(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0174453
(43) 공개일자 2024년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2020.05)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0133189
(22) 출원일자 2023년10월06일
심사청구일자 2023년10월06일
(30) 우선권주장
1020230073579 2023년06월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
황철상
서울특별시 관악구 청룡길 77, 203동 102호
문상현
서울특별시 성북구 고려대로17길 25, 401호
(74) 대리인
위병갑

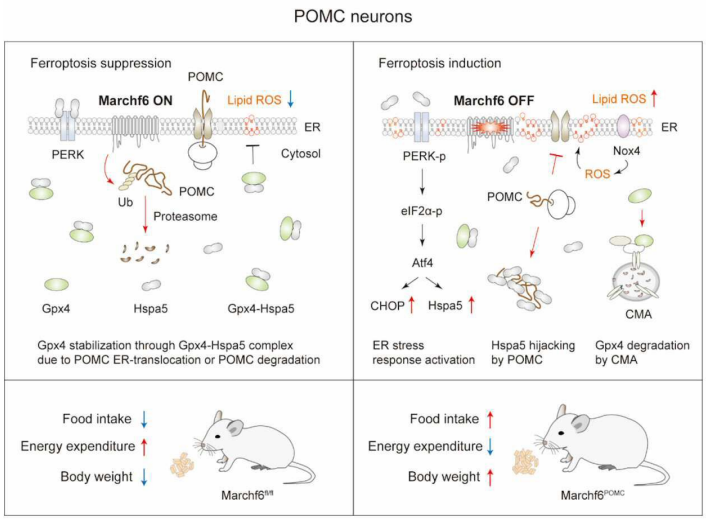
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **Marchf6의 대사질환 치료 용도**

(57) 요 약

본 발명은 Marchf6의 대사질환 치료 용도에 관한 것으로, 본 발명에서는 식욕 조절 호르몬 전구체 단백질인 POMC에 Marchf6가 식욕 조절 호르몬 전구체 단백질인 POMC를 직접적으로 인식하여 이의 분해 및 ER로의 이동을 조절함으로써 POMC가 세포질에 축적되어 발생하는 ER 스트레스 및 폐롭토시스를 조절하는 것을 밝혔으며, 이의 구체적인 기전을 확인하고, 특히, POMC 뉴런에서 Marchf6의 결손(deficient)이 비만, 폭식증, 증가된 식욕 및 감소된 에너지 대사와 같은 대사 장애를 유발하는 것을 *in vivo*로 확인하였으므로, 이를 비만을 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
G01N 33/5058 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192901
과제번호	2020R1A3B2078127
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	N-말단 암호 인식 단백질분해신호 경로 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

Marchf6(membrane associated ring-CH-type finger 6) 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, Marchf6의 단편은 C4 영역을 포함하는, 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, Marchf6의 단편은 아미노산 서열 중 C9 및 P460를 포함하는, 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 발현 촉진제는 Marchf6 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터인, 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 대사질환은 비만, 과식증, 당뇨병, 동맥경화, 고혈압, 고지혈증, 지방간, 대사성 간질환 및 심혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, Bag6, Derl1 또는 VCP의 활성화제 또는 발현 촉진제를 추가로 포함하는, 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 포함하는, POMC(pro-opiomelanocortin) 분해 촉진용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, POMC 뉴런의 세포질에서 POMC의 분해를 촉진하는, POMC 분해 촉진용 조성물.

청구항 9

Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 포함하는, ER로의 이동(translocation) 촉진용 조성물.

청구항 10

Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 포함하는, POMC 뉴런의 ER 스트레스 또는 페롭토시스(ferroptosis) 억제용 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 과량의 POMC 또는 세포질 잔류 POMC에 의한 ER 스트레스 증가 또는 페롭토시스를 억제하는, ER 스트레스 또는 페롭토시스 억제용 조성물.

청구항 12

Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 대사질환

의 예방 또는 개선용 식품조성물.

청구항 13

A) 개체로부터 분리된 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

B) 후보물질이 처리된 세포에서 Marchf6 발현 또는 활성화 수준을 확인하는 단계; 및

C) Marchf6 발현 또는 활성화 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 세포는 POMC 뉴런인, 비만 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Marchf6의 대사질환 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대사질환은 생체 내에서의 물질대사 장애에 의해 발생하는 질환을 총칭한다. 일반적으로 당질, 지질, 단백질, 비타민, 전해질 및 수분 등의 불균형에 의해 발생하게 되는데, 그 예로는 비만, 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화증, 지방간, 고혈압 등이 있다. 대사질환은 고열량, 고지방 및 고당질 식사에 의한 체내 에너지 대사의 불균형은 비만을 초래하고 인슐린 저항성과 대사성 염증을 유도하여 지질대사 이상 및 제2형 당뇨병 등 퇴행성 질환을 일으킬 수 있으므로, 생활습관성 질환이라고도 부르며, 최근 우리나라는 식생활의 서구화로 인해 가공식품과 동물성 식품의 섭취 증가와 식물성식품 섭취 감소로 인한 식생활의 변화로 고혈압, 심장병, 동맥경화증 및 당뇨병 등의 만성퇴행성질환의 이환율이 높아지고 있다.

[0003] 비만 (대략 >30kg/㎡의 체질량 지수로서 통상적으로 정의됨)은 열량의 섭취와 소비 불균형으로 발생되는 대사성 질환의 일종으로, 종종 고인슐린혈증, 인슐린 내성, 당뇨병, 고혈압 및 이상지질혈증과 같은 각종 병적 상태와 관련된다 (Mantzoros et al, J Clin Endocrinol Metab, 85:4000-2, 2000). 지난 수십년간 비만의 발생율은 급속히 증가함에 따라 비만에의 관심이 계속적으로 고조되면서 비만의 원인이 과잉의 에너지 공급이 지방세포 크기와 수의 증가를 유발하여 체내 지방으로 축적되는 것이라고 알려져 있으며, 이 외에도 유전적 요인, 서구화된 식생활에 의한 환경적 요인, 심리적 요인, 에너지 대사 이상 등 다양한 원인이 작용한다고 알려져 있다. 이러한 비만 상태가 오랜 시간에 걸쳐 지속되면 단순히 신체활동의 불편, 작업능률의 저하, 신체발육의 변칙적인 성장뿐 아니라 당뇨병, 고지혈증, 혈중 콜레스테롤 상승, 신장질환, 심장병, 뇌졸증, 동맥경화증, 지방간 및 관상동맥질환, 그리고 관절질환 등의 다양한 질병의 원인이 된다.

[0004] 많은 기관들/조직들이 비만 및 타입 2 당뇨병의 발병과 연관되어 있고, 특히 시상하부가 에너지 섭취 제어 등을 포함하는 너지 생체 항상성(homeostasis)에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Stellar,Psychol Rev 61:5-22, 1954). 시상하부는 음식물 섭취량, 에너지 소비량 및 체지방조직량과 정확히 균형을 이룸으로써 체중을 조절한다. 에너지 조절 (손상될 때 시상하부 비만을 야기)에 연루되는 주된 시상하부 영역은 복내측 시상하부, 실방핵, 궁상핵 및 측면 시상하부 영역을 포함한다. 추가로, 신체 내의 지방 조직 덩어리(렙틴을 포함)로부터의 그리고 위장관으로부터의 신호 (GLP-1, PYY 및/또는 췌장 인슐린/애밀린을 포함)는 시상하부 중심에 영향을 미친다. 시상하부와의 신호 상호작용, 또는 시상하부에 대한 손상을 수반하는 장애는 병적인 시상하부 비만을 야기할 수 있다. 시상하부 비만에 의한 체중증가는 포만감 및 배고픔의 제어의 상실, 에너지 균형 조절의 무능력 및/또는 에너지 소비량의 감소, 및/또는 고인슐린혈증 및 당뇨병으로의 빈번한 진행과 함께 시상하부 중심의 정상적인 항상성 기능의 파괴로부터 일어난다. 시상하부에서 기능 장애가 일어나 섭식 조절이 실패하여 발생하는 비만은 정상 비만의 체중증가와 다르게 수용하기 어려운 왕성한 과식증이 발생하여 전형적으로 식이요법 및 운동에 반응하지 않는다. 이와 같은 시상하부 비만은 시상하부의 어떤 손상 또는 결함에 의해 일어날 수 있다. 시상하부 비만은 유전적 증후군에 의해, 예컨대 렙틴 또는 렙틴 수용체, CART(코카인 및 암페타민-관련 전사체), POMC(프로오피오멜라노코틴), 프로호르몬 전환효소, MC4R(멜라노코틴-4 수용체), 싱글마인디드(singleminded) 1 (시상하부 내 시각로상핵 및 PVN 핵의 형성이 필수적인 전사 인자) 또는 TrkB에서 돌연변이를

가지는 환자에서 일어날 수 있으며, 염색체 15q11-q13 상에서 부계각인 유전자의 결실에 의해 야기되는 프라더-윌리증후군 및 BBS(바뎃-비들 증후군)도 시상하부 비만을 야기할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 POMC 분해 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 ER로의 이동 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 ER 스트레스 또는 페롭토시스 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 대사질환의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 목적은 비만 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 POMC 분해 촉진용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 ER로의 이동 촉진용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 ER 스트레스 또는 페롭토시스 억제용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 비만 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에서는 식욕 조절 호르몬 전구체 단백질인 POMC에 Marchf6가 식욕 조절 호르몬 전구체 단백질인 POMC를 직접적으로 인식하여 이의 분해 및 ER로의 이동을 조절함으로써 POMC가 세포질에 축적되어 발생하는 ER 스트레스 및 페롭토시스를 조절하는 것을 밝혔으며, 이의 구체적인 기전을 확인하고, 특히, POMC 뉴런에서 Marchf6의 결손(deficient)이 비만, 폭식증, 증가된 식욕 및 감소된 에너지 대사와 같은 대사 장애를 유발하는 것을 *in vivo*로 확인하였으므로, 이를 비만을 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 Marchf6 결합 단백질을 스크리닝한 도이다:

A: 스크리닝 실험 과정;

B: Marchf6의 영역별 결합 추정 단백질; 및

C: bait로서 전장의 Marchf6 및 prey로서 POMC, Bnip3, Gps1, SNAPIN, Yif1a, Hspa5, Hax1, Fhl2 및 Mcfd2를 이용한 Split-Ub 분석.

도 2는 Marchf6 및 POMC의 상호작용 부위를 탐색한 도이다:

A: Marchf6의 모식도 및 서열;

B: Y2H 분석;

C: Split-Ub 분석;

D 및 E: $Marchf6_{3f}$ 또는 $Marchf6_{3f}^{P460A}$과 $POMC_{ha}$의 상호 공동면역침전(Reciprocal co-immunoprecipitation) (*: 비특이적 밴드);

F: POMC 및 SM의 CHX-추적 분석;

G: $POMC_{ha}$ 및 $Marchf6_{3f}$의 면역블로팅; 및

H: 8시간 동안 MG132 (10 μM) 처리 하에 $POMC_{myc}$의 생체 내 유비퀴틴화 분석.

도 3은 Marchf6의 POMC 분해 기전을 분석한 도이다:

A: 내인성 Marchf6의 면역블로팅;

B: $POMC_{ha}$의 CHX-추적 분석;

C: 내인성 POMC의 CHX-추적 분석;

D: 8시간 동안 MG132 (10 μM) 처리 하에 $POMC_{myc}$의 생체 내 유비퀴틴화 분석;

E: Bag6, Derl1 또는 VCP siRNA를 처리 후 $POMC_{ha}$의 CHX-추적 분석; 및

F: Bag6, Derl1 또는 VCP siRNA를 처리 후 $POMC_{ha}$의 상대적 mRNA 수준.

도 4는 Marchf6의 POMC 인식 부위를 확인한 도이다:

A: Y2H 분석 (좌) 및 POMC의 구성 (우);

SP: signal peptide;

N-POMC: Nt-POMC domain;

ACTH: adrenocorticotropic hormone;

β-LPH: β-lipotropin;

B: Marchf6을 bait로서, POMC 단편을 prey로서 사용한 Split-Ub 분석;

C: GST 풀다운 분석;

D: SP를 포함하는 POMC에 대한 항체 (anti-$POMC^{SP}$) 제작을 위한 에피토프 개략도;

E: anti-$POMC^{SP}$를 GST-$POMC^{1-76}$, GST-$POMC^{27-76}$ 및 GST-$POMC^{1-26}$의 면역블로팅;

F: digitonin/Triton X-100-기반 세포질-세포소기관 분획 후 IP 및 IB 실험 모식도; 및

G: digitonin/Triton X-100-기반 세포질-세포소기관 분획 후 anti-$POMC^{SP}$를 사용한 IP 및 anti-ha를 이용한 IB 결과.

도 5는 Marchf6의 POMC로 인한 ER 스트레스 및 페롭토시스 억제 효과를 나타낸 도이다:

A: $POMC_{ha}$의 점진적 발현 증가에 따른 지질 ROS 수준;

B: $POMC_{ha}$의 점진적 발현 증가에 따른 상대적 NADP(H) 수준;

C: $POMC_{ha}$의 점진적 발현 증가에 따른 상대적 세포 생존율;

D: $POMC_{ha}$의 점진적 발현 증가에 따른 상대적 LDH 방출;

E: $POMC_{ha}$의 점진적 발현 증가에 따른 Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 면역블로팅;

F: Fer-1 (5 μM)의 24시간 처리 유무에 따른 4-HNE, Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 면역블롯팅

G: 지질 ROS 수준;

H: 상대적 세포 생존율;

I: Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 면역블로팅; 및

J: Fer-1(5μM), Z-VAD(20μM) 또는 Nec-1(40μM) 존재 하의 상대적 세포 생존율.

