



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

Niemann-Pick type C1 like 1의
N-terminal domain과 결합하는
cholesterol과 그誘導體들의 결합構造 研究

濟州大學校 大學院

動物資源科學科

朱 恩 淑

2016 年 8月

Binding modes of Niemann–Pick type C1 like 1
N-terminal domain with cholesterol and it's
derivatives : by molecular docking study and
molecular dynamics simulation

EunSook Joo

(Supervised by professor WangShik Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF AGRICULTURE SCIENCES

2016. 06

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED

DEPARTMENT OF ANIMAL RESOURCE
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Niemann-Pick type C1 like 1의
N-terminal domain과 결합하는
cholesterol과 그誘導體들의 結合構造 研究

指導教授 李 王 植

朱 恩 淑

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2016年 6月

朱恩淑의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長

김 소 외

委

員

장 동 기

委

員

장 순 방

委

員

윤 혜 진

委

員

이 왕 식

濟州大學校 大學院

2016年 6月

목 차

1. 서론	10
2. 연구사	12
2.1. 세포막과 콜레스테롤	12
2.2. Niemann-Pick type C1(NPC1)과 Niemann-Pick type C2(NPC2) ..	14
2.3. NPC1과 NPC2의 콜레스테롤 소포 유통	16
2.4. 세포 내에서의 콜레스테롤 항상성 유지	17
2.5. Niemann-Pick type C1 like 1(NPC1L1)	18
2.6. 전신의 콜레스테롤 항상성 유지	20
2.7. NPC1L1과 지질 유통	20
2.8. NPC1과 NPC1L1의 차이점	22
3. 재료 및 방법	25
3.1. 분자도킹실험	25
3.2. 분자동역학 모의실험	29
4. 결과 및 고찰	32
4.1. 분자도킹실험	32
4.2. 분자동역학 모의실험	40
4.3. 결론 및 토론	53
5. 요약	59
ABSTRACT	62
참고문헌	64
부록 1. Supplementary Data	77
부록 2. “고콜레스테롤 식이 공급과 콜레스테롤 흡수저해제인 키토산과 키 토산올리고당의 보충 시 절식시간이 흰쥐에서 콜레스테롤의 흡수 및 대 사에 미치는 영향”	91

표 차례

[Table 1. Flexible receptor docking results of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD and Cholesterol]	34
[Table 2. Flexible receptor docking results of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD with 25-HC]	36
[Table 3. Flexible receptor docking results of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD with β -SITO]	39
[Table 4. RMSD between loops of unbound and bound conformations for NPC1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO]	43
[Table 5. RMSD between loops of unbound and bound conformations for NPC1L1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO]	44
[Table S1. Molecular docking results of NPC1 NTD with cholesterol]	77
[Table S2. Molecular docking results of NPC1L1 NTD with cholesterol]	78
[Table S3. Molecular docking results of NPC1 NTD with 25-HC]	79
[Table S4. Molecular docking results of NPC1L1 NTD with 25-HC] ..	80
[Table S5. Molecular docking results of NPC1 NTD with β -SITO] ..	81
[Table S6. Molecular docking results of NPC1L1 NTD with β -SITO]	82
[Table S7. RMSD between loops in unbound and bound conformations for NPC1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO]	83
[Table S8. The loop RMSD between ligand bound and unbound average conformation for NPC1 NTD and NPC1L1 NTD]	84
Table 1. Composition of experimental diets (% , wt/wt)	95
Table 2. Composition of experimental diets (% , wt/wt)	96

Table 3. Effects of oligo-chitosan or chitosan on initial body weight (initial BW) and final body weight (final BW) by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.	98
Table 4. Effect of oligo-chitosan or chitosan on average daily feed intake (ADFI), average daily weight gain (ADWG) and feed efficiency (FE) in rats fed with high-cholesterol diets.	99
Table 5. Effects of oligo-chitosan or chitosan on slaughter weight (SW), liver weight (LW), liver weight (LW) rate, kidney weight (KW) and kidney weight (KW) rate by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.	100
Table 6. Effects of oligo-chitosan or chitosan on serum total cholesterol (sTC), serum HDL-cholesterol (srHDL-C) rate, serum LDL-cholesterol (sLDL-C) and serum triglyceride (sTG) by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.	103
Table 7. Effects of oligo-chitosan or chitosan on liver total cholesterol (lTC) and liver triglyceride (lTG) by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.	104
Table 8. Effects of oligo-chitosan or chitosan on serum glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate-pyruvate transaminase (GPT) level by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.	105

그림 차례

[Figure 1] The active torsion bonds of ligands.	26
[Figure 2] The Flexible residues of hydrophobic binding pocket used in current docking study.	27
[Figure 3] The loops used to compare with ligand bound and unbound conformations for NPC1 NTD and NPC1L1 NTD.	30
[Figure 4] The sequence alignment of NPC1L NTD and NPC1 NTD.	31
[Figure 5] Best model of protein in complex with cholesterol from molecular docking study.	33
[Figure 6] Best model of protein in complex with 25-HC from molecular docking study.	35
[Figure 7] Best model of protein in complex with β -SITO from molecular docking study.	37
[Figure 8] The backbone RMSD of NTD-ligand complex with respect to unbound structure (3GKH or 3QNT) as a function of simulation time.	41
[Figure 9] The RMSF of each residue between ligand bound and unbound conformations for NPC1 NTD and NPC1L1 with cholesterol, 25-HC and β -SITO.	46
[Figure 10] The loop regions of NPC1 NTD which shows noticeable structural change after ligand binding for cholesterol, 25-HC and β -SITO.	47
[Figure 11] Movement of L6 in complex of NPC1 NTD.	48
[Figure 12] Movement of L5 in complex of NPC1 NTD.	48
[Figure 13] The loop regions of NPC1L1 NTD which shows	

noticeable structural change after ligand binding for cholesterol, 25-HC and β -SITO.	49
[Figure 14] Movement of L2 in complex of NPC1L1 NTD.	50
[Figure 15] Movement of L6 in complex of NPC1L1 NTD.	50
[Figure 16] The average structures of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD obtained from MD simulation.	51
[Figure S1] Best binding mode of protein in complex with cholesterol in RB orientation from Rigid receptor condition docking.	85
[Figure S2] Best binding mode of protein in complex with cholesterol in FB orientation from Rigid receptor condition docking.	85
[Figure S3] Best binding mode of protein in complex with 25-HC in RB orientation from Rigid receptor condition docking.	86
[Figure S4] Best binding mode of protein in complex with 25-HC in FB orientation from Rigid receptor condition docking.	86
[Figure S5] Best binding mode of protein in complex with β -SITO in RB orientation from Rigid receptor condition docking.	87
[Figure S6] Best binding mode of protein in complex with β -SITO in FB orientation from Rigid receptor condition docking.	87
[Figure S8] Moving residues of complex of NPC1 NTD with cholesterol at 50 ns simulation time.	88
[Figure S9] Moving residues of complex of NPC1 NTD with 25-HC at 50 ns simulation time.	88
[Figure S10] Moving residues of complex of NPC1 NTD with β -SITO at 50ns simulation time.	89
[Figure S11] Moving residues of complex of NPC1L1 NTD with cholesterol at 50 ns simulation time.	89

[Figure S12] Moving residues of complex of NPC1L1 NTD with 25-HC
at 50ns simulation time. 90

[Figure S13] Moving residues of complex of NPC1L1 NTD with β -SITO
at 50ns simulation time. 90

1. 서론

Niemann-Pick type C1 like 1(NPC1L1)은 포유류 소장의 솔가장자리세포막 (brush border membrane)과 영장류 간의 세관세포막(canalicular membrane)에 위치한 막단백질로 식이와 담즙 콜레스테롤의 흡수를 중계하며, 전신의 콜레스테롤 항상성(homeostasis) 유지에 중요 역할을 담당한다(Davis 등, 2004; Dietschy 등, 2004). NPC1L1은 Niemann-Pick type C(NPC) 군 단백질(family protein)로 Niemann-Pick type C1(NPC1)과 아미노산 순서나 2차 구조가 유사하지만 (Carstea 등, 1997; Davies 등, 2000b), NPC1L1과는 달리 NPC1은 모든 세포의 리소좀(lysosome) 막에 위치하여 저밀도 리포단백질(low-density lipoprotein; LDL)-유래 콜레스테롤을 세포 소기관으로 전달한다(Xie 등, 1999). 두 단백질은 N-말단 도메인(N-terminal domain; NTD)의 3차 구조도 매우 유사하고(Kwon 등, 2011), NTD에 콜레스테롤과 직접 결합하는(Infante 등, 2008b; Altmann 등, 2004) 소수성 결합부위(hydrophobic binding pocket)도 가지고 있으므로 유사한 콜레스테롤 결합구조를 가질 것으로 예측되었다(Kwon 등, 2011). 한편, 콜레스테롤의 산화형태인 25-hydroxycholesterol(25-HC)(Ikonen, 2008)과 식물성 스테롤인 β -sitosterol(β -SITO)(Davis 등, 2004)은 NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD와 결합하는 친화도에서 콜레스테롤과는 차이가 있다고 보고되고(Davis 등, 2004; Brown 등, 2007; Infante 등, 2008a; Ge 등, 2008) 있다.

본 연구에서는 실험적으로 보고되지 않은 NPC1L1 NTD의 콜레스테롤 결합구조를 예측하고자 한다. 이를 위해, NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD와 3 가지 리간드들(콜레스테롤, 25-HC, β -SITO)과의 결합구조를 2 가지의 계산화학 도구 즉, 모델링에 의한 분자도킹(molecular docking)과 분자동역학 모의실험(molecular dynamics(MD) simulation)을 사용해 비교할 것이다. 우선, AutoDock(v1.5.6)을 이용한 모델링에 의한 도킹으로 NPC1L1 NTD(PDB ID: 3QNT)와 NPC1 NTD(PDB ID: 3GKH) 각각의 구조와 3 가지 리간드들과의 결합구조(best model)를 도출하고 이들의 결합특성을 살펴볼 것이다. 다음으로 이 결합구조를 가지고

GROMACS(v4.6.5)를 이용한 분자동력학 모의실험을 실시하여 각각의 동적 특성들을 비교하고 두 NTD가 3 개의 리간드와 결합할 때 차이점 또는 유사성이 있는지 살펴볼 것이다. 이 결합은 다량의 리간드 수송을 위한 내재화(internalization) 과정, 특히 내재화 개시와 중요한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며(Zhang 등, 2011; Infante 등, 2008b), 극히 최근에 실험적으로 결정된 NPC1 전체구조에서도 NTD는 다른 내강 도메인(luminal domain)들과 인접해 있어(Gong 등, 2016) 이러한 추론을 더욱 뒷받침하기도 한다. 따라서 이들 사이의 결합구조나 동력학적 특성의 체계적인 분석을 통해 NPC1L1 NTD의 역할 특히, 콜레스테롤 흡수에 있어서의 역할에 대한 이해를 증진할 수 있으리라 기대한다.

2. 연구사

2.1. 세포막과 콜레스테롤

모든 세포막(plasma membrane; PM)은 이중막(bilayer)을 형성하는 지질의 특성에 따라 상태가 달라진다. 예를 들어 길고, 포화된 탄화수소 사슬(saturated hydrocarbon chain)을 가지고 있는 스피고미엘린(sphingomyelin; SM) 함유량이 높을수록 세포막은 고체에 가까운 상태를 나타내며, 불포화된 탄화수소 사슬(unsaturated hydrocarbon chain)을 가진 글리세로인지질(glycerophospholipids) 함유량이 높을수록 세포막은 액체상태에 가까워진다. 이중막을 구성하는 지질들 사이에 스테롤(sterol)이 섞여있으면 4개의 탄소 고리가 나타내는 경직된 구조 때문에 고체상만큼이나 정렬되어 있으면서도 액체의 유동성을 나타내는 특별한 상태(liquid-ordered phase; lipid raft)가 된다(van Meer 등, 2008). 세포막에는 스피고지질(sphingolipids)과 스테롤이 풍부하며, 글리세로지질(glycerolipids)의 밀도가 높아 짝 찬 구조를 나타내는 반면, 세포내 소기관들은 구성하고 있는 지질의 종류와 구성 비율도 각각 달라서 각 소기관들의 기능과 밀접하게 연관되어 있다(van Meer 등, 2008). 특히, 콜레스테롤은 세포막에 가장 많이 존재하며(전체 지질의 약 20~25%), 세포내이입 재활용구획(endocytic recycling compartment; ERC)이나 후기 골지망(trans Golgi network; TGN)에도 다량의 콜레스테롤이 존재한다고 알려져 있다(Coxey 등, 1993; Mukherjee 등, 1998). 세포질 그물(endoplasmic reticulum; ER)은 세포 소기관 중에서 콜레스테롤 농도가 가장 낮으면서도 세포내의 콜레스테롤 항상성 유지에 주된 역할을 담당하여, 세포막의 콜레스테롤 공급원(pool)이 확대되면 그 중 일부가 소포체 막으로 이동하여 콜레스테롤농도를 상승시켜 이 때문에 콜레스테롤 생합성을 촉진하는 스테롤조절요소-결합단백질 절단활성화 단백질(sterol regulatory element binding protein(SREBP) cleavage activating protein; Scap)/인슐린유도유전자 단백질(Insulin-induced gene protein;

Insig)/스테롤조절요소-결합단백질(sterol regulatory element-binding protein; SREBP) 시스템의 기능이 즉각적으로 저해된다고 한다(Das 등, 2014). 세포막에서의 콜레스테롤은 3 β -수산기(hydroxyl group)가 수성환경에 노출되지 않도록 인지질의 머리부분으로 덮여진 상태로 비교적 손쉽게 수평(lateral) 이동할 수 있으며(Simons와 Ikonen, 1997), 플립플롭(flip-flop) 즉 역전을 통해 이중막의 내막과 외막 사이(transbilayer)를 빠르게 이동할 수 있다고 알려져 있다(Steck 등, 2002). 콜레스테롤은 긴 소수성부위 때문에 수성환경인 세포내에서 자유롭게 이동하지 못하지만 옥시스테롤(oxysterol)은 추가된 수산기로 인해 화학 반응성과 용해도가 높아져 세포 내부를 자유롭게 이동할 수 있으며, 세포내의 옥시스테롤의 양은 적지만(옥시스테롤:콜레스테롤=1:1000) 신호전달 지질(signalling lipid)로 기능할 수 있다고 알려져 있다(Ikonen, 2008).

콜레스테롤은 많은 G 단백질공역수용체(G protein-coupled receptor)의 리간드 결합에 영향을 미쳐 막 단백질의 막관통 α -나선(transmembrane α -helix)들 사이의 틈이나 단백질 이합체 사이에 결합하는 방식으로 단백질의 구조를 변화시키거나 단백질을 안정화시키며 나선들 사이를 채움으로써 막 단백질의 활성화 조절에 관여한다고 한다(Lee, 2011). 담즙에 의해 유화된 식이 콜레스테롤을 포함하는 미셀(micelle)이 소장막과 융합하여 세포막에 콜레스테롤 농도가 높아지면 세포막의 스핑고미엘린과 결합하여 고도중첩구조(high-ordered structure)를 형성하고, 이러한 지질뿔목 도메인은 세포신호로 작용한다고 한다(Simons와 Ikonen, 1997). 세포막은 지질 이중막구조로 소수성 중심부를 가지고 있으며, 이들의 두께는 막에 박혀있는 지방산 사슬의 길이에 의해 결정된다. 막 단백질의 막관통 α -나선 다발(bundle)의 길이는 주변 세포막의 소수성 부위에 영향을 주어 주변 세포막의 성질을 변화시킨다(Lee, 2004). 즉, 세포막의 소수성 중심부위가 막 단백질의 막관통 다발의 길이보다 두꺼우면 지방산 사슬들은 압축되어 이중막을 얇게 만들고, 단백질 주변 세포막 표면이 지방산 사슬들로 가득 차게 된다. 반대로 세포막의 소수성 중심부위가 단백질의 막관통 다발 길이보다 얇으면 인지질 사슬들이 신장되어 이중막을 두껍게 만들고 이때는 단백질 주변의 세포막에 지방산 사슬들의 밀도가 상대적으로 적어지게 된다. 또한 단백질의 막관통 부위 근처에 박혀있는 인지질의 머리부분은 막관통 α -나선과의 수소결합이나 수화(hydration)를

통해 막 단백질의 활성도에 영향을 미치며, 단백질의 반응 진행에 따라 인지질 머리부분의 구조변화가 수반된다고 한다(Lee, 2002).

2.2. Niemann-Pick type C1(NPC1)과 Niemann-Pick type C2(NPC2)

Niemann-Pick C(NPC) 질환은 *NPC1*이나 *NPC2*의 돌연변이에 의해 발생되며, 후기 내포/리소좀(late endosome/lysosome)에서의 지질 과다축적이 직접적인 원인으로 알려져 있다(Vanier, 2010). NPC1은 1278개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 13개의 막관통 도메인(transmembrane domain; TM), NTD(239개 아미노산)를 포함하는 3개의 내강 도메인(luminal domain, 25-264, 371-615, 855-1098)과 스테롤 감지 도메인(sterol-sensing domain; SSD, 616-791), 세포질의 C-말단 도메인(cytoplasmic C-terminal domain; CTD)을 가지고 있다(Davies와 Ioannou, 2000). 이는 모든 세포 내에서 광범위하게 분포하며, 특히 리소좀 막에서 발견된다(Wüstner와 Solanko, 2015). NPC1 CTD는 클라트린(clathrin) 어댑터인 AP-1과 산성인 2류신 모티브(acidic/di-leucine motif)를 통해 상호작용을 하여 후기 내포/리소좀이 어느 세포소기관으로 이동할지를 나타내는 지향(targeting)과 NPC의 기능에 중요역할을 한다(Poirier 등, 2013). NPC 환자의 1/3은 cysteine이 풍부한 세 번째 내강 도메인(도메인 I)에서의 돌연변이가 원인이라고 보고되어 있다(Vanier, 2014). NPC1 NTD의 소수성 결합부위는 수용액에 대해 양쪽으로 열려있는 구조이며, 여기에 콜레스테롤이 직접 결합하여 3 β -수산기와 NPC1 NTD 결합부위의 Asn41과 Gln79가 수소결합을 형성한다(Kwon 등, 2009). NPC1 NTD의 구조는 비결합구조(PDB ID: 3GKH) 뿐 아니라 콜레스테롤과 결합한 경우(PDB ID: 3GKI)와 25-HC와 결합한 경우(PDB ID: 3GKJ)도 보고되어 있다(Kwon 등, 2009). NPC1 NTD는 경쟁분석법(competition assay)에서 콜레스테롤보다도 24-C, 25-C, 27-C 위치에 수산기가 붙은 옥시스테롤에 높은 결합친화도(특히 25-HC)를 보였고, 19-HC나 20-HC에 대한 결합친화도는 낮았다고 보고했다(Infante 등, 2008b). 이에 반해 NPC2는 151개의 아미노산으로 구성된 작고, 수

용성인 당단백질(glycoprotein)로서(Naureckiene 등, 2000), 소의(bovine) NPC2의 조(PDB ID: 1NEP)를 보면 7개의 β -가닥(strands)이 2개의 β -병풍(sheet)을 형성한 β -샌드위치(sandwich) 구조를 가지고 있으며, 넓은 소수성 중심(용적 $\sim 84 \text{ \AA}^3$)에 리간드가 느슨하게 결합하는 것으로 추정하고 있다(Friedland 등, 2003). NPC2는 후기 내포/리소좀에서 주로 발견되며, 각종 분비액(유즙, 부고환액, 담즙, 혈장)에서도 일부 발견된다(Storch와 Xu, 2009). 하지만 담즙의 NPC2는 소장에서 NPC1L1과는 상호작용을 하지 않는 것으로 알려져 있다(Dixit 등, 2007). NPC2는 콜레스테롤과 높은 친화도를 나타내 1:1 몰비(molar ratio)로 결합하며(Xu 등, 2007) 그 외에도 다양한 콜레스테롤 전구체, 식물성 스테롤(i.e. β -SITO), 3-탄소 위치에 에스테르화가 된 콜레스테롤 에스테르(i.e. 콜레스테롤 초산염, 콜레스테롤 황산염 등)와도 잘 결합하는 것으로 알려져 있으나, 옥시스테롤에 대해서는 콜레스테롤에 비해 낮은 결합 친화도를 보인다고 알려져 있다(Storch와 Xu, 2009).

극히 최근에 단일입자 냉동전자현미경(single particle electron cryo-microscopy; cryo-EM)를 사용하여 CTD를 제외한 NPC1의 전체 단백질 구조(PDB ID: 3JD8)가 단위체(monomer) 형태로 보고되었다(Gong 등, 2016). 이에 따르면, 전체 단백질 구조에는 총 14개의 글리코실화(glycosylation) 부위(NTD에 5개, 도메인 C에 7개, 도메인 I에 2개)를 가지고 있으며, 세포막에 박혀있는 막관통 나선(TM)들 위에 도메인 C와 도메인 I가 상동적인 구조를 보이면서도, 대칭적인 구조($\sim 160^\circ$ 회전)로 팔짱을 낀 모양으로 서로 교차되어 있고, NTD는 세포막에서 약 40 \AA 정도 위로 솟아 이 두 도메인들의 윗부분에 위치한다고 보고되었다. 한편, 5개의 TM(TM3~7)으로 이루어진 SSD는 나머지 TM(TM9~13)들과 대칭적인 구조(180° 회전)로 다발을 형성하고 있고 배열상동성(sequence homology) 역시 43%를 나타내어 SSD-유사 도메인(SSD-like domain)으로 명명되었으며, 이 다발의 앞(TM2)과 뒤(TM8)의 TM들과 세포질 쪽 세포막에 횡으로 놓여있는 $\alpha 1-2$ 와 $\alpha 7-8$ 이 도메인 C와 I를 연결하고 있으며, NTD와 TM 다발들을 연결하는 TM1을 보고하였다. 이 보고에 따르면 NPC1의 내강 도메인들은 서로 상당히 근접한 위치에 있었으며, NPC1 NTD의 콜레스테롤 결합부위 입구는 도메인 C 쪽으로 향한 상태로 도메인 C의 두 개의 고리들에 둘러싸인 채로 위치하고 있어서 NPC2

가 NPC1에게 콜레스테롤을 전달할 때 NPC1의 도메인 C와 NTD의 결합부위 입구에 일시적으로 결합한다는 보고들(Wang 등, 2010; Deffieu와 Pfeffer, 2011)과 일치하는 모습을 보였다. 그래서 Gong 등(2016)은 이 도메인들의 구조적인 위치를 고려하여 NPC2는 NTD와 도메인 C의 접촉부위를 약간 밀어내면서 NPC1 NTD와 도메인 C에 일시적으로 부착하고 NPC1 NTD는 약간 뒤로 밀려난 상태에서 콜레스테롤을 넘겨받을 것으로 추정하였다.

2.3. NPC1과 NPC2의 콜레스테롤 소포 유통

후기 내포/리소좀의 내부에서 NPC2의 소수성 결합부위에 콜레스테롤의 isooctyl 결사슬이 결합되면, 신속하게 NPC1으로 이동하여 NPC2의 표면이 NPC1 NTD와 내강 도메인 C에 일시적으로 부착된 상태에서, 소수성 이관(hydrophobic handoff)을 통해 콜레스테롤을 NPC1 NTD에 넘겨주게 된다(Wang 등, 2010; Deffieu와 Pfeffer, 2011). 이때 NPC1 단독으로는 콜레스테롤 전달속도가 매우 느리나, NPC2가 같이 있을 때 NPC1 NTD나 리포솜(liposome)으로의 콜레스테롤 전달속도가 100배 이상 높아져 NPC1의 콜레스테롤 전달기전은 NPC2에 상당히 의존적인 것으로 알려져 있다(Infante 등, 2008c). NPC1과 NPC2는 Rab-관련 소포유통(Rab-related vesicle trafficking)을 통한 막 재활용(Choudhury 등, 2002)이나 후기 내포/리소좀의 융합/분열(Ko 등, 2001; Goldman과 Krise, 2010)을 통해 리소좀의 콜레스테롤을 다른 세포 소기관으로 전달하는 것으로 추정되며(Vanier, 2014), 다만 미토콘드리아로의 콜레스테롤 운반은 NPC2가 단독으로 수행한다고 한다(Kennedy 등, 2012).

한편, 양친매성 아민(amphiphilic amines)인 U18666A는 NPC1과 결합하여 콜레스테롤의 리소좀 방출을 억제하므로 리소좀 내에 콜레스테롤 축적을 일으킨다(Liscum과 Faust, 1989; Butler 등, 1992). Ohgami 등(2004)은 NPC1에 콜레스테롤이 결합하는 데에 있어 SSD가 필수적이며, SSD 부근에 돌연변이(P691S)가 일어나면 NPC1과 콜레스테롤의 결합능력이 감소하였다고 보고했다. 또한 Ohgane

등(2013)은 SSD에 콜레스테롤이 직접 결합한다는 증거는 없지만, NTD 외에 콜레스테롤과 직접 결합하는 부분이 존재한다고 보고하였다. 최근에 Lu 등(2015)은 NPC1의 P691S 돌연변이 실험을 통해 U18666A가 결합하여 저해작용을 일으키는 곳이 SSD임을 확인하여, 콜레스테롤이 NPC2에서 NPC1 NTD로, 다시 SSD로 전달되며, SSD에서 리소좀 막을 통과하여 탈출하게 되는 것으로 예측하였다.

2.4. 세포 내에서의 콜레스테롤 항상성 유지

콜레스테롤은 최소 20여 가지의 효소가 관여하는 복잡한 경로를 통해 ER에서 합성되며, 포유류 세포는 LDL의 수용체-매개 세포내이입(receptor-mediated endocytosis)을 통해 외인성 콜레스테롤을 받아들인다(Brown과 Goldstein, 1986). LDL-콜레스테롤(LDL-C)이 LDL-콜레스테롤 수용체(LDL-R)에 의해 세포 내(초기 내포; early endosome)로 유입되면 후기 내포/리소좀으로 운반되어 리소좀 산성 리파제(lysosomal acidic lipase; LAL)에 의해 콜레스테롤 에스테르가 콜레스테롤로 전환된다. 콜레스테롤은 NPC2와 NPC1의 협력작용으로 세포질로 배출되어 여러 소기관들(i.e. PL; ER; ERC; 리소좀 축적소기관(lysosomal storage organelles; LSOs))에게로 전달되어 다양한 대사에 사용된다(Chang과 Chang, 2008).

세포 내에서의 콜레스테롤 항상성은 콜레스테롤 생합성과 LDL 흡수에 대한 되먹임 조절(feedback regulation)에 의해 조절된다. ER로 유입된 LDL-C는 SREBP 스테롤감지시스템을 통해 콜레스테롤 생합성과 관련된 단백질의 발현을 감소시키고, 결과적으로 콜레스테롤 생합성도 저해시킨다(Goldstein 등, 2006). 또한 LDL-C는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase의 분해를 촉진시키고, Acetyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT-1)를 활성화시켜 콜레스테롤을 콜레스테롤 에스테르로 전환하여 세포내에서 콜레스테롤 수준을 빠르게 낮춘다(DeBose-Boyd, 2008). 25-HC 같은 옥시스테롤은 ER에서의 콜레스테롤의 조절작용과 비슷하게 SREBPs의 소포체-골지체간 수송(ER-to-Golgi

transport)을 저해하며 HMG-CoA reductase와 ACAT를 활성화시킨다고 한다 (Adams 등, 2004). Ikonen(2008)에 의하면 25-HC는 NPC1 NTD와 결합하기는 하지만 내재화 과정에 대한 기여는 적으며, NPC1이나 NPC2의 도움 없이 ER로 전달되어 SREBP에 대한 저해작용을 한다고 보고하였다. 이 외에도 세포 내에서 NPC1과 상관없이 리소솜의 콜레스테롤이나 옥시스테롤을 운반하는 다른 단백질들이 보고되었다(Wüstner와 Solanko, 2015). 즉, steroidogenic acute regulatory protein(StAR)-related lipid transfer(StART)-도메인을 포함하고 있는 전이성 림프절 64(metastatic lymph node; MLN64)는 NPC2에게서 콜레스테롤을 넘겨받아 후기 내포/리소솜에서 탈출시키며(van der Kant 등, 2013), ATP-결합상자 전달 효소 A-1(ATP-binding cassette transporter A1; ABCA1)이 중계하는 콜레스테롤 배출은 후기 내포/리소솜에서 apoA-1로 콜레스테롤을 전달한다(Denis 등, 2008). 또한, 25-HC와 같은 옥시스테롤은 옥시스테롤결합 단백질-관련단백질 5(oxysterol binding protein; OSBP)-related protein 5(ORP5)와 ORP1의 작용에 의해 후기 내포/리소솜에서 ER로 전달되어(Du 등, 2011) SREBP를 ER 막에 고정하는 Insig와 결합하여 콜레스테롤 생합성을 조절하게 된다(Ikonen, 2008).

2.5. Niemann-Pick type C1 like 1(NPC1L1)

Niemann-Pick type C1 like 1(NPC1L1)은 소장과 간에서 발현되는 막관통 단백질이자(Iyer 등, 2005), Niemann-Pick type C(NPC) 군 단백질로서 NPC1과 42%의 아미노산 배열이 동일하며, 51%의 비슷한 아미노산 배열을 나타내며 (Davies 등, 2000b), 특정신호 펩티드와 13개의 막관통 부위, NTD, 2개의 고리, CTD 구조를 공유하고 있다는 것이 밝혀져 있다(Davies와 Ioannou, 2000; Wang 등, 2009). NPC1L1 NTD(265개 아미노산)에는 8개의 α -나선과 3개의 β -병풍, 독특한 류신지퍼(leucine-zipper)가 잘 보존된 “NPC1 도메인”을 가지고 있다 (Carstea 등, 1997; Davies 등, 2000b). 또한 NPC1과 동일하게 소수성 결합부위를 가지고 있어 콜레스테롤과 직접 결합하여 콜레스테롤의 막 통과기전을 중계

한다(Altmann 등, 2004; Ge 등, 2008; Infante 등, 2008b). Altmann 등(2004)은 NPC1L1 null mice에서는 소장에서의 콜레스테롤 흡수가 70% 이상 감소했다고 보고하여 소장에서의 콜레스테롤 흡수에 있어서 NPC1L1의 역할은 핵심적인 것으로 알려져 있다.

NPC1L1 NTD은 리간드가 없는 비결합구조(PDB ID: 3QNT)만 실험적으로 보고되어 있으며, NPC1L1 NTD의 구조를 보면 콜레스테롤의 4개 탄소고리 주변에 위치할 것으로 예상되는 잔기들이 NPC1 NTD에 비해 더 작아 결합부위 안쪽공간이 더 크기 때문에 NPC1L1 NTD는 좀 더 다양한 스테롤과 결합할 수 있을 것으로 추측되었다(Kwon 등, 2011). 반면 결합부위 입구 쪽은 NPC1 NTD에 비해 좁고($\sim 2.3 \text{ \AA}$), 막힌 형태(closed conformation)를 보였으며, isooctyl 결사슬 근처의 잔기들은 두 단백질에서 거의 크기가 비슷하여, β -SITO는 ethyl기가 결합에 불리한 구조적 충돌을 유발하여 NPC1L1 NTD에 잘 결합하지 못하는 것으로 판단되었다(Kwon 등, 2011). 또한 Ge 등(2008)은 콜레스테롤이 결핍된 세포에 콜레스테롤이나 식물성 스테롤을 공급해주었을 때, NPC1L1이 중계하는 콜레스테롤 흡수는 $\sim 80\%$ 였으나, β -SITO 등은 8~13%만이 내재화되었고 콜레스테롤 공급 시에는 NPC1L1의 85%가 세포내에서 발견되었지만, 식물성 스테롤을 공급해주었을 때에는 12~18%의 NPC1L1만 세포내로 이동하여 β -SITO에 비해 콜레스테롤에 대한 선호도가 높다고 보고하였다. 하지만 Davis 등(2004)은 NPC1L1은 식물성 스테롤의 흡수를 위한 주된 경로이며, NPC1L1 null mice에서 혈청의 식물성 스테롤 수준이 90% 이상 감소했으며, NPC1L1의 녹아웃 처리에 따라 소장과 간의 콜레스테롤 생합성과 혈청과 간의 콜레스테롤 및 식물성 스테롤 수준이 영향을 받아 콜레스테롤과 식물성 스테롤의 소장 흡수에 NPC1L1이 반드시 필요하다고 보고한 바 있다. 또한 일반적으로 식이 콜레스테롤의 $\sim 50\%$ 가 소장에서 흡수되며, β -SITO는 5~15%만 소장에서 흡수된다고 하는데(von Bergmann 등, 2005), 이는 ABCG5/8이 우선적으로 식물성 스테롤을 배출시키는 것도 원인이 되며(Hui와 Howles 2005), NPC1L1이 콜레스테롤을 더 선호하여 흡수시키는 성질과도 관련이 있다고 보고되었다(Yamanashi 등, 2007).

2.6. 전신의 콜레스테롤 항상성 유지

인체에서 콜레스테롤 항상성은 콜레스테롤 생합성, 소장에서의 식이 콜레스테롤의 흡수 그리고 담즙염의 재흡수 및 대변 배설에 의해 유지되며 그중 식이콜레스테롤은 포유류의 주된 콜레스테롤 공급원으로 매일 200~600 mg의 콜레스테롤이 식이로 공급된다(Alfin-Slater와 Aftergood, 1980). 식이로 공급되는 콜레스테롤의 양이 적으면 간에서의 콜레스테롤 생합성과 담즙염의 재흡수가 촉진된다. 콜레스테롤 생합성은 ATP를 소비하여 acetyl CoA로부터 약 20개의 효소가 관여하여 이루어지며 이에 관여하는 모든 유전자들은 SREBPs에 의해 생산되는 세포막 부착 전사인자군(transcription factor family)에 의해 조절된다(Wang과 Song, 2012). 한편, 약 94%의 담즙염이 소장에서 재흡수되어 혈액을 통해 간문맥을 거쳐 간으로 되돌아오며, 회수된 담즙은 즉시 정맥동(venous sinus)을 통하여 간세포에 대부분 흡수되고 나머지는 담즙으로 재분비되게 된다(Portincasa와 Wang, 2012). 이때 NPC1L1은 포유류의 소장세포의 솔가장자리세포막과 영양류간의 세관세포 세포막에 위치하여 식이 콜레스테롤과 담즙 콜레스테롤 흡수에 모두 관여하므로 전신의 콜레스테롤 항상성 유지에 중요역할을 담당한다(Davis 등, 2004; Dietschy 등, 2004).

