



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월23일  
(11) 등록번호 10-1514282  
(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2006.01) GOIN 33/48 (2006.01)  
GOIN 33/53 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0111072  
(22) 출원일자 2013년09월16일  
심사청구일자 2013년09월16일  
(65) 공개번호 10-2015-0032364  
(43) 공개일자 2015년03월26일  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2006067944 A  
JP2005504529 A  
JP2007534323 A

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(72) 발명자  
이재란  
대전광역시 유성구 과학로 125  
임소희  
대전 서구 만년남로3번길 27, 203호 (만년동)  
(74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

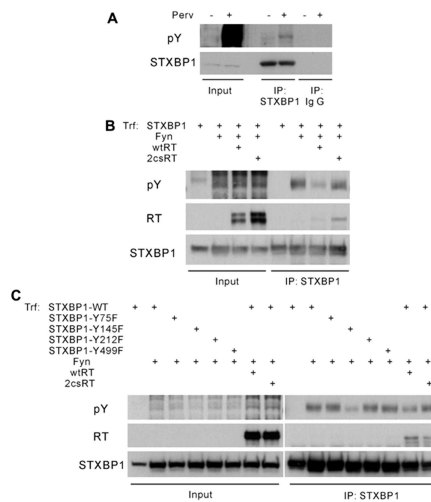
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 PTPRT 및 신타신-결합 단백질 1을 이용한 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1)을 이용한 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로 PTPRT에 의해 탈인산화 되는 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1(syntaxin 1)과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진함을 확인함으로써, 상기 PTPRT 및 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1은 SNARE 복합체 형성 촉진제를 포함한 시냅스 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013031230  
 부처명 미래창조과학부  
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)  
 연구사업명 기초연구사업(중견)  
 연구과제명 신경세포 타이로신탈인산화 신호전달과 우울증 기전 연구  
 기여율 60/100  
 주관기관 한국생명공학연구원  
 연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1141312  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 기초기술연구회  
 연구사업명 주요사업(연구개발과제)  
 연구과제명 뇌/신경 발달 및 분화 조절 인자 단백질체 분석  
 기여율 40/100  
 주관기관 한국생명공학연구원  
 연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- 1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 PTPRT의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 단계 1)의 세포주는 형질전환에 의해 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1이 과발현되는 것을 특징으로 하는 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 PTPRT는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 2)의 탈인산화 정도 측정 방법은 면역침강 분석, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사성 동위원소 검출법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 2)의 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화는 PTPRT가 신타신-결합 단백질 1의 145 번째에 위치한 타이로신을 탈인산화시키는 것을 특징으로 하는 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 7

- 1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 PTPRT의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포

합하는 SNARE 복합체 형성 조절제 스크리닝 방법.

**청구항 8**

- 1) 피검 물질을 해마 신경세포주(hippocampal neuron)에 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 해마 신경세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 단계 2)의 탈인산화 정도 측정 방법은 면역침강 분석, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사성 동위원소 검출법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법.

**청구항 10**

- 1) 피검 물질을 해마 신경세포주에 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 해마 신경세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SNARE 복합체 형성 조절제의 스크리닝 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 및 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1)을 이용한 시냅스 형성 조절제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 신경전달물질의 분비를 위해서는 신경전달물질을 담지하고 있는 소포 (vesicle)의 표면에 존재하는 시냅토프레빈(Synaptobrevin), VAMP(Vesicle-associate membrane protein)와 전시냅스 세포막 (pre-synaptic plasma membrane)에 존재하는 SNAP25, 신타신(Syntaxin)의 3개의 단백질이 SNARE(soluble N-ethylmalei-44 mid-sensitive factor attachment protein receptor) 복합체를 형성하고 Ca<sup>2+</sup>의 자극에 의해 세포외로 분비된다.

[0003] 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1, Sec/Munc18-like protein)은 SNARE 복합체의 구성단백질로 잘 알려져 있지만, 신타신 1과 단단한 결합 덕분에 시냅스 소포체 융합(synaptic vesicle fusion)과 연관지어 진다. 진핵 세포에서 세포막 융합은 SNAREs 및 신타신-결합 단백질의 조립에 의해 매개된다. 신타신-결합 단백질 1은 SNAREs와 결합하여 활성화를 조절한다. 원래, Sec1/Munc18 단백질(포유류 상동 unc-18, mammalian homologue of unc-18)은 신타신에 안정하게 결합하는 뇌 단백질이다. 신타신-결합 단백질 1에 결합된 신타신 1은 신타신 1의 파트너인 SNAREs가 접근할 수 없게 만드는 "닫힘(closed)" 형태를 취하는 것으로 보인다. 따라서, 신타신 1은 신타신-결합 단백질 1과 분리되고 "열림(open)" 형태로 바뀌어야 SNARE 복합체에 결합할 수 있다. 그러나, 열린 신타신 1 돌연변이(L165A, E166A)는 신타신-결합 단백질 1과 상호작용하는데 아무런 영향을 미치지 않으며, 그 대신, 신타신 1의 N-말단 모티프가 변형되었을 때(L8A), 신타신-결합 단백질 1과의 상호작용이 완화되고 SNARE-촉매화된 막 융합에 있어서 신타신-결합 단백질 1의 촉진성 기능이 극단적으로 완화된다고 보고되고 있다. 최근 막 융합 동안 신타신-결합 단백질 1의 1차 타겟이 3차 SNARE 복합체인 것으로

생각되며, 이는 신타신 1의 N-말단 뿐만 아니라 t- 및 v-SNARE 서브유닛(subunit)으로부터 핵심 영역(core regions)을 포함한 신타신-결합 단백질 1과 다중 접촉 부위를 형성한다고 보고되고 있다.

[0004] 신타신-결합 단백질 3(Munc18c)는 타이로신 인산화를 통해 조절되고, 신타신-결합 단백질 3의 인산화는 신타신 4로부터 신타신-결합 단백질 3을 분리할 수 있다. 이러한 신타신-결합 단백질의 활성화는 사이클린-의존적 키나아제 5(cyclin-dependent kinase 5) 또는 단백질 키나아제 C에 의해 세린/트레오닌(serine/threonine) 잔기의 인산화를 통해 조절된다. 그러나, 타이로신 키나아제 또는 타이로신 탈인산화효소에 의한 신타신-결합 단백질의 조절 역할이 아직 알려져 있지 않으며, 인산화의 조절 기작 역시 알려져 있지 않다.

[0005] 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT)는 중추신경계에서 주로 발현되고, 시냅스 형성 및 시냅스 신호 전달을 조절한다. PTPRT 활성화는 신경세포의 타이로신 인산화효소 Fyn에 의해 조절된다. PTPRT 기질은 암 세포에서 일부 확인되고 있지만, 신경세포 발달과 연관된 PTPRT 특이적 기질은 많이 알려져 있지 않다.

[0006] 이에 본 발명자들은 PTPRT에 대한 신경세포의 기질을 찾기 위해 노력한 결과, PTPRT 항체에 의해 매개되는 면역 침강반응을 적용한 프로테오믹스 접근법을 랫트 뇌 시냅소솜(synaptosome)에 적용하여 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT의 신규한 기질임을 확인하고, PTPRT에 의해 탈인산화 된 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진함을 확인함으로써, 상기 PTPRT 및 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1이 시냅스 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 본 발명의 목적은
- [0008] 1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;
- [0009] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0010] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공하기 위한 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0012] 1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;
- [0013] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0014] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은
- [0016] 1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;
- [0017] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및

