

이소화학감각수용체를 통한 건강기능식품 소재 및 신약 후보 물질 발굴

“아젤라산을 유효 성분으로 하는 건강기능식품 및 신약개발”

이성준

레오바이오주식회사 2020. 12.



1. 창업팀
2. 기술
 - 이소화학감각수용체
 - 유용 물질 발굴 플랫폼
3. 특허 사업화
4. 참고자료

■ 약력

CEO 이성준 교수

서울대 식품공학과 학사 및 석사. 미 하버드대 영양생화학 박사

고려대 생명과학대학 식품공학과 /생명공학과 교수

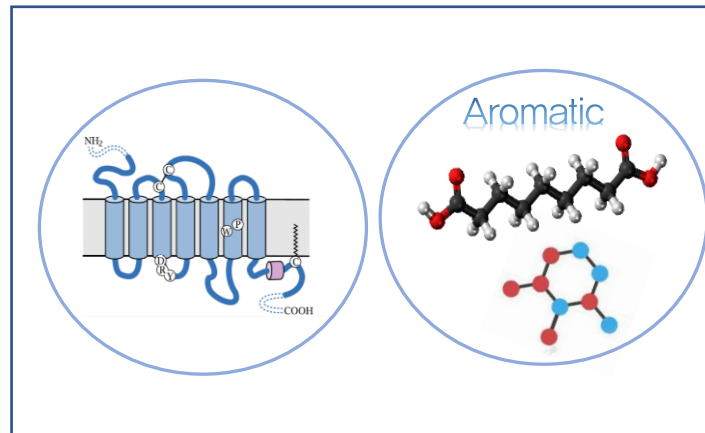
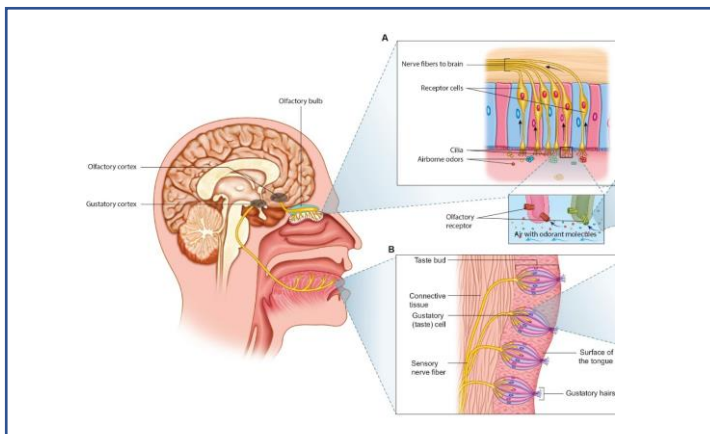
한국연구재단 생명공학단 전문위원

한국연구재단 기초연구실"이소화학감각수용체 응용연구실"과제 책임자

식약처 영양기능식품기준과 기능성원료 심의위원 역임. 한국식품과학회 건강기능식품분과 위원장

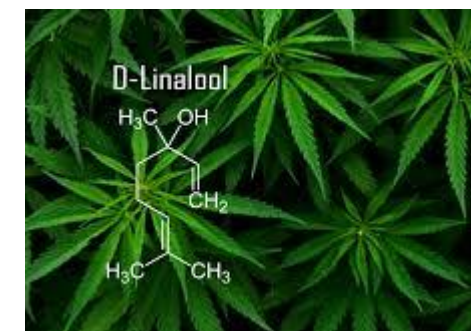


■ 이소화학감각수용체 코와 입 이외의 인체의 기관과 조직에도 존재하는 후각 및 미각 수용체

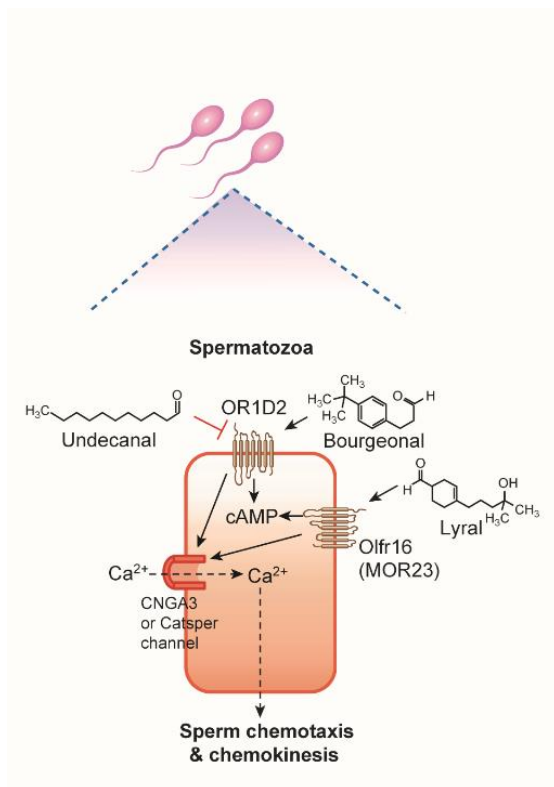


■ 풍미 성분의 건강 증진 기능 창업팀의 초기 연구 사례

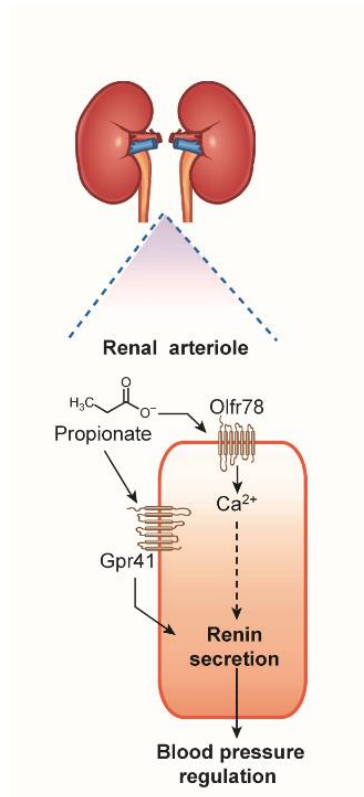
- *Melissa officinalis* essential oil: 레몬밤 정유 리나로올 Linalool이 인체 내 지질대사 조절에 관여하는 상위 유전자 조절인자 PPAR- α 의 리간드로 결합 활성화 함으로써 조직내 지방산 산화과정을 촉진



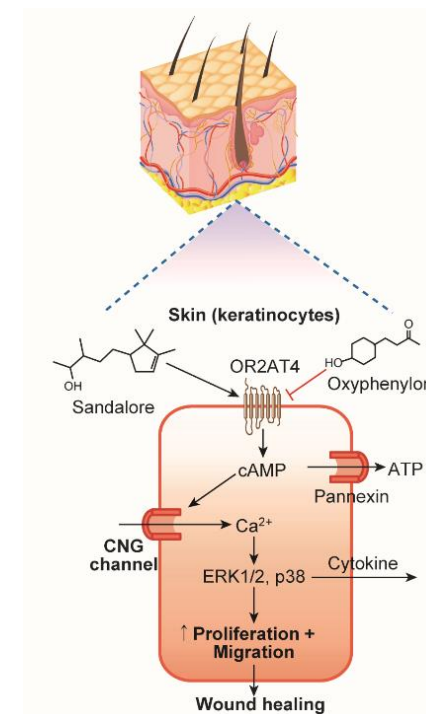
■ 이소화학감각수용체 조직 특이적 신호전달 연구



Hatt H and colleagues
2003 Science



Pluznick J et al.
2013 PNAS

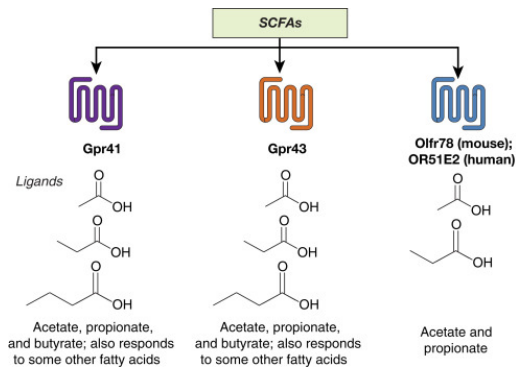


Busse D et al
2013 J Invest Dermatol

이소화학각각수용체 주요 연구자



Dr. Jennifer Pluznick
Johns Hopkins University, USA



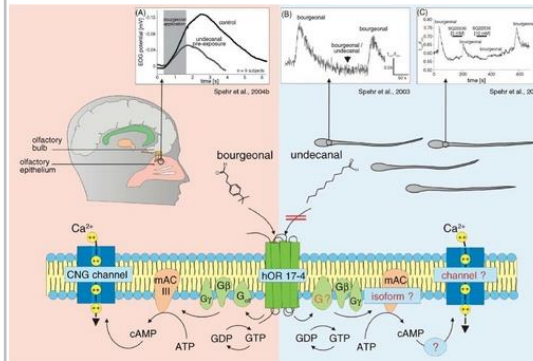
Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation

Jennifer L. Pluznick^{1,*}, Ryan J. Protzko¹, Haykanush Gevorgyan², Zita Peterlin¹, Arnold Sipos³, Jinah Han¹, Isabelle Brunet¹, La-Xiang Wan¹, Federico Rey¹, Tong Wang¹, Stuart J. Firestein¹, Masashi Yanagisawa^{1,2}, Jeffrey I. Gordon¹, Anne Eichmann², Janos Pelt-Peterdi², and Michael J. Caplan¹

¹Department of Physiology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205; ²Departments of Physiology and Biophysics and



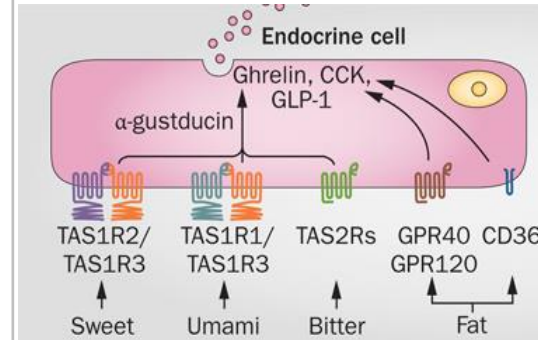
Prof. Dr. Dr. Dr. med. Habil. Hanns Hatt
Ruhr University Bochum, Germany



Marc Spehr¹, Günter Gisselmann¹, Alexandra Poplawski¹, Jeffrey A. Riffell², Christian H. Wetzel¹, Richard K. Zimmer^{2,3}, and Hanns Hatt^{1,*}



Prof. Inge Depoortre
Leuven University, Belgium

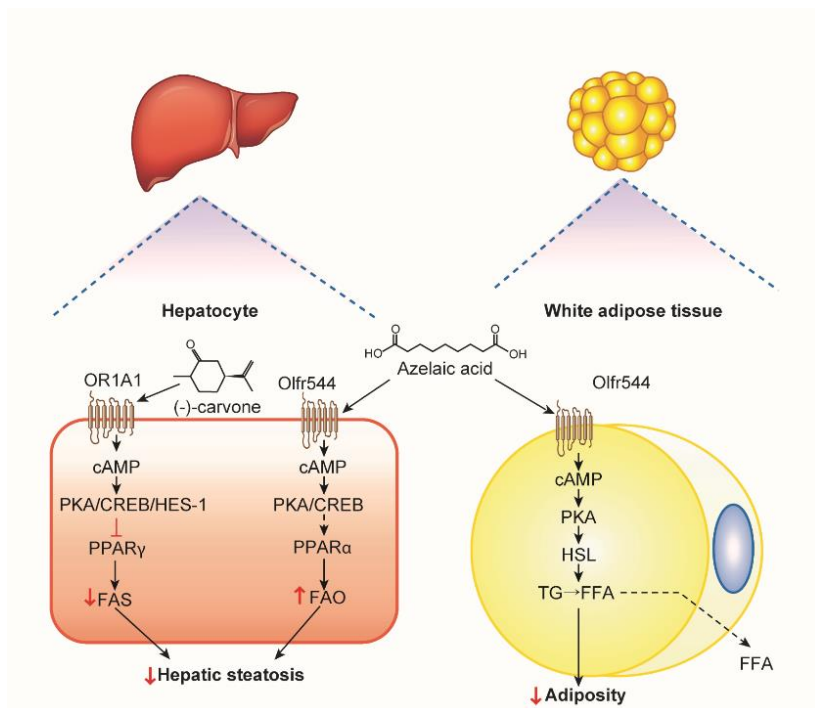


Bitter taste receptors and α-gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying

Sara Janssen, Jorien Laermans, Pieter-Jan Verhulst, Theo Thijs, Jan Tack, and Inge Depoortre¹

¹Department of Pathophysiology, Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders, Catholic University of Leuven, 3000 Leuven, Belgium
Edited by Roger D. Cone, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, and approved December 28, 2010 (received for review August 4, 2010)

■ 창업팀의 이소화학감각수용체 연구 - 간, 지방세포 특이적 발현과 정확한 기능 규명



Wu C et al 2015 Int J Biochem Cell Biol
 Wu C et al 2019 BBA Mol Cell Biol Lipids
 Wu C et al 2017 J Clin Invest

