



- (51) 국제특허분류:
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011802
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 18일 (18.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0148212 2012년 12월 18일 (18.12.2012) KR
- (71) 출원인: 재단법인 의약바이오컨버전스연구단 (MEDICINAL BIOCONVERGENCE RESEARCH CENTER) [KR/KR]; 443-270 경기도 수원시 영통구 이의동 864-1 차세대융합기술연구원 B동 8층, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김성훈 (KIM, Sunghoon); 135-859 서울특별시 강남구 도곡동 895-8 역삼한신아파트 4동 1005호, Seoul (KR). 황광연 (HWANG, Kwang Yeon); 140-727 서울특별시 용산구 이촌로 81길 14 강촌아파트 102-1302, Seoul (KR). 전영호 (JEON, Young Ho); 363-783 충청북도 청원군 오창읍 오창중앙로 65 우림필유 2차 아파트 609-1102, Chungcheongbuk-do (KR). 한병우 (HAN, Byung Woo); 151-742 서울특별시 관악구 관악로 1, A동 104호 (봉천동 서울대학교수아파트 122), Seoul (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook) 등; 135-915 서울특별시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, 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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

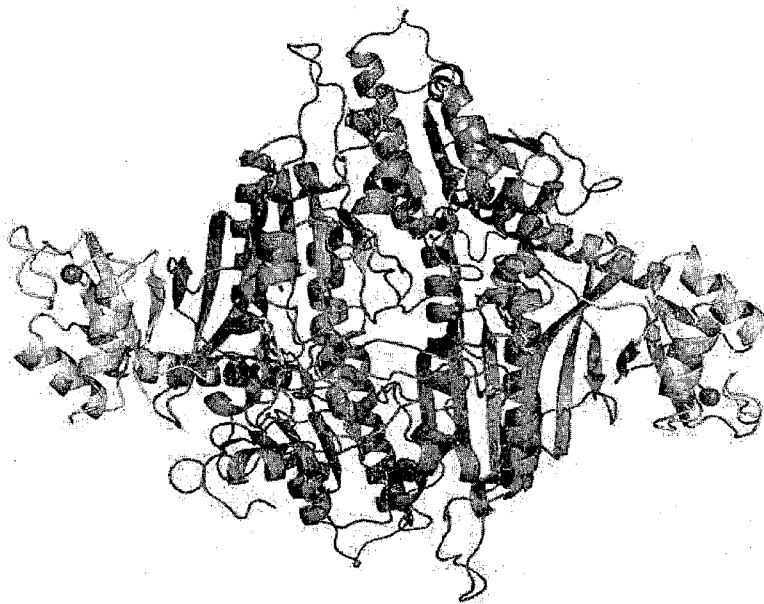
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CRYSTAL STRUCTURE OF DENATURED EPRS PROTEIN, AND CRYSTALLIZATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 변형된 EPRS 단백질의 결정 구조 및 이와 결정화 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a crystal structure of a denatured bifunctional glutamate/proline tRNA synthetase(EPRS) protein, and a crystallization method therefor, and more specifically, to a method for expressing, in large quantities, a denatured EPRS protein in which 1000 amino acids of N-terminal portion of a human-derived EPR protein are removed and purifying the protein so as to crystallize the same and a crystal structure analyzed by the same. Therefore, since the present invention provides the crystal structure of a denatured EPRS protein having an amino acid sequence represented by sequence number 1 including a PRS protein domain portion among human-derived EPRS proteins, the present invention can be very useful for developing an inhibitor using the same.

(57) 요약서: 본 발명은 변형된 EPRS 단백질의 결정 구조 및 이와 결정화 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상세하게는 인간으로부터 유래한 EPRS(bifunctional glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질의 N 말단 부분 1000 개의

아미노산을 제거한 변형된 EPRS 단백질을 대량 발현하고 이를 정제하여 결정화시키는 방법 및 이에 의하여 분석된 결정 구조에 관한 것이다. 따라서 본 발명은 인간유래 EPRS 단백질 중 PRS 단백질 도메인 부분을 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정구조 및 결정화 방법을 제공하고 있어, 이를 이용한 저해제 개발에 유용하게 이용될 수 있다.



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

변형된 EPRS 단백질의 결정 구조 및 이의 결정화 방법

【기술분야】

- <1> 본 발명은 변형된 EPRS 단백질의 결정 구조 및 이의 결정화 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인간으로부터 유래한 EPRS(bifunctional glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질의 N말단 부분 1000개의 아미노산을 제거한 변형된 EPRS 단백질을 대량 발현하고 이를 정제하여 결정화 시키는 방법 및 이에 의하여 분석된 결정 구조에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

- <2> 아미노아실 tRNA 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetase)는 특정 아미노산을 대응되는 tRNA에 정확하게 결합시키는 효소로서, 단백질 합성계에서는 꼭 필요하다. 아미노산과 tRNA를 결합시키는 과정은 크게 두 단계의 과정으로 나뉘는데, 첫 번째 과정은 하나의 ATP를 소모하여, 아미노산을 아미노아실아데닐레이트로 활성화 하는 단계이고, 두 번째 과정은 활성화된 아미노산을 tRNA에 전달하는 단계이다.
- <3> 포유동물의 아미노아실 tRNA 합성효소는 원핵생물의 아미노아실 tRNA 합성효소와 역할은 비슷하지만, 다른 부가적인 도메인을 가진다. 이 부가적인 도메인은 아미노아실 티알엔에이 합성효소나 다른 조절인자들과의 다양한 복합체 형성에 관여한다. 이런 구조적인 복잡성이 아미노아실 tRNA 합성효소의 기능적인 다양함과 사람의 여러 가지 질병과 관련이 있다는 것이 최근 밝혀졌다.
- <4> 아미노아실 tRNA 합성효소의 비정상적인 발현, 돌연변이, 상이한 형성은 다양한 루트로 질병을 일으킨다. 예를 들면, 정상적인 촉매 활성을 보이더라도 비정상적인 세포 내 국한적인 축적, 비정상적인 분자 상호작용은 정상세포의 조절 네트워크를 방해해 종양기인성 혈관 형성, 면역 반응, 전자 번역 조절, 신호전달에 영향을 미친다. 세포의 프로테옴과 신호전달 경로의 방해는 종양발생이나 종양발생과 관계가 있는 스트레스에 대한 세포의 민감성에 영향을 미친다.
- <5> 아미노아실 tRNA 합성효소 중 특이하게도 사람의 글루타메이트와 프롤린의 tRNA와의 결합을 촉진하는 효소(EPRS)는 특이하게도 하나의 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 글루타메이트를 촉매하는 도메인은 N 말단 부분에, 프롤린을 촉매하는 도메인은 C 말단에 각각 위치하며, 상기 두 도메인은 WHEP 도메인으로 연결되어 있

다. 글루타밀 tRNA 합성효소는 class 1 아미노아실 tRNA 합성효소에 속하고, 프롤린 tRNA 합성효소는 class 2 아미노아실 tRNA 합성효소에 속한다. 두 도메인을 연결하는 WHEP 도메인은 57개의 아미노산 사슬이 3번 반복되어 있는 구조로 구성되어 있는데, 단백질-단백질 또는 단백질-RNA 상호작용을 매개한다.

<6> 생명체의 대부분의 생명활동은 20여개 아미노산의 조합으로 만들어진 단백질이라는 매개체를 통하여 유지된다. 각종 생체 내 반응을 촉매하고 조절하는 효소계는 물론이고, 각종 신호의 전달체계 역시 단백질이라는 사실은 단백질의 중요성을 예시한다. 한편 단백질은 각자의 독특한 기능을 나타내기 위해 폴딩(folding)을 통해 3차원 구조 또는 입체 구조를 형성하는데, 이러한 3차원 구조에 변형이 생기면 질병 발생의 주요 원인이 된다. 단백질의 3차원 구조 규명은 단백질의 기능을 정확하게 이해하기 위한 근본이 되며, 기능이 밝혀지지 않은 단백질의 3차원 구조 규명은 그 기능을 파악할 수 있는 중요한 수단이 된다. 따라서 선진국들은 지놈 프로젝트 이후, 단백질의 구조 규명을 위해 국가적인 노력을 경주하고 있다. 그러나 단백질의 3차원 구조는 각각의 폴리펩티드를 이루고 있는 아미노산 하나하나의 서열에 의하기 때문에 각각을 고려하여 만들어질 단백질의 구조를 예측하는 것은 무척 어려운 일이다.

<7> 최근 생명공학의 발전은 신약 개발의 혁명을 예고하고 있다. 인간의 질병은 대부분 단백질의 이상에 의해 발생하고, 이러한 단백질의 기능을 억제하거나 증가시켜 정상적인 기능으로 바꾸는 것이 신약으로 개발되고 있다. 지금까지의 신약 발굴은 의약품 후보 물질을 대상으로 수많은 약효검증 실험의 반복을 통해 이루어져 왔다. 하지만 최근에는 질병 단백질의 구조를 규명하여 그 부위에 결합하는 화합물을 디자인하여 약물을 개발하는 추세로 바뀌고 있다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

<8> 이에 본 발명자들은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 변형된 EPRS 단백질을 결정화 및 구조분석을 하여 본 발명을 완성하였다.

