



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0085167
(43) 공개일자 2022년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0175009
(22) 출원일자 2020년12월15일
심사청구일자 2020년12월15일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
제재영
부산광역시 남구 신선로 566, 304동 401호
(74) 대리인
김성현

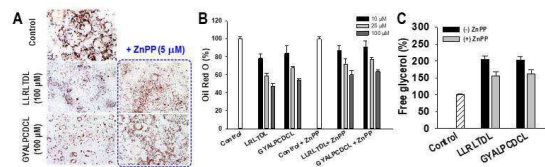
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 꼬막단백질 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 지방세포분화 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 꼬막단백질로부터 분리한 펩타이드 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방세포분화 억제용 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 지방세포분화 억제용 조성물을 개시한다. heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시킴으로써 지방세포분화를 억제 및 지방분해를 촉진하는 꼬막단백질 유래 펩타이드를 함유하는 지방세포분화 억제용 조성물과 지방세포분화 억제방법을 개시하고 있다. 본 발명에 따르면 꼬막단백질 유래 펩타이드가 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현시켜 지방세포분화에 관여하는 전사인자의 발현을 억제하며 지방세포에서 지방분해를 촉진하여 세포내 지방의 과잉 축적을 억제할 수 있어 지방세포분화 억제 및 비만개선의 효과를 얻을 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 3/04 (2018.01)

C07K 14/43504 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110218
과제번호	2019R1A2C1005348
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	수산물 유래 HO-1/Nrf2 신호전달 활성화를 통한 지방세포분화 조절 및 항비만 신소
재 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방세포분화 억제용 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 새꼬막으로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 펩타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 를 억제하여 지방세포분화를 조절하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 펩타이드.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 p-AMPK 활성화에 의하여 지방분해를 촉진하는 것을 특징으로 하는 지방세포분화 억제용 펩타이드.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 지방세포분화 억제용 펩타이드 조성물.

청구항 7

서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방분해 촉진용 펩타이드.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 펩타이드는 새꼬막(*Scapharca subcrenata*)으로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 지방분해 촉진용 펩타이드.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 펩타이드는 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 지방분해 촉진용 펩타이드.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 펩타이드는 p-AMPK 활성화에 의하여 지방분해를 촉진하는 것을 특징으로 하는 지방분해 촉진용 펩타이드.

청구항 11

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 지방분해 촉진용 펩타이드 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방세포분화 억제용 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시킴으로써 지방세포분화를 억제 및 지방분해를 촉진하는 꼬막단백질 유래 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방세포분화 억제용 펩타이드 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 하는 지방세포분화 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 음식물의 섭취(food intake)와 에너지의 사용(energy expenditure)의 불균형으로 초래되는 질병으로, 염증, 제2형 당뇨병 및 동맥경화 등 심각한 질병을 동반할 수 있다. 최근 대사증후군(metabolic syndrome)으로 부르게 되었으며, 이런 성인병들은 사회적으로 가장 왕성하게 활동하는 사람들에게서 발병하기 때문에 경제적인 손실도 상당할 뿐만 아니라, 이의 예방과 치료를 위해 들이는 비용은 의약학 및 건강 산업의 최고액에 다다를 정도의 수준이다.

[0003] 종래부터 비만의 예방과 개선에 대해서는 식사제한, 과잉 에너지의 흡수 지연 및 저해, 혹은 소화관에서의 당질 흡수 저해물질의 탐색 등 섭취 에너지를 제한하기 위한 다양한 연구가 이루어져 왔다. 그러나, 에너지 섭취의 제한은 기초대사량을 저하시키는 요인도 되므로, 비만이 개선되지 않는 경우도 있다. 따라서, 비만을 해소하기 위해서는 축적된 지방을 적극적으로 대사, 분해하여 열에너지로서 발산하는 것이 이상적이다. 이에, 근래 식품 소재 중에서 지방분해 촉진작용을 갖는 기능성 성분의 탐색이 활발하게 이루어져 많은 지방분해촉진제 및 음식품이 제안되고 있다.

[0004] 항비만 치료제 개발은 주로 당질의 소화에 관여하는 아밀라아제나 α -글루코시다제에 대한 저해기능을 갖는 소화흡수 억제제, 식욕억제제, 및 체내에 축적된 체지방의 대사를 조절하기 위한 지방대체제, 지방대사 개선제, 및 혈당 감소제를 기반으로 한 저분자 합성 화합물이 주를 이루고 있다.

[0005] 이들 치료제들은 대부분이 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제시키는 약물로써 경구투여의 이점이 있지만 미미한 체중 감소효과, 요요현상 및 항정신성 의약품으로 남용 가능성에 주의가 필요한 단점이 있다.

[0006] 지방조직의 분화는 근육세포 분화나 신경세포 분화와는 달리 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다. 지방전구세포가 지방세포로 분화해 나가는 과정에는 세포의 형태적 변화와 유전자 발현양상의 변화 등이 함께 일어난다. 대부분의 경우 이러한 변화는 전사단계에서 각 유전자의 발현량의 변화를 나타내는데, 지방세포의 분화조절은 C/EBP, PPAR, γ /RXR, ADD1/SREBP 1C라고 불리는 전사인자(transcription factor)가 중추적인 역할을 담당하고 있다. 이들 전사인자는 지방세포 분화 과정 중 각기 다른 시점에서 발현이 유도되며 서로 상호작용을 통하여 여러 지방세포 특이유전자들의 발현을 조절하고, 지방대사의 활성화와 지방세포 분화를 점진적으로 유도해 나간다.

