



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월22일

(11) 등록번호 10-1514440

(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0155416

(22) 출원일자 2013년12월13일

심사청구일자 2013년12월13일

(56) 선행기술조사문헌

JP2013539975 A*

US20100184638 A1*

JP2002508169 A

US6368812 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

성재영

서울 노원구 노원로22길 34, 103동 1205호 (중계동, 롯데우성아파트)

김동규

서울 성북구 인촌로11길 20, 105호 (안암동2가, JS빌딩)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **갈라닌 수용체 3형의 리간드로서 스펙신의 용도**

(57) 요약

본 발명은 갈라닌 수용체 3형의 새로운 리간드로서 스펙신의 용도에 관한 것으로, 스펙신은 갈라닌 수용체 3형과 특이적으로 결합하고 이러한 결합은 갈라닌 수용체 3형이 발현되는 뇌 조직 특이적으로 이루어지므로 갈라닌 수용체 3형이 담당하는 체내의 여러 가지 생리적 기능에 관여할 가능성을 시사한다. 따라서, 생체내의 스펙신-갈라닌 수용체 3형의 시스템 결여로 유발되는 장애 및 질병을 진단하는 진단 제제 개발에 사용되거나, 치료제 개발을 위한 신약성분의 소재로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

Hu_SPX1 (14 a.a.)	NTWTPQAMLYLKGAA-NH ₂
Zf_SPX2 (16 a.a.)	NTWSPQSMLYLKGKH-NH ₂
Hu_GAL (30 a.a.)	SWTLNLSAGYLLSPHAVSNHRSFSKNGLTS
Hu_GALP (60 a.a.)	APAHNGRGSWTLNLSAGYLLSPVLLPQMGDQDGKRETALELDLWKALDGLPYSHPPQFS

(72) 발명자

윤성식

대전 서구 신갈마로 46, 102동 808호 (내동, 롯데
아파트)

황종익

서울 성북구 회기로5길 100, 102동 406호 (하월곡
동, 샹그레빌아파트)

김재일

광주 광산구 첨단중앙로181번길 42-4, (월계동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0019231

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 신규 뉴로펩티돔의 발굴 및 기능 규명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.03.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

갈라닌 수용체 2형 또는 3형으로 형질전환된 HEK293-Gqi 세포, 검출 가능하게 표지된 스펙신(spexin) 및 후보물질 반응을 반응시키는 단계; 및

반응물의 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하고,

상기 HEK293-Gqi 세포는 Gqi를 안정적으로 발현하는 세포이고, 상기 Gqi는 Gaq 서브유닛의 카르복실기 말단을 이에 상응하는 Gai의 아미노산 3개로 치환한 돌연변이로서 Gai의 신호를 Gaq/11의 신호전달 경로로 전환할 수 있는 단백질인, 갈라닌 수용체 2형 또는 3형의 기능 조절제를 스크리닝하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

스펙신은 SEQ ID NO.: 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

검출 가능하게 표지된 스펙신은 방사성동위원소, 형광물질, 형광소광제, 효소, 친화성 태그 또는 에피토프 태그 중 어느 하나로 표지된 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

갈라닌 수용체 3형은 SEQ ID NO. 4 내지 6으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

기능 조절제는 작용제(agonist), 길항제(antagonist) 또는 역작용제(inverse agonist)중 어느 하나인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

후보물질은 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체 또는 항원 결합 단편, 지질, 탄수화물, 핵산 및 유기 저분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

측정은 표지 치환(label displacement), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer), 형광소광(fluorescence quenching) 또는 형광 편광(fluorescence polarization) 중 어느 하나를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 8