<9> 따라서 본 발명의 목적은 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분의 아미노산 1000개를 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 공간군이 $P3_121$, 단위 세포 파라미터가 $a=119.67\text{\AA}$, $b=119.67\text{\AA}$, $c=99.36\text{\AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이며, 다이머(dimer) 구조를 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정을 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 (a) 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분 1000개의 아미노산을 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 변형된 EPRS(Bifunctional Glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 정제된 단백질을 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl) 또는 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)을 침전제로 포함하는 보존용액으로 결정화하는 단계를 포함하는 상기 변형된 EPRS 단백질의 결정화 방법을 제공하는 것이다.

<11> 본 발명의 다른 목적은 (a) 상기 변형된 EPRS 단백질과 후보 화합물을 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 후보 화합물 중에서 상기 변형된 EPRS 단백질과 상호작용하는 화합물을 선별하여 EPRS 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 결정하는 단계를 포함하는 EPRS 단백질 활성 저해제 개발 방법을 제공하는 것이다.

【과제의 해결 수단】

<12> 본 발명의 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분의 아미노산 1000개를 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 공간군이 $P3_121$, 단위 세포 파라미터가 $a=119.67\text{\AA}$, $b=119.67\text{\AA}$, $c=99.36\text{\AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이며, 다이머(dimer) 구조를 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정을 제공한다.

<13> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분 1000개의 아미노산을 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 변형된 EPRS(Bifunctional Glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 정제된 단백질을 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl) 또는 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)을 침전제로 포함하는 보존용액으로 결정화하는 단계를 포함하는 상기 변형된 EPRS 단백질의 결정화 방법을 제공한다.

<14> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 상기 변형된 EPRS 단백질과 후보 화합물을 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 후보 화합물 중에서 상기 변

형된 EPRS 단백질과 상호작용하는 화합물을 선별하여 EPRS 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 결정하는 단계를 포함하는 EPRS 단백질 활성 저해제 개발 방법을 제공한다.

<15> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<16> 본 발명에서는 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분의 아미노산 1000개를 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 공간군이 $P3_121$, 단위 세포 파라미터가 $a=119.67\text{\AA}$, $b=119.67\text{\AA}$, $c=99.36\text{\AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이며, 다이머(dimer) 구조를 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정을 제공한다.

<17> 본 발명에서 단위 세포 파라미터(unit cell parameter)란, 격자계수라고도 불리며, 단위 세포는 공간 격자(space lattice)를 구성하는 가장 해석이 용이한 최소 반복 단위(repeating unit)로서, 세 crystallographic axes로 정의되며, 이 세 벡터들의 길이(a , b , c)와 이들이 서로 이루는 각(α , β , γ)을 의미한다.

<18> 공간군(space group)이란, 공간 그룹으로도 불리며, 결정의 단위 세포의 대칭(symmetry)을 의미하며, 대칭 요소들을 조합하면 군(group)을 형성하는데 총 230개의 대칭군이 가능하다.

<19> 본 발명에서 제공하는 변형된 EPRS 단백질은 PRS 도메인을 포함하는 단백질로서 EPRS 단백질의 N말단에서 1000개의 아미노산을 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖도록 제조한 것이다. 단백질의 2차 구조와 Expasy, NCBI, ERGO(<http://wit.integratedgenomics.com/Igwt>)에서 얻은 단백질 도메인 분석자료 그리고 여러 균주에서 아미노산 유사성을 비교한 결과를 토대로 상기 1000개의 아미노산을 제거한 것이다.

<20> 본 발명의 단백질은 다이머(dimer) 구조를 갖는 것을 특징으로 한다.

<21> 본 발명은 (a) 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분 1000개의 아미노산을 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 변형된 EPRS(Bifunctional Glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 정제된 단백질을 구연산나트륨/

염산(Sodium citrate/HCl) 또는 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)을 침전제로 포함하는 보존용액으로 결정화하는 단계를 포함하는 상기 변형된 EPRS 단백질의 결정화 방법을 제공한다.

- <22> (a) 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분 1000개의 아미노산을 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 변형된 EPRS(Bifunctional Glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계;
- <23> 상기 변형된 EPRS 단백질(본 발명 실시예의 EPRS_Tr2)의 아미노산 서열(서열번호 1)을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 상기 유전자의 5'-말단과 3'-말단에 대응하는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)용 프라이머를 고안하여 합성한다. 유전자의 5' 말단에 대응하는 프라이머는 대장균 발현 벡터로 클로닝이 용이하도록 제한 효소 인지 부위가 존재하고, 3' 말단에 대응하는 프라이머에는 제한효소 인지 부위와 종료 코돈을 만들어 단백질 합성이 인위적으로 종료하도록 만든다. 이때 5' 말단에 대응하는 프라이머는 N-말단의 아미노산을 원하는 수만큼 제거하도록 제조한다. 호모 사피엔스 EPRS DNA 중 PRS 도메인을 포함하는 DNA를 주형으로 하고, 상기와 같이 제조된 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행하여 PRS 도메인 유전자를 증폭한다.
- <24> 본 발명의 변형된 EPRS 단백질의 발현은 당업계에 공지된 통상의 분자생물학 방법을 이용하여 실시할 수 있다. 당업계에서 통상적으로 이용되는 벡터, 예컨대 pGEM-T, pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pUC19 또는 pET 등에 PCR로 증폭한 유전자를 삽입한다. 상기 발현벡터는 옴피실린 저항 유전자, 테트라사이클린 저항 유전자, 가나마이신 저항 유전자, 클로람페니콜 저항 유전자 등과 같은 통상의 선별마크를 포함할 수 있다. 삽입 후 적합한 숙주 세포, 예컨대 E. coli JM109, E. coli, BL21(DE3), E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110과 같은 대장균, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 추린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등에 형질전환시키고, 형질전환된 세포를 배양하여 상기 변형된 EPRS 단백질을 대량으로 발현시킬 수 있다. 발현에 사용되는 벡터는 가장 바람직하게는 pET 일 수 있고, 숙주세포는 대장균일 수 있다.
- <25> 단백질의 생성여부는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 웨스턴 블롯팅 방법 등과 같은 통상적인 방법으로 확인할 수 있다. 변형된 EPRS 단백질(EPRS_Tr2)

의 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 된 대장균을 엠포실린, 테트라사이클린, 카나마이신, 클로람페니콜 등 선별마커에 대응하는 항생제가 함유된 배지에서 진탕 배양하여 일정한 세포농도에 다다랐을 때, IPTG(isopropyl--D-galactopyranoside)를 첨가하여 EPRS_Tr2의 발현을 유도한다. 상기 배양액을 원심 분리하여 대장균 세포를 침전시킨 후, 대장균을 적당한 완충 용액에 현탁한 후 파쇄한다. 상기 파쇄물을 원심분리하여, 단백질이 녹아있는 상층액을 분리한 후, 이온교환수지, 친화성 결합수지, 사이징(sizing) 등을 이용하여 EPRS_Tr2를 분리 및 정제한다.

<26> (b) 상기 (a) 단계에서 정제된 단백질을 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl) 또는 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)을 침전제로 포함하는 보존용액으로 결정화하는 단계;

<27> 단백질의 3차원 구조를 규명하기 위하여, 표적 단백질이 결정성을 갖는 것이 중요하다. 표적 단백질의 3차원 구조 규명에 있어서, 일반적으로 X-선 결정화법(x-ray crystallography)이 사용되며, 이러한 X-선 결정화법을 사용하기 위한 전처리 단계로서 여러 가지 결정화 방법이 수행되어 있어야 한다.

<28> 상기 결정화 방법은 통상적인 농도 평형을 이용한 방법이다. 더 상세하게는 증기 평형법 또는 투석법일 수 있다. 상기 증기 평형법에는 시팅 드롭 증기 평형법 및 행잉 드롭 증기 평형법으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 가장 바람직하게는 행잉 드롭 증기 평형법 일 수 있다.

<29> 본 발명에서는 결정화 방법으로 행잉 드롭 증기 평형법(Hanging-drop vapour diffusion method)을 사용하였다.