- [0018] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SNARE 복합체 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은
- [0020] 1) 피검 물질을 해마 신경세포주(hippocampal neuron)에 처리하는 단계;
- [0021] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0022] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 해마 신경세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0023] 아울러, 본 발명은
- [0024] 1) 피검 물질을 해마 신경세포주에 처리하는 단계;
- [0025] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0026] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 해마 신경세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SNARE 복합체 형성 조절제의 스크리닝 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0027] 본 발명의 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1)은 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT)의 신규한 기질로서 해마 신경세포(hippocampal neuron)의 신경시냅스(neuronal synapse)에서 나타나고, PTPRT에 의해 탈인산화된 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진하므로, 상기 PTPRT 및 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1을 SNARE 복합체 형성 촉진제를 포함한 시냅스 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0028] 도 1A는 항-단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT)-특이적 단일클론항체를 적용하여 랫트(rat) 뇌 시냅토솜(synaptosome) 단백질의 분석한 도이다.
- 도 1B는 펩타이드 이온의 결합된 MS/MS 스펙트럼의 아미노산 서열을 나타낸 도이다.
- 도 2A는 랫트 시냅토솜에서 항-PTPRT(RT) 항체에 의해 면역침강된 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1, STXBP1)을 나타낸 도이다.
- 도 2B는 랫트 시냅토솜에서 항-신타신-결합 단백질 1 항체에 의해 면역침강된 PTPRT를 나타낸 도이다.
- 도 2C는 이종성 세포(heterologous cell)에서 항-신타신-결합 단백질 1 항체에 의해 면역침강된 전장 PTPRT(RT-FL)을 나타낸 도이다.
- 도 2D는 이종성 세포에서 항-신타신-결합 단백질 1 항체에 의해 면역침강된 PTPRT 촉매 도메인(RT-D)을 나타낸 도이다.
- 도 2E는 랫트 뇌 발달 동안 신타신-결합 단백질 1 발현 변화를 나타낸 도이다.
- 도 3A는 해마 신경세포(hippocampal neuron)의 수상돌기(dendritic spine)에 위치한 신타신-결합 단백질 1을 나타낸 도이다.
- 도 3B는 해마 신경세포의 축색돌기(axone)에 위치한 신타신-결합 단백질 1을 나타낸 도이다.
- 도 3C는 후시냅스(post-synaptic)에 위치한 신타신-결합 단백질 1을 나타낸 도이다.
- 도 3D는 전시냅스(pre-synaptic)에 위치한 신타신-결합 단백질 1을 나타낸 도이다.

도 3E는 신경 시냅스(neuronal synapse)에서 PTPRT 및 신타신-결합 단백질의 위치를 나타낸 도이다.

도 4A는 해마 신경세포에서 인산화된 신타신-결합 단백질 1을 나타낸 도이다.

도 4B는 이중성 세포에서 신경 타이로신 키나아제(neuronal tyrosine kinase) Fyn에 의해 인산화되고 PTPRT에 의해 탈인산화 되는 신타신-결합 단백질 1을 나타낸 도이다:

wtRT; 야생형 PTPRT; 및

2csRT: 비활성화 PTPRT.

도 4C는 이중성 세포에서 PTPRT의 신타신-결합 단백질 1의 타이로신 타겟 부위를 나타낸 도이다:

STXBP1-WT: 야생형 신타신-결합 단백질 1;

STXBP1-Y75F: 75 번째 타이로신을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 변경한 신타신-결합 단백질 1 돌연변이;

STXBP1-Y145F: 145 번째 타이로신을 페닐알라닌으로 변경한 신타신-결합 단백질 1 돌연변이;

STXBP1-Y212F: 212 번째 타이로신을 페닐알라닌으로 변경한 신타신-결합 단백질 1 돌연변이; 및

STXBP1-Y499F: 499 번째 타이로신을 페닐알라닌으로 변경한 신타신-결합 단백질 1 돌연변이.

도 5는 PTPRT에 의한 신타신-결합 단백질 1 및 신타신 1(syntaxin 1, STX1)의 상호작용 조절을 나타낸 도이다:

STX1-WT: 야생형 신타신 1;

STX1-LEAA: 신타신 1의 열린(open) 형태 돌연변이; 및

STX1-L8A: 8 번째 루신(leucine)을 알라닌(alanine)으로 변경한 신타신 1 돌연변이.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030]

본 발명은

[0031]

1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;

[0032]

2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및

[0033]

3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0034]

상기 단계 1)의 세포주는 형질전환에 의해 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1이 과발현되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0035]

상기 PTPRT는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖으며, 이의 단편은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0036]

상기 단계 2)의 탈인산화 정도 측정 방법은 면역침강 분석, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사성 동위원소 검출법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0037]

상기 단계 2)의 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화는 PTPRT가 신타신-결합 단백질 1의 145 번째에 위치한 타이로신을 탈인산화시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0038]

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인간 PTPRT, PTPRT 촉매 도메인(catalytic domain)(RT-D), 신타신-결합 단백질 1, 타이로신 비인산화(non-phosphorylation) 모방(mimicking) 신타신-결합 단백질 1 돌연변이(Y75F, Y145F, Y212F 및 Y499F), 신타신 1(syntaxin 1) 및 신타신 1 돌연변이(L8A)를 포함한 벡터를 제조하였다.



- [0039] 또한, 본 발명자들은 PTPRT의 상호작용 파트너를 확인하기 위하여, 항-PTPRT-특이적 단일 클론항체를 적용하여 MS/MS 분석을 수행한 결과, 신타신-결합 단백질 1이 신규한 상호작용 파트너임을 확인하였다(도 1A 및 도 1B 참조).
- [0040] 또한, 본 발명자들은 랫트(rat) 시냅토솜(synaptosome)에서 PTPRT와 신타신-결합 단백질 1의 상호작용을 확인하기 위하여, 항-PTPRT 항체 및 항-신타신-결합 단백질 1 항체를 이용하여 공동-면역침강(co-immunoprecipitation) 분석을 수행한 결과, 항-PTPRT 항체에 의해 신타신-결합 단백질 1이 침전되고, 반대로, 항-신타신-결합 단백질 1에 의해 PTPRT가 침전되는 것을 확인함으로써, 랫트 시냅토솜에서 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT와 상호작용함을 확인하였다(도 2A 및 도 2B).
- [0041] 또한, 본 발명자들은 이종성 세포(heterologous cell)에서 PTPRT와 신타신-결합 단백질 1의 상호작용을 확인하기 위하여, HEK293T 세포에 전장 PTPRT(RT-FL) 또는 PTPRT 촉매 도메인(RT-D), 및 신타신-결합 단백질 1(STXBP1)을 포함한 벡터를 형질감염하고, 항-PTPRT 항체 및 항-신타신-결합 단백질 1 항체를 이용하여 공동-면역침강 분석을 수행한 결과, 항-신타신-결합 단백질 1 항체에 의해 전장 PTPRT 및 PTPRT 촉매 도메인 모두 침전되는 것을 확인함으로써, 이종성 세포에서 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT의 촉매 도메인과 상호작용함을 확인하였다(도 2C 및 도 2D).
- [0042] 또한, 본 발명자들은 뇌 발달 동안 신타신-결합 단백질 1의 발현 변화를 확인하기 위하여, 배자기 18일(E18) 랫트, 생후 1 및 3일(P1 및 P3)된 랫트, 및 생후 1, 2, 3 및 6주(1W, 2W, 3W 및 6W)된 랫트의 뇌 조직을 이용하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행한 결과, 성인 단계로 갈수록 신타신-결합 단백질 1 및 PTPRT의 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, 뇌 발달 동안 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT와 상호작용함을 확인하였다(도 2E).
- [0043] 또한, 본 발명자들은 PTPRT 및 신타신-결합 단백질의 발현 위치를 확인하기 위하여, E18 랫트로부터 준비된 해마 신경세포에서 녹색 형광단백이 접합된 수상돌기(dendritic spine) 마커인 항-MAP2 항체, 축색돌기(axon) 마커인 항-신경미세섬유 L(neurofilament L; NF-L) 항체, 후시냅스(post-synaptic) 마커인 항-PSD-95 항체, 전시냅스(pre-synaptic) 마커인 항-시냅토파이신(synaptophysin) 항체 및 항-PTPRT 항체, 및 빨강 형광단백이 접합된 항-신타신-결합 단백질 1 다클론 항체를 이용하여 면역형광분석을 수행한 결과, 신타신-결합 단백질 1이 해마 신경세포의 수상돌기, 축색돌기, 신경 시냅스(neuronal synapses)에서 나타나고, 신경 시냅스에서 PTPRT와 동일한 위치에서 나타나는 것을 확인함으로써, 상기 신타신-결합 단백질 1 및 PTPRT 모두 신경 시냅스에서 발현됨을 확인하였다(도 3A 내지 도 3E).
- [0044] 또한, 본 발명자들은 PTPRT의 신규한 기질로서 신타신-결합 단백질 1의 타이로신 타겟을 확인하기 위하여, 타이로신 탈인산화 억제제인 펄바나테이트(pervanadate)를 처리한 해마 신경세포, 야생형 PTPRT(wtRT) 또는 비활성 PTPRT 돌연변이(2csRT), 신경 타이로신 키나아제(neuronal tyrosine kinase) Fyn 및 신타신-결합 단백질 1(STXBP1)을 포함하는 벡터를 형질감염시킨 HEK293T 세포 및 신타신-결합 단백질 1(STXBP1-WT) 또는 비인산화 타이로신 모방 신타신-결합 단백질 1 돌연변이(STXBP1-Y75F, STXBP1-Y145F, STXBP1-Y212F 또는 STXBP1-Y499F), Fyn, PTPRT(wtRT) 또는 비활성 PTPRT 돌연변이(2csRT)를 포함하는 벡터를 형질감염시킨 HEK293T 세포를 이용하여 면역침강 분석을 수행한 결과, 탈인산화 억제제를 처리한 해마 신경세포에서 신타신-결합 단백질 1의 타이로신 인산화가 증가하고(도 4A), Fyn 및 신타신-결합 단백질 1을 동시 발현한 HEK293T 세포와 달리 Fyn, 신타신-결합 단백질 1 및 PTPRT 동시 발현한 HEK293T 세포에서 인산화가 감소하며(도 4B), Fyn 및 신타신-결합 단백질 1 비인산화 타이로신 모방 돌연변이 Y145F(STXBP1-Y145F)를 동시 발현한 HEK293T 세포에서 인산화가 감소하는 것을 확인함으로써(도 4C), 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT의 새로운 기질이며, 신타신-결합 단백질 1의 145번 타이로신 잔기가 PTPRT의 주요한 탈인산화 타겟임을 확인하였다(도 4A 내지 4C).
- [0045] 또한, 본 발명자들은 PTPRT가 신타신-결합 단백질 1 및 신타신 1의 상호작용에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 신타신 1(STX1-WT), 신타신 1 돌연변이 (STX1-L8A) 또는 신타신 1의 열린(open) 형태 돌연변이(LEAA), 및 신타신-결합 단백질 1(STXBP1-WT) 또는 비인산화 타이로신 모방 신타신-결합 단백질 1 돌연변이 Y145F(STXBP1-Y145F)를 포함하는 벡터를 형질감염시킨 HEK293T 세포를 이용하여 면역침강 분석을 수행한 결과, 타이로신 비인산화 모방 신타신-결합 단백질 1 돌연변이(Y145F)와 신타신 1 돌연변이(L8A)의 상호작용이 감소하지 않고, 타이로신 비인산화 모방 신타신-결합 단백질 1 돌연변이(Y145F)가 신타신 1(STX1-WT)과 더 강하게 결합하는 것을 확인함으로써, 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT에 의해 탈인산화 되면 신타신 1과의 결합이 증가하며, 이를 통해 PTPRT가 신타신-결합 단백질 1 및 신타신 1의 상호작용을 조절함을 확인하였다(도 5 참조).
- [0046] 따라서, 본 발명의 신타신-결합 단백질 1은 PTPRT의 신규한 기질로서 해마 신경세포의 신경 시냅스에서 나타나