[0007] 최근에는 기존 치료제의 부작용을 회피할 수 있는 펩타이드를 이용한 제제개발이 활발히 진행되고 있으며 다양한 분자 targets을 활용한 비만치료제가 개발되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1981393

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2017-0079132

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 지방세포분화에 관여하는 전사인자의 발현을 억제하며 지방세포에서 지방분해를 촉진하여 세포내 지방의 과잉 축적을 억제하는 지방세포분화 억제용 펩타이드 및 지방분해 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 꼬막단백질 유래의 펩타이드를 이용하여 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시킴으로써 지방세포분화 억제용 및 지방분해 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명은,
- [0012] 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방세포분화 억제용 펩타이드를 제공한다.
- [0013] 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방분해 촉진용 펩타이드를 제공한다.
- [0014] 상기 펩타이드는 새꼬막(*Scapharca subcrenata*)으로부터 유래하는 것이 바람직하다.
- [0015] 상기 펩타이드에 의하여 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시키고 β -catenin의 활성화를 유도하여 지방세포분화를 억제할 수 있다.
- [0016] 상기 펩타이드는 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 를 억제하여 지방세포분화를 조절할 수 있다.
- [0017] 상기 펩타이드는 p-AMPK를 활성화하여 지방분해를 촉진할 수 있다.
- [0018] 상기 다른 목적을 해결하기 위하여 본 발명은,
- [0019] 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 지방세포분화 억제용 조성물 및 지방분해 촉진 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 꼬막단백질 유래 펩타이드가 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현을 증가시켜 지방세포분화에 관여하는 전사인자의 발현을 억제 및 지방분해를 촉진하는 단백질 발현을 증가시켜 지방세포분화 억제 및 지방세포에서 지방분해를 촉진하여 세포 내 지방의 과잉 축적을 억제할 수 있어 비만개선의 효과를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 SP-Sephadex C-25 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 분리 및 이들획분의 지방세포분화에서 지방구 형성에 미치는 영향을 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 양이온 교환 크로마토그래피에서 분리한 분획물의 지방구 형성 억제능을 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 De-novo sequencing (Q-TOF LC-MS/MS)에 의한 펩타이드 서열 확인 및 지방세포분화 억제능을 도시한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 LLRLTDL 및 GYALPCDCL 처리에 의한 지방세포분화 과정에서 지방 분해 미치는 영향을 도시한 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 LLRLTDL 및 GYALPCDCL 펩타이드 처리가 중간엽줄기세포의 지방세포분화 과정에서 염증성 사이토카인 및 활성산소종 생성에 미치는 영향을 도시한 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 LLRLTDL 및 GYALPCDCL 펩타이드가 중간엽줄기세포의 지방세포분화 과정에서 HO-1 발현 및 전사인자 활성화에 미치는 영향을 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 지방구 형성 및 분해에 미치는 영향을 도시한 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 β -catenin 활성화에 미치는 영향을 도시한 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 활성산소종 및 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 도시한 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 HO-1 및 전사인자 단백질 발현에 미치는 영향을 도시한 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 AMPK 활성화에 미치는 영향을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 명세서에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 그리고 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0023] 이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명의 신규한 펩타이드는 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질(펩타이드)을 의미한다. 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 펩타이드를 포함한다. 바람직하게는 펩타이드의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알칼리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다.
- [0025] 또한 아미노산 서열상의 변이로 효소 활성이 증대된 변이체일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 신규한 펩타이드는 꼬막의 단백질로부터 직접 분리하여 제조할 수 있으며, 이의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명의 펩타이드는 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 펩타이드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 펩타이드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다. 본 발명의 신규한 펩타이드는 보호된 아미노산간의 응축반응(condensation reaction)에 의한 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으로 진행하면서 합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미노리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 펩타이드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.
- [0028] 본 발명의 일측면에 따르면, 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방세포분화 억제용 펩타이드를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 지방분해 촉진용 펩타이드를 제공한다.
- [0030] 본 발명은 서열번호 1(LLRLTDL) 또는 서열번호 2(GYALPCDCL)의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드는 꼬막단백질로부터 형성될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 꼬막단백질 유래 펩타이드에 의하여 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현이 증가시키고 β -catenin의 활성화를 유도하여 지방세포분화를 억제할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 꼬막단백질 유래 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)가 지방세포분화에 필수적인 전사인자(PPAR γ , C/EBP α , SREBP1)의 발현에 영향을 미칠 수 있다. SREBP-1은 지방산 생합성(fatty acid synthase, FAS; lipoprotein lipase, LPL) 효소의 발현에 관여하며 protein kinase A(PKA)에 의해서 지방산 분해에 관여하는 효소인 HSL(hormone sensitive lipase)의 활성화에 관여한다.
- [0033] 또한 본 발명의 펩타이드 처리를 하게 되면 지방세포분화 과정에서 생성되는 염증성 사이토카인 및 활성산소종

을 효과적으로 억제할 수 있다.