<30> 방울 혼합 증기 평형법의 결정화 원리와 과정은 아래와 같다. 밀폐된 공간에 모액의 작은 방울과 이보다 훨씬 큰 규모의 보존 용액(reservoir)이 분리된 채 공존할 때, 이들 사이에서 물 또는 다른 휘발성 물질의 이동이 일어나게 된다. 한편, 단백질의 용액 조건 중 열역학적으로 불안정 상태인 과포화 상태에서 침전제의 변화에 따라 단백질의 침전이 일어나며, 침전 속도가 느리게 진행되면서 안정된 결정화 상태가 된다. 여기에 사용 가능한 침전제는 잘 알려져 있으며, 이들은 농축 상태의 단백질 용액의 용해도를 줄여 주는 역할을 하게 된다. 이때 단백질 분자 주위의 상대적인 흡착층을 감소시키기 위하여, 단백질 분자들이 서로 응집하여 결정을 형성하게 된다. 따라서 저수조 용액은 이와 같은 침전제를 비롯하여, 완충액, 염, 세정제(detergent) 등이 다양한 농도로 섞여 있게 되는데, 단백질 용액과 이런 다

양한 조건의 저수조 용액이 보통의 경우 약 1:1의 비율로 섞여서 방울을 형성하게 된다. 이렇게 얻어진 방울을 실리콘으로 코팅된 유리 슬라이드에 얹어 뒤집은 상태로 준비된 플레이트에 얹어 밀봉한다. 초기에는 방울 중의 단백질의 농도가 보존용액의 농도와 차이가 있어서 단백질이 결정상태로 존재하지 않지만, 밀봉된 상태로 놓아두면 서서히 평형이 이루어지게 되는데, 이때 상기에서 설명한 원리에 의하여 특정 상태의 조건에서 결정이 형성되는 것이다. 이와 같은 방울 혼합 증기평형법에서 보존용액 중의 침전제 뿐만 아니라 염, 완충액 및 세정제의 종류와 적정농도, 용액의 pH 및 실험온도는 단백질의 종류에 따라 달리 선택되고, 경우에 따라서는 단백질의 결정형성에 있어서 아주 중요한 요소가 된다.

<31> 시팅 드롭 증기 평형법과 행잉 드롭 증기 평형법은 상기 서술한 원리를 기본으로 구성되었다. 차이점은 시료를 놓는 위치에 있다.

<32> 행잉 드롭 증기 평형법은 도 10a와 같이 진행된다. 행잉 드롭 증기 평형법은 단백질의 결정화에 가장 많이 쓰이고 있는 방법이다. 단백질 용액과 보존용액이 섞인 시료를 순수 보존용액과 증기 평형 상태에 있는 용기 상단에 부착시키면, 용기 내 보존용액에 비해 그 함량이 적은 시료가 평형상태를 이루기 위해, 시료 내 수분이 아래로 떨어지게 된다. 평형 상태에 도달하게 되면 단백질 결정을 얻게 된다.

<33>

<34> 시팅 드롭 증기 평형법은 도 10b와 같다. 시팅 드롭 증기 평형법은 행잉드롭 증기 평형법과 기본 원리가 동일하다. 다만, 단백질 용액과 보존용액을 섞은 시료가 증기 내부에 존재하는 차이가 있다.

<35>

<36> 또 다른 방법으로서 투석법이 있다. 투석법은 단백질 용액이 다공성의 막으로 구성된 튜브 내에 존재하고, 외부에는 침전제를 포함하는 저수조 용액(보존용액)이 존재하며, 이 때 다공성 막은 크기가 작은 물 분자만 이동이 가능하므로 단백질 용액 내부의 물 분자가 다공성 막을 통과하여 침전물 쪽으로 서서히 이동하면서 농축되고, 그 결과 결정이 생성된다.

<37> 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 변형된 EPRS 단백질 결정을 제조하기 위해서 보존용액에 포함된 침전제로서 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl) 또는 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)을 사용할 수 있다. 더 바람직하게는 상기 두 물질을 함께 쓸 수 있다. 전체 보존용액 내에서의 침전제의 농도는 사용되는 침전제의 종류에 따라서 달라지며, 일반적으로는 0.05~1.5M 범위인 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl)은 농도가 0.5M 내지 1.5M이고, 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)은 농도가 0.05M 내지 0.15M일 수 있다.

<38> 상기 보존용액은 상기 침전제 외에도 통상적으로 사용 가능한 염, 완충액 및 세정제 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 단백질 결정화는 pH 6.0 내지 7.0에서 수행되는 것이 바람직하다. 상기 범위는 실험적으로 결정된 것이며, 상기 범위의 pH 조건에서 반응 시 가장 우수한 결정을 얻을 수 있다.

<39> 본 발명의 단백질 결정을 형성하기 위한 반응 온도는 15℃ 내지 25℃인 것이 바람직하고, 18℃ 내지 22℃인 것이 더욱 바람직하다. 반응 기간은 1일 내지 10일이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 2일 내지 5일일 수 있다. 상기 반응 온도 및 반응 기간 범위는 X-ray 분석이 용이한 최적의 데이터를 갖는 결정을 얻을 수 있는 조건으로서 실험적으로 찾아진 범위이다.

<40> 제조된 결정성 EPRS_Tr2 단백질의 구조를 분석하기 위해서 X-선을 조사하면,

X-선의 높은 에너지로 인해, 단백질의 수명이 짧아지고, 데이터의 강도도 약해져서 구조 분석에 좋지 않은 결과가 발생한다. 이러한 결점을 방지하기 위하여, X-선 분석 전에 단백질 결정을 고속으로 질소 냉각하는 고속 질소 냉각법을 수행하는 것이 바람직하다. 고속 냉각용 용액은 sodium malonate, sodium cacodylate trihydrate (pH6.0), sodium citrate tribasic dihydrate 으로 구성되고, sodium malonate의 농도는 3 내지 4 M, sodium cacodylate trihydrate (pH6.0) 농도는 0.05 내지 0.2 M, sodium citrate tribasic dihydrate 농도는 0.5 내지 1 M 인 것이 바람직하다. 상기 농도는 고속 냉각용 용액 내에서의 각 성분의 농도를 나타낸 것이다. 또한 상기 고속 질소 냉각법의 수행온도는 50 내지 200 K, 바람직하게는 80 내지 120 K에서 수행하는 것이 바람직하다. 상기 농도 및 온도 범위는 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질이 그 결정성에 영향없이 질소 스트림에 잘 견딜 수 있고, 고속 질소 내에서 보관이 용이한 범위로서 실험적으로 얻어진 것이다.

<41> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 본 발명의 변형된 EPRS 단백질과 후보 화합물을 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 후보 화합물 중에서 상기 변형된 EPRS 단백질과 상호작용하는 화합물을 선별하여 EPRS 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 결정하는 단계를 포함하는 EPRS 단백질 활성 저해제 스크리닝 방법을 제공한다.

<42> (a) 본 발명의 변형된 EPRS 단백질과 후보 화합물을 반응시키는 단계;

<43> 상기 (a) 단계는 EPRS 단백질의 활성을 억제하기 위해, 후보 저해제 물질들을 선별 또는 설계하여 반응시키는 단계이다.

<44> 상기 후보 화합물은 기존에 만들어진 화합물 또는 본 발명에서 제공하는 변형된 EPRS 단백질 결정화 방법 또는 구조를 사용하여 설계한 화합물 일 수 있다. 화합물을 설계할 때, 본 발명의 변형된 EPRS 단백질의 3차원 결정 구조 또는 상기 단백질과 프롤린 및 아데닌이 결합하는 활성화 자리에 영향을 미치는 개별적 아미노산의 역할에 기초하여, 신규 화합물을 설계할 수 있다.

<45> 본 발명의 변형된 EPRS 단백질의 구조는 효소 활성 부위와 생물학적인 조절 기작 사이의 세부화된 정보를 나타낸다. 활성 부위에서 촉매적으로 중요한 잔기들 모두 일정한 위치에 존재하고, 활성 구조를 갖는다. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 본 발명의 상기 단백질에서는 히스티딘 242, 트레오닌 240, 121, 글루탐산 123, 아르기닌 152, 아르기닌 163, 278, 152, 글로타메이트 237 잔기들이 이에 포함된다. 히스티딘 242, 트레오닌 240, 121, 글루탐산 123, 아르기닌 152 잔기들은

프롤린과 상호작용을 하고, 아르기닌 163, 278, 152, 글로타메이트 237 잔기들은 아데노신과 상호작용을 한다(실시예 4-2 참조).

<46> (b) 상기 후보 화합물 중에서 상기 변형된 EPRS 단백질과 상호작용하는 화합물을 선발하여 EPRS 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 결정하는 단계;

<47> 상기 (b) 단계는 본 발명의 변형된 EPRS 단백질과 상호작용(결합)하는 화합물을 선발하고, 선발된 화합물이 EPRS 단백질의 활성을 저해하는지 여부를 스크리닝하는 단계이다.

상기 (a), (b) 단계를 통해서 EPRS 단백질 활성 저해제가 스크리닝되어 개발될 수 있다.

본 발명에서 반응에 사용되는 후보 화합물은 정제된 단일화합물 또는 여러 화합물의 혼합화합물일 수 있으며, 바람직하게는 화합물 라이브러리에 포함되어 있는 것이다.

스크리닝에 사용되는 본 발명의 변형된 EPRS 단백질은 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분의 아미노산 1000개를 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 공간군이 P3₁21, 단위 세포 파라미터가 $a=119.67\text{\AA}$, $b=119.67\text{\AA}$, $c=99.36\text{\AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이며, 다이머(dimer) 구조의 3차구조를 가지며, 예를 들어 도 8에 기재된 구조모식도를 가질 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법에 의해서 상기 변형된 EPRS 단백질과 상호작용하여 이의 활성을 저해하는 화합물이 선별되며, 이 때, 상호작용은 후보 화합물과 변형된 EPRS 단백질의 3차 구조의 활성 부위 (active site) 또는 알로스테릭 부위 (allosteric site)의 전부 또는 일부에서 이루어질 수 있으며, 그 결합형태는 공유 결합 또는 비공유결합일 수 있다. 상기 비공유결합은 예를 들어, 수소결합, 이온결합, 반데르발스 힘, 소수성 상호작용 또는 이들의 혼합에 의해서 형성된다.

