

## α-MSH유도체들의 구조와 기능연구

연세대학교 의과대학 내과학교실<sup>1</sup>, 연세대학교 의과대학 내분비 연구소<sup>2</sup>, 연세대학교 이과대학 생화학과<sup>3</sup>

임승길<sup>1,2</sup> · 이송철<sup>2</sup> · 이원태<sup>3</sup> · 이정훈<sup>3</sup> · 남수연<sup>1</sup> · 김경래<sup>1,2</sup> · 이현철<sup>1,2</sup> · 허갑범<sup>1,2</sup>

### Structure and Function Analysis of α-MSH Analogues

Sung-Kil Lim, M.D.<sup>1,2</sup>, Song-zhe Li M.D.<sup>2</sup>, Wontae Lee Ph.D.<sup>3</sup>, Jung Hoon Lee<sup>3</sup>,  
Su Youn Nam M.D.<sup>1</sup>, Kyung Rae Kim M.D.<sup>1,2</sup>, Hyun Chul Lee M.D.<sup>1,2</sup> and Kap Bum Huh M.D.<sup>1,2</sup>

*Dept. of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University<sup>1</sup>, Institute of Endocrinology,  
College of Medicine, Yonsei University<sup>2</sup>, Dept. of Biochemistry, College of Science, Yonsei University<sup>3</sup>*

#### ABSTRACT

**Background:** Leptin secreted from adipose tissue activates not only its receptors expressed abundantly in the brain, including arcuate nucleus but the POMC neurons resulting in secretion of α-MSH. Activation of MC4R by α-MSH increases the energy expenditure and decreases the food intake, and promotes the sympathetic activity.

**Methods:** To analyze the biologic activity of α-MSH analogues, the rat MC3R DNA and human MC4R DNA were stably and independently expressed in CHO cell lines, and we performed the competitive receptor binding assay with [<sup>125</sup>I]NDP-MSH as a radioligand and cyclic AMP accumulation assay following treatment with different ligands. α-MSH (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Val-NH<sub>2</sub>) and its analogue α-MSH-ND (Ac-Nle-Asp-His-Dphe-Arg-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>) were synthesized by Genosys Biotechnologies, Inc. The HPLC purified samples for NMR experiments were dissolved in 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O or 99.9% D<sub>2</sub>O solutions at pH 7.0 with concentrations of 2~4 mM in 50 mM sodium phosphate buffer. The NMR spectra were acquired on a Bruker AMX-500 or DMX-600 spectrometer in quadrature detection mode equipped with a triple-resonance probe with an actively shielded pulsed field gradient coil.

**Results:** The preferential order of binding activity for MC3R was NDP-MSH > α-MSH-ND > [Nle<sup>4</sup>]-MSH with IC<sub>50</sub> values (nM) being 0.367±0.074, 47.20±9.08 and 106.70±32.25, respectively. For MC4R, the same preferential order, NDP-MSH (0.566±0.194) > α-MSH-ND (6.70±1.07) >

접수일자: 1999년 1월 14일

통과일자: 1999년 3월 16일

책임저자: 임승길, 연세대학교 의과대학 내과학교실

\* 본 연구는 '98 보건 복지부 연구비(HMP-98-D-4-0033) 지원에 의하여 이루어 졌음.

[Nle<sup>4</sup>] $\alpha$ -MSH (238.30 $\pm$ 30.47), were obtained. In c-AMP generation assay, the potency order of peptides was NDP-MSH >  $\alpha$ -MSH-ND >  $\alpha$ -MSH at both MC3R and MC4R. Accumulated food intake of Sprague Dawley rats was low significantly for six hours after injection of  $\alpha$ -MSH-ND into peritoneum.  $\alpha$ -MSH forms a hair pin loop conformation, whereas  $\alpha$ -MSH-ND, a linear form of MTHL, prefers a type I  $\beta$ -turn comprising residues Asp<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-DPhe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup> in NMR study.

**Conclusion:** we developed *in vitro* and *in vivo* bioassay system to evaluate the biologic activity of  $\alpha$ -MSH analogues and we also showed that the type I  $\beta$ -turn structure of  $\alpha$ -MSH-ND might enhance the binding activity to MC4R (J Kor Soc Endocrinol 14:18~26, 1999).

**Key Words:** Obesity, Melanocortin, Structure and Function

## 서 론

최근 몇 년 동안 비만증 연구에 헌신적으로 기여한 일련의 학자들은 비만 동물 모델을 대상으로 비만증을 유발시키는 후보 유전자들을 크로닝하고, 크로닝한 유전자에 돌연변이를 유발시킨 knock out 생쥐 동물 모델을 만들어서 다시 그 표현형을 분석하는 분자생물학적 기법, 또는 가족성 고도 비만 환자들로부터 특정 유전자의 돌연변이를 찾아내는 방법을 이용하여 비만 조절 기작을 이해하는데 결정적이고 팔목할 만한 사실들을 밝혀낼 수 있게 되었다[1,2]. 그 중에서도 obese(ob) 유전자와 diabetes(db) 유전자의 크로닝은 신체의 체중과 energy balance 조절기작을 이해하는 발판을 마련해 주었으며[1], 뒤이어 제시된 렙틴 분비 증감에 따른 다음 조절 단계로서 neural NPY와 멜라노코르틴의 증감이 매우 중요하다는 가설은 비만증 연구에 새로운 지평선을 열게 해 주었다[2]. 이를 간단히 요약해 보면, 말초 지방 세포가 증가하면 렙틴의 분비가 증가되고 증가된 렙틴은 시상하부의 NPY 생성을 억제하고 멜라노코르틴 생성 및 분비를 증가케 함으로써 식욕을 감소시킬 수 있다는 가설이다. 최근에는 이를 뒷받침해 줄 수 있는 여러 실험적 근거들이 속속 보고됨에 따라 렙틴 이외의 상기 두 신경전달 물질들은 새로운 비만 치료 후보 물질로서 크게 주목을 받게 되었다[2].