- [0034] HO-1(heme oxygenase-1)은 외부 자극에 의해서 발현되는 대표적인 세포보호 효소로서 전사인자인 Nrf2의 활성화 기작에 의해서 발현된다. HO-1 발현은 세포 내에서 항산화 및 항염증뿐만 아니라 비만 관련 대사증후군 및 심혈관질환을 감소시키는 것으로 확인된다. HO-1은 지방세포분화를 촉진하는 것으로 알려져 있는 heme 단백질을 분해시켜 지방세포분화를 억제할 수 있다. 또한 HO-1은 염증성 사이토카인 등의 생성을 억제하여 염증 반응을 줄여주는 것으로도 알려져 있다.
- [0035] HO-1의 발현이 Wnt/ β -catenin 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 활성화된 β -catenin 전사인자는 지방세포분화에 필수적인 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 를 억제하여 지방세포분화를 조절하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 발명에 따라, LLRLTDL 및 GYALPCDCL의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 처리를 하면 HO-1 발현을 통하여 β -catenin의 활성화(핵이동) 및 HO-1 저해제 처리에 의한 β -catenin의 활성화에 영향을 미친다는 것이다.
- [0036] 본 발명에 따라 지방세포분화 과정에서 꼬막단백질 유래 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL) 처리에 의한 HO-1의 발현은 Wnt/ β -catenin의 활성화를 유도하며 이는 지방세포분화에 필수적인 전사인자를 조절하여 지방세포분화를 억제하는 것으로 볼 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따라 지방세포분화 과정에서 꼬막단백질 유래 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL) 처리에 의한 HO-1의 발현은 p-AMPK의 활성화를 유도하며 이는 지방분해를 촉진하여 지방세포에서 지질의 축적을 억제하는 것으로 볼 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 펩타이드는 식품 유래 저분자펩타이드 소재로 안전성이 확보되어 있으며 부작용이 없다는 장점이 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 지방세포분화 억제용 조성물은 지방세포분화를 억제하는 효과를 낼 수 있어 기존 비만치료제의 부작용을 회피할 수 있고 비만의 개선과 치료를 위한 다양한 형태의 약학 조성물로 활용이 가능하다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물은 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0043] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

- [0044] <실시예>
- [0046] <실험재료 및 방법>
- [0047] 재료
- [0048] 실험에 사용된 꼬막(*Scapharca subcrenata*)은 순천에 위치한 재래시장에서 구입하였다. 그 외 세포 배양에 사용된 재료는 Gibco-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 단백질 분석을 위한 항체(HO-1, Nrf2, β -catenin, PPAR γ , SREBP-1, C/EBP α , LPL, FAS, HSL 및 β -actin)는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, 염증성 사이토카인 측정에 사용된 분석 kits는 GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. 항산화 효소(catalase, glutathione peroxidase 및 superoxide dismutases) 측정에 사용된 분석 kits는 Cayman 社(MI, USA)에서 구입하였고, 그 외 시약은 Sigma-Aldrich 社에서 구입하였다.
- [0049] 꼬막단백질 유래 지방세포분화 억제 가수분해물 제조
- [0050] 지방세포분화 억제 펩타이드를 제조하기 위해서 꼬막을 동결건조한 후 펩신을 이용하여 분해하였다. 효소대 기질비는 1:500, 반응시간은 2시간으로 가수분해물을 제조하였다. 분해물은 막분리 방법을 이용하여 분자량이 1 kDa 이하의 분획물을 제조하여 사용하였다.
- [0052] 지방세포분화 억제 펩타이드의 분리, 정제 및 구조 동정
- [0053] 지방세포분화 억제 펩타이드를 분리하기 위해서 먼저 SP-Sephadex C-25 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 1L 비이커에 미리 양이온 교환 수지를 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)으로 평형화시킨 다음 꼬막단백질 유래 펩타이드를 첨가하여 양이온 교환 수지와 반응시켰다. 1시간 후에 비흡착된 펩타이드는 filtration을 통하여 모으고 나머지 흡착부분은 NaCl을 이용하여 stepwise방법으로 용출시켰다. 즉, NaCl 농도를 0-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6 및 0.6-1.0 M로 처리하여 흡착된 펩타이드를 얻었다. 회수한 펩타이드는 투석(dialysis)을 통하여 NaCl을 제거하고 동결건조하였다. 이온교환 크로마토그래피에서 분리한 분획물을 다시 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 상에서 Hypersil Gold C₁₈ column(20×250mm, Thermo Scientific, PA, USA), Superdex Peptide 10/300GL column, Hypersil Gold C₁₈ column(4.6×250mm)을 이용하여 분리하였고 각 단계별로 지방세포분화 억제 활성을 Oil Red S 염색법을 이용하여 확인하였다. 분리한 펩타이드는 Q-TOF LC-MS/MS mass spectrometer에서 de-novo sequencing방법으로 펩타이드의 서열을 동정하였다.
- [0055] 세포독성측정
- [0056] 사용된 2종의 펩타이드의 세포독성 측정은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하였다. 24-well plate에 세포가 70-80% confluent한 상태가 되었을 때 펩타이드를 농도별로 처리한 후 24 또는 48시간 후에 1 mg/mL MTT 용액을 첨가하였다. 4시간 동안 incubator에서 배양한 후 배지를 제거하여 생성된 formazan은 DMSO에 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0058] Oil Red O staining을 이용한 지방 축적 확인
- [0059] 2종의 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)로 7일 또는 21일 동안 처리한 후 세포를 PBS로 2회 세척한 후 10% 포르말린으로 1시간 동안 실온에서 고정한 다음 60% 이소프로판올로 세척하였다. 그런 다음 Oil Red O 용액으로 1시간 동안 세포를 염색 한 후 증류수로 2회 세척하였다. 중간엽줄기세포에서 지방 축적 이미지는 도립 현미경(DMI6000, Leica, Wetzlar, Germany)으로 확인하였다. 지방 축적 정량화는 이소프로판올에 지질을 추출한 후 microplate reader(Multiskan™ GO, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA)를 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.
- [0061] 지방 분해 측정(lipolysis assay)