<48> 본 발명의 변형된 EPRS 단백질 저해제는 자가면역질환 치료제로 이용될 수 있다.

<49>

창산이라는 약초의 뿌리에는 할로푸지논(Halofuginone)이 자가면역질환의 치료에 효과적이라는 여러 실험들이 있었는데, 그 약효의 근간이 되는 기작이 최근에 밝혀졌다. 할로푸지논은 아미노산반응경로(Amino acid response pathway, AAR)를 활성화시킴으로서 자가면역질환을 억제한다는 것이다. 영양소를 감지하는 AAR은 세포들이 세포 내 자원을 보존해야 할 때를 세포에게 알려준다. 예를 들어, 세포가 단백질 합성을 위해 필요한 아미노산 공급이 제한된다는 것을 감지하면, AAR은 염증을 촉진시키는 시그널을 차단하는데, 이는 염증이 발생하는 조직은 많은 단백질을 요구하기 때문이다. 할로푸지논이 AAR 경로를 어떻게 활성화시키는지 분석한 결과, 할로푸지논이 EPRS를 억제하여, 프롤린의 합성을 저해한다는 것이 밝혀졌다. EPRS를 억제하면, 프롤린이 고갈되어 AAR 반응이 활성화되면서 자가면역질환이 완화된다는 것이다(Tracy L Keller et al. Nature Chemical Biology; 8: 311-317, 2012). 따라서 프롤린 합성에 관여하는 PRS 도메인을 포함하는 본 발명 단백질의 저해제는 자가면역질환 치료제로 이용될 수 있다.

【발명의 효과】

<50>

본 발명은 인간 유래 EPRS 단백질 중 PRS 단백질 도메인 부분을 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정구조 및 결정화 방법을 제공하고 있어, 이를 이용한 EPRS 저해제 개발에 효과적이다

【도면의 간단한 설명】

<51>

도 1은 EPRS(bifunctional glutamate/proline tRNA synthetase, 1~1512)과 본 발명에서 결정화한 PRS(proline tRNA synthetase, 1001~1512) 도메인을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질을 코딩하는 DNA를 PCR로 증폭한 후, 전기영동으로 추출한 결과이다.

도 3은 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질 코딩 유전자를 포함하는 대장균 발현벡터 pET28a로 형질전환된 대장균을 배양하여 얻은 세포 침전물을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 결과를 나타낸 것이다. (C : IPTG Induction을 하지 않은 형질전환 대장균을 Lysis한 샘플. T : 해당 농도의 IPTG와 시간으로 induction하여 얻은 대장균을 Lysis한 Total 샘플. S : Total 샘플을 얻은 상층액(Supernatant). P : Total 샘플을 얻은 펠릿(Pellet)).

도 4는 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질을 정제 후, SDS-폴리아크릴아마이드 겔

전기 영동한 결과를 보여주는 사진이다. (M : 사이즈 마커, 45 ~ 72 lane : 단백질 용출 분획)

도 5는 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질의 단결정 사진이다.

도 6은 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질, ATP, Mg, 프롤린의 혼합 결정 사진이다.

도 7은 본 발명의 EPRS_Tr2 단백질의 단결정 X-선 회절 데이터 이미지이다.

도 8은 구조 정밀화가 완성되어 확보된 EPRS_Tr2 단백질의 구조 모식도로서 이량체(dimer)구조를 보인다.

도 9A는 아미노아실 tRNA 합성효소가 아미노산과 tRNA를 연결시켜주는 과정을 나타낸다.

도 9B는 본원발명의 EPRS_Tr2의 잔기들과 프롤린, 아데노신이 상호작용하고 있는 것을 구조 모식도로 표현한 것으로, 도 9A의 빨간 네모 상태를 나타낸다.

(파란색 : 질소 원소, 빨간색 : 산소 원소, 흰색 : 탄소 원소)

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

<52> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<53> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<54> <실시예 1>

<55> EPRS_Tr2 유전자 발현

<56> <1-1> EPRS_Tr2 유전자의 증폭

<57> EPRS(Bifunctional glutamate/proline-tRNA synthetase, Homo sapiens) 단백질의 게놈 서열 정보를 기초로 하여, EPRS 단백질 중, PRS(proline-tRNA synthetase) 도메인을 포함하는 C 말단(서열번호 1의 아미노산 서열)을 코딩하는 유전자를 아래 프라이머들을 사용하여 PCR(중합효소 연쇄반응)로 증폭하였다(도 1 참조). 상기 프라이머는 아래 [표 1]에 기재하였다. 상기 PRS 도메인을 본 발명에서는 EPRS_Tr2로 명명하였다.

<58> 【표 1】

서열번호	방향성	서열	길이
3	정방향	5-aaaaagctagcgagcaggagaagggcagggg-3	32 mer
4	역방향	5-aactcgagtcagtagctgcgaccaaataaggtgtagtacttg-3	42 mer

<59> 상기 서열번호 3의 염기서열을 갖는 프라이머는 NheI 제한효소 인지부위(염기부분, gctagc)에 해당하는 염기서열을 포함하고, 서열번호 4의 염기서열을 갖는

프라이머는 종결코돈(밀줄 친 부분, tca), 제한효소 XhoI 인지부위(음영부분, ctcgag)에 해당하는 염기서열을 포함한다.

<60> PCR 반응액은 호모사피엔스 EPRS DNA 1 ul, 10mM dNTP 2 ul(최종농도 :0.2mM), 5uM 프라이머 3 ul,(최종농도:0.3 uM), HotStarTaq DNA 중합효소 0.5 ul(5U/ul, Quiagen, USA), 10ul PCR 완충용액(Quiagen)에 80.5ul의 증류수를 넣어 제조하였다. 상기 반응액을 95℃에서 10분; 94℃에서 1분 30초; 58℃에서 1분; 72℃에서 1분 30초의 반응을 28회 반복하였다. 반응용액을 1% 아가로스 젤에서 전기영동법으로 분리하여 약 1500 염기쌍의 EPRS_Tr2 유전자를 용출하여 얻었다.

<61> 이 용출액 16ul에 10배의 제한효소 반응 완충용액 2ul와 제한효소 NheI과 XhoI을 1ul씩 첨가하여 37에서 20분 동안 반응시켰다. 다음 이 반응용액을 1% 아가로스 젤에서 전기영동법으로 분리하여 원하는 DNA 절편(이하 EPRS_Tr2 Nhe/Xho)을 추출한 후 50ul의 증류수 용액에 용존시켰다. 전기영동 결과 사진은 [도 2]에 표시하였다.

<62> <1-2> EPRS_Tr2 유전자를 포함하는 발현벡터 제조

<63> Quiagen에서 구입한 플라스미드 pET28a를 제한효소 NheI과 XhoI을 이용하여 완전히 절단하고 1% 아가로스 젤 상에서 분리하였다(이하 pET28a Nhe/Xho). EPRS_Tr2 Nhe/Xho 6 ul을 위의 플라스미드 벡터 pET28a Nhe/Xho 3 ul과 함께 반응튜브에 넣은 후 2 ul의 10배 연결반응용액 (500mM 트리스-염산, pH 7.8, 100mM 염화마그네슘, 100mM DTT, 10mM ATP), 10U의 T4 DNA 리가제를 넣고 총 부피가 20 ul가 되도록 증류수를 가한 다음 37℃에서 30분 동안 반응시켰다.

<64> 상기 반응용액을 대장균 DH5 컴피턴트 세포에 첨가하여 형질전환 시킨 다음 50 ul/ml 농도의 LB-카나마이신 배지에 평판하여 대장균 형질전환체를 선별하였다. 이들로부터 플라스미드를 추출하고 제한효소 및 염기서열 분석에 의해 각각 pET28a-EPRS_Tr2를 얻은 것을 확인하였다. 상기에서 얻은 재조합 플라스미드에 클로닝된 EPRS_Tr2 유전자의 염기서열 확인은 Sanger 등 (Sanger, F., et al. (1977). PNAS U.S.A 74, 5463)의 방법에 따라 Big-Dye Cycle Sequencing System (Applied Biosystems, U.S.A)을 이용하여 수행하였고 ABI 377 DNA 염기서열 분석기에 의해 분석결과, EPRS_Tr2 유전자 염기서열은 서열번호 2 인 것을 확인하였다.

<65> <실시예 2>

<66> 단백질의 정제

<67> <2-1> 대장균 내 EPRS_Tr2 수용화 및 과발현 여부 확인

<68> 상기 <실시에 2>에서 얻은 발현 벡터 pET28a-EPRS_Tr2을 발현 숙주인 대장균 Rosetta2(DE3)pLysS(Novagen Inc.)에 형질 전환시켰다. 형질전환된 대장균 균주를 100ug/ml의 카나마이신이 함유된 루리아 배지(LB, 1% 박토트립톤, 0.5% 효모 추출물, 1% 염화나트륨)에서 12시간 동안 진탕 배양한 후 이중 1ml을 100ml의 루리아 배지(100ug/ml의 카나마이신 함유)에 옮겨 37℃에서 박테리아의 흡광도가 600nm에서 약 0.6 정도가 될 때 IPTG(isopropyl-β-D-galactopyranoside)를 최종농도가 1mM이 되게 첨가하였다. IPTG 첨가한 후 18시간 후에 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 각각 세포 침전물을 수거하였다. 수거한 세포 침전물을 20mM Tris pH 8.0, 100mM 염화나트륨, 5mM MgCl₂ 조성의 완충용액에 현탁시킨 다음, 얼음중탕에서 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator, Fisher, 미국)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리기로 13000rpm에서 1시간 원심 분리한 후 그 상층액을 분리하였다.