멜라노코르틴 수용체는 현재 모두 다섯 가지가 알려졌는데 이들 모두가 seven transmembrane domain 을 갖는 수용체 군에 속하여 G-protein과 결합하여 활성

을 나타낸다[3]. 다섯 종류의 수용체 중에도 agouti 단백질이  $\alpha$ -MSH와 경쟁적으로 길항작용을 나타내는 수용체는 MC1R과 MC4R이며[4], 특히 MC4R는 섭생과 비만의 병태생리에 매우 중요한 작용을 함이 밝혀졌다. 이를 뒷받침할 수 있는 실험적 근거들로는 MC4R 유전자가 발현되지 않는 knockout mice에서도 agouti 단백질의 돌연변이시 표현되는 것과 유사하게 비만 현상이 발현되었는데, 이는 MC4R가 섭생과 비만의 병태생리에 매우 중요한 작용을 한다는 직접적인 증거라 할 수 있다[5]. 또한 MC4R의 agonist가 식욕을 억제하는 반면에 이들 수용체 길항제들은 반대로 식이섭취를 촉진시킨다는 사실들도 MC4R가 섭생과 비만의 병태생리에 매우 중요하다는 것을 뒷받침하는 결과라 할 수 있다[6,7].

최근 MC4R을 크로닝한 콘(Roger D. Cone)그룹을 위시한 일부 그룹들은  $\alpha$ -MSH의 기능적으로 매우 중요한 중심 sequence를 포함한 불과 5~10개 이내의 올리고펩타이드 만으로도 수용체에 결합하여 높은 생물학적인 활성도를 나타내는 것을 밝혀내고, 아미노산기를 변형시킨 일부 후보 제제들의 약제화 가능성을 탐색 중에 있다고 한다[8,9]. 이에 저자 등은 멜라노코르틴 agonist가 비만약제로 개발 가능한지를 탐색해 보고자 MC3R 및 MC4R cDNA를 CHO 세포에 stable transfection 시켜서 멜라노코르틴 유도체를 검증할 수 있는 시스템을 확보하고, 동시에 멜라노코르틴 유도체의 NMR구조를 조사하여  $\alpha$ -MSH의 구조와 기능을 연구하고자 본 실험을 진행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. DNA 구성

DNA 구성은 멜라노코틴 제3 수용체 (MC3R) 와 멜라노코틴 제4 수용체 (MC4R) cDNA를 Cone R.D. 교수로부터 기증 받아서 동물세포 표현 벡터인 pcDNA I (neo-resistant)에 subcloning함으로써 구성하였다. Subcloning 된 유전자는 제한 효소와 염기서열 검정을 통해서 멜라노코틴 제3 과 제4 수용체 각각의 cDNA 가 적절하게 삽입되었는지 여부를 확인하였다.

### 2. MC 수용체의 표현

멜라노코틴 수용체 cDNA가 삽입된 DNA를 fg2 숙주세포에 넣어서 MC3R 및 MC4R를 표현 시킬 수 있는 DNA를 대량 얻었다. 이렇게 얻은 DNA는 CHO 세포에 calcium phosphate 법으로 stable transfection 되었으며, neomycin을 배양 용액에 첨가하여 MC3R 또는 MC4R가 적절하게 genomic DNA에 삽입된 세포 주만을 screening해 낼 수 있었다. 즉 MC3 receptor 와 MC4 receptor 표현 가능성이 큰 세포주를 각각 10개 선택하고, 다시 neomycin 첨부된 용액에서 sub-culture시켜 증식 시킨 후 [ $^{125}$ I]  $\alpha$ -MSH 투여에 따른 c-AMP 형성 정도를 조사하여 basal level 은 제일 낮으면서 자극에는 최대치를 보이는 세포 주만을 각각 선택하였다.