갈라닌 수용체 2형 또는 3형으로 형질전환된 HEK293-Gqi 세포 및 검출 가능하게 표지된 스펙신(spexin)을 포함하고,

상기 HEK293-Gqi 세포는 Gqi를 안정적으로 발현하는 세포이고, 상기 Gqi는 Gaq 서브유닛의 카르복실기 말단을 이에 상응하는 Gai의 아미노산 3개로 치환한 돌연변이로서 Gai의 신호를 Gaq/11의 신호전달 경로로 전환할 수 있는 단백질인, 갈라닌 수용체 2형 또는 3형의 기능 조절제 스크리닝용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈라닌 수용체 3형의 리간드로서 스펙신의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2003년 약 30억 개의 인간 DNA 염기분석을 끝낸 인간유전체분석(human genome project)의 결과 기능이 밝혀지지 않은 유전자들의 존재가 실증되었으며 이러한 유전자들의 수는 현재까지도 증가하는 추세이며 이를 해결하기 위해 다양한 생물학적/생화학적 방법을 이용한 이른바 인간단백질체분석(human proteome project)이 전 세계적으로 진행되고 있다.

[0003] 이들 중 한 후보 유전자였던 스펙신(Spexin/NQ/NPQ)을 암호화하는 유전자는 C12orf39(chromosome 12 open reading frame 39)로 명명된 유전자이며 2007년도 인간유전체 데이터베이스를 이용한 생물정보학법(bioinformatics)을 통해 최초로 세포 외부로 분비되는 기능적인 단백질일 것으로 예측되었다. 스펙신 유전자는 인간뿐 아니라 대표적인 척추동물들에서 모두 존재하는 것으로 알려져 있다. 예컨대, 제브라피시(zebrafish), 메다카(medaka), 큰가시고기(stickleback)를 포함하는 어류뿐 아니라, 손톱개구리속(xenopus)을 포함하는 양서류, 도마뱀(lizard)을 포함하는 파충류, 닭(chick)을 포함하는 조류, 생쥐(mouse) 및 흰쥐(rat)나 인간을 포함한 포유류에 이르기까지 다양한 종들에서 발견되는 것으로 보고되었다. 유전자로부터 전사 이후 번역과정을 거친 스펙신의 전구 단백질은 인간에서 116개의 아미노산으로 이루어져 있는 폴리펩타이드이며, 아미노기 말단(Met¹-Cys²⁶)에는 전형적인 분비될 단백질에 신호를 부여하는 신호 펩타이드가 존재한다. 중간 보존되어 있는 단백질 서열은 36번째의 아스파라진(asparagine)부터 49번째에 위치한 글루타민(Glutamine)까지이며, 이 부위의 아미노기 말단(N-terminal)과 카르복실기 말단(C-terminal)의 이중염기쌍(double dibasic amino acids)은 내포된 단백질인 스펙신(Asn³⁶-Gln⁴⁹)이 기능적인 역할을 수행할 수 있도록 세포 내의 전효소분해단백질(protein convertase)에 의해 절단되게 하는 신호로서 존재한다. 또한 절단된 스펙신의 카르복실기 말단의 글라이신(Glycine)은 펩타이드글라이신-알파-하이드록시화 모노옥시제나제(peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase, PHM)에 의한 촉매화(catalyzed) 작용에 의해 제거되고 아미드화(amidation)가 이루어짐으로써 결과적으로 총 14개의 아미노산으로 구성된 성숙된 구조를 취하게 된다.

[0004] 이러한 스펙신의 mRNA 및 단백질의 발현은 대뇌피질(cortex), 해마(hippocampal field), 시상하부(hypothalamus), 시개(optic tectum), 뇌교(pons)를 포함하는 중추신경계뿐만 아니라, 망막(retina), 식도(esophagus), 위(stomach), 신장(kidney), 부신(adrenal gland)을 포함하는 말초조직에서도 다량 관찰되었다. 이러한 발현 양상은 본 펩타이드가 다양한 생리적 기능을 담당할 것을 시사한다. 실제로 흰쥐의 위장을 체외에 이식한 후(explant) 합성한 스펙신을 처리하였을 때, 위장근이 수축되는 효과를 관찰하였고, 손상된 부신의 피질부위에서는 스펙신의 처리로 피질세포들의 증식이 촉진되어 손상된 부신의 회복을 빠르게 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 최근의 연구에서 뇌실(ventricle) 혹은 정맥(intravenous)을 통한 스펙신의 주입은 흰쥐의