<69> 본 발명에서 목표하는 EPRS_Tr2 단백질의 수용화 및 과발현 여부를 확인하기 위해, IPTG로 배양하지 않은 형질전환 대장균, IPTG로 배양한 형질전환 대장균, 상기 13000rpm으로 원심분리하여 생긴 상층액과 펠렛을 각각 SDS-PAGE를 실시하였고, 그 결과는 [도 3]에 표시했다.

<70> 도 3]에서 T는 total sample 이고, S는 상층액 sample, P는 펠렛 sample 이다. T와 S sample에서 표적 EPRS_Tr2 단백질(58kDa)의 band가 보이는데(도 3의 빨간 네모), 이는 EPRS_Tr2 단백질의 수용화와 과발현에 성공했다는 것을 의미한다.

<71> <2-2> 파쇄된 대장균에서 단백질의 정제

<72> 상기 상층액을 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM 염화나트륨, 5 mM 마그네슘 클로라이드 조성의 완충용액으로 미리 평형된 니켈-니트릴로트리아세틱 액시드(Ni-NTA) 칼럼 (파마시아, 미국)에 결합시킨 후 0-0.5M 이미다졸 농도구배를 이용하여 용출한 후 SDS-PAGE하여 EPRS_Tr2 단백질 부분만 모았다.

<73> 상기 모은 EPRS_Tr2 단백질을 이온교환수지로 2ml 가량 농축한 후, 20mM Tris pH 8.0, 100mM 염화나트륨, 1% 글라이세롤, 5mM DTT 조성의 완충용액으로 평형된 젤 필터레이션 칼럼(Superdex 200, 26/80, 파마시아)에 주입시킨 후 단백질의 분자량에 의해 분리하여 SDS-PAGE로 확인하고 EPRS_Tr2 단백질을 정제하였다([도 4] 참조).

<74>

<실시예 3>

<75>

정제된 단백질의 결정화 및 냉각

<76>

공지된 행잉 드롭 증기 평형법(Hanging-drop vapour diffusion method; Jancarik, J. et al.. J. Appl. Cryst; 24: pp.409-411, 1991)을 응용하여 상기 실시예 2에서 정제한 EPRS_Tr2 단백질을 결정화하였다.

<77>

1M sodium cacodylate trihydrate(pH6.0), 0.85M sodium citrate tribasic dihydrate로 구성된 용액에 EPRS_Tr2을 넣고 단백질 농도를 36mg/ml로 조절하여 단백질 용액을 제조하였다. 최종 단백질 농도는 브래드포드 방법(Bradford, M., *Anlytical biochemistry*; 72: pp.248-254, 1976)에 의해 결정하였다.

<78>

상기의 최종 단백질 용액과 초기 스크린 용액(Hampton research Inc, Emerald Biosystems Inc 제품)으로 단계별로 결정 조건을 검색하였다. 그 결과, 1.0M 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl) 및 0.1M 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)으로 이루어진 pH6.5의 조건이 가장 적합한 것으로 나왔다.

<79>

마이크로브릿지(microbridge) 표면에 EPRS_Tr2 단백질 용액 1 μ l와 저수조 용액 1 μ l의 혼합용액을 접촉시키고, 이 슬라이드를 저수조 용액 0.5ml가 들어 있는 플레이트 위에 덮어 20℃ 항온 상태에서 보관하였다. 3일 후에 결정이 생성되었고 육방정계 공간군을 나타내는 단백질 단결정을 획득하였다. 획득한 결정은 카메라(SHW-M110S)로 찍어 [도 5]에 기재하였다.

<80>

EPRS_Tr2 결정을 직접 X-선에 노출 시 파생되는 문제점을 해결하기 위하여, 다음과 같이 EPRS_Tr2 결정을 문헌에 기재된 고속 질소 냉각법(Garman E.F. et al.. J. Appl. Cryst.. 30, pp.211-237, 1997)을 응용하여 냉각시켰다.

<81>

고속질소 냉각법의 최적 조건을 검색한 결과, 3.4 M sodium malonate와 0.1 M sodium cacodylate trihydrate (pH6.0)과 0.85M sodium citrate tribasic dihydrate로 구성된 고속 냉각용 용액이 EPRS_Tr2 결정에 아무런 해를 입치지 않으면서 100 K의 액체 질소 스트림에 가장 잘 견디게 해주는 것으로 나타났다. 또한 실험 도중에 자주 발생하는 아이스링 (고속질소 냉각이 완전하지 않는 경우에 물이 얼어서 나타나는 현상) 현상도 보이지 않았다.

<82>

<실시예 4>

<83>

단백질 결정구조 분석

<84> <4-1> X-회절 데이터 수집

<85> 상기 실시예 3에서 얻어진 EPRS_Tr2 결정으로 포항공과 대학교내의 방사광 가속기(Macromolecular Beam Line PL-7A)에서 데이터를 모으는 실험을 수행하였다. 가속기의 검출기는 Q210(Area Detector System Co. USA)으로서 EPRS_Tr2 결정의 데이터 한계는 2.6 Å이고, 결정의 공간군은 육방정계 공간군($P3_121$)이며, 격자 단위는 $a=119.67\text{Å}$, $b=119.67\text{Å}$, $c=99.36\text{Å}$ 및 $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이다.

<86> 상기 실시예에서 제조한 EPRS_Tr2 단백질이 프롤린, AMP와 상호작용하는 아미노산 잔기를 파악하기 위해, ATP, Mg, 프롤린을 EPRS_Tr2 단백질과 혼합하였다. 상기 분자들의 상호작용을 유도하기 위해, EPRS_Tr2 단백질이 녹아있는 용액의 용매(1M sodium cacodylate trihydrate(pH6.0), 0.85M sodium citrate tribasic dihydrate)와 같은 용매에 녹인 후, 이 용액을 상기 단백질 용액에 첨가하여, 각각의 농도가 5mM이 되도록 한 후, 혼합 결정을 생성했다. 생성된 결정을 사진으로 찍은 결과, [도 6]과 같은 모양이었다. 상기 혼합 결정의 데이터 한계는 2.3Å 이며, 상기 혼합 결정의 공간군은 육방정계 공간군($P3_121$)으로 EPRS_Tr2 단결정과 같다.

<87> EPRS_Tr2 단백질의 단결정 X-선 회절 이미지는 [도 7]에 표시하였다.

<88> <4-2> 3차원 구조 해석

<89> 상기 단백질 결정의 구조는 분자치환방법(Molecular replacement)과 Zn-MAD(Multi-wavelength anomalous dispersion, 다중이상분산법)를 이용하여 규명하였다. 상기 X-선 회절 데이터를 구조 프로그램 Phenix, CCP4, CNS 등을 이용해 Phasing 단계를 거쳐 3차원적인 구조로 규명하였다.

<90> 단백질 구조 분석 결과, 2개의 단량체를 포함하는 다이머(dimer) 구조인 것을 확인하였다([도 8] 참조).

<91> 또한, ATP, Mg, 프롤린, EPRS_Tr2를 혼합한 결정의 전자밀도 구조를 규명한 결과는 [도 9 B]에 표시하였다. 상기 [도 9 B]에서 아데닌, 프롤린과 상호작용하는 EPRS_Tr2의 아미노산 잔기들을 확인할 수 있다. 프롤린과 상호작용을 하는 잔기들은 히스티딘 242, 트레오닌 240, 121, 글루타믹산 123, 아르기닌 152 이고, 아데노신 부분과 상호작용하는 잔기는 아르기닌 163, 278, 152, 글로타메이트 237 인 것을 확인할 수 있다.

【산업상 이용가능성】

<92> 본 발명은 인간 유래 EPRS 단백질 중 PRS 단백질 도메인 부분을 포함하는 서

열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정구조 및 결정화 방법을 제공하고 있어, 이를 이용한 EPRS 저해제 개발에 이용할 수 있어, 산업상 이용 가능성이 높다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분의 아미노산 1000개를 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 공간군이 $P3_121$, 단위 세포 파라미터가 $a=119.67\text{\AA}$, $b=119.67\text{\AA}$, $c=99.36\text{\AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이며, 다이머(dimer) 구조를 갖는 변형된 EPRS 단백질의 결정.

【청구항 2】

(a) 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분 1000개의 아미노산을 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 변형된 EPRS(Bifunctional Glutamate/proline tRNA synthetase) 단백질을 발현 및 정제하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 정제된 단백질을 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl) 또는 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)을 침전제로 포함하는 보존용액으로 결정화하는 단계를 포함하는 제1항의 단백질 결정화 방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 (b) 단계의 결정화 방법은 방울 혼합 증기 평형법인 것을 특징으로 하는 제1항의 단백질 결정화 방법.