- [0062] 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)를 7일 동안 처리한 후, 제조업체의 지침 (Sigma-Aldrich)에 따라 유리 글리세롤 시약(free glycerol reagent)을 사용하여 배양 배지로의 유리 글리세롤 방출을 측정하였다.
- [0064] **세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 함량 측정**
- [0065] 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)를 7일 동안 처리한 후 HBSS 버퍼에 녹인 20 μ M DCFH-DA를 세포에 첨가한 다음 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 세포 내 ROS는 485 및 528 nm의 여기 및 방출에서 형광 강도를 측정하였다.
- [0067] **항산화 효소 활성 측정**
- [0068] 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)를 7일 동안 처리한 후, RIPA buffer(Sigma-Aldrich 社)를 사용하여 세포 용해물을 추출하고 이들 세포 용해물에 포함되어 있는 catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPX) 및 superoxide dismutases(SOD)의 활성을 제조사(Cayman, MI, USA)의 지침에 따라 측정하였다.
- [0070] **염증성 사이토카인 측정**
- [0071] 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)를 7일 동안 처리한 후, 배양 배지에 방출된 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β)는 제조사(GE Healthcare)의 지침에 따라 측정하였다.
- [0073] **면역형광법**
- [0074] 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)를 처리한 후, 중간엽줄기세포를 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정한 다음 0.1% Triton X-100으로 10분 동안 투과시켰다. 2% 소혈청 알부민을 사용하여 30분간 blocking한 후 Nrf2 또는 β -catenin 항체를 사용하여 4°C에서 24시간 동안 배양한 다음 Alexa Fluor 488-conjugated secondary 항체를 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 핵은 10분 동안 2 μ g/mL Hoechst 33342로 대조 염색하였고, 형광 신호는 형광 현미경 (Leica)을 사용하여 관찰하였다.
- [0076] **Western blotting**
- [0077] 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)를 7일 동안 처리한 후 RIPA buffer를 이용하여 세포를 파괴한 후 단백질을 추출하여 정량하였다(Pierce BCA assay kit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 PVDF membrane으로 옮겼다. 5% skim milk로 blocking 후 1차 항체를 처리한 후 4°C에서 overnight하였다. 그런 다음 2차 항체를 처리하여 상온에서 2~3시간 반응시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence) assay kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 이용하여 PVDF membrane 상의 단백질을 검출하였다.
- [0079] **<실험결과 및 평가>**
- [0080] **실시예 1**
- [0081] **꼬막단백질 유래 지방세포분화 억제 펩타이드 분리, 정제 및 구조 동정**
- [0082] 분자량 1kDa 이하로 분획된 꼬막단백질 유래 지방세포분화 억제 펩타이드는 이온 교환 크로마토그래피에 의해서 분리되었고, 분리된 획분의 지방세포분화 억제 활성을 Oil Red S 염색으로 지질 축적 정도를 확인하였다.
- [0083] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 SP-Sephadex C-25 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 분리 및 이들 획분의 지방세포분화에서 지방구 형성에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 1을 참조하면, 획분 F4(0.4-0.6 M NaCl 용출)에서 가장 높은 지방구 형성 억제능을 나타내었다.
- [0084] 양이온 교환 크로마토그래피에서 분리된 획분(F4)을 Hypersil Gold C₁₈ column(20×250mm)이 장착된 HPLC 상에서 분리하였다. 유속은 2.5 mL/min, 이동상은 0.1% TFA/H₂O와 0.1% TFA/acetonitrile를 사용하여 선형상 농도구

배법(0-60% acetonitrile, 2-25min)으로 용출시킨 다음, 각 분획물을 분리하였다. 분리한 결과 20-22min 사이에서 용출된 획분(H5)에서 가장 우수한 지방구 형성 억제능을(도 2의 A-B). 이 획분(H5)을 증류수를 이동상으로 하여 Superdex Peptide 10/300GL column(유속 1.0 mL/min)을 이용하여 다시 분리한 결과 획분(G4)에서 가장 우수한 지방세포분화 억제능을 보였다(도 2의 C-D). 이 획분(G4)을 최종적으로 Hypersil Gold C₁₈ column(4.6×250mm)이 장착된 HPLC 상에서 다시 분리하였다. 유속은 0.7 mL/min, 동일한 이동상에서 선형상 농도구배법(20-40% acetonitrile, 0-18min)으로 분리한 결과, 획분(A4)에서 가장 우수한 지방세포분화 억제능을 나타내었고(도 2의 E-F), 동일한 조건으로 다시 분리하여 최종 획분을 확인하였다.