*e-mail: junelee@korea.ac.kr

<https://doi.org/10.1038/s41573-018-0002-3>

REVIEWS

Therapeutic potential of ectopic olfactory and taste receptors

Sung-Joon Lee^{1,4*}, Inge Depoortere^{2,4} and Hanns Hatt^{3,4}

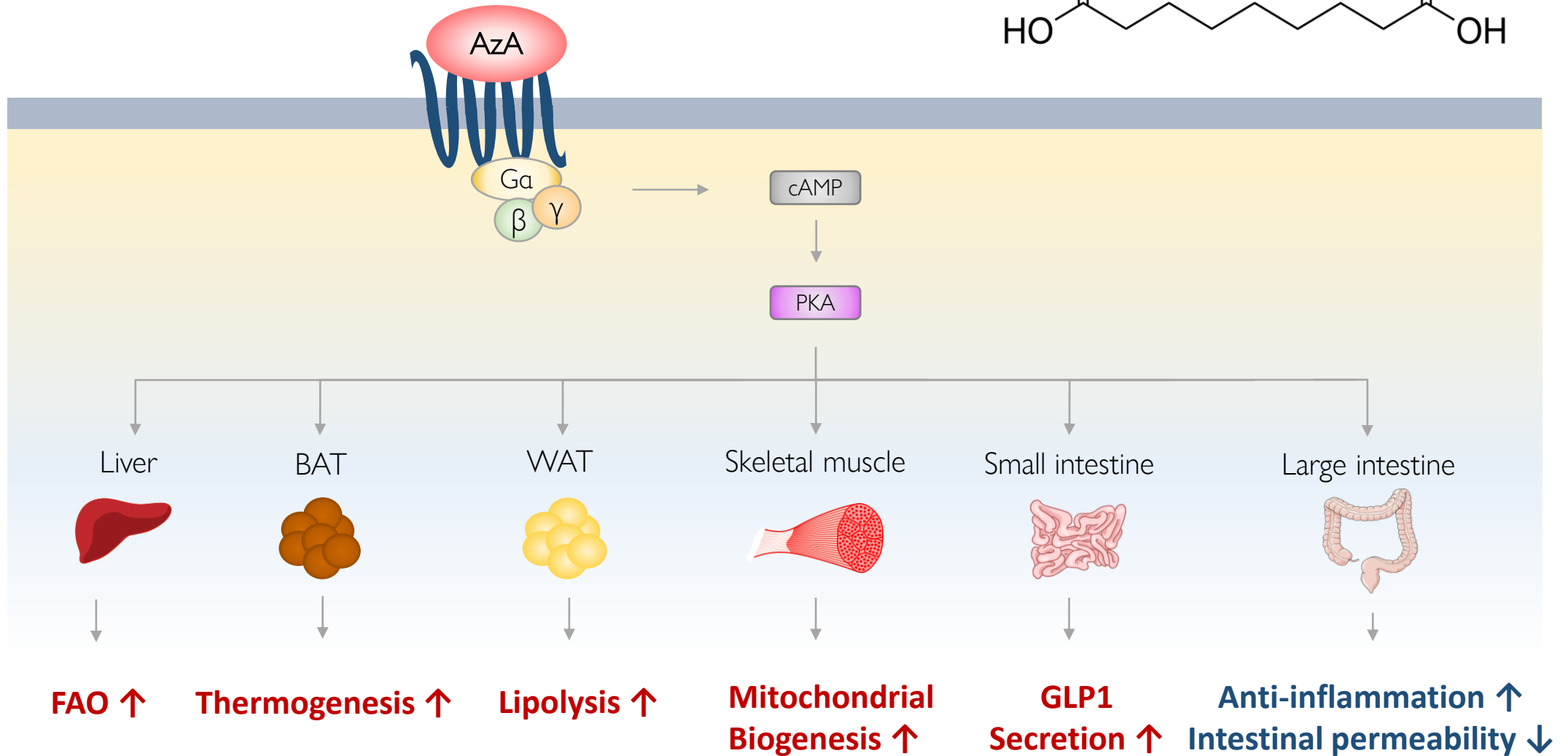
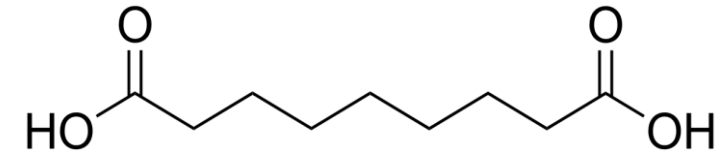
Abstract | Olfactory and taste receptors are expressed primarily in the nasal olfactory epithelium and gustatory taste bud cells, where they transmit real-time sensory signals to the brain. However, they are also expressed in multiple extra-nasal and extra-oral tissues, being implicated in diverse biological processes including sperm chemotaxis, muscle regeneration, bronchoconstriction and bronchodilatation, inflammation, appetite regulation and energy metabolism. Elucidation of the physiological roles of these ectopic receptors is revealing potential therapeutic and diagnostic applications in conditions including wounds, hair loss, asthma, obesity and cancers. This Review outlines current understanding of the diverse functions of ectopic olfactory and taste receptors and assesses their potential to be therapeutically exploited.

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY

2019년 Nature Review Drug Discovery (IF 57) 리뷰 논문 발표 (이성준 교수 단독교신, 공동제1저자)

유용 물질 발굴 및 기작 규명 가속화. GPCR 단백질 타겟 신약 개발 영역 확장

■ 아젤라산 : Olfr544 : 간, 지방세포: 지방대사 촉진



■ 이소화학감각수용체를 활용한 유용물질 발굴 플랫폼

후보 물질 탐색

10만 종 이상 탐색
후각 미각 수용체 리간드
천연물, 화합물 등

+

이소화학감각수용체 조직 특이적 발현 인체내 기능 규명

400 여개
이소화학감각수용체
여러 인체 기관 및 세포
자체 기능 규명 연구 역량

=

건강기능식품 소재 신약 후보물질 진단 시약 발굴 플랫폼

효과적인 후보 물질 발굴
정확한 기능 규명 및 특허
용도 변경 신약 개발

■ 유용물질 파이프라인 – 이소화학감각수용체의 조직 내 기작 규명

- ▶ 아젤라산 1차: 지방세포 체지방 감소 기작 규명. 특허 등록
- ▶ 아젤라산 2차: 근육 기능 강화 기작 규명. 특허 등록
- ▶ 아젤라산 3차: 간세포 지방 감소 기작 규명. 특허 출원
- ▶ 아젤라산 4차: 소장세포의 항비만 호르몬 GLP-1 분비촉진 규명. 특허 출원 예정
- ▶ 물질 A: 여성 질 상피세포 건강 개선 기작 규명. 세포주 실험. 특허 출원 예정
- ▶ 물질 B: 대장암 억제 기작 규명. 동물실험 중. 특허 출원 예정
- ▶ 물질 C: 피부 노화 억제 기능 확인중. 세포주 실험중
- ▶ 물질 D: 탈모 억제 유용물질 발굴. 기능 확인중

그 외 다수

■ 아젤라산 특허 목록

권리구분	출원/등록	명칭	번호	등록인
국내특허	등록	지방조직 중성지질 분해효능을 가지는 아젤라산 조성물	10-1593539	고려대
국내특허	등록	아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성을 통한 근육강화 촉진용 조성물	10-2066908	고려대
국내특허	출원	아젤라산을 유효성분으로 하는 지방간 예방, 치료, 또는 개선용 조성물	10-2018-0020080	고려대
PCT	출원	지방조직 중성지질 분해효능을 가지는 아젤라산 조성물	PCT/KR2016/006859	고려대
USA	출원	지방조직 중성지질 분해효능을 가지는 아젤라산 조성물	15/861,239	고려대
Hong Kong	출원	지방조직 중성지질 분해효능을 가지는 아젤라산 조성물	18109520.0	고려대
E.P.O.	출원	지방조직 중성지질 분해효능을 가지는 아젤라산 조성물	16821568.9	고려대
China	출원	지방조직 중성지질 분해효능을 가지는 아젤라산 조성물	201680045618.7	고려대
USA	출원	아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성을 통한 근육강화 촉진용 조성물	16/278,899	고려대

■ 아젤라산 특허 사업화 목표

▶ 항비만 건강기능식품 개발: 개별인정 원료 승인 2022년 5월 목표

특허: 아젤라산의 지방세포 중성지방 분해 특허 및 근육 강화 특허

높은 안전성: 천연물. 곡물 껍질에 존재. 식품첨가물 등재. 인간 섭취 기록 다수

국내 의료기관과 임상시험 계획 중

개별인정 원료 승인 시 추정 가치: 150억원~250억원

▶ Repurposing Drug 추진: 기존 피부과 치료제로 시판중인 물질로서 용도변경 의약품에 해당

특허: 중성지방 분해 특허 활용 (또는 지방간 치료제 특허 등록 완료 후)

용도 변경 신약 개발 추진: 희귀질환 타겟. 독성시험 면제 시 간이 임상 후 임상 2상 진입

Mode of Action 입증 연구 추가 필요

전임상 완료 후 임상 진입 승인 시 추정 가치: 700억원

■ 비만 치료제 신약 개발 회사와 대형 제약사 간 주요 계약 사례

- ▶ **NGM과 Merck의 계약** (2015년): NGM의 비만치료제 인체 대상 개념 검증 완료 시 Merck는 \$94M Up-front 및 \$106M 지분인수. 향후 5년간 \$250M 추가 투자하는 계약 체결
- ▶ **Orexigen과 Takeda Pharmaceuticals와 미국 판권 계약**: \$50M Up-front (2010년), \$100M (2014년), 순매출액의 20%~35% 로열티 지급 계약 체결
- ▶ **Palatin Technology 와 AstraZeneca의 글로벌 판권 및 공동 연구 개발 계약**: \$10M Up-front, 마일스톤에 따라 최대 \$300M 까지 지급. 매출에 따른 단계적 로열티 지급 계약 체결
- ▶ **종근당의 벨로라닙을 기술 이전 받은 미 Zafgen 사의 IPO시 시가 총액은 \$320M**: 자프겐은 임상2상 후 IPO를 성공 시총 \$320M을 달성했고, 임상3상 진행 시총 \$1.5B 달성. (2016년 벨로라닙 혈전증 부작용으로 임상 중단, 현재 Chondrial Therapeutics와 합병)

■ 아젤라산 및 후보물질 개발 로드맵 2020년 - 2022년

물 질	용도	2020			2021				2022			
		2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q
아젤라산	체지방 감소 (건기식)	원료확보	GLP 실험	임상 1차 및 2차			개별인정					
	근육강화 (건기식)		GLP 시험		임상1차 및 2차			개별인정				
	지방간 치료 (신약)		독성시험 면제추진		특허확정	IND enabling/CMC works						
물질 A	여성 질 세포 노화 방지	기작규명완료 및 특허출원			간이임상							
물질 B	대장암 억제	보강실험		특허출원								
물질 C	피부 노화 억제	보강실험			특허출원							
물질 D	탈모 방지	물질추가검증			기작검증		특허출원					

■ 파트너십 추진

- 원료: 유럽 A사, 아젤라산 원료 독점 공급 추진
- 임상시험: 비만분야 전문의와 건강기능식품 임상시험 진행 협의중, 동국대 일산병원, 이대 서울 병원, 고려대 병원 등 협의중
- 생산 및 판매: 제형 개발, 제품 생산 등 중장기 협력 파트너 미팅 중
- 해외 영업: 미국 B사, 아젤라산 함유 비타민 혼합 제제 판매 논의
- 신약 개발: 미국 EFIL Pharma, 비만 지방간 치료제 미 FDA 승인 업무 협력
- 특허 강화: 미국 넬슨 멀린스(로펌)과 특허 강화 및 특허 전략 업무 협력

■ 임상시험 협력 추진 중인 비만 분야 의료 전문가

오상우 교수

동국대학교 일산병원 가정의학과
비만대사영양센터장
비만, 대사증후군, 암예방, 건강증진,
임상영양학



- 1991년 서울대학교 의학대학 졸업
- 2002년 서울대학교 의과대학원 의학 석사 / 박사
- 1994년 서울대병원 인턴,
- 1995~1998년 가정의학과 전공의
- 1998~1999년 서울대학교병원 가정의학과 임상강사
- 1999~2007년 인제대학교 일산백병원
전임강사/조교수/부교수
- 2007~현재 동국대학교 일산병원 가정의학과 교수

심경원 교수

이대 서울병원 가정의학과
비만클리닉 소장
비만, 대사증후군, 노화예방, 여성건강



- 1993년 이화여자대학교 의과대학 졸업
- 1998년 이화여자대학교 의과대학원 석사
- 2004년 건국대학교 의학박사
- 1993-1994 이화여대 부속병원 인턴
- 1995-1998 이대부속병원 레지던트
- 1998-1999 아주대병원 연구강사
- 1999-2001 이대목동병원 가정의학과 연구강사
- 2001-2002 이대목동병원 가정의학과 임상강사
- 2002-현재 이화여대 가정의학과 교수

■ 투자 제안

회사 개요

법인 설립: 법인登記 완료. 고려대 연구실 창업 기업 5월 말 승인 예정.