도 6은 세포질의 POMC가 ER 스트레스 및 페롭토시스를 유발하는 기전을 분석한 도이다:

A: 지질 ROS 수준;

B 내지 D: NADP(H) 수준, 세포생존율 및 LDH 방출;

E: Gpx4, CHOP, Nox2, Nox4, Atf4, eIF2α-p(인산화된 eIF2α), eIF2α, PERK-p(인산화된 PERK), PERK, Ire1-p(인산화된 Ire1), Ire1 및 Atf6의 면역블로팅;

F: 상대적 Gpx4 mRNA 수준;

G: Gpx4의 CHX-추적 분석;

H: MG132 (20μM), 3-MA (5mM), BafA1 (100nM) 또는 CQ (50 μM)를 8시간 동안 처리한 세포에서 Gpx4의 면역블로팅;

I: CMA를 통한 세포질 POMC 유발 Gpx4 분해 예상 모식도;

J: Hsp90, Hsc70 및 Lamp2a의 면역블로팅; 및

K: Lamp2a에 대한 siRNA 처리 후 Gpx4의 CHX-추적 분석.

도 7은 세포질 POMC의 Hspa5-Gpx4 상호 작용 억제를 분석한 도이다:

A: Gpx4의 CHX-추적 분석;

B: Gpx4 mRNA 수준;

C: digitonin/Triton X-100-기반 세포질/세포소기관 분획 후 Hspa5, Gpx4, tubulin (세포질 마커), calreticulin (ER 루멘 마커), Sec61α (ER 멤브레인 마커) 및 Na^+/K^+ ATPase (원형질막 마커)의 면역블로팅;

D: $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$ 및 $Hspa5_{myc}$의 상호 공동면역침전 분석;

E: $Hspa5_{myc}$를 이용한 Gpx4의 면역침전;

F: 24시간 동안 Fer-1(5 μM) 처리 유무에 따른 anti-Hspa5 항체를 이용한 Gpx4의 면역침전;

G: Fer-1(5μM) 처리 유무에 따른 digitonin/Triton X-100-기반 세포질/세포소기관 분획 후 anti-$POMC^{SP}$와의 공동면역침전 및 anti-ha를 이용한 면역블로팅; 및

H: 24시간 동안 에라스틴(10 μM) 처리 유무에 따른 digitonin/Triton X-100-기반 세포질/세포소기관 분획 후 anti-$POMC^{SP}$와의 공동면역침전 및 anti-ha를 이용한 면역블로팅.

도 8은 세포질의 Hspa5에 의한 POMC 유발 Gpx4 분해 억제 효과를 확인한 도이다:

A: 페톱토시스 이펙터(effectors)인 Acsl4, Alox5, TfR1, POR, Nox1, Lpcat3, Slc40a1, Fsp1, HO1 및 Nrf2의 면역블로팅;

B: 지질 ROS 수준;

C: 세포생존율;

D: Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 면역블로팅; 및

E: Gpx4의 CHX-추적 분석.

도 9는 POMC 뉴런 특이적 *Marchf6* 결손 마우스인 $Marchf6^{POMC}$ 마우스의 과식증, 대사율 감소 및 체중 증가를 확인한 도이다:

A: 수컷 마우스의 성장 곡선;

B: 암컷 마우스의 성장 곡선;

C: 20주령 수컷 마우스의 일일 음식 섭취량;

D: 20주령 암컷 마우스의 일일 음식 섭취량;

E: 20주령 수컷 마우스의 에너지 소비;

F: 20주령 암컷 마우스의 에너지 소비; 및

G 내지 I: 마우스의 POMC 뉴런에서 면역조직화학적으로 염색된 4-HNE(G), Gpx4(H) 및 Hspa5(I)에 대한 정량 데이터.

도 10은 *Marchf6*^{POMC} 마우스의 체중 증가를 분석한 도이다:

A: 20주령 수컷 마우스의 체중;

B: 20주령 암컷 마우스의 체중;

C: 20주령 수컷 마우스의 지방량;

D: 20주령 암컷 마우스의 지방량;

E: 20주령 수컷 마우스의 제지방량;

F: 20주령 수컷 마우스의 제지방량.

도 11은 *Marchf6*^{POMC} 마우스와 동배인 *Marchf6*$^{f1/f1}$ 마우스의 POMC 뉴런에서 4-HNE, Hspa5 및 Gpx4를 IHC 분석한 도이다.

도 12는 Marchf6가 POMC 뉴런에서 ER 스트레스, 페롭토시스 및 대사 항상성을 조절하는 기전을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0020] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[0022] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α-아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0023] 알라닌: Ala, A; 아르기닌: Arg, R; 아스파라긴: Asn, N; 아스파르트산: Asp, D; 시스테인: Cys, C; 글루탐산: Glu, E; 글루타민: Gln, Q; 글리신: Gly, G;히스티딘: His, H; 이소류신: IIe, I; 류신: Leu, L; 리신: Lys, K; 메티오닌: Met, M; 페닐알라닌: Phe, F; 프롤린: Pro, P; 세린: Ser, S; 트레오닌: Thr, T; 트립토판: Trp,

W; 티로신: Tyr, Y; 및 발린: Val, V.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0026] 일 구현예에서, Marchf6의 단편은 Marchf6 단백질의 443번째 아미노산 내지 480번째 아미노산을 포함하는 C4 영역을 포함할 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, Marchf6의 단편은 아미노산 서열 중 9번째 아미노산인 C9 및 460번째 아미노산인 P460를 포함할 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, Marchf6 단백질은 이의 변이체 또는 유사체일 수 있으며, 상기 변이체 또는 유사체는 POMC를 분해하는 활성이 유지되는 기능적 동등물일 수 있다.

[0029] 일 구현예에서, Marchf6 단백질은 Gpx4의 분해를 억제할 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, Marchf6 단백질은 지질 과산화를 방지할 수 있다.

[0031] 일 구현예에서, Marchf6 단백질 또는 이의 단편은 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 단백질의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 추가의 아미노산 서열도 포함할 수 있으며, 시상하부의 POMC 뉴런에 결합할 수 있는 접합된 펩타이드/단백질을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 일 구현예에서, Marchf6 단백질 또는 이의 단편은 이펙터(effectors), 약물, 프로드럭, 독소, 펩타이드, 전달분자 등의 커플링 파트너와 연결될 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제는 Marchf6 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 앱타머, 프라이머, 프로브 또는 항체일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 발현 촉진제는 Marchf6 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제에 의해 증가된, 활성화된 또는 발현 증가된 Marchf6는 세포질에서 ER로 이동되지 못한 SP-절단되지 않은 POMC를 제거할 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, Marchf6는 POMC 뉴런의 세포질에서 SP-포함 POMC를 분해하고, Marchf6가 지질 과산화를 억제함으로써 ER로의 POMC 이동(translocation)을 조절한다.

[0037] 일 구현예에서, 상기 재조합 벡터에 시상하부의 POMC 뉴런 표적화 리간드를 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 상기 재조합 벡터는 전사 조절인자, 번역 조절인자 또는 유전자 발현을 확인할 수 있는 마커를 추가로 포함할 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 마커는 항생제 내성 유전자, 선별 마커 유전자, 베타 글루쿠로니데이즈를 암호화하는 유전자(β glucuronidase encoding gene), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼레이즈, 루시퍼레이즈 또는 형광 단백질을 암호화하는 유전자(fluorescent protein encoding gene)일 수 있다.

[0040] 일 구현예에서, 상기 선별 마커 유전자는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(neomycin phosphotransferase), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase), 퓨로마이신(puromycin), 히스티디놀 디하이드로게나제(histidinol dehydrogenase), 구아닌 포스퍼트랜스퍼라제(guanine phosphotransferae), 및 제오신(zeocin)으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있으며, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제(hygromycin phosphotransferase, htpII) 유전자인 것이 더욱 바람직하다.

[0041] 일 구현예에서, 상기 형광 단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 향상 녹색형광단백질(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)일 수 있다.

[0042] 일 구현예에서, 상기 재조합 벡터는 태그(tag) 서열을 포함할 수 있으며, 상기 태그는 His 태그, Myc(c-myc) 태그, FLAG 태그, HA 태그 또는 T7 태그일 수 있다.

[0043] 일 구현예에서, 상기 조성물은 Bag6, Derl1 또는 VCP의 활성화제 또는 발현 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 대사질환은 비만, 과식증, 당뇨병, 동맥경화, 고혈압, 고지혈증, 지방간, 대사성 간질환 및 심혈관질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 비만일 수 있고, 시상하부 장애에 의해 발생하는 비만인 것이 더욱 바람직하다.

[0045] 일 구현예에서, 대사질환은 시상하부의 POMC 뉴런의 세포질에 축적된 POMC 단백질에 의해 발생하는 ER 스트레스 또는 페롭토시스에 의해 유발되는 비만일 수 있으며, 상기 비만은 폭식증, 증가된 식욕 및 감소된 에너지 대사의 증상을 가질 수 있다.

[0046] 본 발명에서 사용된, 용어 "변이체"는 기준 물질과 비교하였을 때 최소한 한개의 아미노산 차이(치환, 삽입 또는 결손)를 포함하는 대응하는 아미노산 서열을 말한다. 특정 구체예들에 있어서 "변이체"는 기준 서열과 비교하였을 때 높은 아미노산 서열 상동성(homology) 및/또는 보존적 아미노산 치환, 결손 및/또는 삽입을 가진다.

[0047] 본 발명에 따른 단백질 변이체는 특정 아미노산 잔기 위치에서 아미노산 잔기가 보존적으로 치환된 변이체도 포함하는 의미로 해석된다.

[0048] 본 발명에서 "보존적 치환"이란 1개 이상의 아미노산을 해당 Marchf6 단백질 또는 이의 단편의 생물학적 또는 생화학적 기능의 손실을 야기하지 않는 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 변이체의 변형을 의미한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체시키는 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 부류는 해당 기술분야에 규정되어 있으며, 잘 알려져 있다. 이들 부류는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다.

[0049] 본 발명에서 사용된, 용어 "유사체"는 아미노산의 측쇄 또는 알파-아미노산 백본에 대하여 하나 이상의 다른 기능기로 치환된 단백질 유사체를 포함할 수 있다. 측쇄 또는 백본 개질화 단백질 유사체의 예로는 피롤리딘 고리가 하이드록시기로 치환된 하이드록시프롤린이나, N-메틸 글리신 "펩토이드"를 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 단백질/펩타이드 유사체의 종류에 대해서는 당업계에 공지되어 있다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 핵산 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs , John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews , 90:543-584(1990)).

[0051] 본 명세서에 있어서, "발현 촉진제"란 Marchf6에 직접 또는 간접적으로 작용하여 Marchf6의 발현을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 물질을 의미하며, 상기 물질의 종류에는 제한이 없다. 상기 물질이 Marchf6의 발현을 촉진시키는 기작은 특별히 제한되지 않으며, 일례로 전사, 번역 등의 유전자 발현을 증대시키거나, 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작으로 작용할 수 있다.

[0052] 본 명세서에 있어서, "재조합 벡터(recombination vector)"란 Marchf6를 발현시킬 수 있도록 제작된 벡터를 총칭하며, 바람직하게는 리포좀, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하며, Marchf6를 체내에서 발현시킬 수 있는 벡터라면 이에 제한되지 않는다. 상기 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노부속바이러스(adeno-associated virus), 레트로바이러스(retrovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 단순포진바이러스(herpes simplex virus), 알파바이러스(alpha virus) 등이 있다.

[0053] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제 외에 공지된 대사질환 치료제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.

[0054] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 대사질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 대사질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상

및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0055] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0056] 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 대사질환의 종류, 대사질환의 발병 원인, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0057] 본 발명의 약학조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0058] 일 구현예에서, 상기 약학조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 대사질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환들을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0061] 본 발명의 약학조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가

능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 약학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 생물학적 요법 또는 화학 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 대사질환을 치료할 수 있다.

[0063] 일 측면에서, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 포함하는, POMC(pro-opiomelanocortin) 분해 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0064] 일 구현예에서, 상기 조성물은 POMC 뉴런의 세포질에서 POMC의 분해를 촉진할 수 있다.

[0065] 일 구현예에서, Marchf6의 단편은 Marchf6 단백질의 443번째 아미노산 내지 480번째 아미노산을 포함하는 C4 영역을 포함할 수 있다.

[0066] 일 구현예에서, Marchf6의 단편은 아미노산 서열 중 9번째 아미노산인 C9 및 460번째 아미노산인 P460를 포함할 수 있다.

[0067] 일 구현예에서, 발현 촉진제는 Marchf6 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터일 수 있다.

[0068] 일 구현예에서, Marchf6의 P460 부위가 POMC의 SP(signal peptide)를 포함하는 부위를 데그론(degron)으로 인식하여 POMC의 분해를 유도할 수 있다.

[0069] 일 측면에서, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 포함하는, ER로의 이동(translocation) 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0070] 일 측면에서, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 포함하는, POMC 뉴런의 ER 스트레스 또는 페롭토시스(ferroptosis) 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0071] 일 구현예에서, 상기 조성물은 과량의 POMC 또는 세포질 잔류 POMC에 의해 유도되는 ER 스트레스 증가 또는 페롭토시스를 억제할 수 있다.

[0072] 일 구현예에서, POMC 뉴런의 세포질에서 Marchf6의 P460 부위가 POMC의 SP(signal peptide)를 포함하는 부위를 데그론(degron)으로 인식하여 POMC를 분해하고, POMC를 ER로 이동시킴으로써 ER 스트레스 및 페롭토시스를 방지/억제할 수 있다.

[0073] 일 측면에서, 본 발명은 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 개선용 식품조성물에 관한 것이다.