고, PTPRT에 의해 145 번째 타이로신 잔기가 탈인산화된 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진하므로, 상기 PTPRT 및 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1을 시냅스 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다.

- [0047] 또한, 본 발명은
- [0048] 1) 피검 물질을 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1) 발현 세포주에 처리하는 단계;
- [0049] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0050] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 PTPRT 또는 이의 단편, 및 신타신-결합 단백질 1 발현 세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SNARE 복합체 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 신타신-결합 단백질 1은 PTPRT의 신규한 기질로서 해마 신경세포의 신경 시냅스에서 나타나고, PTPRT에 의해 145 번째 타이로신 잔기가 탈인산화된 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진하므로, 상기 PTPRT 및 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1을 SNARE 복합체 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은
- [0053] 1) 피검 물질을 해마 신경세포주(hippocampal neuron)에 처리하는 단계;
- [0054] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0055] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 해마 신경세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 시냅스 형성 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0056] 상기 단계 2)의 탈인산화 정도 측정 방법은 면역침강 분석, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사성 동위원소 검출법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 신타신-결합 단백질 1은 PTPRT의 신규한 기질로서 해마 신경세포의 신경 시냅스에서 나타나고, PTPRT에 의해 145 번째 타이로신 잔기가 탈인산화된 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진하므로, 해마 신경세포주에서 상기 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1을 시냅스 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은
- [0059] 1) 피검 물질을 해마 신경세포주에 처리하는 단계;
- [0060] 2) 단계 1)의 세포주에서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 측정하는 단계; 및
- [0061] 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 물질을 처리하지 않는 해마 신경세포주와 비교하여 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 정도를 증가시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SNARE 복합체 형성 조절제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 신타신-결합 단백질 1은 PTPRT의 신규한 기질로서 해마 신경세포의 신경 시냅스에서 나타나고, PTPRT에 의해 145 번째 타이로신 잔기가 탈인산화된 신타신-결합 단백질 1이 신타신 1과 결합하여 SNARE 복합체 형성을 촉진하므로, 해마 신경세포주에서 상기 PTPRT의 신규한 기질인 신타신-결합 단백질 1을 SNARE 복합체 형성 조절제의 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0063] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0064] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은

아니다.

[0065] <실시예 1> 인간 단백질 타이로신 탈인산화효소 수용체 T(protein tyrosine phosphatase receptor T; PTPRT) 및 신타신-결합 단백질 1(syntaxin-binding protein 1)을 포함하는 벡터의 제조

[0066] 전장 인간 PTPRT(NM\_133170, aa 1-1460; 서열번호 1), 전장 인간 신타신-결합 단백질 1 아형(isoform) b(NM\_001032221.3, aa 1-594; 서열번호 3) 및 전장 마우스 신타신 1(syntaxin 1)(NM\_016801, aa 1-288; 서열번호 4)을 GW1-CMV 내로 서브클론시켰다(A.R. Park, D. Oh, S.H. Lim, J. Choi, J. Moon, D.Y. Yu, S.G. Park, N. Heisterkamp, E. Kim, P.K. Myung, J.R. Lee, J. Cell Sci, 2012, 125, 4518-4531). PTPRT의 촉매 도메인(catalytic domain)(RT-D)(서열번호 2)을 p3xFLAG-CMV-7.1(Sigma, USA) 내로 PTPRT의 aa 921-1173을 암호화하는 DNA의 서브클로닝에 의해 구축하였다. 또한, 비활성 PTPRT(2cs PTPRT, C1103,1397S)를 p3xFLAG-CMV-7.1(Sigma, USA) 내로 암호화하는 DNA의 서브클로닝에 의해 구축하였다. 또한, 신타신-결합 단백질 1의 타이로신(tyrosine) 비인산화(non-phosphorylation) 모방(mimicking) 돌연변이를 제조하기 위하여, Quick-Change system(Stratagene)(Oh et al., submitted)을 이용하여 위치지정돌연변이(site-directed mutagenesis)에 의해 75, 145, 212 및 499 번째 타이로신을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 변경한 Y75F, Y145F, Y212F 및 Y499F 신타신-결합 단백질 1 컨스트럭트를 제조하였다. 또한, 신타신 1의 N-말단 돌연변이(L8A)를 제조하기 위하여, Quick-Change system을 이용하여 신타신 1의 8 번째 루신(leucine)을 알라닌(alanine)으로 변경하였다. 또한, 신타신 1의 열린(open) 형태 돌연변이(LEAA)를 제조하기 위하여, Quick-Change system을 이용하여 신타신 1의 165 번째 루신 및 166 번째 글루탐산(glutamic acid)을 알라닌으로 변경하였다.

[0067] <실시예 2> PTPRT와 신타신-결합 단백질 1의 상호작용 확인

[0068] <2-1> PTPRT의 상호작용 파트너 확인

[0069] PTPRT의 가능한 상호작용 파트너를 확인하기 위하여, 항-PTPRT-특이적 단일클론항체를 적용하여 MS/MS 분석을 수행하였다.

[0070] 구체적으로, 항-PTPRT-특이적 단일클론항체(S.H. Lim, S.K. Kwon, M.K. Lee, J.Moon, D.G. Jeong, E. Park, S.J. Kim, B.C. Park, S.C. Lee, S.E. Ryu, D.Y. Yu, B.H. Chung, E. Kim, P.K. Myung, J.R. Lee, EMBO J, 2009, 28, 3564-3578)를 이용하여 면역침강된 랫트(rat) 뇌 시냅토솜 단백질의 분석을 위해 MS/MS 분석을 수행한 후, Mascot 데이터베이스 검색 프로그램을 이용하여, 펩타이드 이온의 결합된 MS/MS 스펙트럼의 아미노산 서열을 확인하였다.