주소: 고려대 생명과학대학 식품공학과 (설립 후, 비수도권 지역 본사 이전 가능)

주주 (지분율): 이성준 (100%) (고려대 연구실 창업 승인 시 이성준 교수 지분을 고대에 기부, 지분율은 이성준 (90%), 고려대 (10%)로 변동 예정)

투자 제안

투자 전 기업 가치: 30억원

투자 유치 목표: 10억원 (2021년 하반기까지 추가 증자 및 정책자금 유치를 통해 총 50억원 확보 목표)

투자 방법: 보통주

질의 응답

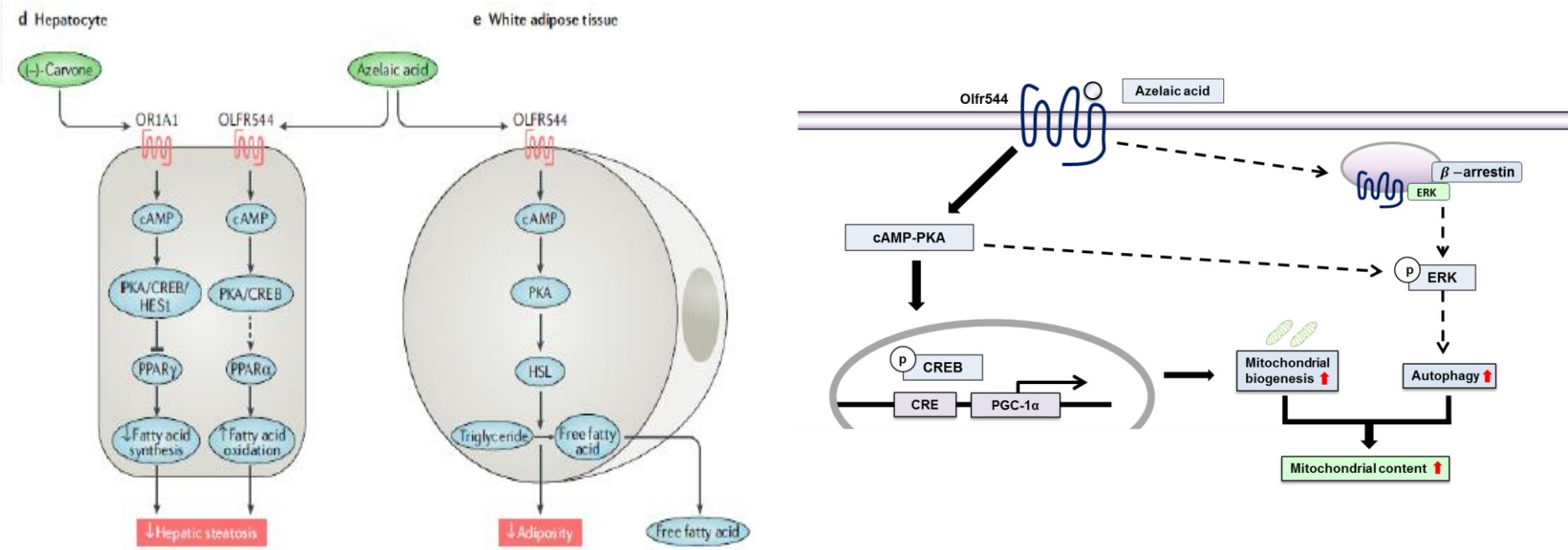
■ 참고자료 목차

1. 아젤라산 특허 목록
2. 체중감소 기작 연구 발표 논문
3. 독성 시험 결과
4. 이화학적 특징
5. 약물동력학 결과
6. 약물동태학
7. 지방세포계에서 지방분해 촉진
8. 간조직 세포에서 지방산화 촉진
9. 지방분해 효과는 Olfr544를 표적으로 함
10. 간조직 지방산화 촉진은 Olfr544를 표적으로 함
11. 고지방 식이 마우스에서 아젤라산이 체지방을 감소시킴
12. 유전적 비만 마우스모델에서 아젤라산이 체지방을 감소시킴
13. 아젤라산이 내당능과 인슐린 민감도를 향상시킴
14. 아젤라산이 지방산 소모를 촉진함
15. Olfr544 결핍 마우스에서 아젤라산의 효과가 사라짐

1. 아젤라산 특허 목록

권리구분 (국내외특허, 실용신안)	출원/등록	등록(출원)명칭	등록(출원)번호	등록(출원)인
국내특허	등록	지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물	10-1593539	고려대
국내특허	출원	아젤라산을 유효성분으로 포함하는 지방간 예방, 치료, 또는 개선용 조성물	10-2018-0020080	고려대
국내특허	등록	아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성을 통한 근육강화 촉진용 조성물	10-2066908	고려대
PCT	출원	지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물	PCT/KR2016/006859	고려대
홍콩	출원	지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물	18109520	고려대
EU	출원	지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물	16821568.9	고려대
중국	출원	지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물	201680045618.7	고려대
미국	출원	지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물	15/861,239	고려대

2. 아젤라산의 체중감소 기작 연구 발표 논문: Olfr544 표적치료제



Lee SJ et al. (2019) Nature Reviews Drug Discovery (IF 57)

Wu C et al. Frontiers in Physiology 2020

3. 아젤라산의 독성 시험 결과

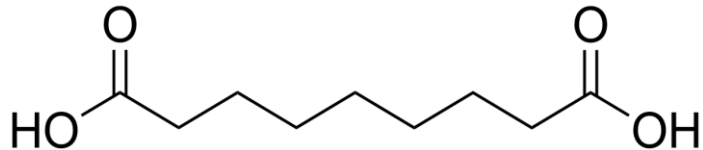
독성시험법	시험 디자인	시험 결과	참고문헌
급성 독성	- 경구 투여 - 랫트	LD₅₀ > 5 g/kg bw	RTECS ¹⁾ , 1997
	- 정맥 투여 (단회) - 랫트: 800 or 1000 mg/kg bw/day	신장기능, 중추신경계 기능, 행동 이상 없음	Toepert et al., 1989
	- 반복 정맥 투여 (6일) - 토끼: 100 mg/kg bw/day	간 기능 이상 없음	
단기 독성	- 식이 섭취 (90일) - 랫트: 140 or 280 mg/kg bw/day - 토끼: 200 or 400 mg/kg bw/day	생물학적 지표 ²⁾ 정상	Mingrone et al., 1983
	- 반복 경구 투여 (30일 이상) - 랫트, 원숭이	부작용 없음	Toepert et al., 1989
장기 독성	- 식이 섭취 (180일) - 랫트: 140 or 280 mg/kg bw/day - 토끼: 200 or 400 mg/kg bw/day	Oral NOAEL : 280 mg/kg bw	Mingrone et al., 1983
유전 독성	<i>In vitro</i> - Ames test, HGPRT test	음성	Toepert et al., 1989
	<i>In vivo</i> - 우성 치사 시험 (dominant lethal test)	음성	

¹⁾ RTECS: Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (미국 화학물질독성영향관리원)

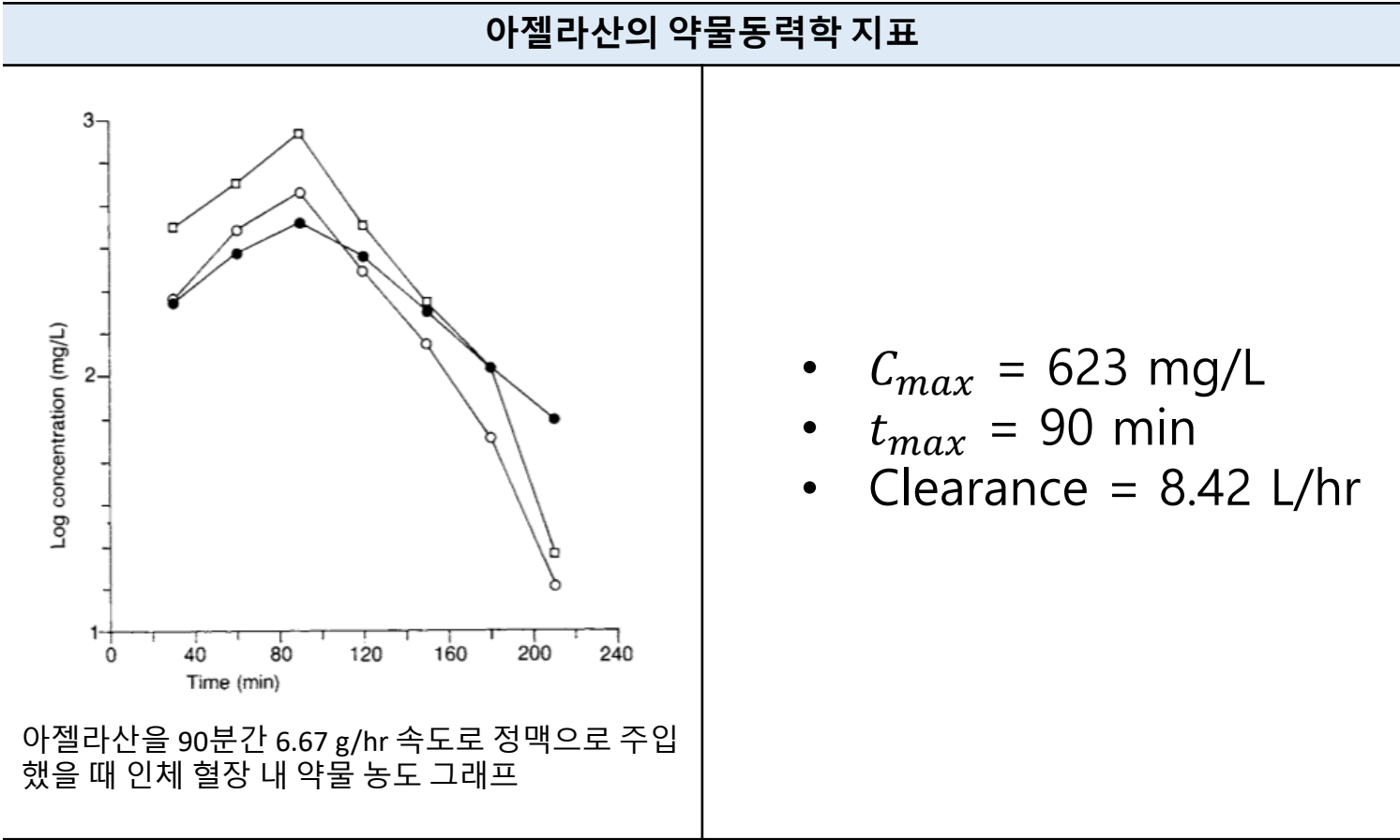
²⁾ 생물학적 지표: 혈액 화학 수치, 혈액학적 수치, 혈청 단백질, 성장 곡선, 각 장기의 조직학적 분석

4. 아젤라산의 이화학적 특징

Properties	
Chemical formula	$C_9H_{16}O_4$
Molar mass	188.22 g/mol
Appearance	white solid
Density	1.443 g/mL
Melting point	109 to 111 °C (228 to 232 °F; 382 to 384 K) ^[1]
Boiling point	286 °C (547 °F; 559 K) at 100 mmHg ^[1]
Solubility in water	2.14 g/L ^[2]
Acidity (pK_a)	4.550, 5.498 ^[2]



5. 아젤라산의 약물동력학 결과



출처: Bertuzzi et al., *Clin Pharmacokinet*, 1991

6. 아젤라산의 약물동태학

[흡수 메커니즘]

- AZA 크림 (20%) 1g을 국소 적용하였더니 3% 경피 흡수 일어남.
- 흡수되는 양은 매개물의 형태와 시간에 의존적.
- 12시간 후 15% AzA 겔에 의한 흡수 (8%)가 수용성 폴리에틸렌 글리콜 연고 베이스를 사용했을 때 보다 높았다 (3%).
- 정상 세포에서 세포막을 통과하는 디카르복실산은 β -산화에 의해 완전히 대사됨.
- 디카르복실산은 종양세포막을 3배 더 잘 침투해 세포 내에 더 고농도로 존재함.
- AzA 가 세포막을 어떻게 투과하는지는 아직 알려져 있지 않음.