2.7. NPC1L1과 지질 유통

2000년대 초까지만 해도 콜레스테롤 대사와 관련된 단백질들(HMG CoA reductase, SREBP, SCAP)과 공유하고 있는(Loftus 등, 1997) NPC1L1의 SSD에 콜레스테롤이 결합되어 흡수된다고 생각했었으나(Osborne과 Rosenfeld, 1998; Radhakrishnan 등, 2004) 이후 계속된 연구를 통해 NPC1L1의 NTD에 콜레스테롤이 직접 결합되며 소장에서의 콜레스테롤의 막 통과기전을 개시한다는 것이 확인되었다(Turley와 Dietschy, 2003; Peake와 Vance, 2010; Xie 등, 2011). 식이

또는 담즙의 콜레스테롤과 다른 스테롤들은 소장 꼭지면막(apical membrane)의 NPC1L1에 의해 흡수되며, 흡수된 콜레스테롤의 50~60%가 ER의 SOAT2에 의해 CE로 전환된다. 이때, NPC1L1은 내재화를 통해 세포 내로 이동하며 콜레스테롤의 농도에 따라 ERC와 PM을 순환하면서 콜레스테롤 흡수에 관여하게 된다. 즉, 세포 내에서 콜레스테롤이 부족하면 ERC의 NPC1L1이 콜레스테롤을 흡수하기 위해 PM으로 돌아가고 세포 내의 콜레스테롤이 많아지면 NPC1L1은 ERC에서 더 많이 머무르게 된다(Ge 등, 2008). 한편 여분의 콜레스테롤은 꼭지면막에 있는 ATP-결합상자 전달효소 G5/G8(ABCG5/G8)에 의해 다시 소장강으로 방출된다. 이때 SOAT2는 콜레스테롤을 더 선호하여 콜레스테롤 에스테르로 전환하고 ABCG5/8은 식물성 스테롤을 우선적으로 배출하여, NPC1L1과 ABCG5/8의 길항작용은 간과 소장에서의 전신의 콜레스테롤 항상성 유지에 있어서 주요부분을 차지한다(Othman 등, 2013).

NPC1L1 NTD에 다량의 콜레스테롤을 소장 막 내로 운반하는 내재화(Simon과 Ikonen, 1997; Ge 등, 2011)에 대해 몇몇 논문에서(Glebov 등, 2006; Babuke 등, 2009) NPC1L1 NTD에 있는 소수성 결합부위와 콜레스테롤의 결합이 NPC1L1의 나머지 부분 특히 내강 도메인 C에 영향을 주어 더 많은 콜레스테롤이 NPC1L1 주변으로 모이도록 해서 내재화를 초래하는 것으로 예상하고 있으나 아직 직접적인 증거는 없다. 단지 세포막의 내재화에 관여하는 다른 단백질들(flottillins, clathrin 등)에 NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 결합 자체가 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Li 등, 2014). Zhang 등(2011)은 NTD 삭제 돌연변이나 콜레스테롤 결합불능 돌연변이에서 flottillins과 결합능력은 유지되면서도 NPC1L1-flottillins-콜레스테롤 풍부(NFC)-미세영역(microdomain)을 형성하지 못하였고, 콜레스테롤의 흡수를 촉진하지 못했다고 보고하여 NFC-microdomain 형성에 NPC1L1과 flottillins의 상호작용과 NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 결합, 이 두 가지 다 필요하다고 보고하였다. 콜레스테롤 흡수저해제인 ezetimibe는 NPC1L1의 도메인 C에 직접 결합하며, 그중에서도 510~571에 이르는 61개의 아미노산, 특히 Phe532, Met543과 비공유성 결합(non-covalent bond)을 형성한다고 알려져 있다. 또한 이곳에 다형성(polymorphism)이 있을 경우 단백질의 구조가 변형되어,

NPC1L1의 전체기능에 대한 저해도 나타나기 때문에 도메인 C의 형태도 NPC1L1의 콜레스테롤 흡수기전에 연관성이 있을 것으로 예측되었다(Weinglass 등, 2008). 한편, NPC1L1의 NTD와 콜레스테롤의 결합 이후에 도메인 C와 SSD 근처의 세포막으로 많은 양의 콜레스테롤이 모이게 되면 NPC1L1의 CTD에 있는 YVNXXF 모티프가 세포막과 분리되며, YVNXXF 모티프는 내재화 신호를 보내어 Numb과 결합하고, Numb이 clathrin과 AP2를 고용하여 세포내 이입 즉, 내재화가 진행된다고 보고하였다(Li 등, 2014). 이때 ezetimibe는 NPC1L1의 내재화뿐만 아니라 CTD와 clathrin과 AP2의 상호작용도 방해하는 것으로 밝혀져 CRL1601 세포와 마우스의 소장에서 ezetimibe는 Numb과 NPC1L1 사이의 콜레스테롤 유도 상호작용을 효과적으로 저해하였다(Ge 등, 2008).

2.8. NPC1과 NPC1L1의 차이점

NPC1L1은 생물체 외부로부터 콜레스테롤을 흡수하는 역할을 하며(Davis 등, 2004; Dietschy 등, 2004), NPC1은 세포 내부에서 콜레스테롤을 다른 소기관 또는 세포막으로 운반하는 역할을 하므로(Chang과 Chang, 2008) 생물체 내에서 담당하는 역할에 있어서의 차이가 있으며, 두 단백질의 NTD도 구조적인 차이를 나타낸다. 수용액에 대해 열린 NPC1 NTD와는 달리 NPC1L1 NTD는 수용액에 대해 닫힌 형태로 전체 단백질의 상동성은 높으나 결합부위 입구 근처의 고리들에서는 구성아미노산 개수나 구조도 다르다(Zhang 등, 2011; Kwon 등, 2011). 한편, NPC1L1의 흡수저해제인 ezetimibe(Suchy 등, 2011)는 NPC1과는 아무런 반응을 하지 못하고, 콜레스테롤 흡수도 저해시키지 못하며(Dixit 등, 2007), 반대로 NPC1의 잠재적 억제제(potential inhibitor)인 U18666A(Cenedella, 2009)도 NPC1L1의 기능에 영향을 미치지 못한다고 알려져 있다(Ge 등, 2008; Wang와 Song, 2012). 또한 다량의 콜레스테롤을 한꺼번에 운반할 수 있는 지질 뗏목(lipid rafts) 형성에 있어서도 NPC1과 NPC1L1은 약간의 차이를 보여 NPC1은 콜레스테롤이 풍부한 caveolin-1 positive 세포내 구획(intracellular compartment)

을 형성하나(Jelinek 등, 2014), NPC1L1은 caveolin-1보다는 flotillins를 선호하여 NFC-microdomain을 형성한다고 보고되었다(Ge 등, 2011). 이처럼 NPC1과 NPC1L1은 모두 콜레스테롤을 내재화하는 과정에 관여하고 있지만 소수성 결합부위에 콜레스테롤이 직접 결합할 때나 막을 통과하여 콜레스테롤을 전달할 때의 조건이나 기전에 차이가 있다(Turley와 Dietschy, 2003; Ko 등, 2003). NPC1이 세포내 콜레스테롤 유통에 어떻게 관여하는 지는 불분명하지만 Ohgane 등(2013)은 2가지 가능성을 제시하였다. 첫 번째, NPC1은 프로톤 역수송체(proton antiporter)인(Tseng 등, 1999) 원핵생물의 resistance-modulation division(RND) 전달효소와 배열 상동성을 나타내므로 동일하게 투과효소/운반체(permease/transporter)로 작용할 것(Davies 등, 2000a; Ioannou, 2001)이며, 두 번째는 NPC1이 소포 유통을 통해 세포내 지질수송을 매개하며, NPC1의 두 번째 스테롤 결합부위가 기질과 결합하여 채널을 통해 스테롤을 세포질로 방출하거나 스테롤 농도에 비례하여 소포 유통을 조절하는 역할을 할 것으로 추정하였다(Ohsaki 등, 2006; Zhang 등, 2001; Ko 등, 2001). 한편, Wang과 Song(2012)은 NFC-microdomain과 관련하여 NPC1L1 NTD의 역할을 2가지로 예상했다. 첫 번째는 NPC1L1 NTD는 콜레스테롤과 직접 결합하면 결합된 콜레스테롤을 하나씩 세포막으로 직접 전달해주는 것이며, 두 번째 가능성은 NPC1L1 NTD에 콜레스테롤이 결합하면 NPC1L1의 구조적인 변화를 초래하고 더 많은 콜레스테롤이 NFC-microdomain으로 유입되도록 촉진하며, NPC1L1 NTD는 다른 도메인(특히 SSD)과 협력하여 많은 양의 콜레스테롤을 NFC-microdomain 사이에 붙잡아놓을 수 있도록 작용할 것으로 예상했다.

NPC1 NTD과 NPC2 모두에서 결합구조와 비결합 구조 사이에 리간드 결합에 따른 형태변화가 관찰되지는 않았다(Kwon 등, 2009; Estiu 등, 2013; Elghobashi-Meinhardt, 2014). 하지만 NPC1L1 NTD의 경우, 소수성 결합부위 근처의 잔기 구성과 개수가 NPC1 NTD과는 약간의 차이가 있어서 콜레스테롤과 결합 전후에 NPC1L1 NTD의 형태에 변화가 있을 것으로 예상되고 있다(Kwon 등, 2011). 근래의 연구에 따르면 에볼라 바이러스(Ebola virus; EBOV)(Miller 등, 2012; Mingo 등, 2015), 인간 면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus; HIV)(Tang 등, 2009; Coleman 등, 2012)와 같이 인체에 치명적인 필로

바이러스(filovirus)들(Krishnan 등, 2012; Hunt 등, 2012)의 세포 침입이 NPC1을 통해 이루어진다고 하며, C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus; HCV)(Del Campo 등, 2012; Sainz 등, 2012)의 세포 침입과정에는 NPC1L1이 연관되어 있다고 보고되었다. 필로 바이러스들은 NPC1과만 상호작용하며(Krishnan 등, 2012), C형 간염 바이러스는 NPC1L1과만 상호작용한다고 알려져 있으며(Sainz 등, 2012), 최근 NPC1의 두 번째 내강 도메인 C와 에볼라 바이러스의 당단백질이 결합하며 이들의 결합구조도 보고되어(Wang 등, 2016) NPC1이나 NPC1L1의 구조나 도메인 간의 상호작용, 콜레스테롤 유통 기전에 대해 더욱 관심이 모아지고 있다.

3. 재료 및 방법

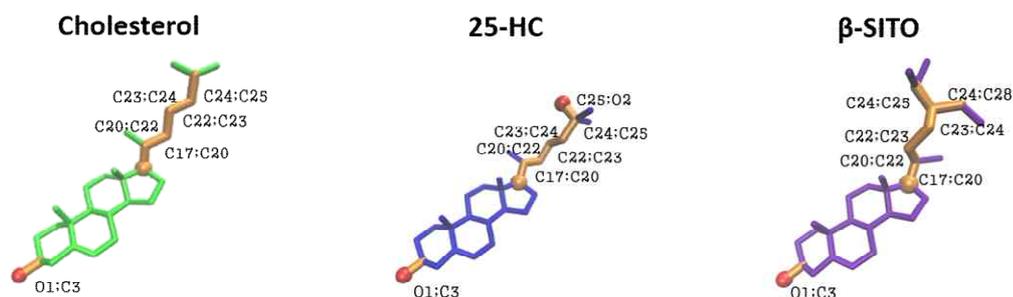
3.1. 분자도킹실험

3.1.1. 도킹준비

도킹실험에 필요한 모든 구조파일(PDB ID: 3GKI와 3GKH, 3GKJ 및 3QNT)은 Brookhaven Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)에서 받아 사용하였다. NPC1 NTD의 경우 결합구조가 이미 보고되어있었으므로 NPC1 NTD(PDB ID: 3GKH)와 콜레스테롤, 25-HC, β -SITO를 도킹하여 각각의 결합구조를 보고된 결합구조(PDB ID: 3GKI, 3GKJ)와 비교하였고, 비결합구조만 보고된 NPC1L1 NTD(PDB ID: 3QNT)을 리간드들과 도킹하여 NPC1 NTD와 리간드들의 결합구조와도 비교하였다. 또한, 결합구조가 알려진 3GKI와 3GKJ에서 각각의 리간드를 분리하여 콜레스테롤과 25-HC의 초기 리간드(reference ligand)로 사용했고, β -SITO는 화학식을 참고하여 Spartan'10프로그램 (Yu 등, 2006)을 사용하여 만들어 사용하였다.

도킹에 필요한 모든 단백질과 리간드들은 AutoDockTools 1.5.6 (ADT)(Morris 등, 2008)을 사용하여 전처리하였다. 이 전처리를 통해 도킹에 사용되는 단백질들의 모든 탄소에 Gasteiger 원자전하와 수소원자를 추가하였고, 물 분자와 N-acetyl-D-glucosamine(NAG)들은 모두 제거한 후 사용하였다. 모델링은 비극성원자까지 포함한 전원자수준(all-atom level)으로 리간드의 모든 수소원자까지 고려하였으며, 리간드 역시 Gasteiger 원자전하를 추가하였다. 리간드의 결합 중에서 이면각 회전(dihedral rotation)이 가능한 비틀림 부위(torsion site)는 콜레스테롤에 6개(O1;C3, C17;C20, C20;C22, C22;C23, C23;C24, C24;C25), 25-HC에는 7개(O1;C3, C17;C20, C20;C22, C22;C23, C23;C24, C24;C25, C25;O2) 그리고 β -SITO에는 7개(O1;C3, C17;C20, C20;C22, C22;C23, C23;C24, C24;C25, C24;C28)

가 있었으며, 최대한 많은 결합이 회전할 수 있도록 모두 Active torsion으로 지정하였다(Figure 1).



[Figure 1] The active torsion bonds of ligands.

The rotatable bonds are indicated in orange and other bonds are indicated in green (cholesterol), dark blue (25-HC) and purple (β -SITO). The center of rotation is shown in big orange ball and oxygen atom is shown in red. All pictures are drawn by VMD.

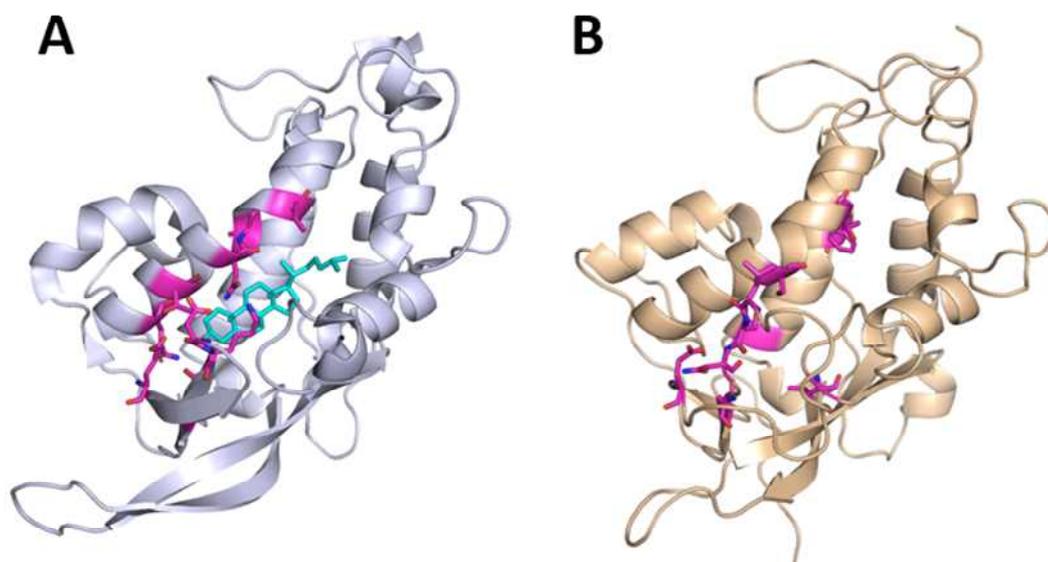
3.1.2. 도킹실험

AutoDock 4.2(Morris 등, 2009)의 AutoGrid(Morris 등, 1998)를 사용하여 친화력 그리드지도(affinity grid map)를 생성하고, AutoDock 프로그램에 포함되어 있는 Lamarckian Genetic Algorithm을 적용한 Flexible Ligand 도킹 실험을 수행했다.

우선 단백질과 리간드의 결합위치 즉, NPC1 및 NPC1L1의 NTD에 있는 소수성 결합부위를 충분히 둘러쌀 수 있도록 그리드 상자(grid box)의 크기를 x, y, z 방향으로 각각 60×60×60으로 지정했다. 그리드 지도를 구성한 그리드 점(grid point)의 총 개수는 226,981개였으며, 0.375 Å의 간격으로 배치되었다. 그리드 상자의 중심좌표는 NPC1L1 NTD와 NPC1 NTD 모두 $x = -17.0$, $y = -29.0$, $z = -18.0$ 으로 지정하였다. 사전 실험을 통해 도킹 결과가 일관성 있게 도출되었던 500회로 도킹 횟수를 변경하였으나 나머지 도킹 매개변수는 AutoDock 프로그램의 기본 값을 그대로 사용했다.

모든 분자도킹실험은 Rigid receptor 도킹과 Flexible receptor 도킹의 두 가지 조건(Morris 등, 2012)에서 수행되었고 Flexible receptor 조건에는 몇몇의 잔기들에 유연성이 부여되었다. 단백질들의 Flexible residue를 지정하기 위해 Elghobashi-Meinhardt(2014)와 Kwon 등(2009, 2011)의 연구를 참고하여 NPC1과

NPC1L1의 NTD에 있는 소수성 결합부위에서 리간드와 가까운 곳에 위치한 잔기들을 Flexible residue 후보군으로 선정하였다. 그중에서 반복된 사전 도킹실험을 통해 단백질과 리간드 사이에 수소결합을 형성한 잔기들과 잔기의 회전 가능한 비틀림 부위에 유연성을 주었을 때 도킹 퍼센트가 개선되고, 단백질과 리간드의 결합에너지를 감소시킬 수 있었던 잔기 9개를 각각 선발하였다. 단, Autodock 프로그램은 단백질의 잔기 중에서 회전이 가능한 탄소-탄소 결합을 가지고 있는 잔기만을 Flexible residue로 지정하므로 회전 가능한 비틀림 부위가 없는 proline 같은 잔기들은 Flexible residue 지정에서 배제되었다. 3GKH(NPC1 NTD)의 경우 총 9개의 잔기들(Glu30, Asp37, Lys38, Asn41, Gln79, Thr82, Asn86, Leu87, Leu89)이, 3QNT(NPC1L1 NTD)의 경우 총 9개의 잔기들(Glu38, Leu52, Ser53, Asn54, Ser56, Ser102, Thr107, Phe120, Leu213)이 Flexible residue로 지정되었다(Figure 2).



[Figure 2] The Flexible residues of hydrophobic binding pocket used in current docking study.

[A] Flexible residues of NPC1 NTD and [B] Flexible residues of NPC1L1 NTD. NPC1 NTD (3GKI) molecule is shown in light blue and cholesterol molecule is shown in cyan as a stick. NPC1L1 NTD (3QNT) molecule is shown in light orange. Flexible residues are shown in pink as a stick. All pictures are drawn by PyMOL.

도킹 조건은 Flexible residue를 지정하지 않은 강직형 도킹(Rigid receptor 도킹; try1), 리간드와 수소결합을 할 가능성이 있는 잔기 2개만 Flexible residue로

지정한 경우(Flexible receptor 도킹; try2), try2에 1개의 잔기를 추가한 경우(Flexible receptor 도킹; try3), 프로그램에서 허용하는 최대범위인 9개의 잔기들을 Flexible residue로 지정한 경우(Flexible receptor 도킹; try4)가 수행되었다.

3.1.4. 클러스터 분석

도킹실험으로 얻어진 500개의 구조들은 각각의 결합에너지(free energy of binding: ΔG , kcal/mol)와 저해상수(inhibition constant: K_i , M)를 계산하였다. 결합에너지(ΔG)는 도킹 에너지와 비틀림 에너지(torsional energy)의 합으로 구했고, K_i 는 도킹에 대한 평형상수이므로 $K_i = \exp((\Delta G \times 1000)/(R \times T))$ 로 계산하였다(R 은 기체상수이고, T 는 상온으로 298.15K이다). 도킹으로 만들어진 각 구조의 리간드들 사이에 C 원자기반 root mean square deviation(RMSD)을 계산하여 표준계층적 클러스터분석(standard hierarchical cluster analysis)을 하였다. 다만 에너지가 낮은 순서, 즉 열역학적으로 가장 유리한 구조(best binding mode)로 서열을 지정하였고 이때 클러스터 구획을 위한 RMSD 기준은 2.0 Å로 하였다. 자유에너지(ΔG) 측면에서 가장 낮은 결합에너지를 나타내면서도 클러스터에 속하는 구조의 개수가 가장 많은 결합방식(binding mode)이 실제로 주요 결합방식으로 작용할 것이므로 이를 반영하여 최적결합구조(best model)를 예측하여야 한다. 본 계산에서는 최대 개수를 갖는 클러스터의 평균 결합에너지가 다른 클러스터의 평균 결합에너지보다 모두 낮게 나타났으므로 이를 실제 존재할 가능성이 있는 최적결합구조로 예측하였다. 도킹에서 얻은 결합구조의 리간드와 실험적으로 보고된 리간드(콜레스테롤, 25-HC)의 위치를 RMSD로 비교하였으며 보고된 실험구조가 없는 리간드의 경우(β -SITO)에는 PyMOL 프로그램 v1.10(The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.)을 이용하여 실험구조가 보고된 콜레스테롤의 3 β -수산기의 산소원자를 기준으로 두 리간드 사이의 거리(Dt)를 측정하여 비교하였다.

모든 분자도킹실험은 Windows 7 Home Premium K로 운영되는 Core i3-3240 CPU 3.40 GHz의 데스크톱 컴퓨터에서 수행되었다.

3.2. 분자동역학 모의실험

3.2.1. 단백질과 리간드 준비

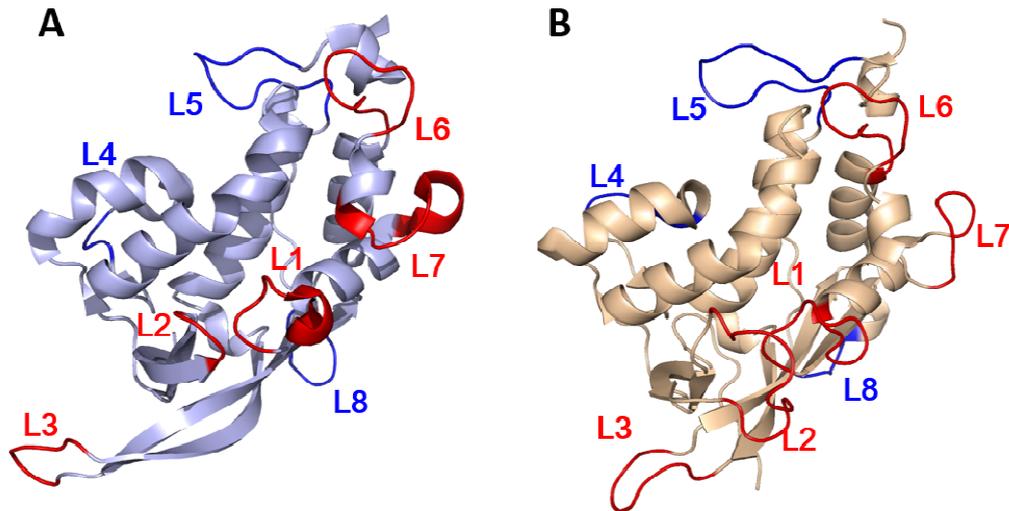
리간드들(콜레스테롤, 25-HC, β -SITO)과 단백질들(NPC1L1 NTD와 NPC1 NTD)의 도킹 결과들 중에서 가장 결합에너지가 낮았던 최적결합구조를 가지고 주기적 경계조건 하에서 GROMACS 4.6.5(Van der Spoel 등, 2005)를 이용한 분자동역학 모의실험을 실시하였다. 단백질에 수소원자를 첨가한 후 Amber03 Force field(Duan 등, 2003)를 사용하여 topology를 생성하였고 리간드들의 topology는 Antechamber(Sousa da Silva와 Vranken, 2012)를 사용하여 생성하였다.

3.2.2. 분자동역학 모의실험 수행 및 결과분석

단백질과 모의실험 상자(simulation box)의 가장자리 사이에 10 Å의 여유가 있도록 상자크기를 지정하였다. 예를 들어 NPC1L1 NTD의 경우 83×83×59 Å³의 초기크기로 제작되었다. MD simulation의 효율성을 위해 12면체(Rhombic Dodecahedron) 상자를 사용하였다. 단백질과 리간드를 결합시키고 수용액을 추가하여 약 13,000개의 물 분자를 포함하는 TIP3P 물분자 모의실험 상자(Jorgensen 등, 1983)를 형성하였고 시스템의 전체 전하를 중성화시키기 위하여 5개의 나트륨 이온이 추가되었다. MD simulation을 수행하기 전에 단백질에 속한 모든 원자들이 자유롭게 회전할 수 있도록, 또한 불필요한 상호작용을 배제하기 위하여 단백질 원자들의 초기에너지를 최소화하여 안정시켰다. Steepest descent법(Fletcher와 Powell, 1963)을 통해 약 1,000 단계 만에 에너지 최소화가 완료되었다. 시스템은 NVT 앙상블(ensemble)에서 0.0 K에서 300.0 K가 될 때까지 200 ps 동안 1 bar 하에서 가열되었고 단백질과 리간드의 결합이 안정될 수 있도록 1.0 ps의 완화시간(relaxation time)을 주었다. 정전기적인 상호작용은 PME법(Darden 등, 1993)을 사용해 계산되었고 원자들 간의 판테르발스 상호작용은 9 Å에서의 switch truncation처리로 0으로 간주되었다.

MD simulation은 2 fs의 간격으로 50 ns 동안 수행되었으며 쿼적은 2 ps마다,

에너지의 좌표들은 매 0.4 ps마다 저장되었다. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 구조변화를 확인하기 위해 비교적 위치변화가 수월할 것으로 예상되는 8개의 고리들을 지정하여 비교하였다(Figure 3, 4).

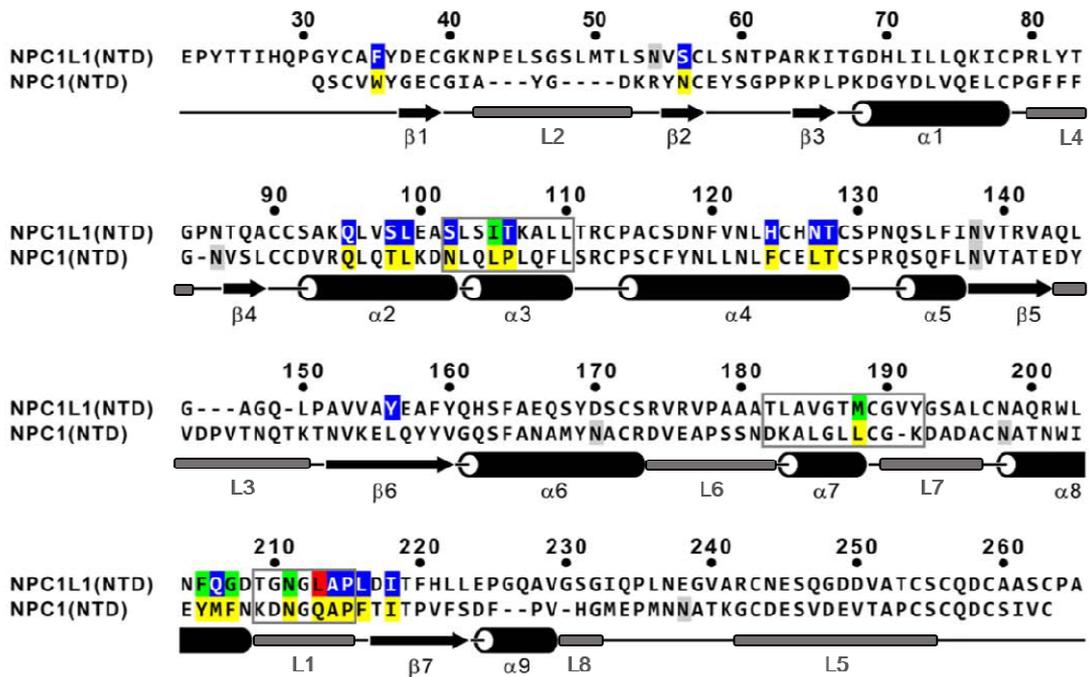


[Figure 3] The loops used to compare with ligand bound and unbound conformations for NPC1 NTD and NPC1L1 NTD.

[A] Loops of NPC1 NTD and [B] Loops of NPC1L1 NTD. NPC1 NTD (3GKH) molecule is shown in light blue, L1 is Asn195~Phe203, 9 amino acids ($\alpha 8/\beta 7$), L2 is Thy35~Asp37, 3 amino acids ($\beta 1/\beta 2$), L3 is Asp131~Asn135, 5 amino acids ($\beta 5/\beta 6$), L4 is Gly69~Val71, 3 amino acids ($\alpha 1/\beta 4$), L5 is Cys227~Pro237, 11 amino acids (~C terminus), L6 is Asp162~Lys171, 10 amino acids ($\alpha 6/\alpha 7$), L7 is Leu176~Gln185, 8 amino acids ($\alpha 7/\alpha 8$) and L8 is Ser210~Glu218, 5 amino acids ($\beta 7$ ~). NPC1L1 NTD (3QNT) molecule is shown in light orange, L1 is Gly207~Asn216, 10 amino acids ($\alpha 8/\beta 7$), L2 is Asn42~Ser53, 12 amino acids ($\beta 1/\beta 2$), L3 is Gln144~Leu150, 7 amino acids ($\alpha 5/\beta 5$), L4 is Leu81~Pro85, 5 amino acids ($\alpha 1/\beta 4$), L5 : Cys243~Ser255, 13 amino acids (~C terminus), L6 is Ser173~Leu183, 11 amino acids ($\alpha 6/\alpha 7$), L7 is Gly190~Leu196, 7 amino acids ($\alpha 7/\alpha 8$) and L8 is Ala228~Gly232, 5 amino acids ($\alpha 9$ ~). All loops shown in red (front) and blue (back). All pictures are drawn by PyMOL.

50 ns MD simulation으로 생성된 구조들의 분포가 얼마나 안정해졌는지 확인하기 위해 실험적으로 보고된 구조(NPC1 NTD, 3GKI; NPC1L1 NTD, 3QNT)와 생성된 구조의 원자들 사이에 거리를 RMSD로 그래프를 그렸다. RMSD 그래프 상에서 RMSD가 일정하게 유지되는 시점 즉, 구조분포가 안정해진 이후부터 50 ns까지의 비결합구조와 결합구조를 각각 100개씩 선발하여 동일한 위치의 고리들 간의 거리를 RMSD로 계산하고 RMSD의 평균값으로 나타내었다. 그리고

MD simulation 초기의 위치와 시간에 따라 변화된 각 잔기들의 위치를 root mean square fluctuation(RMSF)으로 계산하여 각 고리의 잔기들이 얼마나 흔들렸는지를 그래프로 확인하였다. 또한 40, 42.5, 45, 47.5, 50 ns에 생성된 결합구조와 비결합구조 5개씩을 선발하여 리간드 결합전후 고리의 위치를 그림으로 그려 비교하였다.



[Figure 4] The sequence alignment of NPC1L NTD and NPC1 NTD.

N-linked glycosylation sites are shaded gray. Residues lining the cholesterol binding pocket are shaded yellow in NPC1. In NPC1L1, residues within the interior of the closed cholesterol binding pocket are shaded blue, residues on the exterior of the closed cholesterol binding pocket are shaded green, and residues separating the interior from the exterior are shaded red. Region around the entrance to the cholesterol binding pocket that change conformation are boxed. The secondary structure of NPC1L1 NTD is shown below the sequence. The loops assigned in current study are shown in grey bar. Edited based on Kwon et al (2011).

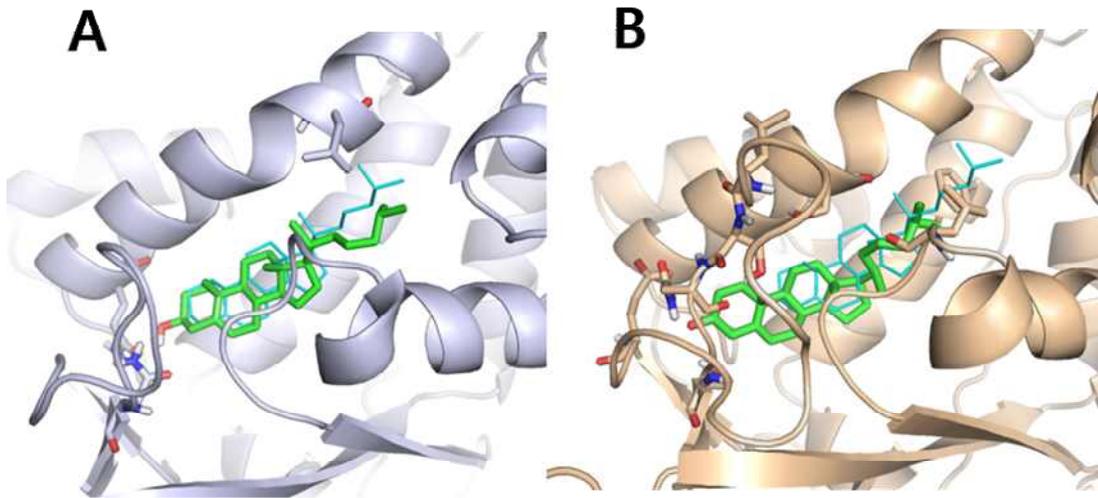
MD simulation의 모든 과정은 CentOS v5.8, 64bit의 운영체제, GPU model NVIDIA GeForce GTX 680×3인 Workstation에서 계산하였다. 이 논문에 사용한 모든 그림들은 VMD v1.9.1(Humphrey 등, 1996)과 PyMOL 프로그램 v1.10(The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.)을 사용하여 그렸다.