심박수와 배뇨의 빈도 감소를 야기하였고, 평균 혈압의 증가 및 배뇨를 통한 체내 염의 분비를 촉진함과 동시에 통증의 완화 효과를 나타내었다. 뿐만 아니라, 금붕어 암컷(female goldfish)의 복강을 통해 주입된 스펙신은 혈중 황체형성호르몬(luteinizing hormone)을 감소시키는 효과를 보였고, 또 다른 연구에서 금붕어 수컷(male goldfish)의 뇌실 및 복강을 통해 주입된 스펙신은 식욕증진성 신경펩타이드(orexigenic neuropeptides)들인 NPY(neuropeptide Y), AgRP(agouti-related peptide), 그리고 apelin의 mRNA의 발현을 억제하나, 식욕감소성 신경펩타이드(anorexigenic neuropeptide)들인 MCH(melanin-concentrating hormone), POMC(pro-opiomelanocortin), CCK(cholecystokinin), 그리고 CART(cocaine- and amphetamine-regulated transcript)의 mRNA의 발현을 증가시킴으로써 식욕을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 과거의 선행연구에서 극복하지 못했던 한계는 스펙신과 직접적으로 상호작용하여 세포 내로 신호전달을 유도하는 세포막 수용체가 동정 되지 못했다는 것이었다. 예컨대, 리간드의 결합에도 이에 대한 수용체가 존재할 경우 기본활성(basal activity)이 존재하므로 명확한 생리학적 기능을 정의하는데 난해함이 있다는 것은 잘 알려져 있다.

[0005]

이에 본 발명자들은 각 종들 간의 유전체 상에서 스펙신의 유전자 위치를 추적하는 방법, 진화적 관점에서 본 유전자의 출현시점 및 과거 원시 유전체에 대한 분석, 그리고 스펙신을 구성하고 있는 아미노산 서열에 대한 분석을 하고, 수용체에 조점을 두어 현재까지 리간드들이 밝혀지지 않은 고아 G 단백질-연결 수용체(orphan G protein-coupled receptor)들을 대상으로 스펙신-특이적인 수용체를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

(비특허문헌 0001) Mirabeau et al. Genome Res., 17:320-327 (2007)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 목적은 스펙신이 갈라닌 수용체 3형의 특이적인 리간드임을 최초로 밝히고, 이를 갈라닌 수용체 3형의 기능 조절제 스크리닝에 사용하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008]

상기 목적을 달성하기 위하여, 검출 가능하게 표지된 스펙신(spexin)과 갈라닌 수용체 3형을 후보물질과 반응시키는 단계; 및 반응물의 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하는 갈라닌 수용체 3형의 기능 조절제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0009]

또한, 본 발명은 검출 가능하게 표지된 스펙신(spexin) 및 갈라닌 수용체 3형을 포함하는 갈라닌 수용체 3형의 기능 조절제 스크리닝용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010]

본 발명은 갈라닌 수용체 3형의 새로운 리간드로서 스펙신을 규명하고, 갈라닌 수용체 3형이 발현되는 뇌 조직 특이적인 스펙신 결합 위치를 확인함으로써 갈라닌 수용체 3형이 담당하는 체내의 여러 가지 생리적 기능, 예컨대 통증(pain), 발작(seizure), 학습과 기억(learning and memory), 불안(anxiety)등의 감정조절(mood disorder), 그리고 섭식(feeding) 및 체중조절(body weight control)등에서 관여할 가능성을 시사한다. 따라서, 생체내의 스펙신-갈라닌 수용체 3형의 시스템 결여로 유발되는 장애 및 질병을 진단할 수 있는 진단용 조성물의 개발이 가능하다. 또한 이의 치료를 위해, 스펙신의 펩타이드 및 염기서열을 응용한 약물체제의 개발을 통해 신약성분의 소재로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011]

도 1은 갈라닌 수용체의 리간드인 갈라닌, 갈라닌-유사 펩타이드 및 스펙신의 아미노산 서열을 도식화한 것이다.