[0074] 본 발명의 조성물을 식품조성물로 사용하는 경우, 상기 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0075] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 통상의 기술자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명의 식품조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는

원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 본 발명의 건강기능식품은 대사질환 치료제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0077] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 Marchf6 단백질 또는 이의 단편, 또는 Marchf6의 활성화제 또는 발현 촉진제를 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0078] 일 측면에서, 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 후보물질이 처리된 세포에서 Marchf6 발현 또는 활성화 수준을 확인하는 단계; 및 Marchf6 발현 또는 활성화 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 비만 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0079] 일 구현예에서, 상기 세포는 POMC 뉴런일 수 있다.

[0081] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0083] **실시예 1. Marchf6와 상호작용하는 단백질 탐색**

[0084] Marchf6(membrane associated ring-CH-type finger 6)과 결합하는 단백질을 조사하기 위해, 세포질을 향한 Marchf6의 8개 영역 (C1 내지 C8)을 이용하여 Y2H(yeast two-hybrid) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 플라스미드 pCH4537 (Marchf6 C1 단편 발현), pCH4538 (Marchf6 C2 단편 발현), pCH4539 (Marchf6 C3 단편 발현), pCH4540 (Marchf6 C4 단편 발현), pCH4541 (Marchf6 C5 단편 발현), pCH4542 (Marchf6 C6 단편 발현), pCH4543 (Marchf6 C7 단편 발현) 및 pCH4544 (Marchf6 C8 단편 발현)를 각각 발현하는 *S. cerevisiae* AH109 (CHY726) 세포에 인간 cDNA 라이브러리 (638820, Clontech)를 bait로서 형질전환(transformation)하였다 (도 1). ~1 X 10^6 개의 형질전환체 중에 ~100개의 양성 클론으로부터 14개의 라이브러리 플라스미드를 회수하고 DNA 시퀀싱으로 분석하여 특정 인간 유전자를 가지는 9개의 플라스미드를 선별하였다 (도 1B). 또한, Marchf6의 각 영역과 결합하는 것으로 검색된 분자들과 전장의 Marchf6와의 상호작용을 추가로 확인하기 위해, bait로서 pCH836 (Marchf6)와 prey로서 pCH4203 (POMC), pCH7140 (Bnip3), pCH7141 (Gps1), pCH7142 (SNAPIN), pCH7143 (Yif1a), pCH7144 (Hspa5), pCH7145 (Hax1), pCH7146 (Fhl2) 및 pCH7147 (Mcfd2)를 CHY712 *S. cerevisiae* 세포로 공동-형질전환하여 split-Ub 분석을 수행하였다. 생성된 형질전환체를 A_{600} = 1까지 성장시키고 5배 연속 희석하여 SC(-Leu/-Trp) 또는 SC(-Leu/-Trp/-His) 플레이트에 스팟팅한 뒤 30℃에서 3일 동안 배양하였다. 이러한 형질전환체 중 pCH836 (Marchf6) 및 pCH4203 (POMC)를 가지는 효모 세포만이 SC 플레이트 (-Leu/-Trp/-His)에서 생존하여 POMC가 전장의 Marchf6에 결합하는 것을 확인하였으며 (도 1C), 이는 Marchf6 및 POMC 간의 상호작용을 나타낸다.

[0086] **실시예 2. Marchf6 및 POMC의 상호작용 부위 탐색**

[0087] 2-1. Y2H 분석 및 split-Ub 분석

[0088] 상기 실시예 1에서 POMC와 상호작용하는 Marchf6의 C4 영역 중 어느 잔기와 POMC와 상호작용하는데 중요한지 확인하기 위해, pCH4540 (C4)와 이의 보존된 부위의 아미노산 치환 변이체들인 pCH4158 ($C4^{R443A}$), pCH4159 ($C4^{R447A}$), pCH4160 ($C4^{L451A}$), pCH4161 ($C4^{D459A}$), pCH4162 ($C4^{P460A}$) 및 pCH4163($C4^{R479A}$)를 각각 pCH4132 (POMC)와 함께 CHY726에 공동-형질전환하였다. 생성된 bait 및 prey 플라스미드들을 포함하는 형질전환체들을 SC 플레이트에 스팟팅하고 30℃에서 3일 동안 배양하였다.

[0089] 그 결과, POMC과 특이적으로 결합하는 Marchf6의 C4 영역 중, R443A(Arg443-to-Ala), R447A(Arg447-to-Ala), L451A(Leu451-to-Ala), D459A(Asp459-to-Ala) 및 R479A(Arg479-to-Ala)의 돌연변이와는 달리, P460A(Pro460-

to-Ala) 돌연변이만이 결합력을 잃은 것으로 나타났다 (도 2A 내지 C).

[0091] 2-2. 화학적 가교 기반 상호 공동-면역 침전 분석

[0092] 화학적 가교 기반 상호 공동-면역 침전(chemical crosslinking-based reciprocal co-immunoprecipitation) 분석을 위해, HEK293T 세포를 10-cm 디쉬 플레이트에서 ~70%의 밀도로 배양한 뒤, pCH60 (빈 벡터) 또는 pCH4129 (exogenous C-terminally hemagglutinin (ha)-tagged POMC: $POMC_{ha}$) 2 μg과 pCH879 (wild-type C-terminal triple flag-tagged Marchf6: $Marchf6_{3f}$) 또는 pCH4170 ($Marchf6_{3f}^{P460A}$)를 함께 트랜스펙션하고 48시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 세척하고 1 mM DSP [dithiobis(succinimidyl propionate)] (Thermo Fisher, 22585)를 처리한 뒤, 가교된 세포를 파쇄하여 면역침전(immunoprecipitated)시켰다. 비드를 IP-세척 버퍼 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% NP-40, 2 mM EDTA, 10% glycerol)로 3회 세척하고 결합된 단백질을 2XSDS 샘플 버퍼로 용출하였으며, FLAG-아가로스 (Sigma-Aldrich, A2220)에 의한 면역침전의 경우에는 3XFLAG 펩타이드 (Protein Ark, GEN-3XFLAG-5)를 사용하였다. 이 후, 용출액을 변성시킨 뒤 37℃에서 20분 동안 가열하고, 해당하는 항체를 이용하여 SDS-PAGE 및 면역 블롯팅을 수행하였다.

[0093] 그 결과, 전장의 POMC가 Marchf6에 특이적으로 결합하나 $Marchf6^{P460A}$에는 결합하지 않는 것으로 나타나 (도 2D 및 E), POMC가 Marchf6의 C4 영역의 P460에 결합하는 것을 확인하였다.

[0095] **실시예 3. Marchf6과 POMC의 상호작용에 의한 POMC 분해 확인**

[0096] 3-1. Marchf6의 POMC 분해 기전 분석

[0097] Marchf6 Ub 라이게이즈(ligase)에 의한 POMC의 특이적 인식으로 인해 POMC를 프로테아좀 분해(proteasomal degradation)하는지 확인하기 위해, 단백질 분해의 CHX(Cycloheximide)-추적 분석을 수행하고 유비퀴틴화(ubiquitylation) 분석을 수행하였다. 구체적으로, CHX-추적 분석을 위해, Marchf6 유전자좌(locus)의 엑손 6을 표적으로 하는 sgRNA를 이용한 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 구축한 *Marchf6*-KO N43/5 세포를 $1x10^5$ 세포의 밀도로 분주하여 24시간 동안 배양하고, CHX를 최종 농도 50 μg/ml로 처리하였다. 이 후, 각 시점에 세포를 수득하고 얼음 위에서 1x프로테아제 억제제 칵테일 (Sigma-Aldrich, 4693132001)을 함유하는 RIPA 버퍼 (Thermo Fisher Scientific, 89900)으로 20분 동안 파쇄한 뒤, 4℃에서 20분 동안 16,500×g로 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 상층액에서 단백질 농도를 Bradford 분석법 (Bio-Rad, 5000006)으로 측정하고 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 해당하는 항체로 면역블로팅을 수행하였다. 면역블로팅 데이터의 정량화는 GelQuant.NET(BiochemLabSolutions)에 의해 수행되었고, α-튜불린의 기준으로 표준화되었다. 또한, 8시간 동안 MG132 (10 μM)의 존재 또는 부재하에 인큐베이션한 $POMC_{ha}$ 및/또는 $Marchf6_{3f}$를 공동 발현시킨 HEK293T 세포에서 $POMC_{ha}$ 및 $Marchf6_{3f}$의 면역블로팅 분석을 수행하였다. 아울러, 유비퀴틴화 분석을 위해, HEK293T 세포를 $POMC_{myc}$, ^{ha}Ub, 및 $Marchf6_{3f}$ 또는 $Marchf6_{3f}^{P460A}$로 트랜스펙션하여 48시간 동안 인큐베이션한 뒤, 8시간 동안 10 μM의 MG132를 처리하거나 무처리하였다. 이 후, 10 μM NEM (N-에틸말레이미드) (Sigma-Aldrich, E3876) 및 1x 프로테아제 억제제 칵테일를 포함하는 파쇄 버퍼 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, pH 7.6)로 세포를 파괘하고, 상층액을 마그네틱 비드-컨쥬게이트된(magnetic bead-conjugated) 래빗 anti-myc (GeneTex, GTX29106)로 면역침전시켰다. 결합된 단백질을 마그네틱 비드로부터 2X SDS 샘플 버퍼로 용출하고 샘플을 95℃에서 5분 동안 가열한 뒤, 용출된 단백질을 SDS-PAGE를 사용하여 분리하고 해당하는 항체로 면역블로팅을 수행하였다.

[0098] CHX-추적 분석 결과, 외인성(exogenous) $POMC_{ha}$가 WT HEK293T (human embryonic kidney) 세포에서는 수명이 짧은(short-lived) 것으로 나타난 반면, *Marchf6*-KO 세포에서는 현저하게 안정화된 것으로 나타났고 (도 3A 및 B), 내인성(endogenous) POMC도 N43/5 (mouse embryonic hypothalamus) 세포에서 수명이 짧은 반면 *Marchf6*-KO N43/5 세포에서는 현저하게 안정화된 것으로 나타났다 (도 3C). 또한, *Marchf6*-KO N43/5 세포에서 안정화된 내인성 POMC가 WT Marchf6의 C-말단에 flag가 3개 태그된 $Marchf6_{3f}$ 발현시 수명이 짧아지는 것으로 나타났으며, POMC와 상호작용하는 부위에 돌연변이를 도입한 $Marchf6_{3f}^{P460A}$의 발현시에는 POMC의 분해가 일어나지 않는 것으

로 나타났고, Marchf6의 기질로 알려진 SM(squalene monooxygenase)는 $Marchf6_{3f}^{P460A}$의 발현시에도 분해가 일어나는 것으로 나타나 (도 2F), Marchf6의 P460 부위와 POMC가 직접적으로 결합함으로써 Marchf6가 POMC를 분해하는 것을 확인하였다.

[0099] 또한, $POMC_{ha}$ 및 $Marchf6_{3f}$의 면역블로팅 분석 결과, $Marchf6_{3f}$ 및 $POMC_{ha}$의 공동 발현에 의해 $POMC_{ha}$의 수준이 감소한 것으로 나타났으며, 이는 프로테아좀 억제제인 MG132의 처리에 의해 회복된 것으로 나타나 (도 2G), $POMC_{ha}$의 분해가 프로테아좀 의존적임을 확인하였다.

[0100] 아울러, ^{ha}Ub(N-말단에 ha 태그된 Ub)와 함께 $POMC_{myc}$(C-말단에 myc이 태그된 POMC)를 발현하는 세포에서 유비퀴틴화 분석 결과, 폴리유비퀴틴화된 $POMC_{myc}$가 $Marchf6_{3f}$와의 공동 발현에 의해 증가한 반면, POMC가 접근 불가능한 $Marchf6_{3f}^{P460}$ 또는 촉매적으로 불활성인 $Marchf6_{3f}^{C9A}$을 공동 발현한 경우에는 그렇지 않은 것으로 나타났다 (도 2H 및 도 3D).

[0102] 3-2. POMC의 분해와 ERpQC 경로 연관성 확인

[0103] Marchf6 매개 POMC 분해에 ERpQC(stress-induced pre-emptive protein quality control) 경로가 관여하는지 확인하기 위해, HEK293T 세포에 ERpQC의 주요 구성 요소인 Bag6 (샤페론), Derl1 (ER 리쿠르팅 인자) 및 VCP (avalosin-containing AAA+-ATPase; also known as p97)에 대한 siRNAs (*Bag6*: SCBT, 15 sc-72614; *Derl1*: SCBT, sc-60519; *VCP*: SCBT, sc-37187) 15 nM을 Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, 13778150)으로 트랜스펙션하고, 24시간 동안 인큐베이션한 후, 0.5 μg/ml의 pCH4129 ($POMC_{ha}$)를 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, 11668019)으로 트랜스펙션하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이 후, CHX-추척 분석을 수행하였다.

[0104] 그 결과, siRNA로 낙다운된 ERpQC 경로의 유전자들이 POMC의 mRNA의 수준에는 영향을 미치지 않으면서 (도 3F) $POMC_{ha}$를 안정화시키는 것으로 나타나 (도 3E), 세포질-노출된 POMC 분해에서 ERpQC 경로가 양성적으로 관련된 것을 확인하였다.