### 3. *In vitro* bioassay

Ligand binding assay를 확립하기 위하여서 NDP-MSH (Sigma)와 [ $^{125}$ I]  $\alpha$ -MSH와 선상형 MTII인  $\alpha$ -MSH-ND를 라는 펩타이드를 디자인하여 합성하였다. NDP-MSH를 chloramin T 법을 이용하여 Na $^{125}$ I (Amersham)로 iodination 시켰으며, iodination 된 NDP-MSH는 C18 Sep-Pak Cartridge column (waters) 및 Sephadex G25 Gel-Filtration Chromatography방법을 이용해서 mono-iodinated NDP-MSH를 purify하였다. 상기 방법으로 만든 stable cell line 들을 24-well plate에 plating 시켜서 confluent cells이 되었을 때에 iodination된 MSH와 이미 알려진 peptide 들 (NDP-MSH, [ $^{125}$ I]  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH-ND)과 com-

petitive binding을 시켜 각 후보 물질들을 IC $_{50}$  (half maximum displacement activity를 보이는 농도) value 를 산정 하여 binding affinity를 비교 판정했다. Binding assay 과정을 기술하면 먼저 세포들을 얼음에 넣어 두었던 washing buffer로 2번 wash 시킨 후 각각의 펩타이드들을 binding buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl $_2$ , 5% Hanks Balanced Salt Solution, 0.5% Bovine Serum Albumin, pH 7.2)로 적정 농도별로 희석 시킨 후 iodinated NDP-MSH 와 함께 각 well에 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 incubation시킨 후 binding mixture를 제거하고 binding buffer로 4번 wash 시킨 후 50mM NaOH용액으로 lysis 시켜 glass tube로 옮긴 후 gamma count 로 측정하였다. 우리는 peptide들의 binding affinity뿐만 아니라 이 펩타이드들의 결합 능력을 관찰하기 위해서 cyclic AMP assay system을 확립하고자 했다. 구체적으로 기술하면 먼저 24-well plate에서 MC3R 및 MC4R를 표현하는 CHO세포 주를 배양하여 cyclic AMP assay buffer로 2번 washing해 준 후 합성된 펩타이드를 적정량의 농도로 희석 시킨 후 각각을 첨가하여 약 30 분간 incubation 시킨다. 배양이 끝난 후 상층 액을 모두 제거하고 세포만을 분쇄한 후 50 mM HCl을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 넣고 overnight 시킨 후, cAMP  $^{125}$ I RIA Kit (INCSTAR, USA)를 이용하여 cyclic AMP 용량을 정량하고 각 후보 peptide들의 EC $_{50}$ 를 산정했다.

### 4. *In vivo* assay

먼저 Sprague Dawley Rat을 각각 5 마리씩 2 그룹으로 나누어 실험군에게는 Lineal MTII ( $\alpha$ -MSH-ND)를 복강 내로 100 nM을 주사하고 대조군에게는 saline을 복강 내 주사하였다. 모든 백서는 metabolic cage에 한마리씩 넣어 주사후 12 시간 동안의 식이 및 물의 섭취량을 측정하였다.

### 5. NMR 구조 분석

멜라노코틴 호르몬들의 삼차원 구조와 기능을 생리 조건에서 핵자기 공명 및 분자 모델링 기법을 사용하여 결정하고 멜라노코틴 수용체와의 결합 기작을 확립

하여 생리활성에 필요한 핵심 부위를 추출하고자 하였다. 이를 위하여 생리 조건에서 멜라노코틴 호르몬들의 삼차원 구조를 연구하기 위하여 일차적으로 생체 내에서 합성되는 기본 호르몬인  $\alpha$ -MSH (Melanocyte Stimulating Hormone, Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Val-NH<sub>2</sub>) 펩타이드 및 그 stereoisomeric 유도체인  $\alpha$ -MSH-ND (Ac-Nle-Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>)를 Genosys Biotechnologies, Inc. 에서 합성하였다. 합성된 펩타이드는 HPLC를 이용하여 순수 분리하였다. 펩타이드들은 pH 7.0 짜리 50 mM Na-PBS buffer에 녹여 최종 농도를 2~4 mM 화 시켰다. 합성된 펩타이드들은 Bruker AMX-500 or DMX-600 spectrometer를 이용하여 핵자기 공명 분광학-삼차원 구조를 결정하였다. 사용된 실험으로는 일차원 NMR 실험으로 합성된 시료들의 순도를 측정하였으며 이차원 DQF-COSY, TOCSY 실험을 통하여 펩타이드들의 공명 신호를 귀속하였다. 호르몬들의 이차원 및 삼차원 구조에 대한 정보를 추출하기 위하여 NOESY 및 ROESY 실험을 통하여 수소 간의 거리 정보를 획득하였다. 얻어진 거리 정보는 분자 모델링 기법을 통하여 펩타이드들의 삼차원 구조를 계산하는데 이용되었으며 계산된 삼차원 구조들과 생리 활성도와의 상관 관계 확립을 통하여 생리활성에 필요한 구조적 정보를 추출하였다.

## 결 과

### 1. MC 수용체의 표현

pcDNA에 표현된 MC3R과 MC4R를 transfection 시킨 CHO세포들을 neomycin 처리하에 배양시켜 각각 20개 이상의 세포주를 얻을 수 있었다. 이들 중 약 10개의 세포주를 선택하여 [<sup>3</sup>H]-MSH를 처리하여서 c-AMP 생성 정도를 조사하여 각각의 세포 중에서도 활성도가 가장 큰 세포 주를 선택할 수 있었다 (Fig.1).

