

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2010년 5월 14일 (14.05.2010)



(10) 국제공개번호
WO 2010/053315 A2

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/006526
- (22) 국제출원일: 2009년 11월 6일 (06.11.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0110718 2008년 11월 8일 (08.11.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울 관악구 신림동 산 56-1, 151-742 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이윤식 (LEE, Yoon-Sik)** [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 관양동 현대아파트 10동 104호, 431-060 Gyeonggi-do (KR). **김병기 (KIM, Byung-Gee)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 서초동 1685 1685 삼풍아파트 11-1302, 137-070 Seoul (KR). **신동식 (SHIN, Dong-Sik)** [KR/KR]; 서울특별시 중랑구 면목6동 408-20, 131-206 Seoul (KR). **김윤곤 (KIM, Yun Gon)** [KR/KR]; 대전광역시 중구 태평동 파라곤아파트 308-1092, 301-150 Daejeon (KR). **김은미 (KIM, Eun-Mi)** [KR/KR]; 서울특별시 성동구 용답동 152-3호 8/4, 133-849 Seoul (KR). **김미라 (KIM, Mira)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 봉천4동 1588-25, 151-054 Seoul (KR). **김재희 (KIM, Jaehi)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림9동 산 56-1번지 서울대학교 302동 713호, 151-744 Seoul (KR).

(74) 대리인: **서근복 (SEO, Keun Bok)**; 서울특별시 강남구 역삼동 642-6 성지하이츠 3차 빌딩 18층 9호, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF SERINE/THREONINE KINASE USING A PEPTIDE LIBRARY

(54) 발명의 명칭 : 펩타이드 라이브러리를 이용한 세린/트레오닌 인산화효소의 기질특이성 분석 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a method for analyzing the substrate specificity of serine/threonine kinase. More particularly, the present invention relates to a method for analyzing the substrate specificity of serine/threonine kinase, serine kinase, threonine kinase, and tyrosine kinase using a peptide library.

(57) 요약서: 본 발명은 인산화효소의 기질특이성 분석 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 펩타이드 라이브러리를 이용한 세린/트레오닌 인산화효소, 세린 인산화효소, 트레오닌 인산화효소 그리고 티로신 인산화효소의 기질특이성 분석 방법에 대한 것이다.



WO 2010/053315 A2

명세서

발명의 명칭: 펩타이드 라이브러리를 이용한 세린/트레오닌 인산화효소의 기질특이성 분석 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인산화효소의 기질특이성 분석 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 펩타이드 라이브러리를 이용한 세린/트레오닌 인산화효소, 세린 인산화효소, 트레오닌 인산화효소 그리고 티로신 인산화효소의 기질특이성 분석 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 본 명세서에서의 단백질 인산화효소란 단백질의 세린(serine), 트레오닌(threonine), 티로신(tyrosine) 잔기에 ATP에서 제공되는 인산기를 결합시켜 주는 효소이며, 인산화 반응이란 인산화효소에 의해 티로신(Tyr), 세린(Ser), 트레오닌(Thr)에 인산기가 도입되는 반응이다.
- [3] 또한, 세린/트레오닌 인산화효소란 단백질의 세린/트레오닌 잔기를 특이적으로 인산화시키는 효소이다.
- [4] 항체란 항원과 결합하는 단백질로서 혈액과 체액에 녹아있는 면역글로불린이며, 항체의 항원 특이성은 매우 다양하다.
- [5] 또한, 기질특이성이란 하나의 효소가 촉매로 작용하는 기질에는 여러 가지 선택성이 있는데 이것을 기질특이성이라 한다. 기질특이성은 효소의 단백질 부분에 의하여 정해진다.
- [6] 본 명세서에서의 질량분석기는 특정 기질에 인산화효소에 의한 인산화 반응을 단시간 내에 대량으로 분석하기 위한 장치로서, 특히 MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight)가 본 발명에서 주로 사용된다.
- [7] 본 명세서에서의 펩타이드 라이브러리란 아미노산이 조직적으로 조합된 서로 다른 다수의 펩타이드들의 조합을 의미한다.
- [8] 본 명세서에서의 사다리 펩타이드 시퀀스(ladder peptide sequence)란 사다리 형태로 합성된 펩타이드들로서, 하나의 지지체 표면에 특정 서열을 갖는 펩타이드가 아미노산이 한 개, 두 개, 세 개, ... 등 하나씩 더 추가되는 형태로 합성된 아미노산 시퀀스들의 혼합물을 의미한다.
- [9] 본 명세서에서의 나누고 섞기(Split and mix) 방법이란 나누기(splitting), 커플링(coupling) 및 혼합(mixing)의 세가지 방법을 반복적으로 수행하여 무작위로 펩타이드 라이브러리를 합성하는 방법을 의미한다.
- [10] 본 명세서의 OBOC(One-Bead One-Compound) 라이브러리란 한 개의 독립된 지지체 표면에 한 종류의 순서를 갖는 아미노산 라이브러리가 합성된 것을 의미한다.

- [11] 본 명세서의 광분해성 링커란 비드와 펩타이드를 결합시키는 화합물로서 특정 파장의 자외선(UV) 조사 시 분해되는 성질을 갖는 링커를 의미한다.
- [12] 본 발명은 OBOC 펩타이드 라이브러리와 질량분석기를 이용하여 세린/트레오닌 인산화효소의 기질특이성을 빠르게 분석하는 방법으로서 기질특이성이 알려지지 아니한 인산화효소의 인산화 반응을 규명함으로써 인산화에 의해 일어나는 신호전달 과정을 규명하고, 단백질 인산화효소의 연구뿐 아니라 세포 내에서 신호 전달에 관여하는 프로테아제(protease) 또는 포스파타아제(phosphatase)를 연구하는데 있어서도 본 발명의 방법이 중요한 도구로 이용될 수 있다.
- [13] 효소는 기질의 특정 구조를 인식하여 선택적으로 결합함으로써 특정 기질에 대해서만 선택적으로 반응하여 변화시키는 기질특이성을 나타낸다. 따라서 어떠한 효소의 기질특이성을 확인하는 실험은 그 효소의 생체내의 역할을 밝히는데 있어서 매우 중요한 과정이다.
- [14] 인산화효소는, 뉴클레오티드삼인산, 주로 아데노신삼인산(ATP)의 인산기를 사용하여 인산화합물을 생성시키는 인산기 전이 효소의 일종으로서 기질을 활성화하는 역할을 한다. 인산화효소에는 아데닐산 인산화효소, 피루빈산 인산화효소, 포스포 인산화효소 등과 같은 여러 종류의 인산화효소가 있다. 이들 중 단백질을 인산화하는 효소는 효소의 활성화나 불활성화를 통하여 인체 내의 대사 제어에 중요한 역할을 한다. 인산화효소 중에서도 단백질 중의 세린/트레오닌을 인산화하는 효소인 세린/트레오닌 인산화효소는 세포의 사멸 및 증식의 제어에 밀접하게 관여하고 있다.
- [15] OBOC 펩타이드 라이브러리를 합성하는 방법은 1991년 Lam 등에 의하여 처음 발표되었으며 양치매성의 텐타젤(TentaGel) 비드 위에서의 합성이 시도되었고, 현재까지 생체활성물질 탐색에 활용하고 있다(Lam; K. S., Salmon; S. E., Hersh; E. M., Hruby; V., Kazmierski; W. M., Knapp; R. J.. Nature 354, 82 (1991)). 그러나 Lam 등에 의해 개발된 OBOC라이브러리는 펩타이드의 서열 분석 시 텐타젤(TentaGel)의 고유한 고른 기능기의 분포에 의하여 광분해성 링커를 사용하지 못하고 화학물질을 이용하여 펩타이드를 유리시킴으로써 펩타이드를 정제하는 과정이 추가로 요구된다는 문제점이 있다(Franz; A. H., Liu; R., Song; A., Lam; K. S., Lebrilla; C. B., J. Comb. Chem. 5, 125 (2003)).
- [16] 펩타이드 라이브러리에서 광화학적 방법으로 펩타이드를 유리시키는 방법이, 2002년에 힐레어 등에 의하여 프로테아제의 기질특이성을 밝혀내는데 사용되었지만, 힐레어 등에 의하여 개발된 방법은 300 nm 내지 800 nm의 매우 큰 크기의 PEGA 수지를 이용하기 때문에 한번 실험에 있어서 사용되어지는 펩타이드 라이브러리에 모든 임의의 펩타이드 기질을 포함시켜 사용할 수 없는 단점이 있다(St. Hilaire; Alves; L. C., Herrera; F., Renil; M., Sanderson; S. J., Mottram; J. C.; Coombs; G. H., Juliano; M. A., Juliano; L., Arevalo; J., Meldal; M. J. Med. Chem. 45, 1971 (2002)).