도 2는 인간에서 발현되는 갈라닌 수용체 1형, 2형, 및 3형의 아미노산 서열을 도식화한 것이다.

도 3은 125 I 동위원소가 표지된 갈라닌 및 스펙신의 인간형 갈라닌 수용체에 대한 결합 및 그 강도를 나타낸 것이다.

도 4는 갈라닌 수용체 아류형에 의해 야기되는 세포 내 신호전달기작 및 세포활성평가시스템으로 본 발명에서 활용된 Serum-Responsive Element-루시페레이스(SRE-Luciferase)의 발현 기작을 도식화한 것이다.

도 5는 포유동물에서 관찰되는 갈라닌 아류형, 1형, 2형 및 3형에 대한 스펙신의 루시페레이스의 활성을 평가한 결과이다.

도 6은 제노푸스 및 제브라피스의 갈라닌 아류형, 1형, 2형, 및 3형에 대한 스펙신의 루시페레이스의 활성을 평가한 결과이다.

도 7은 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)가 표지된 스펙신을 생쥐의 뇌로 주입한 후 면역조직화화법을 통해 결합 위치를 동정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)가 표지된 스펙신을 생쥐의 뇌로 주입한 후 면역조직화화법을 통해 갈라닌 수용체 2형 및 3형이 발현하는 세포에서만 특이적으로 내재화되어 있음을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

본 발명자들은 125 I가 표지된 스펙신과 갈라닌을 이용한 수용체 결합력 분석 실험, 루시페레이스 리포터 유전자(SRE-luciferase)를 이용한 갈라닌 수용체의 활성도 측정, 및 생쥐의 뇌 조직을 이용한 면역조직화화법을 기반으로 하여 스펙신이 갈라닌 수용체 3형의 내재적 작용제임을 다각도에서 검증하였다.

[0013]

갈라닌 수용체의 내재적 작용제인 갈라닌은 인간에서 30개, 설치류에서 29개로 구성된 기능적인 펩타이드로서 인간에서 발현되는 갈라닌은 설치류 혹은 발굽포유동물에서 발현되는 갈라닌과는 달리 카르복실기 말단에 알파-아미드기가 없는 대신 세린 잔기 하나가 확장된 구조를 갖는 것이 특징이다. 이외에도 현재까지 알려진 갈라닌 수용체의 내재적인 리간드로 갈라닌과 같은 전구체에서 절단되는 다른 단백질 형태인 갈라닌 메시지-연관 펩타이드(galanin message-associated peptide, GMAP), 이와는 다른 유전자에서 발현되는 갈라닌-유사 펩타이드(galanin-like peptide, GALP), 그리고 갈라닌-유사 펩타이드를 암호화하는 유전자로부터 mRNA로의 전사과정 중 선택적 스플라이싱(alternative splicing)의 결과로 발현되는 알라린(alarin)이 있다. 현재까지 척추동물에서 관찰되는 갈라닌 수용체 아류형은 총 5형(1형, 1-b형, 2형, 2-b형, 3형)으로, 상술한 리간드들은 갈라닌 수용체 아류형에 대해 각기 다른 결합력을 보인다.

[0014]

상기 갈라닌 수용체 3형은 폐, 신장의 말초조직에서와 해마, 시상하부, 편도의 뇌에서 다량 발현되며 상대적으로 1형과 2형에 비해 넓은 영역에서 관찰되는 것으로 보고되어 있고, 갈라닌 수용체 3형의 생리적 기능은 1형 및 2형에 비해 상대적으로 연구가 미미하나, 흰쥐의 뇌실에 주입된 3형 특이적인 역제제(antagonist)인 SNAP 37889, SNAP 398229의 효과는 쥐들의 사회성(social interaction)과 수영운동(swimming test)을 증진시킴으로써 1형과 2형의 수용체의 기능과 달리 정상적인 상황에서 불안증진 효과 및 우울증 유발에 기여하는 것으로 관찰되었다.