### 2. In vitro bioassay

MC3R 표현 세포주에 대한 각 peptide들의 IC<sub>50</sub> (nM)은 NDP-MSH 0.3671±0.074, [<sup>3</sup>H]-MSH

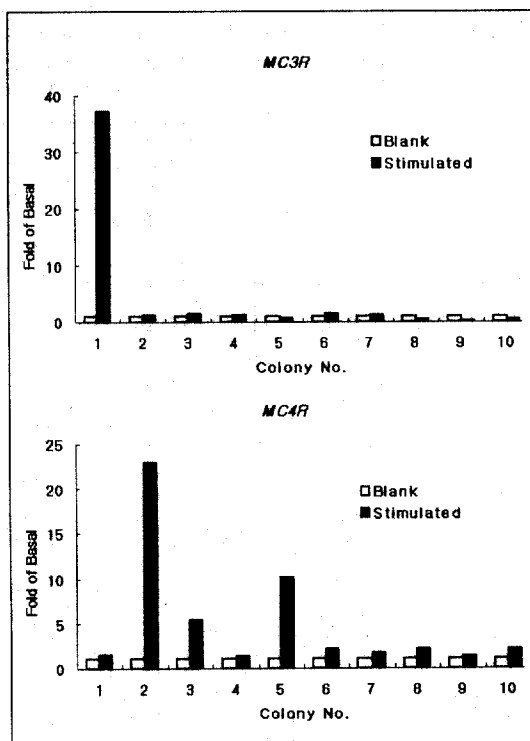


Fig. 1. Selection of CHO cell lines stably expressing MC3R or MC4R by measuring the level of [<sup>3</sup>H]-MSH-stimulated cAMP accumulation

106.70±32.25,  $\alpha$ -MSH-ND 47.20±9.08 였으며, MC4R에 대한 IC<sub>50</sub>는 "NDP-MSH 0.566±0.194, [<sup>3</sup>H]-MSH 238.30±30.47,  $\alpha$ -MSH-ND 6.70±1.07 였다. 또한 각 peptide들의 MC3R에 대한 EC<sub>50</sub> (nM)은 NDP-MSH 0.174±0.052, [<sup>3</sup>H]-MSH 9.362±1.932,  $\alpha$ -MSH-ND 1.523±0.707 이고, MC4R에 대한 EC<sub>50</sub>은 NDP-MSH 0.126±0.020, [<sup>3</sup>H]-MSH 46.040±4.799,  $\alpha$ -MSH-ND 0.780±0.405이었다. 따라서 각 peptide들의 IC<sub>50MC3R</sub>/IC<sub>50MC4R</sub> Ratio는  $\alpha$ -MSH-ND (7.04) > NDP-MSH (0.65) > [<sup>3</sup>H]-MSH (0.45) 순이며, EC<sub>50MC3R</sub>/EC<sub>50MC4R</sub> Ratio은  $\alpha$ -MSH-ND (1.953) > NDP-MSH (1.381) > [<sup>3</sup>H]-MSH (0.203) 순이었다 (Table 1).

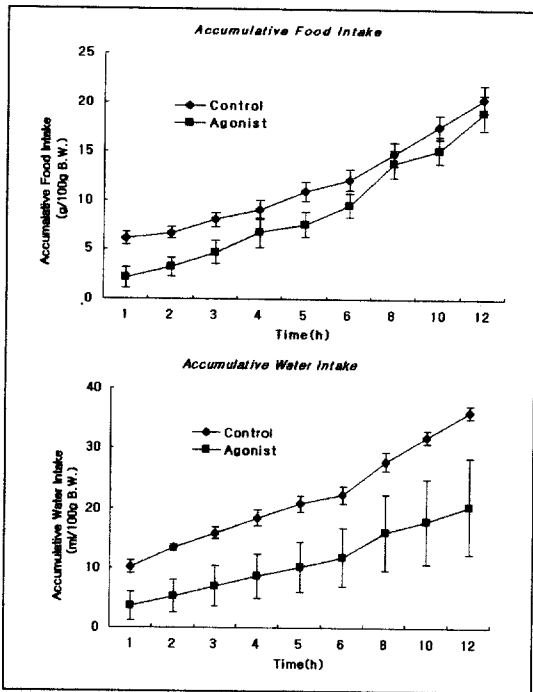
### 3. In vivo assay

$\alpha$ -MSH-ND를 ventricle 및 복강 내로 주입 받은 백서들은 주입 즉시 대조군과 비교하여 현저하게 식이

**Table 1.** IC<sub>50</sub> Values (Mean±S.E.M) and EC<sub>50</sub> Values (Mean±S.E.M) of α-MSH Analogues Obtained from Computer Analysis of Dose-response Curves on MC3 and MC4 Receptor- transfected CHO Cells, Together with Relative Affinity Ratios and Relative Bioactivity Ratios of the Melanocortin Receptor Subtypes

Ligands	IC <sub>50</sub> (nM)			EC <sub>50</sub> (nM)		
	MC3R	MC4R	Ratio of MC3R/MC4R	MC3R	MC4R	Ratio of MC3R/MC4R
NDP-MSH	0.36±0.07	0.576±0.19	0.65	0.174±0.05	0.126±0.02	1.38
[Nle <sup>4</sup> ]α-MSH	106.70±32.25	238.30±30.47	0.45	9.362±1.93	46.04±4.80	0.20
α-MSH-ND	47.20±9.08	6.70±1.07	7.04	1.523±0.71	0.78±0.41	1.95

MC: melanocortin, IC<sub>50</sub>: half inhibitory concentration, EC<sub>50</sub>: half effective concentration, CHO: China hamster ovary cell line.