- [17] 인산화효소는 질병의 전이 등의 메커니즘에 관련된 단백질로써 인산화에 의해서 일어나는 신호전달에 관한 명확한 이해를 바탕으로 그 기능을 정확하게 이해하는 것이 매우 중요하다. 그 중 인산화효소 단백질이 작용하는 기질의 서열을 분석하는 것은 새로운 인산화효소의 특성을 분석하고 이를 휴먼 키놈 맵(Human Kinome Map)에서 분류하여 신약 개발의 마커로 사용하는데 있어서 매우 중요하다.
- [18] 인산화효소의 기질특이성을 확인하기 위한 여러가지 방법들이 현재까지 개발되었다. 그러나 기존 연구에서 개발된 방법은 각각의 인산화효소의 기질 서열을 분석하는 데 있어 한정된 펩타이드 라이브러리를 사용하여 수행되었으며, 일반적으로 노동집약적이고 많은 시간이 소요되는 경우가 많다.
- [19] 최근, 조합합성 펩타이드 라이브러리를 이용하여, 인산화된 서열을 검출하는 여러가지 방법이 개발되었다. 그 예로 인산화효소의 기질 펩타이드로서 아미노산-스캐닝 돌연변이 검출법(amino acid-scanning mutagenesis), 아미노산 제거 방법(deletion) 그리고 위치별 검출법(positional scanning)을 위하여 각각 펩타이드 라이브러리를 합성하여 유리표면에 위치특이적 마이크로어레이(site-specific Microarray)를 제조하였다(Uttamchandani; M., Chan; E. W., Chen; G. Y., Yao; S. Q., Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 2997 (2003)).
- [20] 이를 이용하여 기질의 인산화 패턴을 분석하기 위하여 형광표지가 붙어있는 항인산화 항체를 이용하였고, 이것의 활성 프로파일(profile)을 분석함으로써 인산화효소의 기질특이성을 분석하는 연구가 진행되었다(Mahesh U (2003), 미국 특허 6,806,056 Glickman; J. (2004)).
- [21] 또한 항체를 대신하여 방사선 동위원소를 이용하여 인산화 정도를 검출하는데 이용한 방법도 개발되었으며(Jessica E. H (2004)), 펩타이드의 서열분석에 있어서 가장 고전적인 방법인 에드만 분해(Edman-Degradation) 방법이 이용되었다. 더 나아가 생물정보학에 기반을 둔 방법들까지 이용하고 있다.
- [22] 그러나 이러한 방법들은 시간이 많이 걸리고, 방사선을 다루는데 있어 제약이 따르는 등 여러 가지 단점들이 있다. 위에서 기술한 위치 스캐닝(positional scanning) 접근 방법은 인산화효소기질의 정확한 시퀀스를 결정하는데 어려움이 있다. 왜냐하면 위치 스캐닝(positional scanning) 방법은 위치별로 한 가지 아미노산으로 고정을 시키면서 스크리닝을 하는 것이기 때문에 완전한 임의의 펩타이드 라이브러리를 사용하여 실험할 수는 없다.
- [23] 또한, 프란쯔 등은 작은 크기의 화합물 라이브러리를 고체상 지지체 위에 제조하고 이를 화학물질을 이용하여 유리시키는 방법을 개시하였다(Franz; A. H., Liu; R., Song; A., Lam; K. S., Lebrilla; C. B., J. Comb. Chem. 5, 125 (2003)). 프란쯔 등은 텐타젤(TentaGel)을 이용하여 생체 활성이 있는 화합물질 라이브러리를 만들었으며 메티오닌 링커를 이용하여 최종적으로 브롬화시아노젠(cyanogen bromide, CNBr)을 이용하여 분석 물질을 유리시켰다. 그러나 프란쯔 등에 의해 발표된 선행 기술은 텐타젤 고유의 고른 기능기의

분포에 의하여 광분해성 링커를 이용하지 못하고 화학물질 선택성을 가진 브롬화시아노젠으로 분석물질을 유리시키므로 추가로 정제 작업과 시간이 요구되는 단점이 있다.

- [24] 본 발명자들은 코어-셸(core-shell) 비드에 펩타이드를 래더(ladder) 시퀀스로 합성하여, 합성된 펩타이드를 단백질 인산화효소와 반응시키고, 이렇게 인산화된 펩타이드만을 인지하는 항체를 이용하여 단백질 인산화효소의 기질특이성을 확인하였다. 상기 항체에는 바이오틴(biotin)이 결합되어 있어 바이오틴을 특이적으로 인식하는 뉴트라비딘(neutravidin)에 결합된 포스파타아제의 기질 반응을 통한 색 변화를 관찰함으로써 상기 단백질 인산화효소에 의해 인산화된 펩타이드를 구분해 낼 수 있다. 또한 펩타이드의 질량분석을 쉽게 하기 위하여 광분해성 링커를 코어-셸(core-shell) 비드에 도입하였다. 이를 통하여, 본 발명자들은 인산화된 펩타이드의 서열을 보다 신속하고 정확하게 찾아낼 수 있음을 구체적으로 확인함으로써, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [25] 본 발명의 기본적인 목적은 i) 고체상 지지체 수지의 표면에 일정한 순서의 아미노산 배열을 갖는 펩타이드 라이브러리를 생성시킴에 있어서, 하나의 지지체 수지 표면에 아미노산 서열이 서로 동일한 펩타이드들을 다수 개 생성시켜 펩타이드 라이브러리를 제조하는 단계; ii) 아미노산 서열을 달리하면서 상기 i) 단계를 수차례 반복하여 하나의 지지체 수지에는 아미노산 서열이 서로 동일한 펩타이드 라이브러리가 생성되어 있으나, 각각의 지지체 수지별로는 아미노산 서열이 서로 상이한, 무작위 펩타이드 라이브러리들의 혼성체를 형성하는 단계; iii) 상기 펩타이드 라이브러리들의 혼성체와 인산화효소를 반응시켜, 일정한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 세린 또는 트레오닌이 인산화된 펩타이드 라이브러리를 제조하는 단계; iv) 인산화된 세린 또는 트레오닌에만 선택적으로 결합하며 바이오틴이 결합된 항체를 상기 인산화된 펩타이드 라이브러리에 반응시키고, 이렇게 얻은 생성물과 포스파타아제 및 퍼옥시다아제 중 하나가 결합된 뉴트라비딘 혹은 스트렙타비딘을 반응시키는 단계; v) 상기 포스파타아제 및 퍼옥시다아제 중의 어느 하나와 상기 기질의 반응에 의하여 나타나는 물성의 변화를 감지하여 물성의 변화를 일으킨 펩타이드 라이브러리가 존재하는 고체상 지지체 수지만을 선별해 내는 단계; 그리고 vi) 상기 분리된 고체상 지지체 수지에서 펩타이드를 분리시키고, 이렇게 분리된 펩타이드의 아미노산 서열을 분석하는 단계를 포함하는, 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법을 제공하는 것이다.
- [26] 본 발명의 또 다른 목적은 다음 하기의 일반식으로 표시되는 펩타이드

라이브러리를 제공하는 것이다:

[27] Z-X-X-X-S/T-X-X-Z-스페이서-링커-고체상 지지체 수지

[28] 상기 일반식에서 Z는 시스테인, 세린 및 트레오닌을 제외한 필수아미노산 중 하나이고; X는 시스테인을 제외한 필수 아미노산 중 티로신, 트레오닌 및 세린과 동일하지 아니한 아미노산이며; S/T는 트레오닌 및 세린 중 어느 하나이고; 스페이서는 알킬기 또는 에테르기를 복합적으로 가지는 선형 또는 가지가 있는 1 내지 6 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이며; 링커는 2-니트로벤질 유도체, 2-(2-니트로페닐)프로필 유도체, 벤조인 유도체 및 펜아실 유도체로 이루어진 광분해성 링커이다.