[0015]

본 발명에서, 스펙신은 갈라닌 수용체 3형에 대해 강한 결합력을 나타냈고, 갈라닌 수용체 3형이 발현되는 뇌의 전반적인 구역에서 FITC-스펙신이 관찰되었으며, 대표적으로는 M1(primary motor cortex), M2(secondary motor cortex), S1(primary somatosensory cortex), GI(granular insular cortex), Pir(piriform cortex) 등의 피질 영역, CA1(field CA1 of hippocampus), CA2(field CA2 of hippocampus) 등의 해마영역, 치아 랑(dentate gyrus), 그리고 다양한 다른 시상하부 구역인 시각교차위핵(suprachiasmatic nucleus, SCN), 뇌실결핵(paraventricular nucleus, PVN), 시상하부의측핵(lateral hypothalamic area, LH), 정중용기(median eminence, ME), 궁상핵(arcuate hypothalamic nucleus, ARC), 배쪽안쪽시상하부핵(ventromedial hypothalamic nucleus, VMH), 등쪽안쪽시상하부핵(dorsomedial hypothalamic nucleus, DMH)등이 있다. 위의 결과는 기존 문헌들에서 보고된 갈라닌 수용체 3형의 발현 위치와 부합함을 보임과 동시에, 뇌 조직-특이적인 스펙신의 결합위

치를 증명하였다.

- [0016] 따라서, 본 발명에서, 갈라닌 수용체 3형의 리간드로 밝혀진 스펙신은 척추동물의 섭식, 배움 및 기억, 간질 및 발작, 통증, 불안 및 감정조절에 있어서 갈라닌 수용체 3형과 더불어 직접적으로 연관될 것으로 예상된다.
- [0017] 본 발명은 갈라닌 수용체 3형의 리간드로 밝혀진 스펙신을 갈라닌 수용체 3형의 기능 조절제 스크리닝에 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 검출 가능하게 표지된 스펙신(spexin)과 갈라닌 수용체 3형을 후보물질과 반응시키는 단계; 및 반응물의 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하는 갈라닌 수용체 3형의 기능 조절제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 검출 가능하게 표지된 스펙신(spexin) 및 갈라닌 수용체 3형을 포함하는 갈라닌 수용체 3형의 기능 조절제 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 방법은 갈라닌 수용체 3형(이하, 'GALR3'라 함)의 기능 조절제로 작용제(agonist), 길항제(antagonist) 또는 역작용제(inverse agonist)를 스크리닝하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 GALR3의 기능 조절제를 스크리닝하는데 사용되는 스펙신은 인간, 생쥐, 흰쥐, 닭, 제브라다니오, 개구리, 큰가시고기, 제노푸스, 제브라피시 등의 척추동물에서 기원하는 공지된 서열을 갖는 단백질로, 예로써, SEQ ID NO.: 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 척추동물의 스펙신 1형(예컨대, 인간 유래의 스펙신)을 사용할 수 있다. 또는 SEQ ID NO.: 3에 기재된 아미노산 서열을 갖는 척추동물의 스펙신 2형(예컨대, 제브라피시 유래의 스펙신)을 사용할 수 있다. 