val Pro Pro Pro Ala Phe Glu Trp  
20 25 30  
Tyr Lys Gly Glu Lys Lys Leu Phe Asn Gly Gln Gln Gly Ile Ile Ile  
35 40 45  
Gln Asn Phe Ser Thr Arg Ser Ile Leu Thr Val Thr Asn Val Thr Gln  
50 55 60  
Glu His Phe Gly Asn Tyr Thr Cys Val Ala Ala Asn Lys Leu Gly Thr  
65 70 75 80  
Thr Asn Ala Ser Leu Pro Leu Asn Pro Pro Ser Thr Ala Gln Tyr Gly  
85 90 95  
Ile