과제 해결 수단

[29] 전술한 본 발명의 기본적인 목적은 i) 고체상 지지체 수지의 표면에 일정한 순서의 아미노산 배열을 갖는 펩타이드 라이브러리를 생성시킴에 있어서, 하나의 지지체 수지 표면에 아미노산 서열이 서로 동일한 펩타이드들을 다수 개 생성시켜 펩타이드 라이브러리를 제조하는 단계; ii) 아미노산 서열을 달리하면서 상기 i) 단계를 수차례 반복하여 하나의 지지체 수지에는 아미노산 서열이 서로 동일한 펩타이드 라이브러리가 생성되어 있으나, 각각의 지지체 수지별로는 아미노산 서열이 서로 상이한, 무작위 펩타이드 라이브러리들의 혼성체를 형성하는 단계; iii) 상기 펩타이드 라이브러리들의 혼성체와 인산화효소를 반응시켜, 일정한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 세린 또는 트레오닌이 인산화된 펩타이드 라이브러리를 제조하는 단계; iv) 인산화된 세린 또는 트레오닌에만 선택적으로 결합하며 바이오틴이 결합된 항체를 상기 인산화된 펩타이드 라이브러리에 반응시키고, 이렇게 얻은 생성물과 포스파타아제 및 퍼옥시다아제 중 하나가 결합된 뉴트라비딘 혹은 스트렙타비딘을 반응시키는 단계; v) 상기 포스파타아제 및 퍼옥시다아제 중의 어느 하나와 상기 기질의 반응에 의하여 나타나는 물성의 변화를 감지하여 물성의 변화를 일으킨 펩타이드 라이브러리가 존재하는 고체상 지지체 수지만을 선별해 내는 단계; 그리고 vi) 상기 분리된 고체상 지지체 수지에서 펩타이드를 분리시키고, 이렇게 분리된 펩타이드의 아미노산 서열을 분석하는 단계를 포함하는, 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.

[30] 상기 고체상 지지체 수지는 코어-셸(core-shell) 구조의 지지체 수지인 것이 바람직하다. 또한 상기 고체상 지지체 수지는 그 표면에 광분해성 링커가 결합되는 것이 바람직하고, 상기 광분해성 링커는 에프목-4-[4-(1-아미노에틸)-2-메톡시-5-니트로페녹시]부탄 산을 포함한 2-니트로벤질 유도체, 2-(2-니트로페닐)프로필 유도체, 벤조인 유도체 또는 펜아실 유도체로부터 선택될 수 있다. 또한 상기 광분해성 링커에 스페이서가 추가로 결합될 수 있고, 상기 스페이서는 알킬기 또는 에테르기를 복합적으로

- 가지는 선형 또는 가지가 있는 1 내지 6 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인 것이 바람직하다.
- [31] 상기 인산화효소는 세린 인산화효소, 트레오닌 인산화효소, 티로신 인산화효소 또는 세린/트레오닌 인산화효소로부터 선택될 수 있다. 또한 상기 세린/트레오닌 인산화효소는 PKA 또는 Yak1인 것이 바람직하다.
- [32] 본 발명에 따르면, 인산화효소의 기질특이성을 조사할 때 질량분석기를 사용한다. 또한 래더 펩타이드가 포함된 OBOC 합성 기술을 사용하여 빠르고 효과적으로 인산화 효소의 인산화 반응을 조사한다. 본 발명에 따른 방법은 세린 및 트레오닌 인산화 효소뿐 아니라 티로신 인산화 효소에도 적용할 수 있다.
- [33] OBOC 펩타이드 라이브러리를 합성한 뒤에 포스파타아제 및 피옥시다아제 중의 어느 하나와 상기 기질의 반응에 의하여 나타나는 물성의 변화를 감지하여 물성의 변화를 일으킨 펩타이드 라이브러리가 존재하는 고체상 지지체 수지(비드)만을 선별하기 위해 포스파타아제 및 피옥시다아제 반응 후 BCIP/NBT 색깔 반응 후 현미경을 통해 비드를 하나씩 분리해 내면 한가지 화합물만 골라서 분석을 할 수 있으며, 유세포분류기 등을 응용하여 비드의 형광 세기 또는 색 차이에 의해 비드를 선별하는 자동화 시스템을 이용할 수도 있다. 또한 비드 또는 항체에 자성 물질을 도입하여 선별하는 방법도 이용 가능하다.
- [34] 본 발명에 따른 방법은 상술하면 다음과 같다.
- [35] i)단계에서, OBOC 래더 펩타이드를 합성한다. 펩타이드 라이브러리는 코어-셀 형태의 수지에 나누고 섞기(split and mix) 방법을 사용하여 합성한다. 코어-셀 수지는 표면에 아미노 그룹이 존재하기 때문에 상용화 되어 있는 텐타젤 수지(TentaGel resin)에 비해 광분해 효율이 두배 이상 높은 특징이 있다(Kim; H, Cho; J. K., Chung; W. J., Lee; Y. S. Org. Lett. 6, 3273 (2004), 이윤식, 김한영, 대한민국 특허출원10-2004-0078860 (2004)).
- [36] 세린을 중심으로 N-말단(N-terminal)으로 3개의 자리와 C-말단(C-terminal)으로 2개의 자리 즉, 모두 5개의 자리를 시스테인과 세린과 트레오닌을 제외한 17개의 필수아미노산을 사용하여 무작위로 합성한다. 인산화 효소가 비드 상에 합성된 펩타이드에 접근하기 쉽게 하기 위하여 펩타이드의 N-말단 과 C-말단에 알라닌을 삽입한다.
- [37] 펩타이드를 MALDI-TOF 질량분석기를 사용하여 분석할 때 비드에서 펩타이드를 분리하기 위하여 광분해성 링커를 도입하고, 분석시 필요한 보조제인 매트릭스와 질량이 겹치는 것을 피하기 위하여 (β -Ala)-(ϵ -ACA)-(β -Ala)-(ϵ -ACA) (BEBE)로 이루어진 스페이서(spacer)를 광분해성 링커 다음에 도입한다. 사용할 수 있는 광분해성 링커로는 2-니트로벤질 유도체, 2-(2-니트로페닐)프로필 유도체, 벤조인 유도체 또는 펜아실 유도체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 사용할 수 있고, 스페이서는 알킬기 또는 에테르기를 복합적으로 가지는 선형 또는 가지가 있는 1 내지 6 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 사용할 수 있다. 결과적으로

- 펩타이드 라이브러리의 시퀀스는 Ala-X-X-X-Ser-X-X-Ala-BEBE-PLL-NH₂ 구조이다(도 1 참조). 합성된 비드 약 1700mg 은 무작위 서열 비드가 약 3,500,000개 이상이므로 5곳의 아미노산 서열 조합을 모두 포함하기에 충분하다.
- [38] ii)단계는 펩타이드 라이브러리 비드 준비 단계로서, 비드는 인산염완충액(phosphate-buffered solution, PBS)을 이용하여 세척하고, 단백질의 비특이적 흡착을 막기 위하여 블로킹(Blocking) 용액으로 처리한 후 세척하여 비드를 준비한다.
- [39] iii)단계는 인산화 효소 반응이다. 인산화 효소 반응은 트리스-염산 완충액(Tris-HCl buffer), ATP 및 인산화 효소를 섞어 반응시킨다. 반응 후 반응용액을 모두 제거하고, 비드를 3차수를 이용하여 세척한다.
- [40] iv)단계는 항체(Ab)를 인산화된 비드에 결합하는 반응이다. 사용하는 항체는 바이오틴이 결합되어 있는 항인산화세린 항체(anti-phosphoserine Ab)이다. 상기 항체를 비드와 반응시키면 인산화된 비드에만 항체가 결합하게 된다. 그 후 알칼라인 포스파타아제 또는 퍼옥시다아제가 결합되어 있는 뉴트라비딘 또는 스트렙타비딘을 반응시켜 상기 항체에 결합된 바이오틴에 결합시킨 후, 세척한다.
- [41] v)단계는 검출 단계이다. 상기 v)단계에서 사용한 뉴트라비딘에 결합된 알칼라인 포스파타아제의 반응을 이용하여 인산화된 비드 만을 색변화를 통해 검출하는 단계이다. 알칼라인 포스파타아제는 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)와 NBT(nitro-blue tetrazolium chloride)를 PBS 용액 녹여 비드와 반응시킨다. 인산화되어 항체가 결합된 비드는 포스파타아제 반응이 진행되어 선명한 적색으로 색변화가 일어난다. 비드를 세척하여 반응을 멈춘다. 퍼옥시다아제의 경우 3,3'-디아미노벤지딘(3,3'-diaminobenzidine)과 반응시켜 색변화를 관찰할 수 있다.
- [42] vi)단계에서는 이렇게 색이 변화된 비드를 집자(forceps)와 현미경을 이용하여 한 개씩 각각 골라낸 후 365nm UV를 조사하여 비드에 합성된 펩타이드를 끊어내어 MALDI-TOF를 이용하여 분석한다. 이때 분석에 사용된 유기산 보조제는 DHB(2,5-dihydroxybenzoic acid in 70% MeOH)을 사용한다.
- [43] 전술한 본 발명의 또 다른 목적은 다음 하기의 일반식으로 표시되는 펩타이드 라이브러리를 제공함으로써 달성될 수 있다:
- [44] Z-X-X-X-S/T-X-X-Z-스페이서-링커-고체상 지지체 수지
- [45] 상기 일반식에서 Z는 시스테인, 세린 및 트레오닌을 제외한 필수아미노산 중 하나이고; X는 시스테인을 제외한 필수 아미노산 중 티로신, 트레오닌 및 세린과 동일하지 아니한 아미노산이며; S/T는 트레오닌 및 세린 중 어느 하나이고; 스페이서는 알킬기 또는 에테르기를 복합적으로 가지는 선형 또는 가지가 있는 1 내지 6 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이며; 링커는 2-니트로벤질 유도체, 2-(2-니트로페닐)프로필 유도체, 벤조인 유도체 및 펜아실 유도체로 이루어진 광분해성 링커이다.