[0085] 분리된 최종 획분을 Q-TOF LC-MS/MS를 이용하여 *de-novo* sequencing한 결과 두 개의 펩타이드를 확인할 수 있었고, 이들의 펩타이드 서열은 Leu-Leu-Arg-Leu-Thr-Asp-Leu (LLRLTDL, 843.02Da) 및 Gly-Tyr-Ala-Leu-Pro-Cys-Asp-Cys-Leu(GYALPCDCL, 954.13Da)으로 확인되었다. 이들 펩타이드의 지방세포분화 억제능을 확인하기 위하여 Fmoc SPSS(solid phase peptide synthesis) 방법으로 합성하였고(Peptron Inc. 서울), 합성된 두 개의 펩타이드의 지방세포분화 억제능을 확인한 결과 강력한 지방세포분화 억제능을 나타내었다(도 3의 A-D).

[0087] 실시예 2

[0088] 지방세포분화 과정에서 꼬막단백질 유래 펩타이드가 전사인자 및 지방산 생합성 및 분해 단백질 발현에 미치는 영향

[0089] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 LLRLTDL 및 GYALPCDCL 처리에 의한 지방세포분화 과정에서 지방 분해에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 4를 참조하면, 분리 및 확인된 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)가 지방구 형성을 강력하게 억제함을 확인하였기 때문에 지방구 감소가 지방 분해로 이어지는지 확인한 결과 펩타이드 처리군(100 μ M)에서 지방 분해가 증가하는 것으로 나타났다.

[0090] Adipogenesis는 중간엽줄기세포에서 지방전구세포(pre-adipocyte)가 증식 및 분화되는 과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정을 의미하며, 이 과정에서 peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT enhancer-binding-proteins α (C/EBP α) 및 sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP1) 등의 전사인자 조절의 의해 지방 생성 및 분해에 관여하는 일련의 과정들이 일어난다. 따라서 본 실시예에서는 꼬막단백질 유래 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)가 지방세포분화에 필수적인 전사인자(PPAR γ , C/EBP α , SREBP1)에 미치는 영향을 조사하였다.

[0091] 도 4의 B를 참조하면, 펩타이드를 7일 동안 처리한 결과 세 가지 전사인자의 단백질 발현이 펩타이드 무처리 세포와 비교하여 현저히 줄어드는 것을 확인하였다. SREBP-1는 지방산 생합성 (fatty acid synthase, FAS; lipoprotein lipase, LPL) 효소의 발현에 관여하며 protein kinase A(PKA)에 의해서 지방산 분해에 관여하는 효소인 HSL(hormone sensitive lipase)의 활성화에 관여한다. 따라서 펩타이드 처리에 의한 지방구 형성 감소가 지방산 생합성 및 분해에 영향을 미쳤는지 조사한 결과 도 4의 C를 참조하면, 펩타이드 처리에 의해 지방산 생합성에 관여하는 효소인 FAS 및 LPL의 발현은 줄어들었고, 반면 지질 분해에 관여하는 효소인 HSL의 발현은 증가함을 확인하였다.

[0093] 실시예 3

[0094] 지방세포분화 과정에서 꼬막단백질 유래 펩타이드가 염증성 사이토카인 및 활성산소종 생성에 미치는 영향

[0095] 지방세포분화 과정에서 다양한 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β) 및 활성산소종(reactive oxygen species)이 생성되며 이들은 지방세포분화에 중요한 역할을 하는 매개체들이다.

[0096] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 LLRLTDL 및 GYALPCDCL 펩타이드 처리가 중간엽줄기세포의 지방세포분화 과정에서 염증성 사이토카인 및 활성산소종 생성에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 5의 A-B는 세포내 활성산소종(현미경 사진 및 정량), 도 5의 C-E는 염증성 사이토카인 함량을 나타낸다. 도 5를 참조하면, 펩타이드 처리 후 이들 염증성 사이토카인 및 활성산소종 생성을 측정한 결과 펩타이드 처리가 지방세포분화 과정에서 생성되는 염증성 사이토카인 및 활성산소종을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

[0098] 실시예 4

[0099] 지방세포분화 과정에서 꼬막단백질 유래 펩타이드 처리가 HO-1 발현 및 전사인자 활성화에 미치는 영향

[0100] 본 발명의 펩타이드 처리가 지방세포분화 과정에서 HO-1의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 LLRLTDL 및 GYALPCDCL 펩타이드가 중간엽줄기세포의 지방세포분화 과정에서 HO-1 발현 및 전사인자 활성화에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 6의 A는 HO-1 발현, 도 4의 B는 전사인자 Nrf2 활성화를 나타낸다.

[0101] 도 6을 참조하면, 펩타이드 처리에 의하여 HO-1 단백질 발현이 무처리군(control)과 비교하여 현저히 증가하였고, HO-1 발현에 필요한 전사인자(Nrf2)의 활성화(핵이동)가 일어나는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 펩타이드 처리에 의한 HO-1의 발현이 지방세포분화 과정에서 발생하는 염증성 사이토카인 및 활성산소종의 생성을 억제하는 것으로 판단된다.