[분포]

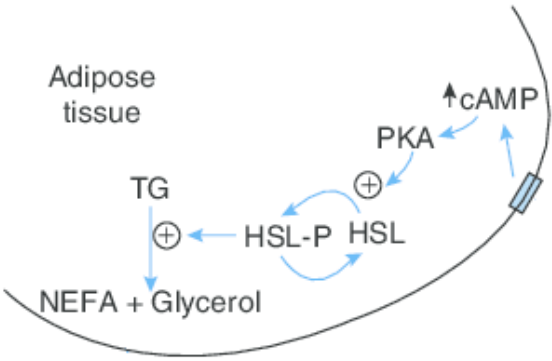
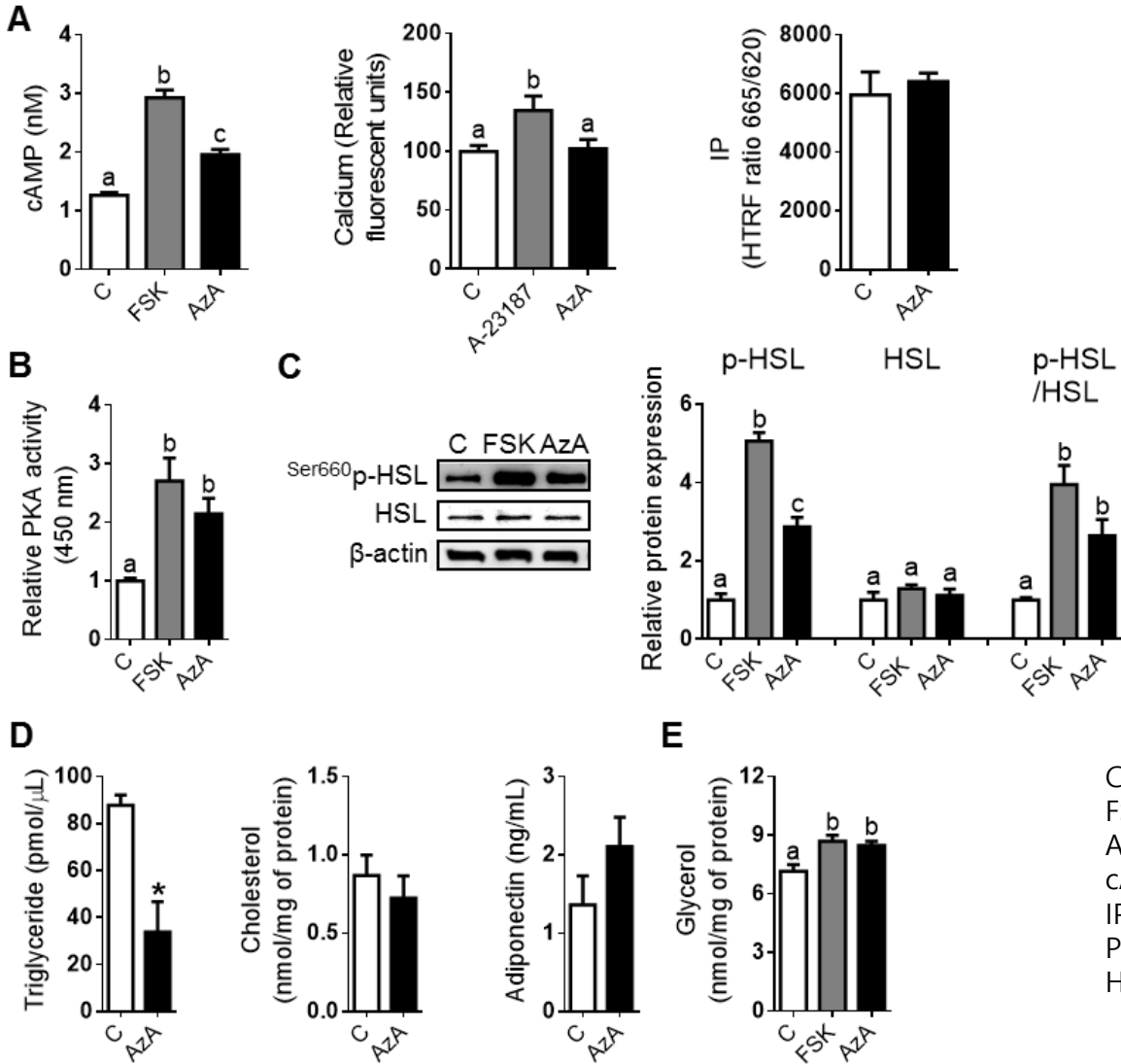
- Rat에 경구투여 12시간 후 제일 높은 AZA 농도가 간, 폐, 신장에서 관찰됨.
- [^{14}C]-아젤라산은 투여 후 약 96시간 동안 지방조직에 축적됨.
- 총 장기 방사능 중 90%는 지방조직, 중성지방과 인지질의 지방산 부분에서 검출됨.
- AzA 는 개의 혈액뇌장벽을 통과할 수 있는데 경구투여, 혈관주사 후 뇌척수액 농도가 혈장의 2~5%였음.

6. 아젤라산의 약물동태학 (계속)

[약리학과 대사]

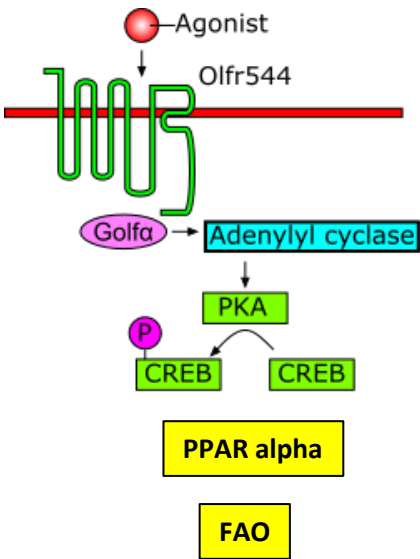
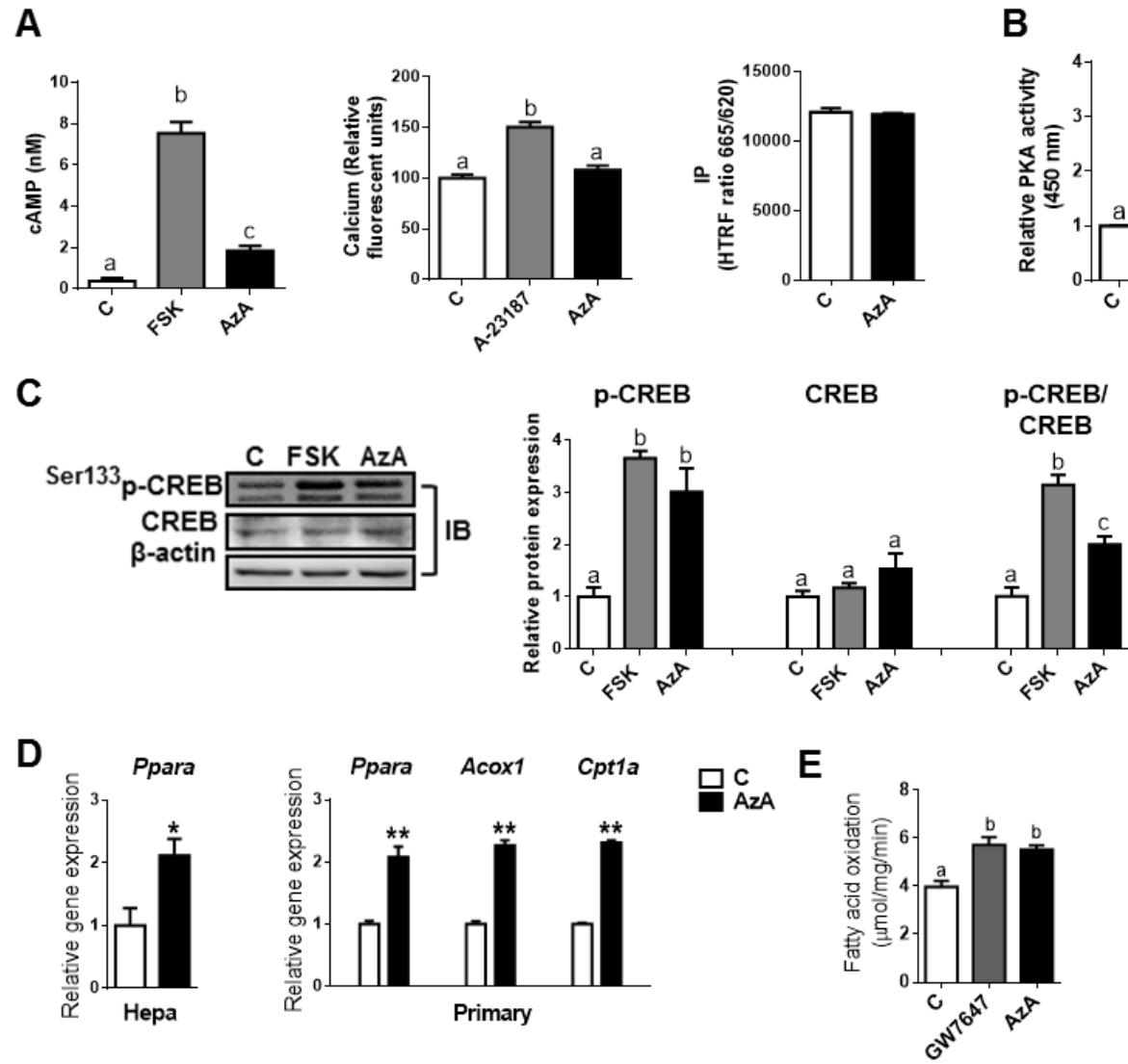
- Rat과 rabbit에 행한 실험에 따르면, AZA는 무독성이고 돌연변이나 기형을 유발하지 않음.
- AZA의 15% 나트륨 염을 정맥, 동맥, 림프 내로 1 주일 동안 국소 또는 전신 부작용 없이 연속 주입함.
- AZA는 주로 소변으로 배출되지만 부분적으로는 β -산화에 의해 피멜린산으로 대사되고 일부 탈카복실화됨.
- 추가적 대사는 malonyl-CoA와 acetyl-CoA를 산출함.
- Acetyl-CoA는 Krebs-cycle을 통해 CO_2 와 H_2O 로 완전 산화되지만 malonyl-CoA는 더 이상 산화되지 않음.
- Malonyl-CoA는 다른 지방산을 합성하는데 사용.
- 사람에게 경구투여 할 경우 하루에 **80 g 까지 허용 가능하며 대사되지 않은 상태의 60%가 12시간 내 소변으로 배출.**

7. 아젤라산이 지방세포계에서 지방분해 촉진



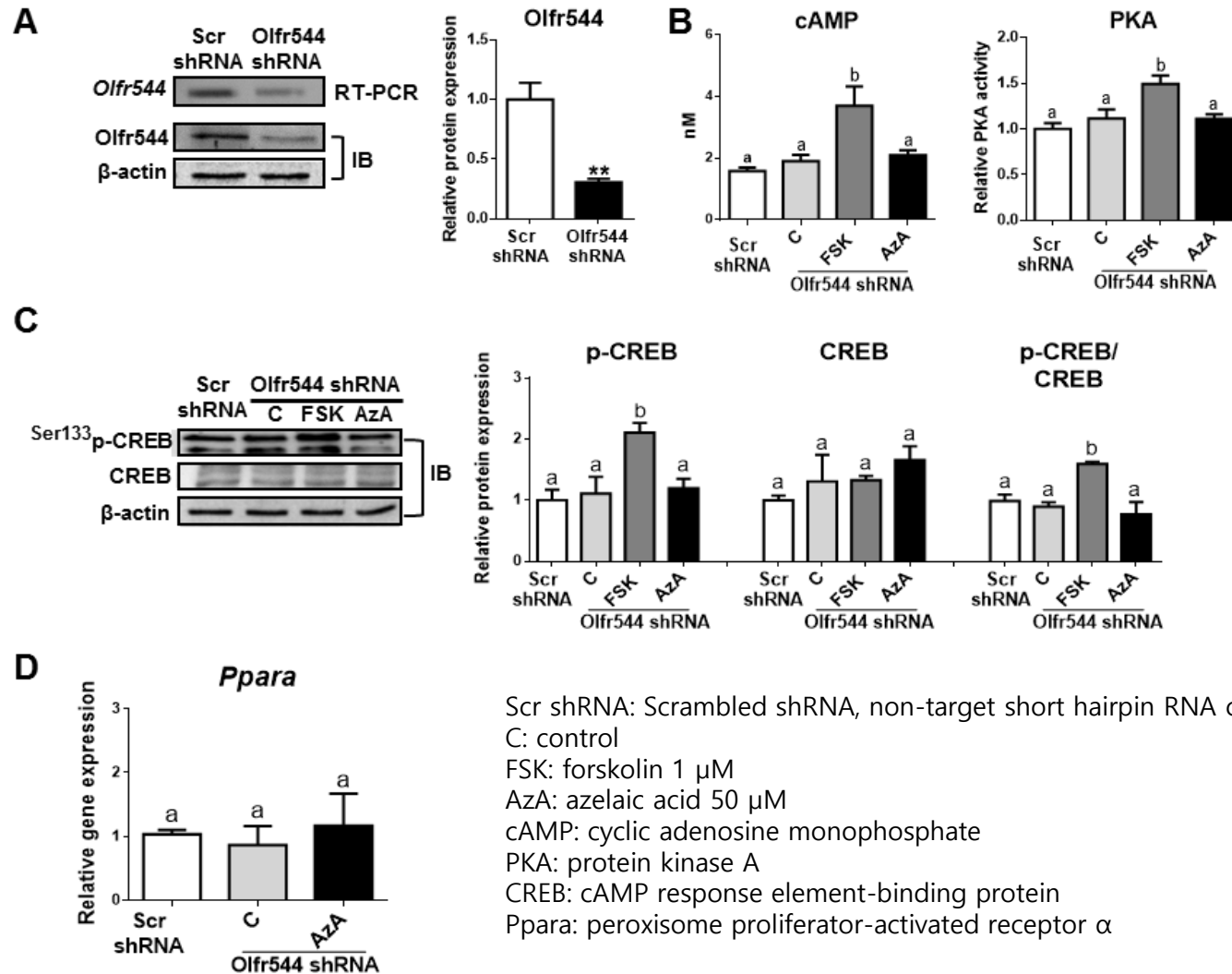
C: control
FSK: forskolin 1 μ M
Aza: azelaic acid 50 μ M
cAMP: cyclic adenosine monophosphate
IP: inositol phosphates
PKA: protein kinase A
HSL: hormone-sensitive lipase