이에 특별히 제한하지는 않으며, 본 명세서에서 명시하지 않은 여타의 척추동물들에서 관찰되는 스펙신 상동체(ortholog) 및 아류형(paralogs)들의 단백질 전장 또는 동등한 기능적 등가물의 단편을 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 SEQ ID NO.: 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 인간 스펙신 1형은 카르복실기 말단의 글리신(Gly)이 세포 내에서 번역이후 공정과정(posttranslational modification) 동안 제거되고 아미드화가 되어 최종적으로는 Asn-Trp-Thr-Pro-Gln-Ala-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-Gln-NH₂가 된다. 흰쥐에서 관찰되는 스펙신은 전술한 Gly 다음에 히스티딘(His)이 하나 더 확장된 구조를 갖는다(SEQ ID NO.: 2).
- [0023] 또한, SEQ ID NO.: 3에 기재된 아미노산 서열을 갖는 어류의 대표종인 제브라피시 유래의 스펙신 2형은 전술한 바와 같이 카르복실기 말단의 글리신(Gly)이 아미드화 되어 최종적으로 Asn-Trp-Gly-Pro-Gln-Ser-Met-Leu-Tyr-Leu-Lys-Gly-Lys-His-NH₂가 된다.
- [0024] 상기 스펙신 1형과 2형의 아미노산 서열들은 매우 높은 상동성을 보이고 있다. 예컨대, 스펙신 1형에서 3번째에 위치한 아미노산 [Thr³], 6번째에 위치한 아미노산 [Ala⁶], 13번째에 위치한 아미노산 [Ala¹³]을 제외한 잔여 아미노산의 상동성 및 전체 길이는 동일하다.
- [0025] 본 발명의 스크리닝 방법에 사용되는 스펙신은 상술한 공지의 서열로부터 당업자에 공지된 유전공학적인 방법 또는 펩타이드 합성법으로 제조할 수 있다. 천연형의 스펙신 단백질을 유전자 재조합 방법에 의하여 제조하는 경우 대장균(*E. coli*)이나 곤충 세포를 이용하는 것보다 포유동물 세포를 이용하는 경우가 단백질의 활성도나 용해성 측면에서 천연형의 것과 유사할 것으로 여겨진다. 상기 재조합 스펙신 단백질은 통상의 컬럼 크로마토그래피 방법 등을 이용하여 분리할 수 있다. 또한 단백질의 정제 정도는 SDS-PAGE 등으로 확인할 수 있다.
- [0026] 상기 스펙신을 표지하는 물질로, 방사성동위원소, 형광물질, 형광소광제, 효소, 친화성 태그 또는 에피토프 태그 등을 사용할 수 있다. 상기 친화성 태그(affinity tag)는 표지된 분자에 대해 그 표지에 결합하는 시약에 의해 특이적으로 결합되는 능력을 부여하는 목적의 분자에 결합한 표지(예를 들면, 스펙신)을 의미한다. 상기 에피토프 태그는 항체에 대한 에피토프, 비오틴, 6×His 또는 GST를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 친화성 태그는 표지종의 정제 및 검출에 이용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 GALR3는 GALR3을 세포막 표면에 제시하거나 포함하는 COS-7 세포, CHO 세포, U2OS 세포, LM(TK-) 세포, NIH-3T3 세포, HEK 세포, K-562 세포 또는 1321 N1 성상세포, 또는 GALR3 원형질막 용액 형태일 수 있다. 상기 GALR3를 포함하는 원형질막 용액은 상업적으로 구입하거나 유전공학적인 방법에 의해 제조하여 사용할 수 있다.
- [0028] 스펙신의 내재적 수용체인 GALR3은 인간, 제노푸스, 제브라피시 등에서 유래된 SEQ ID NO.: 4 내지 6으로 표시