4. 결과 및 고찰

4.1. 분자도킹실험

4.1.1. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 콜레스테롤 도킹 결과

NPC1 NTD, NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 최적결합구조는 Figure 5와 같았다. 단백질들과 결합된 리간드의 방향은 초기 리간드(3GKI의 콜레스테롤)와 일치하였다(reference-like binding; RB). NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 도킹 퍼센트를 높이기 위해 다양한 잔기에 유연성을 부여하여 도킹 실험을 실시하였다. Rigid 도킹의 경우, 콜레스테롤의 수산기와 NPC1 NTD의 Asn41(Dt: 2.0 Å)과 Gln79(Dt: 2.0 Å)이, NPC1L1 NTD의 경우 주로 Glu38(Dt: 2.5 Å)이, 간혹 Ser56(2.8 Å)도 수소결합을 형성(Figure S1)하였으므로 이들을 포함하여 결합에너지나 도킹 퍼센트를 개선했던 9 가지 잔기들을 각각 선발하였다. NPC1 NTD의 3개 잔기에 유연성을 부여했을 때 결합에너지가 가장 낮은 결합구조(Figure 4A)를 얻을 수 있었으며, 이때의 리간드는 초기 리간드와 비슷한 곳(Dt: 0.8 Å, RMSD: 1.1 Å)에 위치했다. 9개의 잔기에 유연성을 준 NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 결합구조에서 결합에너지가 가장 낮았으며, 이때 리간드의 위치는 NPC1 NTD와 동일하게 결합부위 안쪽에 있었고 초기 리간드와의 거리가 4.4 Å(RMSD: 4.1 Å)으로(Figure 4B), NPC NTD 결합구조에 비해(Dt: 0.5 Å, RMSD: 1.1 Å) 또, 모든 리간드들(25-HC, 1.8 Å; β -SITO, 3.3 Å)에 비해 가장 길었다. Rigid receptor 도킹 결과 중에 일부는 콜레스테롤의 위치가 반대로 뒤집혀서 flipped binding(FB) 방향을 나타낸 경우도 있었는데 이때 콜레스테롤의 β -수산기는 결합부위 입구를 향하고 있었고 콜레스테롤의 isooctyl 결사슬은 찌그러져 있었다(Figure S2). 500회를 실시한 도킹 결과에서 FB 방향 구조에 비해 RB 방향 구조가 더 우세했고, 결합에너지 면에서도 RB 방향 구조들에서 더 낮아(Table 2) 실제 결합구조는 RB 방향 구조로 존재할 것으로 예측되었다.



[Figure 5] Best model of protein in complex with cholesterol from molecular docking study.

[A] NPC1 NTD and cholesterol (RMSD: 1.1 Å) complex from Flexible receptor docking, [B] NPC1L1 NTD and cholesterol (RMSD: 4.1 Å) complex from Flexible receptor docking. Docked ligand is shown in green stick and reference ligand from 3GKI is shown in cyan line. NPC1 NTD and NPC1L1 NTD is shown in light blue and light orange ribbon. Flexible residues of hydrophobic binding pocket are shown in a stick. Nitrogen and oxygen atoms are shown in blue and red, respectively.

Rigid receptor 조건에서 리간드 결합방향(RB or FB), 결합에너지, 도킹 퍼센트, K_i 등은 Table S1, S2과 같았다. NPC1 NTD와 콜레스테롤의 결합구조를 보면 FB 방향에 비해 RB 방향 클러스터의 결합에너지가 더 낮고 빈도도 더 많았다. 하지만 NPC1L1 NTD와 콜레스테롤 결합구조에서는 FB 방향 클러스터의 빈도가 2배 정도 더 높게 나타나 FB 방향 클러스터가 수적으로는 우세했지만 결합부위 안에 리간드가 들어간 비율(RB 도킹 퍼센트)이 매우 저조하여 실제로는 존재하기 어려운 결합구조였다. NPC1L1 NTD의 RB 방향 도킹 퍼센트를 높이기 위해 몇몇 잔기들의 회전할 수 있는 결합에 유연성을 주었을 때(Table 1), RB 방향 도킹 퍼센트가 5배가량(40.6%) 향상되었으나 NPC1 NTD의 RB 방향 도킹 퍼센트는 오히려 72.8%로 감소하였다. 그리고 500개의 구조 중에서 가장 안정한 구조인 최적결합구조에서의 결합에너지와 K_i 는 NPC1L1 NTD(-13.44 kcal/mol, 141.1 pM)과 NPC1 NTD(-14.75 kcal/mol, 15.3 pM)로 낮아져 Rigid receptor 도킹에 비해 상대적으로 안정했다. 즉, NPC1L1 NTD의 9개 잔기들에 유연성을 준 결과 NPC1L1 NTD의 최적결합구조의 결합에너지와 도킹 퍼센트가 개선되었으

나, NPC1 NTD는 3개 잔기들에 유연성을 주었을 때 최적결합구조의 상대적인 안정성은 향상되었으나, 전체적인 도킹 퍼센트는 감소하여 NPC1L1 NTD와는 다른 경향을 나타냈다.

결합에너지, K_i , RB 방향 도킹 퍼센트를 고려하여 NPC1 NTD는 3개의 잔기에 유연성을 준 도킹으로 얻어진 결합구조를 최적결합구조(Figure 5A, 결합에너지 -13.65 kcal/mol)로 선정했고, NPC1L1 NTD는 9개의 잔기에 유연성을 준 도킹 결과 얻어진 결합구조를 최적결합구조(Figure 5B, 결합에너지 -13.74 kcal/mol)로 선정했다.

[Table 1. Flexible receptor docking results of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD and Cholesterol]

flexible protein	reference-like bind (RB) cluster		flipped bind (FB) cluster		RB docked percent ¹ (%)	best model	
	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs		free Energy of binding (kcal/mol)	K_i (inhibition constant)
NPC1 NTD ²	-14.75	364	-11.80	135	72.8	-14.75	15.3 pM
NPC1L1 NTD ³	-11.71	203	-10.29	119	40.6	-13.44	141.1 pM

¹. RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

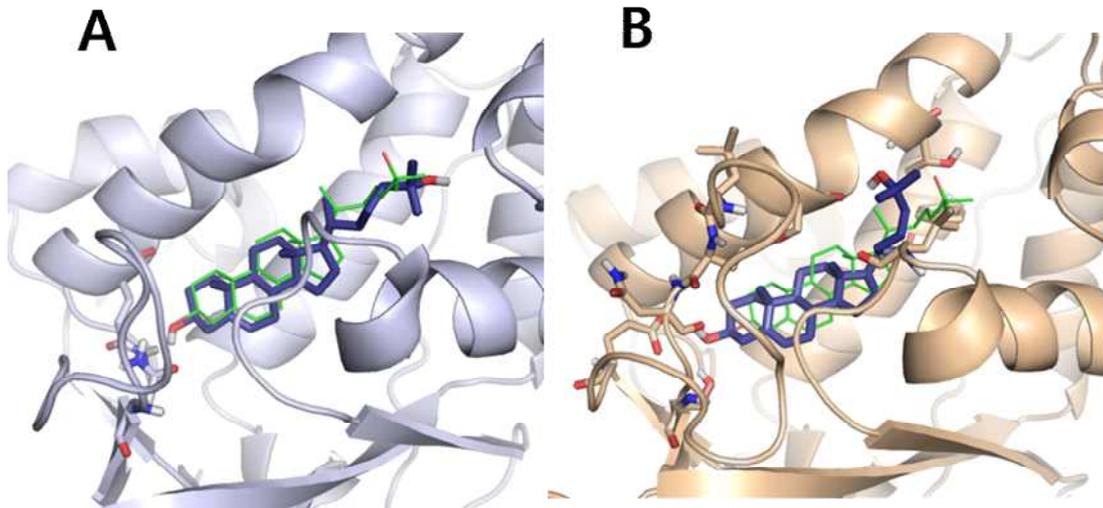
². Flexible residue = Asn41, Gln79, Leu89

³. Flexible residue = Glu38, Leu52, Ser53, Asn54, Ser56, Ser102, Thr107, Phe120, Leu213

4.1.2. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 25-HC 도킹 결과

NPC1 NTD, NPC1L1 NTD와 25-HC의 최적결합구조는 Figure 6과 같았다. 25-HC와 NPC1L1 NTD의 도킹 결과도 콜레스테롤과 같이 9개의 잔기들에 유연성을 부여했을 때 도킹 퍼센트를 개선되었고, 더 안정한 구조를 나타내었다 (Figure 6A). 또한 NPC1 NTD와 25-HC의 도킹 결과는 2개의 잔기들에 유연성을 부여했을 때 결합에너지가 가장 낮아 더 안정한 구조를 나타내었다(Figure 6B). NPC1L1 NTD의 결합구조들에서 25-HC의 위치는 초기 리간드와 유사했다. 25-HC도 콜레스테롤과 마찬가지로 NPC1 NTD(Dt: 0.7 Å, RMSD: 1.2 Å)보다 NPC1L1 NTD의 결합부위 내에서 더 깊숙이 결합하여 초기 리간드와의 거리는 1.8 Å(RMSD; 2.1 Å)을 나타냈으나 콜레스테롤 결합구조(Dt: 4.4 Å, RMSD: 4.1

Å)보다는 짧았다.



[Figure 6] Best model of protein in complex with 25-HC from molecular docking study.

[A] NPC1 NTD and 25-HC (RMSD: 1.2 Å) complex in Rigid receptor condition, [B] NPC1L1 NTD and 25-HC (RMSD: 2.1 Å) complex in flexible receptor condition. Docked ligand is shown in dark blue stick and reference ligand of 3GKJ is shown in green line. NPC1 NTD is shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Nitrogen and oxygen atoms are shown in blue and red, respectively.

RB 방향 외에도 25-HC의 3 β -수산기가 결합부위의 입구 쪽을 향하는 뒤집혀진 방향(FB) 역시 관찰 되었으나(Figure S4), RB 방향 클러스터에 비해 결합에너지가 높고 빈도도 낮았다. 즉, NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD 모두 25-HC와 결합할 때 FB에 비해 RB 방향 클러스터가 더 우세했고, 구조도 더 안정되었다.

Rigid receptor 조건에서의 NPC1 NTD, NPC1L1 NTD와 25-HC의 결합방식(RB 방향 or FB 방향), 결합에너지, 도킹 퍼센트, K_i 등은 Table S3, S4와 같다. 몇몇 잔기들의 회전할 수 있는 결합에 유연성을 주었을 때(Table 2), NPC1L1 NTD와 25-HC의 RB 방향 도킹 퍼센트는 7.8%에서 40.0%로 개선되었다. 하지만 NPC1 NTD와 25-HC의 RB 방향 도킹 퍼센트는 93.8%에서 74%로 떨어졌다. 한편, NPC1L1 NTD와 25-HC의 RB 방향 구조의 평균결합에너지는 Flexible receptor 조건에서 더 낮은 결합에너지 -11.86 kcal/mol를 나타내 Rigid receptor 조건(-7.61 kcal/mol)에 비해 꽤 안정화되었고 최적결합구조의 결합에너지도 -9.89 kcal/mol에서 -14.66 kcal/mol로, K_i 도 56.3 pM이 18.1 pM로 더 안정한 구

조를 보였다. 하지만 NPC1 NTD의 RB 방향 평균결합에너지는 약간 증가되었다 (+0.11 kcal/mol). 다만 최적결합구조는 NPC1 NTD의 경우, -13.8 kcal/mol에서 -14.79 kcal/mol로, K_i 도 77.0 pM에서 14.4 pM로 떨어져 더 안정한 결합을 나타내 콜레스테롤 도킹 실험과 같은 경향을 보였다. NPC1 NTD와 25-HC의 최적결합구조는 결합에너지 -14.79 kcal/mol와 K_i 14.4 pM을 나타내 NPC1 NTD와 콜레스테롤의 최적결합구조의 결합에너지(-14.75 kcal/mol)와 K_i (15.3 pM)보다 약간 낮았다.

결합에너지, K_i , RB 방향 도킹 퍼센트를 고려하여 NPC1 NTD는 2개의 잔기에 유연성을 준 경우 얻어진 결합구조를 최적결합구조(Figure 5A, 결합에너지 -14.79 kcal/mol)로 선정했고, NPC1L1 NTD는 9 개의 잔기에 유연성을 준 도킹으로 얻어진 결합구조를 최적결합구조(Figure 5B, 결합에너지 -14.66 kcal/mol)로 선정했다.

[Table 2. Flexible receptor docking results of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD with 25-HC]

flexible protein	reference-like bind (RB) cluster		flipped bind (FB) cluster		RB docked percent ¹ (%)	best model	
	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs		free Energy of binding (kcal/mol)	K_i (inhibition constant)
NPC1 NTD ²	-13.26	370	-12.28	130	74.0	-14.79	14.4 pM
NPC1L1 NTD ³	-11.86	200	-9.94	106	40.0	-14.66	18.1 pM

¹. RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

². Flexible residue = Asn41, Gln79

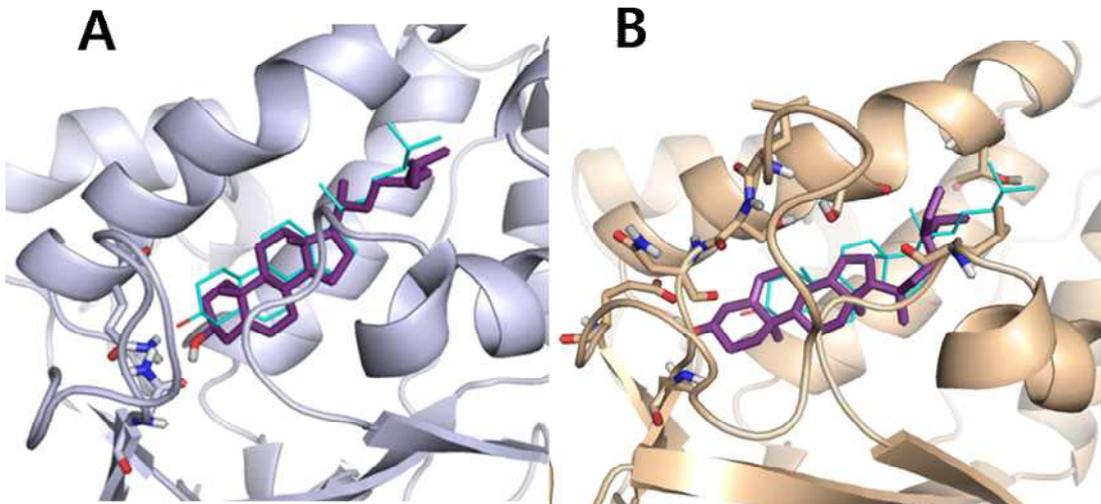
³. Flexible residue = Glu38, Leu52, Ser53, Asn54, Ser56, Ser102, Thr107, Phe120, Leu213

4.1.3. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 β -SITO 도킹 결과

Rigid receptor 조건에서의 NPC1 NTD, NPC1L1 NTD와 β -SITO의 도킹 결과, 두 결합구조 모두 결합부위 안에 리간드가 위치해있었으며, NPC1 NTD에 비해 NPC1L1 NTD에서 리간드의 위치가 더 안쪽으로 이동해 있었다(Figure S5). 하지만 β -SITO와 NPC1L1 NTD의 도킹 결과도 Rigid receptor 조건에서 전체적인 도킹 퍼센트가 현저하게 떨어져 이를 개선하기 위해 9개의 잔기들에 유연성

을 부여하였다. Flexible receptor 조건에서 도킹 했을 때 NPC1L1 NTD의 도킹 퍼센트가 개선되었고, 더 안정한 구조를 나타내었다(Figure 7B). 한편, NPC1 NTD와 β -SITO의 도킹 결과는 2개의 잔기들에 유연성을 부여했을 때 Rigid receptor 도킹보다 더 안정한 구조를 나타내었고(Figure 7A) 이때 초기 리간드와의 거리는 1.2 Å으로 다른 리간드들에 비해 약간 옆으로 이동해있었다.

이들 결합구조들에서 β -SITO의 위치가 초기 리간드(3GKI의 콜레스테롤)와 유사한 위치에 결합되어있었다. 다른 리간드들과 비슷하게 NPC1L1 NTD에서의 β -SITO 위치가 NPC1 NTD에 비해 결합부위 내부로 깊숙이 결합되어있었고 초기 리간드와의 거리가 3.3 Å으로 25-HC(1.8 Å)에 비해 길었다. 또한 β -SITO의 결합지는 다른 스테롤들에 비해 더 많이 찌그러진 형태를 보였다.



[Figure 7] Best model of protein in complex with β -SITO from molecular docking study.

[A] NPC1 NTD and β -SITO complex in Rigid receptor condition, [B] NPC1L1 NTD and β -SITO complex in Flexible receptor condition. Docked ligand is shown in dark blue stick and reference ligand of 3GKI is shown in cyan line. NPC1 NTD is shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Nitrogen and oxygen atoms are shown in blue and red, respectively.

β -SITO의 경우 β -수산기이 결합부위 입구를 향하는 FB 방향의 구조가 다른 리간드에 비해 상대적으로 많이 관찰되었으나(Figure S6), RB 방향 클러스터에 비해서는 결합에너지도 높고 빈도도 높지 않았다. 즉, NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD 모두 β -SITO와 결합할 때 FB에 비해 RB 방향 도킹 클러스터가 더 우세

했고, 구조도 더 안정되었다.

NPC1 NTD, NPC1L1 NTD와 β -SITO의 결합방식(RB 방향 or FB), 결합에너지, 도킹 퍼센트, K_i 등은 Table S5, S6과 같다. NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 클러스터의 평균 결합에너지는 -13.39 kcal/mol과 -6.76 kcal/mol로 25-HC 도킹 study(-13.37 kcal/mol과 -7.61 kcal/mol)에 비해 NPC1L1 NTD의 RB 방향 클러스터 평균 결합에너지가 약간 높아졌고 NPC1L1 NTD는 차이가 없었다. 하지만 NPC1L1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 도킹 퍼센트는 2.2%로 NPC1 NTD(89.6%)에 비해 현저하게 낮았고, 다른 리간드들(콜레스테롤, 8.2%; 25-HC, 7.8%)에 비해서도 가장 낮은 수준이었다.

몇몇 잔기들의 회전할 수 있는 결합에 유연성을 주었을 때(Table 3), NPC1L1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 도킹 퍼센트는 2.2%에서 26.8%로 개선되었다. 하지만 NPC1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 도킹 퍼센트는 89.6%에서 67.2%로 떨어졌다. 한편, NPC1L1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 클러스터의 평균결합에너지는 Flexible receptor 조건에서 더 낮은 결합에너지 -12.0 kcal/mol를 나타내 Rigid receptor 조건(-6.76 kcal/mol)에 비해 꽤 안정화되었고 최적결합구조의 결합에너지도 -9.3 kcal/mol에서 -14.44 kcal/mol로, K_i 도 153.4 nM이 25.9 pM로 더 안정한 구조를 보였다. 하지만 NPC1 NTD의 RB 방향 평균결합에너지는 약간 증가되었다($+0.06$ kcal/mol). 다만 최적결합구조는 NPC1 NTD의 경우, -13.94 kcal/mol에서 -14.79 kcal/mol로, K_i 도 60.1 pM에서 10.6 pM로 떨어져 더 안정한 결합을 나타내 다른 리간드들(콜레스테롤, 25-HC)과 같은 경향을 보였다. NPC1 NTD와 β -SITO의 최적결합구조는 결합에너지 -14.97 kcal/mol와 K_i 10.6 pM을 나타내 NPC1 NTD와 콜레스테롤(-14.75 kcal/mol)이나 25-HC(-14.79 kcal/mol)보다도 낮아 이번 도킹 실험을 통틀어 열역학적으로 가장 안정한 구조를 나타내었다.

결합에너지, K_i , RB 방향 도킹 퍼센트를 고려하여 NPC1 NTD는 2개의 잔기에 유연성을 준 Flexible receptor 도킹 결과 얻어진 결합구조를 최적결합구조(Figure 7A, 결합에너지 -14.97 kcal/mol)로 선정했고, NPC1L1 NTD는 9 개의 잔기에 유연성을 준 flexible 도킹 결과로 얻어진 결합구조를 최적결합구조

(Figure 7B, 결합에너지 -14.44 kcal/mol)로 선정했다.

[Table 3. Flexible receptor docking results of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD with β -SITO]

flexible protein	reference-like bind (RB) cluster		flipped bind (FB) cluster		RB docked percent ¹ (%)	best model	
	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs		free Energy of binding (kcal/mol)	K_i (inhibition constant)
NPC1 NTD ²	-13.43	336	-12.01	158	98.8	-14.97	10.6 pM
NPC1L1 NTD ³	-12.00	134	-9.76	106	20.8	-14.44	25.9 pM

¹. RB docked percent = (number of reference-like binding)/500..

². Flexible residue = Asn41, Gln79

³. Flexible residue = Glu38, Leu52, Ser53, Asn54, Ser56, Ser102, Thr107, Phe120, Leu213

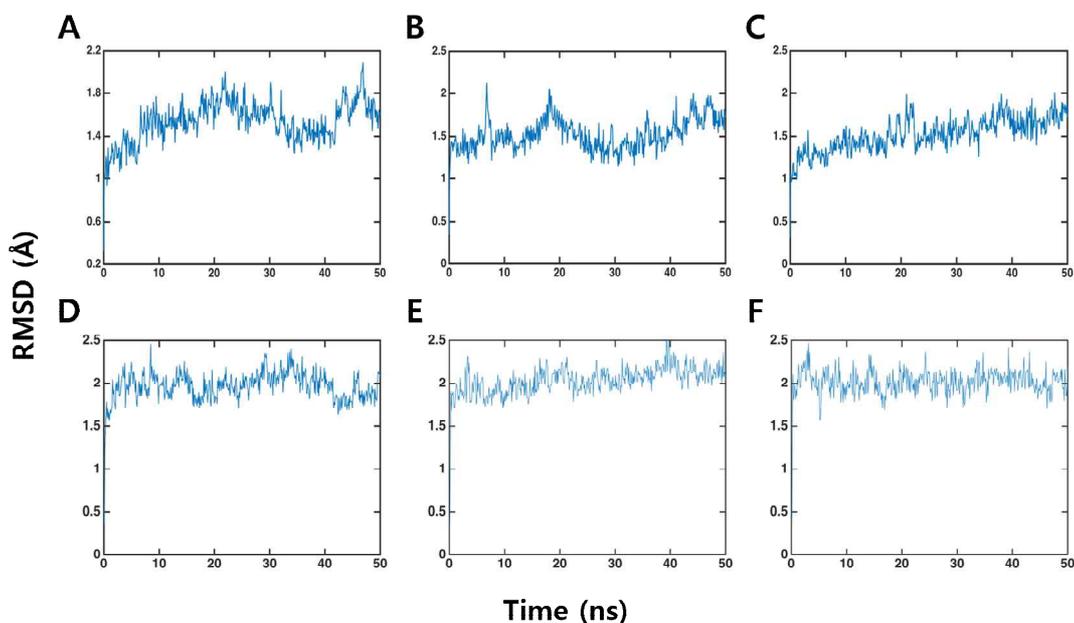
전체적인 분자도킹실험 결과를 종합해보면, NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD는 결합구조의 특징에서 다른 양상을 보여, NPC1 NTD에 비해 NPC1L1 NTD는 잔기의 유연성이 많이 부여될수록 도킹 퍼센트와 최적결합구조의 결합에너지가 일률적으로 개선되는 경향을 보였다. 또한 리간드별로 살펴보면 NPC1 NTD의 최적결합구조는 β -SITO, 25-HC, 콜레스테롤과의 결합에너지 차이가 미미했고, NPC1L1 NTD의 최적결합구조는 25-HC, β -SITO에 비해 콜레스테롤 결합구조의 결합에너지가 약 1 kcal/mol 정도 높아 상대적인 결합의 안정성이 약간 떨어지는 것으로 나타났다. 도킹 퍼센트는 NPC1L1 NTD(~64.4%)에 비해 NPC1 NTD(~100%)에서 높아 더 잘 결합되는 경향을 보였으며, NPC1 NTD와 리간드들의 결합구조는 결합에너지(ΔG)나 K_i 의 측면에서도 NPC1L1 NTD의 결합구조들에 비해 더 안정한 구조를 나타내었다. 결과적으로 NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD와 리간드들과의 결합구조가 다를 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었으며, NPC1L1 NTD보다는 NPC1 NTD의 결합구조가 상대적으로 안정한 것으로 나타났다. 비교적 정적인 분자도킹실험에서 관찰된 두 단백질의 결합구조 차이를 동적인 구조에서도 확인하고자 분자동역학 모의실험을 실시하였다.

4.2. 분자동역학 모의실험

4.2.1. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 분자동역학 구조

리간드와 결합이 된 후의 단백질 결합구조는 고정된 상태가 아닌 주어진 환경에서 일정한 범위의 동적인 구조를 갖게 되며, 정적인 구조가 아닌 이러한 동적인 구조들이 결합 이후의 과정에 영향을 미치게 될 것이므로 동적 구조에서의 작용을 살펴보아야 한다. MD simulation은 주어진 온도에서 충분히 오래 표본을 추출할 경우, 나타날 수 있는 다양한 구조들을 얻을 수 있으므로 이를 이용하여 두 단백질의 결합구조를 비교할 수 있다. 분자도킹실험에서 얻은 두 단백질과 리간드 별 최적결합구조 6개를 사용하여 50 ns 동안 MD simulation을 시행하여, 시간의 흐름에 따라 각각의 결합구조들이 어떻게 움직이는 지를 비교하였다.

0 ns에서 50 ns사이에 생성된 구조들의 집합은 주어진 온도에서 시간이 흘러감에 따라 더 이상 분포의 변화가 없는, 또는 일정한 구조분포를 하는 상태가 되므로 이때에 두 단백질의 결합구조를 확인하고 비교하는 것이 타당하다. 어느 시점부터 일정한 구조분포를 이루었는지 확인하기 위해 실험적으로 보고된 구조(NPC1 NTD, 3GKH; NPC1L1 NTD; 3QNT)에 대한 결합구조들의 원자위치의 RMSD를 그래프로 나타내어 구조의 분포가 일정해지는 시점을 도출하였다(Figure 8). NPC1 NTD와 콜레스테롤의 RB 방향 결합구조는 약 20 ns부터 $\text{RMSD} \approx 1.6 \text{ \AA}$ 으로, NPC1 NTD와 25-HC의 RB 방향 결합구조는 약 30 ns부터 $\text{RMSD} \approx 1.6 \text{ \AA}$ 으로, NPC1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 결합구조는 약 40 ns부터 $\text{RMSD} \approx 1.7 \text{ \AA}$ 으로 일정한 구조분포를 이룬 것으로 나타났다. 한편, NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 RB 방향 결합구조는 약 40 ns부터 $\text{RMSD} \approx 2.0 \text{ \AA}$ 으로, NPC1L1 NTD와 25-HC의 RB 방향 결합구조는 약 40 ns부터 $\text{RMSD} \approx 2.1 \text{ \AA}$ 으로, NPC1 NTD와 β -SITO의 RB 방향 결합구조는 약 20 ns부터 $\text{RMSD} \approx 2.0 \text{ \AA}$ 으로 구조분포가 일정해진 것으로 나타났다.



[Figure 8] The backbone RMSD of NTD-ligand complex with respect to unbound structure (3GKH or 3QNT) as a function of simulation time.

[A]-[C] NPC1 NTD complex, [D]-[F] NPC1L1 NTD complex. A and D are with cholesterol, B and E are with 25-HC, C and F are with β -SITO.

NPC1 NTD에서 콜레스테롤이나 25-HC에 비해 β -SITO와의 결합구조는 50 ns 시간은 일정한 구조분포를 형성하는 데에 부족했던 것으로 나타나서 MD simulation 실험을 더 길게 수행한 후에 결합구조와 비결합구조를 비교하는 것이 타당할 것으로 추정되었다. 하지만, 정해진 실험일정상 더 이상의 MD simulation 수행이 어려웠으므로 최대한 구조변화가 일정해진 40 ns 이후부터 구조분석에 사용하였다. 물론, NPC1L1 NTD를 포함한 모든 결합구조들에서도 정확한 구조를 파악하기에 50 ns라는 시간은 충분한 시간이 아닐 수 있지만 다른 결합구조에서는 10 ns 이후부터는 비교적 구조분포가 일정해져 NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 결합구조를 비교할 수 있었다.

4.2.2. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 결합구조와 비결합구조 고리간의 RMSD

각각의 리간드와의 결합구조가 일정한 분포를 나타낸 시점부터 50ns까지 결합구조와 비결합구조 각 100개씩을 선발하여 각 고리들 간의 RMSD를 계산하고 RMSD의 평균값으로 나타내었다(Table 4, 5).

NPC1 NTD 결합구조들 중에서는 공통적으로 L6의 위치변화가 관찰되었고, 리간드의 종류에 따라 다른 고리들도 위치변화가 다르게 나타났다(Table 4). 콜레스테롤 결합구조의 L5, L6, L8은 다른 리간드에서 비해 가장 큰 위치변화를 보였고 25-HC 결합구조에서는 L6과 L8의 위치변화가 β -SITO 결합구조보다 컸으며, β -SITO 결합구조는 다른 리간드에 비해 L6과 L8이 가장 위치변화가 작았다. 고리의 크기가 클수록 움직이는 경향이 많을 것으로 예상되어 각각의 RMSD 평균값을 고리를 구성하는 잔기의 개수로 나누어보았더니, 잔기의 개수에 상관없이 크게 위치변화가 나타났던 고리에서 relative RMSD도 크게 나타나는 경향을 보였으며, L2와 L4의 경우 고리의 길이가 3개 잔기로 짧음에도 비교적 큰 위치변화(relative RMSD 0.1 Å과 0.2 Å)를 한 것으로 나타났다.

한편, NPC1L1 NTD와 리간드들의 결합구조에서(Table 5) L1, L2, L5, L8 총 4개의 고리들에서 공통적으로 큰 위치변화를 보였고 리간드별로 L3, L6, L7에서 개별적인 위치변화를 나타내 NPC1 NTD(Table 4)에 비해 위치가 변한 고리 수가 많았고, 그 범위도 컸다. NPC1L1 NTD와 콜레스테롤 결합구조에서 L1과 L2는 리간드 결합전후에 크게 위치가 변화되어 NPC1 NTD 결합구조와 가장 큰 차이를 나타냈다.

[Table 4. RMSD between loops of unbound and bound conformations for NPC1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO]

RMSD (\AA) ¹ between loops of unbound and bound conformations (Relative RMSD ²)						
Loop	Reference-like Binding			Flipped Binding		
	cholesterol	25-HC	β -SITO	cholesterol	25-HC	β -SITO
L1	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)	0.4 (0.04)	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)
L2	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	1.4 ³ (0.47)
L3	0.4 (0.08)	0.4 (0.08)	0.3 (0.06)	0.4 (0.08)	0.9 (0.18)	0.4 (0.08)
L4	0.6 (0.2)	0.5 (0.16)	0.4 (0.13)	0.5 (0.16)	1.3 (0.43)	1.2 (0.4)
L5	1.1 (0.1)	0.8 (0.07)	0.9 (0.08)	1.0 (0.09)	1.0 (0.08)	0.9 (0.08)
L6	1.2 (0.12)	1.2 (0.12)	1.1 (0.11)	1.0 (0.1)	1.2 (0.12)	1.2 (0.12)
L7	0.7 (0.08)	0.6 (0.08)	0.6 (0.09)	0.6 (0.08)	0.6 (0.08)	0.6 (0.08)
L8	1.6 (0.32)	1.1 (0.22)	0.7 (0.14)	1.7 (0.34)	0.8 (0.16)	0.7 (0.14)

¹. Average RMSD between loops of Bound and Unbound (100 conformations respectively).

². Relative RMSD = (average RMSD)/(number of residue).

³. Bold letter represents average RMSD greater than 1.0 \AA .

- * L1 : Asn195~Phe203, 9 amino acids (α 8/ β 7)
- * L2 : Thy35~Asp37, 3 amino acids (β 1/ β 2)
- * L3 : Asp131~Asn135, 5 amino acids (β 5/ β 6)
- * L4 : Gly69~Val71, 3 amino acids (α 1/ β 4)
- * L5 : Cys227~Pro237, 11 amino acids (~C terminus)
- * L6 : Asp162~Lys171, 10 amino acids (α 6/ α 7)
- * L7 : Leu176~Gln185, 8 amino acids (α 7/ α 8)
- * L8 : Ser210~Glu218, 5 amino acids (β 7~)

[Table 5. RMSD between loops of unbound and bound conformations for NPC1L1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO]

RMSD (\AA) ¹ between loops of unbound and bound conformations (Relative RMSD ²)						
Loop	Reference Binding			Flipped Binding		
	cholesterol	25-HC	β -SITO	cholesterol	25-HC	β -SITO
L1	1.1 ³ (0.11)	1.2 (0.12)	1.1 (0.11)	1.0 (0.1)	1.5 (0.15)	1.4 (0.14)
L2	2.6 (0.22)	2.6 (0.22)	2.6 (0.22)	2.3 (0.19)	2.2 (0.18)	2.2 (0.18)
L3	0.6 (0.08)	1.0 (0.14)	1.2 (0.17)	0.9 (0.13)	0.9 (0.13)	0.8 (0.11)
L4	0.6 (0.12)	0.6 (0.12)	0.7 (0.14)	0.7 (0.14)	0.6 (0.12)	0.6 (0.12)
L5	1.3 (0.1)	1.6 (0.12)	1.8 (0.14)	1.8 (0.14)	1.9 (0.15)	1.7 (0.13)
L6	1.2 (0.09)	0.5 (0.04)	0.8 (0.06)	0.6 (0.05)	0.5 (0.04)	0.8 (0.06)
L7	0.9 (0.13)	1.3 (0.14)	0.7 (0.11)	1.3 (0.14)	0.8 (0.12)	0.7 (0.11)
L8	1.5 (0.3)	1.1 (0.22)	1.6 (0.32)	1.2 (0.24)	1.6 (0.32)	1.6 (0.32)

¹. Average RMSD between loops of Bound and Unbound (100 conformations respectively).

². Relative RMSD = (average RMSD)/(number of residue).

³. Bold letter represents average RMSD greater than 1.0 \AA .