[0071] 그 결과, 도 1A 및 도 1B에 나타낸 바와 같이, 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT의 가능한 상호작용 파트너임을 확인하였다(도 1A 및 도 1B).

[0072] <2-2> 랫트 시냅토솜(synaptosome)에서 PTPRT와 신타신-결합 단백질 1의 상호작용 확인

[0073] PTPRT와 신타신-결합 단백질 1의 상호작용을 확인하기 위하여, 항-PTPRT 항체 및 항-신타신-결합 단백질 1 항체를 이용하여 공동-면역침강(co-immunoprecipitation) 분석을 수행하였다.

[0074] 구체적으로, 데옥시콜산나트륨(sodium deoxycholate)으로 용해시킨 랫트 시냅토솜(synaptosome)을 항-PTPRT 단일클론 항체 또는 비-면역 마우스 면역글로불린(IgG)과 반응시키고 SDS 시료 완충용액을 첨가하여 반응을 종결시킨 후, SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane(Amersham, UK)으로 전달시켰다. 그런 다음, 일차 항체로 항-신타신-결합 단백질 1 항체(Pierce, USA)를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(Pierce chemical co, USA)를 이용하여 확인함으로써, 공동-면역 침강된 신타신-결합 단백질 1을 탐색하였다(도 2A). 또한, 데옥시콜산나트륨(sodium deoxycholate)으로 용해시킨 랫트 시냅토솜(synaptosome)을 항-신타신-결합 단백질 1 단일클론 항체 또는 비-면역 마우스 면역글로불린(IgG)과 반응시킨 후, 상기와 같이 공동-면역침강된 PTPRT를 항-PTPRT 항체를 이용하여 탐색하였다(도 2B).

[0075] 그 결과, 도 2A 및 도 2B에 나타낸 바와 같이, 랫트 시냅토솜에서 신타신-결합 단백질 1이 항-PTPRT 항체에 의하여 침전되고, 반대로 PTPRT 역시 항-신타신-결합 단백질 1 항체에 의해 침전되는 것을 확인함으로써, 랫트 시냅토솜에서 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT와 상호작용하는 것을 확인하였다(도 2A 및 2B).

- [0076] <2-3> 이종성 세포(heterologous cell)에서 PTPRT와 신타신-결합 단백질 1의 상호작용 확인
- [0077] 이종성 세포에서 PTPRT와 신타신-결합 단백질 1과의 상호작용을 확인하기 위하여, HEK293T 세포를 이용해 공동-면역침강 분석을 수행하였다.
- [0078] 구체적으로, 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양한 HEK293T 세포(ATCC, USA)에 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 전장 PTPRT(RT-FL) 및 신타신-결합 단백질 1(STXBP1)을 포함한 벡터를 인산칼슘 방법으로 형질감염시키고, 2일 후에 프로티아제 억제제(protease inhibitor) 및 탈인산화효소 억제제(phosphatase inhibitor), 1%(v/v) Triton X-100을 포함한 차가운 pH 7.4 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)(Invitrogen, USA)를 이용해 30분 동안 4℃에서 반응시켜 원심분리 후 세포 용해물을 수득하였다. 상기 용해된 세포의 세포잔해를 제거한 용해물(Cleared lysate)을 단백질 A-아가로즈에 결합된 항-신타신-결합 단백질 1 항체와 반응시키고 SDS 시료 완충용액을 첨가하여 상기 반응을 종결시킨 후, 상기 실시예 <2-2>와 같이 공동-면역침강된 전장 PTPRT를 항-PTPRT 항체를 이용해 탐색하였다(도 2C). 또한, 상기와 같이 HEK293T 세포에 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 PTPRT 촉매 도메인(RT-D) 및 신타신-결합 단백질 1을 포함한 벡터를 형질감염 및 용해시키고, 용해된 세포의 세포잔해를 제거한 용해물을 항-신타신-결합 단백질 1 항체와 반응시켜 공동-면역침강된 PTPRT 촉매 도메인을 항-PTPRT 촉매 도메인 항체를 이용하여 탐색하였다(도 2D).
- [0079] 그 결과, 도 2C 및 도 2D 에 나타난 바와 같이, HEK293T 세포에서 발현된 전장 PTPRT 및 PTPRT 촉매 도메인 모두 항-신타신-결합 단백질 1 항체에 의해 침전 되는 것을 확인함으로써, 상기 PTPRT와 신타신-결합 단백질 1이 세포내 PTPRT의 촉매 도메인과 상호작용하는 것을 확인하였다(도 2C 및 2D).
- [0080] <2-4> 뇌 발달 동안 신타신-결합 단백질 1의 발현 변화 확인
- [0081] 뇌 발달 동안 신타신-결합 단백질 1의 발현 변화를 확인하기 위하여, 랫트 뇌 조직을 이용하여 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하였다.
- [0082] 구체적으로, 배자기(embryonic day) 18일(E18) 랫트, 생후 1 및 3일(P1 및 P3)된 랫트, 및 생후 1, 2, 3 및 6 주(1W, 2W, 3W 및 6W)된 랫트로부터 뇌를 적출하고, 프로티아제 억제제, 0.32 M 수크로즈, 4 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 차가운 완충 수크로즈(pH 7.3)로 조직 분쇄기를 이용해 용해하여 조직 용해물을 수득하고, 수득한 조직 용해물을 수득하였다. 상기 수득한 조직 용해물은 SDS 시료 완충용액을 첨가하여 반응을 종결시킨 후, SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane으로 시켰다. 각 인자의 일차 항체를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 부은 일차 항체에 HRP-접한 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL을 이용하여 확인하였다. 일차 항체로 항-신타신-결합 단백질 1, 항-PSD-95 항체(Upstate, Germany) 및 항- $\alpha$ -tubulin 항체(Sigma, USA)를 사용하였다.
- [0083] 그 결과, 도 2E에 나타난 바와 같이, 랫트 뇌 발달 동안 신타신-결합 단백질 1의 발현이 PTPRT와 유사하게 증가하고, 성인 단계까지 점차적으로 신타신-결합 단백질 1의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 2E). 따라서, 상기 <실시예 2>의 결과들을 통해 신타신-결합 단백질 1이 신경 시냅스(neuronal synapses)에서 뇌 특이적으로(brain-specific) 발현되는 타이로신 탈인산화효소인 PTPRT와 상호작용함을 확인하였다.
- [0084] <실시예 3> PTPRT 및 신타신-결합 단백질 1의 발현 위치 확인
- [0085] PTPRT 및 신타신-결합 단백질 1이 발현되는 위치를 확인하기 위하여, 해마 신경세포를 이용하여 면역형광분석을 수행하였다.
- [0086] 구체적으로, 배자기 18일(E18) 랫트로부터 준비된, 초기 해마 신경세포를 폴리-D-리신으로 사전 코팅된 유리 커버슬립(coverlip) 위에서 글루타민(glutamine) 및 B-27 무혈청 보충제(invitroten, USA)를 포함한 무혈청 신경기저 배지(neurobasal media)(Invitrogen, USA)로 체외배양법으로(*in vitro*) 15 일 동안 배양(15 DIV)하였다. 상기 15 DIV 해마 신경세포를 1×PBS로 세척하고 상온에서 20분 동안 4%(v/v) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)/4%(w/v) 수크로즈(sucrose)로 고정하였다. 그 다음, 상기 해마 신경세포를 0.2% TritonX-100(Sigma, USA)으로 상온에서 15분 동안 침투하고 4℃에서 하루 동안, 수상돌기(dendritic spine) 마커인 항-

MAP2 항체(Sigma, USA)(도 3A), 축색돌기(axon) 마커인 항-신경미세섬유 L(neurofilament L, NF-L) 항체(Cell signaling, USA)(도 3B), 후시냅스(post-synaptic) 마커인 항-PSD-95 항체(도 3C), 전시냅스(pre-synaptic) 마커인 항-시냅토파이신(synaptophysin, Synph) 항체(Santa Cruz, USA)(도 3D) 및 항-PTPRT 항체(도 3E), 및 항원의 C-말단 항원결정기(epitope)(aa 580 내지 594)에 결합하는 항-신탁신-결합 단백질 1 다클론 항체로 반응시킨 후, PBS로 세 번 세척하였다. 그 다음, 상온에서 2시간 동안 1:1000으로 희석한 Cy3-접합 이차 항체 및 FITC-접합 이차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)와 함께 반응시키고, PBS로 세척한 후 LSM510 공초점 현미경(LSM 510 Meta, Zeiss, Göttingen, Germany)를 이용해 시각화하였다(Scale bar, 20  $\mu$ m).