**Fig. 2.** Effects of α-MSH derivative, α-MSH-ND, on food intake and water intake in mice after intraperitoneal injection.

\*p<0.05 as compared to the value of control group.

및 물의 섭취가 감소하였다. α-MSH-ND를 복강 내에 주입한 후 총 섭취량에서 실험군은 6시간까지 대조군에 비하여 식이 섭취가 적었다. 그러나 총 물의 섭취량

은 대조군에 비하여 12시간 내내 지속적으로 낮았다 (Fig. 2).

#### 4. NMR 구조 분석

기본 펩타이드 호르몬인 α-MSH와 Stereoisomer인 α-MSH-ND들의 삼차원 구조가 용액상에서 결정되었다. α-MSH는 MSH들에 공통으로 발견되는 아미노산 서열 부위(Glu<sup>5</sup>~Trp<sup>9</sup>)에서 hairpin loop 구조를 형성하고 있었으며 안정된 type I 이나 type I 형식의 β-turn 구조는 관찰되지 않았다. 반면에 생리활성이 탁월한 stereoisomer 인 α-MSH-ND 펩타이드는 전형적인 type I 의 β-turn 구조를 형성하였다 (Fig. 3). 안정된 구조를 이루는 type I 의 β-turn 부위는 Asp<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-DPhe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup> 서열로서 MSH 수용체와의 결합 부위의 핵심을 이루는 부분을 포함하고 있었다.

#### 고 찰

뇌하수체 전엽과 달리 뇌하수체 간엽과 뇌하수체 이외의 뇌세포에서 POMC (pro-opiomelanocortin)라는 거대 단백질은 생성 직후 α-MSH, Clip 및 γ-LPH로 분할되고 γ-LPH는 β-MSH로, β-endorphin은 γ-endorphin으로 γ-endorphin은 다시 α-endorphin으로 분할되어 특유의 생물학적 활성을 나타낸다[3]. 전신으로 분비된 α-MSH는 피부 착색화는 물론 부신피질을 자극하고 뇌에서 신경전달물질로 생성된 α-MSH는

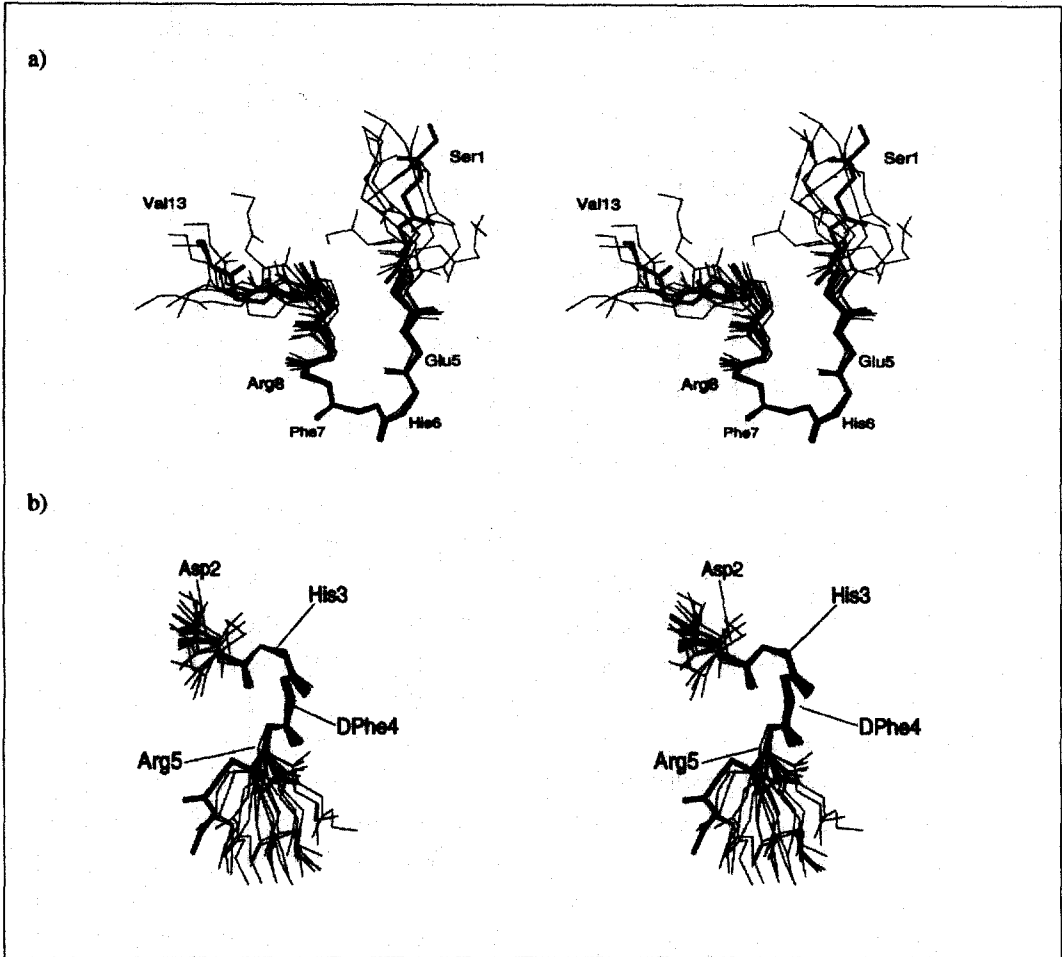


Fig. 3. NMR structure of  $\alpha$ -MSH and  $\alpha$ -MSH-ND.  $\alpha$ -MSH forms a hair pin loop conformation(a), whereas  $\alpha$ -MSH-ND, a linear form of MTH, prefers a type I  $\beta$ -turn comprising residues Asp<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-DPHe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>(b).