* L1 : Gly207~Leu216, 10 amino acids (α 8/ β 7)

* L2 : Asn42~Ser53, 12 amino acids (β 1/ β 2)

* L3 : Gln144~Leu150, 7 amino acids (α 5/ β 5)

* L4 : Leu81~Pro85, 5 amino acids (α 1/ β 4)

* L5 : Cys243~Ser255, 13 amino acids (~C terminus)

* L6 : Ser173~Leu183, 11 amino acids (α 6/ α 7)

* L7 : Gly190~Leu196, 7 amino acids (α 7/ α 8)

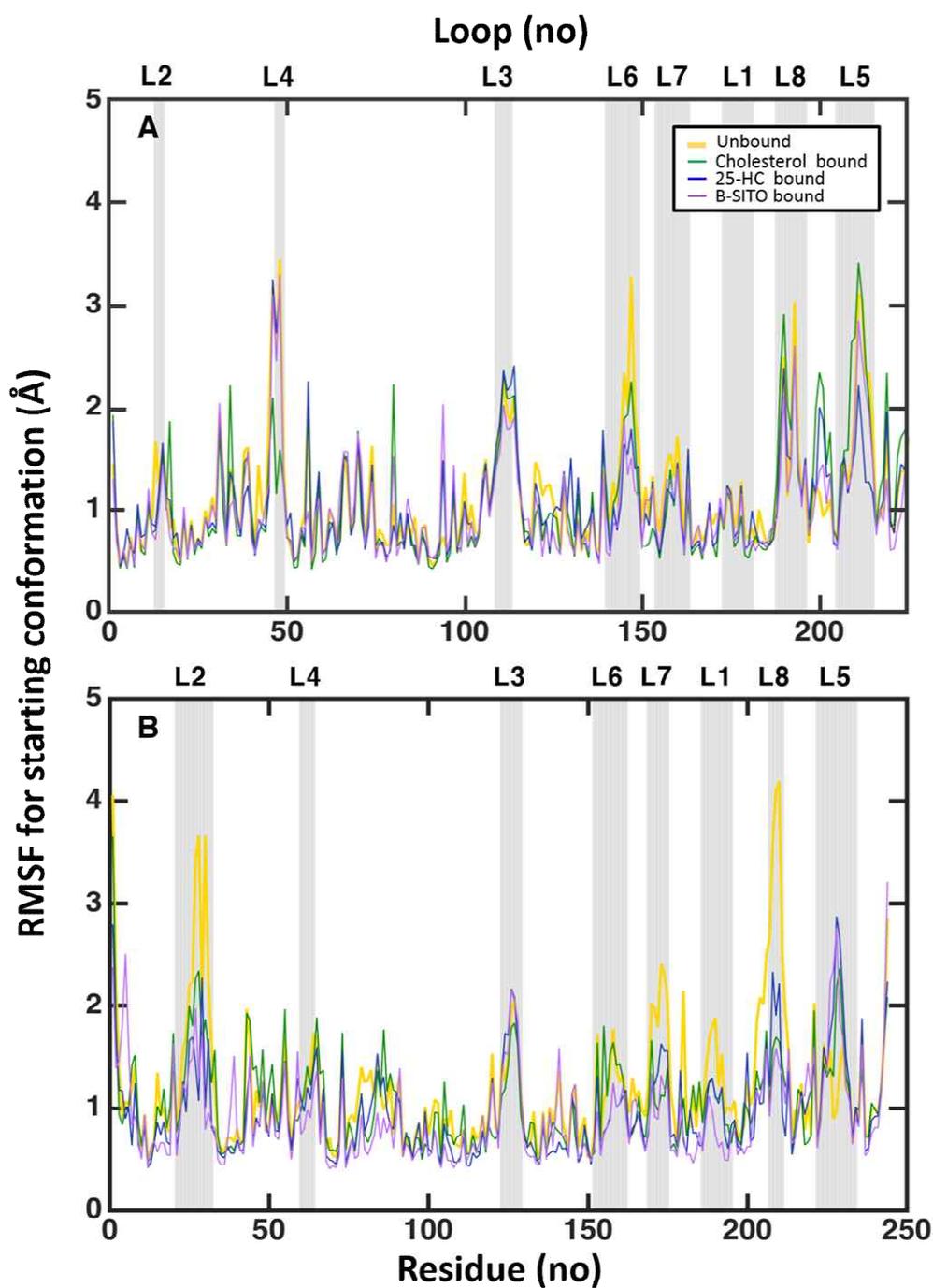
* L8 : Ala228~Gly232, 5 amino acids (α 9~)

또한 NPC1L1 NTD 콜레스테롤 결합구조에서 L6과 L8은 다른 리간드들의 결합구조에 비해 가장 큰 위치변화를 보였고 β -SITO, 25-HC의 결합구조 순으로 위치변화가 감소하였다. 한편, L5와 L8은 β -SITO 결합구조에서의 위치변화가 가장 컸다. 고리의 길이를 고려하여 각 고리들의 위치변화를 비교해보았더니, RMSD 값이 컸던 L8과 L2에서 가장 큰 위치변화가 나타났다.

즉, NPC1L1 NTD 결합구조는 여러 고리들에서 큰 위치변화를 나타내어 결합부위 근처의 L1, L2나 다른 고리들에서도 위치변화가 거의 없었던 NPC1 NTD와는 다른 결과를 보여, 이러한 고리의 위치변화 차이가 NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 결합구조에 차이가 있음을 시사하고 있었다.

4.2.3. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 고리에 위치한 잔기간의 위치변화

Table 4와 5에서 계산된 고리의 움직임은 각 구조의 고리간의 거리를 평균차이로 나타내므로 MD에 넣어준 초기구조에 대하여 시간의 흐름에 따라 잔기들이 움직이는 RMSD의 분포정도 또는 변화정도(fluctuation)와 같이 비교하는 것이 필요하다. MD simulation 초기의 위치와 시간에 따라 변화된 각 잔기들의 위치를 RMSF로 계산하여 그래프로 나타내었다(Figure 9). NPC1 NTD 비결합 구조는 L4, L6, L8, L5에서 초기구조에 비해 많이 움직였고, NPC1L1 NTD 비결합 구조는 N-말단, L2, L8에서 초기구조에 비해 많이 움직였다. L4는 NPC1 NTD와 β -SITO 결합구조를 제외한 모든 구조에서 잔기들의 움직임(flexibility)이 컸고, L6은 모든 리간드 결합구조에서 움직임이 감소했다. L8과 L5는 콜레스테롤 결합구조에서 다른 리간드 결합구조에 비해 움직임이 컸고, L2, L3, L1은 모든 구조에서 움직임의 차이가 없었다. 한편, NPC1L1의 경우 비결합 구조에 비해 리간드 결합구조의 움직임이 상대적으로 작았던 경우가 많았으며(L2, L7, L1, L8), L2부터 L4, α 1로 이어지는 부분에서 콜레스테롤 결합구조의 움직임이 가장 컸고, L6에서도 다른 리간드에 비해 상대적인 움직임이 있었다. L7부터 L1, L8, L5에 이르는 구간에서는 25-HC 결합구조가 다른 리간드에 비해 상대적인 움직임을 나타내었다. 즉, NPC1 NTD는 초기구조에 비해 결합전후에 잔기 움직임이 비슷했고, NPC1L1 NTD는 초기구조에 비해 결합전후에 잔기 움직임 차이가 커서 비결합 구조에서의 움직임이 결합구조에서 감소하였다.

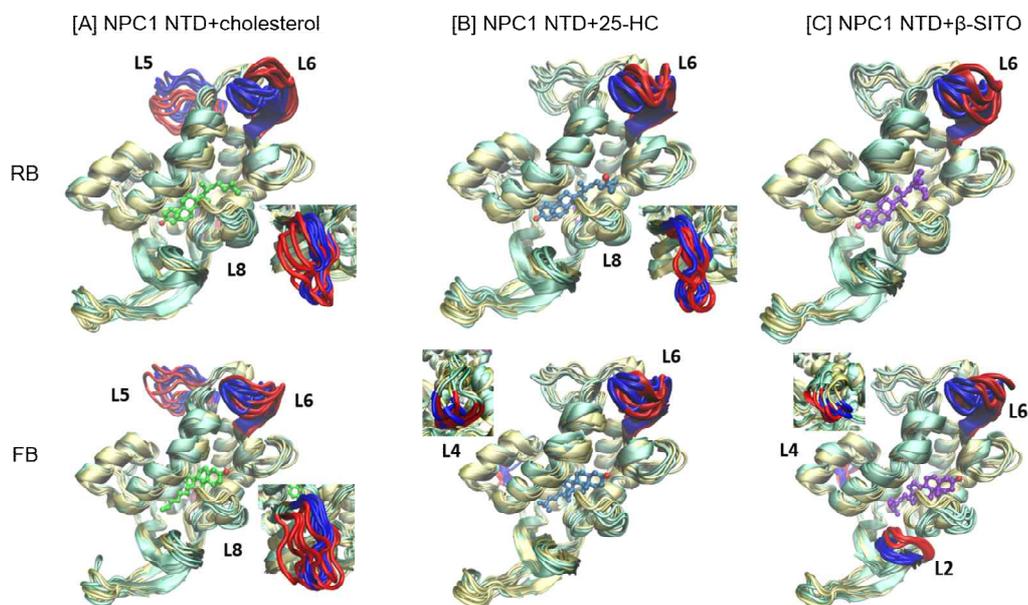


[Figure 9] The RMSF of each residue between ligand bound and unbound conformations for NPC1 NTD and NPC1L1 with cholesterol, 25-HC and β -SITO.

[A] NPC1 NTD complex, [B] NPC1L1 NTD complex. Unbound structure is shown in yellow bold line, cholesterol bound structure is shown in green line, 25-HC and β -SITO bound structures is shown in blue and purple lines.

4.2.4. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD 결합구조의 고리 위치변화

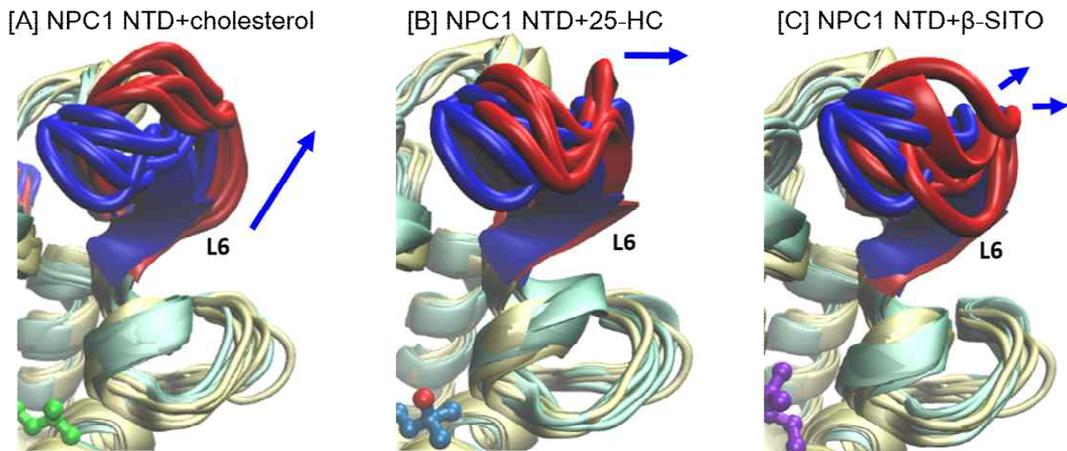
Figure 10은 NPC1 NTD 결합구조에서 일관적으로 위치변화가 있었던 고리들을 표시한 것으로 결합구조의 고리들은 빨간색으로, 여기에 상응하는 비결합 구조의 고리는 파란색으로 표시했다. 리간드가 결합하는 결합부위 근처의 L1이나 L2는 리간드 결합전후에 차이가 거의 없었고, 리간드 결합과는 관계가 적어보이는 위치의 L6이 모든 결합구조에서 공통적으로 위치가 변하였다. 결합부위 입구 반대편의 L5와 L8에서도 일부 유의미한 위치변화가 관찰되었다. 콜레스테롤 결합구조에서는 L5, L6, L8이 결합전후에 명확한 위치변화를 나타내었고, 25-HC나 β -SITO의 결합구조에서는 결합전후의 고리 위치변화가 상대적으로 감소했거나 없어졌다. RMSD(Table 4)에서 동일한 크기(1.2 Å)를 나타내었던 콜레스테롤과 25-HC 결합구조의 L6은 RMSF(Figure 9)나 움직인 방향(Figure 11)이 다른 경향을 나타내었고, L5는 콜레스테롤 결합구조에서만 크게 움직였다(Figure 12).



[Figure 10] The loop regions of NPC1 NTD which shows noticeable structural change after ligand binding for cholesterol, 25-HC and β -SITO.

[A], [B], [C] are MD results of NPC1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO.

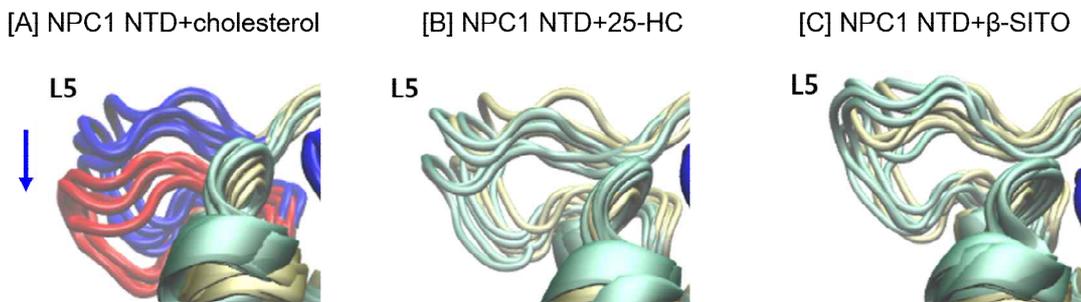
All proteins is shown in light blue(bound) and yellow (unbound) ribbons. The loop which RMSD is greater than 1 Å, is shown in red (bound) and blue (unbound). Docked ligands are cholesterol (green), 25-HC (dark blue), β -SITO (purple) from 50 ns conformations. Oxygen atoms of ligands are shown in red. Conformations only from simulation time at 40 ns, 42.5 ns, 45 ns, 47.5 ns, 50 ns are used for current drawing purpose. All pictures are drawn by VMD.



[Figure 11] Movement of L6 in complex of NPC1 NTD.

[A], [B], [C] are zoom in L6 region of RB structures in Figure 10.

All proteins are shown in light blue (bound) and yellow (unbound) ribbons. The L6 is shown in red (bound) and blue (unbound). Blue arrows represent direction of L6 change after cholesterol binding.



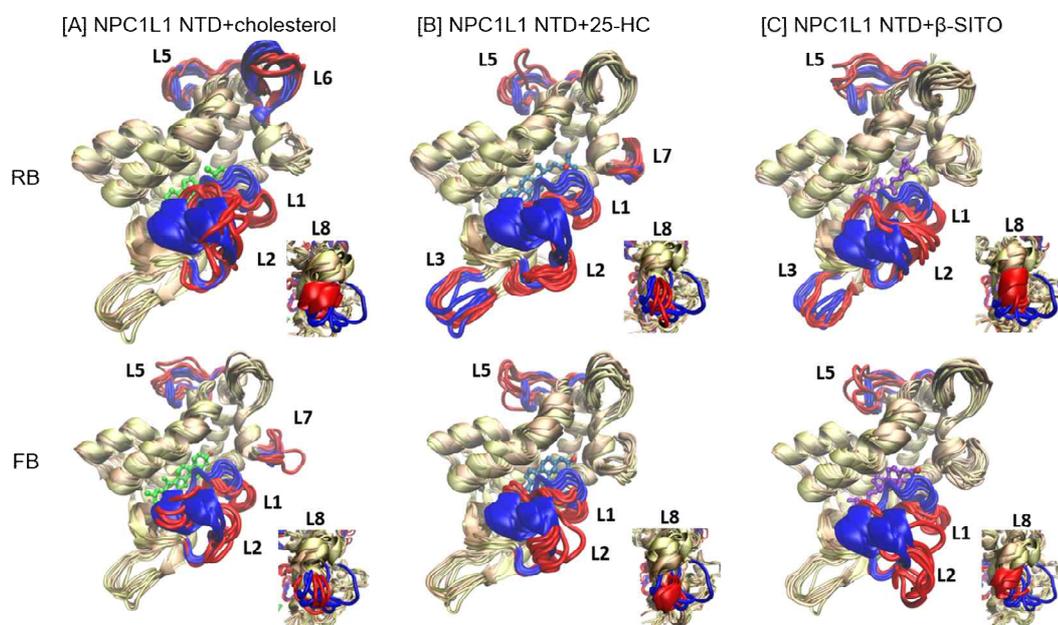
[Figure 12] Movement of L5 in complex of NPC1 NTD.

[A], [B], [C] are zoom in L5 region of RB structures in Figure 10.

All proteins are shown in light blue (bound) and yellow (unbound) ribbons. The L5 is shown in red (bound) and blue (unbound). Blue arrows represent direction of L5 change after cholesterol binding.

Figure 13은 NPC1L1 NTD의 결합전후에 고리 위치변화를 나타낸 것이다. 결합부위에 리간드가 결합함에 따라 결합부위 입구 근처의 L1과 L2의 위치변화가 크게 관찰되었다. 이는 NPC1 NTD의 결합구조에서는 관찰되지 않았던 것으로, NPC1 NTD와 달리 NPC1L1 NTD는 리간드와 결합을 한 후에 구조적인 변화가 있을 수 있다는 것을 시사해준다. 특히, L1의 움직임은 리간드 결합 후에 일관적으로 결합부위 바깥쪽으로 밀려난 모습이고 L2는 L1이 빠진 자리로 접근하는 모습을 보였다. 특히 L2는 RMSD(Table 5)에서 동일한 크기(2.6 Å)와 비슷한 RMSF(Figure 9)를 나타낸 반면, 콜레스테롤과 β-SITO 결합구조에서도 약간 위

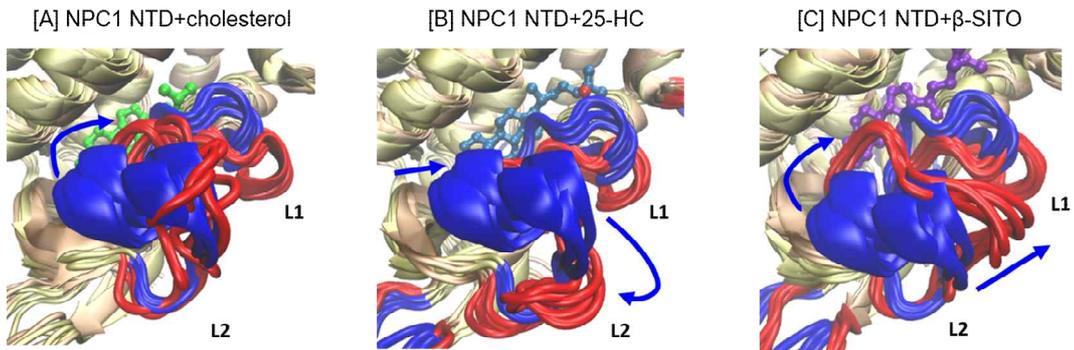
치가 달랐고, 25-HC 결합구조에서는 L2가 L1쪽으로 접근하지 않고 바깥쪽으로 밀려나 리간드별로 다 다른 모습을 나타내었다(Figure 14). 또한 결합부위와 거리가 먼 L5와 L8에서도 리간드 결합구조에서 일관적으로 위치변화가 나타났으며, L8의 경우 콜레스테롤과 β -SITO의 결합구조에서의 위치변화가 유사했다. 결합부위 입구의 위쪽에 위치한 L6은 콜레스테롤 결합구조에서만 상대적으로 큰 움직임을 보였고, β -SITO, 25-HC 결합구조 순으로 위치변화가 감소하여(Figure 15) L6 역시 리간드별 차이를 보였다. 전체적으로 콜레스테롤이나 β -SITO의 결합구조는 L2와 L6의 위치변화가 비슷했고, 25-HC 결합구조에서는 고리의 위치변화가 다른 방향 또는 다른 경향을 나타내었다.



[Figure 13] The loop regions of NPC1L1 NTD which shows noticeable structural change after ligand binding for cholesterol, 25-HC and β -SITO.

[A] MD results of NPC1L1 NTD and cholesterol, [B] MD results of NPC1L1 NTD and 25-HC, [C] MD results of NPC1L1 NTD and β -SITO.

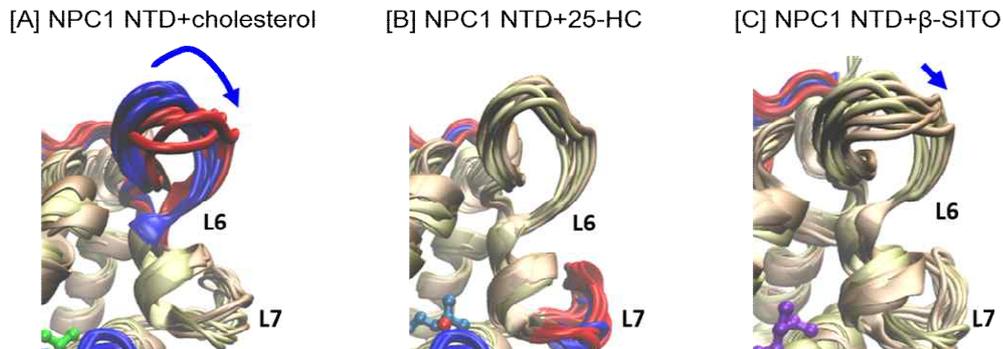
All proteins are shown in light orange (bound) and yellow (unbound) ribbons. The loop which RMSD is greater than 1 Å, is shown in red (bound) and blue (unbound). Docked ligands are cholesterol (green), 25-HC (dark blue), β -SITO (purple) from 50 ns conformations. Oxygen atoms of ligands are shown in red ball. Conformations only from simulation time at 40 ns, 42.5 ns, 45 ns, 47.5 ns, 50 ns are used for current drawing purpose.



[Figure 14] Movement of L2 in complex of NPC1L1 NTD.

[A], [B], [C] are zoom in L2 part of RB complexes in Figure 13.

All proteins are shown in light orange (bound) and yellow (unbound) ribbons. The L2 is shown in red (bound) and blue (unbound). Blue arrows represent direction of L2 change after cholesterol binding.



[Figure 15] Movement of L6 in complex of NPC1L1 NTD.

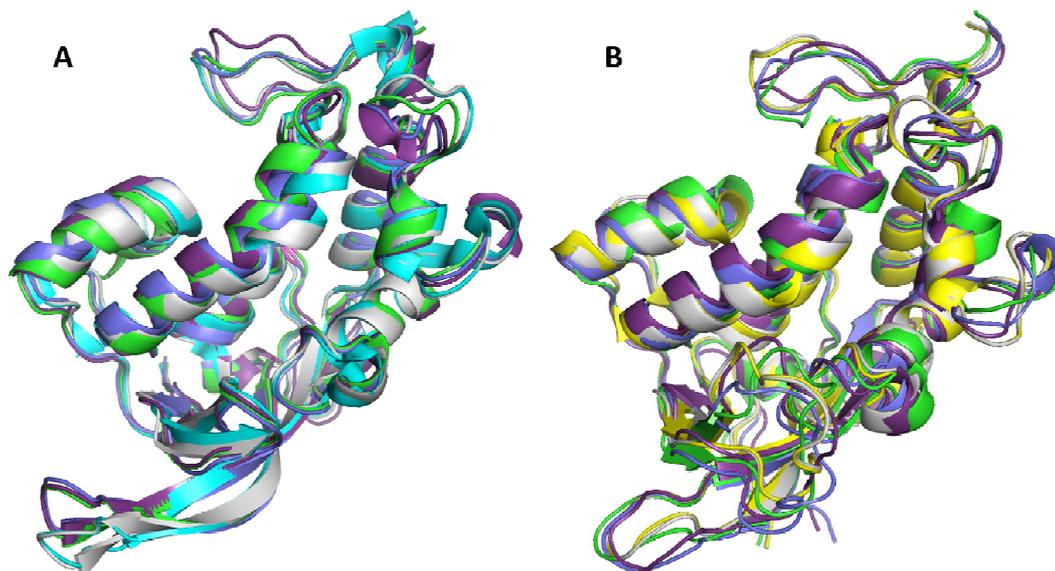
[A], [B], [C] are zoom in L6 part of RB complexes in Figure 13.

All proteins are shown in light orange (bound) and yellow (unbound) ribbons. The L6 is shown in red (bound) and blue (unbound). Blue arrows represent direction of L6 change after cholesterol binding.

4.2.5. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 리간드 결합전후 평균구조 변화

MD simulation으로 생성된 구조들의 집합에 대한 평균구조를 계산하여 그림으로 나타내었다(Figure 16). NPC1 NTD의 리간드 결합 전 구조는 실험에서 보고된 구조(PDB ID: 3GKH)에 비해 $\alpha 2$ 와 $\alpha 3$ 및 $\alpha 8$ 이 결합부위 안쪽으로 모아진 모습을 보였고 본 실험에서 관찰했던 8개의 고리들의 위치는 모두 3GKH와 일치하였다. 콜레스테롤 등 리간드결합구조들에서는 공통적으로 L3, L6에서 비결합구조와 다른 위치를 나타내었으며, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 8$ 등이 결합부위 바깥방향으로 밀려난 것도 관찰되었다. β -SITO가 결합한 경우 L5의 위치변화를 비롯하여 결합부

위 근처의 나선들이 가장 크게 바깥방향으로 밀려났다. 반면 25-HC는 결합부위 근처의 나선 위치변화($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 8$)가 다른 리간드에 비해 가장 작았다. 콜레스테롤이 결합한 경우는 오히려 $\alpha 7$ 이 약간 결합부위 안쪽으로 이동하였고, L4와 L6에서 다른 리간드들과는 다른 위치변화가 관찰되었다.



[Figure 16] The average structures of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD obtained from MD simulation.

[A] Average structures of NPC1 NTD, [B] Average structures of NPC1L1 NTD. Unbound conformation is shown in light grey ribbon and average structures of bound conformations are shown in green (cholesterol bound), blue (25-HC bound) and purple (β -SITO bound) ribbon, respectively. 3GKH and 3QNT are aligned with average structures and shown in cyan and yellow ribbon, respectively. All ligands in bound conformations are deleted.

NPC1L1 NTD의 비결합구조는 결합부위 근처의 $\alpha 2$ 와 $\alpha 3$ 및 $\alpha 8$ 이 실험에서 보고된 구조(PDB ID: 3QNT)와 비슷한 위치를 나타내었고, 본 실험에서 관찰했던 8개의 고리들의 위치도 모두 3QNT와 일치하였다. 콜레스테롤 등 리간드결합구조들에서는 공통적으로 L1, L2, L5, L6에서 비결합구조와 다른 위치를 나타내었으며, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 8$ 이 결합부위 바깥방향으로 밀려난 것도 관찰되었다. β -SITO가 결합한 경우 결합부위 근처의 $\alpha 2$ 와 $\alpha 3$ 이 가장 크게 바깥방향으로 밀려났다. 콜레스테롤이 결합한 경우는 NPC1 NTD와는 반대로 $\alpha 8$ 이 결합부위 바깥쪽으로 크게 이동하였다. L1은 25-HC나 β -SITO가 결합했을 때 L2쪽으로 내려왔고, 콜레스테롤이 결합했을 때는 결합부위 바깥방향으로도 이동했다. L2는 콜레스테롤

이나 β -SITO가 결합했을 때 L1 가까이로 위치가 변해 결합부위를 감싸는 형태를 나타내었다. 25-HC가 결합했을 때 L2는 결합부위를 덮지 못하고 L3방향으로 내려앉으면서 결합부위 바깥쪽으로 이동한 것이 관찰되었다.

전체적으로 NPC1 NTD에 비해 NPC1L1 NTD에서 리간드 결합 후 고리들의 위치변화가 크게 나타나 Table 4와 5의 RMSD 비교나 Figure 10과 13의 고리 위치변화와 일치하는 결과를 보였다.

4.2.6. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 소수성 결합부위에서의 잔기 위치변화

Figure S8~S13은 MD simulation의 50 ns 시점에서 NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD의 비결합구조와 각 리간드 결합구조에서 결합부위 근처에 있는 일부 잔기들의 위치변화를 나타낸 것이다. 이것은 MD simulation에서 한 순간에 관찰된 구조를 비교한 것으로 앞 절의 평균구조와는 약간의 차이가 있을 수 있다. NPC1 NTD와 콜레스테롤이 결합했을 때(Figure S8) 리간드와 인접한 부분, 특히 결합부위 입구 근처의 잔기들이 모두 바깥방향으로 약간씩 벌어져 입구를 넓혔다. 25-HC(Figure S9)나 β -SITO(Figure S10)가 결합했을 때는 추가된 수산기나 24-ethyl 기 같은 리간드의 형태 차이에 따라 콜레스테롤 결합구조에서 관찰된 고리나 α -나선의 위치 뿐 아니라 잔기의 방향도 조금씩 다르게 나타났다.

NPC1L1 NTD와 콜레스테롤이 결합했을 때 결합부위 입구 근처의 잔기들이 바깥방향으로 이동하여 입구를 넓힌 것을 볼 수 있다(Figure S11). 특히 Leu213(L1)과 Gln206(α 8)은 비결합구조에서는 결합부위 입구 안쪽을 막는 위치에 있었으나, 리간드와 결합으로 L1과 L2의 위치가 바뀌면서 잔기위치도 변경되었다. 한편 Ser102와 Ile105(α 3)과 Leu52(L2)는 결합구조를 형성한 후에 리간드 가까이에서 발견되어 다른 잔기들과 달리 리간드의 탄소고리 근처에서 결합부위를 좁게 만들었다. NPC1L1 NTD도 25-HC(Figure S12)나 β -SITO(Figure S13)가 결합했을 때는 리간드의 형태 차이에 따라 결합구조의 잔기방향이 다르게 나타났으며, 일부 잔기의 위치변화가 축소되었다.

NPC1이나 NPC1L1의 NTD에 있는 결합부위가 좁고 길기 때문에 리간드의 형태와 주변의 고리나 잔기의 위치변화가 연관될 가능성이 높아 보였다.

4.3. 결론 및 토론

4.3.1. NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD의 리간드 결합구조 비교

본 연구에서는 모델링에 의한 도킹과 분자동역학 모의실험을 통해 정적, 동적인 구조특성 비교를 통해 NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 결합구조에 있어서 유사점과 차이점을 관찰하였다. 분자도킹 결과, NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 결합구조는 NPC1 NTD나 다른 리간드 결합구조에 비해 상대적인 결합의 안정도가 낮았다. 분자동역학 모의실험 결과, NPC1L1 NTD가 콜레스테롤과 결합구조를 형성했을 때에 많은 고리들(L1, L2, L5, L6, L8)의 위치변화가 관찰되었으나 NPC1 NTD에서는 L5, L6, L8에서만 뚜렷한 위치변화가 관찰되었다. MD simulation은 50 ns이라는 짧은 시간동안 두 단백질의 결합구조를 비교한 것으로 더 긴 시간이 주어진다면 고리들의 위치변화가 달라질 가능성도 분명히 존재한다. 하지만 우리가 관찰한 고리 위치의 변화는 리간드 결합전후의 구조를 비교한 상대적인 수치이므로 객관적인 타당성이 있을 것으로 사료되며 이를 토대로 NPC1이나 NPC1L1의 NTD에서의 구조변화가 다른 도메인에 미치는 영향도 추정하였다. Kwon 등(2009)은 NPC1 NTD의 구조를 보고하면서 리간드 결합 전후의 RMSD 차이가 콜레스테롤과 결합할 경우 1.8 Å, 25-HC와 결합할 경우 1.6 Å으로 구조변화가 거의 없었다고 했다. 그러나 우리의 연구에서는 NPC1 NTD는 리간드와 결합전후에 $\alpha 3$, L1, $\alpha 8$ 에서 몇몇 잔기들의 위치가 변화하여 결합부위를 넓혔다. NPC1 NTD와 NPC2의 MD simulation을 시도한 Estiu 등(2013)도 콜레스테롤이 결합하지 않은 NPC1 NTD의 $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ 은 결합부위 안쪽으로 모아진 형태로 있다가, NPC2의 콜레스테롤의 3β -수산기가 NPC1 NTD의 결합부위 입구근처 잔기들과 일시적으로 수소결합을 형성하고 입구를 넓혀 NPC1 NTD로 콜레스테롤이 전달된 후에도 결합부위 내부가 확장되어 $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ 의 위치변화가 있었다고 보고하여 우리의 MD simulation 결과와 일치하는 모습을 보였다.

반면, NPC1L1 NTD는 모든 리간드와의 결합에서 결합부위 입구의 L1과 L2의 위치가 크게 바뀌어 리간드 결합전후의 구조변화에 가장 많이 기여했으며, 결합

부위 입구 안쪽(Phe205, Leu213)과 내부의 잔기들(I105, His124, Met188, Gln206)의 위치변화도 컸다. Zhang 등(2011)은 $\alpha 3$ 과 L1의 일부 잔기들에 돌연변이를 유도했을 때 NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 결합저해가 관찰되었다고 보고하였다. 특히 Leu216(L1)에서의 돌연변이는 콜레스테롤 결합저해에 미치는 영향이 가장 커서 NPC1L1 NTD의 L1에서의 위치변화는 콜레스테롤 등 리간드의 결합에 중대한 영향을 미칠 것으로 예상하였다. NPC1L1 NTD와 NPC1 NTD의 결합구조가 비슷할 것이라고 예측했던 Kwon 등(2011)도 두 단백질은 결합부위 입구 근처($\alpha 3$, $\alpha 7$, L1)의 아미노산 배열이 달라 이 부분에서 결합구조에 차이가 있을 수 있다고 언급했고, 우리도 바로 이 부분에서 가장 많은 위치변화를 관찰하였다. 콜레스테롤과 결합할 때 NPC2에 매우 의존적(Infante 등, 2008c)인 NPC1 NTD와는 달리 NPC1L1 NTD는 NPC2와 상호작용을 하지 않아(Dixit 등, 2007) 이러한 두 단백질의 리간드 결합기전에서의 차이가 NPC1L1 NTD 결합구조에서 관찰된 L1과 L2의 위치변화와 연관될 가능성을 추론할 수 있다.

4.3.2. NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 기능 및 내재화 기전

NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD의 결합부위는 비교적 좁은 편으로 보고되어(Kwon 등, 2009; 2011) 리간드의 독특한 형태가 결합부위 근처의 잔기나 고리의 동적변화에 영향을 미칠 가능성이 있다. 우리 연구에서 리간드의 종류에 따라 결합부위 주변의 구조변화가 달랐고, NPC1L1 NTD의 경우 NPC1 NTD에 비해 그 차이가 더욱 뚜렷하여 리간드별로 독특한 결합구조를 형성했다. 이 때문에 두 단백질은 결합구조 뿐 아니라 리간드와의 결합 이후에 이어지는 작용에 있어서도 차이가 있을 것으로 예측해볼 수 있다. 특히 리간드 종류에 따라 달라졌던 L2와 L6의 위치는 NPC1L1의 주요기능인 다량의 콜레스테롤 흡수와 관련이 있을 가능성이 제시되었다. 소장내 콜레스테롤은 50%가 흡수되므로 흡수효율이 상당히 높은 편(Davis 등, 2004)이며, 효율적인 면에서 NPC1L1 NTD는 다량의 콜레스테롤을 한 번에 흡수할 수 있는 내재화 기전을 주로 이용하는 것으로 추정되고 있다(Wang과 Song, 2012). NPC1L1의 내재화 개시능력은 콜레스테롤이 가장 컸으며 β -SIT0는 내재화 개시능력(Ge 등, 2011)이나 NPC1L1의 세포내 순환(Brown 등, 2007)에 미치는 영향이 미미했다. 또한 in vitro에서 25-HC나 27-HC

는 NPC1L1 NTD에 결합할 때 콜레스테롤과 경쟁한다고 보고한 Zhang 등(2011)은 NPC1L1과 flotillin들의 상호작용에 NTD가 필요하지 않지만 NTD에 콜레스테롤이 직접 결합하는 것이 NFC-microdomain 형성에 필수적이며, 25-HC 같은 옥시스테롤은 콜레스테롤이 NTD에 결합하는 것을 방해하여 NFC-microdomain 형성이나 NPC1L1 NTD의 내재화를 방해했다고 하였다. 이에 비추어보면 NPC1L1 NTD의 어느 부분(또는 부분들)이 내재화 개시에 직접적으로 관여하는지 파악하는 것은 이들 대사를 조절하거나 이해하는데 결정적인 단서를 제공해준다. 우리 연구에서 NPC1L1 NTD의 L2와 L6에서 관찰된 구조변화가 바로 이 역할을 담당할 수 있다는 것을 나타내며 이들이 다량의 콜레스테롤이나 NPC1L1의 내재화를 개시하는 신호로서 사용될 수 있을 것이라는 것을 예측할 수 있다. 이를 종합해볼 때, NPC1L1 NTD에 결합하는 리간드의 종류에 따라 독특한 L2와 L6의 위치변화가 나타났으므로, NFC-microdomain의 형성을 개시하는 NPC1L1 NTD 결합구조의 역할에 있어서 이 두 고리들의 위치가 리간드별 특이성을 반영할 가능성이 제시되었다.