【청구항 4】

제2항에 있어서, 상기 구연산나트륨/염산(Sodium citrate/HCl)은 농도가 0.5M 내지 1.5M이고, 카코딜염산 나트륨(Sodium cacodylate)은 농도가 0.05M 내지 0.15M인 것을 특징으로 하는 제1항의 단백질 결정화 방법.

【청구항 5】

제2항에 있어서, 상기 (b)단계의 단백질 결정화는 pH 6.0 내지 7.0에서 수행되는 것을 특징으로 하는 결정화 방법.

【청구항 6】

제2항에 있어서, 상기 (b)단계의 단백질 결정화는 15 내지 25℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 결정화 방법.

【청구항 7】

- (a) 제1항의 변형된 EPRS 단백질과 후보 화합물을 반응시키는 단계; 및
- (b) 상기 후보 화합물 중에서 상기 변형된 EPRS 단백질과 상호작용하는 화합물을 선발하여 EPRS 단백질의 활성을 저해하는 화합물을 결정하는 단계를 포함하는 EPRS 단백질 활성 저해제 스크리닝 방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 후보 화합물은 화합물 라이브러리에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 상기 변형된 EPRS 단백질은 인간 유래 EPRS(Bifunctional Glutamate/Proline synthetase) 단백질의 N말단 부분의 아미노산 1000개를 제거하여 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 공간군이 $P3_121$, 단위 세포 파라미터가 $a=119.67\text{\AA}$, $b=119.67\text{\AA}$, $c=99.36\text{\AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ 이며, 다이머(dimer) 구조의 3차구조를 가지는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 10】

제7항에 있어서, 상기 변형된 EPRS 단백질과 상호작용은 후보 화합물과 변형된 EPRS 단백질의 3차 구조의 활성 부위 (active site) 또는 알로스테릭 부위 (allosteric site)의 전부 또는 일부와의 상호작용인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 11】

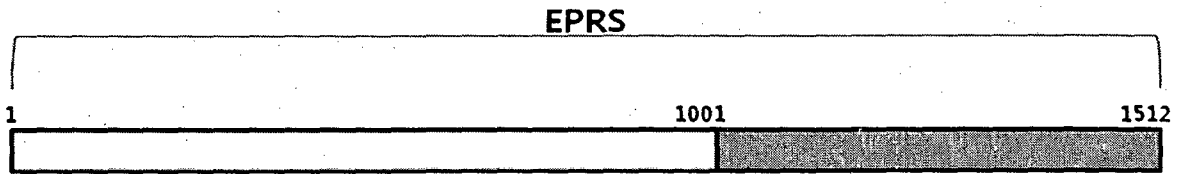
제7항에 있어서, 상기 상호작용은 공유결합 또는 비공유결합에 의한 것임을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 비공유결합은 수소결합, 이온결합, 반데르발스 힘, 소수성 상호작용인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