[0103] 실시예 5

[0104] 꼬막단백질 유래 펩타이드에 의한 HO-1 발현이 지방세포분화 과정에 미치는 영향

[0105] 펩타이드 처리에 의한 HO-1 발현이 지방세포분화를 조절한다는 것을 증명하기 위하여 HO-1 저해제(ZnPP, 5 μ M)를 사용하여 지방세포분화에 관여하는 지방구 형성, 전사인자, 염증성 사이토카인, 활성산소종 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

[0106] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 지방구 형성 및 분해에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 7의 A는 지방구 형성 현미경 사진, 도 7의 B는 지방구 정량, 도 7의 C는 유리 글리세롤 정량을 나타낸다.

[0107] 도 7을 참조하면, 먼저 HO-1 저해제 처리 시 지방구 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 펩타이드 처리에 따라 줄어드는 지방구 형성이 HO-1 저해제를 처리한 결과 지방구 형성이 증가함을 알 수 있었다. 또한 줄어드는 지방구가 지방 분해로 이어지는지를 유리 글리세롤 측정으로 확인한 결과 펩타이드 처리에 의하여 증가한 유리 글리세롤 함량이 HO-1 저해제 처리에 의하여 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0108] 본 실시예에서는 펩타이드 처리에 의한 HO-1 발현이 β -catenin의 활성화(핵이동) 및 HO-1 저해제 처리에 의한 β -catenin의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

[0109] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 β -catenin 활성화에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 8을 참조하면, 펩타이드 처리에 의하여 β -catenin 전사인자의 핵이동을 증가시키는 것으로 나타났으나 HO-1 저해제를 처리한 결과 펩타이드 처리에 의한 β -catenin 전사인자의 핵이동이 억제됨을 알 수 있었다. 즉 펩타이드 처리에 따른 HO-1 발현이 β -catenin 전사인자 활성화에 관여한다는 것을 알 수 있다.

[0110] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 활성산소종 및 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 9를 참조하면, HO-1 저해제 처리가 활성산소종 및 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 펩타이드 처리에 의해서 억제되었던 활성산소종 및 염증성 사이토카인 생성이 다시 증가됨을 알 수 있었다. 이는 펩타이드 처리에 의한 HO-1 발현이 지방세포분화 조절에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있다.

[0111]

[0112] 실시예 6

[0113] 꼬막단백질 유래 펩타이드에 의한 HO-1 발현이 지방세포분화에 관여하는 전사인자 발현에 미치는 영향

[0114] 이상과 같이 펩타이드 처리에 의한 HO-1 발현이 지방세포분화에 있어서 지방구 형성, 활성산소종, 염증성 사이토카인 등을 조절하는 것으로 확인되었다. 또한 HO-1 저해제 처리가 HO-1 발현 및 그에 따른 지방세포분화에 필수적인 전사인자 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0115] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 HO-1 및 전사인자 단백질 발현에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 10의 A를 참조하면, 펩타이드 처리에 의해서 증가되었던 HO-1의 발현이 저

해제를 처리한 결과 HO-1 발현이 감소됨을 알 수 있었다. 또한 도 10의 B를 참조하면, HO-1 저해제 처리가 전사인자 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 펩타이드 처리에 의해 감소된 세 가지 전사인자의 발현이 HO-1 저해제 처리에 의해서 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0116] 이상의 결과를 종합하면, 꼬막단백질 유래 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)가 지방세포분화를 억제하는 결과를 확인하였고, 이것은 지방세포분화 과정에서 펩타이드 처리에 의한 HO-1의 발현이 Wnt/ β -catenin의 활성화를 유도하며 지방세포분화에 필수적인 전사인자를 조절하여 지방세포분화를 억제하는 것으로 볼 수 있다.

[0118] 실시예 7

[0119] 꼬막단백질 유래 펩타이드에 의한 HO-1 발현이 p-AMPK/AMPK 발현에 미치는 영향

[0120] 비만은 에너지 불균형과 관련된 대사 장애이다. AMPK(AMP-activated protein kinase)는 최근 항비만 물질 개발을 위한 신규 타겟으로 주목받고 있는데 세포 내 에너지 저장 및 소비와 관련된 중요한 에너지 센서로서 작용한다. 활성화된 AMPK는 몇몇 하위 단계에 있는 기질을 인산화하여 지방산 합성과 콜레스테롤 합성을 억제한다. AMPK의 활성을 증가시키는 물질은 ATP 합성촉진, 글루코스 흡수의 증가, 지방의 β -산화(oxidation) 촉진, 콜레스테롤 합성 저해, 염증 반응 완화 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있어 비만을 포함한 당뇨, 인슐린 저항성, 고지혈증, 염증 등 대사성 질환 치료제 개발을 위한 약물 표적으로 활용되고 있다. 또한 최근 연구들에 따르면, AMPK의 활성화가 지방세포분화에 관여하는 전사인자(PPAR γ , SREBP-1, C/EBP α)의 발현을 억제하여 지방세포분화를 억제하는 것으로 나타났다. 또한 HO-1 발현의 항비만 효과를 증명하기 위하여 HO-1 저해제 처리가 AMPK 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.