8. 아젤라산이 간조직 세포에서 지방산화 촉진

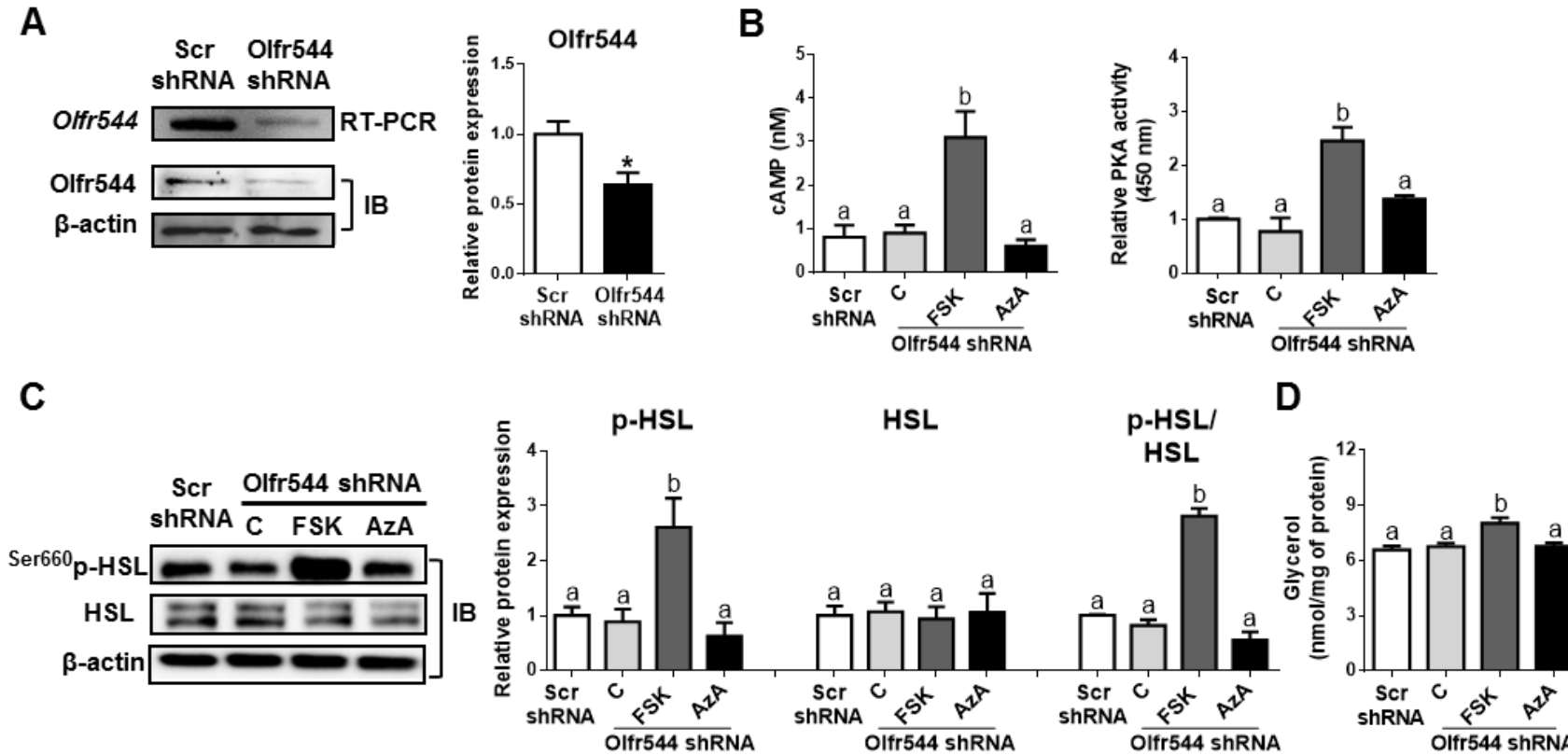


C: control
FSK: forskolin 1 μM
AzA: azelaic acid 50 μM
IP: inositol phosphates
CREB: cAMP response element-binding protein
Ppara: peroxisome proliferator-activated receptor α
Acox1: peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Cpt1a: carnitine palmitoyltransferase 1A