[0087] 그 결과, 도 3A 및 3B에 나타낸 바와 같이, 신탁신-결합 단백질 1과 MAP2 및 NF-L 단백질의 위치가 유사한 것을 확인함으로써, 상기 신탁신-결합 단백질 1이 해마 신경세포의 수상돌기 및 축색돌기에서 나타남을 확인하였다(도 3A 및 3B).

[0088] 또한, 도 3C 및 3D에 나타낸 바와 같이, 신탁신-결합 단백질 1과 PSD-95 및 시냅토파이신과 동일한 위치에 존재하는 것을 확인함으로써, 상기 신탁신-결합 단백질 1이 신경 시냅스(neuronal synapses)에서 나타남을 확인하였다(도 3C 및 3D)

[0089] 또한, 도 3E에 나타낸 바와 같이, 신탁신-결합 단백질 1이 신경 시냅스(neuronal synapses)에서 PTPRT와 동일한 위치에 나타나는 것을 확인하였다(도 3E). 따라서, 상기의 결과들을 통해 신탁신-결합 단백질 1 및 PTPRT 모두 신경 시냅스에서 발현되며 상호결합할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0090] **<실시예 4> PTPRT의 신경세포 기질로서의 신탁신-결합 단백질 1 확인**

[0091] **<4-1> 해마 신경세포에서 신탁신-결합 단백질 1의 인산화 확인**

[0092] 신탁신-결합 단백질 1의 타이로신 인산화 정도를 확인하기 위하여, 타이로신 탈인산화 억제제를 이용하여 면역침강 분석을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 상기 <실시예 3>에 기재된 방법으로 획득한 15 DIV 해마 신경세포에 15분 동안 타이로신 탈인산화 억제제인 200  $\mu$ M 퍼바나데이트(pervanadate)를 처리하였다. 그 다음, 상기 실시예 <2-3>과 같이 용해된 세포의 세포 잔해를 제거한 용해물을 단백질 A-아가로즈에 결합된 항-신탁신-결합 단백질 1 항체(STXBP1) 또는 비면역 마우스 면역글로블린(IgG)과 반응시켜 면역침강 분석을 수행하였다. 면역침강된 타이로신 인산화된 신탁신-결합 단백질 1을 항-인산화된 타이로신 항체(Upstate, Germany)를 이용하여 탐색하였다.

[0094] 그 결과, 도 4A에 나타낸 바와 같이 탈인산화 억제제를 처리한 해마 신경세포에서 신탁신-결합 단백질 1의 타이로신 인산화가 증가하는 것을 확인함으로써, 신경세포에서 상기 신탁신-결합 단백질 1의 타이로신 잔기가 인산화됨을 확인하였다(도 4A).

[0095] **<4-2> PTPRT의 기질로서 신탁신-결합 단백질 1 확인**

[0096] 신경 타이로신 키나아제(neuronal tyrosine kinase) Fyn은 PTPRT와 상호작용하며, PTPRT의 내생 기질을 인산화한다고 보고되고 있다(A.R. Park, D. Oh, S.H. Lim, J. Choi, J. Moon, D.Y. Yu, S.G. Park, N. Heisterkamp, E. Kim, P.K. Myung, J.R. Lee, J. Cell Sci, 2012, 125, 4518-4531., S.H. Lim, S.K. Kwon, M.K. Lee, J. Moon, D.G. Jeong, E. Park, S.J. Kim, B.C. Park, S.C. Lee, S.E. Ryu, D.Y. Yu, B.H. Chung, E. Kim, P.K. Myung, J.R. Lee, EMBO J, 2009, 28, 3564-3578). 따라서, 신탁신-결합 단백질 1이 PTPRT의 신경세포 기질인지 확인하기 위하여, Fyn을 이용하여 면역침강 분석을 수행하였다.

[0097] 구체적으로, 상기 실시예 <2-3>과 같이 HEK293T 세포에 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 신탁신-결합 단백질 1(STXBP1), Fyn, 야생형 PTPRT(wtRT) 또는 비활성 PTPRT 돌연변이(2csRT)를 포함하는 벡터를 형질감염하고 2일 후 세포 용해물을 수득하였다. 용해된 세포의 세포 잔해를 제거한 용해물을 단백질 A-아가로즈에 결합된 항-신탁신-결합 단백질 1 항체와 반응시켜 면역침강 분석을 수행하였다. 면역침강된 타이로신 인산화된 신탁신-결합 단백질 1을 항-인산화된 타이로신 항체를 이용하여 탐색하였다.

[0098] 그 결과, 도 4B에 나타낸 바와 같이, Fyn 및 신탁신-결합 단백질 1을 동시에 발현한 경우, Fyn에 의해 신탁신-결합 단백질 1이 인산화가 증가하는 반면, Fyn, 신탁신-결합 단백질 1 및 PTPRT를 동시에 발현한 경우, PTPRT가

현저하게 신타신-결합 단백질 1의 인산화를 감소시키는 것을 확인함으로써, 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT의 새로운 기질이며, PTPRT에 의해 탈인산화 됨을 확인하였다(도 4B).

[0099] <4-3> PTPRT의 기질로서 신타신-결합 단백질 1의 탈인산화 부위 확인

[0100] PTPRT의 기질로서 신타신-결합 단백질 1의 타이로신 타겟 부위를 확인하기 위하여, 비인산화 타이로신 모방 (mimicking) 신타신-결합 단백질 1 돌연변이를 이용해 면역침강 분석을 수행하였다.

[0101] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>와 같이 HEK293T 세포에 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 신타신-결합 단백질 1(STXBP1-WT), 신타신-결합 단백질 1 비인산화 타이로신 모방 돌연변이 Y75F, Y145F, Y212F 또는 Y499F(STXBP1-Y75F, STXBP1-Y145F, STXBP1-Y212F 및 STXBP1-Y499F), Fyn, PTPRT(wtRT) 및 비활성 PTPRT 돌연변이(2csRT)를 포함하는 벡터를 형질감염하고 2 일 후 세포 용해물을 수득하였다. 용해된 세포의 세포 잔해를 제거한 용해물을 단백질 A-아گار오스에 결합된 항-신타신-결합 단백질 1 항체와 반응시켜 면역침강 분석을 수행하였다. 면역침강된 타이로신 인산화된 신타신-결합 단백질 1을 항-인산화된 타이로신 항체를 이용하여 탐색하였다.

[0102] 그 결과, 도 4C에 나타난 바와 같이, Fyn 및 신타신-결합 단백질을 동시 발현한 경우, Fyn에 의해 신타신-결합 단백질의 인산화가 증가하는 반면, Fyn 및 신타신-결합 단백질 1 비인산화 타이로신 모방 돌연변이 Y145F(STXBP-Y145F)를 동시 발현한 경우, 신타신-결합 단백질 1 돌연변이의 인산화가 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 신타신-결합 단백질 1의 145 번째 타이로신 잔기가 Fyn 타이로신 키나아제 및 PTPRT 타이로신 탈인산화효소의 주요한 타겟임을 확인하였다(도 4C). 따라서, 상기 <실시예 4>의 결과들을 통해 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT의 새로운 기질이며, 145 번째 타이로신 잔기가 PTPRT의 주요한 탈인산화 타겟임을 확인하였다.

[0103] <실시예 5> PTPRT에 의한 신타신-결합 단백질 1 및 신타신 1(syntaxin 1)의 상호작용 조절 확인

[0104] 신타신-결합 단백질 1은 신타신 1의 결합 표면을 제공하는 도메인 1 및 3a에 의해 형성된 중앙 공동(central cavity)을 가지는 아치모양의(arch-shaped) 분자이다(K.M.S. Misura, R.H. Scheller, W.I. Weis, Nature 404, 2000, 355-362). 또한, 도메인 1 및 2 사이의 상호작용은 아치모양 및 신타신 1을 위한 중앙 공동을 형성하기 위한 패키징 준비를 위해 중요하며, 145 번째 타이로신은 도메인 1 및 2 사이의 연결자(linker) 주변에 위치하기 때문에, 상기 145 번째 타이로신의 인산화 및 탈인산화는 신타신-결합 단백질 1 및 신타신 1과의 상호작용을 조절한다. 한편, 신타신 1의 N-말단은 신타신-결합 단백질 1과 상호작용하기 위한 주된 도메인이며, 루신(leucine) 8번을 알라닌으로 바꾼 신타신 1 돌연변이(L8A)에 의해 상호작용이 억제된다고 보고되고 있다(J. Shen, D.C. Tareste, F. Paumet, J.E. Rothman, T.J. Melia, Cell 128, 2007, 183-195). 따라서, PTPRT에 의한 탈인산화가 신타신-결합 단백질 1과 신타신 1의 상호작용에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 신타신 1 돌연변이 및 신타신-결합 단백질 1 돌연변이를 이용하여 면역침강 분석을 수행하였다.