한편, NPC1은 세포내에서의 콜레스테롤 유통에 어떻게 관여하는지는 아직 불분명하며 NPC1과 NPC2의 협력으로 내포 자체가 세포 내에서 순환하거나 이동하는 방식(Choudhury 등, 2002; Goldman과 Krise, 2010)이나 투과효소/전달효소(permease/transferase)로서 SSD를 통한 콜레스테롤의 운반(Ohgane 등, 2013) 등이 제시되고 있다. 우리 연구에서 NPC1 NTD는 리간드 결합전후의 구조변화가 NPC1L1 NTD에 비해 두드러지지 않았고, 리간드 종류에 따른 구조변화 차이도 뚜렷하지 않았다. 만약 L6의 위치변화가 단독으로 또는 다른 고리(L5나 L2)와 협력하여 NTD와 콜레스테롤 등의 내재화 개시에 관여한다면, L6의 움직임에 있어 리간드 간에 차이가 적었던 NPC1 NTD는 NPC1L1 NTD에 비해 리간드의 선택성(selectivity)을 뚜렷하게 나타내지 않을 가능성이 있으며, 이를 통해 NPC1 NTD는 내재화에 의존도 또는 이를 사용할 기회가 상대적으로 적을 가능성도 생각해볼 수 있을 것이다.

NPC1 NTD의 경우, 콜레스테롤 결합에 따라 위치가 변하는 고리가 L5와 L6로 NPC1L1 NTD와는 달라서 두 단백질이 아미노산 배열이나 3차구조가 매우 유사함에도 불구하고 서로 다른 형태의 구조변화(L5와 L6/L2와 L6)로 콜레스테롤 유

통에 대한 기능을 나타낼 가능성이 있다. 즉, 두 단백질은 결합구조 뿐 아니라 결합 후의 내재화 또는 기능발현을 위한 구조적 신호(변화)를 나타내는 고리의 위치도 다를 것으로 추정된다. 콜레스테롤 수송에 있어서 여러 경로가 존재하지만(Castro-Torres 등, 2014), 최소한 NTD와 콜레스테롤 결합으로 인해 연쇄적으로 진행되는 일련의 내재화과정에 대해 NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 작용에 차이가 있을 것으로 예상된다. 물론 여기서 다루는 부분은 NPC1L1의 나머지 구조에 대한 정확한 정보가 없는 상태에서의 한계가 분명히 있다. 하지만 NPC1과 NPC1L1은 신체 내에서 작용하는 장소가 다르며, 그에 따른 역할도 차이가 있을 가능성이 많으며, 결과적으로 콜레스테롤 수송에 있어서 서로 다른 기전을 사용할 가능성(필요)도 있어 이러한 우리의 추론을 뒷받침해준다.

4.3.3. 향후 연구방향

콜레스테롤과 결합 후 발생하는 NPC1L1 NTD의 구조변화는 다른 내강 도메인들에도 직접적인 영향을 미칠 가능성이 있으며, 이때 세포막의 콜레스테롤과 직접 작용할 수 있는 도메인 C나 I는 직접 또는 간접적으로 NTD의 구조변화에 영향을 받을 수 있도록 NTD와 인접한 위치에 존재해야 할 것이다. NPC1의 도메인 C는 에볼라 바이러스를 운반하는 당단백질과 직접 결합한다고 알려졌으며(Wang 등, 2016), Vanier(2014)도 NPC 환자의 1/3은 도메인 I에서 돌연변이를 가진다고 보고하여 NPC1이 정상적으로 기능하는 데에 있어서 도메인 I의 역할도 중요할 것으로 추정된다. 특히 최근에 보고된 NPC1의 전체 구조(Gong 등, 2016)에서도 도메인 C와 I는 상동구조를 나타내며 대칭적으로 교차되어 매우 밀접하게 위치해 있었고, NTD 역시 이 두 도메인들의 교차지점의 바로 위쪽에 붙어 있었다. NTD의 L5와 L6은 도메인 I와 C의 위쪽 고리들과 인접한 곳에 위치하고 있기 때문에, NPC1이 세포내에서 작용할 때 이들 도메인들과 NTD는 어떤 형태로든 상호작용을 할 것으로 예상할 수 있다. NPC1과 동일한 균 단백질(Davies 등, 2000b)인 NPC1L1도 이처럼 3개의 내강 도메인들이 비교적 근거리 에 위치하여 상호작용할 가능성을 제시할 수 있을 것이다. NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD 모두에서 내강 도메인들은 서로 간에 상호작용을 할 여지가 있으므로 향후 NTD와 리간드 결합에 영향을 받을 가능성이 있는 내강 도메인들 간

의 상호작용에 대한 연구가 이어진다면 NTD와 콜레스테롤의 결합으로 개시되는 내재화에 대한 이해도 증진될 수 있을 것이다.

콜레스테롤이 NPC1L1 NTD과 결합했을 때 NFC-microdomain의 내재화가 개시된다고 알려졌지만(Li 등, 2014), 이 결합 이후에 일어나는 현상에 대해 구체적인 내용은 아직 밝혀지지 않았다(Wang과 Song, 2012). 다만 세포막 안에서 flotillin들(Zhang 등, 2011) 외에 NPC1L1의 CTD(Li 등, 2014)도 세포막과 상호작용을 하고 있으며 내재화 단계에서 이 상호작용에 변화가 생기는데, 이러한 변화를 유도하는 데 있어서도 NTD가 관계되었다고 한다. 이를 종합해보면 NPC1L1 NTD에 리간드가 결합하는 것이 콜레스테롤 내재화의 첫 단계이므로, 이 결합이 어떤 형태로든 결합 후에 신호로서 작용하여 NPC1L1의 CTD나 flotillin들과 세포막의 상호작용에 영향을 미칠 것으로 예상되며, 우리 연구에서 관찰되었던 것처럼 NPC1L1 NTD의 L2와 L6이 위치변화를 통해 세포내의 다른 단백질들에게 신호를 주는 것으로 추정된다. 즉, 콜레스테롤을 포함한 리간드들이 단백질과 결합할 때 발생하는 결합구조의 변화, 또는 동적인 구조들의 집합은 단백질의 다른 도메인들이나 NTD의 구조변화를 인지하는 세포내외의 다른 단백질과 연결되는 신호로서 작용할 것으로 생각할 수 있을 것이다. 즉, NTD와 콜레스테롤의 결합은 NPC1L1의 내강도메인들 뿐 아니라 세포 내의 단백질들이나 CTD 등에도 영향을 미치므로 향후 이에 대한 구체적인 작용기전도 확인할 필요가 있다.

본 연구에서 리간드별로 결합전후의 구조변화가 달랐고, 25-HC가 콜레스테롤 내재화의 저해제로 작용한다는 사실을 고려해 볼 때 25-HC의 구조를 모방한 화합물은 NPC1L1 NTD의 L2, L6, L8의 위치변화를 콜레스테롤 결합구조에서 보이는 방향과는 다른 쪽으로 유도할 수 있어 효과적인 콜레스테롤 흡수저해제로 작용할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 우리의 연구결과는 NPC1L1 NTD와 콜레스테롤의 결합이 NPC1L1 단백질 전체에 구조적인 변화를 유도할 때 NTD의 어느 부분이 중요한 역할을 하는 지에 대한 정보를 제공하고 있다. 앞으로 NPC1L1 NTD의 결합구조에서 유의미한 위치변화를 나타내었던 L2나 L6 또는 L1이나 L8의 정확한 역할 확인을 위해 이들 고리부분에서의 돌연변이 생성(mutagenesis) 실험을 계획하고 있으며, 이를 통해 체내의 콜레스테롤 농도 조절

을 위한 신약의 개발에 이들 고리에 대한 정보를 활용할 수 있으리라 기대한다. 또한 현재까지는 NPC1에 비해 NPC1L1에 대한 돌연변이 생성실험이 많이 수행되지 않았으므로 향후 분자 모델링에 이들 고리에서의 돌연변이 생성을 유도하고, MD simulation을 통해 각각의 돌연변이들이 결합구조 형태변화에 미치는 영향을 확인한다면 결합구조별로 차이가 있었던 고리의 역할에 대한 구체적인 이해가 가능할 것으로 사료된다.

5. 요약

본 연구에서는 체내의 콜레스테롤 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 군단백질인 NPC1L1의 NTD와 NPC1 NTD의 결합구조를 비교함으로써 아직 실험적으로 보고되지 않은 NPC1L1 NTD과 콜레스테롤 결합구조를 모델링하고, 콜레스테롤 유통에 중요한 역할을 하는 이들의 결합구조를 NPC1 NTD와의 비교분석을 통해 유추하고자 한다. AutoDock 4.2 프로그램을 사용하여 두 가지 단백질 즉, NPC1L1 NTD(PDB ID: 3QNT)와 NPC1 NTD(PDB ID: 3GKH)에 각각 다른 특성을 가지고 결합한다고 알려진 3 가지 리간드(콜레스테롤, 25-HC, β -SITO)에 대해 모델링을 통한 도킹을 시도하여 열역학적으로 가장 안정한 결합구조를 예측하였다. 결합구조가 알려진 3GKI와 3GKJ에서 각각의 리간드를 분리하여 콜레스테롤과 25-HC의 초기 리간드로 사용했고, β -SITO는 Spartan'10 프로그램으로 만들어 사용하였다. 모델링은 비극성원자까지 포함한 전원자수준(all-atom level)으로 진행하였고 이면각회전이 가능한 비틀림 부위가 콜레스테롤에 6개, 25-HC와 β -SITO에는 각각 7개로, 최대한 많은 결합이 회전할 수 있도록 모두 Active torsion으로 지정하였다. 그리드 상자의 크기는 NPC1 및 NPC1L1의 NTD에 있는 소수성 결합부위를 충분히 둘러쌀 수 있도록 60×60×60으로, 그리드 상자의 중심좌표는 $x = -17.0$, $y = -29.0$, $z = -18.0$ 으로 지정하고 도킹 결과가 일관성 있게 도출되도록 도킹시도 횟수는 500회로 변경하였으나 나머지는 도킹 프로그램의 기본 값을 그대로 사용했다. 모든 도킹은 Rigid receptor 도킹과 Flexible receptor 도킹의 두 가지 조건에서 수행되었고 Flexible receptor 조건에서는 최대 9개의 잔기들에 유연성이 부여되었다. 도킹 결과, 3 가지 리간드 모두 NPC1 NTD나 NPC1L1 NTD와 소수성 결합부위 내에서 결합했으며 실험적으로 보고되었던 NPC1 NTD 결합구조(PDB ID: 3GKI, 3GKJ)와 동일한 방향(RB 방향)으로 결합했을 때, 결합에너지(ΔG)와 K_i 가 가장 낮게 나타났다. 한편, 리간드 종류에 따른 도킹 퍼센트는 콜레스테롤, 25-HC, β -SITO 순으로 낮았으며, 최적결합구

조의 결합에너지(ΔG)는 β -SITO, 25-HC, 콜레스테롤, 또는 25-HC, 콜레스테롤, β -SITO 순으로 낮았다. 즉, 리간드 종류에 따른 결합구조의 특성이 두 단백질에서 다르게 나타났고, 전반적으로 NPC1 NTD에 비해 NPC1L1 NTD와 리간드 결합의 안정성이 떨어지는 경향을 보여 두 단백질이 서로 다른 결합구조를 가질 여지가 있는 것으로 추정되었다.

다음으로 분자동역학실험에서 얻은 결합구조 중에서 가장 결합에너지가 낮았던 최적결합구조를 가지고 주기적 경계조건 하에서 GROMACS 4.6.5를 이용한 분자동역학 모의실험을 실시하였다. 각 단백질은 수소원자를 첨가한 후 Amber03 Force field를 사용하여 topology를 생성하였고 리간드의 topology는 Antechamber를 사용하여 생성하였다. 또한, 모의실험 상자는 12면체를 사용하였으며, 그 안에서 단백질과 리간드를 결합시키고 수용액을 추가하여 TIP3P 물분자 모의실험 상자를 형성하였다. 시스템은 NVT 앙상블에서 0.0 K에서 300.0 K가 될 때까지 200 ps 동안 1 bar 하에서 가열되었고 MD simulation은 2 fs의 간격으로 50 ns 동안 수행되었으며, 궤적은 2 ps마다, 에너지의 좌표들은 매 0.4 ps마다 저장되었다. 0에서 50 ns사이에 생성된 결합구조들이 시간의 흐름에 따라 분포가 안정해졌는지 확인하기 위해 실험적으로 보고된 비결합 구조(NPC1 NTD, 3GKI; NPC1L1 NTD, 3QNT)에 대한 원자간 거리의 RMSD로 그래프를 그려 확인하였다. MD simulation에서 일정한 구조분포를 이룬 상태에서 비결합과 결합구조 각각 100개씩을 선발하여 동일한 위치의 고리들 간의 거리를 RMSD의 평균값으로 나타내었으며, 초기의 위치에 대하여 시간에 따라 변화된 각 잔기들의 거리를 RMSF로 계산하여 그래프로 나타내어 비교하였다. 또한 40부터 50 ns 사이에 구조 5개씩을 선발하여 총 8군데 고리들에서 리간드 결합 후의 위치변화를 비교했다. 여기서도 도킹 결과에서 나타난 두 단백질의 결합구조 차이가 동일하게 관찰되었는데, NPC1 NTD는 콜레스테롤과 결합할 때 L5(1.1 Å)와 L6(1.2 Å)에서만 위치변화가 있었으나, NPC1L1 NTD는 콜레스테롤과 결합할 때 L1(1.1 Å)과 L2(2.6 Å), L5(1.3 Å), L6(1.2 Å), L8(1.5 Å)에서 위치변화가 있어 NPC1 NTD와 NPC1L1 NTD의 결합구조가 서로 다름을 시사했다. NPC1 NTD의 결합구조에서는 리간드 결합부위와 먼 L5, L6에서 리간드별로 큰 위치변화가 관찰되었고 반면, NPC1L1 NTD는 결합부위 입구의 L1과 L2가 크게

움직여 리간드 결합전후의 구조변화에 크게 기여했고, 다른 고리들의 위치변화도 컸다.

본 연구 결과, NPC1L1 NTD의 L1과 L2는 콜레스테롤 등 리간드의 결합과 관련이 있을 것으로 예상되었고 NPC1L1 NTD는 NPC2와의 상호작용과 같은 결합기전에서 NPC1 NTD와는 차이가 있어 이러한 차이가 L1과 L2에서의 뚜렷한 위치변화와 연관될 가능성이 있다. NPC1L1 NTD는 리간드 종류에 따라 L2와 L6의 위치가 달랐으며, 콜레스테롤 결합구조에서 보인 L2와 L6의 위치변화가 다량의 콜레스테롤을 수송하는 내재화를 개시하는 NPC1L1 NTD의 구조적인 변화로 추정되었다. 결합된 리간드 종류에 따라 독특한 위치변화를 나타내었던 NPC1의 L5와 L6은 다른 내강 도메인들(C와 I)과 인접해있어 이들의 위치변화를 통해 NTD의 리간드 결합이 다른 내강 도메인에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 제시되었다. 즉, NPC1 NTD과 NPC1L1 NTD는 결합구조가 다르며, 리간드별 독특한 위치변화를 나타낸 고리도 달라 두 단백질은 결합구조 뿐 아니라 결합기전이나 결합 후의 작용에도 차이가 있을 가능성이 있어보였다. NPC1L1도 NPC1처럼 도메인 C와 I, NTD가 비교적 근거리에 위치하여 내강 도메인들 간의 상호작용이 NPC1L1의 기능에 반영될 여지가 있을 것으로 예상된다. 콜레스테롤의 내재화 경로에 대한 NPC1L1 NTD의 구조변화가 NPC1 NTD와는 다른 방식으로 다른 도메인들 또는 전체 단백질 구조에 영향을 미칠 것이므로 본 연구에서 위치변화가 관찰된 주요 고리들에 대한 돌연변이 생성실험으로 내강 도메인들 간의 상호작용에 미치는 영향이 확인된다면 NPC1L1에 의한 콜레스테롤 수송에 대한 이해를 증진시킬 수 있으리라 기대한다.

ABSTRACT

Niemann–Pick type C1 like 1(NPC1L1) is a membrane protein that is expressed in brush border membrane of small intestine and canalicular membrane of liver. It mediates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol re-absorption. As a Niemann–Pick type C(NPC) family protein, it has sequence homology and conformational similarity with Niemann–Pick type C1(NPC1). Like NPC1, NPC1L1 has N-terminal domain(NTD) including hydrophobic binding pocket which directly binds with cholesterol. Due to their conformational similarities in NTD hydrophobic pockets, it is believed that both NPC1L1 NTD and NPC1 NTD have similar binding mode with cholesterol. Unlike NPC1 NTD the experimental structure of NPC1L1 NTD in complex with cholesterol is not available.

In this study, the structure of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD in complex with cholesterol and its derivatives are compared using computational modeling, i.e, molecular docking and molecular dynamics(MD) simulation. We have employed AutoDock ver. 4.2 to obtain the binding structures. For cholesterol, 25-HC, and β -SITO, the resulting complex structures show stable binding modes in the hydrophobic pocket of both NPC1 NTD and NPC1L1 NTD. And all ligands have the same orientation as observed in crystal structure of NPC1 NTD cholesterol complex. However, there are subtle differences in binding modes between these complexes, especially between NPC1 NTD complexes and NPC1L1 NTD complexes due to the difference in detailed sequence and ligand structure. It is also observed that the binding free energy with NPC1 NTD is more stable than that of NPC1L1 NTD for all three ligands. To further understand their structural differences as a collection of dynamical ensemble structures rather than static structure, we

have performed the molecular dynamics (MD) simulations with GROMACS ver. 4.6.5. The MD simulations are started from both bound and unbound structures for each of NPC1 NTD and NPC1L1 NTD with three ligands, resulting in six independent MD simulations. Analysis of the 50 ns MD trajectories indicates there is difference in loop region L6 after binding with ligand for NPC1 NTD. Meanwhile for NPC1L1 NTD, loop L1, L2, L5, and L8, especially L1 and L2, show structural change after ligand binding. And L2 and L6 shows noticeable structural change after only cholesterol binding for NPC1L1 NTD.

The current study indicates that for cholesterol between NPC1 NTD and NPC1L1 NTD, there is difference not only in detailed binding modes but also the loop structure after binding. The structural change after binding with ligand could play as a signal for a series of subsequent events. Very recently, the whole structure of NPC1 is reported and its luminal domains are in close contact. Therefore, this modeling study suggest that there could be difference in cholesterol internalization pathway between NPC1 and NPC1L1, especially the initiation step right after cholesterol binding to NTD. We believe the current study can improve our understanding of cholesterol transportation in NPC1L1 and NPC1 from structural perspective. For example, the loop region L2 and L6 we have identified here for NPC1L1 NTD could serve as a target sequences for further mutagenesis study in internalization of cholesterol and its derivatives.

참고문헌

- Adams CM1, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem.* (2004) 279(50): 52772-52780
- Alfin-Slater RB, Aftergood L. *Lipids*. R.S. Goodhart, M.E. Shils (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* (6th ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, PA (1980) 113-141
- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science* (2004) 303(5661): 1201-1204
- Babuke T, Ruonala M, Meister M, Amarddii M, Genzler C, Esposito A, Tikkanen R. Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cell Signal.* (2009) 21(8): 1287-1297
- Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* (1986) 232:34-47
- Brown JM, Rudel LL, Yu L. NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) mediates sterol-specific unidirectional transport of non-esterified cholesterol in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Biochem J.* (2007) 406(2): 273-283
- Butler JD, Blanchette-Mackie J, Goldin E, O'Neill RR, Carstea G, Roff CF, Patterson MC, Patel S, Comly ME, Cooney A, Vanier MT, Brady RO, Pentchev PG. Progesterone blocks cholesterol translocation from lysosomes. *J Biol Chem.* (1992) 267(33): 23797-23805
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH,

Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. (1997) 277: 228-231

Castro-Torres IG, la O-Arciniega MD, Bravo-Duarte GA, Gallegos-Estudillo J, Dominguez-Ortiz MA, Martinez-Vazquez M. Intestinal and hepatic Niemann-Pick C1L1 proteins: Future therapeutic target for cholesterol gallstones disease? *Euro J Pharmacol* (2014) 728: 77-81

Cenedella RJ. Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiology process. *Lipids*. (2009) 44: 477-487

Chang TY and Chang C. Ezetimibe blocks internalization of the NPC1L1/cholesterol complex. *Cell Metab* (2008) 7(6): 469-471

Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin Invest*. (2002) 109(12): 1541-1550

Coleman EM, Walker TN, Hildreth JE. Loss of Niemann Pick type C proteins 1 and 2 greatly enhances HIV infectivity and is associated with accumulation of HIV Gag and cholesterol in late endosomes/lysosomes. *Virology*. (2012) 9:31

Coxey RA, Pentchev PG, Campbell G, Blanchette-Mackie EJ. Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res*. (1993) 34(7): 1165-1176

Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method

for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* (1993) 98: 10089-10092

Das A, Brown MS, Anderson DD, Goldstein JL, Radhakrishnan A. Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *eLife* (2014) 3: e02882

Davis HR, Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* (2004) 279: 33586-33592

Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* (2000a) 290(5500): 2295-2298

Davies JP and Ioannou YA. Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem*. (2000) 275(32): 24367-24374

Davies JP, Levy B, Ioannou YA. Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family : identification and characterization of NPC1L1. *Genomics*. (2000b) 65(2): 137-145

DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res*. (2008) 18: 609-621

Deffieu MS and Pfeffer SR. Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2011) 108(47): 18932-18936

Del Campo JA, Rojas Á, Romero-Gómez M. Entry of hepatitis C virus into the cell: a therapeutic target. *World J Gastroenterol*. (2012) 18(33): 4481-4485

- Denis M, Landry YD, Zha X. ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *J Biol Chem.* (2008) 283(23): 16178-16186
- Dietschy JM and Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* (2004) 45: 1375-1397
- Dixit SS, Sleat DE, Stock AM, Lobel P. Do mammalian NPC1 and NPC2 play a role in intestinal cholesterol absorption? *Biochem J.* (2007) 408: 1-5
- Du X, Kumar J, Ferguson C, Schulz TA, Ong YS, Hong W, Prinz WA, Parton RG, Brown AJ, Yang H. A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J Cell Biol.* (2011) 192(1): 121-135
- Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T, Caldwell J, Wang J, Kollman P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem.* (2003) (16): 1999-2012
- Elghobashi-Meinhardt N. Niemann - Pick type C Disease: a QM, MM study of conformational changes in cholesterol in the NPC1(NTD) and NPC2 binding pockets. *Biochemistry.* (2014) 53(41): 6603-6614
- Estiu G, Khatri N, Wiest O. Computational studies of the cholesterol transport between NPC2 and the N-terminal domain of NPC1 (NPC1(NTD)) *Biochemistry.* (2013) 52(39): 6879-6891
- Fletcher R and Powell MJD. A rapidly convergent descent method for minimization. *Comput J.* (1963) 6(2): 163-168
- Friedland N, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann - Pick type C2 disease, *Proc Natl Acad Sci*

USA. 100 (2003) 2512-2517

Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, Li BL, Song BL. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab.* (2008) 7(6): 508-519

Ge L, Qi W, Wang LJ, Miao HH, Qu YX, Li BL, Song BL. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108(2): 551-556

Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* (2006) 8(1): 46-54

Goldman SD and Krise JP. Niemann-Pick C1 functions independently of Niemann-Pick C2 in the initial stage of retrograde transport of membrane-impermeable lysosomal cargo. *J Biol Chem.* (2010) 285(7): 4983-4994

Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* (2006) 124: 35-46

Gong X, Qian H, Zhou X, Wu J, Wan T, Cao P, Huang W, Zhao X, Wang X, Wang P, Shi Y, Gao GF, Zhou Q, Yan N. Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection. *Cell.* (2016) 165(6): 1467-1478

Hui DY and Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol.* (2005) 16(2): 183-192

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* (1996) 14(1): 33-38

Hunt CL, Lennemann NJ, Maury W. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world. *Viruses.* (2012) 4(2): 258-275

Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev*

Mol Cell Biol. (2008) 9: 125-138

Infante RE, Abi-Mosleh L, Radhakrishnan A, Dale JD, Brown MS and Goldstein JL. Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein. J Biol Chem (2008a) 283(2): 1052-1063

Infante RE, Radhakrishnan A, Abi-Mosleh L, Kinch LN, Wang ML, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS. Purified NPC1 protein II. localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. J Biol Chem (2008b) 283(2): 1064-1075

Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. Proc Natl Acad Sci USA. (2008c) 105(40): 15287-92

Ioannou YA. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. Nat Rev Mol Cell Biol. (2001) 2: 657-668

Iyer SP, Yao X, Crona JH, Hoos LM, Tetzloff G, Davis HR, Jr, Graziano MP, Altmann SW. Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein. Biochim Biophys Acta (2005) 1722: 282-292

Jelinek D, Heidenreich RA, Orlando RA, Garver WS. The Niemann-Pick C1 and caveolin-1 proteins interact to modulate efflux of low density lipoprotein-derived cholesterol from late endocytic compartments. J Mol Biochem. (2014) 3(1): 14-26

Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J Chem Phys. (1983) 79: 926-935

Kennedy BE, Charman M, Karten B. Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria

without interacting with NPC1. *J Lipid Res.* (2012) 53(12): 2632-2642

Ko DC, Binkley J, Sidow A, Scott MP. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2003) 100: 2518-2525

Ko DC, Gordon MD, Jin JY, Scott MP. Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol Biol Cell.* (2001) 12(3): 601-614

Krishnan A, Miller EH, Herbert AS, Ng M, Ndungo E, Whelan SP, Dye JM, Chandran K. Niemann-Pick C1 (NPC1)/NPC1-like1 chimeras define sequences critical for NPC1's function as a flavivirus entry receptor. *Viruses.* (2012) 4(11): 2471-2484

Kwon HJ, Abi-Mosleh LA, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, Infante RE. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* (2009) 137: 1213-1224

Kwon HJ, Palnitkar M, Deisenhofer J. The structure of the NPC1L1 N-terminal domain in a closed conformation. *PLoS one* (2011) e18722, 6(4): 1-7

Lee AG. Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends Biochem Sci.* (2011) 36(9): 493-500

Lee AG. Ca²⁺-ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism, helix-helix and helix-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta.* (2002) 1565(2): 246-266

Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* (2004) 1666(1-2): 62-87

Li PS, Fu ZY, Zhang YY, Zhang JH, Xu CQ, Ma YT, Li BL, Song BL. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through

dynamic interaction with NPC1L1. *Nat Med.* (2014) 20(1): 80–86

Liscum L and Faust JR. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem.* (1989) 264(20): 11796–11806

Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, Gu JZ, Cummings C, Brown A, Ellison J, Ohno K, Rosenfeld MA, Tagle DA, Pentchev PG, Pavan WJ, Murine model of Niemann–Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. (1997) *Science* 277: 232–235

Lu F, Liang Q, Abi-Mosleh L, Das A, De Brabander JK, Goldstein JL, Brown MS. Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *Elife.* (2015) 4: e12177

Miller EH, Obernosterer G, Raaben M, Herbert AS, Deffieu MS, Krishnan A, Ndungo E, Sandesara RG, Carette JE, Kuehne AI, Ruthel G, Pfeffer SR, Dye JM, Whelan SP, Brummelkamp TR, Chandran K. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J.* (2012) 31: 1947–1960

Mingo RM, Simmons JA, Shoemaker CJ, Nelson EA, Schornberg KL, D'Souza RS, Casanova JE, White JM. Ebola virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1+ endolysosomes is a rate-defining step. *J Virol.* (2015) 89(5): 2931–2943

Mukherjee S, Zha X, Tabas I, Maxfield FR. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys J.* (1998) 75(4): 1915–1925

Morris GM, Goodsell DS, Pique ME, Lindstrom WL, Huey R, Forli S, Hart WE, Halliday S, Belew R, Olson AJ. “User guide for AutoDock version 4.2: Automated docking of flexible ligands to flexible receptors” (2012) <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/Auto>

Dock4.2_UserGuide.pdf/

- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem.* (1998) 19: 1639 - 1662
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* (2009) 30(16): 2785-2791
- Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics.* (2008) 8(8): bi0814s24
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science.* (2000) 290: 2298-2301
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss III JF, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ, The Niemann - Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem.* (1999) 274: 9627-9635
- Ohgami N, Ko DC, Thomas M, Scott MP, Chang CC, Chang TY. Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2004) 101(34): 12473-12478
- Ohgane K, Karaki F, Dodo K, Hashimoto Y. Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem Biol.* (2013) 20(3): 391-402
- Ohsaki Y, Sugimoto Y, Suzuki M, Hosokawa H, Yoshimori T, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H. Cholesterol depletion

- facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4. *J Cell Sci.* (2006) 119: 2643-2653
- Osborne TF and Rosenfeld JM. Related membrane domains in proteins of sterol sensing and cell signaling provide a glimpse of treasures still buried within the dynamic realm of intracellular metabolic regulation. *Curr Opin Lipidol.* (1998) 9(2): 137-140
- Othman RA, Myrie SB, Jones PJ. Non-cholesterol sterols and cholesterol metabolism in sitosterolemia. *Atherosclerosis.* (2013) 231(2): 291-299
- Peake KB and Vance JE. Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FERS lett* (2010) 584: 2731-2739
- Poirier S, Mayer G, Murphy SR, Garver WS, Chang TY, Schu P, Seidah NG. The cytosolic adaptor AP-1A is essential for the trafficking and function of Niemann-Pick type C proteins. *Traffic.* (2013) 14(4):458-469
- Portincasa P and Wang DQ. Intestinal absorption, hepatic synthesis and biliary secretion of cholesterol: Where are we for cholesterol gallstone formation? *Hepatology* (2012) 55(5): 1313-1316
- Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: Mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* (2004) 15: 259-268
- Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med.* (2012) 18(2): 281-285
- Simons K and Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* (1997) 387(5): 569-572
- Sousa da Silva AW and Vranken WF. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res Notes.* (2012) 5: 367

- Steck TL, Ye J, Lange Y. Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophys J.* (2002) 83(4): 2118-2125
- Storch J and Xu Z. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta.* (2009) 1791(7): 671-678
- Suchy D, Łabuzek K, Stadnicki A, Okopień B. Ezetimibe, a new approach in hypercholesterolemia management. *Pharmacol Rep.* (2011) 63: 1335-1348
- Tang Y, Leao IC, Coleman EM, Broughton RS, Hildreth JE. Deficiency of niemann-pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J Virol.* (2009) 83(16): 7982-7995
- Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol.* (1999) 1(1):107-25
- Turley SD and Dietschy JM. Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol* (2003) 14: 233-240
- van der Kant R, Zondervan I, Janssen L, Neefjes J. Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *J Lipid Res.* (2013) 54(8): 2153-2165
- van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* (2005) 26(16): 1701-1718
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2008) 9(2): 112-124
- Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* (2010) 5: 16

- Vanier MT. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type-C. *J Inherit Metab Dis.* (2014) 38(1): 187-199
- von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol.* (2005) 96(1A): 10D-14D
- Wang J, Chu BB, Ge L, Li BL, Yan Y, Song BL. Membrane topology of human NPC1L1, a key protein in enterohepatic cholesterol absorption. *J Lipid Res.* (2009) 50(8): 1653-1662
- Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metabol.* (2010) 12: 166-173
- Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, Gao GF. Ebola viral glycoprotein bound to its endosomal receptor Niemann-Pick C1. *Cell* (2016) 164: 258-268
- Wang LJ and Song BL. Niemann-Pick C1-like 1 and cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta* (2012) 1821: 964-972
- Weinglass AB, Kohler M, Schulte U, Liu J, Nketiah EO, Thomas A, Schmalhofer W, Williams B, Bildl W, McMasters DR, Dai K, Beers L, McCann ME, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008) 105(32): 11140-11145
- Wüstner D and Solanko K. How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport. *Biochim Biophys Acta.* (2015) 1848(9): 1908-1926
- Xie C, Turley SD, Pentchev PG, Dietschy JM. Cholesterol balance and metabolism in mice with loss of function of Niemann-Pick C protein. *Am J Physiol* (1999) 276: E336-E344
- Xie X, Brown MS, Shelton JM, Richardson JA, Goldstein JL, Liang G. Amino

acid substitution in NPC1 that abolishes cholesterol binding reproduces phenotype of complete NPC1 deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2011) 108(37): 15330-15335

Xu S, Benoff B, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *J Biol Chem*. (2007) 282(32): 23525-23531

Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. (2007) 320(2): 559-564

Yu L, Bharadwaj S, Brown MJ, Ma Y, Du W, Davis MA, Michaely P, Liu P, Willingham MC, Rudel LL. Cholesterol-regulated Translocation of NPC1L1 to the Cell Surface Facilitates Free Cholesterol Uptake. *J Bio Chem* (2006) 281(10): 6616-6624

Zhang M, Dwyer NK, Neufeld EB, Love DC, Cooney A, Comly M, Patel S, Watari H, Strauss 3rd JF, Pentchev PG, Hanover JA, Blanchette-Mackie EJ. Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in Niemann-pick C1 late endosomes. *J Biol Chem*. (2001) 276: 3417-3425

Zhang JH, Ge L, Qi W, Zhang L, Miao HH, Li BL, Yang M, Song BL. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J Biol Chem*. (2011) 286(28): 25088-25097

부록 1. Supplementary Data

[Table S1. Molecular docking results of NPC1 NTD with cholesterol]

try No	condition	flexible residues of receptor	reference-like binding cluster		flipped binding cluster		total docked percent (%)	RB docked percent (%)	entropy for this clustering	best model of docked conformations (lowest binding E)	
		(number of Flexible residues)	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs				free Energy of binding (kcal/mol)	Ki (inhibition constant)
1	rigid receptor	–	–13.44	499	–11.79	1	100.0	99.8	0.0	–13.65	99.15 pM
2		Asn41/Gln79 (2)	–13.43	376	–11.85	124	100.0	75.2	0.1	–14.53	22.17 pM
3	flexible receptor	Asn41/Gln79/Leu89 (3)	–14.75	364	–11.80	135	99.8	72.8	0.11	–14.75	15.30 pM
4		Glu30/Asp37/Lys38/ Asn41/Gln79/Thr82/ Asn86/Leu87/Leu89 (9)	–12.02	62	–11.01	56	23.6	12.4	0.48	–14.23	36.80 pM

* total docked percent = (number of RB and FB)/500.

* RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

[Table S2. Molecular docking results of NPC1L1 NTD with cholesterol]

try No	condition	flexible residues of receptor	reference-like binding cluster		flipped binding cluster		total docked percent (%)	RB docked percent (%)	entropy for this clustering	best model of docked conformations (lowest binding E)	
		(number of Flexible residues)	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs				free Energy of binding (kcal/mol)	Ki (inhibition constant)
1	rigid receptor	–	–7.86	41	–6.92	94	27.0	8.2	0.39	–8.89	303.5 nM
2	flexible receptor	Glu38/Ser56 (2)	–10.39	110	–7.13	94	40.8	22.0	0.4	–12.18	1.18 nM
3		Glu38/Ser53/Ser56 (3)	–10.12	91	–7.38	71	32.4	18.2	0.42	–11.96	1.71 nM
4		Glu38/Leu52/Ser53/Asn54/Ser56/Ser102	–11.71	203	–10.29	119	64.4	40.6	0.36	–13.44	141.1 pM
		/Thr107/Phe120									
	/Leu213 (9)										

* total docked percent = (number of RB and FB)/500.

* RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

[Table S3. Molecular docking results of NPC1 NTD with 25-HC]

try No	condition	flexible residues of receptor	reference-like binding cluster		flipped binding cluster		total docked percent (%)	RB docked percent (%)	entropy for this clustering	best model of docked conformations (lowest binding E)	
		(number of Flexible residues)	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs				free Energy of binding (kcal/mol)	Ki (inhibition constant)
1	rigid receptor	–	–13.37	469	–12.08	31	100.0	93.8	0.02	–13.80	76.95 pM
2		Asn41/Gln79 (2)	–13.26	370	–12.28	130	100.0	74.0	0.04	–14.79	14.38 pM
3	flexible receptor	Asn41/Gln79/Leu89 (3)	–13.00	334	–12.17	165	99.8	66.8	0.1	–14.65	18.32 pM
4		Glu30/Asp37/Lys38/ Asn41/Gln79/Thr82/ Asn86/Leu87/Leu89 (9)	–11.97	85	–11.65	78	32.6	17.0	0.48	–13.96	58.97 pM

* total docked percent = (number of RB and FB)/500.

* RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

[Table S4. Molecular docking results of NPC1L1 NTD with 25-HC]

try No	condition	flexible residues of receptor	reference-like binding cluster		flipped binding cluster		total docked percent (%)	RB docked percent (%)	entropy for this clustering	best model of docked conformations (lowest binding E)	
		(number of Flexible residues)	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs				free Energy of binding (kcal/mol)	Ki (inhibition constant)
1	rigid receptor	–	–7.61	39	–5.63	33	14.4	7.8	0.40	–9.89	56.27 nM
2		Glu38/Ser56 (2)	–8.44	49	–6.89	60	21.8	9.8	0.42	–11.33	4.95 nM
3		Glu38/Ser53/Ser56 (3)	–8.90	50	–6.59	64	22.8	10.0	0.42	–10.86	11.03 nM
4	flexible receptor	Glu38/Leu52/Ser53/ Asn54/Ser56/Ser102 /Thr107/Phe120 /Leu213 (9)	–11.86	200	–9.94	106	61.2	40.0	0.33	–14.66	18.05 pM

* total docked percent = (number of RB and FB)/500.

* RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

[Table S5. Molecular docking results of NPC1 NTD with β -SITO]

try No	condition	flexible residues of receptor	reference-like binding cluster		flipped binding cluster		total docked percent (%)	RB docked percent (%)	entropy for this clustering	best model of docked conformations (lowest binding E)	
		(number of Flexible residues)	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs				free Energy of binding (kcal/mol)	Ki (inhibition constant)
1	rigid receptor	–	–13.39	448	–12.23	52	100.0	89.6	0.06	–13.94	60.11 pM
2		Asn41/Gln79 (2)	–13.43	336	–12.01	158	98.8	67.2	0.15	–14.97	10.63 pM
3	flexible receptor	Asn41/Gln79/Leu89 (3)	–13.07	307	–11.94	184	44.2	61.4	0.18	–14.95	11.07 pM
4		Glu30/Asp37/Lys38/ Asn41/Gln79/Thr82/ Asn86/Leu87/Leu89 (9)	–12.02	25	–11.79	31	11.2	5.0	0.49	–14.46	25.18 pM

* total docked percent = (number of RB and FB)/500.

* RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

[Table S6. Molecular docking results of NPC1L1 NTD with β -SITO]

try No	condition	flexible residues of receptor	reference-like binding cluster		flipped binding cluster		total docked percent (%)	RB docked percent (%)	entropy for this clustering	best model of docked conformations (lowest binding E)	
		(number of Flexible residues)	average binding E (kcal/mol)	no. of runs	average binding E (kcal/mol)	no. of runs				free Energy of binding (kcal/mol)	Ki (inhibition constant)
1	rigid receptor	–	–6.76	11	–5.41	35	9.2	2.2	0.30	–9.30	153.4 nM
2		Glu38/Ser56 (2)	–6.23	7	–5.79	50	11.4	1.4	0.34	–7.94	1.5 μ M
3		Glu38/Ser53/Ser56 (3)	–7.9	28	–5.88	53	16.2	5.6	0.36	–10.97	9.0 nM
4	flexible receptor	Glu38/Leu52/Ser53/ Asn54/Ser56/Ser102 /Thr107/Phe120 /Leu213 (9)	–12.00	134	–9.76	106	48.0	26.8	0.41	–14.44	25.9 pM

* total docked percent = (number of RB and FB)/500.

* RB docked percent = (number of reference-like binding)/500.

[Table S7. RMSD between loops in unbound and bound conformations for NPC1 NTD and cholesterol, 25-HC and β -SITO]

RMSD (\AA) ¹ between loops of bound and unbound conformations (Relative RMSD ²)						
Loop	Reference-like Binding			Flipped Binding		
	cholesterol	25-HC	β -SITO	cholesterol	25-HC	β -SITO
L1	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)	0.5 (0.06)	0.4 (0.04)
L2	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.5 (0.16)	0.3 (0.1)
L3	0.4 (0.08)	0.4 (0.08)	0.4 (0.08)	0.4 (0.08)	0.4 (0.08)	0.3 (0.06)
L4	0.6 (0.2)	0.6 (0.2)	0.7 (0.23)	0.5 (0.16)	0.5 (0.16)	0.7 (0.23)
L5	1.0 ³ (0.09)	1.0 (0.09)	1.3 (0.12)	0.9 (0.08)	0.9 (0.08)	0.9 (0.08)
L6	1.1 (0.11)	1.2 (0.12)	2.0 (0.2)	1.9 (0.19)	1.2 (0.12)	1.1 (0.11)
L7	0.6 (0.08)	0.6 (0.08)	0.7 (0.09)	0.6 (0.08)	0.8 (0.1)	0.6 (0.08)
L8	0.8 (0.16)	0.7 (0.14)	0.7 (0.14)	0.7 (0.14)	0.9 (0.18)	0.7 (0.14)

¹. Average RMSD between loops of Bound and Unbound (100 conformations respectively).

². Relative RMSD = (average RMSD)/(number of residue).

³. Bold letter represents average RMSD greater than 1.0 \AA .

- * L1 : Asn195~Phe203, 9 amino acids (α 8/ β 7)
- * L2 : Thy35~Asp37, 3 amino acids (β 1/ β 2)
- * L3 : Asp131~Asn135, 5 amino acids (β 5/ β 6)
- * L4 : Gly69~Val71, 3 amino acids (α 1/ β 4)
- * L5 : Cys227~Pro237, 11 amino acids (~C terminus)
- * L6 : Asp162~Lys171, 10 amino acids (α 6/ α 7)
- * L7 : Leu176~Gln185, 8 amino acids (α 7/ α 8)
- * L8 : Ser210~Glu218, 5 amino acids (β 7~)

[Table S8. The loop RMSD between ligand bound and unbound average conformation for NPC1 NTD and NPC1L1 NTD]

loop RMSD (Å) ¹ between ligand bound and unbound average conformation						
Loop	NPC1 NTD			NPC1L1 NTD		
	cholesterol	25-HC	β-SITO	cholesterol	25-HC	β-SITO
L1	0.2	0.2	0.2	0.9	1.0²	0.9
L2	0.1	0.1	0.1	2.3	2.3	2.2
L3	0.1	0.1	0.0	0.1	0.6	1.0
L4	0.4	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3
L5	0.5	0.4	0.2	1.1	1.4	1.6
L6	0.8	0.7	0.7	1.1	0.2	0.7
L7	0.4	0.2	0.2	0.7	1.1	0.3
L8	1.3	0.8	0.2	1.3	0.5	1.3
Total NTD	1.2	1.1	1.2	1.6	1.8	2.0

¹. Average RMSD between loops of Bound and Unbound (100 conformations respectively).

². Bold letter represents average RMSD greater than 1.0 Å.

* L1 for NPC1 NTD : Asn195~Phe203, 9 amino acids (α8/β7)

* L2 for NPC1 NTD : Thy35~Asp37, 3 amino acids (β1/β2)

* L3 for NPC1 NTD : Asp131~Asn135, 5 amino acids (β5/β6)

* L4 for NPC1 NTD : Gly69~Val71, 3 amino acids (α1/β4)

* L5 for NPC1 NTD : Cys227~Pro237, 11 amino acids (~C terminus)

* L6 for NPC1 NTD : Asp162~Lys171, 10 amino acids (α6/α7)

* L7 for NPC1 NTD : Leu176~Gln185, 8 amino acids (α7/α8)

* L8 for NPC1 NTD : Ser210~Glu218, 5 amino acids (β7~)

* L1 for NPC1L1 NTD : Gly207~Leu216, 10 amino acids (α8/β7)

* L2 for NPC1L1 NTD : Asn42~Ser53, 12 amino acids (β1/β2)

* L3 for NPC1L1 NTD : Gln144~Leu150, 7 amino acids (α5/β5)

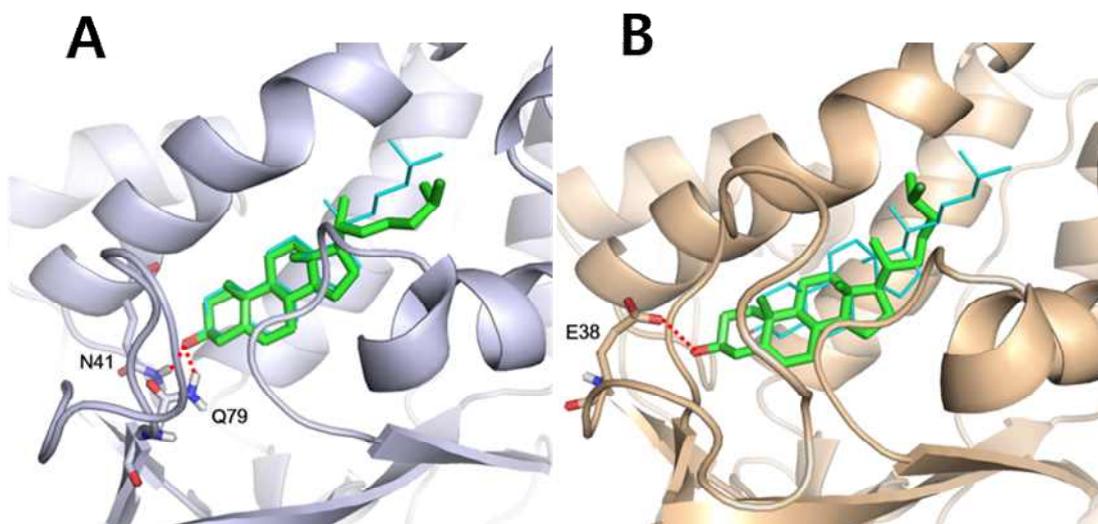
* L4 for NPC1L1 NTD : Leu81~Pro85, 5 amino acids (α1/β4)

* L5 for NPC1L1 NTD : Cys243~Ser255, 13 amino acids (~C terminus)

* L6 for NPC1L1 NTD : Ser173~Leu183, 11 amino acids (α6/α7)

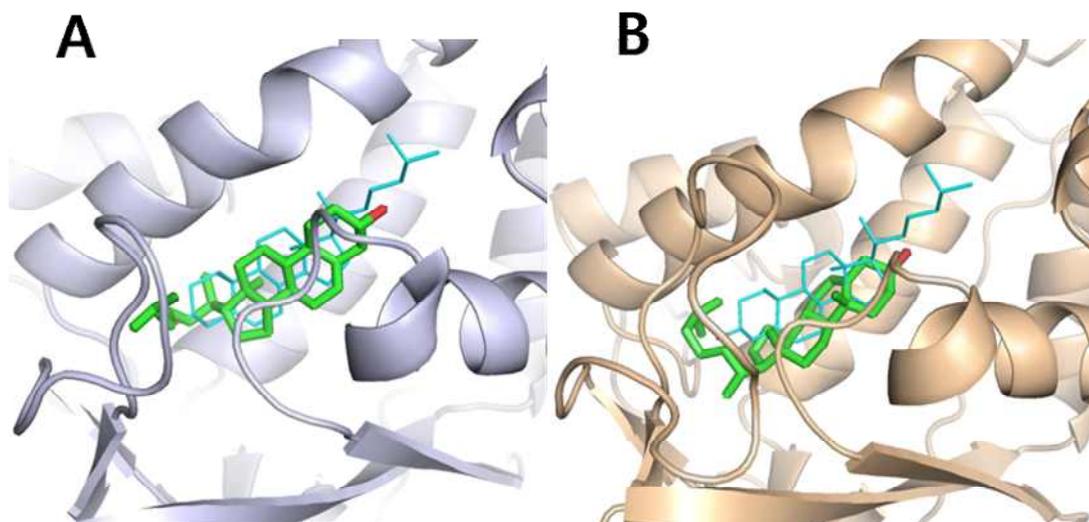
* L7 for NPC1L1 NTD : Gly190~Leu196, 7 amino acids (α7/α8)

* L8 for NPC1L1 NTD : Ala228~Gly232, 5 amino acids (α9~)



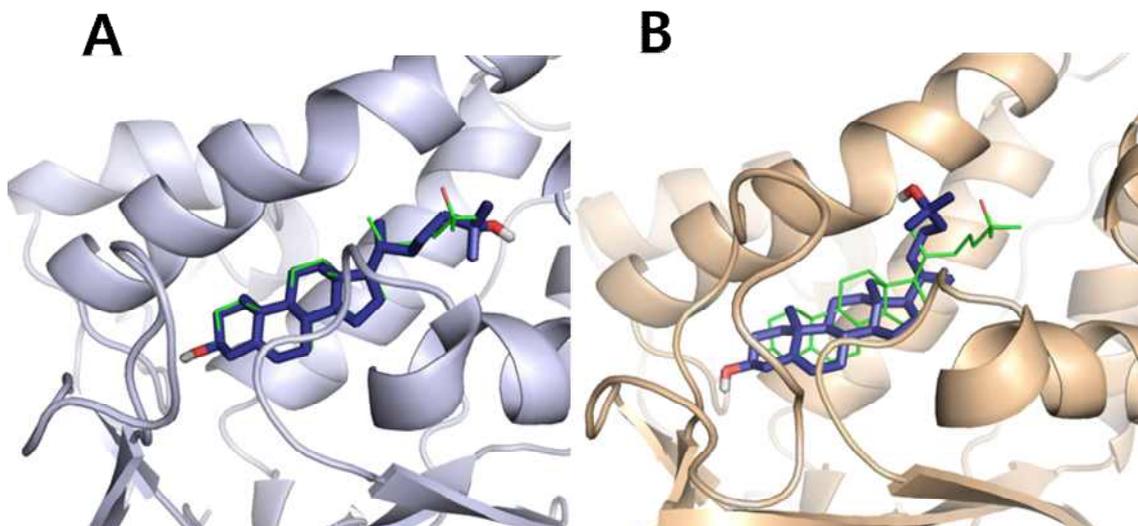
[Figure S1] Best binding mode of protein in complex with cholesterol in RB orientation from Rigid receptor condition docking.

[A] NPC1 NTD and cholesterol (RMSD: 1.0 Å) complex, [B] NPC1L1 NTD and cholesterol (RMSD: 3.8 Å) complex. Docked ligand is shown in green stick and reference ligand of 3GKI is shown in cyan line. NPC1 NTD is shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Red dotted lines represent H-bond between cholesterol and nearby residues. Nitrogen and oxygen atoms are shown in blue and red, respectively. All pictures are drawn by PyMOL.



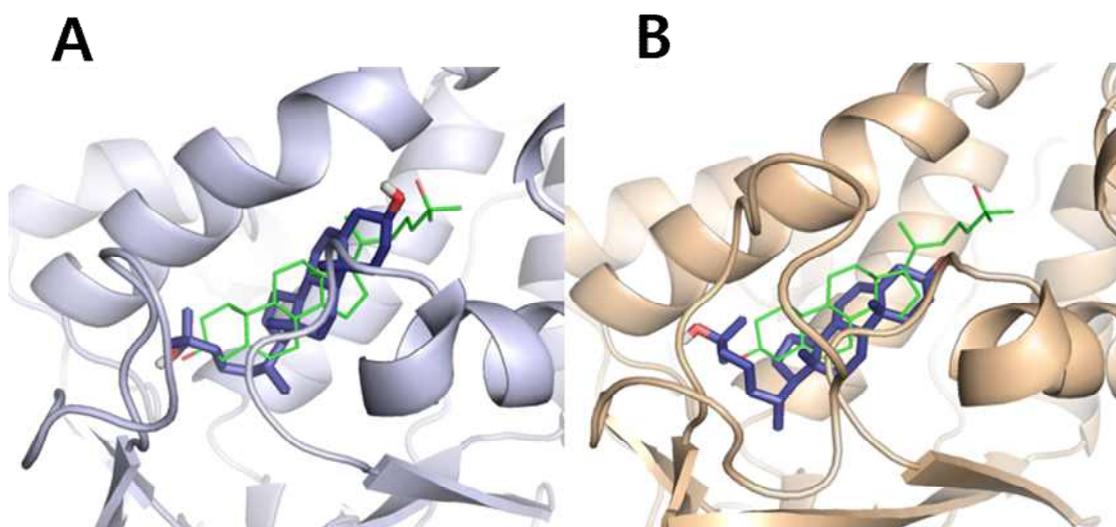
[Figure S2] Best binding mode of protein in complex with cholesterol in FB orientation from Rigid receptor condition docking.

[A] NPC1 NTD and cholesterol (RMSD: 9.1 Å) complex, [B] NPC1L1 NTD and cholesterol (RMSD: 9.1 Å) complex. Docked ligand is shown in green stick and reference ligand from 3GKI is shown in cyan line. NPC1 NTD is shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Oxygen atoms are shown in red.



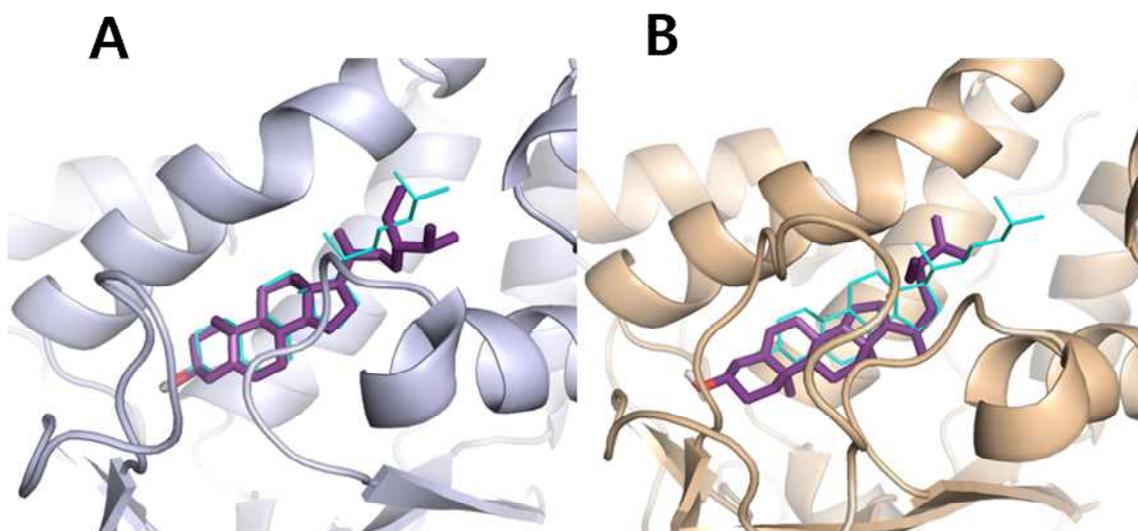
[Figure S3] Best binding mode of protein in complex with 25-HC in RB orientation from Rigid receptor condition docking.

[A] NPC1 NTD and 25-HC (RMSD: 1.0 Å), complex, [B] NPC1L1 NTD and 25-HC (RMSD: 2.2 Å) complex. Docked ligand is shown in dark blue stick and reference ligand of 3GKJ shown in green line. NPC1 NTD is shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD shown in orange ribbon. Oxygen atoms are shown in red.



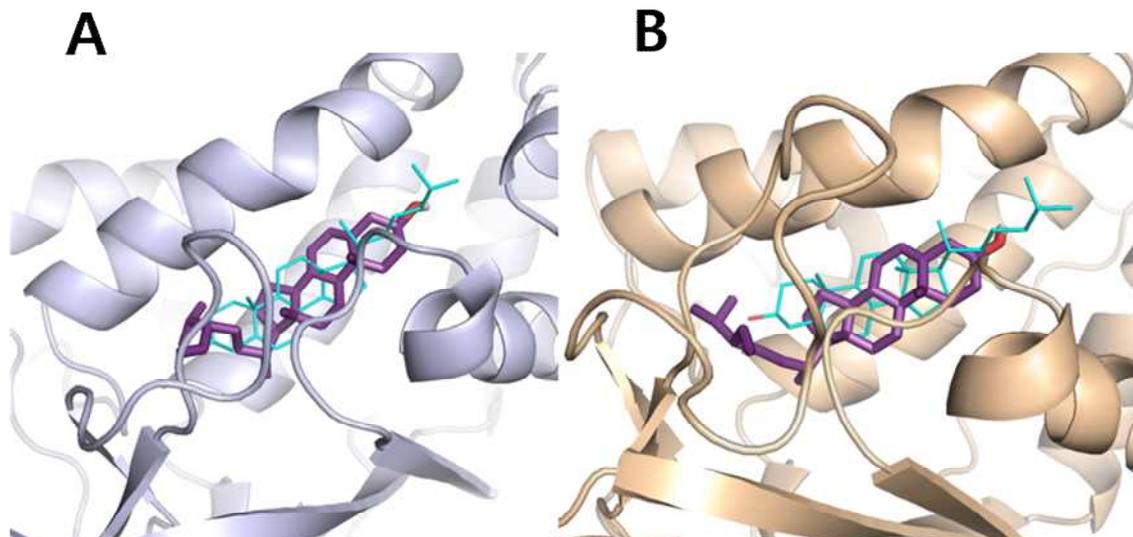
[Figure S4] Best binding mode of protein in complex with 25-HC in FB orientation from Rigid receptor condition docking.

[A] NPC1 NTD and 25-HC (RMSD: 9.3 Å) complex, [B] NPC1L1 NTD and 25-HC (RMSD: 9.6 Å) complex. Docked ligand shown in dark blue stick and reference ligand from 3GKJ is shown in green line. NPC1 NTD shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Oxygen atoms are shown in red.



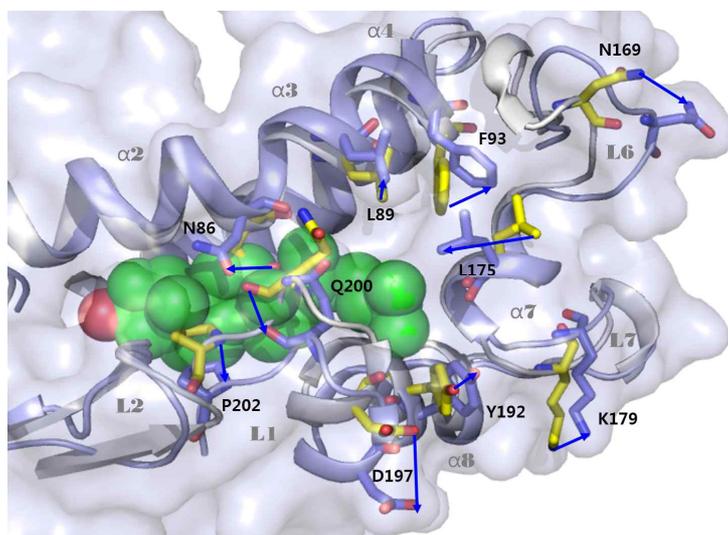
[Figure S5] Best binding mode of protein in complex with β -SITO in RB orientation from Rigid receptor condition docking.

[A] NPC1 NTD and β -SITO complex, [B] NPC1L1 NTD and β -SITO complex. Docked ligand is shown in purple stick and reference ligand of 3GKI is shown in cyan line. NPC1 NTD is shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Oxygen atoms are shown in red.



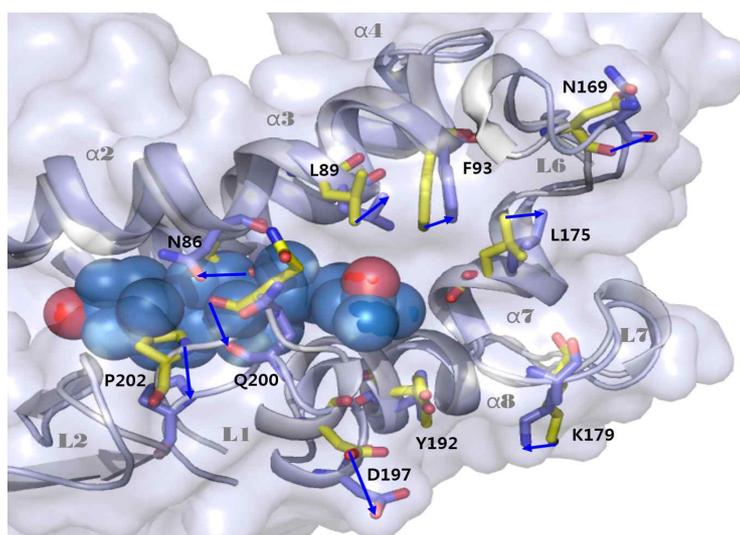
[Figure S6] Best binding mode of protein in complex with β -SITO in FB orientation from Rigid receptor condition docking.

[A] NPC1 NTD and β -SITO complex, [B] NPC1L1 NTD and β -SITO complex. Docked ligand shown in purple stick and reference ligand from 3GKI is shown in cyan line. NPC1 NTD shown in light blue ribbon and NPC1L1 NTD is shown in orange ribbon. Oxygen atoms are shown in red.



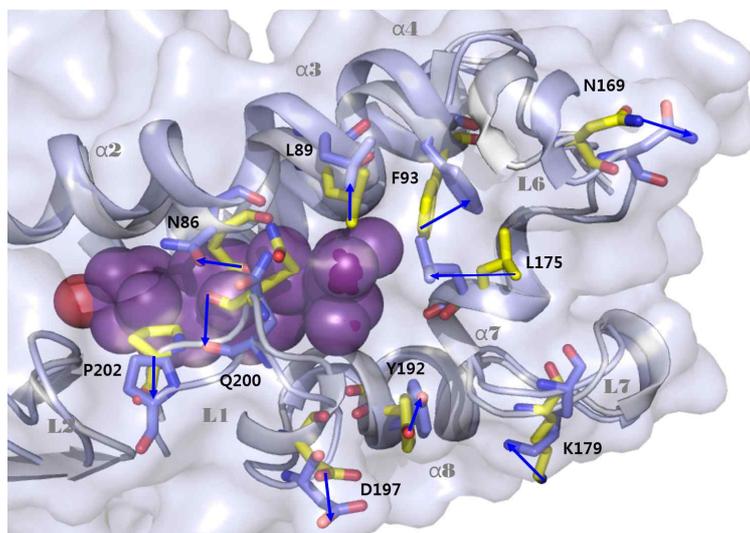
[Figure S8] Moving residues of complex of NPC1 NTD with cholesterol at 50 ns simulation time.

Docked ligand (cholesterol) is shown in green sphere. Bound and unbound conformations of NPC1 NTD are shown in light blue and grey ribbon. The residues of conformation are shown in light blue (bound) and yellow (unbound). Blue arrows represent direction of residue movement. The secondary structure of protein is labeled by grey bold letter.



[Figure S9] Moving residues of complex of NPC1 NTD with 25-HC at 50 ns simulation time.

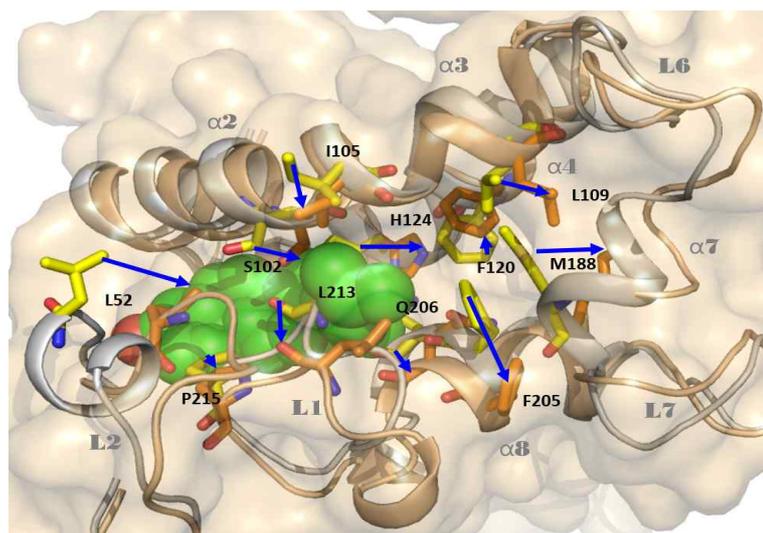
Docked ligand (25-HC) is shown in blue sphere. Bound and unbound conformations of NPC1 NTD are shown in light blue and grey ribbon. The residues of conformation are shown in light blue (bound) and yellow (unbound). Blue arrows represent direction of residue movement. The secondary structure of protein is labeled by grey bold letter.



[Figure S10] Moving residues of complex of NPC1

NTD with β -SITO at 50ns simulation time.

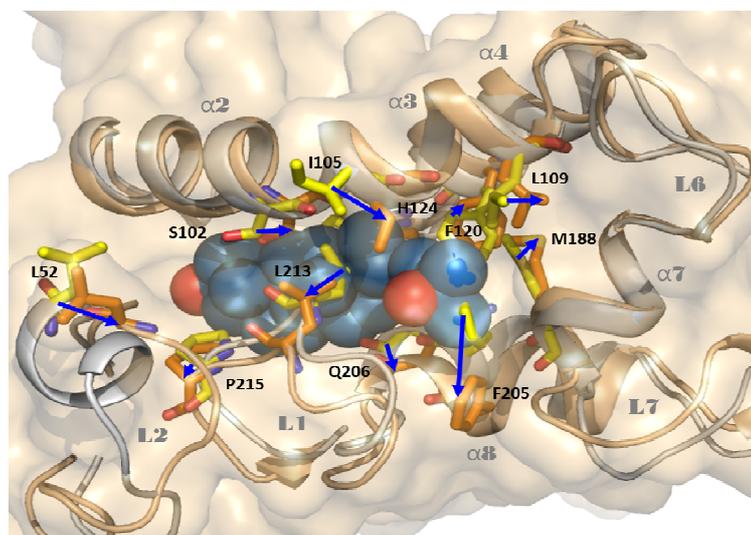
Docked ligand (β -SITO) is shown in purple sphere. Bound and unbound conformations of NPC1 NTD are shown in light blue and grey ribbon. The residues of conformation are shown in light blue (bound) and yellow (unbound). Blue arrows represent direction of residue movement. The secondary structure of protein is labeled by grey bold letter.



[Figure S11] Moving residues of complex of NPC1L1

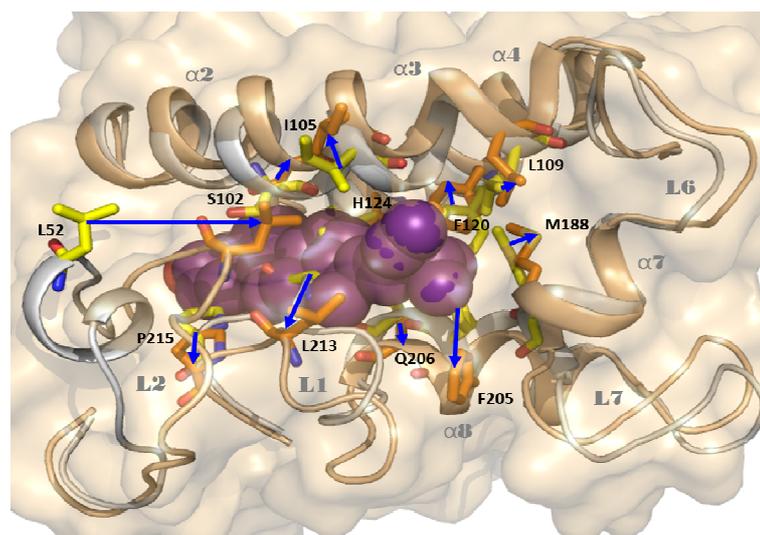
NTD with cholesterol at 50 ns simulation time.

Docked ligand (cholesterol) is shown in green sphere. Bound and unbound conformation of NPC1L1 NTD are shown in light orange and grey ribbon. The residues of conformation are shown in orange (bound) and yellow (unbound). Blue arrows represent direction of residue movement. The secondary structure of protein is labeled by grey bold letter.



[Figure S12] Moving residues of complex of NPC1L1 NTD with 25-HC at 50ns simulation time.

Docked ligand (25-HC) is shown in blue sphere. Bound and unbound conformation of NPC1L1 NTD are shown in light orange and grey ribbon. The residues of conformation are shown in orange (bound) and yellow (unbound). Blue arrows represent direction of residue movement. The secondary structure of protein is labeled by grey bold letter.



[Figure S13] Moving residues of complex of NPC1L1 NTD with β -SITO at 50ns simulation time.

Docked ligand (β -SITO) is shown in purple sphere. Bound and unbound conformation of NPC1L1 NTD are shown in light orange and grey ribbon. The residues of conformation are shown in orange (bound) and yellow (unbound). Blue arrows represent direction of residue movement. The secondary structure of protein is labeled by grey bold letter.