9. 아젤라산 지방분해 효과는 Olfr544를 표적으로 함



10. 아젤라산의 간조직 지방산화 촉진은 Olfr544를 표적으로 함



Scrambled shRNA: non-target short hairpin RNA control vector

FSK: forskolin 1 μ M

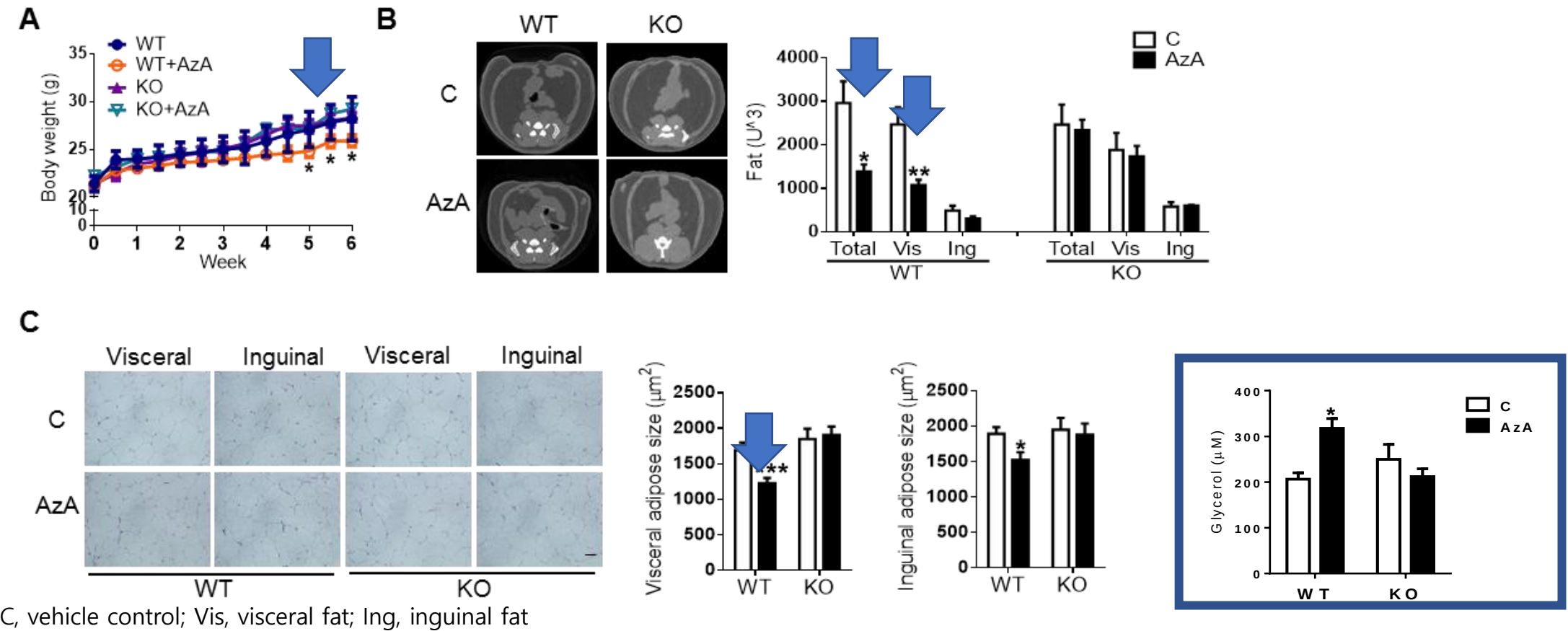
AzA: azelaic acid 50 μ M

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

PKA: protein kinase A

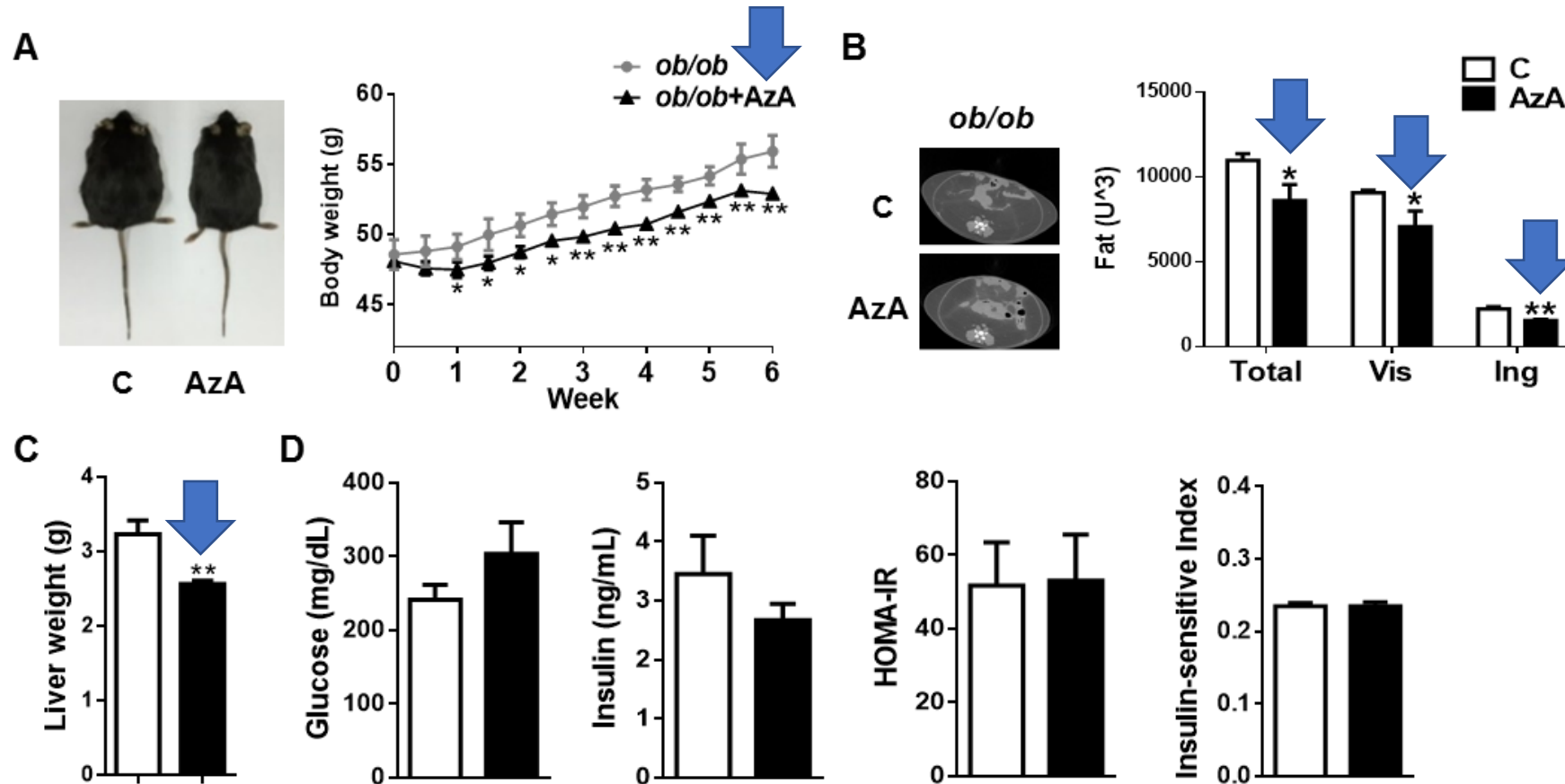
HSL: hormone-sensitive lipase

11. 고지방 식이 마우스에서 아젤라산이 체지방을 감소시킴



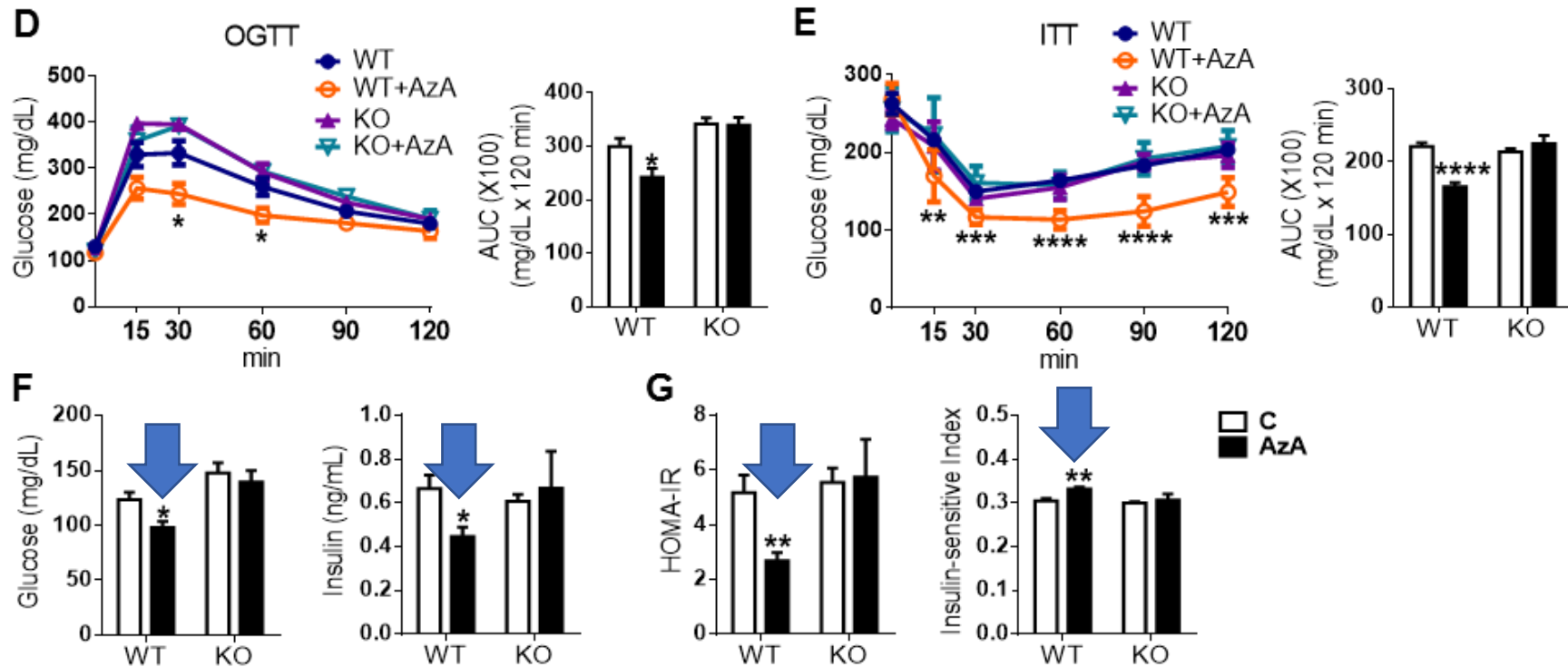
50mpk = 240 mg/60kg human

12. 유전적 비만 마우스모델에서 아젤라산이 체지방을 감소시킴



C, vehicle control; Vis, visceral fat; Ing, inguinal fat
HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance

13. 아젤라산이 내당능과 인슐린 민감도를 향상시킴



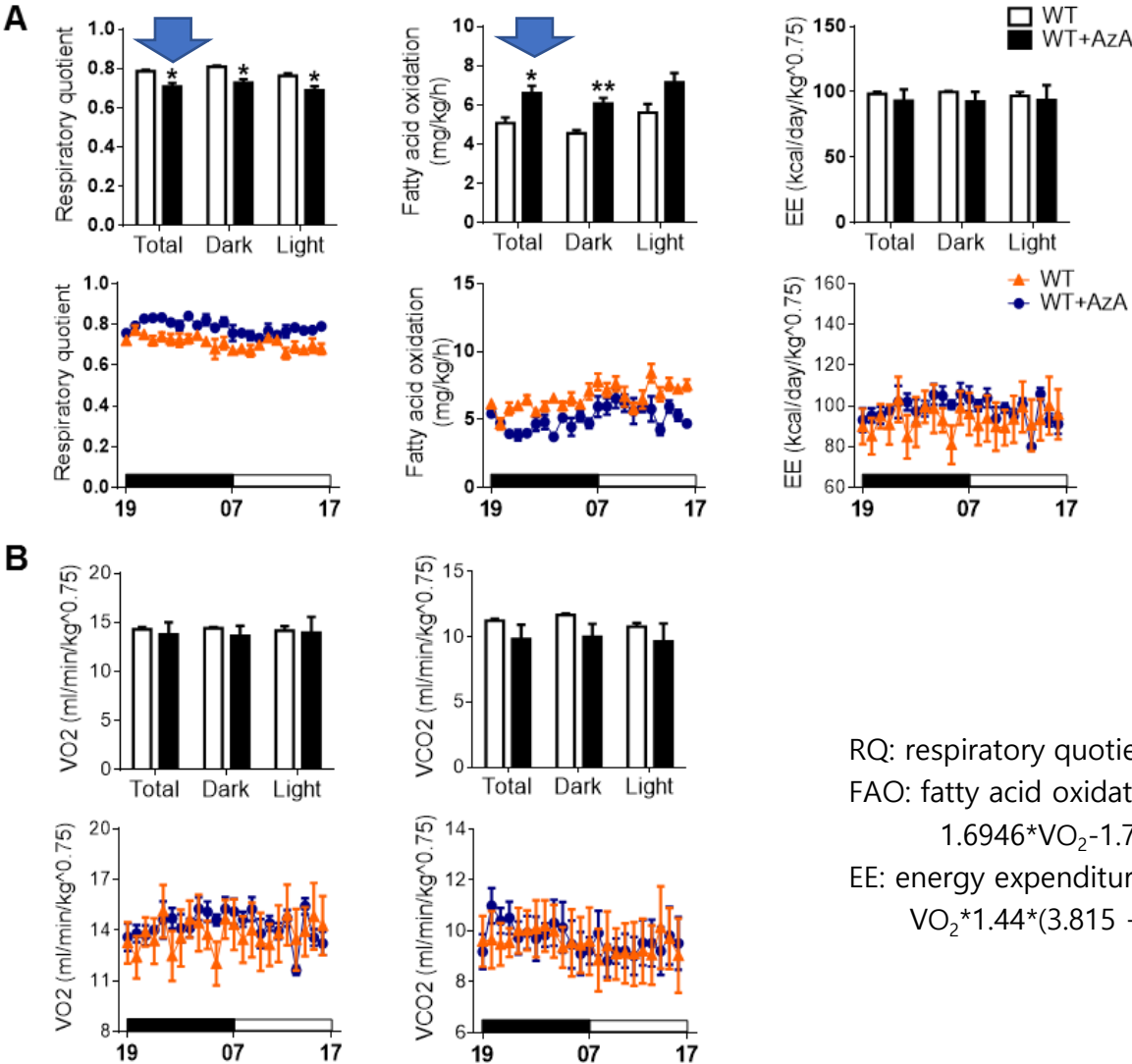
OGTT: Oral glucose tolerance test

ITT: Insulin tolerance test

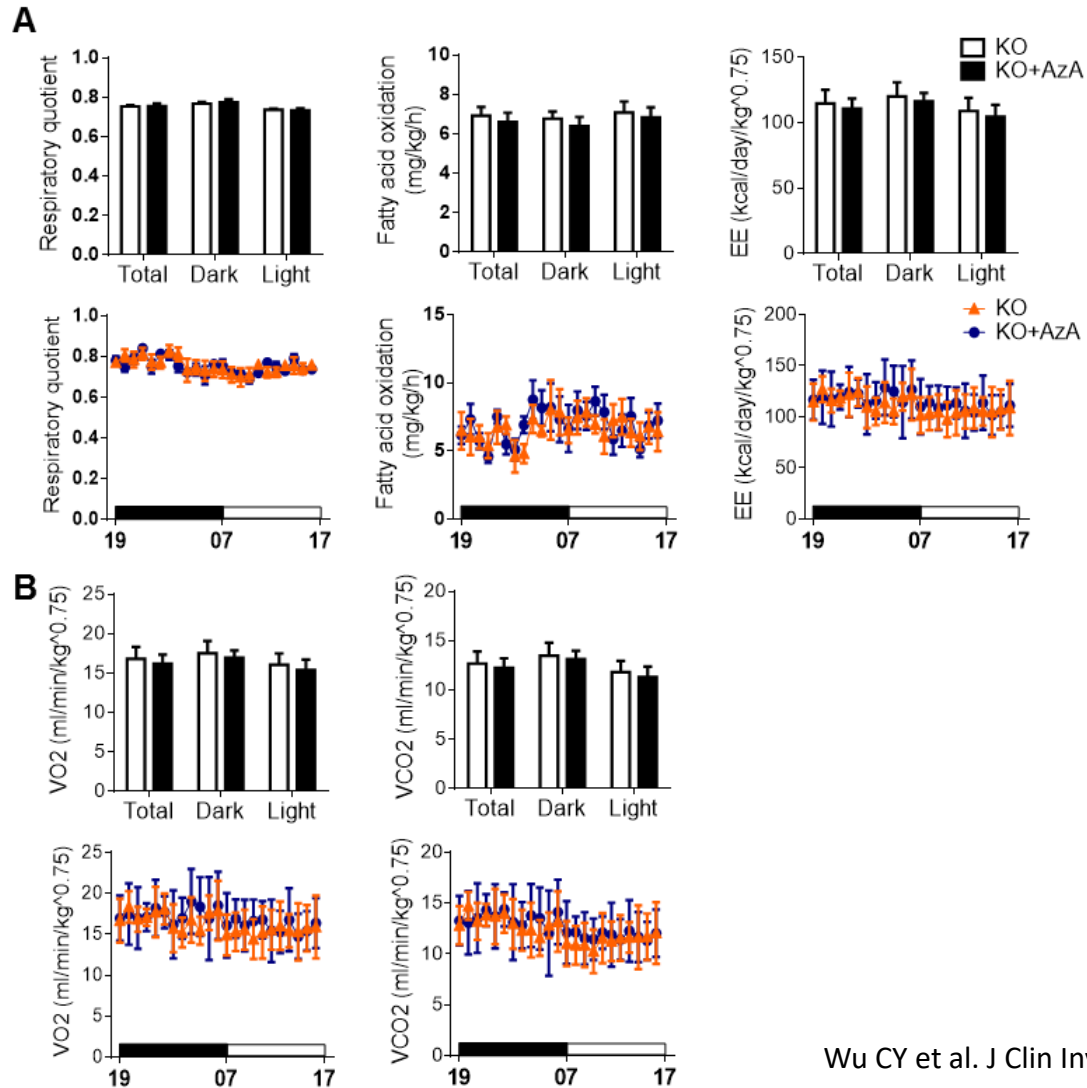
AUC: area under curve

HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance

14. 아젤라산이 지방산 소모를 촉진함



15. Olfr544 결핍 마우스에서 아젤라산의 효과가 사라짐





Azelaic Acid Induces Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle by Activation of Olfactory Receptor 544

Trung Thanh Thach^{1,2†}, Chunyan Wu^{1,2†}, Kwang Yeon Hwang³ and Sung-Joon Lee^{1,2*}

¹ Department of Biotechnology, School of Life Sciences and Biotechnology for BK21-PLUS, Korea University, Seoul, South Korea, ² Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, South Korea, ³ Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, South Korea