[0106] **실시예 4. Marchf6의 POMC 표적 부위 특정**

[0107] Marchf6의 C4 도메인과 결합하는 POMC 도메인을 명확히 하기 위해, Marchf6의 C4와 POMC의 C 말단(Ct-)이 절단된 POMC 단편 세트를 이용하여 Y2H 분석을 수행하였다. 이를 위해, pCH4540 (C4), pCH4132 (POMC), 또는 이의 절단된 형태 pCH4235 ($POMC^{1-76}$), pCH4236 ($POMC^{1-87}$), pCH4237 ($POMC^{1-102}$), pCH4238 ($POMC^{1-137}$) 및 pCH4239 ($POMC^{1-176}$)를 CHY726에 공동 형질전환하고 상기 실시예에서와 같이 SC(-Leu/-Trp) 또는 SC(-Leu/-Trp/-His) 플레이트에 스팟팅하고 분석하였다. 또한, 전장의 Marchf6와 POMC의 상호작용 분석을 위해, *S. cerevisiae* CHY712에 pCH836 (Marchf6) 또는 pCH4311 ($Marchf6^{P460A}$)를 bait로서, pCH4203 ($POMC^{1-267}$), pCH4204 ($POMC^{77-267}$) 또는 pCH4313 ($POMC^{1-76}$)를 prey로서 형질전환하여 split-Ub 분석을 수행하였다. 아울러, GST(Glutathione-S-transferase) pull-down 분석을 위해, 정제된 GST, GST-$POMC^{1-76}$, GST-$POMC^{27-76}$ 또는 GST-$POMC^{1-26}$ 50 μg을 50 μl의 글루타티온 세파로스 비드 (Cytiva, 17-0756-05)와 함께 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. pCH879 ($Marchf6_{3f}$)를 형질전환한 HEK293T 세포를 1X프로티에이즈 억제제 칵테일을 포함하는 파쇄 버퍼 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, pH 7.6)로 파쇄한 추출물과 상기 비드를 4℃에서 2시간 동안 추가로 인큐베이션한 뒤, 0.5 ml의 GST-세척 버퍼 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10% 글리세롤, pH7.6)으로 3회 세척하였다. 비드에 결합된 단백질을 2X SDS-샘플 버퍼로 용출하고, 37℃에서 20분 동안 가열하여 SDS-PAGE를 수행하고 쿠마시 블루 염색을 수행하고, anti-flag 항체를 이용하여 면역 블로팅을 수행하였다.

[0108] Marchf6에 의한 POMC 인식 부위를 Y2H로 분석한 결과, Marchf6의 C4 영역이 SP(signal peptide) 및 N-POMC(Nt-POMC domain)의 Nt-세그먼트(segment)를 포함하는 $POMC^{1-76}$와 상호작용하는 것으로 나타났다 (도 4A). 또한,

split-Ub 분석 결과, Marchf6가 $POMC^{1-267}$ 및 $POMC^{1-76}$와 상호작용하고 $POMC^{77-267}$와는 상호작용하지 않는 것으로 나타났다 (도 4B). 아울러, GST 풀-다운 분석 결과, $Marchf6_{3f}$가 GST-$POMC^{1-76}$와 직접적으로 결합하고 GST-$POMC^{27-76}$와 매우 약하게 결합하는 것으로 나타났고, GST-$POMC^{1-26}$에는 거의 결합하지 않는 것으로 나타났다 (도 4C). 이를 통해, Marchf6가 SP를 포함하고 Nt-POMC 세그먼트에 인접한 데그론(degron)을 인식하는 것을 확인하였다.

[0110] **실시예 5. Marchf6의 ER로의 POMC 이동(translocation) 조절**

[0111] 5-1. SP 포함 POMC 특이적 항체 제작

[0112] SP-포함 POMC에 특이적인 항체를 제작하기 위해, 인간 POMC의 19 내지 28 위치에 해당하는 QASMEVRGWC(Q, Gln; A, Ala; S, Ser; M, Met; E, Glu; V, Val; R, Arg; W, Trp; 및 C, Cys)의 펩타이드를 에피톱(epitope)으로써 합성하고 (도 4D), 이를 AbClon (Seoul, South Korea)에 의뢰하여 SP-포함 POMC 유래 펩타이드에 대한 래빗 폴리클로날 항혈청(polyclonal antisera)을 제작하였다. 이 후, 사전-컨쥬게이트된 GST-$POMC^{27-76}$를 1.5 mg 함유하는 Affi-Gel 10/15 비드 1ml와 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션한 1ml의 항혈청으로부터 SP-포함 POMC에 특이적인 항체를 "음성적으로" 선택하고, 통과한 분획(flow-through fraction)을 사전-컨쥬게이트된 GST-$POMC^{1-76}$를 1mg 함유하는 Affi-Gel 10/15 비드 1ml와 4℃에서 하룻밤 동안 추가적으로 인큐베이션하였다. 그 뒤, 비드를 얼음처럼 차가운 PBS 10ml로 최소 5회 세척하고, 비드에 결합된 항체를 1ml의 0.1M 글리신-HCl (pH 3.0)으로 용출하였다. 용출된 분획을 즉시 1M Tris (pH 8.0)로 중화시킨 후 단백질 A-세파로스 크로마토그래피 (Amicogen, 한국)로 농축하여, SP-포함 POMC에 특이적인 항체를 생산하고 항-$POMC^{SP}$(anti-$POMC^{SP}$) 항체로 명명하였다. 이렇게 제작한 항체가 SP를 포함하는 POMC를 검출할 수 있는지 확인하기 위해, GST-$POMC^{1-76}$, GST-$POMC^{27-76}$ (SP 불포함) 및 GST-$POMC^{1-26}$ (SP 포함)를 이용하여 면역 블로팅 분석을 수행하였다.

[0113] 그 결과, 항-$POMC^{SP}$ 항체는 SP를 포함하는 GST-$POMC^{1-76}$ 및 GST-$POMC^{1-26}$는 특이적으로 검출하였으나, SP가 없는 GST-$POMC^{27-76}$는 인식하지 못하는 것으로 나타났다 (도 4E).

[0115] 5-2. Marchf6에 의한 POMC의 세포 내 이동 조절 확인

[0116] Marchf6에 의한 POMC의 분해 및 이에 따른 세포 내 위치(localization)를 확인하기 위해, WT HEK293T 세포 또는 *Marchf6*-KO HEK293T 세포에 pCH4129 ($POMC_{ha}$)를 트랜스펙션한 뒤, ER 이동 억제제(translocation inhibitor)인 EerI(Eeyarestatin I) (8 μM)의 존재 또는 부재하에 MG132 (10 μM)을 8시간 동안 처리하고 세포질-세포소기관 분획 분석(Cytosol-organelle fractionation assay)을 위해 subcellular fractionation 후 면역침전(IP)-면역블로팅(IB) 분석을 수행하였다 (도 4F). 구체적으로, 세포를 PBS로 세척한 후, 1X프로티에이즈 억제제 칵테일을 포함하는 반-투과 버퍼(semi-permeabilization buffer) (110 mM KOAc, 50 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM benzamidine, 0.01% digitonin, pH 7.4)를 얼음 상에서 5분 동안 처리하고, 4℃에서 10분간 500×g로 원심분리하여 상층액을 세포질 분획으로서 수득하였다. 그 후, 상층액을 분리한 뒤의 세포를 차가운 PBS로 세척하여 잔류 digitonin 추출물을 제거하고, 1X프로티에이즈 억제제 칵테일을 포함하는 IP 버퍼 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.4)로 얼음 상에서 10분 동안 파쇄하였다. 파쇄 후 4℃에서 10분 동안 12,000×g로 원심분리하여 상층액을 세포기관 분획으로 수득하였다. 세포질 및 세포기관 분획을 상기 실시예 5-1에서 제작한 anti-$POMC^{SP}$ 항체 (1:2,000)와 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하고, Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific, 10004D)를 추가하여 4℃에서 90분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 비특이적으로 결합된 또는 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위해 4℃에서 5분씩 IP 세척 용액 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.4)으로 3회 세척하고 면역 침전된 단백질을 2x SDS-샘플 버퍼로 용출하고 95℃에서 5분 동안 가열하여 SDS-PAGE을 수행하고 anti-ha를 이용하여 면역 블로팅 분석을 수행하였다.

[0117] 그 결과, SP를 포함하는 $POMC_{ha}$를 *Marchf6*-KO HEK293T 세포의 세포질 분획에서 검출하였으나, 야생형 세포에서는 검출되지 않았다 (도 4G, cf. 레인 5 및 7). 특히, ER 이동 억제제인 EerI을 처리한 경우 SP-포함 $POMC_{ha}$를 *Marchf6*-KO HEK293T 세포의 세포질 분획 (digitonin-추출된)에서 증가시켰을 뿐만 아니라, 야생형 세포에서도

프로호르몬(prohormone)을 검출할 수 있게 만들었다 (도 4G, 레인 5 내지 8).

[0119] 상기 결과들을 통해, Marchf6가 초기 POMC의 ER로의 이동(translocation)과 분해를 양성적으로 조절하는 것을 확인하였다.

[0121] **실시예 6. Marchf6의 POMC-유도 ER 스트레스 및 페롭토시스 억제 효과 확인**

[0122] 6-1. 과량의 POMC에 의한 ER 스트레스 및 페롭토시스(ferroptosis) 유발

[0123] Marchf6-매개된 POMC 분해 및 페롭토시스 간의 기능적 또는 기전적 관련성을 이해하기 위해 지질 과산화(lipid peroxidation) 센서인 C11-BODIPY$^{581/591}$을 사용하여 $POMC_{ha}$를 과발현하는 N43/5 세포에서 지질 ROS 수준을 비교하였다. 구체적으로, WT 또는 *Marchf6*-KO N43/5 세포에 pCH4129 ($POMC_{ha}$)를 48시간 동안 트랜스펙션하고, 2 μM C11-BODIPY$^{581/591}$ (Thermo Fisher Scientific, D3861)을 함유하는 배양 배지로 교체하였다. 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 형광 프로브-처리된 세포를 트립신 처리하여 15ml Falcon 튜브로 옮기고 얼음처럼 차가운 PBS 1ml로 3회 세척한 뒤, 얼음처럼 차가운 둥근 바닥 폴리스티렌 튜브 (Corning, 352235)로 옮겼다. ~20,000개 세포 내 지질 ROS의 양을 FITC(fluorescein isothiocyanate)를 사용한 CytoFLEX LX (Beckman Coulter)로 측정하고 FlowJo v10.8.1 (BD Bioscience)로 분석하였다. 또한, CellTiter-Glo luminescent 3D cell viability assay 2 kit (Promega, G9241)와 multimode plate reader (TECAN, Spark 10M)를 이용하여 세포 생존율을 분석하였다. 이 때, 세포 사멸 억제를 평가하는 경우에는, pCH60 (빈 벡터) 또는 pCH4129 ($POMC_{ha}$) (각각 1 μg/ml의 최종 농도)를 발현하는 WT 또는 *Marchf6*-KO N43/5 세포에 5 μM Fer-1, 20 μM , Z-VAD-FMK 또는 40 μM Nec-1를 처리한 후 24시간 동안 배양하고 세포 생존율을 분석하였다. 또한, 세포 내 NADP(H)의 수준은 NADP/NADPH-Glo 분석 키트 (Promega, G9081) 및 multimode plate reader (TECAN, Spark 10M)를 이용하여 측정하였다. 아울러, LDH 활성은 Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) (Sigma, 4744926001)를 사용하여 측정하였다.

[0124] 지질 과산화 분석 결과, N43/5 세포에서 $POMC_{ha}$의 수준이 증가하면서 지질 과산화(lipid peroxidation)가 증가하였으며 (도 5A), 페롭토시스(ferroptosis)를 예측할 수 있는 바이오마커인 NADP(H)의 수준이 감소하였다 (도 5B). 또한, $POMC_{ha}$의 수준이 증가하면서 세포의 생존력이 점차 감소하였고 (도 5C), $POMC_{ha}$의 이러한 용량-의존적인 치사율을 LDH(lactate dehydrogenase)의 방출을 평가하여 추가로 확인하였다 (도 5D). 또한, 페롭토시스 관련 단백질인 Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 발현 수준을 면역 블로팅으로 분석한 결과, $POMC_{ha}$의 수준이 증가할수록 페롭토시스의 주요 조절자인 Gpx4 (glutathione peroxidase 4)의 발현 수준이 감소하는 것으로 나타났으며, ER 스트레스 마커인 CHOP (a C/EBP homologous transcription factor) 및 ROS-생성 NADPH 옥시데이즈(oxidase)인 Nox2 및 Nox4의 수준도 증가하는 것으로 나타났다 (도 5E 및 도 8A). 아울러, $POMC_{ha}$의 과발현은 지질 과산화 마커인 4-HNE(4-hydroxynonenal)의 수준도 현저하게 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 과산화지질(lipid peroxide) 소거제(scavenger)인 Fer-1 처리에 의해 회복되는 것으로 나타났다 (도 5F).

[0125] 이를 통해, 과부하된 POMC가 Gpx4을 하향 조절하고 CHOP, Nox2 및 Nox4를 상향 조절하여 지질 과산화를 증가시킴으로써 페롭토시스를 유발하는 것을 확인하였다.

[0127] 6-2. Marchf6의 POMC-유도 페롭토시스 억제

[0128] 상기 실시예들을 통해 Marchf6가 POMC의 분해를 매개하므로, Marchf6의 손실이 POMC 뉴런을 POMC-유발 페롭토시스에 과민하게 만들 것으로 예상되어, pCH60 (빈 벡터), pCH879 ($Marchf6_{3f}$), pCH880 ($Marchf6_{flag}^{C9A}$) 또는 pCH4170 ($Marchf6_{flag}^{P460A}$)를 WT 또는 *Marchf6*-KO N43/5 세포에 트랜스펙션하고 상기 실시예 6-1과 같이 POMC 신경 세포의 페롭토시스 유발 정도를 분석하였다.