발명의 효과

- [46] 첫째, 본 발명에서 제안한 사다리(Ladder) 펩타이드가 포함된 OBOC 펩타이드 라이브러리 합성기술과 MALDI-TOF분석 기술을 결합하여 단백질 인산화효소의 기질특이성을 신속하게 결정할 수 있다.
- [47] 둘째, 여기서 얻어진 기질 서열이 생체 내에서(in vivo) 실제 인산화효소가 작용하는 모티프(motif)와 잘 맞기 때문에, 단백질 인산화효소의 역할을 정확히 이해하는데 중요할 뿐 아니라 그것의 저해제의 개발에 중요한 정보를 제공할 수 있다.
- [48] 셋째, 펩타이드 라이브러리를 이용한 고속 단백질 분석 및 스크리닝은 장차 신약 개발과 관련되어 새로운 단백질 마커 및 인산화효소 저해제를 찾는 데 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [49] 도 1은 본 발명에 따른 라이브러리 비드의 개념도이다.
- [50] 도 2는 본 발명의 실시예 6의 펩타이드에 대한 질량분석 결과를 나타낸다.
- [51] 도 3은 실시예 7에서 인산화효소에 반응한 펩타이드들의 서열을 나타낸다.
- [52] 도 4는 도 3의 펩타이드 서열로부터 얻은 PKA 인산화효소의 인산화에 영향을 미치는 각 위치의 중요한 서열을 나타낸다.
- [53] 도 5는 실시예 8의 Yak1 인산화효소의 펩타이드 서열을 나타낸다.
- [54] 도 6은 실시예 8에서 얻은 Yak1 인산화효소의 최적 기질의 +3 위치 및 -1 위치가 Arg(R)임을 보여준다.
- [55] 도 7은 실시예 7의 PKA 인산화효소와 실시예 8의 Yak1 인산화효소에 대한 BLAST 조사 결과이다.
- [56] 도 8은 실시예 10의 기질 단백질들을 이용한 Yak1 인산화효소의 인산화 여부를 보여주는 phosphoimager 분석결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [57] 이하, 다음 실시예를 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시 태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리 범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

[58]

[59] 실시 예 1. 광분해성 링커 및 스페이서가 도입된 지지체 수지의 제조

- [60] 코어-셀 수지에 광분해성 링커 및 스페이서를 도입하기 위하여 하이코어(HiCore) 지지체 수지(0.3 mmol/g, 2 g)를 30 mL의 N-메틸-2-피롤리돈(NMP, N-methyl-2-pyrrolidone)으로 팽윤시킨 뒤 에프목-광분해성 링커(Fmoc-photolabile linker, Fmoc-PLL, Fmoc-4-[4-(1-aminoethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy]butyric acid, 2 당량) 1.2 mmol, 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄

헥사플루오로-포스페이트 (BOP, benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluoro-phosphate 2 당량) 1.2 mmol, 1-하이드로벤조트리아졸 (HOBt, 1-hydroxybenzotriazole 2 당량) 1.2 mmol, 디이소프로필에틸아민 (DIEA, diisopropylethylamine 4 당량) 2.4 mmol을 15 mL의 NMP에 녹여 첨가하였다.

- [61] 상온에서 1 내지 4시간 동안 반응시킨 뒤, 여액을 걸러서 제거한 후, NMP, DCM, MeOH로 세척하여 Fmoc-PLL이 결합된 지지체 수지를 얻었다. 반응의 종결은 카이저(Kaiser) 닐히드린 시험법을 이용하였다. Fmoc 보호기는 20% 피페리딘(piperidine)/NMP 용액으로 각각 3분, 17분 반응시켜 제거한 후, 위에서 설명한 바와 같은 방법으로 세척하였다. 스페이서를 도입하기 위하여 PLL이 결합된 지지체 수지에 Fmoc- ϵ -ACA(Fmoc- ϵ -aminocaproic acid; 2당량) 및 Fmoc- β -Ala(2당량)를 BOP(2당량), HOBt(2당량) 및 DIEA(4당량)를 이용하여 번갈아 두 번씩 반복하여 결합 반응을 시켜 광분해성 링커 및 스페이서가 도입된 지지체 수지를 제조하였다.

[62]

[63] 실시 예 2. 펩타이드 라이브러리의 제조

- [64] 펩타이드 라이브러리는 나누고 섞기 방법을 사용하여 합성하였다. 키나아제가 비드 상에 합성된 펩타이드에 접근하기 쉽게 하기 위하여 펩타이드의 N-말단과 C-말단에 알라닌을 삽입하였고, 가운데 부분에 세린 혹은 트레오닌을 넣어 Ala-X-X-X-S/T-X-X-Ala-BEBE-PLL-HiCore 구조의 펩타이드 라이브러리를 합성하였다. 도 1에 나타낸 바와 같이 하나의 비드에 하나의 서열을 가진 펩타이드 시퀀스를 사다리(Ladder) 형태로 합성하였다.

- [65] PLL은 광분해성 링커(photolabile linker)를 나타낸다. 이것은 365nm-UV 조사에 의해 분해되는 특성을 나타낸다. BEBE는 스페이서(spacer)로서 MALDI-TOF 질량 분석시 사용되는 매트릭스(matrix)와 구분하기 위해 도입했다. X는 시스테인, 트레오닌과 세린을 제외한 17개의 아미노산을 나타낸다.

- [66] 실시예 1에서 제조된 광분해성 링커 및 스페이서가 도입된 하이코어 지지체 수지를 100 mg씩 분취하여 각각 17개의 반응 튜브 (5 mL)에 넣었고, Fmoc-아미노산(시스테인, 세린, 트레오닌 제외, 2당량), 아세트산(0.2당량), BOP(2.2당량), HOBt(2.2당량), DIEA(4.4당량)를 3 mL의 NMP에 녹여 첨가하였다.

- [67] 상온에서 1 내지 4 시간 동안 반응시킨 뒤, 여액을 걸러서 제거한 후, NMP, DCM, MeOH로 세척하였다. Fmoc 보호기는 각각의 지지체 수지를 하나의 반응 용기에 담아 20% 피페리딘/NMP 용액으로 각각 3분, 17분 반응하여 제거한 후, 같은 방법으로 세척하고 6 내지 12 시간 동안 진공 오븐에서 건조시켰다.

- [68] 상기 과정을 반복한 뒤, 말단의 아민(Amine)기를 아세틸(Acetyl)기로 캐핑(capping)하기 위하여 무수아세트산(acetic anhydride, 2 당량), DIEA(4 당량)를 NMP 용액에서 1 내지 4 시간 동안 반응시킨 뒤, 여액을 걸러서 제거한

후, NMP, DCM, MeOH로 세척하였다. 반응의 종결은 카이저(Kaiser) 닐히드린 시험법을 이용하였다.