식이섭취를 억제한다[10]. 동물에서 에너지의 양의 밸런스가 지속적으로 유지되면 지방 세포의 비대가 초과되고 이로 인하여 렙틴의 분비는 물론 혈중 인슐린의 분비가 증가 된다. 증가된 두 호르몬은 뇌조직의  $\alpha$ -MSH의 분비를 촉진하는 것은 물론 시상하부의 NPY 분비 신경세포를 억제하는 것으로 알려졌다[11]. 더욱이 최근에는 렙틴의 수용체가 많이 표현되는 arcuate nucleus 부위에 POMC 뉴런의 체부가 있다는 것이 밝혀지면서  $\alpha$ -MSH가 식이조절에 매우 중요한 역할을 할 것이란 주장의 신빙성을 더하고 있어  $\alpha$ -MSH

agonist 또는 NPY antagonist 개발이 비만약제 개발의 새로운 표적 물질이 되었다 [10].

현재까지 알려진  $\alpha$ -MSH 수용체는 5가지가 있는데  $\alpha$ -MSH는 이들 5개의 수용체를 활성화시켜 각각의 조직 특이의 생물학적 작용을 나타내는 것으로 알려졌다 [3]. 즉 제1형 수용체는 멜라노사이트, 대식세포 및 지방세포에 표현되어 코르티솔의 분비를 증가시키며, 제3형 수용체는 태반, 십이지장, 췌장 및 위장에도 소량 표현되며 주로 뇌의 제한된 부위에 표현되는 것으로 알려져 있지만 그 기능은 아직 명확하지 않으며, 제4

형 수용체는 근육, 자율신경계와 척수부에도 표현되지만 주로 뇌에 비교적 광범위하게 표현되어 식이조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 반면에 제5형 수용체는 피부, 부신, 흉선, 난소 및 고환과 지방세포는 물론 뇌에도 표현되는 것으로 알려졌지만 그 기능은 아직 명확하지 않다. 한편 fuel homeostasis에 멜라노코틴이 멜라노코틴 제4 수용체(MC4R)를 활성화시켜 식욕억제를 유도한다는 구체적인 증거로는 POMC유전자의 돌연변이로 인하여  $\alpha$ -MSH전혀 형성되지 못한 환아들에서 극심한 비만이 관찰된다든지[12], 건강한 생쥐에서도 표현도 되고  $\alpha$ -MSH에 대한 길항 효과가 있는 agouti 단백질이 프로모토 부위의 돌연변이로 인하여 이소성으로 말초 및 뇌에 과량 표현된 생쥐에서 피부색의 탈색화와 함께 비만증이 관찰된다든지[13], 정상 뇌조직에서 agouti family로 표현되는 아구티양 단백질(agouti-related protein)을 과 표현 시킨 생쥐에서 비만증이 관찰된다든지 또는 MC4R를 Knock out 시킨 생쥐에서 비만증이 관찰되는 것 등을 들 수 있다 [5,14].

이에 본 연구진은  $\alpha$ -MSH-agonist를 개발해 보고자 MC3R 및 MC4R cDNA를 CHO cell에 stable transfection 시켜서 기저 c-AMP 합성을 최소로 하고 ligand 자극에 최대한 반응하는 세포 주를 각각 1 개씩 선택할 수 있었으며, 이러한 세포주들을 이용하여 radio-ligand binding assay와 c-AMP generation assay 법을 완료하였다. 이들 검사법을 이용하여 가장 생물학적으로 활성도가 높다는 NDP-MSH와  $\alpha$ -MSH 유도체개발에 가장 lead compound인 MTII의 선상형(lineal form)인  $\alpha$ -MSH-ND를 투여하여 각각 수용체에 대한 결합능과 c-AMP 생성능을 비교해 보았으며 동시에  $[Nle^4]\alpha$ -MSH의 생물학적 활성도도 함께 조사해 보았다. NDP-MSH는 예상한 것과 같이 truncated form인  $\alpha$ -MSH-ND에 비하여 생물학적 활성도가 매우 높았는데, 이는 NDP-MSH의 N-terminus 및 C-terminus가 활성도를 나타내는데 어느 정도 기여한다는 것을 의미하는 결과라 하겠다. 흥미로운 것은  $[Nle^4]\alpha$ -MSH에 비하여서도 NDP-MSH의 활성도가 현저하게 높았는데, 이들 두 펩타이드간에는 Phe/D-Phe의 차이밖에는 없어 Phe  $\rightarrow$  D-Phe.으로의 치환