[0129] 그 결과, Marchf6가 결손된 경우 $POMC_{ha}$-과발현 N43/5 세포의 생존율이 현저하게 감소되었으며, 이는 WT

Marchf6$_{3f}$의 이소성(ectopic) 발현에 의해 회복되었으나, 촉매적으로 비활성인 Marchf6$_{3f}^{C9A}$ 및 POMC 접근 불가능한 Marchf6$_{3f}^{P460A}$에 의해서는 회복되지 않는 것으로 나타났다 (도 5G 및 5H). 또한, POMC$_{ha}$-과발현 *Marchf6*-KO N43/5 세포에서 Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4 단백질의 발현 수준이 감소한 것이 Marchf6$_{3f}$에 의해서는 회복되었으나, Marchf6$_{3f}^{C9A}$ 및 Marchf6$_{3f}^{P460A}$에 의해서는 회복되지 않는 것으로 나타났다 (도 5I). 아울러, POMC$_{ha}$-과발현 *Marchf6*-KO N43/5 세포의 감소된 생존율이 페롭토시스 억제제인 Fer-1(ferrostatin-1)의 처리에 의해 회복되었으나, 세포사멸(apoptosis) 억제제인 Z-VAD(Z-VAD-FMK) 또는 Nec-1(necroptosis inhibitor necrostatin-1) 처리에 의해서는 회복되지 않는 것으로 나타났다 (도 5J).

[0130] 이를 통해, Marchf6가 POMC 분해를 특이적으로 촉진함으로써 POMC 뉴런 세포에서 페롭토시스를 억제하는 것을 확인하였다.

[0132] 6-3. 세포질-잔류된 POMC의 페롭토시스 및 ER-스트레스 유발

[0133] Marchf6에 의해 분해되지 않아 POMC가 세포질에 잔류하는 경우의 생물학적 영향을 확인하기 위해, ER-표적화하는 SP가 없어 세포질에 잔류/유지되는 POMC$^{\Delta 1-26}$를 N43/5 POMC 신경 세포에 발현시키고 이의 세포 생존율을 분석하고, 지질 과산화, NADP(H) 함량, LDH 방출, Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 발현 수준, ER 스트레스 마커 CHOP의 발현, 및 ER 스트레스 센서인 PERK(protein kinase RNA-like ER kinase), Ire1(inositol requiring protein-1) 및 Atf6(activating transcription factor-6)의 발현 및 활성화 정도를 분석하였다.

[0134] 그 결과, SP가 없는 POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$가 SP를 포함하는 POMC$_{ha}$ (FL, Full length)에 비해 지질 과산화, NADP(H) 함량, LDH 방출 및 세포 생존율에 더 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다 (도 6A 내지 D). 또한, N43/5 세포에서 세포질 POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$의 발현이 전장의 POMC$_{ha}$을 발현시킨 경우에 비해 CHOP, Nox2 및 Nox4의 수준을 현저하게 증가시켰으며, Gpx4의 수준을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다 (도 6E). 또한, 세포질 POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$가 ER 스트레스 마커인 CHOP의 발현을 상향 조절하여, 이와 관련된 신호전달 경로의 상위(upstream) 구성 요소들인 eIF2α(a eukaryotic initiation factor), PERK, Ire1 및 Atf6의 발현 및 인산화로 인한 활성화를 분석한 결과, POMC$_{ha}$ 또는 POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$의 과발현에 의해 PERK 및 eIF2α의 인산화가 증가되었으며, Atf4가 상향조절되었으나, Ire1 및 Atf6에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 (도 6E), 세포질에 잔류된 POMC가 PERK/eIF2α/Atf4/CHOP 신호전달 경로를 통해 ER 스트레스 반응을 유발하는 것을 확인하였다.

[0136] **실시예 7. 세포질 POMC의 ER 스트레스 및 페롭토시스 유발 기전 분석**

[0137] 7-1. 샤페론-매개 오토파지를 통한 Gpx4 분해

[0138] 전장의 POMC$_{ha}$ 또는 세포질 POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$이 페롭토시스 유발에 의해 분해되는 것으로 알려진 Gpx4 단백질의 발현을 조절하는지 확인하기 위해, 전장의 POMC$_{ha}$ 또는 세포질 POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$를 과발현시킨 N43/5 세포에서 qRT-PCR로 Gpx4의 mRNA 수준을 분석하고, CHX-추척 분석을 수행하였다. 또한, Gpx4 분해는 CMA(chaperone-mediated autophagy), 거대자가포식(macroautophagy) 또는 Ub-프로테아좀 시스템(Ub-proteasome system)을 통해 발생하므로, POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$를 과발현시킨 N43/5 세포에 리소좀 억제제(lysosomal inhibitors)인 클로로퀸(chloroquine, CQ) 또는 BafA1(bafilomycin A1), 프로테아좀 억제제인 MG132, 또는 거대자가포식 억제제인 3-MA(3-methyladenine)를 처리하고 Gpx4 단백질의 발현을 면역 블로팅으로 분석하였다. 아울러, POMC$_{ha}^{\Delta 1-26}$를 과발현시킨 N43/5 세포에서 Lamp2a (lysosome-associated protein 2A), 열충격 단백질(heat shock chaperones) Hsc70 및 Hsp90의 발현을 면역 블로팅으로 확인하고, Lamp2a 특이적 siRNA (SCBT, sc-35791)의 처리에 의한 Gpx4 변화를 분석하였다.

[0139] 그 결과, 전장 $POMC_{ha}$ 및 세포질 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$의 발현은 Gpx4의 mRNA 수준에는 영향을 주지 않고 단백질의 발현을 하향조절하였으며, 특히, 세포질에 잔류하는 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$는 ER-이동 가능한 $POMC_{ha}$에 비해 Gpx4를 현저하게 하향 조절하는 것으로 나타나 (도 6E 및 F), 세포질에서 POMC가 Gpx4 분해를 야기할 수 있음을 확인하였다. 또한, CHX-추적 실험 결과, 세포질 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$가 Gpx4의 분해를 가속화시키는 것으로 나타났다 (도 6G). 또한, $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$-발현 N43/5 세포에서의 Gpx4 하향 조절은 MG132 및 3-MA를 처리한 경우와 달리 CQ 및 BafA1의 처리에 의해 회복된 것으로 나타나 (도 6H), POMC-유도된 Gpx4 분해가 CMA와 관련된 것을 확인하였다 (도 6I). 실제로 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$의 발현이 Lamp2a, Hsc70 및 Hsp90와 같은 CMA 구성 요소의 수준을 현저하게 증가시켰으며 (도 6J), CMA 수용체인 Lamp2a의 낙다운에 의해 Gpx4 단백질이 현저하게 안정화시켰다 (도 6K).

[0141] 7-2. Hspa5-Gpx4 상호작용 감소

[0142] 스트레스-유발성 열충격 인자(stress-inducible heat shock factor) Hspa5 (known as the major ER chaperone BiP or Grp78)는 페롭토시스 동안 Gpx4와의 직접적인 상호 작용을 통해 Gpx4의 분해를 억제하는 것으로 알려졌으므로, POMC의 세포질 잔류에 따른 페롭토시스에서 이를 확인하였다. 구체적으로, N43/5 세포에 Hspa5 특이적 siRNA (SCBT, sc-35522) 10 nM를 Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, 13778150)으로 트랜스펙션한 뒤, 24시간 후 pCH4134 ($POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$) (최종 1㎍/ml)를 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, 11668019)로 트랜스펙션한 후, Gpx4의 mRNA 수준을 분석하고 CHX-추척 분석을 수행하였다. 또한, Hspa5가 세포질에서 POMC-유도된 페롭토시스에 대항(counteract)하는지 확인하기 위해, SP가 없어 세포질에 잔류되는 $Hspa5_{myc}^{\Delta 1-18}$ 및 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$를 N43/5 세포에 공동 발현시키고 상기 실시예 6-1에서와 같이 페롭토시스 유발 분석을 수행하였다. 또한, 상기 실시예 5-2에서와 같이 세포질-세포소기관 분획 분석(Cytosol-organelle fractionation assay)을 수행하였다. 아울러, 세포질에 유지된 POMC가 Hspa5-Gpx4 상호 작용을 방해하여 Gpx4 분해를 촉진하는지 확인하기 위해, 공동면역침강(coimmunoprecipitation) 분석을 수행하였다.

[0143] CHX-추척 분석 결과, $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$-발현 N43/5 세포에서 Hspa5의 낙다운이 Gpx4의 mRNA에는 영향을 주지 않고 Gpx4의 분해를 가속화하는 것으로 나타났다 (도 7A 및 B). 또한, $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$에 의한 지질 과산화 및 세포 생존율 감소를 $Hspa5_{myc}^{\Delta 1-18}$의 공동발현이 개선하였고 (도 8B 및 C), $Hspa5_{myc}^{\Delta 1-18}$ 및 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$의 공동발현이 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$에 의해 유발된 Gpx4, CHOP, Nox2 및 Nox4의 발현 수준 변화를 복원하였으며 (도 8D), $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$에 의한 Gpx4의 분해를 $Hspa5_{myc}^{\Delta 1-18}$와의 공동발현이 억제하는 것으로 나타났다 (도 8E). 이는 세포질의 Hspa5가 Gpx4의 분해를 방지하고 ER 스트레스 마커를 상향조절함으로써 POMC-매개된 페롭토시스를 억제하는 것을 의미한다. 또한, 세포질-세포소기관 분획 분석 결과, $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$-발현 N43/5 세포의 Triton X-100-처리된 세포소기관 분획 (도 7C, 레인 5 및 6)뿐만 아니라 digitonin-처리된 세포질 분획 (도 7, 레인 3 및 4)에서도 Hspa5가 현저하게 검출되었다. 또한, $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$의 발현이 ER 스트레스 반응의 지표로서 Hspa5의 수준을 현저하게 증가시킨 반면, 세포질 $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$의 발현은 특히 세포질 분획에서 Gpx4의 수준을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다 (도 7C, 레인 3 및 4). 아울러, 공동면역침강 분석 결과, $POMC_{ha}^{\Delta 1-26}$가 $Hspa5_{myc}$에 결합하여 Gpx4-Hspa5의 상호작용을 감소시키는 것으로 나타나 (도 7D 및 E), 세포질에서 ER로 이동하지 못한 POMC가 Hspa5를 격리함으로써 Gpx4의 분해를 유도하는 것을 확인하였다.

[0145] **실시예 8. Marchf6의 ER로의 POMC 이동 기전 분석**

[0146] 전장의 $POMC_{ha}$가 *Marchf6*-KO N43/5 세포에서 Hspa5-Gpx4의 상호작용을 현저하게 감소시켰고 (도 7F, cf. 레인 2 및 3), 이 감소가 Fer-1 처리에 의해 회복되었기 때문에 (도 7F, cf. 레인 4), Marchf6의 제거가 지질 ROS 수

준을 증가시킴으로써 SP 포함 (ER 이동 가능) POMC의 ER 이동에 영향을 주는지 differential detergent subcellular fractionation 후 IP-IB 분석으로 확인하였다.

[0147] 그 결과, *Marchf6*-KO N43/5 세포의 세포질 분획 (digitonin-추출된)에서 $POMC_{ha}$의 수준이 Fer-1 처리에 의해 현저하게 감소하는 것으로 나타난 반면 (도 7G, cf. 레인 3 및 4), 페롭토시스 유도제인 에라스틴(erastin)을 처리한 경우 WT N43/5 세포의 세포질 분획에서 조차 $POMC_{ha}$의 수준이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 7H, cf. 레인 3 및 4).

[0148] 에라스틴이 지질 과산화를 상향 조절하여 Marchf6 불활성화를 유발하므로, 상기 결과를 통해, Marchf6가 지질 과산화를 방지함으로써 POMC의 ER로의 이동(translocation)을 촉진하는 것을 유추할 수 있다.

[0150] **실시예 9. POMC 뉴런 특이적 Marchf6 매개 POMC 분해의 생리학적 역할 분석**

[0151] POMC 뉴런에서 Marchf6-매개된 POMC 분해의 생리학적 역할을 확인하기 위해, Cre-loxP 기술을 이용하여 POMC 뉴런 특이적 *Marchf6* 결손(deficiency) 마우스 ($Marchf6^{POMC}$)를 제작하였다. 구체적으로, C57BL/6J 배경에서 LacZ 및 네오마이신 선택 카세트가 없는 $Marchf6^{fl/fl}$ 마우스 (EUCOMM, $Marchf6^{tm1c}$)와 *POMC-Cre* 마우스 (Jackson Laboratory, #JAX010714)를 교배하여 POMC 뉴런 특이적 *Marchf6*-플록스된(floxed) 마우스를 제작하였다. 제작한 마우스의 꼬리를 샘플링하여 얻은 유전체(Genomic) DNA를 PCR 기반 유전형 분석(genotyping)을 통해 분석하였다. 이 때, 사용된 유전형 분석 프라이머 쌍 (OCH5339: CACTAGACATGCTGTCAACGTGAGTATTA, OCH9075: TCAAGTAATAAGATTAAATACATGAGCCAGGC; 및 OCH5339: CACTAGACATGCTGTCAACGTGAGTATTA, OCH9129: GCGAGCTCAGACCATAACTTCG)은 *Marchf6* 엑손 5 및 그의 248-bp 플록스된 DNA의 277-bp 야생형 DNA를 각각 검출하도록 설계하였다. 제작한 POMC 뉴런 특이적 *Marchf6* 결손 마우스 ($Marchf6^{POMC}$)의 체중 및 음식 섭취량은 해당 주(week)에 디지털 체중 척도로 측정하였으며, 체지방량(fat mass and) 및 제지방량(lean mass)과 같은 체 성분(Body composition)은 정량적 NMR-기반 분석기 (EchoMRI, EchoMRI-700)로 측정하였다. 에너지 소비(energy expenditures)를 평가하기 위해, 동물들을 분석 48시간 전에 분석 조건에 적응시킨 다음, 12:12 시간 주/야간 주기로 추가 48시간 동안 PhenoMaster (TSE SYSTEM)를 사용하여 평가하였다. 이 분석 동안의 주/야간 주기는 마우스의 초기 주거 동안의 주기와 동일했으며 동일한 음식을 단일 대사 케이지에서 제공하였다. 또한, 면역조직화학(immunohistochemistry, IHC) 분석을 위해, Avertin (250 mg/kg of body weight, Sigma, T48402)를 복강내 주사하여 마우스를 마취하고, PBS 및 4% 파라포름알데하이드 (PFA) (Mentos Biotechnology, M1177)로 순차적으로 경심관류(transcardially perfused)하였다. 마우스에서 뇌를 적출하고 vibratome (Leica, VT1000S)을 이용한 후속 섹션화(sectioning) (60 μm 두께로 관상면(coronal section))를 위해 4℃의 4% PFA 용액에서 후-고정하였다. 마우스 뇌 아틀라스(atlas)에 따라 궁상핵(arcuate nucleus, ARC)-포함 조직 섹션을 수득하고 (https://mouse.brain-map.org/static/atlas), 블로킹 버퍼 용액 (100 mM 인산 버퍼, 4% 정상 당나귀의 혈청, 0.5% Triton X-100)와 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이 후, anti-Gpx4 (1:500), anti-4HNE (1:500) 및 anti-Hspa5 (1:500)를 일차항체로 사용하여 4℃에서 12시간 동안 처리하고, 조직을 4℃에서 10분씩 3회 100 mM 인산 버퍼로 세척하여 각 일차항체에 대응되는 Alexa-Fluor 488, 568 또는 647-컨쥬게이트된 이차항체 (1:500)를 4℃에서 12시간 동안 처리하였다. 조직을 DAPI (Vector Laboratories, H-2000)를 포함하는 마운팅 용액으로 마운팅하고 1024×1024 픽셀 크기의 레이저 스캐닝 콘포컬 현미경 (Olympus, FV1000)로 이미지화하였으며, ImageJ (NIH) 를 이용하여 형광 강도를 정량화하였다. 아울러, $Marchf6^{POMC}$ 마우스의 시상하부(hypothalamus)에서 POMC-유래 α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)의 수준을 측정하기 위해, 마우스에서 시상하부를 채취하여 즉시 액체질소로 동결시켜 -80℃에서 보관하고, 동결된 시상하부를 분쇄한 뒤 0.1N HCl 용액에 재현탁하여 초음파 처리하였다. 4℃에서 17,000×g로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 수득한 뒤, α-MSH ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, EK-043-01)를 이용하여 ELISA 분석을 수행하였다.