- [69] 각 아미노산 잔기의 보호기를(protectig group)을 제거하기 위하여 K 시약(Reagent K; 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA) 85%, 페놀(phenol) 5%, 에탄디티올(ethanedithiol) 2.5%, 물 2.5%)을 넣어 상온에서 1 내지 4 시간 동안 반응시켜 펩타이드 라이브러리 지지체 수지를 제조하였다.

[70]

[71] 실시에 3. 인산화된 세린 펩타이드 라이브러리의 제조

- [72] 펩타이드 라이브러리 지지체 수지를 PBS를 사용하여 세척하였고, 단백질의 비특이적 흡착을 막기 위하여 블로킹(Blocking) 용액(3% BSA, Tween20 in PBS)을 사용하여 상온에서 2 내지 4 시간 동안 처리한 후 세척하여 비드를 준비하였다. PKA 세린/트레오닌 인산화효소 반응은 50 mM Tris-HCl 버퍼 용액(pH 7.5, 10mM MgCl₂), 100μM의 ATP 와 2000unit의 PKA를 이용하여 실시하였고, Yak1 세린/트레오닌 인산화효소 반응은 25mM HEPE-KOH 버퍼 용액(pH 7.5, 10mM MgCl₂), 100μM의 ATP와 100μM의 Yak1을 이용하여 20°C 내지 30°C에서 1 내지 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 반응용액을 모두 제거하고, 비드를 3차수를 이용하여 3회 세척하였다.

[73]

[74] 실시에 4. 인산화된 세린 펩타이드 라이브러리에 항체의 결합

- [75] 바이오틴(biotin)이 결합된 항인산화 세린 항체(anti-phosphoserine Ab) 실시에 3에서 얻은 인산화된 세린 비드와 반응시켜 상기 비드에 항체를 결합시켰다. 100μg/ml의 항체를 상온에서 1 시간 동안 비드와 반응시킨 후 PBS를 이용하여 3회 세척하였다.

[76]

[77] 실시에 5. 항체가 결합된 펩타이드 라이브러리에 알칼라인 포스파타아제 결합

- [78] 포스파타아제가 결합된 뉴트라비딘(Neutravadin)을 바이오틴이 도입된 인산화된 세린 펩타이드 라이브러리와 반응시켰다. 10μg/ml의 뉴트라비딘을 사용하여 상온에서 30분 반응시킨 후 PBS를 이용하여 5회 세척하였다

[79]

[80] 실시에 6. 인산화된 펩타이드 라이브러리의 선별 및 분리된 펩타이드의 아미노산 서열 분석

- [81] 뉴트라비딘에 결합된 알칼라인 포스파타아제의 반응을 이용하여 인산화된 비드를 색변화를 통해 검출하기 위하여 알칼라인 포스파타아제는 0.1mg/mL의 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)와 0.1mg/mL의 NBT(nitro-blue tetrazolium chloride)를 PBS 용액에 녹여 비드와 37°C에서 30분 내지 1시간 동안 반응시킨 후 3차수로 세척하였다.

- [82] 인산화되어 항체가 결합된 비드는 포스파타아제 반응이 진행되어 선명한 적색으로 변화하였으며, 색이 변화된 비드를 핀셋과 현미경을 이용하여 한 개씩

각각 콜라겐 후 365 nm 자외선(50 mW/cm²)을 30분 내지 1 시간 동안 조사함으로써 비드 상에 합성된 펩타이드를 끊어내었다.

- [83] 유리된 펩타이드(5 μ L)를 유기산 보조제인 DHB(2,5-dihydroxybenzoic acid, 1 μ L, 30 mg/mL, MeOH:물=70:30)를 섞어 MALDI-TOF를 이용하여 펩타이드의 서열을 분석하였다. 도 2에 상기 분석결과를 나타내었고, 사다리 형태의 펩타이드를 분석하면 도 2과 같은 8개의 피크가 나타나며 각 피크들의 질량 차이를 순서대로 계산하여 펩타이드의 각 위치의 아미노산을 결정할 수 있다. 마지막 Ala의 경우 합성시 마지막에 붙여주는 아미노산이다.
- [84]
- [85] 실시에 7. c-AMP dependent protein kinase(PKA) 세린/트레오닌 인산화효소를 이용하여 개발된 방법의 유효성 실험
- [86] 본 발명의 방법이 세린/트레오닌 인산화효소의 기질특이성을 밝히는데 사용할 수 있는 일반적인 방법임을 확인하기 위해 이미 기질특이성이 잘 밝혀진 PKA 세린/트레오닌 인산화효소로 시험하였다. PKA를 이용하였을 때, 붉은색으로 바뀐 100개의 비드를 콜라겐 후 광분해한 후 MALDI-TOF로 분석하였다. 그 중 정확하게 분석된 98개의 스펙트럼을 얻었다. 인산화효소에 반응한 펩타이드 시퀀스를 도 3에 나타내었다.
- [87] 이 서열들을 바탕으로 통계처리를 통해 PKA 인산화효소의 인산화에 영향을 미치는 각 위치의 중요한 서열을 결정한다(도 4 참조). PKA 인산화효소의 기질특이성은 -3 위치에 Arg(R)이 위치해 있으며, -2 위치에 Lys(K)/Gln(Q) 또는 R이 위치할 때 인산화가 가장 효율적으로 일어난다는 것을 알 수 있다. 이는 이전의 연구결과와 동일한 것으로 본 발명에 따른 방법이 세린/트레오닌 인산화효소의 기질특이성을 밝히는데 일반적으로 적용될 수 있는 방법임을 증명한다.
- [88]
- [89] 실시에 8. 본 발명의 방법에 의한 Yeast Yak1 세린/트레오닌 인산화효소의 기질특이성 조사
- [90] 본 발명의 방법을 일반화하기 위하여, Yeast Yak1 인산화효소의 기질특이성을 조사하였다. 현재 Yak1 인산화효소에 대한 기질특이성은 잘 밝혀지지 않았다. 본 발명의 방법을 이용한 Yak1 인산화효소의 펩타이드 서열 분석 효율은 약 97%였다(도 5).
- [91] 서열이 분석된 펩타이드는 -3 위치에 Arg(R)이 나타나며 또한 +1 위치에 Arg(R)이 위치하는 빈도가 높음을 확인하였다(도 6 참조). 따라서 본 발명에 따른 방법을 통해서 Yeast Yak1의 인산화효소의 최적 기질은 -3, +1 위치가 모두 Arg(R)임을 확인하였다.
- [92]
- [93] 실시에 9. 인산화효소의 활성 펩타이드 시퀀스를 이용한 인산화효소의 기질 단백질 분석

- [94] 실시예 8에서 제시된 Yak1 인산화효소의 활성 펩타이드 서열들을 이용하여 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 조사를 한 결과, 그 펩타이드 서열은 Crf1, MSN2, MSN5, IFH1(도 7 참조) 단백질의 일부 부위에 속하는 것으로 나타났다. 이로써 본 발명에 따른 방법을 통하여 Yak1 인산화효소의 기질특이성을 밝힐 수 있었다.
- [95]
- [96] 실시예 10. 기질 단백질을 이용한 Yak1 인산화효소의 인산화 유무 확인
- [97] Yak1, MSN2, MSN4, IFH2(1-400), IFH1(401-800) 단백질 생산 재조합 균주를 만들어 대장균에서 각 단백질을 생산 한 후, GST 분리 정제법을 통해 정제하고 50mM의 Tris HCl(pH8.0), 1mM의 DTT 그리고 15% 글리세롤이 포함된 버퍼에 투석하였다. 대장균에서 분리, 정제한 Yak1 1 μ g과 분리 정제한 각 기질 단백질 3 μ g을 25mM의 HEPES-KOH(pH 7.5), 10mM의 MgCl₂, 50 μ M의 ATP 그리고 [γ -³²P]-ATP 5 μ Ci 가 포함된 버퍼에 최종 부피가 20 μ L가 되도록 섞어서 30분 내지 90분간 반응시켰다. 반응이 완료된 샘플을 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동시켜 모든 단백질을 크기 별로 분리한 후, 젤을 종이 위에 옮겨 수분을 제거하였다. 그 후 인산화된 단백질을 phosphorimager 분석기로 확인하였다. 그 결과 도 8와 같이 기질이 되는 단백질들이 모두 인산화된 것을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법이 인산화효소의 기질 단백질을 스크리닝하는데 유용함을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1]