부록 2. “고콜레스테롤 식이 공급과 콜레스테롤 흡수저해제인 키토산과 키토산올리고당의 보충 시 절식시간이 흰쥐에서 콜레스테롤의 흡수 및 대사에 미치는 영향”

1. 서론

인체에서 콜레스테롤의 농도 조절은 소장에서의 식이 콜레스테롤 흡수, 간에서의 콜레스테롤 생합성, 소화기계를 통한 담즙염의 생산, 배출 및 재흡수 등 크게 3가지 경로의 협력작업에 의해 이루어진다(Dietschy와 Wilson, 1970). 콜레스테롤은 세포막의 구성성분으로 세포성장에 필수적이며 스테로이드 호르몬의 전구체로 체내에서 중요한 역할을 하기 때문에 생합성에 의해 합성된 콜레스테롤과 옥시스테롤 같은 대사산물들은 콜레스테롤 대사에 관계된 효소들을 전사단계(Edward 등, 2000)부터 조절하여 세포 내의 콜레스테롤 농도가 일정하게 유지된다고 알려져 있다. 체내에서 필요로 하는 콜레스테롤의 양에 비하여 식이 섭취가 부족할 때에는 체내 생합성이 활성화되어 부족한 콜레스테롤을 보충하고 소화기계로 분비되었던 담즙염의 재흡수도 빠르게 일어나게 된다. 반대로 체내에서 요구하는 콜레스테롤의 양보다 과다하게 식이 콜레스테롤이 유입되면 최종생산물 되먹임 조절(end-product feedback regulation)을 통해 간에서의 콜레스테롤 생합성이 저해되고 동시에 생합성에 관여하는 각종 효소들의 합성도 저해되어 체내 콜레스테롤 합성이 감소하게 된다. 여기에 체내 콜레스테롤을 원료로 하는 담즙염이 왕성하게 합성되어 소화기계로 다량 분비되며, 콜레스테롤의 배출을 촉진하게 되므로 결국 콜레스테롤 급원은 항상 일정한 양을 유지하게 된다(Siperstein와 Fagan, 1966; Dietschy와 Siperstein, 1967).

하지만 고콜레스테롤 식이를 공급하는 동물실험을 수행하는 경우에 일반적인 콜레스테롤 항상성 유지 기전으로는 설명할 수 없는 결과들이 종종 나타나기도 한다. 다양한 기관에서 다양한 방법을 통해 복잡한 조절과정을 갖는 콜레스테롤의 특성을 고려할 때 체내 콜레스테롤의 주된 공급원인 식이 콜레스테롤(Lammert와 Wang, 2005) 흡수량에 대해 보다 민감한 감지 또는 즉각적인 조절기전이 있을 것으로 예상하고, 이를 확인하기 위해 사

양실험을 수행하였다. 이번 실험에서는 식이로 고농도의 콜레스테롤을 공급하면서 콜레스테롤 흡수저해제인 키토산과 키토산올리고당을 처리하여 식이 콜레스테롤의 흡수와 체내 콜레스테롤의 항상성 유지 기전에 미치는 영향을 확인하고 더불어 절식시간에 따른 콜레스테롤 대사변화를 관찰하고자 한다.

2. 연구사

1) 세포막과 콜레스테롤

세포막의 콜레스테롤 농도는 세포 내 전체 지질의 반 정도 차지하며, 4개의 탄소 고리가 나타내는 경직된 구조 때문에 세포막의 유동성에 직접적인 영향을 주며, 세포의 형태 유지, 삼투압 취약성(osmotic fragility) 등 세포막 기능조절에 중요한 역할을 한다. 막에서의 콜레스테롤 농도는 인지질의 지방산 사슬의 운동성에 영향을 미쳐 결과적으로 세포막의 소수성 부위 두께에 변화를 주어 다양한 막 단백질의 기능 및 구조 안정화에 영향을 미친다(Lee, 2011). 예를 들어, Na^+ , K^+ -ATPase가 선호하는 인지질의 지방산 사슬의 길이는 콜레스테롤 유무에 따라 달라지며, 인지질과 콜레스테롤의 결합에 따라 Ca^{2+} -ATPase 활성도도 변화한다고 보고되고 있다(Lee, 2004).

2) 전신의 콜레스테롤 항상성 유지

인체에서 콜레스테롤 항상성은 콜레스테롤 생합성, 소장에서의 식이 콜레스테롤 흡수 그리고 담즙염의 재흡수 및 대변 배설에 의해 유지되며 그중 식이 콜레스테롤은 포유류의 주된 콜레스테롤 공급원으로 체내에서 요구하는 콜레스테롤의 70%를 공급한다(Alfin-Slater와 Aftergood, 1980). 식이 콜레스테롤은 간에서 합성되어 내장으로 분비된 담즙에 의해 유화되어 미셀을 형성하고 솔가장자리(brush border) 세포막과의 융합을 통해 소장세포(enterocyte) 내부로 흡수되게 된다(Goldstein과 Brown, 1990). 소장은 소장세포의 꼭지면막(apical membrane)에 Niemann-Pick type C1-like 1(NPC1L1)이 있어서(Davis 등, 2004) 미셀에 유화된 식이 콜레스테롤과 직접 결합하고 이 결합을 통해 다량의 콜레스테롤을 NPC1L1과 함께 내재화(internalization)시킨다(Altman 등, 2004). 세포 내로 유입된 NPC1L1은 체내의 콜레스테롤 요구량에 따라 내포 재활용 구획(endosomal recycling compartment; ERC)과 세포막을 순환하면서 콜레스테롤 흡수를 담당한다. 세포 내에서 콜

레스테롤이 부족하면 ERC의 NPC1L1이 콜레스테롤 흡수를 증대하기 위해 세포막으로 돌아오고 세포 내에 콜레스테롤이 많아지면 NPC1L1은 ERC에서 더 많이 머무르게 된다(Ge 등, 2008). 한편 여분의 콜레스테롤은 소장상피세포의 꼭지면막에 있는 ATP-결합상자 전달효소 G5/G8(ABCG5/G8)에 의해 다시 소장강으로 방출된다. NPC1L1과 ABCG5/8의 길항작용은 간과 소장에서의 전신의 콜레스테롤 항상성 유지에 주요 부분을 차지한다(Othman 등, 2013). 콜레스테롤 생합성은 ATP를 소비하여 acetyl CoA로부터 약 20개의 효소가 관여하는 합성과정으로 이에 관여하는 모든 유전자들은 스테롤 조절인자-결합단백질(sterol regulatory element-binding protein; SREBPs)에 의해 생산되는 세포막 부착 전사인자군에 의해 조절된다(Wang과 Song, 2012). 간과 소화기계는 전체 콜레스테롤 생합성능력의 90%를 차지하며 그중 간에서 콜레스테롤 합성능력은 55%로 가장 높다고 알려져 있다(Dietschy와 Siperstein, 1967). 식이로 공급되는 콜레스테롤의 양이 적으면 간에서의 콜레스테롤 생합성과 담즙염의 재흡수가 촉진된다. 약 94%의 담즙염이 소장에서 재흡수되어 혈액을 통해 간문맥을 거쳐 간으로 되돌아오며, 회수된 담즙염은 즉시 정맥동(venous sinus)을 통하여 간세포로 대부분 흡수되고 나머지만 담즙으로 재분비된다(Portincasa와 Wang, 2012).

3) 세포 내에서의 콜레스테롤 항상성 유지

콜레스테롤은 최소 20여 가지의 효소가 관여하는 복잡한 경로를 통해 ER에서 합성되며, 포유류 세포는 저밀도 지단백질(low-density lipoprotein; LDL)의 수용체-매개 세포내 이입(receptor-mediated endocytosis)을 통해 외인성 콜레스테롤을 받아들인다(Brown과 Goldstein, 1986). LDL-콜레스테롤(LDL-C)이 LDL-콜레스테롤 수용체(LDL-R)에 의해 세포 내(초기 내포; early endosome)로 유입되면 후기 내포/리소솜으로 운반되어 리소솜 산성 지방분해효소(lysosomal acidic lipase; LAL)에 의해 콜레스테롤 에스테르가 콜레스테롤로 전환된다. 콜레스테롤은 NPC2와 NPC1의 협력작용으로 세포질로 배출되어 여러 소기관들(i.e. PL, ER, ERC, 리소솜 축적소기관(lysosomal storage organelles; LSOs))로 전달된다(Chang과 Chang, 2008). 세포 내에서의 콜레스테롤 항상성은 콜레스테롤 생합성과 LDL 흡수에 대한 되먹임 조절(feedback regulation)에 의해 유지되며, ER에서 LDL-C는 스테롤조절요소-결합단백질 절단활성화 단백질(SREBP cleavage activating protein; Scap)/인슐린유도유전자 단백질(Insulin-induced gene protein; Insig)/스테롤조절요

소-결합단백질(sterol regulatory element-binding protein; SREBP) 시스템을 통해 콜레스테롤의 생합성과 관련된 단백질의 발현을 감소시켜, 결과적으로 콜레스테롤 생합성도 저해시킨다(Goldstein 등, 2006). 또한 LDL-C는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase의 분해를 촉진시키고, acyl-CoA:콜레스테롤 acyl기 전달효소(acyl-CoA:cholesterol acyltransferase; ACAT)를 활성화시켜 콜레스테롤을 콜레스테롤 에스테르로 전환되도록 하여 킬로미크론(chylomicron)으로 포장된 콜레스테롤 에스테르는 림프로 배출된다(DeBose-Boyd, 2008; Nguyen 등, 2012).

4) 키토산과 키토산올리고당의 생리적 기능

키토산(chitosan)은 새우나 게 등 갑각류의 외골격 성분인 키틴(chitin)을 강알칼리 조건에서 탈아세틸화하여 만들어지며, 천연 중합체이다(Arvanitoyamis 등, 1998). 키토산은 지방흡착능력이 일반 식물성 섬유에 비해 월등하여 동물실험에서 소장에서의 지방흡수를 줄이고 혈청 콜레스테롤 수준을 감소시키는 등 고콜레스테롤혈증(Maezaki 등, 1993; Hossain 등, 2007)에 효과가 있다고 알려져 있다.

키토산올리고당은 키토산의 분해산물이며, 수용성으로 키토산에 비해 쉽게 동물과 사람에게서 흡수된다(Yuan 등, 2009). 키토산올리고당(1 kDa<MW<3 kDa)은 지질조절작용에 있어서 키토산(1,000 kDa)과 유사한 효과(Nam과 Shon, 2009; Ausar 등, 2003)를 나타내었으며, 12주 동안 고지방식이(15.8% fat+1.25% 콜레스테롤)와 키토산올리고당을 급여한 apoE^{-/-} mice에서 키토산올리고당 보충량에 비례하여 유의적으로 혈청 콜레스테롤과 TG를 감소시켜 동맥경화 방지효과를 나타냈다는 보고(Yu 등, 2015)도 있다. 한편, 12주 동안 키토산올리고당을 급여한 실험(Kim 등, 2009)에서는 혈청 포도당 농도의 유의적인 감소와 인슐린 분비를 촉진하는 혈청 C-펩티드의 농도가 증가하였고 췌장의 β-세포가 성공적으로 재건되어 당뇨에 대한 치료적인 효과도 나타내었다.

3. 재료 및 방법

- 1) Test 1 : 고콜레스테롤(0.25%)과 흡수저해제(1%, 키토산 또는 키토산올리고당)의 보충 효과 구명

실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley 종 수컷 쥐 총 21마리에 고형사료를 급여하여 난괴법(randomized complete block design)으로 각 군당 7마리씩 3개 군으로 나누어 4주간 와이어바닥케이지(wire bottomed cage)에서 개별 사육하였다. 고콜레스테롤 대조군(0.25% 콜레스테롤; hC), 고콜레스테롤 식이와 키토산 및 키토산올리고당 분말을 각각 1.0%씩 첨가하여 급여한 키토산올리고당 군(hCo)와 키토산 군(hCc)으로 나누었으며, 실험식이의 조성은 Table 1과 같았다. 사육실의 온도는 25±2°C로, 명암은 12시간 주기로 일정하게 유지시켰다. 키토산과 키토산올리고당은 키토산분해효소(Bacillus pumilus BN-262 유래)를 이용한 효소적 가수분해에 의해 생산되었다. 키토산의 분자량은 150,000~200,000 Da으로 탈아세틸화도 95%였고 키토산올리고당의 분자량은 1,000~20,000 Da이며 탈아세틸화도 89%로 모두 (주)키토라이프로부터 제공받아 사용했다. 4주 후에 2일에 걸쳐서 실험동물을 도살하였는데 절식시간에 따른 콜레스테롤 지표 변화를 확인하고자 도살 전에 군당 3수는 12시간 절식시키고 나머지 4수는 24시간 절식시킨 후 가볍게 에테르로 마취시켜 심장에서 채혈하였다. 실험동물의 혈청과 간의 지질함량 및 혈청의 기능성 지표효소 활성을 분석하였다.

Table 1. Composition of experimental diets (% wt/wt)

Ingredients	hC ⁴⁾	hCo ⁵⁾	hCc ⁶⁾
Corn starch	69.65	68.65	68.65
Casein	20.0	20.0	20.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Vitamin Mix ¹⁾	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Mineral Mix ²⁾	3.5	3.5	3.5
Cholesterol	0.25	0.25	0.25
Cholic acid	0.1	0.1	0.1
Oligo-Chitosan ³⁾	-	1.0	-
Chitosan	-	-	1.0

¹⁾AIN93 Vitamin Mixture.

²⁾AIN93 Mineral Mixture.

³⁾oligo-chitosan (oC) 1%.

⁴⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

⁵⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

⁶⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

2) Test 2 : 고콜레스테롤(0.5%)과 흡수저해제(5%, 키토산올리고당)의 보충 효과 구명

실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley 중 수컷 쥐 총 24마리를 일주일 간 안정시킨 후 난괴법으로 각 군당 8마리씩 3개 군으로 나누어 4주간 와이어바닥케이지에서 개별 사육하였다. 대조군(정상식이; -C)과 고콜레스테롤 대조군(0.5% cholesterol; HC), 고콜레스테롤 식이와 키토산올리고당 분말을 5.0%를 첨가하여 급여한 올리고 키토산 군(HCO)으로 나누었다. 실험식이의 조성은 Table 2와 같았고 사육실의 온도나 명암주기는 test 1과 동일하게 유지하였다. 모든 실험재료는 test 1과 동일한 것으로 사용했다. 군당 4수는 도살 전에 12시간 절식시키고 나머지는 24시간 절식시켜 에테르로 마취한 후 심장에서 채혈하였다. 실험동물의 혈청과 간에서 test-1과 동일한 항목을 분석하였다.

Table 2. Composition of experimental diets (% , wt/wt)

Ingredients	-C ⁴⁾	HC ⁵⁾	HCO ⁶⁾
Corn starch	70.2	69.3	64.3
Casein	20.0	20.0	20.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3
Corn oil	5.0	5.0	5.0
Vitamin Mix ¹⁾	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	-	0.2	0.2
Mineral Mix ²⁾	3.5	3.5	3.5
Cholesterol	-	0.5	0.5
Cholic acid	-	0.2	0.2
Oligo-Chitosan ³⁾	-	-	5.0

¹⁾AIN93 Vitamin Mixture.

²⁾AIN93 Mineral Mixture.

³⁾Oligo-Chitosan (O) 5.0%

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

3) 체중 및 사료 섭취량 측정

체중은 격일로 오전 중에 측정했고, 개체별 사료 섭취량을 매일 측정하여 Choi(1987)의 방법으로 사료효율(feeding efficiency rate : FER(%) = WG/FI × 100)을 계산하였다.

4) 혈청과 간조직의 준비

실험동물에서 채혈한 혈액은 20분 정도 실온에 방치한 후 4℃ 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 액체질소로 급속 냉동시켜 분석에 사용하기 전

까지 -20°C 냉동고에 보관했다. 간은 채혈이 끝난 후에 즉시 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 여분의 수분을 제거한 후 중량을 측정하고, 지질분석을 위해 1 g 씩 잘라서 액체질소로 급속 냉동시켜 분석에 사용하기 전까지 -70°C 냉동고에 보관했다.

5) 혈청 및 간 조직의 콜레스테롤 함량 측정

혈청 중의 총 콜레스테롤(serum total cholesterol; sTC), HDL-콜레스테롤(high density lipoprotein-cholesterol; sHDL-C) 및 중성지방(triglyceride; sTG)은 효소법으로 각각의 키트(아산제약, 한국)를 사용하여 측정했으며, sTC에 대한 sHDL-C의 비율로 rHDL-C를 계산하였다. 한편, 간 조직 중의 지질을 추출하기 위해 냉동 보관되었던 간 1 g을 실온에서 해동하여 100 mM 인산완충용액(pH 7.4, KCl 1.17% 함유) 10 ml를 첨가하고 균질기(homogenizer)로 분쇄한 후 Bligh와 Dyer(1959)의 방법에 따라 클로로폼:메탄올:물(2:1:8, v/v)용매로 지질을 추출하였다. 추출된 지질은 각각의 키트(아산제약, 한국)를 사용하여 효소법으로 총 콜레스테롤(ITC)과 중성지방(ITG) 함량을 측정하였다.

6) 혈청 중 간 기능성 지표효소 활성화 측정

간세포의 변성이나 괴사가 일어나는 경우 혈청 중의 glutamyl oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamyl pyruvic transaminase(GPT) 활성이 매우 높아지므로(Takeda 등, 1964) 혈청에서 이들 효소의 농도를 측정하여 간 조직의 손상 정도를 파악하고자 하였다. 혈청에 있는 GOT, GPT의 활성화 측정을 위해 GOT는 L-aspartic acid와 α -ketoglutaric acid를, GPT는 L-alanine과 α -ketoglutaric acid를 기질로 사용하였다. 활성화 측정은 37°C 에서 기질을 첨가하여 30분간 반응시킬 때 생성되는 피루브산을 정량하는 키트(아산제약, 한국)를 사용하여 측정하였다.

7) 통계처리

모든 분석 결과는 IBM SPSS Statistics 24프로그램을 사용하여 평균치와 표준편차를 계산하고, 처리 간의 유의성검정을 위해 Duncan 법을 이용한 사후검정을 실시하여 평균치 간의 유의성을 검증하였다.($p < 0.05$)

4. 결과 및 고찰

1) 개시체중과 최종체중

4주간 사육한 실험동물의 개시체중(initial BW)과 최종체중(final BW)은 Table 3과 같다. 0.25% 콜레스테롤 급여군보다 0.5% 콜레스테롤 급여군의 개시체중이 높았는데, 이는 0.25% 콜레스테롤 급여실험은 4주령 흰 쥐를 공급받은 후 바로 실험을 수행하였고 0.5% 콜레스테롤 급여실험에서는 4주령 흰 쥐를 공급받아 약 1주일간 고행사료를 급여하면서 안정화시킨 후에 실험을 시작했기 때문이다. 하지만 두 가지 콜레스테롤 급여실험의 4주 후 최종체중은 비슷해졌고, 같은 실험 내에서는 키토산올리고당 보충(hCo, HCO)에 따라 최종체중이 유의적($p<0.05$)으로 낮아졌다. 4주간 사육한 쥐의 일일 증체량은 키토산올리고당 보충에 따라 유의적($p<0.05$)으로 낮아졌고 콜레스테롤 농도가 0.5%일 때의 체중증가 저해효과가 더 컸다.

Table 3. Effects of oligo-chitosan or chitosan on initial body weight (initial BW) and final body weight (final BW) by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.

Items	initial BW(g)	final BW(g)
hC ¹⁾	93.8±12.3	301.5±18.1 ^a
hCo ²⁾	93.7±14.4	248.5±42.9 ^b
hCc ³⁾	93.8±11.5	291.2±35.4 ^{ab}
-C ⁴⁾	126.9±5.2	300.3±7.3 ^a
HC ⁵⁾	126.6±3.6	300.8±18.4 ^a
HCO ⁶⁾	126.6±4.5	226.1±33.4 ^b

* The value was mean±SD, ^{abc} was significant differences by Duncan($p<0.05$)

¹⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

²⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

³⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

2) 식이섭취량, 증체량 및 사료효율

전체 실험동물의 일일식이섭취량 평균은 17.91 g이며, 일일 증체량 평균은 6.28 g, 사료

효율 평균은 34.6%였다(Table 4). 0.25% 콜레스테롤 급여실험에서 1% 키토산올리고당을 보충한 경우 일일식이섭취량과 일일증체량이 유의적($p<0.05$)으로 낮았다. 0.5% 콜레스테롤 급여실험에서도 키토산올리고당 급여에 따라 일일 식이섭취량, 일일 증체량, 사료효율 모두 유의적($p<0.05$)으로 현저히 낮아졌다. 즉, 키토산올리고당 급여(hCo 및 HCO)는 일일 식이섭취량을 감소시켜 일일 증체량과 사료효율을 유의적($p<0.05$)으로 감소시켰고 이런 효과는 0.5% 콜레스테롤 급여 시 더 커졌다. 또한, -C군에 비교해볼 때 0.5%의 콜레스테롤 급여(HC)는 일일 식이섭취량이나 일일 증체량, 사료효율에 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 나타난 반면 0.25% 콜레스테롤 급여(hC)는 일일 식이섭취량 수준이 비슷함에도 불구하고 일일 증체량을 증가시켜 사료효율 상승에 기여했다.

즉, 0.5%의 콜레스테롤 급여보다는 0.25%의 콜레스테롤 급여가 체중증가에 더 확실한 영향을 미쳤으며, 키토산보다는 키토산올리고당 보충군에서 사료효율의 감소효과가 크게 관찰되었다.

Sumiyoshi와 Kimura(2006)는 고지방식이를 급여한 C57BL/6J mice에서 46 kDa 키토산올리고당의 경구투입(oral intubation)은 17~20주 사이의 체중증가를 유의적($p<0.05$)으로 감소시켰다고 보고하였고, 본 실험도 이와 비슷하게 1% 및 5% 키토산올리고당 보충으로 일일 식이섭취량과 일일 증체량의 유의적인($p<0.05$) 감소를 나타내었다.

Table 4. Effect of oligo-chitosan or chitosan on average daily feed intake (ADFI), average daily weight gain (ADWG) and feed efficiency (FE) in rats fed with high-cholesterol diets.

Items	ADFI (g/day)	ADWG (g/day)	FE (%)
hC ¹⁾	19.3±1.3 ^a	8.0±0.4 ^a	41.4±2.4 ^a
hCo ²⁾	16.4±2.3 ^b	5.9±1.1 ^b	35.8±3.5 ^b
hCc ³⁾	19.0±1.1 ^a	7.6±1.0 ^a	40.0±4.7 ^a
-C ⁴⁾	19.2±1.0 ^a	6.4±0.2 ^a	33.5±1.9 ^a
HC ⁵⁾	19.1±0.8 ^a	6.5±0.6 ^a	33.7±2.4 ^a
HCO ⁶⁾	14.5±1.3 ^b	3.7±1.3 ^b	25.0±6.7 ^b

* The value was mean±SD, ^{abc} was significant differences by Duncan. ($p<0.05$)

¹⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

²⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

³⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

3) 도체중, 간 무게 및 간 무게비율과 신장 무게 및 신장 무게비율

Table 5에서 0.25% 콜레스테롤 급여 군들의 도체중은 Table 3의 최종체중과 비례하여 hC군에 비해 hCo군에서 유의적으로 낮았고, 간과 신장의 무게도 도체중과 같은 경향을 나타내었다. 0.5% 콜레스테롤 급여군에서는 다른 군들에 비해 HCO군에서 유의적($p<0.05$)으로 도체중과 신장 무게가 낮았고, 간 무게는 HC군에 비해 -C, HCO군에서 유의적($p<0.05$)으로 낮게 나타나 간 무게 비율이 -C군에서 유의적($p<0.05$)으로 낮았다.

절식시간 증가에 따라 모든 군에서 도체중, 간과 신장 무게가 감소하는 경향을 보였고, 특히 간 무게가 유의적($p<0.05$)으로 높았던 hC, hCc군에서 절식시간 증가에 따라 유의적($p<0.05$)으로 간 무게 비율이 낮아져 0.25% 콜레스테롤 급여군 간의 차이가 없어졌다. 신장 무게 비율은 hCc군에서만 절식시간에 따라 유의적($p<0.05$)인 감소가 관찰되었다. 0.5% 콜레스테롤 급여군들의 간 무게 비율은 HC, HCO군에서 12시간 절식에 비해 24시간 절식 시 유의적($p<0.05$)으로 감소했고, 특히 HCO군은 간 무게 비율의 감소로 -C군과 비슷한 수준을 나타내었다.

즉, 0.25% 콜레스테롤 급여실험에서는 간 무게 비율에 군 간의 차이가 보이지 않았으나, 0.5% 콜레스테롤 급여 시 간 무게 비율이 HC, HCO에 비해 -C군에서 가장 낮아 콜레스테롤 급여의 영향이 뚜렷했다. 또한 간 무게가 유의적($p<0.05$)으로 높았던 군들(hC, hCc, HC)에서 절식시간 증가에 따라 유의적($p<0.05$)으로 간 무게 비율의 감소가 나타났다. 키토산 올리고당이나 키토산의 보충은 간 무게 비율이나 신장 무게 비율에 뚜렷한 변화를 주지 못하였다.

Gallaher 등(2000)은 0.125% 콜레스테롤과 10%의 키토산을 보충한 wister 중 쥐에서 체중과 간 무게 감소를 보고했으나, 우리 실험에서는 키토산에 의한 체중이나 간 무게 감소 효과는 나타나지 않았다. 이는 Gallaher의 실험에 비해 우리 실험에서 보충한 키토산의 양이 1/10 정도 밖에 되지 않아 이러한 키토산의 체중 감소효과가 나타나기에는 부족했던 것으로 사료된다.

Table 5. Effects of oligo-chitosan or chitosan on slaughter weight (SW), liver weight (LW), liver weight (LW) rate, kidney weight (KW) and kidney weight (KW) rate by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.

Items	SW(g)		LW(g)		LW rate (LW/SW, %)		KW(g)		KW rate (KW/SW, %)	
	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr
hC ¹⁾	302.1±19.9 ^a	278.4±5.6 ^{ab}	15.1±2.4 ^a	11.5±0.4 ^{bc}	5.0±0.7 ^a	4.1±0.2 ^b	2.7±0.0 ^a	2.4±0.1 ^{ab}	0.91±0.0 ^{ab}	0.84±0.0 ^{bc}
hCo ²⁾	231.6±39.7 ^b	236.5±44.7 ^b	10.8±3.1 ^{bc}	9.7±2.6 ^c	4.6±0.5 ^{ab}	4.0±0.4 ^b	2.1±0.2 ^b	2.1±0.4 ^b	0.91±0.1 ^{ab}	0.88±0.0 ^{ab}
hCc ³⁾	256.8±43.4 ^{ab}	293.2±6.4 ^a	13.5±1.3 ^{ab}	11.7±0.5 ^{bc}	5.3±0.8 ^a	4.0±0.2 ^b	2.4±0.4 ^{ab}	2.3±0.1 ^{ab}	0.94±0.0 ^a	0.80±0.0 ^c
-C ⁴⁾	289.7±9.3 ^a	285.9±6.3 ^a	10.3±0.5 ^b	10.3±0.6 ^b	3.5±0.1 ^c	3.6±0.2 ^c	2.4±0.2 ^a	2.2±0.2 ^{ab}	0.83±0.0	0.75±0.1
HC ⁵⁾	292.3±25.9 ^a	279.4±15.1 ^a	13.7±1.1 ^a	11.5±0.7 ^b	4.7±0.2 ^a	4.1±0.1 ^b	2.3±0.1 ^{ab}	2.1±0.0 ^b	0.8±0.1	0.75±0.0
HCO ⁶⁾	229.7±28.4 ^b	188.8±30.4 ^c	10.3±2.6 ^b	6.0±1.7 ^c	4.4±0.6 ^{ab}	3.1±0.4 ^c	1.8±0.3 ^c	1.5±0.2 ^d	0.74±0.2	0.82±0.2

* The value was mean±SD, ^{abc} was significant differences by Duncan.(p<0.05)

¹⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

²⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

³⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

4) 혈청의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 비율 및 총 중성지방 농도
혈청의 TC 농도는 0.5% 콜레스테롤 급여에 따라 유의적($p<0.05$)으로 증가했으나
0.25% 콜레스테롤 급여군에서의 혈청 TC는 -C군보다도 오히려 낮은 경향을 보였다. 혈
청 TG는 hC군보다는 hCo군에서, HC와 HCO군보다는 -C군에서 유의적($p<0.05$)으로 높
았다. 0.25% 콜레스테롤 급여실험에서, 혈청 TC, HDL-C, HDL-C 비율은 군 간에 차이가
없었고, 0.5% 콜레스테롤 급여실험에서 혈청 TC, HDL-C, TG 모두 군별로 다른 경향을
나타내었다. 즉, 5% 키토산올리고당 보충에 따라 HDL-C 농도가 감소했고, 0.5% 콜레스
테롤 급여에 따라 TC는 증가하고 TG는 감소했다.

절식시간 증가는 0.25% 콜레스테롤 급여군에서 혈청 TC와 HDL-C에는 영향을 미치지
못했고, hCo군에서 혈청 TG농도를 유의적($p<0.05$)으로 감소시켰다. 0.5% 콜레스테롤 급
여 시 HCO군에서 혈청 TC농도가 유의적($p<0.05$)이고 극심하게 감소되었고, 반면, 절식시
간이 증가했음에도 혈청 TG는 유의적($p<0.05$)으로 증가되었다.

식이 중 지방(3% 또는 45% 버터) 함량이나 46 kDa 키토산올리고당 보충은 혈청 TG에
영향을 미치지 않았으며, 혈청 TC 농도만이 식이의 지방함량이 증가함에 따라 유의적으
로 증가했고, 46 kDa 키토산올리고당 보충에 따라 유의적으로 감소했다고 보고되었고
(Sumiyoshi와 Kimura, 2006), Yu 등(2015)도 고지방식이(15.8% fat+1.25% 콜레스테롤)을
급여한 apoE^{-/-} mice에서 키토산올리고당(1 kDa; 250 mg/kg/day와 1000 mg/kg/day) 보
충수준에 따라 유의적($p<0.05$ 또는 $p<0.01$)으로 혈청 TC과 TG가 감소했다고 보고했다.
하지만 우리 실험에서는 키토산올리고당 보충이 체중이나 간 무게 감소에 영향을 준 것
에 비해 혈청 TC나 HDL-C 에는 영향을 미치지 못했으며 혈청 TG는 오히려 증가했다.
Yang 등(2011)은 rat이 혈청 TC의 대부분을 HDL-C를 통해 운반하기 때문에 혈청 TC의
제거능력이 매우 높고, 콜레스테롤 섭취에 따른 고 중성지방혈증 유발이 어려워 0.1% 콜
레스테롤과 10% 라드를 4주 동안 급여한 기니피그에서는 혈청의 TC, LDL-C, TG, 지방
산의 농도가 유의적으로 증가했으나, 쥐에서는 영향이 없었고, 반대로 쥐의 간 TG는 급
격하게 증가한 반면, 기니피그에서는 영향이 없었다고 보고한 바 있다. 우리 실험에는 실험
동물로 쥐를 사용했기 때문에 mice를 사용한 Yu 등(2015)의 연구에 비해 혈청 TC나
TG 수준의 변화가 다르게 나타난 것으로 사료된다.

Table 6. Effects of oligo-chitosan or chitosan on serum total cholesterol (sTC), serum HDL-cholesterol (srHDL-C) rate, serum LDL-cholesterol (sLDL-C) and serum triglyceride (sTG) by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.

Items	sTC(mg/dl)		sHDL-C(mg/dl)		sHDL-C rate (sHDL-C/sTC, %)		sTG(mg/dl)	
	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr	12hr	24hr
hC ¹⁾	101.1±20.2	95.0±8.8	50.1±2.9	56.9±6.2	51.1±11.7 ^{ab}	60.1±7.6 ^{ab}	62.0±13.4 ^b	57.5±15.1 ^b
hCo ²⁾	83.6±3.6	97.1±19.6	38.4±1.4	58.1±21.4	45.9±1.3 ^b	62.4±25.7 ^{ab}	88.4±14.9 ^a	56.2±17.1 ^b
hCc ³⁾	102.1±11.6	80.9±14.3	48.0±6.2	56.9±10.3	47.3±7.0 ^{ab}	70.4±4.3 ^a	71.1±16.5 ^{ab}	50.0±10.4 ^b
-C ⁴⁾	117.1±7.3 ^c	104.9±5.0 ^c	40.4±2.2 ^a	44.9±4.5 ^a	34.6±3.0 ^{abc}	42.7±2.3 ^{ab}	66.7±24.8 ^a	85.1±7.7 ^a
HC ⁵⁾	207.0±94.4 ^{ab}	132.7±20.0 ^{bc}	42.2±3.6 ^a	43.6±16.8 ^a	27.2±21.0 ^{bc}	34.0±16.8 ^{abc}	36.9±6.5 ^b	65.4±14.7 ^a
HCO ⁶⁾	239.5±74.2 ^a	58.0±26.4 ^c	24.2±5.1 ^b	31.6±11.2 ^{ab}	11.0±4.0 ^c	61.2±34.2 ^a	41.3±7.1 ^b	32.6±11.7 ^b

* The value was mean±SD, ^{abc} was significant differences by Duncan.(p<0.05)

¹⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

²⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

³⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

5) 간의 총 콜레스테롤 및 총 중성지방 함량

간 TC와 TG는 콜레스테롤 급여수준이 높아짐에 따라 증가했다. 0.25% 콜레스테롤 급여 시 간의 TC와 TG 함량은 군 간의 차이가 없었으며, 0.5% 콜레스테롤 급여실험에서는 ITC는 HCO, HC, -C군 순으로 유의적(p<0.05)으로 감소했고, TG는 HC, HCO, -C군 순으로 유의적(p<0.05)으로 감소했다. 특히 0.5% 콜레스테롤을 급여한 HC군에서의 TG농도 증가가 전체 군들에 비해 월등했다. 한편, 절식시간 증가에 따른 간의 지질농도 변화는 0.25% 콜레스테롤 급여 군에서만 관찰되어 절식시간 24시간으로 증가됨에 따라 hCo군에서 TC가 유의적(p<0.05)으로 증가하였다.

Table 7. Effects of oligo-chitosan or chitosan on liver total cholesterol (ITC) and liver triglyceride (ITG) by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.