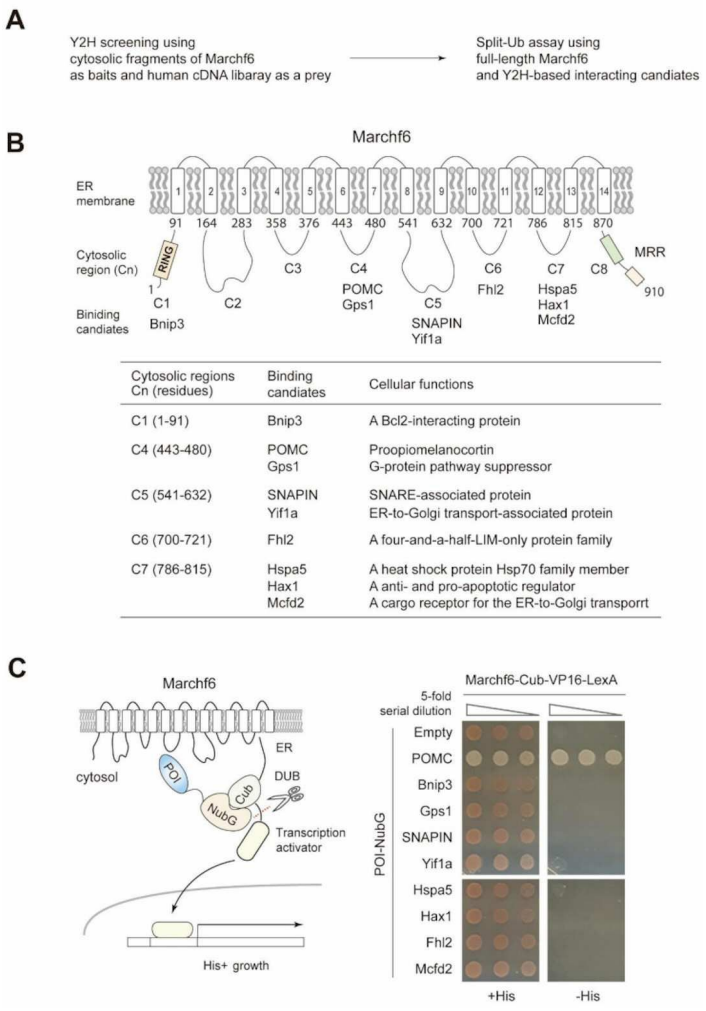
[0152] POMC 뉴런 특이적 *Marchf6* 결손 마우스인 $Marchf6^{POMC}$ 마우스는 암수 모두 출생시에는 정상이었으나, 정상적인 음식 섭취하에 동배(littermate)의 $Marchf6^{fl/fl}$ 마우스에 비해 현저하게 체중이 증가하는 것으로 나타났다 (도 9A 및 B, 및 도 10A 및 B). 특히, 소비된 음식의 총량이 20주령의 $Marchf6^{fl/fl}$ 마우스에 비해 $Marchf6^{POMC}$ 마우스에서 현저하게 높은 것으로 나타났다 (도 9C 및 D). 또한, 체성분 분석 결과, $Marchf6^{POMC}$ 마우스 암 수 모두 지방량이 증가하였으며, 제지방량은 적은 것으로 나타났다 (도 10C 내지 F). 반면, 에너지 소비는 동배의

Marchf6$^{fl/fl}$ 마우스에 비해 *Marchf6*^{POMC} 마우스에서 현저하게 감소한 것으로 나타났다 (도 9E 및 F). 또한, IHC 분석 결과, 동배의 *Marchf6*$^{fl/fl}$ 마우스에 비해 *Marchf6*^{POMC} 수컷 마우스의 시상하부 ARC에서 지질 과산화 산물인 4-HNE, POMC 및 Hspa5의 수준이 현저하게 증가한 (도 9G 및 H, 및 도 11) 반면, Gpx4 수준은 Marchf6 결실 POMC 뉴런에서 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 9I 및 도 11). 아울러, *Marchf6*^{POMC} 마우스의 시상하부에서 POMC-유래 α-MSH의 수준이 *Marchf6*$^{fl/fl}$ 마우스에 비해 현저히 감소하였다 (도 9J). *Marchf6*^{POMC} 마우스는 동배의 *Marchf6*$^{fl/fl}$ 마우스보다 POMC 뉴런에서 POMC 단백질 수준이 더 높기 때문에, Marchf6 결손에 의해 유발된 지질 과산화 증가로 인해 POMC의 ER로의 이동이 지연되어 POMC-유래 생리활성 펩타이드 중 하나인 α-MSH의 방출이 감소된 것일 수 있다.

[0154] 상기 결과를 통해, POMC 뉴런 특이적 Marchf6-결손 마우스에서 POMC-매개된 페롭토시스 손상의 증가, ER 스트레스 증가, 및 그 후의 성숙한 POMC-유래 호르몬들의 감소로 인해 과식증, 체중 증가 및 감소된 에너지 소비가 발생한 것을 확인하였다.

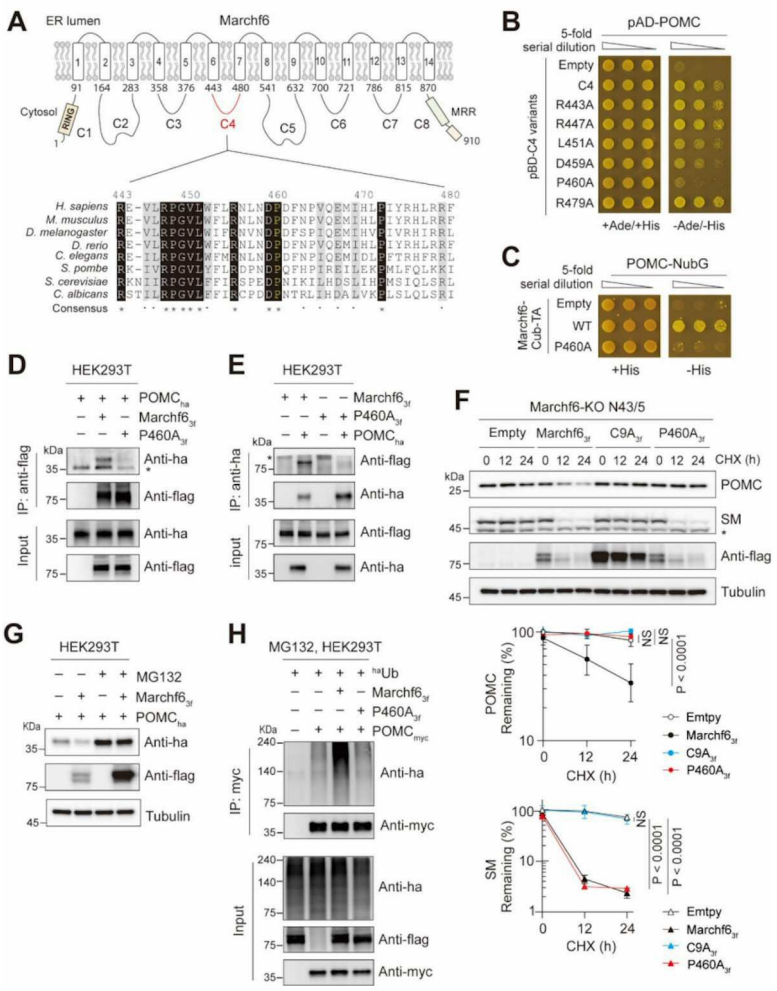
도면

도면1

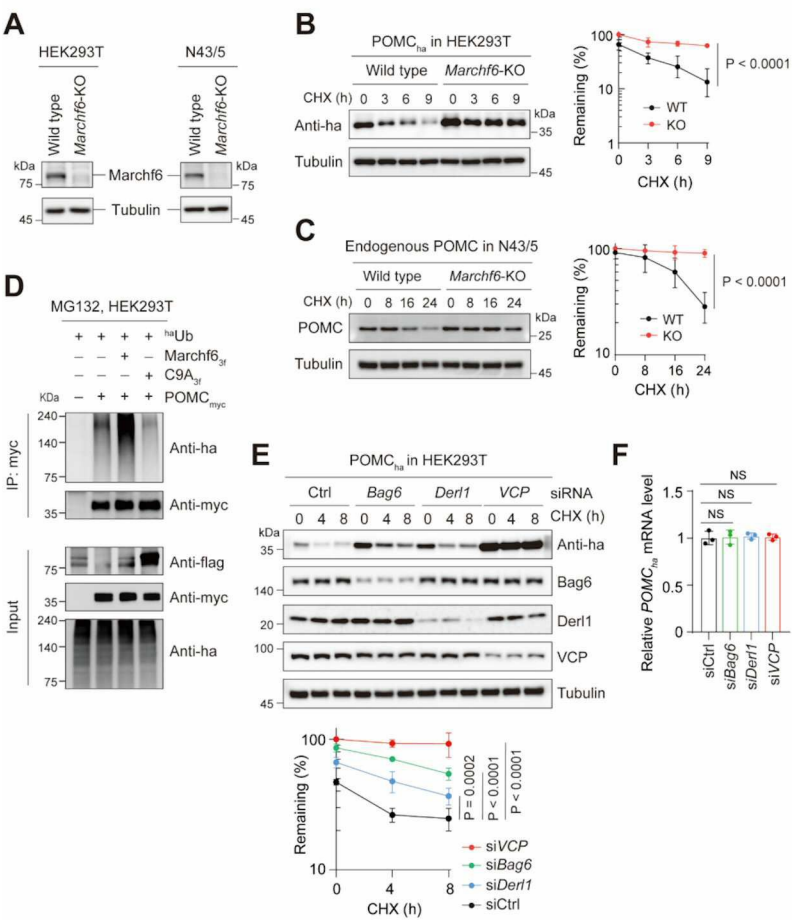


Cytosolic regions Cn (residues)	Binding candiates	Cellular functions
C1 (1-91)	Bnip3	A Bcl2-interacting protein
C4 (443-480)	POMC Gps1	Proopiomelanocortin G-protein pathway suppressor
C5 (541-632)	SNAPIN Yif1a	SNARE-associated protein ER-to-Golgi transport-associated protein
C6 (700-721)	Fhl2	A four-and-a-half-LIM-only protein family
C7 (786-815)	Hspa5 Hax1 Mcfd2	A heat shock protein Hsp70 family member A anti- and pro-apoptotic regulator A cargo receptor for the ER-to-Golgi transporrt