이 수용체 결합능 및 potency 증가에 결정적으로 기여한 것임을 알 수 있었다. 또한  $[Nle^4]\alpha$ -MSH에 비하여  $\alpha$ -MSH-ND는 아미노산기를 13개에서 7개로 줄였음에도 불구하고  $[Nle^4]\alpha$ -MSH에 비해서도  $\alpha$ -MSH-ND의 MC3R 및 MC4R에 대한 활성도가 더 높았다. 동시에 MC3R보다는 MC4R에 대한  $\alpha$ -MSH-ND의 결합능이  $[Nle^4]\alpha$ -MSH는 물론 NDP-MSH 보다도 더 높았는데 이는 C-terminus 없이 core structure의 구조 변경만으로도 수용체와의 결합력 증가뿐만 아니라 특정 수용체아형에 대한 선택적 결합능 증가를 유도할 수 있다는 것을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 물론 이번 실험에 이용한 선상형의 MTII인  $\alpha$ -MSH-ND가 cyclic형의 MTII와 비교하여 볼 때 선상형과 cycle형태라는 구조적인 차이에도 불구하고 두 물질의 MC3R 및 MC4R에 대한 활성도는 거의 유사하게 나타났다. 이는 cycle 형이 아닌 선상형의 구조로도 MSH 유도체가 멜라노코틴 수용체들에 대하여 높은 활성도를 보이는 것은 물론 특정  $\alpha$ -MSH 아형 수용체에 대하여 선택적인 활성을 갖을 수 있는 매우 작은 크기의 올리고펩타이드로 또는 유기화합물로 개발될 수 있다는 가능성을 시사하는 중요 소견이라고 할 수 있다.

한편  $\alpha$ -MSH-ND를 복강 내로 주사하여 본 결과 6 시간 동안 식이섭취가 의미 있게 감소하는 것을 확인하였는데 시간 별로 보면 첫 1시간 동안에 식이섭취가 현저하게 낮았고 그 이후에는 대조군과 비교하여 비슷한 양의 식이를 섭취한 결과라고 할 수 있다. 따라서 상기 결과는  $\alpha$ -MSH가 식이조절에 관여한다는 직접적인 증거는 물론 선상형의  $\alpha$ -MSH-ND가 BBB를 통과하여 식이 중추를 조절한다는 간접적인 증거라 할 수 있다. 그러나  $\alpha$ -MSH-ND의 주사후 혈중 반감기라든지 얼마나 효율적으로 BBB를 통과하는지 등에 대하여서는 향후 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료되었다. 이번 실험에서 특이한 것은 식이 이외에도 물의 섭취가 동시에 감소되었는데  $\alpha$ -MSH가 어떤 기전에 의하여 물의 섭취를 감소시키는지에 대하여서는 향후 좀 더 많은 연구가 더 필요할 것으로 보였다.

Two-dimensional NMR을 이용한 solution structure를 규명하여 강력한 analogue 개발에 이용해 보고자 우리는  $\alpha$ -MSH와 선상형 MT-II인  $\alpha$ -MSH-ND의

NMR 구조를 분석하여 보았다.  $\alpha$ -MSH는 MSH들에 공통으로 발견되는 아미노산 서열 부위 (Glu<sup>5</sup>-Trp<sup>9</sup>)에서 hairpin loop 구조를 형성하고 있었지만 안정된 type I 이나 type I 형식의  $\beta$ -turn 구조는 관찰되지 않았다. 반면에 생리활성이 탁월한 stereoisomer인  $\alpha$ -MSH-ND 펩타이드는 흥미롭게도 불과 7개로 구성된 올리고펩타이드 입에도 불구하고 전형적인 type I  $\beta$ -turn 구조를 형성하였다. 안정된 구조를 이루는 부위는 Asp<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-DPhe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup> 서열로서 멜라노코틴 수용체와의 결합 부위의 핵심을 이루는 부분을 포함하고 있었다. 특히 이 부위의 구조는 매우 안정되어 있으며 DPhe<sup>7</sup>의 위치 및 다른 아미노산들과의 상대적인 공간 상에서의 위치들이 생리활성 및 선택성에 중요한 역할을 하리라 생각된다. 또한 NMR 구조들의 특성으로 볼 때에  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH-ND는 구조적 특이성에서 차이가 나며  $\alpha$ -MSH에 비하여 human MC4 수용체에 대한 선택성은 안정된 turn 구조 및 stereochemistry에 좌우됨을 알 수 있었다.

결론적으로 우리는 이번 연구를 통하여  $\alpha$ -MSH 유도체들의 활성도를 검증할 수 있는 *In vitro* 및 *In vivo* 시스템을 구축할 수 있었다. 동시에  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH-ND의 구조를 조사하여  $\alpha$ -MSH와 달리  $\alpha$ -MSH-ND가 type I  $\beta$ -turn을 구성하고 있는 것을 알 수 있었는데 향후  $\alpha$ -MSH 유도체들의 활성도 조사와 더불어 구조 연구를 병행함으로써 보다 강력한  $\alpha$ -MSH 유도체를 탐색해 낼 수 있을 것으로 본다.