Items	ITC(mg/g)		ITG(mg/g)	
	12hr	24hr	12hr	24hr
hC ¹⁾	16.9±0.1 ^{bc}	18.0±1.2 ^{ab}	33.4±3.6	39.5±7.8
hCo ²⁾	16.8±0.4 ^c	18.2±0.3 ^a	36.4±2.2	42.0±5.7
hCc ³⁾	17.6±0.6 ^{abc}	18.1±0.4 ^a	43.0±2.8	41.3±7.9
-C ⁴⁾	4.7±0.2 ^c	5.0±1.6 ^c	19.2±1.3 ^c	17.2±4.2 ^c
HC ⁵⁾	40.4±1.0 ^b	37.9±5.3 ^b	112.1±6.5 ^a	113.9±8.8 ^a
HCO ⁶⁾	45.0±1.9 ^a	44.7±1.9 ^a	82.6±13.2 ^b	77.8±9.7 ^b

* The value was mean±SD, ^{abc} was significant differences by Duncan.(p<0.05)

¹⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

²⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

³⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

LeHoux와 Grondin(1993)은 3주간 1% 콜레스테롤 식이에 7.5%로 보충해준 70 kDa의 키토산은 쥐에서 혈청과 간의 TC 수준을 각각 54%와 64%로 낮춰주었고 HMG-CoA reductase의 활성을 크게 감소시켰다고 보고했다. 하지만 본 실험에서 사용한 키토산올리고당의 보충수준(1%와 5%)은 위의 혈청과 간의 콜레스테롤 감소효과를 확실하게 나타내기에는 부족함이 있어 보였고, 식이에 배합하여 키토산올리고당을 보충했던 본 실험과는 달리 Sumiyoshi와 Kimura(2006)는 별도로 키토산올리고당 수용액을 경구투입 하였다. 두

실험의 급여방법이 달랐기 때문에 실제 실험동물에서 흡수된 키토산올리고당의 량도 다를 수 있고, 생체 내에서의 작용도 다를 수 있어 결과적으로 실험결과에도 차이가 난 것으로 보인다. 또한 본 실험은 일반적인 혈중 콜레스테롤 감소효과를 실험하는 실험모델(6~8주)에 비해 사육기간이 4주로 짧았고, 대부분 200~250 g 체중(BW)의 쥐를 사용하는 데 반해 상대적으로 어린 쥐(4~5주령, 80~130 g BW)를 사용하여 세밀하게 조절되는 콜레스테롤 대사에 있어서 식이나 보충의 효과를 확인하기에는 어려움이 있었다. Anandan 등(2013)이 어린 쥐와 늙은 쥐에게 키토산의 항노화효과를 확인한 실험에서도 120~150 g BW(2~3월령) 쥐에서는 350~400 g BW(20~25월령) 쥐에서 관찰되었던 2% 키토산 보충에 따른 혈청 TC, HDL-C, LDL-C 농도변화가 관찰되지 않았다.

6) GOT, GPT 활성도

간의 GOT는 0.25% 콜레스테롤 급여실험에서 hC, hCc군에 비해 hCo군에서 유의적(p<0.05)으로 높았으나, GPT는 군 간의 차이가 없었다. 0.5% 콜레스테롤 급여실험에서는 GOT, GPT 모두 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 절식시간에 따른 GOT, GPT 활성변화도 나타나지 않았다.

Table 8. Effects of oligo-chitosan or chitosan on serum glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate-pyruvate transaminase (GPT) level by fasting time in rats fed with high-cholesterol diets.

Items	GOT(IU/ℓ)		GPT(IU/ℓ)	
	12hr	24hr	12hr	24hr
hC ¹⁾	65.2±4.0 ^b	69.1±11.7 ^b	19.3±3.4	18.6±3.0
hCo ²⁾	96.9±33.5 ^a	97.1±17.4 ^a	21.4±7.0	21.2±2.4
hCc ³⁾	64.0±6.9 ^b	77.8±5.1 ^{ab}	19.6±2.7	17.5±1.7
-C ⁴⁾	89.3±8.2	87.1±8.1	25.1±2.5	27.8±1.7
HC ⁵⁾	86.6±10.3	86.2±11.2	17.5±4.5	18.4±0.9
HCO ⁶⁾	99.9±21.9	113.4±36.0	22.1±4.3	34.1±31.0

* The value was mean±SD, ^{abc} was significant differences by Duncan.(p<0.05)

¹⁾high cholesterol positive control diet (hC) cholesterol 0.25%.

²⁾high cholesterol diet (hC) + oligo-chitosan (o) 1.0%.

³⁾high cholesterol diet (hC) + chitosan (c) 1.0%.

⁴⁾cholesterol free negative control diet (-C)

⁵⁾High cholesterol positive control diet (HC) cholesterol 0.5%

⁶⁾High cholesterol diet (HC) + Oligo-chitosan (O) 5.0%

실험결과를 종합해보면, 0.25% 콜레스테롤 급여와 0.5% 콜레스테롤 급여 사이에 일일 증체량과 체내 지질 구성변화에 대해 차이를 보였다. 0.25% 콜레스테롤 급여는 일일 증체량에 대한 기여가 컸으며 혈청 TC는 -C군에 비해 오히려 감소하는 경향을, 혈청 TG는 비슷한 경향을 보였다. 반면, 0.5% 콜레스테롤 급여는 -C군에 비해 혈청 TC는 약 2배가량 확연한 증가를, 반대로 혈청 TG는 반으로 감소하는 모습을 나타냈다. 간에서는 TC와 TG 모두 콜레스테롤 급여농도에 비례하여 급격하게 증가했다. 한편, 키토산의 보충은 대조군(hC군)에 비해 일일증체량이나 혈청 및 간의 지질 구성변화에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이에 비해 키토산올리고당의 보충은 콜레스테롤 급여에 따른 일일 증체량 증가를 유의적($p<0.05$)으로 감소시켰고 1% 키토산올리고당 급여군에서 혈청 TG를 유의적($p<0.05$)으로 증가시켰고 혈청 TC는 미미하게 감소시키는 경향을 나타냈다. 반대로 5% 키토산올리고당 보충군에서 혈청 TC를 유의적($p<0.05$)으로 증가시켰고 간 TG는 유의적($p<0.05$)으로 감소시켜 콜레스테롤 농도에 따라 키토산올리고당의 효과가 달라졌다.

본 실험에서 관찰된 생체 내 콜레스테롤 지표변화와 관련하여 키토산이나 키토산올리고당 보충과 절식시간 증가에 의한 효과는 다음의 네 가지 가능성을 나타내었다고 추정해볼 수 있다. 첫 번째는 키토산이나 키토산올리고당의 양이온과 콜레스테롤의 수산기의 상호작용으로 인해 NPC1L1의 NTD에 콜레스테롤이 결합하지 못하여 소장강에서 NPC1L1의 콜레스테롤 흡수 개시를 저해했을 가능성이 있다. 햄스터에서 소장내용물의 점도 증가는 혈청과 간의 콜레스테롤 감소와 큰 연관성이 있다(Gallaher 등, 1993)는 보고도 있지만 고지방식을 공급한 쥐에서 glucomannan은 점성증가에 따라 18.2%의 콜레스테롤 흡수저해효과를 나타내었고, 키토산은 확인되지 않은 다른 기전에 의해 20.2%의 콜레스테롤 흡수저해효과를 나타내었다(Gallaher 등, 2000). 또 *in vitro*에서는 키토산 무게의 4배가량의 지질을 흡착(결합)할 수 있다고 알려져 있어(Guha 등, 2005) 키토산의 콜레스테롤 배출효과는 음이온교환능력과 더 직접적인 연관성이 있어 보인다. 본 실험에서는 지방을 흡착하는 능력이 뛰어난 키토산과 키토산올리고당을 식이와 분리해서 공급한 것(i.e. 경구 투입)이 아니라 다른 성분들과 함께 배합하여 공급함으로써 실험동물이 섭취하기 전에 사료 내에서 이미 많은 양의 지질과 콜레스테롤이 키토산이나 키토산올리고당에 흡착된 상태로 있었을 가능성이 많다. 이렇게 되면 체내에서 식이 콜레스테롤의 유입량이 부족하다고 감지하여 오히려 간에서의 생합성을 촉진시킴으로써 체내 콜레스테롤 함량을 상승시킬 수 있다. 또한 이러한 문제는 키토산이나 키토산올리고당의 콜레스테롤 감소효과는 약

화시켰지만 실제로 급여된 콜레스테롤 양을 감소시켰을 수 있다. 이 때문에 0.25% 콜레스테롤 급여군에서는 실험에서 의도했던 것보다 훨씬 더 적은 양의 콜레스테롤이 공급되었을 가능성이 있으며 이것이 체내 콜레스테롤의 항상성 유지에 긍정적인 영향을 미치게 된 것 같다. 실험동물에게 고콜레스테롤 식이(0.25% 콜레스테롤 공급)를 공급했지만 위에 설명한 사유로 실제 흡수된 콜레스테롤의 양은 적어져 혈청의 TC나 HDL-C의 농도를 상승시키지 않으면서도 간에서의 콜레스테롤 생합성을 저해할 만큼의 적당한 수준으로 공급되었을 수 있다. 반면 콜레스테롤이 전혀 없는 식이를 공급받은 -C군은 식이로 공급되는 콜레스테롤이 전혀 없어 간에서의 콜레스테롤 생합성이 현저하게 증가됨으로 오히려 hC군보다도 더 혈청 TC수준을 높아지는 예상치 못한 결과가 나타났다. 본 실험을 통해 고콜레스테롤혈증을 가진 환자에게 콜레스테롤 섭취를 완전히 제한하는 것보다는 적절한 수준의 콜레스테롤 섭취가 체내 콜레스테롤 항상성 유지에 긍정적인 영향을 줄 수 있다는 가능성을 확인하였다.

두 번째는 키토산올리고당은 분자량이 작아 소장막을 통과하여 소장세포 내로 유입되어 세포 내에서의 콜레스테롤의 대사에 직접 영향을 주었을 가능성이 있다. 쥐에서 키토산의 분자량에 따른 소장에서의 흡수율 차이를 확인한 Chae 등(2005)의 연구를 보면 비교적 분자량이 작은 3.8 kDa나 7.5 kDa의 키토산은 십이지장과 공장(jejunum)에서 세포막을 통과하여 흡수되었다. 소장에서 다량의 식이 콜레스테롤 흡수를 증계하는 NPC1L1은 NPC1L1 N-말단 도메인(NTD)에 콜레스테롤이 결합되면 주위 세포막에 콜레스테롤의 유입되도록 촉진한다고 보고되었다(Wang과 Song, 2012). 이렇게 세포 내로 유입된 NPC1L1은 콜레스테롤의 필요정도에 따라 ERC와 세포막을 순환하면서 콜레스테롤 흡수를 매개하므로(Ge 등, 2008) NTD와 콜레스테롤의 결합으로 촉발되는 NPC1L1의 위치변화와 콜레스테롤 흡수 능력은 밀접한 관계가 있다고 볼 수 있다. ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)는 후기 내포/리소솜에서 apoA-1으로 콜레스테롤을 전달하여 HDL-C를 형성하도록 도와 체내의 콜레스테롤을 감소시킨다고 한다(Denis 등, 2008). 우리가 실험에서 사용한 키토산올리고당의 분자량은 1~3 kDa이었으므로 충분히 실험동물의 소장막을 통과할 수 있었을 것이다. 세포막을 통과한 키토산올리고당은 콜레스테롤과 결합하여 ACAT나 ABCA1의 작용을 방해했을 가능성이 있으므로 소장내부로 흡수된 식이 콜레스테롤이 다른 조직으로 전달되지 못하고 결과적으로 많은 양의 콜레스테롤이 소장세포 내에 축적될 수 있다. 이것이 세포막을 통과하지 못하는 키토산에 비해 키토산을

리고당을 보충했을 때 혈청 HDL-C의 농도가 일률적으로 낮아진 원인이 될 수 있다. 또한 세포막에서 콜레스테롤과 결합된 채로 NPC1L1와 함께 키토산올리고당을 내재화되어 세포막과 ERC 사이의 NPC1L1의 이동을 지연시키고 이 때문에 간에서의 콜레스테롤 생합성이 촉진된 것으로 예상할 수도 있다.

세 번째는 키토산이나 키토산올리고당의 보충으로 인해 변화된 체내 콜레스테롤 대사가 절식시간 증가에 따라 그 변화폭이 더욱 확대된 것이다. Malhotra 등(2013)은 CaCo-2 세포와 C57BL6 mice의 소장에서도 24시간동안 포도당을 제거(절식)했을 때 NPC1L1 mRNA와 NPC1L1의 발현이 유의적으로 감소했다고 보고했다. 반대로 높은 포도당 농도는 직접적으로 소장 상피세포의 NPC1L1 발현에 영향을 주어 NPC1L1의 발현을 증가시킨다고 보고하였다(Gylling 등, 2004)고, Ravid 등(2008)도 고농도의 포도당은 CaCo-2 세포에서 NPC1L1 발현을 증가시키고, SR-B1 단백질의 양과 HMG-CoA reductase의 활성도도 감소시켰다고 보고하였다. 5% 콜레스테롤의 6주간 급여나 48시간 절식에 따라 쥐에서 간의 콜레스테롤 생합성은 현저하게 감소했다고 한다(Dietschy와 Siperstein, 1967). 본 실험에서도 0.25% 콜레스테롤 급여군에 비해 0.5% 콜레스테롤 급여군에서 절식시간에 따른 콜레스테롤 생합성 저해가 가속된 것으로 볼 수 있다. 본 실험에서 절식시간 증가에 따라 상대적인 간 무게는 모든 군에서 감소하는 경향을 보였으며, 특히 0.25% 콜레스테롤 급여와 1% 키토산을 보충한 hCc군에서 유의적($p < 0.05$)인 감소를 보여 같은 농도의 콜레스테롤 급여군 중에서 상대적인 간 무게가 가장 높았던 hCc군에서 절식에 따른 간 무게 감소가 더 두드러져 보였다. 24시간으로 절식시간 증가에 따른 간의 지질구성 변화는 없었으나, 혈청의 TC는 5% 키토산올리고당 보충군(HCO군)에서 12시간 절식에 비해 1/4정도로 감소하여 대조군(-C군)과 비슷한 수준을 나타내었다. 다른 직접적인 분석결과가 없어 단정할 수는 없지만 우리 실험에서도 0.5% 콜레스테롤의 급여와 키토산올리고당의 섭취에 따라 소장에서의 콜레스테롤 생합성이 어느 정도 저해되었고, 24시간 절식에 따라 낮은 포도당 농도로 인한 콜레스테롤 생합성 저해가 가속되어 상대적인 간 무게와 혈청 TC의 급격한 감소로 이어진 것으로 추측된다. 이에 비해 0.5% 콜레스테롤만 지속적으로 급여되었던 HC군이나 정상식을 급여했던 -C군에서는 절식시간 증가에 따른 혈청의 TC 감소효과가 유의적으로 나타나지 않아 이러한 추론을 뒷받침해주고 있다.

네 번째, 소장강에 있는 높은 농도의 식이 콜레스테롤 또는 세포막에 일부 결합된 콜레스테롤의 양이 NPC1L1에 의한 흡수 성공여부와 상관없이 소장막에서의 콜레스테롤 농도

를 감지하는 여러 효소들의 활성화에 영향을 미쳤기 때문이라 볼 수도 있다. 담즙은 콜레스테롤을 유화시켜 미셀을 형성하고 미셀은 소장막과 융합하여 세포막에 콜레스테롤을 포화시킨다. 세포막의 콜레스테롤은 스피고미엘린(sphingomyeline; SM)과 결합하여 지질뿔막 도메인을 형성하고, 이러한 지질뿔막 도메인은 세포신호에 관여한다고 한다(Simons와 Ikonen, 1997). Das 등(2014)에 따르면 세포막에는 가변성 급원, SM-격리 급원, 세포가 살아있는 한 어떤 경우에도 변하지 않는 필수 급원, 총 3가지 콜레스테롤 급원이 있어 세포막에서 가변성 급원이 확장되면 일부가 ER로 이동하여 ER 막의 콜레스테롤 농도가 5 mol% 초과되면 SCAP/Insig/SREBP 시스템을 이용한 콜레스테롤 조절과 ACAT를 통한 에스테르화를 개시된다. 이로써 세포 내의 콜레스테롤 생합성은 저해하고 신속하게 콜레스테롤을 세포 외로 배출하도록 해 세포 내 콜레스테롤 농도를 적정수준으로 유지한다고 한다. Yu 등(2015)의 연구에서는 WT mice에서보다 apoE^{-/-} mice에서, 그보다는 고지방 식이를 급여한 경우 키토산올리고당의 보충효과가 더 커져 non-HDL 분획에서의 콜레스테롤과 TG 농도를 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. 또한, Jia 등(2010)은 L1-KO(NPC1L1-결핍) mice에게 저 콜레스테롤과 고지방식에 비해 고콜레스테롤과 고설탕식을 급여한 경우 간 TC와 TG가 유의적으로 감소했다고 보고했다. 소장막에 NPC1L1이 없는 상태에서도 고농도의 식이 콜레스테롤은 세포내에서 콜레스테롤 합성을 현저하게 감소시켜 간의 지질농도를 낮출 수 있었다.

본 실험에서는 쥐를 사용한 실험모델 구성의 한계와 생체시료 분석범위의 한계 때문에 절식과 콜레스테롤 급여에 따른 정확한 체내 콜레스테롤 대사 변화를 명확하게 설명할 수는 없었다. 다만, 키토산올리고당이나 키토산이 혈청이나 간에서의 지질대사 변화를 유도하는 여러 가능성이 있으며, 콜레스테롤 급원에 대한 조절에 관여하는 요인들은 매우 다양하다는 것을 알 수 있었다. 콜레스테롤 항상성을 유지하려고 하는 기전 역시 잘 발달되어 있어 체내 콜레스테롤을 조절하는 실험결과를 도출하기 위해서는 보다 정교하게 실험모델을 구성할 필요가 있었다. 특히 적당량의 콜레스테롤 섭취는 체내의 콜레스테롤 지표들(특히 HDL-C)에 일부 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 가능성이 있으며, 24시간 절식에 따라 나타난 소장막에서의 NPC1L1 발현이나 콜레스테롤 생합성 기전 변화가 정상적인 식이공급에 따라 어떻게 변화되는 지 향후 연구에서 확인할 필요가 있다. 이를 통하여 체내 콜레스테롤 생합성이나 배출에 관여하는 여러 효소들의 활성화에 긍정적인 영향을 미치는 적정 콜레스테롤 섭취량에 대한 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

5. 요약

본 실험에서는 식이로 콜레스테롤 농도를 달리하여 공급한 군에서 콜레스테롤 흡수저해제인 키토산과 키토산올리고당의 처리가 쥐에서 어떠한 대사적인 변화를 유도하는지 확인하고, 절식시간 증가가 키토산 등의 콜레스테롤 감소효과와 콜레스테롤의 지표들에 어떤 영향을 미치는 지 확인하고자 하였다. 콜레스테롤 급여농도는 2수준(0.25%와 0.5%)으로 하여 쥐의 사료에 4주간에 걸쳐 1%, 5%의 키토산 또는 키토산올리고당의 보충하였고 도살하기 전의 절식시간을 12시간과 24시간으로 달리하여 체내 지질대사 변화를 비교하였다. 전체적인 실험결과를 보면 0.25% 콜레스테롤의 급여는 일일 증체량과 사료효율이 유의적($p<0.05$)으로 증가했음에도 체내의 콜레스테롤 균형과 혈청의 TC, TG농도는 정상 수준을 유지하였다. 또한 1% 키토산올리고당의 보충은 혈청 HDL-C 비율과 간의 TC를 낮추었으나, TG농도는 유의적($p<0.05$)으로 상승시켰으며, 5% 키토산올리고당의 보충은 식이 콜레스테롤 급여에 따라 증가된 체중과 상대적인 간 무게를 유의적으로 감소시켰다. 또한, HDL-C 수준과 비율, 간의 TG농도를 현저하게 감소시켰고, 간의 TC는 약간 상승시켰다. 한편 0.25% 콜레스테롤 급여실험에서 기존의 키토산에 의한 콜레스테롤 조절기전과는 다른 결과들이 도출되었다. 1% 키토산은 혈청의 TC농도는 약간 낮았으나, 간에서의 TC와 TG 농도를 약간 증가시켰다. 즉, 키토산은 간의 무게와 절식시간 증가에 따라 혈청 콜레스테롤 농도를 감소시켰다. 키토산과 키토산올리고당은 사료 내에서 이미 지질과 콜레스테롤과 흡착하여 전반적인 지질과 콜레스테롤 흡수를 저해시켰을 가능성도 있는 것으로 추정되었는데, 이 때문에 콜레스테롤을 전혀 급여하지 않은 -C군과 0.25% 콜레스테롤 급여군의 혈청 TC가 비슷했고, HDL-C 농도나 비율이 0.25% 콜레스테롤 급여군에서 더 높아졌다. 반대로 간의 TC와 TG 농도는 -C군에 비해 0.25% 콜레스테롤 급여군에서 높았다. 한편, 0.25% 콜레스테롤 급여군에서는 절식시간 증가에 따라 혈청의 HDL-C비율은 일률적으로 높아지고, TG농도는 일률적으로 낮아지는 경향을 보여, 혈청과 간의 TG농도에서 12시간 절식 시와 비슷하거나 높은 수준을 나타내었던 0.5% 콜레스테롤 급여군과는 다르게 절식시간 증가에 따라 0.25% 콜레스테롤 급여군에서 체내 지질대사변화가 긍정적인 방향으로 변화하였다. 콜레스테롤을 전혀 급여하지 않은 -C군에 비해 0.25% 콜레스테롤 급여 시 사료에 배합되었던 키토산이나 키토산올리고당이 지질과 콜레스테롤을 흡착하여 예상했던 것보다 흡수된 콜레스테롤 양이 적었던 것으로 추정된

다. 이 때문에 체내 콜레스테롤 대사에 영향을 미쳐 적절한 콜레스테롤의 섭취가 혈청 콜레스테롤 농도에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료되었다.

이번 실험에서는 실험모델 구성의 한계 때문에 절식과 콜레스테롤 급여에 따른 정확한 체내 콜레스테롤 대사 변화를 명확하게 설명할 수는 없었지만, 키토산올리고당이 혈청이나 간에서의 지질대사 변화를 유도하는 여러 가능성이 있으며, 콜레스테롤 급원에 대한 조절에 관여하는 요인들은 매우 다양하고, 콜레스테롤 항상성을 유지하려고 하는 기전 역시 잘 발달되어 있어 정확한 실험결과를 도출하기 위해서는 보다 정교하게 실험모델을 구성할 필요가 있었다. 적당량의 콜레스테롤 섭취도 체내의 콜레스테롤 지표들(특히 HDL-C)에 일부 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 가능성이 있으므로 추가적인 연구를 통해 장기적인 식이 콜레스테롤 흡수저해가 체내 콜레스테롤 생합성이나 배출에 관여하는 여러 효소들의 활성화에 미치는 영향에 대해 조사할 필요가 있을 것으로 사료된다.

6. 참고문헌

- Alfin-Slater RB and Aftergood L. Lipids. Goodhart RS, Shils ME (Eds.), Modern Nutrition in Health and Disease (6th ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, PA (1980) 113-141
- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. Science (2004) 303(5661): 1201-1204
- Anandan R, Ganesan B, Obulesu T, Mathew S, Asha KK, Lakshmanan PT, Zynudheen AA. Antiaging effect of dietary chitosan supplementation on glutathione-dependent antioxidant system in young and aged rats. Cell Stress Chaperones (2013) 18(1): 121-125
- Arvanitoyamis IS, Nakayama A, Aiba S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. Carbohydr Polym (1998) 37: 371-382
- Ausar SF, Morcillo M, Leon AE, Ribotta PD, Masih R, Vilaro Mainero M, Amigone JL, Rubin G, Lescano C, Castagna LF, Beltramo DM, Dias G, Bianco ID. Improvement of HDL- and LDL-cholesterol levels in diabetic subjects by feeding bread containing chitosan. J Med Food (2003) 6: 397-399
- Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol (1959) 37: 911-917
- Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Sci (1986) 232: 34-47
- Chae SY, Jang MK, Nah JW. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosan. J Control Release (2005) 102: 383-394

- Chang TY and Chang C. Ezetimibe blocks internalization of the NPC1L1/cholesterol complex. *Cell Metab* (2008) 7(6): 469-471
- Choi JH. A study on fatty acid pattern in brain and liver tissues of developing chicken embryos. (1987) MS Thesis. Korea University
- Das A, Brown MS, Anderson DD, Goldstein JL, Radhakrishnan A. Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *eLife* (2014) 3: e02882
- Davis HR, Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* (2004) 279: 33586 - 33592
- Denis M, Landry YD, Zha X. ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *J Biol Chem.* (2008) 283(23): 16178-16186
- DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* (2008) 18: 609-621
- Dietschy JM and Siperstein MD. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J Lipid Res* (1967) 8: 97-104
- Dietschy JM and Wilson JD. Regulation of cholesterol metabolism. *N Engl J Med* (1970) 282: 1128-1138
- Edward PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1529: 103-113
- Gallaher CM, Munion J, Hesslink Jr R, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol

reduced by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr* (2000) 130: 2753-2759

Gallaher DD, Hassel CA, Lee KJ. Relationships between viscosity of hydroxypropyl methylcellulose and plasma cholesterol in hamsters. *J Nutr* (1993) 123: 1732-1738

Guha S, Pal SK, Chatterjee N, Sarkar G, Pal S, Guha S, Basu AK, Banerjee R. Effect of chitosan on lipid levels when administered concurrently with atorvastatin - a placebo controlled study. *Journal of the Indian Medical Association* (2005) 103(8): 418-420

Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, Li BL, Song BL. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Met* (2008) 7: 508-519

Goldstein JL and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* (1990) 343: 425-430

Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. (2006) 124: 35-46

Gylling H, Tuominen JA, Koivisto VA, Miettinen TA. Cholesterol metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes* (2004) 53: 2217 - 2222

Hossain S, Rahman A, Kabir Y, Shams AA, Afros F, Hashimoto M. Effects of shrimp (*Macrobracium resenberghii*)-derived chitosan on plasma lipid profile and liver lipid peroxide level in normo- and hypercholesterolaemic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2007) 34: 170-176

Jia L, Ma Y, Liu G, Yu L. Dietary cholesterol reverses resistance to diet-induced weight gain in mice lacking Niemann-Pick C1-like 1. *J Lipid Res*. (2010) 51: 3024-3033

Kim JN, Chang IY, Kim HI, Yoon SP. Long-term effects of chitosan

oligosaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Islets* (2009) 1(2): 111-116

Lammert F and Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology* (2005) 129: 718-734

Lee AG. Biological membranes: the importance of molecular detail. *Trends Biochem Sci* (2011) 36(9): 493-500

Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* (2004) 1666: 62-87

LeHoux JG and Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology* (1993) 132(3): 1078-1084

Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T, Takekawa W, Terada A, Hara H, Mitsuoka T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotech Biochem* (1993) 57: 1439-1444

Malhotra P, Boddy CS, Soni V, Saksena S, Dudeja PK, Gill RK, Alrefai WA. D-Glucose modulates intestinal Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) gene expression via transcriptional regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2013) 304(2): G203-210

Nam KS and Shon YH. Suppression of metastasis of human breast cancer cells by chitosan oligosaccharides. *J Microbiol Biotechnol* (2009) 19: 629-633

Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Rudel LL. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J Lipid Res* (2012) 53(1): 95-104

Othman RA, Myrie SB, Jones PJ. Non-cholesterol sterols and cholesterol metabolism in sitosterolemia. *Atherosclerosis*. (2013) 231(2): 291-299

- Portincasa P and Wang DQ. Intestinal absorption, hepatic synthesis and biliary secretion of cholesterol: Where are we for cholesterol gallstone formation? *Hepatology* (2012) 55(5): 1313-1316
- Ravid Z, Bendayan M, Delvin E, Sane AT, Elchebly M, Lafond J, Lambert M, Mailhot G, Levy E. Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2008) 295(5): G873-885
- Simons K and Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. (1997) 387(6633): 569-572
- Siperstein MD and Fagan VM. Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* (1966) 241: 602-609
- Sumiyoshi M and Kimura Y. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. *J Pharm Pharmacol* (2006) 58: 201-207
- Wang LJ and Song BL. Niemann-Pick C1-like 1 and cholesterol uptake. *Biochim Biochem Acta* (2012) 1821: 964-972
- Yang R, Guo P, Song X, Liu F, Gao N. Hyperlipidemic guinea pig model: Mechanisms of triglyceride metabolism disorder and comparison to rat. *Biol Pharm Bull* (2011) 34(7): 1046-1051
- Yu Y, Luo T, Liu S, Song G, Han J, Wang Y, Yao S, Feng L, Qin S. Chitosan Oligosaccharides Attenuate Atherosclerosis and Decrease Non-HDL in ApoE^{-/-} Mice. *J Atheroscler Thromb* (2015) 22(9): 926-941
- Yuan WP, Liu B, Liu CH, Wang XJ, Zhang MS, Meng XM, Xia XK. Antioxidant activity of chito-oligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetes in rats. *World J Gastroenterol* (2009) 15: 1339-1345

감사의 글

7월의 첫날, 시원하게 쏟아지는 빗소리를 들으면서 2년여 간의 논문작업을 마무리하고 있습니다. 오랜 기간 접어두었던 박사학위를 마무리해야겠다고 마음먹었던 날부터 오늘에 이르기까지 하나님의 은혜와 예비하심이 없었더라면 이 논문은 완성되지 못했을 것입니다. 이때까지 인도해주시고, 고비마다 해결할 지혜와 포기하지 않도록 힘을 주신 하나님 아버지께 먼저 영광과 감사를 돌립니다.

늦게나마 온전하게 박사과정을 마무리할 수 있도록 제게 기회를 주시고, 내실 있는 연구가 될 수 있도록 지도를 아끼지 않으신 이왕식 지도교수님께 감사드립니다. 조용히 제 연구를 지켜봐주시고 의지가 흔들릴 때마다 끝까지 밀고 나갈 수 있도록 따뜻하게 격려해주셔서 많은 용기를 얻었습니다. 또한 제게는 많이 낮설었던 계산화학이라는 연구 분야에 대해 하나하나 가르쳐주시고, 아낌없이 지원해주시고 세심하게 지도해주신 장순민 교수님과 이 연구가 진행되는 내내 자식을 키우는 심정으로 저보다도 더 많이 고민해주시고, 열과 혼을 다해 지도해주신 윤혜진 교수님께 특별한 감사를 드립니다. 두 분 교수님의 사랑과 가르침으로 이 연구를 다시 시작할 수 있었고, 완성할 수 있었습니다. 그리고 논문심사를 주관해주시고, 제가 논문을 작성하는 내내 가장 큰 고민이었던 계산화학과 생리학의 융합에 있어서 균형 잡힌 해석방안에 대해 명쾌한 해답을 주신 김소미 교수님, 논문심사를 준비하고 진행해가면서 노심초사하던 제게 세심한 배려와 따뜻한 조언을 아끼지 않으신 정동기 교수님께도 깊은 감사드립니다.

또한 15년 전에 박사과정을 시작했을 때 동물영양학에 대한 해박한 지식으로 저를 가르쳐 주시고, 열린 마음으로 저의 엉뚱한 질문들을 들어주시고 답을 찾아주셨던 김규일 교수님께 감사드립니다. 공부의 끈을 놓지 않는 학자로서 바른 본을 보여주셨던 교수님을 지도교수로 모시고 함께 토론했던 시간들은 제게 큰 행운이었습니다. 함께 많은 동물실험을 진행할 수 있도록 지원해주시고 오랜 기간 동안 제가 박사학위를 마무리할 수 있도록 응원해주신 전유진 교수님께도 늦게나마 감사의 말씀을 드립니다.

10년도 넘게 손을 놓았던 박사과정을 다시 이어갈 수 있도록 조언해주시고, 물심양면으로 지원을 아끼지 않으신 김경환 센터장님과 문상식부장님, 김주란, 정현경 선생님, 가천대학교 공학교육혁신센터 동료들께 감사드립니다. 끝까지 저를 믿어주신 여러분들의 믿음과 기도와 배려로 연구를 다시 시작할 수 있었습니다. 직장생활과 연구를 병행하면서 힘들었던 순간마다 늘 용기를 주시고 관심 가져주신 공학인증 PD교수님들과 손성용 교수님, 장주섭 교수님, 강민식 교수님, 이원재 교수님께도 감사를 드립니다. 박사연구를 다시 시작하는 저를 위해 늘 기도해주신 양창직 목사님과 사모님, 성혜옥 목사님, 이정희 목사님, 최동혁 목사님,

한나의집 김한빛 원장님, 김영철 목사님과 사모님, 전영진 목사님과 사모님, 이근중 목사님과 사모님 덕분에 모든 과정이 순탄하게 진행될 수 있었습니다.

제주대학교에서 박사과정 공부와 동물실험을 할 때 많은 도움을 주었던 이승철, 이종언 선배님, 정오준 선배를 비롯한 연구실 식구들과 어느 날 갑자기 나타난 나이 많은 박사연구생을 따뜻하게 맞아주고 세세하게 가르쳐준 세종대학교 계산화학실험실의 김태훈 방장님, 처음부터 분자모의실험 계산을 가르쳐주고 끝까지 실험을 도와주느라 고생이 많았던 오태환, 늘 응원해준 문성욱과 다른 화학과 학생들에게도 깊은 감사의 마음을 드립니다.

2001년 박사과정을 시작할 때부터 지금까지 곁에서 기도와 아낌없는 지원을 주었던 남편 전양규 목사의 도움이 없었더라면 결코 이 논문을 완성할 수 없었습니다. 가정에서 저의 빈자리를 대신하여 두 아이들을 건사하면서도 틈틈이 논문작성과정에도 제가 미처 보지 못하는 문제들을 세심하게 검토하여 조언해주었습니다. 시간가는 줄 모르고 밤늦게까지 연구실에서 시간을 보내는 부인을 챙겨주고, 공부한다는 핑계로 딸 노릇, 며느리 노릇을 못하는 아내를 대신하여 양가 부모님들을 한결 같은 마음으로 챙겨준 남편과 늘 연구와 직장생활로 정신이 없는 엄마를 이해해주고, 엄마의 도움 없이도 자신의 일을 성실하고 책임감 있게 해온 사랑하는 두 아들 중범이와 중찬이는 저에게 늘 기쁨과 힐링을 주는 영양제였습니다.

제가 박사과정을 마치도록 간절한 마음으로 기도해주시고 논문심사 통과소식에 누구보다도 기뻐해주신 부모님과 시부모님은 어려운 과정을 이겨내는 큰 힘이 되었습니다. 그리고 항상 저를 응원해준 오빠와 가족들, 동생 혜숙이, 큰아주버님 가족들, 조카들에게도 사랑과 감사드립니다.

멀리서 제게 힘을 주고 기도해준 사랑하는 내 친구 연욱이, 소연이, 진희, 미경이, 유경이와 응원을 아끼지 않은 박인례 대표님, 김동근 부장님, 녹소연을 통해 만났던 여러분들께도 감사의 인사를 드립니다.

동물영양학을 전공했던 학생으로 계산화학이라는 새로운 분야에 도전하였던 지난 2년여 간의 시간들은 제게 자연과 과학을 이해하는 새로운 시각과 가능성을 열어주었고, 앞으로의 연구를 지속할 수 있는 용기를 주었습니다. 아직은 부족한 점이 많이 있지만 더욱 학문에 정진하여 제 논문을 위해 애써주신 모든 분들의 기대에 부응하는 성실한 연구자가 되겠습니다.

2016년 7월

주은숙