- i) 고체상 지지체 수지의 표면에 일정한 순서의 아미노산 배열을 갖는 펩타이드 라이브러리를 생성시킴에 있어서, 하나의 지지체 수지 표면에 아미노산 서열이 서로 동일한 펩타이드들을 다수 개 생성시켜 펩타이드 라이브러리를 제조하는 단계;
- ii) 아미노산 서열을 달리하면서 상기 i) 단계를 수차례 반복하여 하나의 지지체 수지에는 아미노산 서열이 서로 동일한 펩타이드 라이브러리가 생성되어 있으나, 각각의 지지체 수지별로는 아미노산 서열이 서로 상이한, 무작위 펩타이드 라이브러리들의 혼성체를 형성하는 단계;
- iii) 상기 펩타이드 라이브러리들의 혼성체와 인산화효소를 반응시켜, 일정한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드의 세린 또는 트레오닌이 인산화된 펩타이드 라이브러리를 제조하는 단계;
- iv) 인산화된 세린 또는 트레오닌에만 선택적으로 결합하며 바이오틴이 결합된 항체를 상기 인산화된 펩타이드 라이브러리에 반응시키고, 이렇게 얻은 생성물과 포스파타아제 및 피옥시다아제 중 하나가 결합된 뉴트라비딘 혹은 스트렙타비딘을 반응시키는 단계;
- v) 상기 포스파타아제 및 피옥시다아제 중의 어느 하나와 상기 기질의 반응에 의하여 나타나는 물성의 변화를 감지하여 물성의 변화를 일으킨 펩타이드 라이브러리가 존재하는 고체상 지지체 수지만을 선별해 내는 단계; 그리고
- vi) 상기 분리된 고체상 지지체 수지에서 펩타이드를 분리시키고, 이렇게 분리된 펩타이드의 아미노산 서열을 분석하는 단계를 포함하는, 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 고체상 지지체 수지가 코어-셸(core-shell) 구조의 지지체 수지인 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.

[청구항 3]

제1항에 있어서, 상기 고체상 지지체 수지가 그 표면에 광분해성 링커가 결합된 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.

[청구항 4]

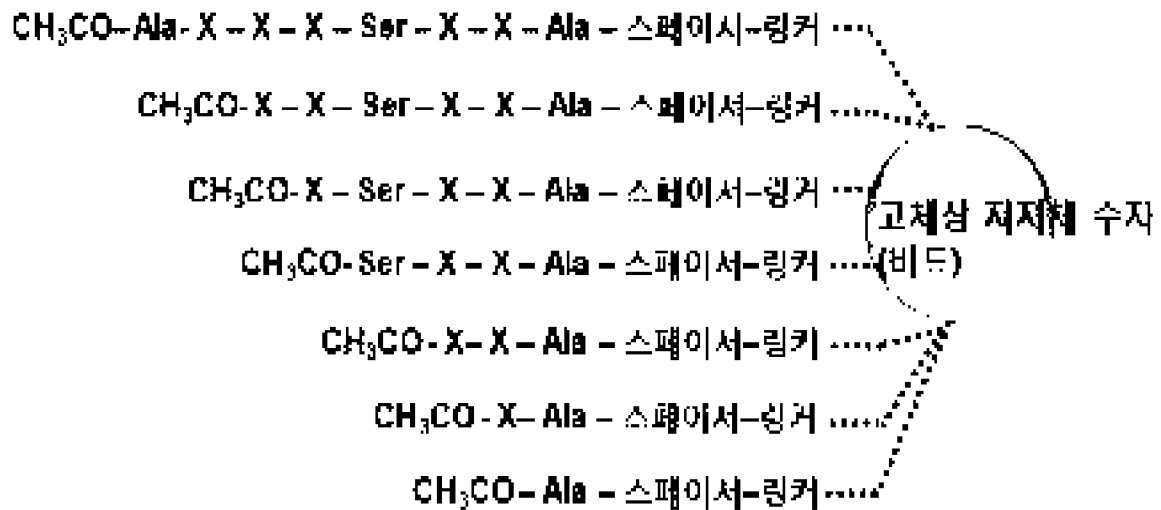
제3항에 있어서, 상기 고체상 지지체 수지의 표면에 결합된 광분해성 링커에 추가로 스페이서가 결합된 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.

[청구항 5]

제1항에 있어서, 상기 인산화효소가 세린 인산화효소, 트레오닌 인산화효소 및 티로신 인산화효소로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석

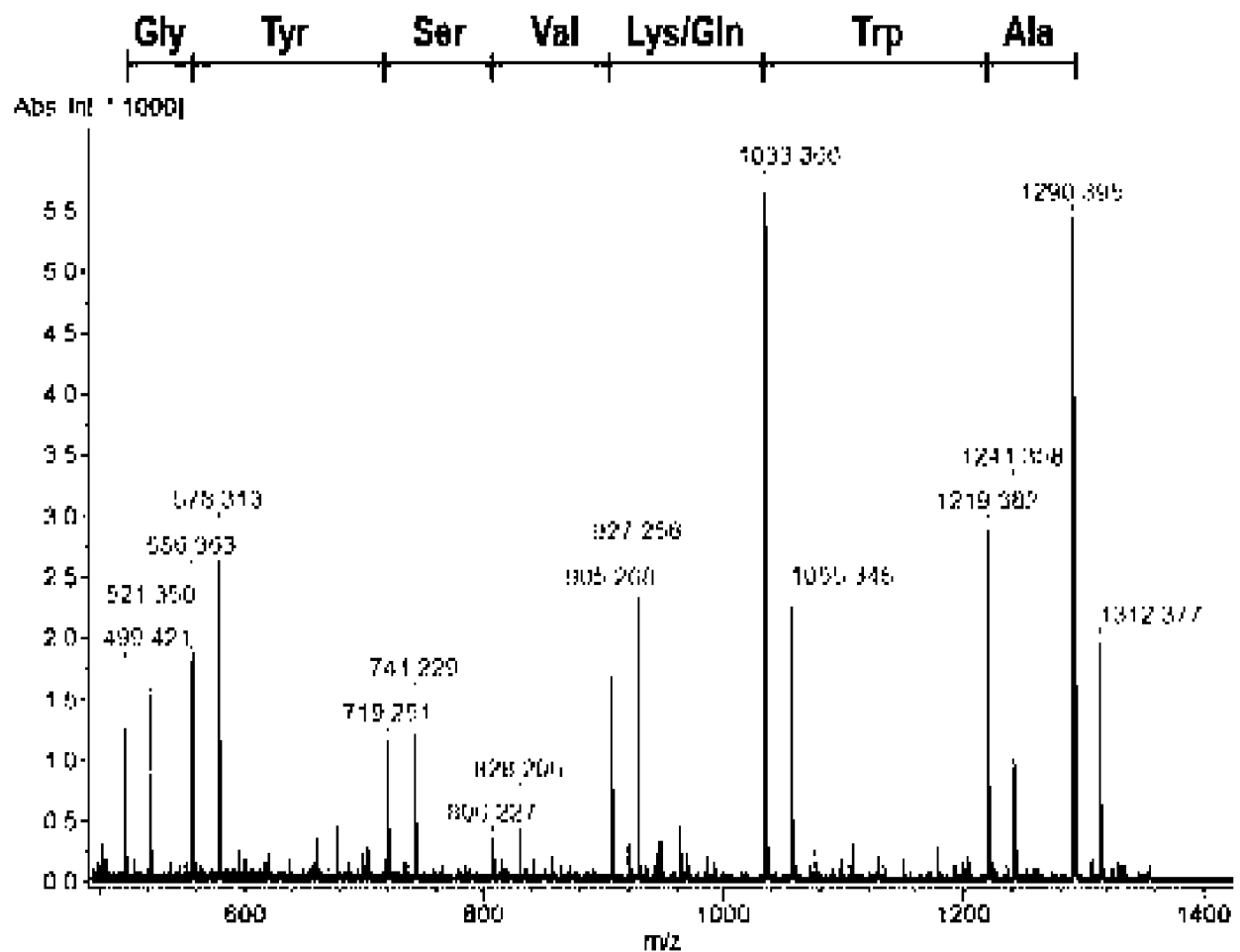
- 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 인산화효소가 세린/트레오닌 인산화효소인 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 세린/트레오닌 인산화효소가 PKA 또는 Yak1인 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 v)단계의 물성의 변화가 고체상 지지체 수지의 색 변화인 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.
- [청구항 9] 제3항에 있어서, 상기 광분해성 링커는 에프목-4-[4-(1-아미노에틸)-2-메톡시-5-니트로페녹시]부탄 산을 포함한 2-니트로벤질 유도체, 2-(2-니트로페닐)프로필 유도체, 벤조인 유도체 및 펜아실 유도체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.
- [청구항 10] 제4항에 있어서, 상기 스페이서는 알킬기 또는 에테르기를 복합적으로 가지는 선형 또는 가지가 있는 1 내지 6 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드인 것임을 특징으로 하는 단백질 인산화효소의 기질특이성 분석 방법.
- [청구항 11] 다음 하기의 일반식으로 표시되는 펩타이드 라이브러리:
 $Z-X-X-X-S/T-X-X-Z$ -스페이서-링커-고체상 지지체 수지
 상기 일반식에서 Z는 시스테인, 세린 및 트레오닌을 제외한 필수아미노산 중 하나이고; X는 시스테인을 제외한 필수 아미노산 중 티로신, 트레오닌 및 세린과 동일하지 아니한 아미노산이며; S/T는 트레오닌 및 세린 중 어느 하나이고; 스페이서는 알킬기 또는 에테르기를 복합적으로 가지는 선형 또는 가지가 있는 1 내지 6 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이며; 링커는 2-니트로벤질 유도체, 2-(2-니트로페닐)프로필 유도체, 벤조인 유도체 및 펜아실 유도체로 이루어진 광분해성 링커이다.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 고체상 지지체 수지가 코어-셸(core-shell) 구조의 지지체 수지인 것임을 특징으로 하는 펩타이드 라이브러리.