## 요 약

**연구배경:** 지방 세포로부터 분비된 렙틴이 시상하부의 NPY 분비 신경세포를 억제하고 멜라노코틴 분비 세포를 자극하므로, 멜라노코틴 agonist 및 NPY antagonist 개발이 비만약제 개발의 새로운 표적이 되어 왔다. 이에 본 연구진은 멜라노코틴 agonist를 탐색해 낼 수 있는 시스템을 확보하고, 일부 멜라노코틴 유도체의 구조와 기능을 조사하고자 하였다.

**방법:** MC3R 및 MC4R cDNA를 CHO cell에 stable transfection 시켜서 거저 c-AMP 합성을 최소화하고 ligand 자극에 최대한 반응하는 세포주를 선택

한 후, radio-ligand binding assay와 c-AMP generation activity를 조사하였다. 동시에  $\alpha$ -MSH-ND를 백서의 복강 내에 주사하여 식이섭취억제 효과를 조사하였다. 멜라노코틴의 구조와 기능을 조사하기 위하여 우리는 Bruker AMX-500 or DMX-600 spectrometer를 이용하여 핵자기 공명 분광학 삼차원 구조를 결정하였다.

**결과:** MC3R 표현 세포주에 대한 결합능을 평가해주는 IC<sub>50</sub> (nM)치는 NDP-MSH 0.367±0.074, [Nle<sup>4</sup>] $\alpha$ -MSH 106.70±32.25,  $\alpha$ -MSH-ND는 47.20±9.08였으며, MC4R에 대한 IC<sub>50</sub> 치는 NDP-MSH 0.566±0.194, [Nle<sup>4</sup>] $\alpha$ -MSH 238.30±30.47,  $\alpha$ -MSH-ND 6.70±1.07였다. 또한 각 펩타이드들의 MC3R에 대한 EC<sub>50</sub> (nM)는 NDP-MSH 0.174±0.052, [Nle<sup>4</sup>] $\alpha$ -MSH 9.362±1.932,  $\alpha$ -MSH-ND 1.523±0.707 이고, MC4R에 대한 EC<sub>50</sub>은 NDP-MSH 0.126±0.020, [Nle<sup>4</sup>] $\alpha$ -MSH 46.040±4.799,  $\alpha$ -MSH-ND 0.780±0.405였다.  $\alpha$ -MSH-ND를 복강에 주사하여 본 결과 6시간, 12시간 동안 식이 및 물의 섭취가 현저하게 감소하는 것을 관찰하였다.  $\alpha$ -MSH와 linear MT-II( $\alpha$ -MSH-ND)의 NMR 구조를 분석하여 본 결과 linear MT-II의 Asp<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-DPhe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>로 이루어진 중심부위가 hairpin loop와 유사한  $\beta$ -turn 구조를 하면서, D-Phe기가 type I  $\beta$ -turn을 구성하는데 가장 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

**결론:** 우리는  $\alpha$ -MSH의 활성도를 조사할 수 있는 시스템을 확보할 수 있었으며  $\alpha$ -MSH-ND가  $\alpha$ -MSH와 달리 type I  $\beta$ -turn의 특이한 구조를 갖고 있음을 알게 되었다. 향후  $\alpha$ -MSH 유도체들의 구조와 기능 연구를 토대로 보다 강력한  $\alpha$ -MSH 유도체 탐색을 효율적으로 수행할 수 있을 것으로 본다.

## 참 고 문 헌

1. Coleman DL: *Obese and Diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetologia* 14:141-148, 1978
2. Friedan JM: *The alphabet of weight control. Nature* 385:119-121, 1997



3. Mountjoy KG, Wong J: *Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides. Mol Cell Endocrinol 128:171-177, 1997*
4. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD: *Agouti protein is an antagonist of the melanocortin-stimulating-hormone receptor. Nature 371:799-802, 1994*
5. Huszar K, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F: *Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell 88:131-141, 1997*
6. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD: *Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature 385:165-168, 1997*
7. Kiefer LL, Ittoop OR, Bunce K, Truesdale AT, Willard DH, Nichols JS, Blanchard SG, Mountjoy KG, Chen WJ, Wilkison WO: *Mutations in the carboxyl terminus of the agouti protein decrease agouti inhibition of ligand binding to the melanocortin receptors. Biochemistry 36:2084-2090, 1997*
8. Oosterom J, Burbach JPH, Gispen WH, Adan RAH: *Asp10 in Lys-2-MSH determines selective activation of the melanocortin MC3 receptor. Eur J Pharm 354:R9-R11, 1998*
9. Schith HB, Mutulis F, Muceniece R, Prusis P, Wikberg JES: *Selective properties of C- and N-terminals and core residues of the melanocortin-stimulating hormone on binding to the human melanocortin receptor subtypes. Eur J Pharm 349:359-366, 1998*
10. Campfield LA, Smith FJ, Bun P: *Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. Science 280:1383-1387, 1998*
11. Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr D, Schwartz MW: *Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280:1378-1383, 1998*
12. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A: *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutation in humans. Nature Genet 19:155-157, 1998*
13. Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP: *Molecular characterization of the mouse agouti locus. Cell 71:1195-1204, 1992*
14. Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL: *Overexpression of agrt lead to obesity in transgenic mice[letter]. Nature Genet 17: 273-274, 1997*