[0121] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 지방세포분화 과정에서 HO-1 저해제 처리가 AMPK 활성화에 미치는 영향을 도시한 것이다. 도 11을 참조하면, 펩타이드 처리가 지방세포분화 과정에서 AMPK의 인산화(p-AMPK)를 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 HO-1의 저해제를 처리할 시 AMPK의 인산화 발현이 감소됨을 확인하였다. 이는 펩타이드 처리에 의한 HO-1의 발현이 지방세포분화 조절 및 지방 분해를 통한 지방 축적을 억제한다는 것으로 볼 수 있다.

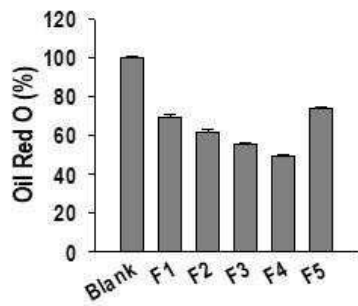
[0122] 이상의 결과를 종합하면, 꼬막단백질 유래 펩타이드(LLRLTDL 및 GYALPCDCL)가 지방세포분화를 억제함을 확인하였는데 이는 지방세포분화 과정에서 펩타이드 처리에 의한 HO-1의 발현이 Wnt/ β -catenin의 활성화를 유도하며 이는 지방세포분화에 필수적인 전사인자를 조절하여 지방세포분화를 억제하며 또한 p-AMPK 활성화를 통하여 지방 축적을 억제하는 것으로 나타났다.

[0124] 실시예의 결과로부터 본 발명은 꼬막단백질 유래 펩타이드가 지방세포분화에 관여하는 전사인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현을 억제하며 지방세포에서 지방분해를 촉진하여 세포내 지방의 과잉 축적을 억제함을 확인하였다. 또는 지방산 생합성에 관여하는 단백질인 SREBP-1, LPL, FAS 등을 억제함과 동시에 지방 분해를 촉진하는 p-AMPK를 활성화시키는 것을 확인하였다.

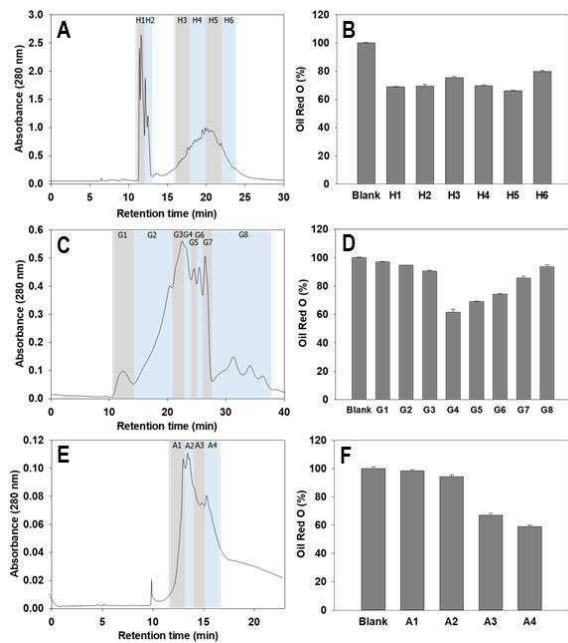
[0125] 또한 본 발명에서는 새로운 분자 target으로 HO-1의 역할을 확인한 결과 꼬막단백질 유래 펩타이드가 지방세포분화 과정에서 HO-1의 발현을 증가시켜 앞서 언급한 전사인자 및 단백질 발현을 억제함을 확인하였다.