[Fig. 1]



하나의 비트에 하나의 서열을 가진 펩타이드
(사다리 형태)

[Fig. 2]

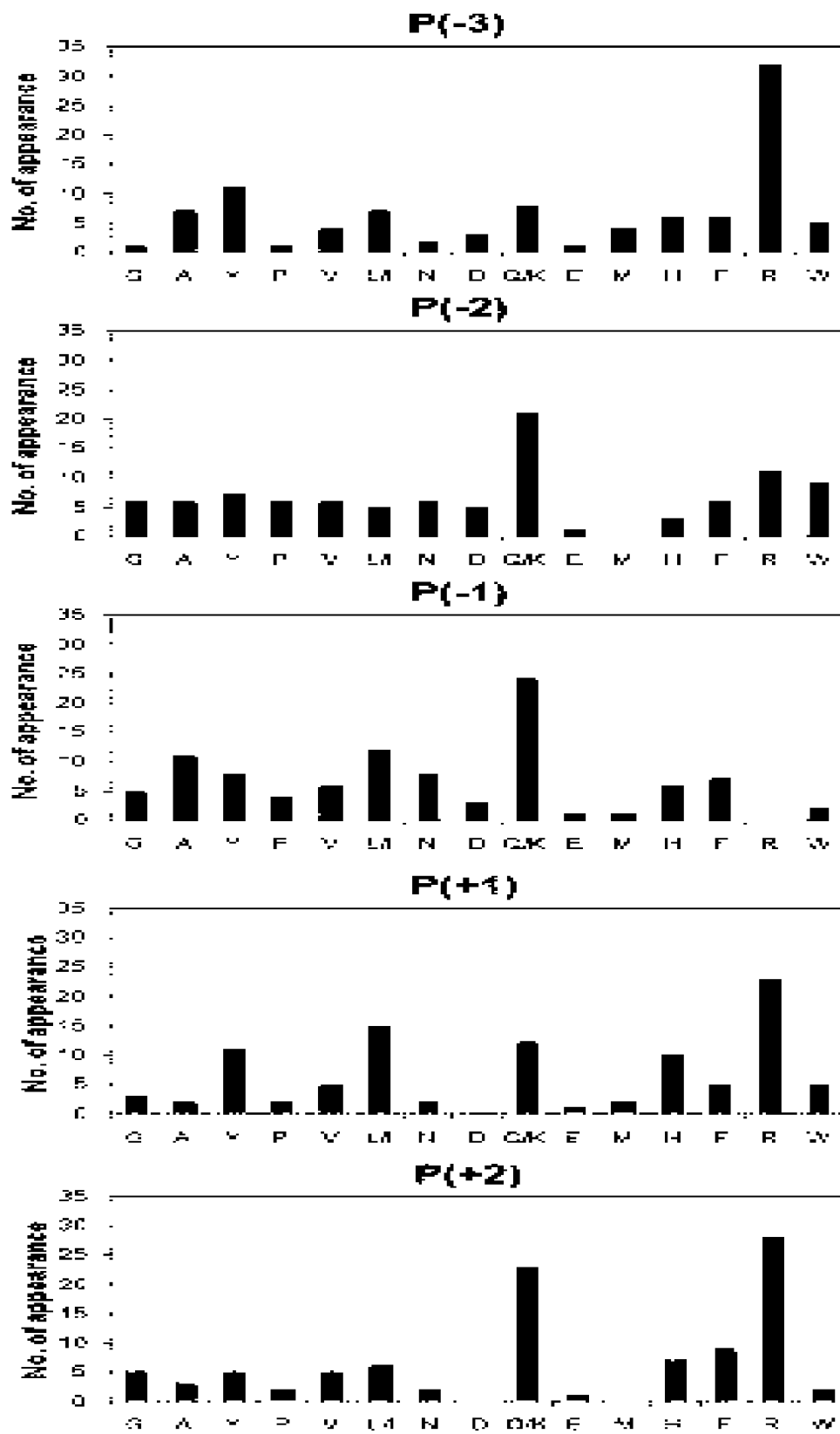


[Fig. 3]

AcNH - Ala - X₃ - X₂ - X₁ - Ser - X₁ - X₂ - Ala - 스페이스 - 교체상시시제 수지

NP(L/I)SR(L/I)	W(K/Q)VSYG	YWVS(L/I) (K/Q)	RWFSHF	VGAS(K/Q) (K/Q)
FWVSP(K/Q)	RRASY	HRGSVH	GRNSRE	FPWSRR
ADVS(K/Q)(K/Q)	RH(K/Q)SHN	RF(K/Q)S(K/Q) (L/I)	RNHSHH	RVHSFH
RW(K/Q)S(L/I)F	YQ(L/I)S(K/Q)G	R(K/Q) (K/Q)S(K/Q)Y	DAASF(K/Q)	WA(K/Q)SG(L/I)
AP(L/I)SRY	R(K/Q)AS(L/I)G	ARYSMG	RAHSA	(K/Q) (K/Q)GS(L/I)F
Y(K/Q) (K/Q)SRH	(K/Q)NFSRF	APPSWR	RW(K/Q)S(L/I)H	(K/Q) (K/Q) (K/Q)SNW
RFASVV	DFAS(K/Q)R	YGYSRG	H(K/Q) (L/I)SER	RPYSH(K/Q)
YV(L/I)SGR	Y(K/Q)ASHN	R(K/Q) (K/Q)SY(L/I)	YYFSVR	(L/I)YASM(K/Q)
F(K/Q)YSR(K/Q)	(L/I)W(K/Q)SYA	RV(K/Q)SFV	MW(K/Q)SRW	RRKSN(K/Q)
RG(L/I)SHR	HADSY(K/Q)	N(L/I)PSR(K/Q)	MHNSF(K/Q)	MNHSRV
ERN(S/L/I)F	M(L/I)(L/I)S(K/Q)H	(K/Q) (K/Q) (L/I)SW(K/Q)	HP(L/I)SRY	(K/Q)N(K/Q)S(L/I)F
HGPSVR	YAHSP(K/Q)	R(K/Q)NSRV	(K/Q)HNSY(K/Q)	RGVS(K/Q)R
VVASHR	RF(L/I)SRH	R(K/Q)NSRF	(K/Q) (L/I)FS(L/I) (K/Q)	PKAS(L/I)R
WWWRR	R(K/Q) (K/Q)SAR	(L/I)VMRR	VY(K/Q)SYA	RRNS(K/Q)F
RN(K/Q)SRR	R(K/Q) (K/Q)SH(K/Q)	WDYS(K/Q)R	FPFS(L/I) (K/Q)	R(K/Q)GSWV
FNNSYR	ADAS(K/Q)Y	VRPSYP	(L/I)(K/Q) (K/Q)SGR	HW(K/Q)SY(K/Q)
YY(K/Q)SW(K/Q)	YY(K/Q)SRP	(L/I)YESRR	YFOSRR	RAYSHR
ARFS(L/I) (K/Q)	WEFSRR	(L/I)K(K/Q)GS(K/Q) (L/I)	(L/I)K(K/Q)YS(L/I)R	DRHS(L/I)F
(K/Q) (L/I)(L/I)SWR	RVYSAR	RRDS(L/I) (K/Q)	FD(L/I)SRR	
R(L/I) (K/Q)SF(K/Q)	AY(K/Q)SV(L/I)	R(K/Q)VSHR	RDGS(L/I)R	