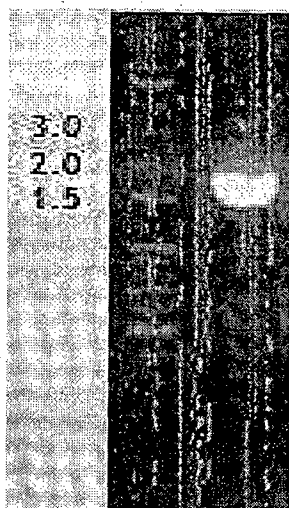
【도면】

【도 1】

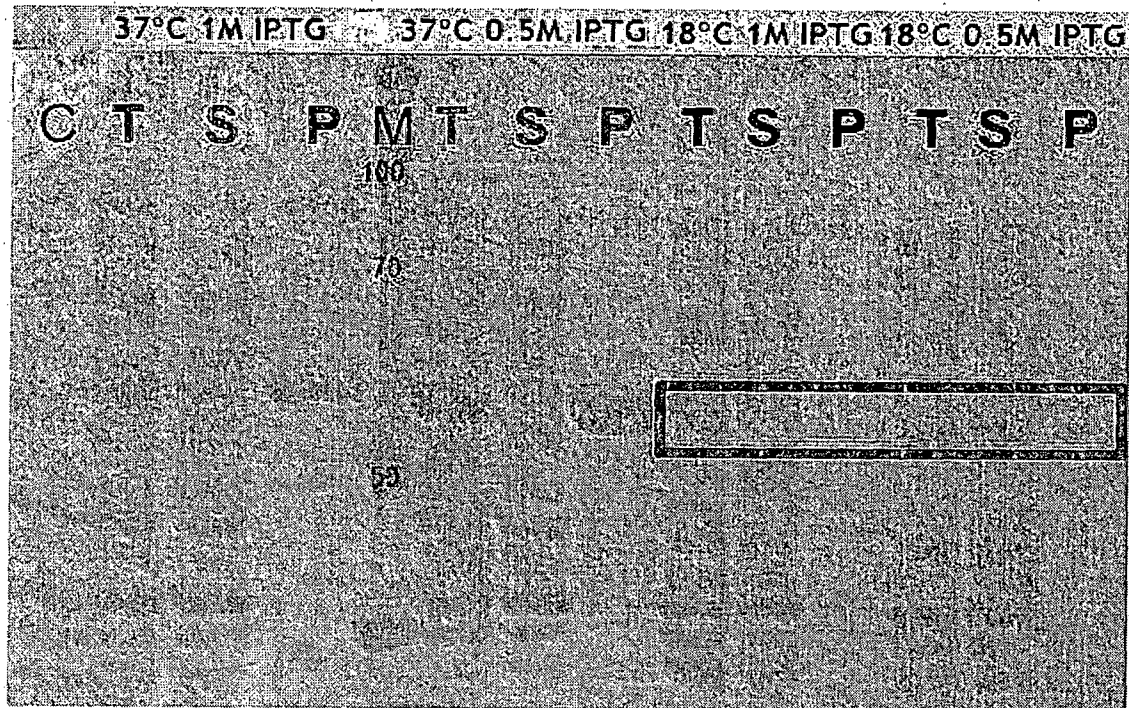


서열번호 1

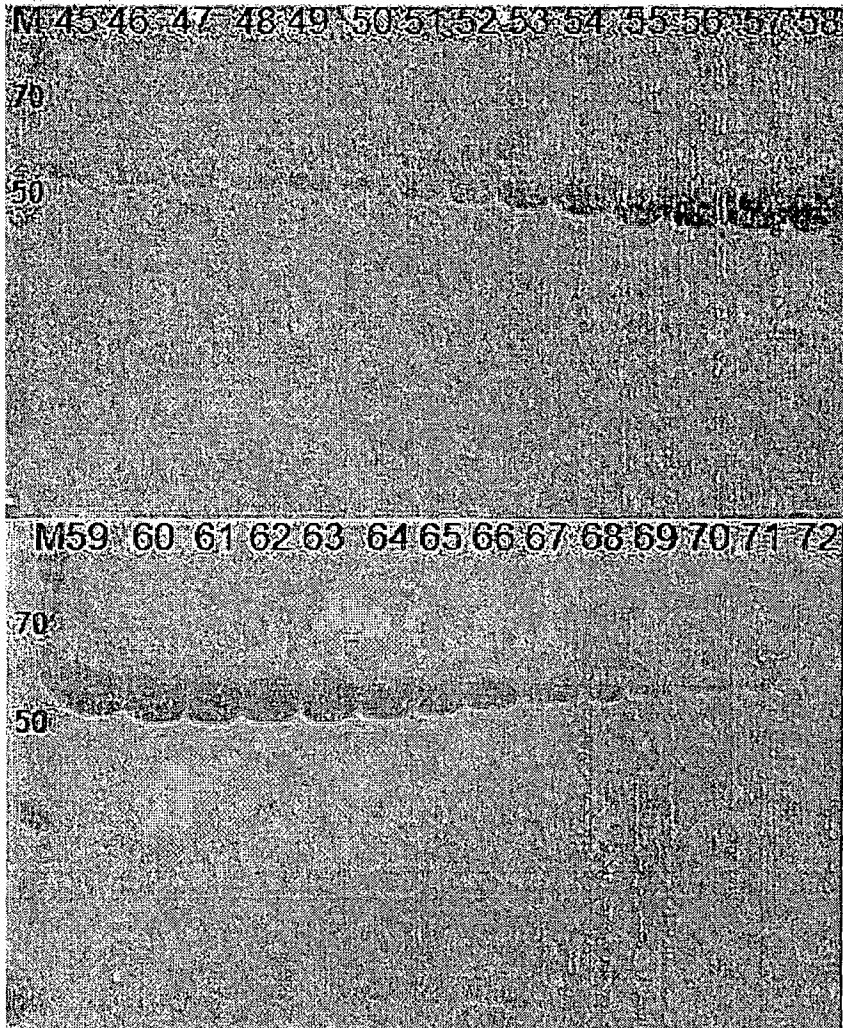
【도 2】



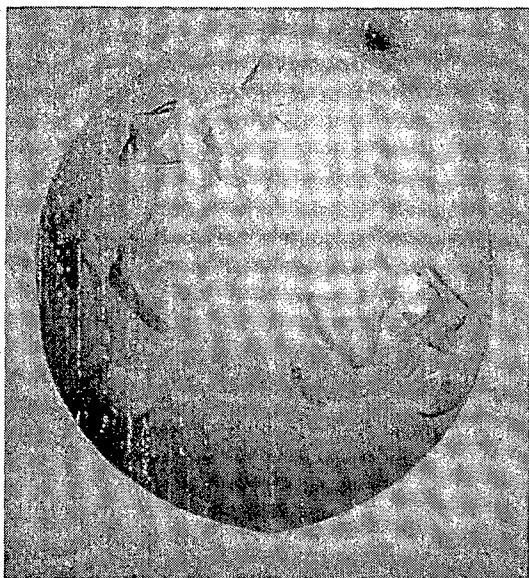
【도 3】



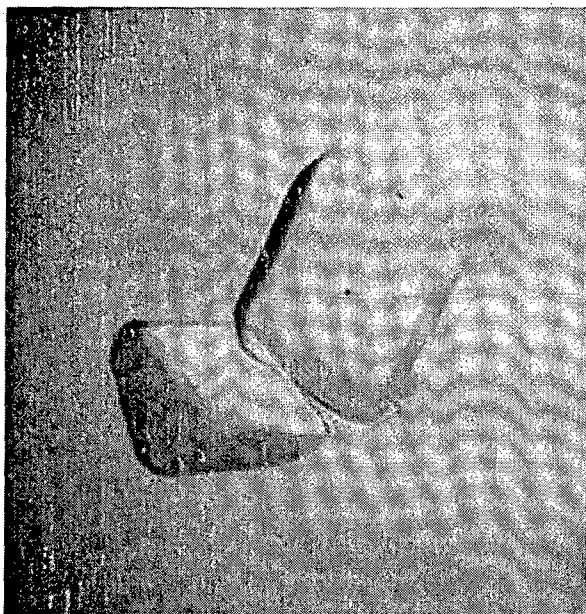
【도 4】



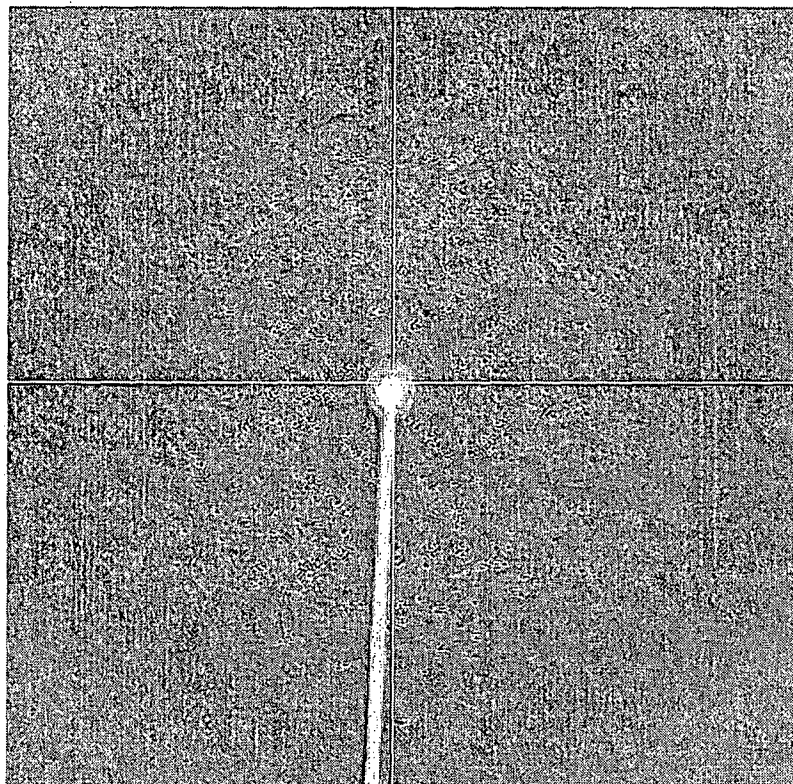
【도 5】



【도 6】



【도 7】

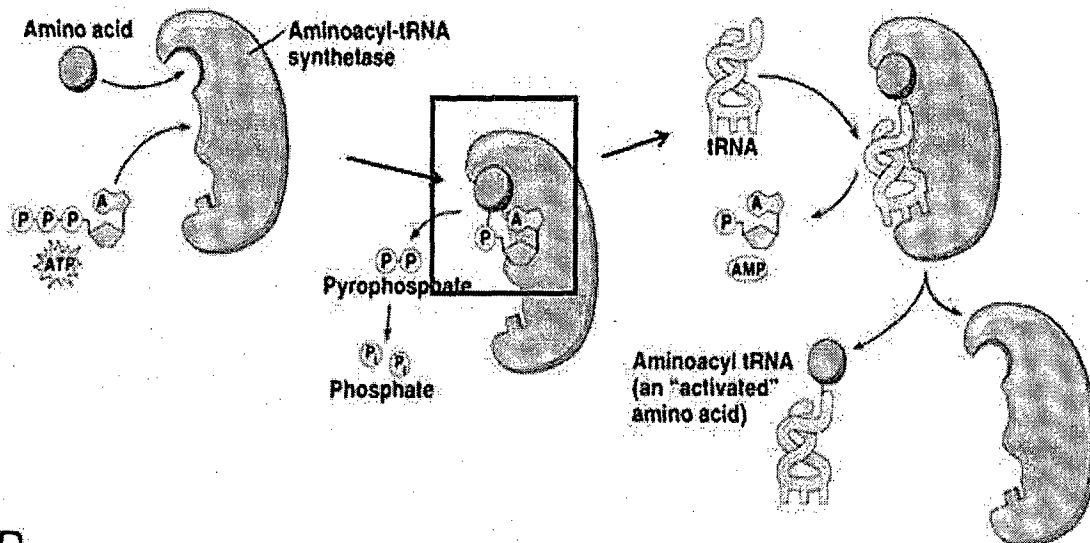


【도 8】

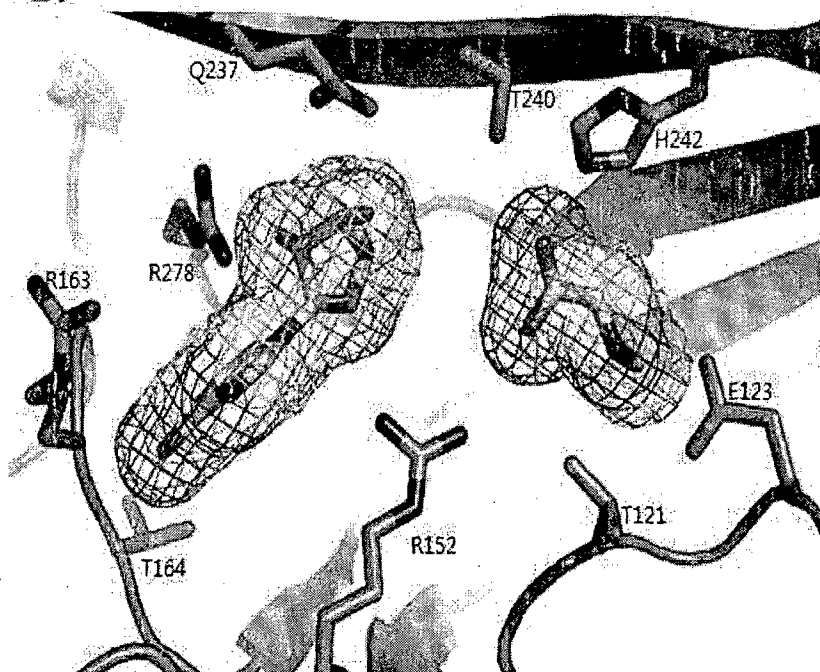


【도 9】

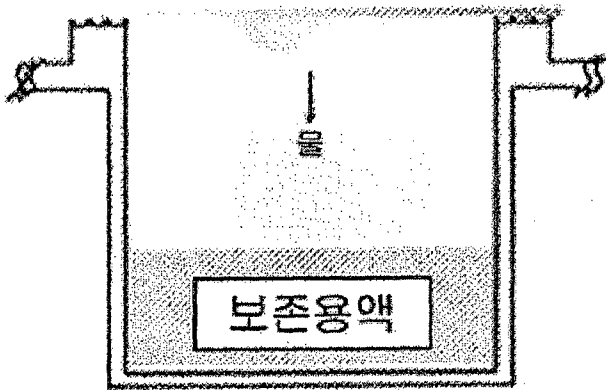
A.



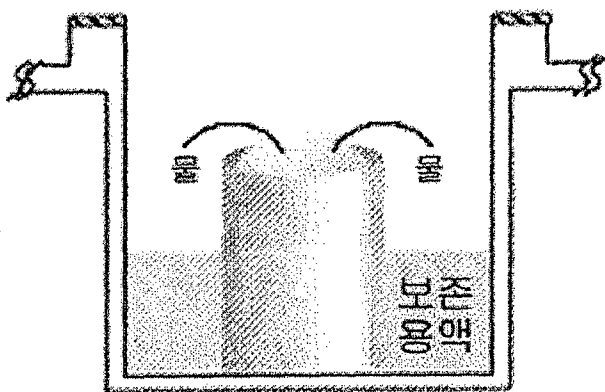
B.