도면

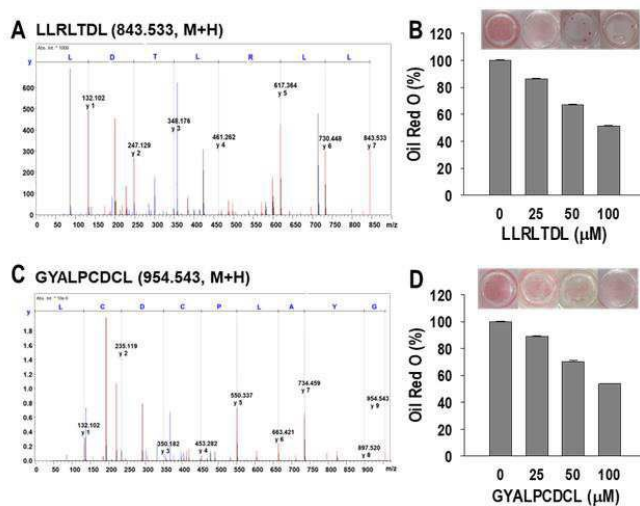
도면1



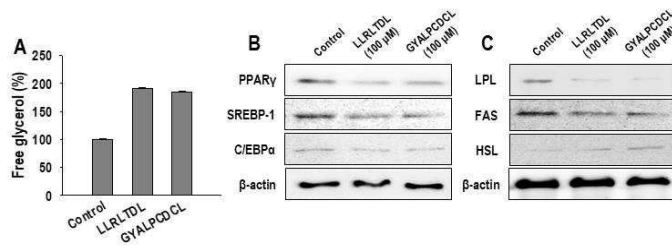
도면2



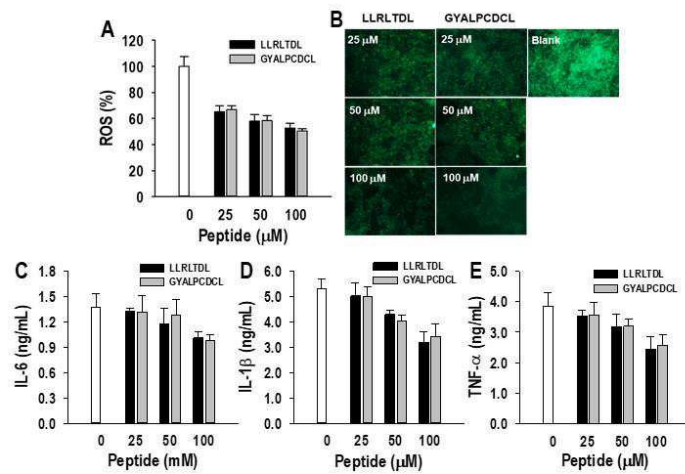
도면3



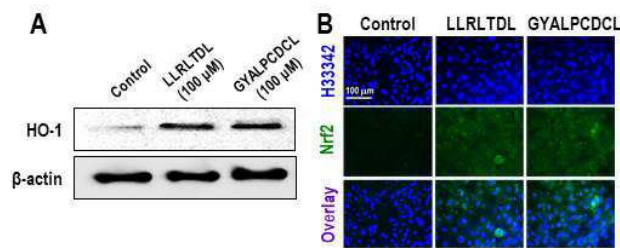
도면4



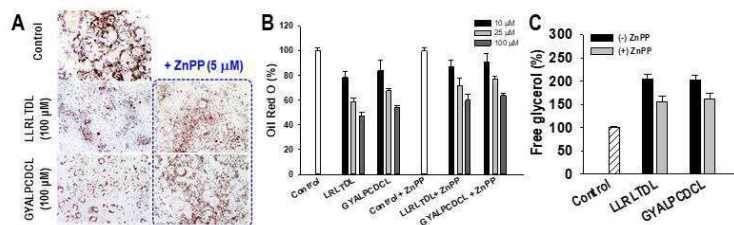
도면5



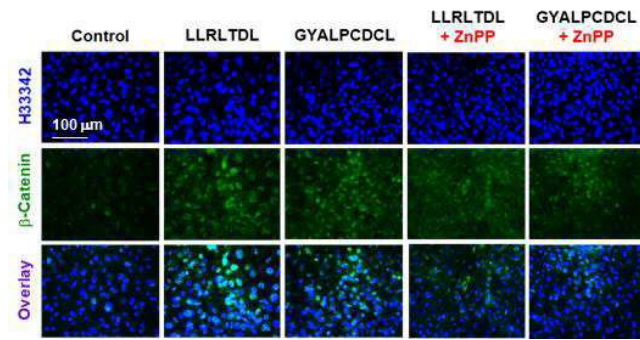
도면6



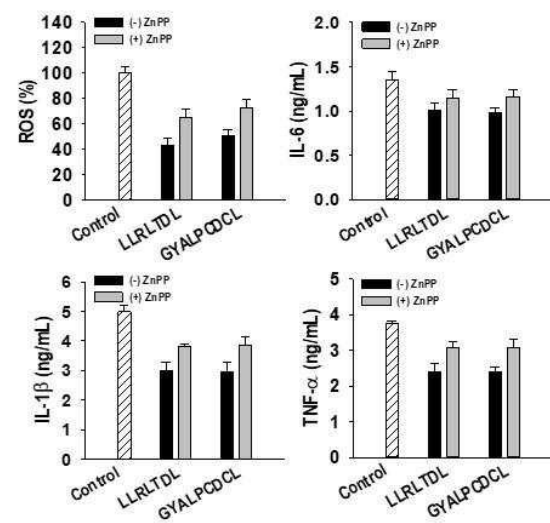
도면7



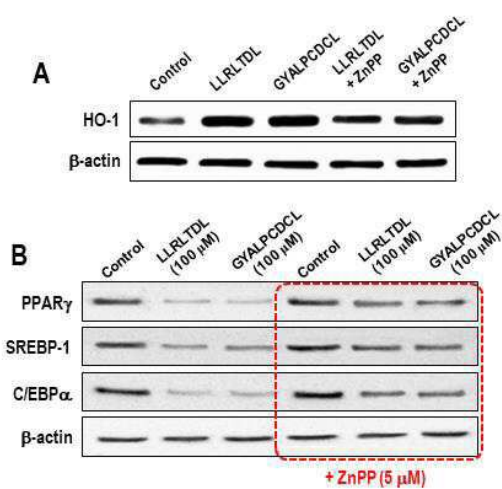
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Composition for inhibiting adipocyte differentiation comprising a Scapharca subcrenata protein-derived peptide as active ingredient

<130> HP2102

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 1

Leu Leu Arg Leu Thr Asp Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 2

Gly Tyr Ala Leu Pro Cys Asp Cys Leu

1 5