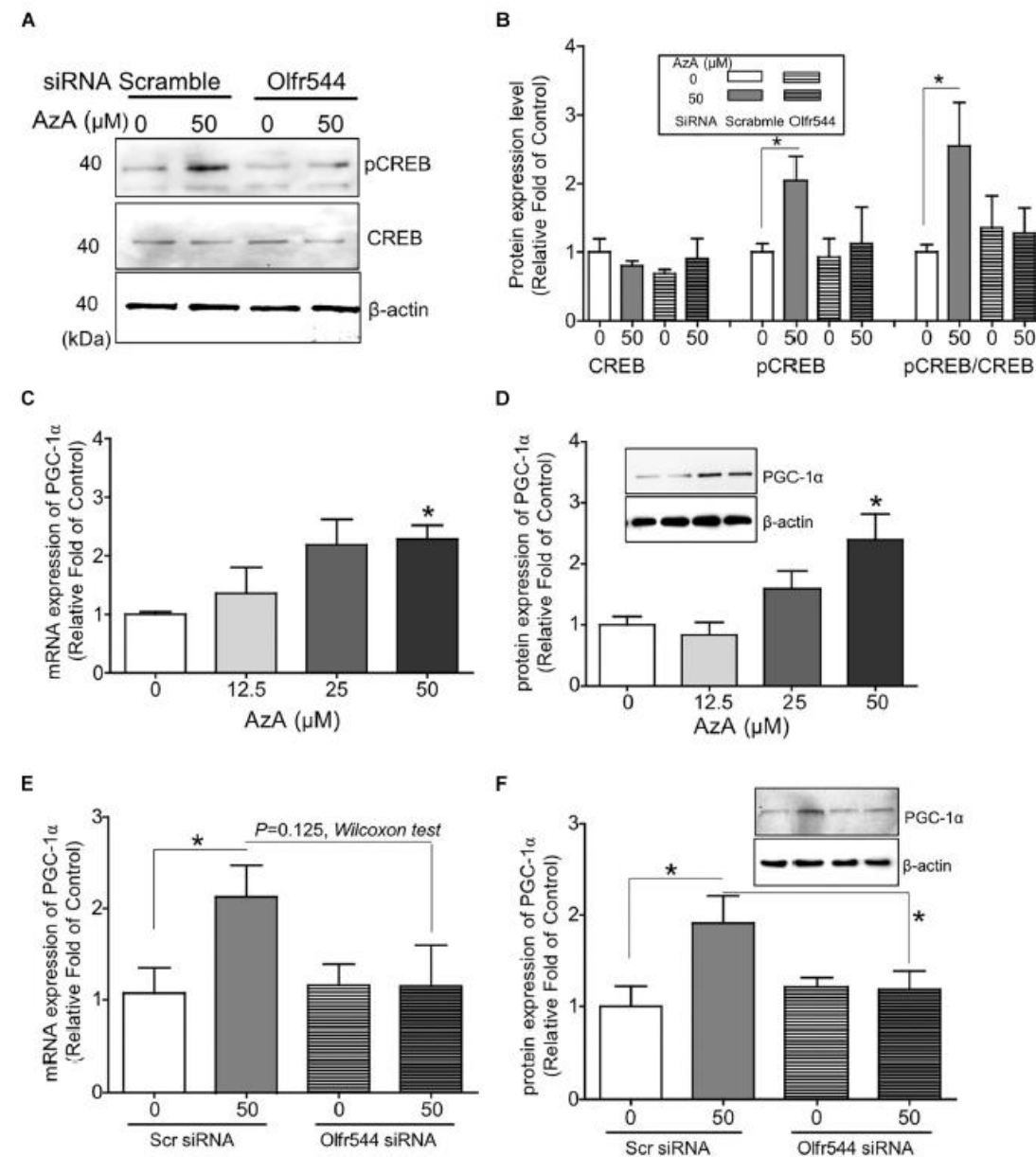


FIGURE 1 | Activation of Olfr544 induces the PKA-CREB-PGC-1 α signaling axis in cultured skeletal muscle cells. **(A,B)** AzA induced pCREB expression in C2C12 myotubes but not in cells with Olfr544 knockdown. Immunoblotting analysis of pCREB and total CREB proteins (**A**, $n = 3$); the ratios of pCREB-to-CREB were normalized to β -actin (**B**, $n = 3$). **(C,D)** AzA induced the expression of PGC-1 α both at the mRNA (**C**, $n = 3$) and protein levels (**D**, $n = 3$) in a dose-dependent manner as measured by real-time qPCR and immunoblotting, respectively. **(E,F)** Olfr544 gene knockdown lessens Pgc-1 α gene expression (**E**, $n = 3$) and protein expression (**F**, $n = 3$). Data are the mean $\pm$ SEM. Data are statistically significant different denoted by * for $P \leq 0.05$ using Wilcoxon test and one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

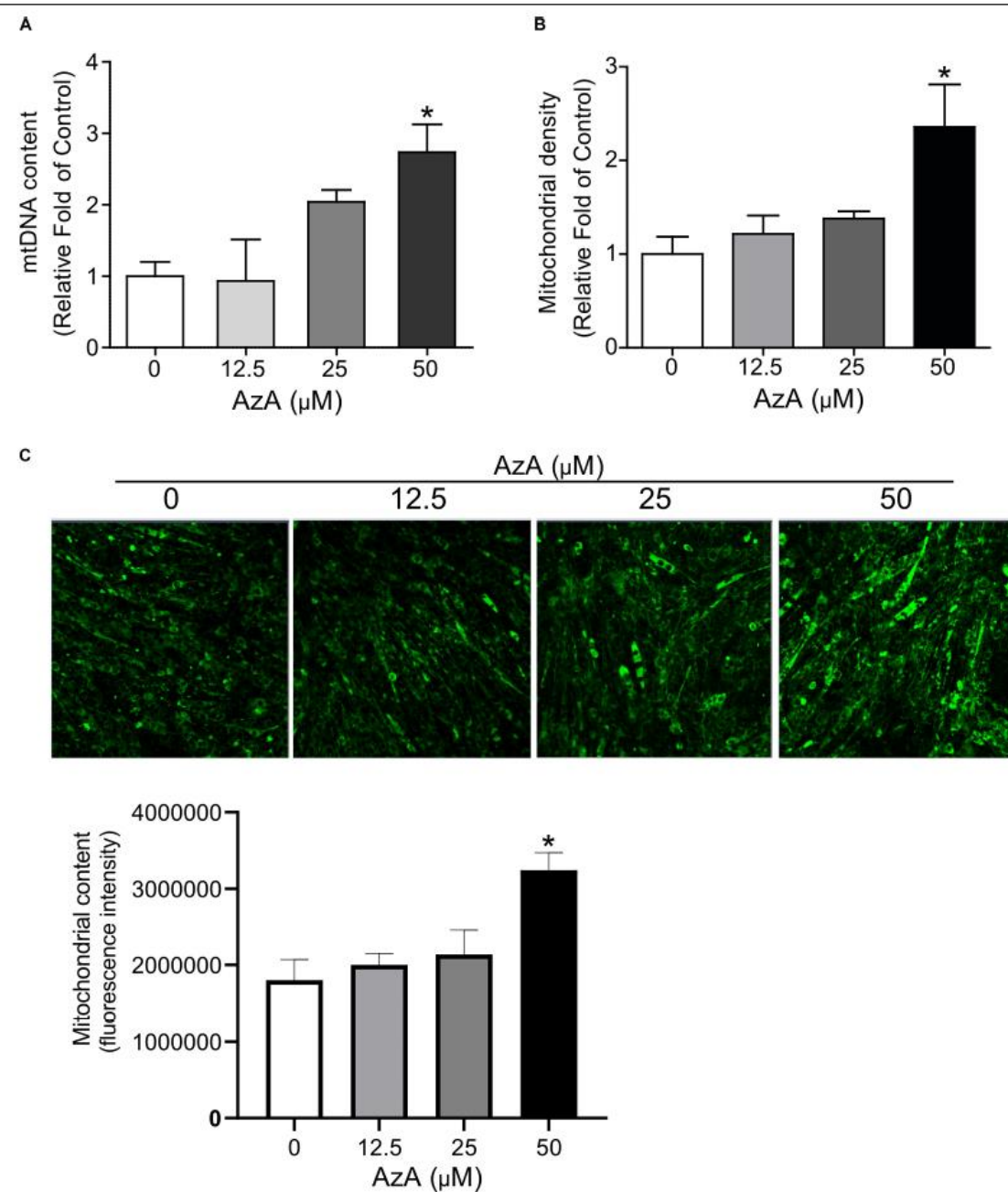


FIGURE 2 | AzA induces mitochondrial biogenesis in skeletal muscle cells. **(A)** AzA induces mtDNA content in a dose-dependent manner as measured by Qpcr ($n = 4$). **(B)** Mitochondrial contents were probed by green MitoTracker and measured by a spectrophotometer ($n = 4$). **(C)** and the levels of mitochondrial content was confirmed under confocal fluorescence microscopy ($n = 3$). Blue, nucleus; green, mitochondrion. Scale bar, 50 μm . Data are the mean $\pm$ SEM. Data are statistically significant different denoted by * for $P \leq 0.05$ using Wilcoxon test and one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

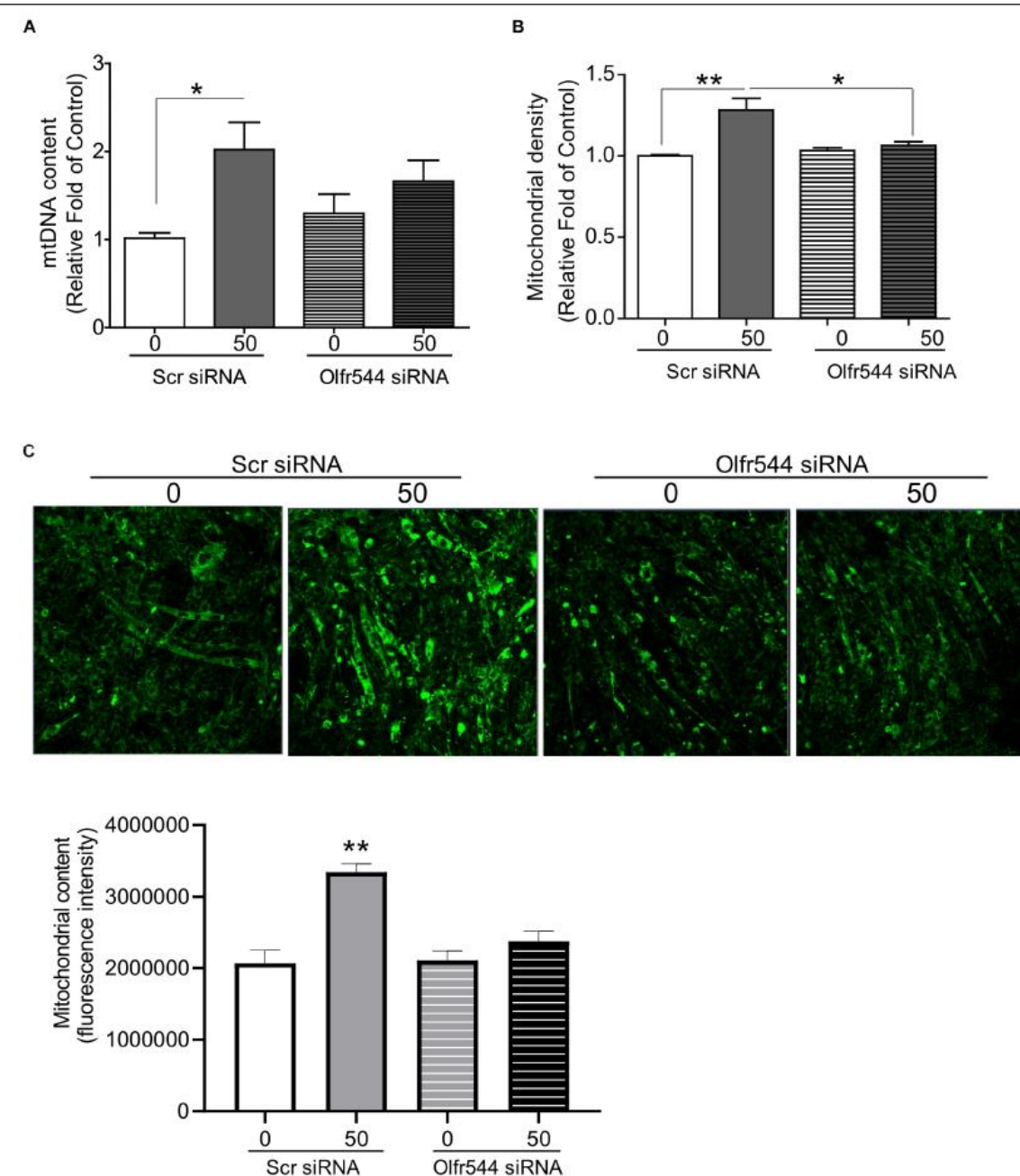


FIGURE 3 | Olfr544 deficiency negates mitochondrial biogenesis stimulated by AzA in skeletal muscle cells. **(A)** AzA induced mtDNA content in myotubes but not in Olfr544 knockdown cells ($n = 8$). Mitochondrial abundance was analyzed using a spectrophotometer **(B, $n = 8$)** and fluorescence imaging **(C, $n = 3$)**. Scale bar, 50 μm . Data are the mean $\pm$ SEM. Data are statistically significant different denoted by * for $P \leq 0.05$, ** for $P \leq 0.01$ using Wilcoxon test and one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