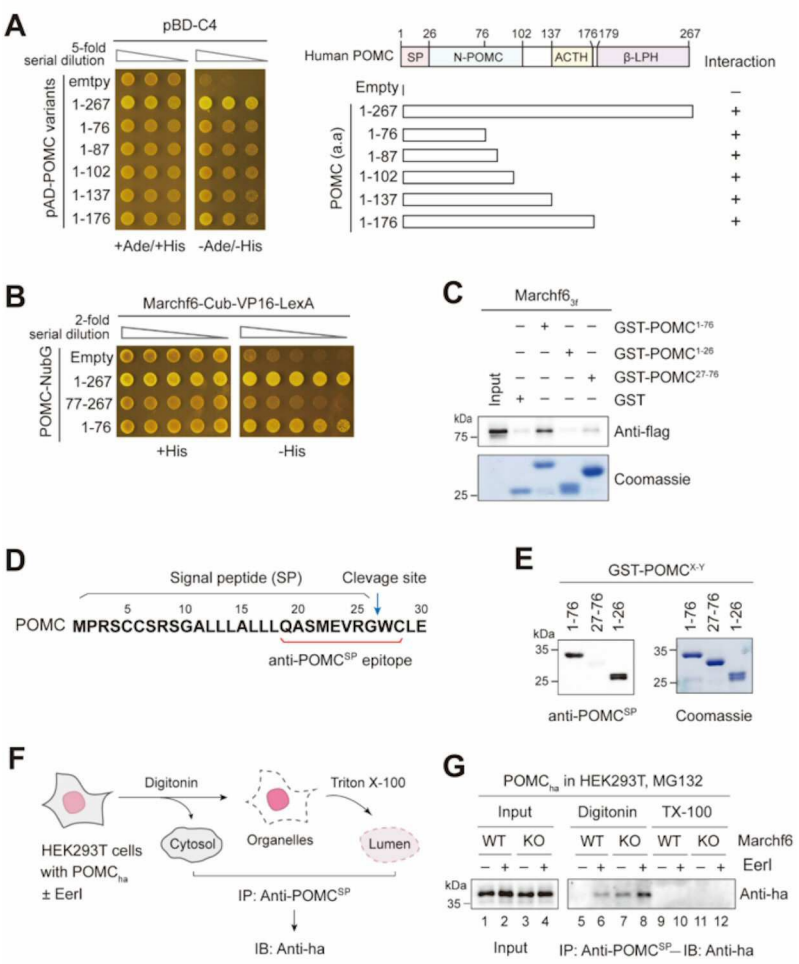
도면2


A
ER lumen
Marchf6
Cytosol
RING
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
MRR
H. sapiens
M. musculus
D. melanogaster
D. rerio
C. elegans
S. pombe
S. cerevisiae
C. albicans
Consensus
B
pAD-POMC
5-fold serial dilution
pBD-C4 variants
Empty
C4
R443A
R447A
L451A
D459A
P460A
R479A
+Ade/+His
-Ade/-His
C
POMC-NubG
Marchf6-Cub-TA
WT
+His
-His
D
HEK293T
IP: anti-flag
Input
Anti-ha
Anti-flag
E
HEK293T
IP: anti-ha
F
Marchf6-KO N43/5
Empty
C9A
CHX (h)
POMC
SM
Tubulin
G
HEK293T
MG132
H
MG132, HEK293T
IP: myc
Anti-myc
POMC Remaining (%)
SM Remaining (%)
CHX (h)
NS
P < 0.0001
Emtpy

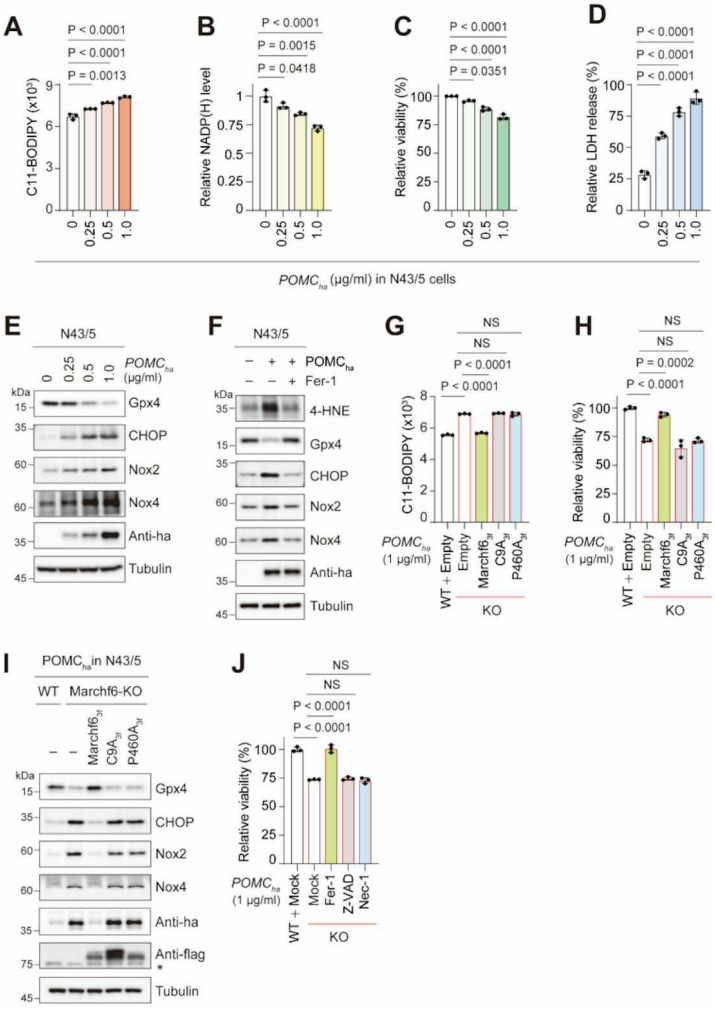
도면3


A
HEK293T
N43/5
Wild type
Marchf6-KO
Marchf6
Tubulin
B
POMC$_{ha}$ in HEK293T
Wild type
Marchf6-KO
CHX (h)
Anti-ha
Tubulin
Remaining (%)
P < 0.0001
WT
KO
CHX (h)
C
Endogenous POMC in N43/5
POMC
D
MG132, HEK293T
^{ha}Ub
Marchf6$_{3f}$
C9A$_{3f}$
POMC$_{myc}$
IP: myc
Anti-ha
Anti-myc
Input
Anti-flag
E
Ctrl
Bag6
Derl1
VCP
siRNA
Bag6
Derl1
VCP
P = 0.0002
P < 0.0001
siVCP
siBag6
siDerl1
siCtrl
F
Relative POMC$_{ha}$ mRNA level
NS
siCtrl
siBag6
siDerl1
siVCP

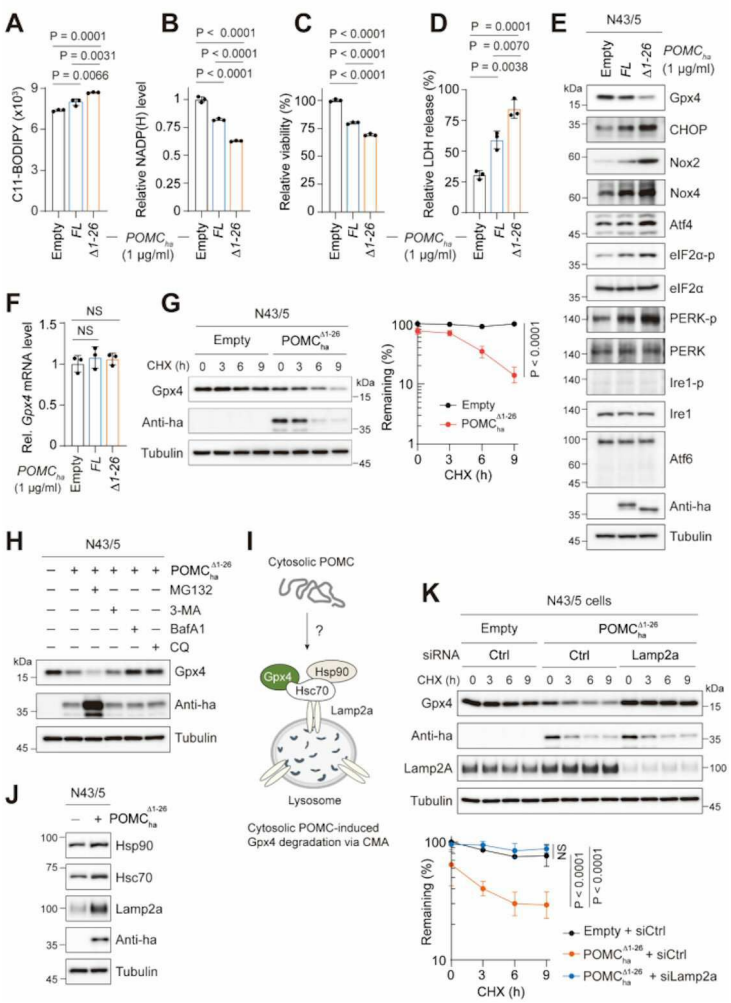
도면4


A
pBD-C4
5-fold serial dilution
pAD-POMC variants
emtpy
1-267
1-76
1-87
1-102
1-137
1-176
+Ade/+His
-Ade/-His
Human POMC
SP
N-POMC
ACTH
β-LPH
Interaction
Empty
POMC (a.a)
B
Marchf6-Cub-VP16-LexA
2-fold serial dilution
POMC-NubG
Empty
1-267
77-267
1-76
+His
-His
C
Marchf6$_{3f}$
GST-POMC$^{1-76}$
GST-POMC$^{1-26}$
GST-POMC$^{27-76}$
GST
Input
kDa
75
25
Anti-flag
Coomassie
D
Signal peptide (SP)
Clevage site
POMC MPRSCCSRSGALLLALLLQASMEVRGWCLE
anti-POMC^{SP} epitope
E
GST-POMC^{X-Y}
1-76
27-76
1-26
kDa
35
25
anti-POMC^{SP}
Coomassie
F
Digitonin
Triton X-100
HEK293T cells with POMC$_{ha}$
± EerI
Cytosol
Organelles
Lumen
IP: Anti-POMC^{SP}
IB: Anti-ha
G
POMC$_{ha}$ in HEK293T, MG132
Input
Digitonin
TX-100
WT
KO
Marchf6
EerI
Anti-ha
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Input
IP: Anti-POMC^{SP}– IB: Anti-ha

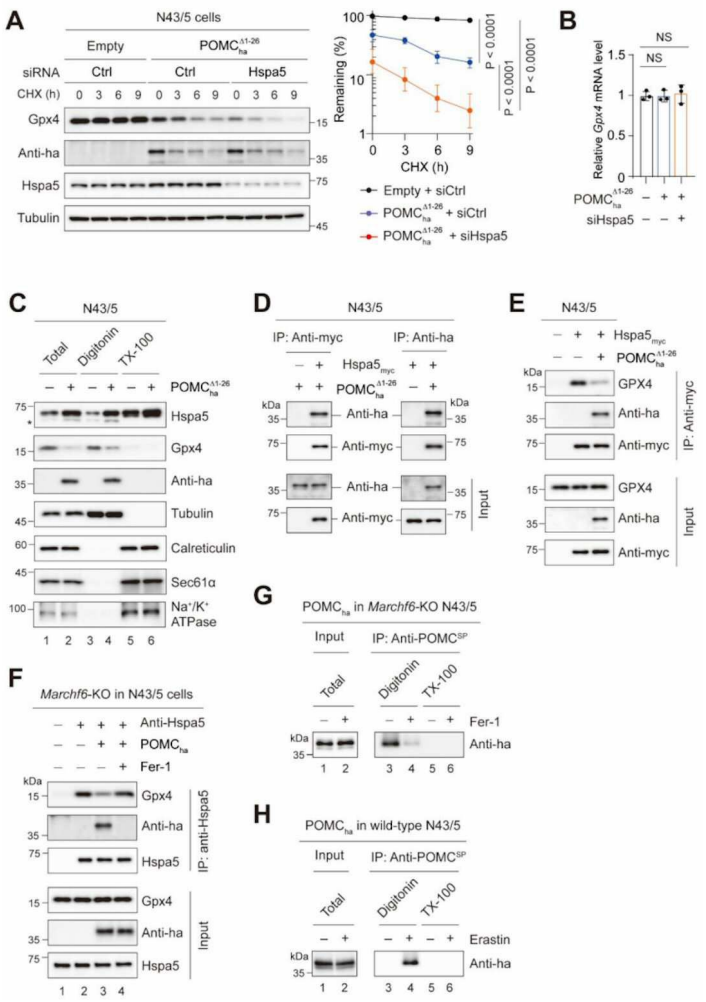
도면5


A
B
C
D
C11-BODIPY (x10³)
Relative NADP(H) level
Relative viability (%)
Relative LDH release (%)
POMC_ha (μg/ml) in N43/5 cells
E
N43/5
POMC_ha (μg/ml)
Gpx4
CHOP
Nox2
Nox4
Anti-ha
Tubulin
F
N43/5
POMC_ha
Fer-1
4-HNE
G
H
WT + Empty
Empty
Marchf6_jf
C9A_jf
P460A_jf
KO
I
POMC_ha in N43/5
WT
Marchf6-KO
Anti-flag *
J
Mock
Fer-1
Z-VAD
Nec-1
NS

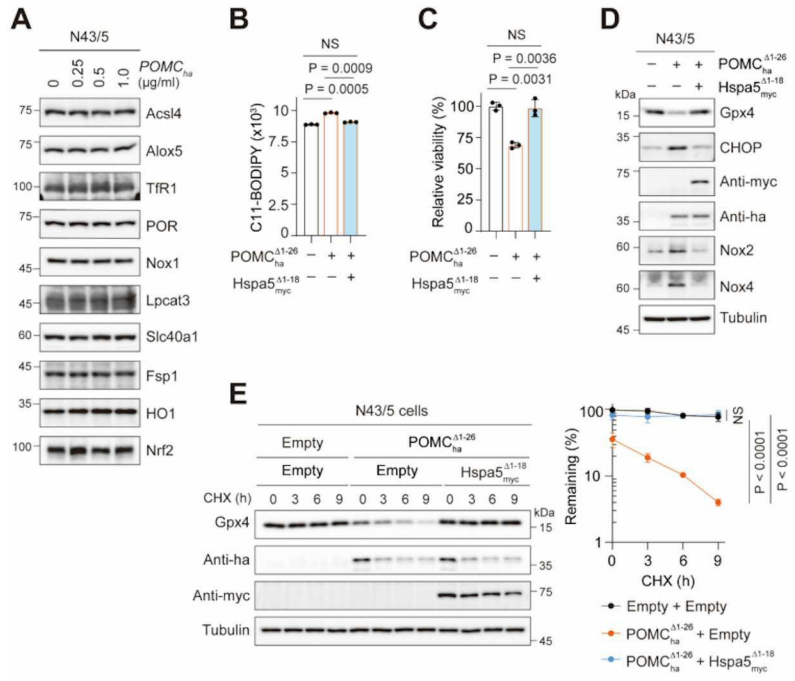
도면6


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
N43/5
Empty
FL
Δ1-26
Gpx4
CHOP
Nox2
Nox4
Atf4
eIF2α-p
eIF2α
PERK-p
PERK
Ire1-p
Ire1
Atf6
Anti-ha
Tubulin
Hsp90
Hsc70
Lamp2a
Cytosolic POMC
Lysosome
Cytosolic POMC-induced Gpx4 degradation via CMA
N43/5 cells
siRNA
Ctrl
Lamp2A
CHX (h)
Remaining (%)
Empty + siCtrl
POMC + siCtrl
POMC + siLamp2a
NS