【도 10a】



【도 10b】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011802**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/47(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/47; C12Q 1/02; C30B 29/58; C12N 9/99; C12Q 1/48; C07K 14/65; C12N 9/00; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: EPRS, crystallization, aminoacyl tRNA synthetase, inhibitor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession No. ADA28846.1 (14 December 2009) See the entire document.	1-12
A	WO 02-064627 A2 (GENENTECH, INC.) 22 August 2002 See claims 9, 15.	1-12
A	US 5985630 A (HAWKES, Timothy Robert) 16 November 1999 See abstract.	1-12
A	US 8183006 B2 (RIBAS DE POUPLANA, LLUIS et al.) 22 May 2012 See claim 1.	1-12
A	MATTHEW, Smith et al., "Drosophila Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates", J. Biol. Chem., 04 August 2004, vol. 279, no. 42, pages 43805-43814. See abstract.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 MARCH 2014 (25.03.2014)

Date of mailing of the international search report

26 MARCH 2014 (26.03.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011802

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 02-064627 A2	22/08/2002	AT 349469 T	15/01/2007
		AT 439378 T	15/08/2009
		AU 255508 B2	03/04/2008
		BR 0207422 A	19/04/2005
		CA 2431033 A1	22/08/2002
		CN 100439397 C	03/12/2008
		CN 1703425 A	30/11/2005
		DE 60217066 D1	08/02/2007
		DE 60217066 T2	12/07/2007
		DE 60217066 T4	01/07/2010
		DE 60233359 D1	24/09/2009
		DK 1358209 T3	07/05/2007
		DK 1772464 T3	14/12/2009
		EP 1358209 A2	05/11/2003
		EP 1358209 B1	27/12/2006
		EP 1772464 A2	11/04/2007
		EP 1772464 A3	03/10/2007
		EP 1772464 B1	12/08/2009
		EP 1801120 A1	27/06/2007
		ES 2278020 T3	01/08/2007
		ES 2331150 T3	22/12/2009
		HK 1060138 A1	03/08/2007
		HU 0500733 A2	28/10/2005
		HU 0500733 A3	28/01/2010
		IL 156435 A	22/09/2009
		IL 156435 D0	04/01/2004
		JP 2005-503329 A	03/02/2005
		JP 2009-215299 A	24/09/2009
		JP 4489352 B2	23/06/2010
		MX PA03007042 A	24/05/2004
		NZ 526672 A	27/10/2006
		NZ 548358 A	30/04/2008
		NZ 548359 A	30/11/2007
		PL 374181 A1	03/10/2005
		US 2002-0165155 A1	07/11/2002
		US 2005-0215477 A1	29/09/2005
		US 2006-0270839 A1	30/11/2006
		US 2006-0276397 A1	07/12/2006
		US 2006-0281905 A1	14/12/2006
		US 2006-0287235 A1	21/12/2006
		US 2006-0287510 A1	21/12/2006
		US 2006-0293507 A1	28/12/2006
		US 7084240 B2	01/08/2006
		US 7238658 B2	03/07/2007
		US 7297763 B2	20/11/2007
		US 7354769 B2	08/04/2008
		US 7433788 B2	07/10/2008
		US 7596455 B2	29/09/2009
		WO 02-064627 A3	31/07/2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011802

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 05985630 A	16/11/1999	ZA 200304900 A	27/05/2005
		AT 170928 T	15/09/1998
		AU 1995-87794 A	01/05/1995
		AU 685165 B2	15/01/1998
		DE 69413241 D1	15/10/1998
		DE 69413241 T2	04/02/1999
		EP 0722506 A1	24/07/1996
		EP 0722506 B1	09/09/1998
		GB 9320563 D0	24/11/1993
		HU 219770 B	30/07/2001
		HU 9600858 D0	28/05/1996
		HU T73694 A	30/09/1996
		JP 09-503129 A	31/03/1997
		JP 3735115 B2	18/01/2006
		NZ 273982 A	19/12/1997
		WO 95-09927 A2	13/04/1995
		WO 95-09927 A3	01/06/1995
US 8183006 B2	22/05/2012	AT 463582 T	15/04/2010
		DE 602007005820 D1	20/05/2010
		EP 2064338 A1	03/06/2009
		EP 2064338 B1	07/04/2010
		ES 2344028 T3	16/08/2010
		US 2010-0055719 A1	04/03/2010
		WO 2008-028862 A1	13/03/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07K 14/47(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/47; C12Q 1/02; C30B 29/58; C12N 9/99; C12Q 1/48; C07K 14/65; C12N 9/00; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: EPRS, 결정화, 아미노아실 tRNA 합성효소, 저해제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession No. ADA28846.1 (2009.12.14) 문서 전체 참조.	1-12
A	WO 02-064627 A2 (GENENTECH, INC.) 2002.08.22 청구항 9, 15 참조.	1-12
A	US 5985630 A (HAWKES, TIMOTHY ROBERT) 1999.11.16 요약 참조.	1-12
A	US 8183006 B2 (RIBAS DE POUPLANA, LLUIS 외 3명) 2012.05.22 청구항 1 참조.	1-12
A	SMITH, MATTHEW 외 3명, `Drosophila Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cytoplasmic SUMO conjugates`, J. Biol. Chem., 2004.08.04, 279 권, 42 호, 43805-43814 페이지. 요약 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

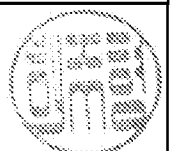
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일
2014년 03월 25일 (25.03.2014)

국제조사보고서 발송일
2014년 03월 26일 (26.03.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 02-064627 A2	2002/08/22	AT 349469 T	2007/01/15
		AT 439378 T	2009/08/15
		AU 255508 B2	2008/04/03
		BR 0207422 A	2005/04/19
		CA 2431033 A1	2002/08/22
		CN 100439397 C	2008/12/03
		CN 1703425 A	2005/11/30
		DE 60217066 D1	2007/02/08
		DE 60217066 T2	2007/07/12
		DE 60217066 T4	2010/07/01
		DE 60233359 D1	2009/09/24
		DK 1358209 T3	2007/05/07
		DK 1772464 T3	2009/12/14
		EP 1358209 A2	2003/11/05
		EP 1358209 B1	2006/12/27
		EP 1772464 A2	2007/04/11
		EP 1772464 A3	2007/10/03
		EP 1772464 B1	2009/08/12
		EP 1801120 A1	2007/06/27
		ES 2278020 T3	2007/08/01
		ES 2331150 T3	2009/12/22
		HK 1060138 A1	2007/08/03
		HU 0500733 A2	2005/10/28
		HU 0500733 A3	2010/01/28
		IL 156435 A	2009/09/22
		IL 156435 D0	2004/01/04
		JP 2005-503329 A	2005/02/03
		JP 2009-215299 A	2009/09/24
		JP 4489352 B2	2010/06/23
		MX PA03007042 A	2004/05/24
		NZ 526672 A	2006/10/27
		NZ 548358 A	2008/04/30
		NZ 548359 A	2007/11/30
		PL 374181 A1	2005/10/03
		US 2002-0165155 A1	2002/11/07
		US 2005-0215477 A1	2005/09/29
		US 2006-0270839 A1	2006/11/30
		US 2006-0276397 A1	2006/12/07
		US 2006-0281905 A1	2006/12/14
		US 2006-0287235 A1	2006/12/21
		US 2006-0287510 A1	2006/12/21
		US 2006-0293507 A1	2006/12/28
		US 7084240 B2	2006/08/01
		US 7238658 B2	2007/07/03
		US 7297763 B2	2007/11/20
		US 7354769 B2	2008/04/08
		US 7433788 B2	2008/10/07
		US 7596455 B2	2009/09/29
		WO 02-064627 A3	2003/07/31

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		ZA 200304900 A	2005/05/27
US 05985630 A	1999/11/16	AT 170928 T	1998/09/15
		AU 1995-87794 A	1995/05/01
		AU 685165 B2	1998/01/15
		DE 69413241 D1	1998/10/15
		DE 69413241 T2	1999/02/04
		EP 0722506 A1	1996/07/24
		EP 0722506 B1	1998/09/09
		GB 9320563 D0	1993/11/24
		HU 219770 B	2001/07/30
		HU 9600858 D0	1996/05/28
		HU T73694 A	1996/09/30
		JP 09-503129 A	1997/03/31
		JP 3735115 B2	2006/01/18
		NZ 273982 A	1997/12/19
		WO 95-09927 A2	1995/04/13
		WO 95-09927 A3	1995/06/01
US 8183006 B2	2012/05/22	AT 463582 T	2010/04/15
		DE 602007005820 D1	2010/05/20
		EP 2064338 A1	2009/06/03
		EP 2064338 B1	2010/04/07
		ES 2344028 T3	2010/08/16
		US 2010-0055719 A1	2010/03/04
		WO 2008-028862 A1	2008/03/13