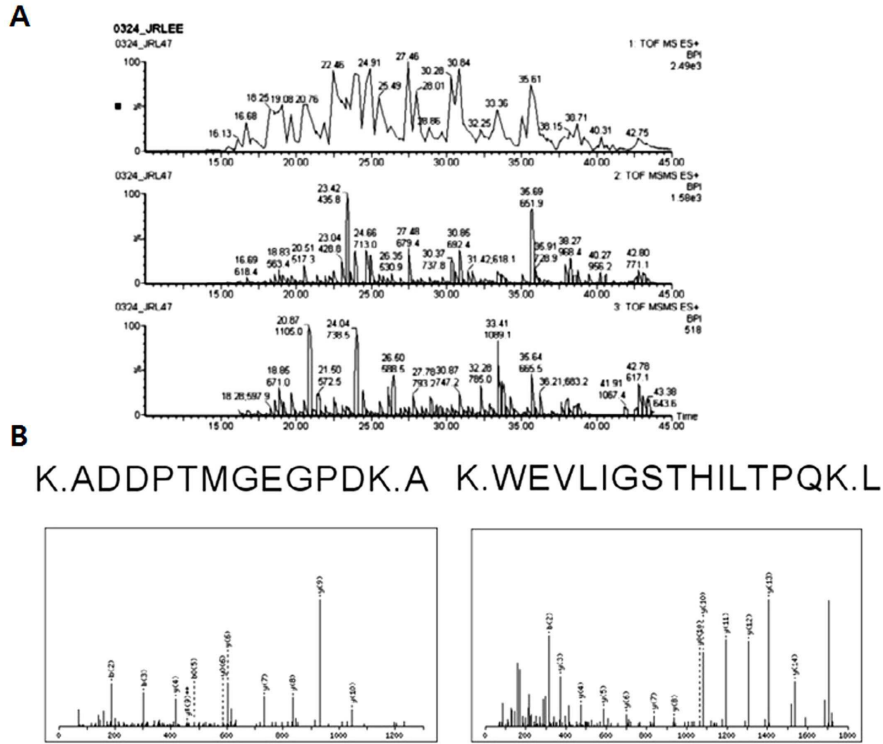
[0105] 구체적으로, 상기 실시예 <4-3>과 같이 HEK293T 세포에 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 신타신 1(STX1-WT), 신타신 1 돌연변이(STX1-L8A) 또는 신타신 1의 열린(open) 형태 돌연변이(LEAA), 및 신타신-결합 단백질 1(STXBP1-WT)(도 5 위) 또는 신타신-결합 단백질 1 비인산화 타이로신 모방 돌연변이 Y145F(STXBP1-Y145F)(도 5 아래)를 포함하는 벡터를 형질감염하고 2 일 후 세포 용해물을 수득하였다. 용해된 세포의 세포 잔해를 제거한 용해물을 단백질 A-아گار오스에 결합된 항-신타신-결합 단백질 1 항체와 반응시켜 면역침강 분석을 수행하였다. 면역침강된 신타신 1을 항-신타신 1 항체(Santa Cruz, USA)를 이용하여 탐색하였다.

[0106] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 신타신 1 돌연변이(L8A)가 야생형 신타신 1에 비해 신타신-결합 단백질 1과의 상호작용이 감소하는 반면, 타이로신 비인산화 모방 신타신-결합 단백질 1 돌연변이(Y145F)와 신타신 L8A 돌연변이의 상호작용이 감소하지 않는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 신타신-결합 단백질 1 돌연변이 Y145F는 야생형 신타신-결합 단백질 1보다 더 강하게 야생형 신타신 1과 결합하는 것을 확인함으로써, 상기 신타신-결합 단백질 1이 PTPRT에 의하여 탈인산화 되면 신타신 1과의 결합이 증가하며, 따라서 상기 PTPRT가 타이로신 탈인산화를 통해 신타신-결합 단백질 1과 신타신 1의 상호작용을 조절함을 확인하였다(도 5).