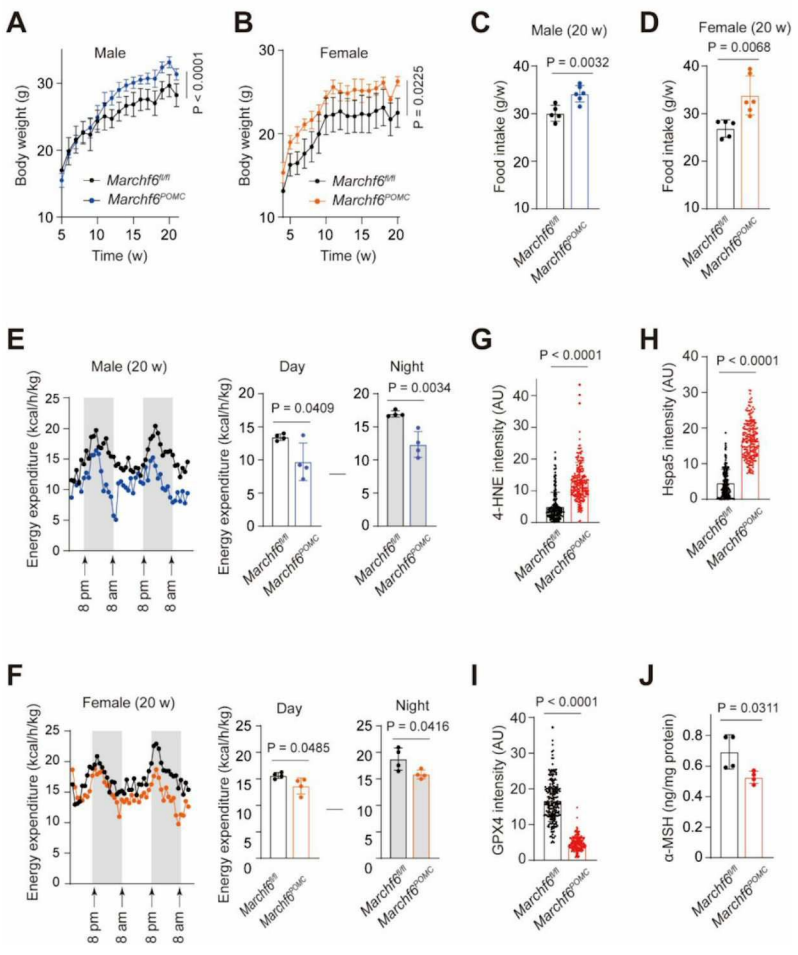
도면7


A
N43/5 cells
Empty
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
siRNA
Ctrl
Ctrl
Hspa5
CHX (h)
0 3 6 9 0 3 6 9 0 3 6 9
Gpx4
Anti-ha
Hspa5
Tubulin
Remaining (%)
CHX (h)
P < 0.0001
P < 0.0001
P < 0.0001
Empty + siCtrl
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$ + siCtrl
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$ + siHspa5
B
Relative Gpx4 mRNA level
NS
NS
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
siHspa5
C
N43/5
Total
Digitonin
TX-100
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
Hspa5
Gpx4
Anti-ha
Tubulin
Calreticulin
Sec61α
Na$^+$/K$^+$ ATPase
1 2 3 4 5 6
D
N43/5
IP: Anti-myc
IP: Anti-ha
Hspa5$_{myc}$
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
Anti-ha
Anti-myc
Input
E
N43/5
Hspa5$_{myc}$
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
GPX4
Anti-ha
Anti-myc
IP: Anti-myc
Input
F
Marchf6-KO in N43/5 cells
Anti-Hspa5
POMC$_{ha}$
Fer-1
Gpx4
Anti-ha
Hspa5
IP: anti-Hspa5
Input
1 2 3 4
G
POMC$_{ha}$ in Marchf6-KO N43/5
Input
IP: Anti-POMC^{SP}
Total
Digitonin
TX-100
Fer-1
Anti-ha
1 2 3 4 5 6
H
POMC$_{ha}$ in wild-type N43/5
Input
IP: Anti-POMC^{SP}
Total
Digitonin
TX-100
Erastin
Anti-ha
1 2 3 4 5 6

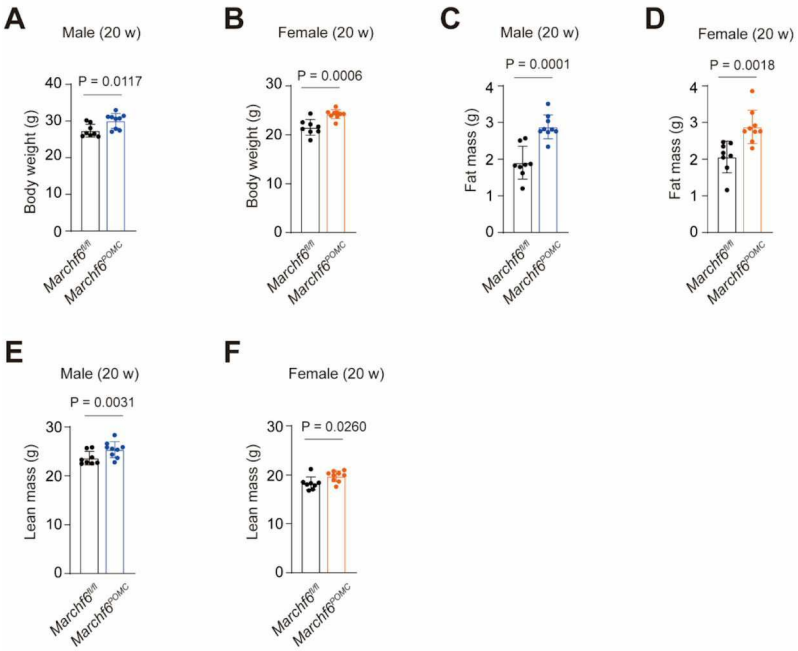
도면8


A
N43/5
POMC$_{ha}$ (μg/ml)
0 0.25 0.5 1.0
Acsl4
Alox5
TfR1
POR
Nox1
Lpcat3
Slc40a1
Fsp1
HO1
Nrf2
B
NS
P = 0.0009
P = 0.0005
C11-BODIPY (x10^3)
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
Hspa5$_{myc}^{Δ1-18}$
C
NS
P = 0.0036
P = 0.0031
Relative viability (%)
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
Hspa5$_{myc}^{Δ1-18}$
D
N43/5
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
Hspa5$_{myc}^{Δ1-18}$
Gpx4
CHOP
Anti-myc
Anti-ha
Nox2
Nox4
Tubulin
E
N43/5 cells
Empty
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$
Empty
Empty
Hspa5$_{myc}^{Δ1-18}$
CHX (h)
0 3 6 9 0 3 6 9 0 3 6 9
Gpx4
Anti-ha
Anti-myc
Tubulin
Remaining (%)
CHX (h)
NS
P < 0.0001
P < 0.0001
Empty + Empty
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$ + Empty
POMC$_{ha}^{Δ1-26}$ + Hspa5$_{myc}^{Δ1-18}$

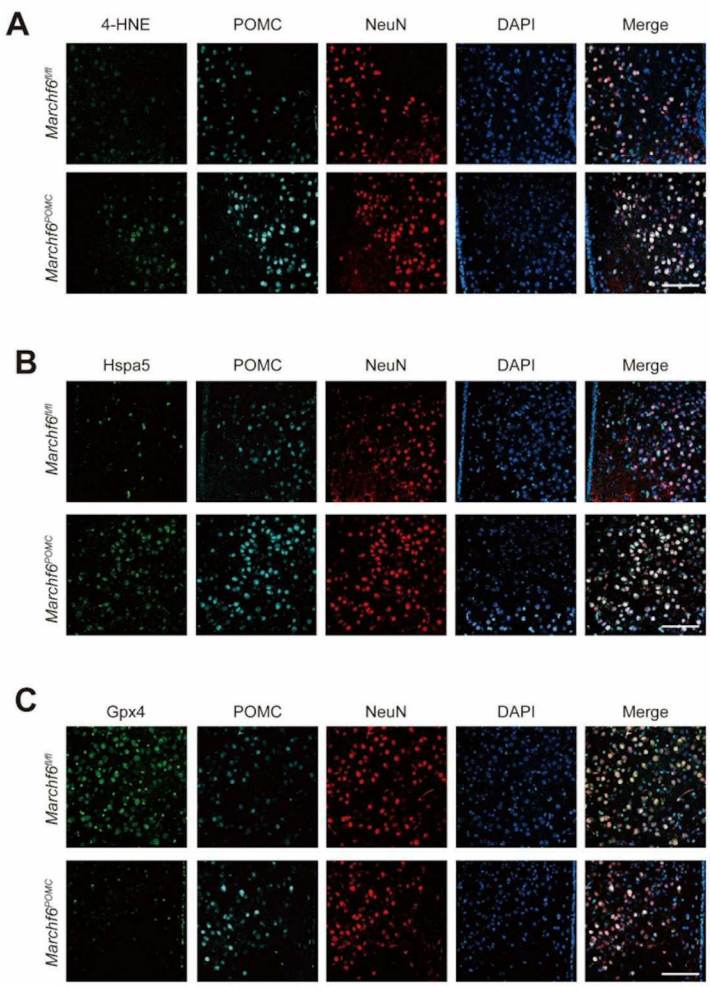
도면9


A
Male
Body weight (g)
P < 0.0001
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
Time (w)
B
Female
Body weight (g)
P = 0.0225
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
Time (w)
C
Male (20 w)
P = 0.0032
Food intake (g/w)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
D
Female (20 w)
P = 0.0068
Food intake (g/w)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
E
Male (20 w)
Energy expenditure (kcal/h/kg)
8 pm
8 am
8 pm
8 am
Day
P = 0.0409
Night
P = 0.0034
Energy expenditure (kcal/h/kg)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
G
P < 0.0001
4-HNE intensity (AU)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
H
P < 0.0001
Hspa5 intensity (AU)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
F
Female (20 w)
Energy expenditure (kcal/h/kg)
8 pm
8 am
8 pm
8 am
Day
P = 0.0485
Night
P = 0.0416
Energy expenditure (kcal/h/kg)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
I
P < 0.0001
GPX4 intensity (AU)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
J
P = 0.0311
α-MSH (ng/mg protein)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC

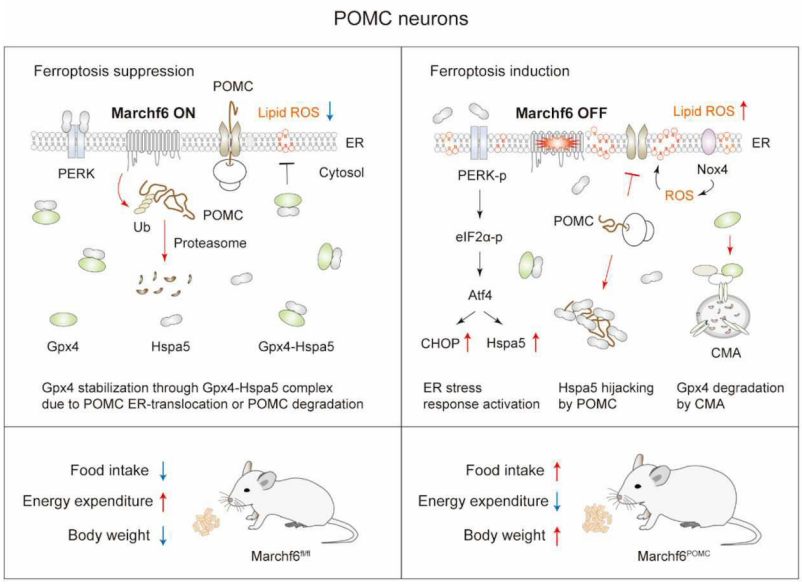
도면10


A
Male (20 w)
P = 0.0117
Body weight (g)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
B
Female (20 w)
P = 0.0006
Body weight (g)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
C
Male (20 w)
P = 0.0001
Fat mass (g)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
D
Female (20 w)
P = 0.0018
Fat mass (g)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
E
Male (20 w)
P = 0.0031
Lean mass (g)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
F
Female (20 w)
P = 0.0260
Lean mass (g)
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC

도면11


A
4-HNE
POMC
NeuN
DAPI
Merge
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
B
Hspa5
POMC
NeuN
DAPI
Merge
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC
C
Gpx4
POMC
NeuN
DAPI
Merge
Marchf6fl/fl
Marchf6POMC

도면12


POMC neurons
Ferroptosis suppression
POMC
Marchf6 ON
Lipid ROS
ER
PERK
Cytosol
POMC
Ub
Proteasome
Gpx4
Hspa5
Gpx4-Hspa5
Gpx4 stabilization through Gpx4-Hspa5 complex due to POMC ER-translocation or POMC degradation
Ferroptosis induction
Marchf6 OFF
Lipid ROS
ER
PERK-p
Nox4
ROS
POMC
eIF2α-p
Atf4
CHOP
Hspa5
CMA
ER stress response activation
Hspa5 hijacking by POMC
Gpx4 degradation by CMA
Food intake
Energy expenditure
Body weight
Marchf6fl/fl
Food intake
Energy expenditure
Body weight
MarchfPOMC