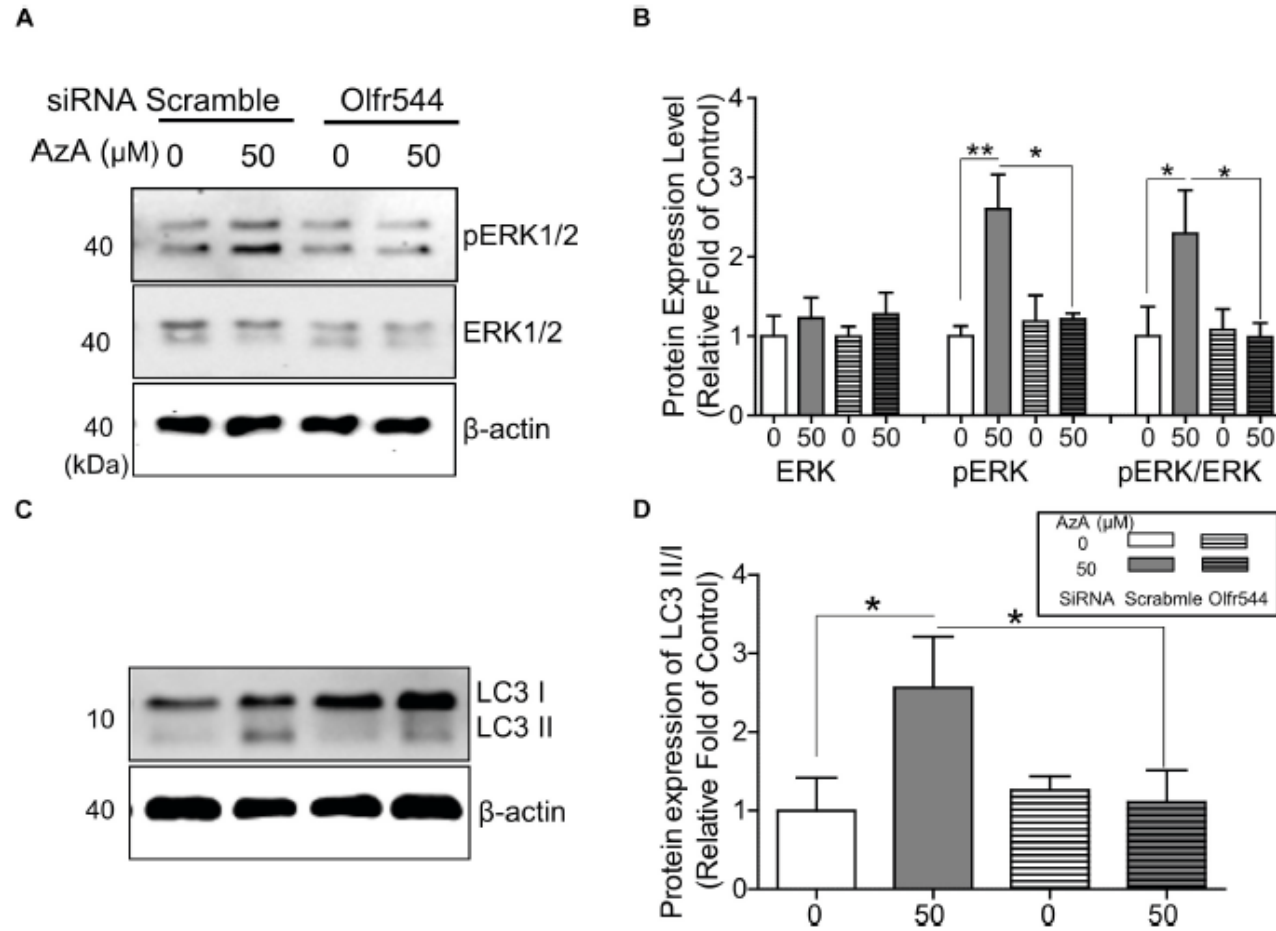


FIGURE 4 | AzA-driven Olf544 activation stimulates ERK1/2 phosphorylation in cultured skeletal muscle cells. AzA induced phosphorylation of ERK1/2 on Thr43/44 (pERK1/2) in myotubes but not in Olf544 knockdown cells. **(A,B)** Expression of total ERK1/2 and pERK1/2 was probed by immunoblotting. Ratios of pERK1/2 to total ERK1/2 were normalized to β -actin ($n = 3$). **(C,D)** AzA-stimulated myotubes increased the LC3-II-to-LC3-I ratio, a marker of autophagosome formation, but not in Olf544 knockdown cells ($n = 3$). Data are the mean $\pm$ SEM. Data are statistically significant different denoted by * for $P \leq 0.05$, ** for $P \leq 0.01$ using Wilcoxon test and one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

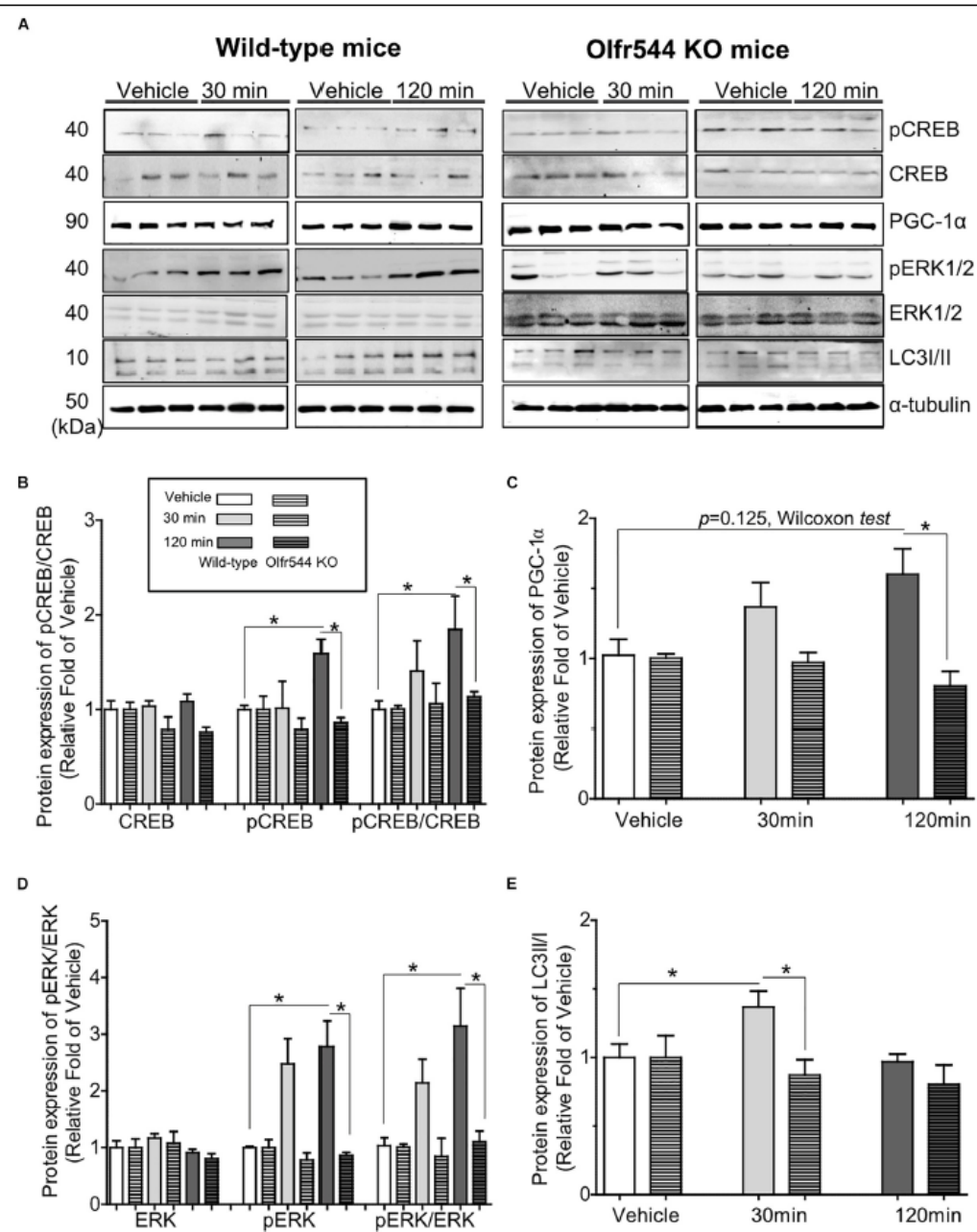


FIGURE 5 | AzA-driven Olf544 activation stimulates the CREB-PGC-1 α signaling axis and autophagy formation in mouse skeletal muscle tissues. **(A)** AzA treatment induced the expression of PGC-1 α , pCREB, pERK1/2 and LC3I/II protein in wild-type mouse skeletal muscle tissues but not in those of Olf544 KO mice. Immunoblotting analysis of soleus muscles extracts for PGC-1 α , pCREB, and CREB, pERK1/2 and total ERK1/2, LC3I/II ($n = 3$). **(B–E)** Ratios of pCREB, PGC-1 α , pERK1/2, and LC3-II were normalized to β -actin ($n = 3$). Data are the mean $\pm$ SEM. Data are statistically significant different denoted by * for $P \leq 0.05$ using Wilcoxon test and one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

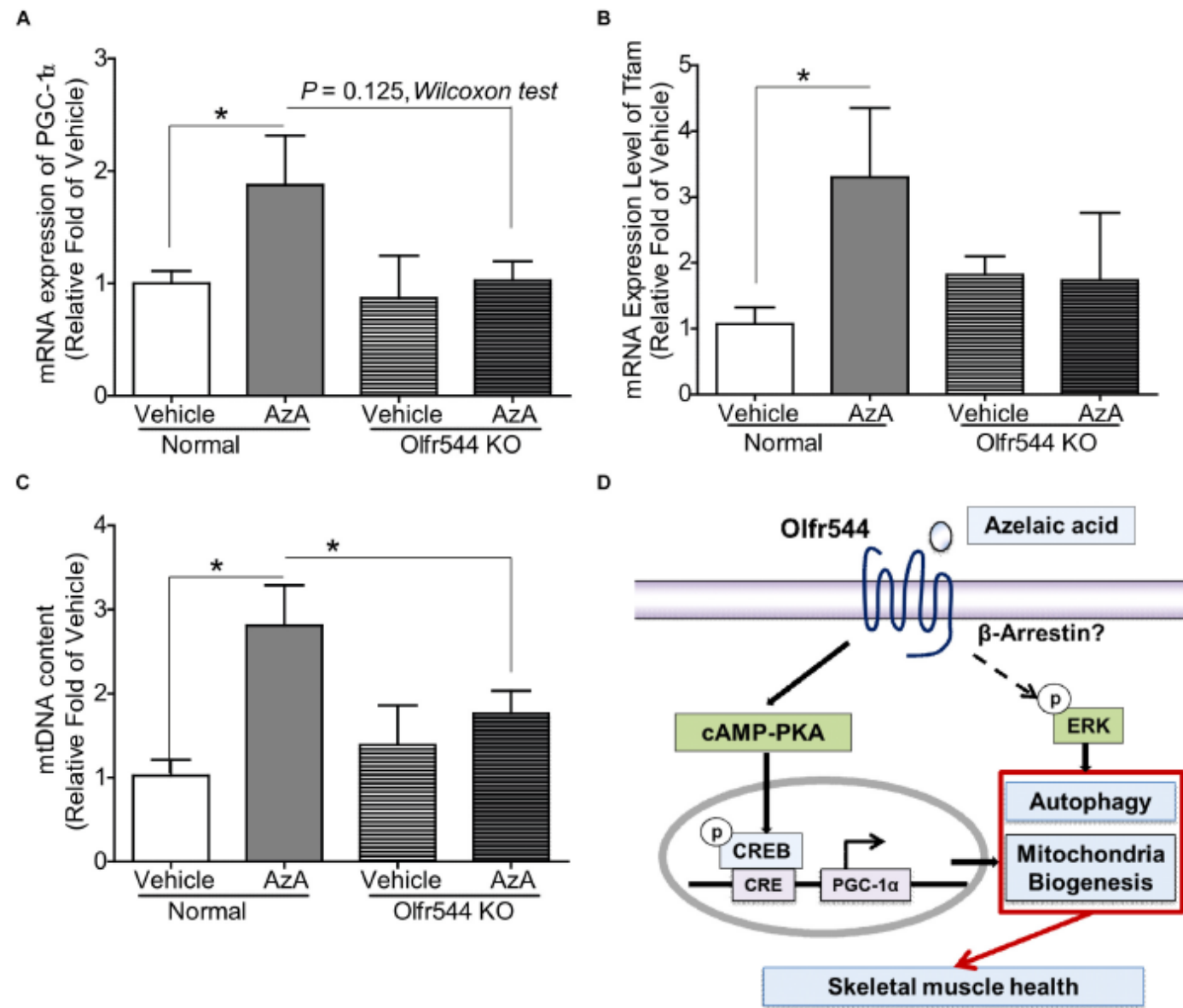


FIGURE 6 | Oral administration of AzA activates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle tissues in HFD-induced obese mice. **(A)** AzA induced Pgc-1 α gene expression in wild-type mouse skeletal muscle tissues but not in those of Olf544 KO mice ($n = 4$). **(B,C)** Gene expression of the mitochondrial marker Tfam and mtDNA content were measured by real-time qPCR ($n = 4$). **(D)** Schematic illustration proposing the mechanism by which AzA-driven Olf544 activation induces mitochondrial biogenesis in skeletal muscle cells by stimulation of CREB-PGC-1 α signaling and ERK1/2 activity. Data are the mean $\pm$ SEM. Data are statistically significant different denoted by * for $P \leq 0.05$ using Wilcoxon test and one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test.

Mouse olfactory receptor 544 (Olfr544) is ectopically expressed in varied extra-nasal organs with tissue specific functions. Here, we investigated the functionality of Olfr544 in skeletal muscle cells and tissue. The expression of Olfr544 is confirmed by RT-PCR and qPCR in skeletal muscle cells and mouse skeletal muscle assessed by RT-PCR and qPCR. Olfr544 activation by its ligand, azelaic acid (AzA, 50 μ M), induced mitochondrial biogenesis and autophagy in cultured skeletal myotubes by induction of cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein (CREB)-peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α)-extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) signaling axis. The silencing Olfr544 gene expression abrogated these effects of AzA in cultured myotubes. Similarly, in mice, the acute subcutaneous injection of AzA induced the CREB-PGC-1 α -ERK1/2 pathways in mouse skeletal muscle, but these activations were negated in those of Olfr544 knockout mice. These demonstrate that the induction of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by AzA is Olfr544-dependent. Oral administration of AzA to high-fat-diet fed obese mice for 6 weeks increased mitochondrial DNA content in the skeletal muscle as well. Collectively, these findings demonstrate that Olfr544 activation by AzA regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Intake of AzA or food containing AzA may help to improve skeletal muscle function.