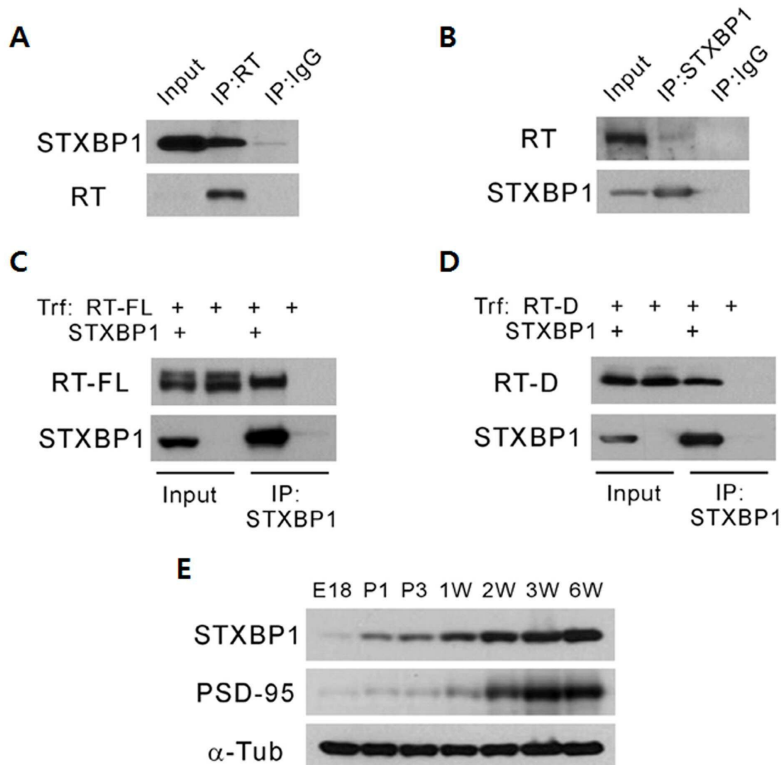


도면

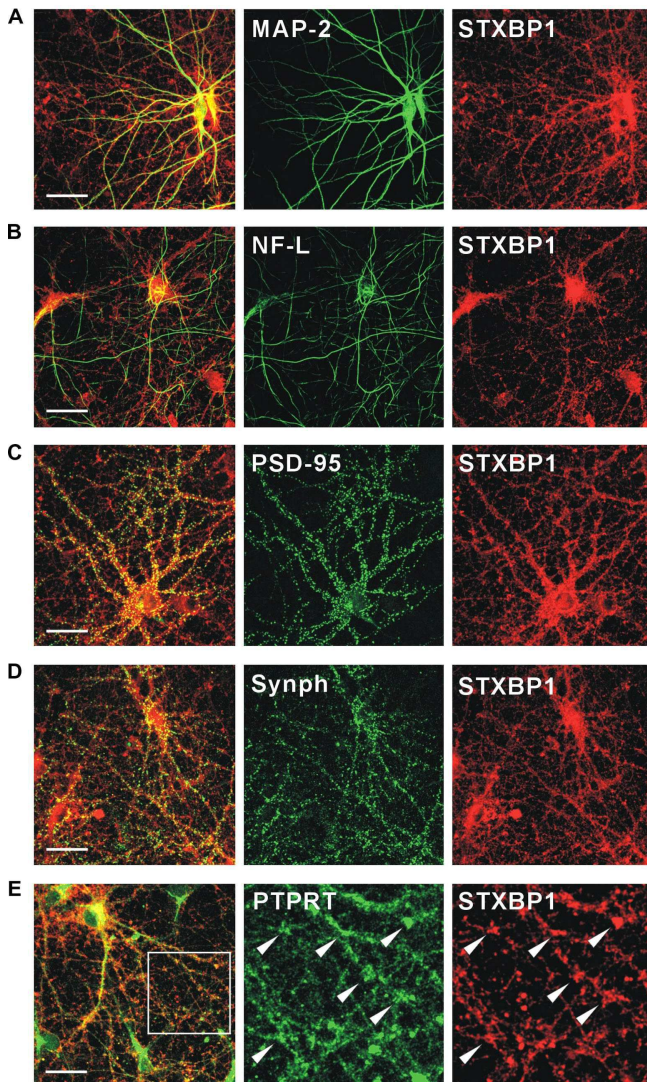
도면1



도면2



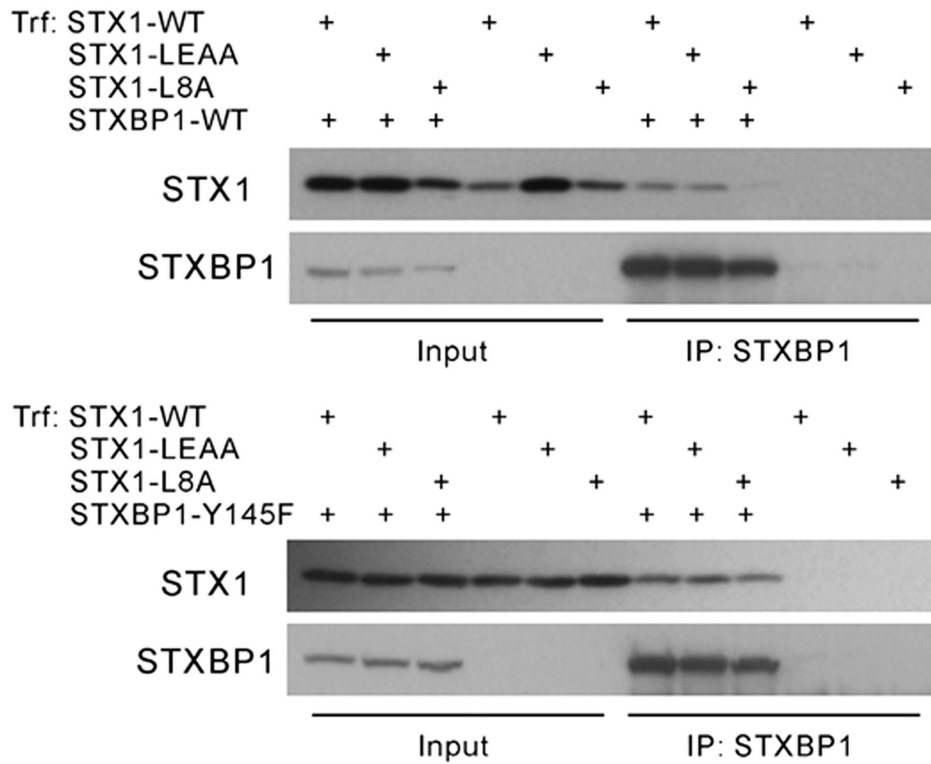
도면3







도면5



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> A screening method of agent for regulating synaptogenesis using PTPRT and syntaxin-binding protein 1
- <130> 13p-07-52
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1460
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ala Ser Leu Ala Ala Leu Ala Leu Ser Leu Leu Leu Arg Leu Gln

1 5 10 15

Leu Pro Pro Leu Pro Gly Ala Arg Ala Gln Ser Ala Ala Gly Gly Cys

20 25 30

Ser Phe Asp Glu His Tyr Ser Asn Cys Gly Tyr Ser Val Ala Leu Gly



290                      295                      300  
 Leu Trp Ile Lys Pro Asn Ala Asn Ser Ile Ile Gly Asp Gly Pro Ile  
  
 305                      310                      315                      320  
 Ile Leu Lys Glu Val Glu Tyr Arg Thr Thr Thr Gly Thr Trp Ala Glu  
                                  325                      330                      335  
 Thr His Ile Val Asp Ser Pro Asn Tyr Lys Leu Trp His Leu Asp Pro  
                                  340                      345                      350  
 Asp Val Glu Tyr Glu Ile Arg Val Leu Leu Thr Arg Pro Gly Glu Gly  
                                  355                      360                      365  
 Gly Thr Gly Pro Pro Gly Pro Pro Leu Thr Thr Arg Thr Lys Cys Ala  
                                  370                      375                      380  
  
 Asp Pro Val His Gly Pro Gln Asn Val Glu Ile Val Asp Ile Arg Ala  
 385                      390                      395                      400  
 Arg Gln Leu Thr Leu Gln Trp Glu Pro Phe Gly Tyr Ala Val Thr Arg  
                                  405                      410                      415  
 Cys His Ser Tyr Asn Leu Thr Val Gln Tyr Gln Tyr Val Phe Asn Gln  
                                  420                      425                      430  
 Gln Gln Tyr Glu Ala Glu Glu Val Ile Gln Thr Ser Ser His Tyr Thr  
                                  435                      440                      445  
 Leu Arg Gly Leu Arg Pro Phe Met Thr Ile Arg Leu Arg Leu Leu Leu  
  
 450                      455                      460  
 Ser Asn Pro Glu Gly Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu Val Val Gln Thr  
 465                      470                      475                      480  
 Glu Glu Asp Val Pro Gly Ala Val Pro Leu Glu Ser Ile Gln Gly Gly  
                                  485                      490                      495  
 Pro Phe Glu Glu Lys Ile Tyr Ile Gln Trp Lys Pro Pro Asn Glu Thr  
                                  500                      505                      510  
 Asn Gly Val Ile Thr Leu Tyr Glu Ile Asn Tyr Lys Ala Val Gly Ser  
                                  515                      520                      525  
  
 Leu Asp Pro Ser Ala Asp Leu Ser Ser Gln Arg Gly Lys Val Phe Lys  
 530                      535                      540



Lys Leu Ala Lys Lys Gln Lys Glu Thr Gln Ser Gly Ala Gln Arg Glu  
 805 810 815  
  
 Met Gly Pro Val Ala Ser Ala Asp Lys Pro Thr Thr Lys Leu Ser Ala  
 820 825 830  
 Ser Arg Asn Asp Glu Gly Phe Ser Ser Ser Ser Gln Asp Val Asn Gly  
 835 840 845  
 Phe Thr Asp Gly Ser Arg Gly Glu Leu Ser Gln Pro Thr Leu Thr Ile  
 850 855 860  
 Gln Thr His Pro Tyr Arg Thr Cys Asp Pro Val Glu Met Ser Tyr Pro  
 865 870 875 880  
 Arg Asp Gln Phe Gln Pro Ala Ile Arg Val Ala Asp Leu Leu Gln His  
 885 890 895  
 Ile Thr Gln Met Lys Arg Gly Gln Gly Tyr Gly Phe Lys Glu Glu Tyr  
 900 905 910  
 Glu Ala Leu Pro Glu Gly Gln Thr Ala Ser Trp Asp Thr Ala Lys Glu  
 915 920 925  
 Asp Glu Asn Arg Asn Lys Asn Arg Tyr Gly Asn Ile Ile Ser Tyr Asp  
 930 935 940  
 His Ser Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Asp Gly Asp Pro His Ser Asp  
 945 950 955 960  
  
 Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Asp Gly Tyr His Arg Pro Arg His Tyr  
 965 970 975  
 Ile Ala Thr Gln Gly Pro Met Gln Glu Thr Val Lys Asp Phe Trp Arg  
 980 985 990  
 Met Ile Trp Gln Glu Asn Ser Ala Ser Ile Val Met Val Thr Asn Leu  
 995 1000 1005  
 Val Glu Val Gly Arg Val Lys Cys Val Arg Tyr Trp Pro Asp Asp Thr  
 1010 1015 1020  
 Glu Val Tyr Gly Asp Ile Lys Val Thr Leu Ile Glu Thr Glu Pro Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 Ala Glu Tyr Val Ile Arg Thr Phe Thr Val Gln Lys Lys Gly Tyr His

1045                      1050                      1055  
 Glu Ile Arg Glu Leu Arg Leu Phe His Phe Thr Ser Trp Pro Asp His  
 1060                      1065                      1070  
 Gly Val Pro Cys Tyr Ala Thr Gly Leu Leu Gly Phe Val Arg Gln Val  
 1075                      1080                      1085  
 Lys Phe Leu Asn Pro Pro Glu Ala Gly Pro Ile Val Val His Cys Ser  
 1090                      1095                      1100  
  