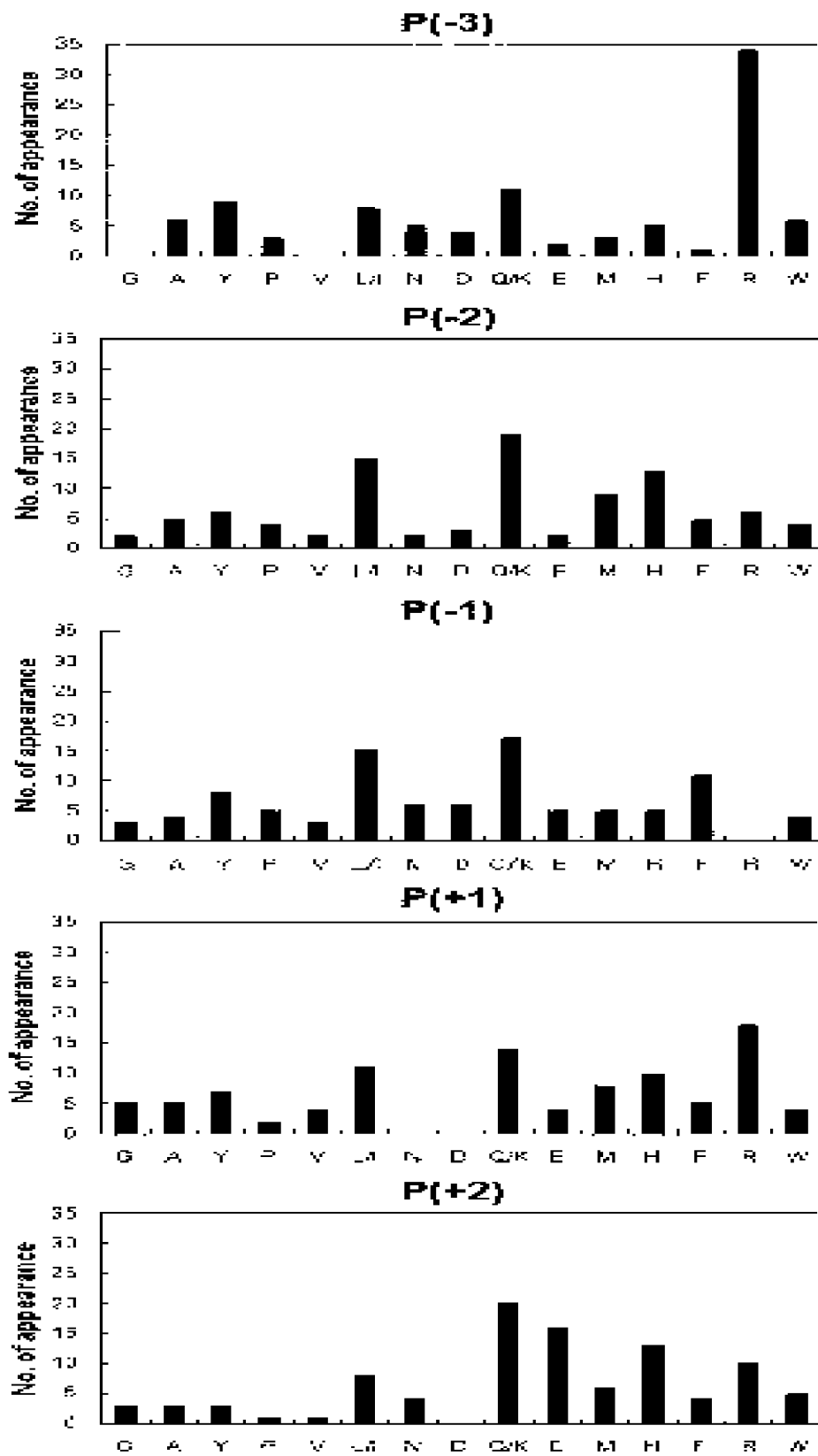
[Fig. 4]



[Fig. 5]

AcNH - Ala - X ₃ - X ₂ - X ₁ - Ser - X ₁ - X ₂ - Ala - 스페이스-고체상 지지체 수지				
(K/Q)YFSRP	RRMS(K/Q)W	R(K/Q)WSF(K/Q)	(K/Q)M(L/I)SWG	RHF(L/I)(K/Q)
A(K/Q)PSRY	RRNSEH	R(K/Q)NSFM	H(L/I)(K/Q)SH(L/I)	R(L/I)(K/Q)SAH
R(K/Q)DSG(L/I)	(K/Q)YDSMH	(L/I)ML(I)SRR	WPYSHH	(L/I)G(K/Q)S(L/I)M
Y(K/Q)NS(L/I)(K/Q)	(K/Q)H(K/Q)SAH	RH(K/Q)SG(K/Q)	D(K/Q)MSRV	NG(L/I)S(K/Q)R
RYHSVH	(K/Q)(K/Q)NSMH	(K/Q)(K/Q)YSF(L/I)	(K/Q)(K/Q)(K/Q)S(K/Q)(L/I)	Y(L/I)DSH(L/I)
AH(L/I)SH(K/Q)	RWYS(L/I)(K/Q)	(L/I)DPMSG	RFMSYH	R(L/I)(L/I)S(L/I)R
RAPSH(K/Q)	AWGSRA	FPASRR	RNN(L/I)E	RHHSRE
PMWSA(K/Q)	R(K/Q)HSR(K/Q)	RVYSG(K/Q)	(L/I)(L/I)(L/I)SY(K/Q)	WA(L/I)SR(L/I)
YP(K/Q)SRW	(K/Q)(K/Q)(L/I)SY(K/Q)	NHVSWH	(K/Q)HASRH	RHYS(K/Q)M
RA(L/I)SRF	(L/I)AES(L/I)A	RYNS(K/Q)(K/Q)	RFFSGH	R(L/I)(L/I)SHH
WHFS(L/I)E	(L/I)FWSFR	RRFSAF	EMFSYR	HE(K/Q)SEE
AHYSR(K/Q)	M(L/I)(K/Q)SHE	AH(L/I)SV(K/Q)	Y(L/I)VSMT	NMVSRE
R(L/I)(K/Q)SRN	Y(K/Q)HSHR	DOYS(L/I)G	R(K/Q)HSWF	(K/Q)(L/I)FSFR
(L/I)EDSFE	(L/I)DD\$RE	(K/Q)W(L/I)SVH	W(L/I)(K/Q)SHH	AV(K/Q)SRW
YAWS(K/Q)A	EWES(K/Q)	WMP\$YR	RR(K/Q)S(K/Q)W	H(L/I)(K/Q)SYN
R(K/Q)FSAE	NIMSRR	P(K/Q)(K/Q)SMF	RRAS(K/Q)E	H(K/Q)GS(K/Q)(K/Q)
PMESV(K/Q)	RHK(Q)S(K/Q)E	YMASGE	MP(L/I)SM(K/Q)	MHFSR(K/Q)
WH(K/Q)SWE	RRFS(L/I)E	Y(K/Q)(L/I)S(L/I)(L/I)	Y(L/I)FSHH	
RNDSYN	NFMS(K/Q)Y	HYYSME	R(K/Q)(L/I)S(K/Q)E	
DYGSMH	R(K/Q)PS(K/Q)(L/I)	D(L/I)ESW	RFES(K/Q)M	

[Fig. 6]



[Fig. 7]

세린/트레오닌 키나아제	Identified sequence	Protein Name
PKA	RKASLG	Glycogen Synthase AAAATPase
	RRNSNQ	Glycogen branching enzyme
	RRFSAF	MSN2 protein
Yak1	RKDSGI	MSN4 protein
	RHKSGK	IFH1 protein

[Fig. 8]