 Ala Gly Ala Gly Arg Thr Gly Cys Phe Ile Ala Ile Asp Thr Met Leu  
 1105                      1110                      1115                      1120  
 Asp Met Ala Glu Asn Glu Gly Val Val Asp Ile Phe Asn Cys Val Arg  
 1125                      1130                      1135  
 Glu Leu Arg Ala Gln Arg Val Asn Leu Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr  
 1140                      1145                      1150  
 Val Phe Val His Asp Ala Ile Leu Glu Ala Cys Leu Cys Gly Asn Thr  
 1155                      1160                      1165  
 Ala Ile Pro Val Cys Glu Phe Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Ile Ser Arg  
  
 1170                      1175                      1180  
 Leu Asp Pro Gln Thr Asn Ser Ser Gln Ile Lys Asp Glu Phe Gln Thr  
 1185                      1190                      1195                      1200  
 Leu Asn Ile Val Thr Pro Arg Val Arg Pro Glu Asp Cys Ser Ile Gly  
 1205                      1210                      1215  
 Leu Leu Pro Arg Asn His Asp Lys Asn Arg Ser Met Asp Val Leu Pro  
 1220                      1225                      1230  
 Leu Asp Arg Cys Leu Pro Phe Leu Ile Ser Val Asp Gly Glu Ser Ser  
 1235                      1240                      1245  
  
 Asn Tyr Ile Asn Ala Ala Leu Met Asp Ser His Lys Gln Pro Ala Ala  
 1250                      1255                      1260  
 Phe Val Val Thr Gln His Pro Leu Pro Asn Thr Val Ala Asp Phe Trp  
 1265                      1270                      1275                      1280  
 Arg Leu Val Phe Asp Tyr Asn Cys Ser Ser Val Val Met Leu Asn Glu  
 1285                      1290                      1295  
 Met Asp Thr Ala Gln Phe Cys Met Gln Tyr Trp Pro Glu Lys Thr Ser



1300 1305 1310  
 Gly Cys Tyr Gly Pro Ile Gln Val Glu Phe Val Ser Ala Asp Ile Asp

1315 1320 1325  
 Glu Asp Ile Ile His Arg Ile Phe Arg Ile Cys Asn Met Ala Arg Pro

1330 1335 1340  
 Gln Asp Gly Tyr Arg Ile Val Gln His Leu Gln Tyr Ile Gly Trp Pro

1345 1350 1355 1360  
 Ala Tyr Arg Asp Thr Pro Pro Ser Lys Arg Ser Leu Leu Lys Val Val

1365 1370 1375  
 Arg Arg Leu Glu Lys Trp Gln Glu Gln Tyr Asp Gly Arg Glu Gly Arg

1380 1385 1390

Thr Val Val His Cys Leu Asn Gly Gly Gly Arg Ser Gly Thr Phe Cys

1395 1400 1405  
 Ala Ile Cys Ser Val Cys Glu Met Ile Gln Gln Gln Asn Ile Ile Asp

1410 1415 1420  
 Val Phe His Ile Val Lys Thr Leu Arg Asn Asn Lys Ser Asn Met Val

1425 1430 1435 1440  
 Glu Thr Leu Glu Gln Tyr Lys Phe Val Tyr Glu Val Ala Leu Glu Tyr

1445 1450 1455  
 Leu Ser Ser Phe

1460

<210> 2

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Trp Asp Thr Ala Lys Glu Asp Glu Asn Arg Asn Lys Asn Arg

1 5 10 15  
 Tyr Gly Asn Ile Ile Ser Tyr Asp His Ser Arg Val Arg Leu Leu Val

20 25 30  
 Leu Asp Gly Asp Pro His Ser Asp Tyr Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Asp

35 40 45

Gly Tyr His Arg Pro Arg His Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Met Gln

50 55 60  
 Glu Thr Val Lys Asp Phe Trp Arg Met Ile Trp Gln Glu Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Ile Val Met Val Thr Asn Leu Val Glu Val Gly Arg Val Lys Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Tyr Trp Pro Asp Asp Thr Glu Val Tyr Gly Asp Ile Lys Val  
 100 105 110  
 Thr Leu Ile Glu Thr Glu Pro Leu Ala Glu Tyr Val Ile Arg Thr Phe  
 115 120 125

Thr Val Gln Lys Lys Gly Tyr His Glu Ile Arg Glu Leu Arg Leu Phe  
 130 135 140  
 His Phe Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Cys Tyr Ala Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Gly Phe Val Arg Gln Val Lys Phe Leu Asn Pro Pro Glu Ala  
 165 170 175  
 Gly Pro Ile Val Val His Cys Ser Ala Gly Ala Gly Arg Thr Gly Cys  
 180 185 190  
 Phe Ile Ala Ile Asp Thr Met Leu Asp Met Ala Glu Asn Glu Gly Val

195 200 205  
 Val Asp Ile Phe Asn Cys Val Arg Glu Leu Arg Ala Gln Arg Val Asn  
 210 215 220  
 Leu Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr Val Phe Val His Asp Ala Ile Leu  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Cys Leu Cys Gly Asn Thr Ala Ile Pro Val Cys  
 245 250

<210> 3

<211> 594

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Pro Ile Gly Leu Lys Ala Val Val Gly Glu Lys Ile Met His

1                    5                    10                    15  
 Asp Val Ile Lys Lys Val Lys Lys Lys Gly Glu Trp Lys Val Leu Val  
                   20                    25                    30  
 Val Asp Gln Leu Ser Met Arg Met Leu Ser Ser Cys Cys Lys Met Thr  
                   35                    40                    45  
 Asp Ile Met Thr Glu Gly Ile Thr Ile Val Glu Asp Ile Asn Lys Arg  
                   50                    55                    60  
 Arg Glu Pro Leu Pro Ser Leu Glu Ala Val Tyr Leu Ile Thr Pro Ser  
                   65                    70                    75                    80

Glu Lys Ser Val His Ser Leu Ile Ser Asp Phe Lys Asp Pro Pro Thr  
                   85                    90                    95  
 Ala Lys Tyr Arg Ala Ala His Val Phe Phe Thr Asp Ser Cys Pro Asp  
                   100                    105                    110  
 Ala Leu Phe Asn Glu Leu Val Lys Ser Arg Ala Ala Lys Val Ile Lys  
                   115                    120                    125  
 Thr Leu Thr Glu Ile Asn Ile Ala Phe Leu Pro Tyr Glu Ser Gln Val  
                   130                    135                    140  
 Tyr Ser Leu Asp Ser Ala Asp Ser Phe Gln Ser Phe Tyr Ser Pro His

145                    150                    155                    160  
 Lys Ala Gln Met Lys Asn Pro Ile Leu Glu Arg Leu Ala Glu Gln Ile  
                   165                    170                    175  
 Ala Thr Leu Cys Ala Thr Leu Lys Glu Tyr Pro Ala Val Arg Tyr Arg  
                   180                    185                    190  
 Gly Glu Tyr Lys Asp Asn Ala Leu Leu Ala Gln Leu Ile Gln Asp Lys  
                   195                    200                    205  
 Leu Asp Ala Tyr Lys Ala Asp Asp Pro Thr Met Gly Glu Gly Pro Asp  
                   210                    215                    220

Lys Ala Arg Ser Gln Leu Leu Ile Leu Asp Arg Gly Phe Asp Pro Ser  
 225                    230                    235                    240  
 Ser Pro Val Leu His Glu Leu Thr Phe Gln Ala Met Ser Tyr Asp Leu





Leu Arg Ile Arg Lys Thr Gln His Ser Thr Leu Ser Arg Lys Phe Val

115 120 125  
 Glu Val Met Ser Glu Tyr Asn Ala Thr Gln Ser Asp Tyr Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Cys Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Glu Glu Leu Glu Asp Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ala Ile  
 165 170 175  
 Phe Ala Ser Gly Ile Ile Met Asp Ser Ser Ile Ser Lys Gln Ala Leu  
 180 185 190

Ser Glu Ile Glu Thr Arg His Ser Glu Ile Ile Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Asp Met Phe Met Asp Met Ala Met Leu Val Glu  
 210 215 220  
 Ser Gln Gly Glu Met Ile Asp Arg Ile Glu Tyr Asn Val Glu His Ala  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu Arg Ala Val Ser Asp Thr Lys Lys Ala Val Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ile Met Ile Ile Ile Cys Cys

260 265 270  
 Val Ile Leu Gly Ile Ile Ile Ala Ser Thr Ile Gly Gly Ile Phe Gly  
 275 280 285