되는 아미노산 서열 중 어느 하나를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0029] 본 명세서에서, '후보물질'은 GALR3와 결합력을 가지는 것으로 추정되는 천연으로부터 분리된 물질 또는 인공적으로 합성된 물질일 수 있다. 상기 후보물질은 그 기능에 따라 GALR3에 결합하여 그 작용을 활성화하는 경우 작용제(agonist)라 하고 그 작용을 억제하는 경우에는 길항제(antagonist) 또는 GALR3에 작용제로 결합하나 구성 성분 활성(constitutive activity)을 거꾸로 가게 하여 반대 효과를 나타내도록 하는 경우에는 역작용제(inverse agonist)라 한다. 예컨대, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체 또는 항원 결합 단편, 지질, 탄수화물, 핵산 또는 유기 저분자 등일 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서, '저분자'는 3000 달톤 미만, 바람직하게는 1500 달톤 미만, 더 바람직하게는 1000 달톤 미만, 가장 바람직하게는 600 달톤 미만의 분자량을 갖는 화합물을 의미한다. '유기 저분자'는 탄소를 포함한 저분자 화합물을 의미한다.
- [0031] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 검출 가능하게 표지된 스펙신과 GALR3은 이들의 결합이 허용되는 조건에서 후보물질과 접촉하게 된다. 상기 조건은, 온도, 염 농도, pH 및 단백질 농도의 조건 등 그 조건하에서 스펙신이 GALR3에 결합하는 조건을 의미한다. 정확한 결합 조건은, 예를 들면, 분석 조건이 살아있는 세포를 이용하는지, 세포의 원형질막만을 이용하거나 또는 수용체 단백질만을 이용하는지에 따라 다양하게 제어할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 스크리닝 방법은 GALR3과 검출 가능하게 표지된 스펙신의 강한 결합력을 이용한 것으로, 즉, GALR3에 검출 가능하게 표지된 스펙신이 결합하고, 경쟁물질(치환제)이 존재할 경우 스펙신이 이 경쟁물질로 치환되어 형광 변화가 일어나게 된다. 이러한 스펙신과 GALR3, 또는 후보물질과 GALR3의 결합성의 변화에 따른 반응물의 형광 변화는 표지 치환(label displacement), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer), 형광소광(fluorescence quenching) 또는 형광 편광(fluorescence polarization) 등의 방법을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0033] 예컨대, 형광 공명 에너지 전이 방법(FRET)은 형광 공여체(fluorescence donor)(D)의 발광 스펙트럼이 형광 수용체(fluorescence acceptor)(A)의 여기 스펙트럼과 중복되는 경우에, 서로 근접한(통상, <100 Å) D와 A의 사이에 일어나는 양자역학적 현상으로 스펙신과 GALR3 단백질을 공여체 및 수용체 형광체의 상보쌍으로 표지하고, 스펙신-GALR3의 결합에 의해 밀접하게 결합하고 있는 동안은 공여체 형광체의 여기에 의해 발광되는 형광이 폴리펩타이드가 결합하고 있지 않는 경우에 그 여기 파장에 반응해 발광된 형광과는 다른 파장을 가지며, 각 파장에서의 발광강도의 측정에 의해 비결합 폴리펩타이드에 대한 결합 폴리펩타이드의 정량화를 가능하게 한다.
- [0034] FRET의 변형법으로, 분자 상호작용을 모니터링 하기 위하여 형광소광을 사용한다. 상호작용하는 쌍의 한편의 분자를 형광체로 표지하고, 한편, 근접 상태가 되었을 경우에 형광체의 형광을 소광하는 분자로 표지할 수 있다. 여기에 수반하는 형광의 변화는, 형광체를 결합 한 분자:소광체 쌍의 결합의 변화를 나타낸다.
- [0035] 형광 편광 측정은, GALR3와 형광 표지된 스펙신과의 강한 결합력을 이용한 것이다. 즉, 상기 GALR3에 형광 표지된 스펙신이 결합하게 되면 분자량이 증가하게 되고 이로 인해 높은 형광편광도를 나타내게 된다. 그러나, 여기에 상기 스펙신과 경쟁하는 물질(치환제)을 함께 반응시키면 수용체에 결합된 형광 표지된 스펙신이 상기 경쟁물질로 치환되어 형광편광도가 감소하게 된다. 따라서, 본 발명은 GALR3와 결합하는 형광 표지된 스펙신이 후보물질에 의해 치환되는 정도를 측정하는 원리를 이용한 것으로서 수용체와 결합한 형광 표지된 추적자, 및 수용체와 결합하지 않은 추적자의 양에 따라 편광의 정도가 상이한 것을 정량화할 수 있다. 이 측정 방법에서 후보물질의 형광편광도가 이상성을 나타내는 경우에는 작용제로, 단상성을 나타내는 경우에는 길항제로 판정할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 스크리닝용 조성물은 키트 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따르는 유용한 키트는 예를 들면, 단리한 막 형태, GALR3를 발현하는 세포 또는 SPR 칩 등, 막- 또는 세포-결합 GALR3를 포함한다. 또한, 상기 키트는 GALR3 폴리펩타이드 또는 GALR3 폴리펩타이드를 발현하도록 형질전환한 세포, 및 스펙신 폴리펩타이드 또는 스펙신을 발현하도록 형질전환한 세포를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 GALR3 작용제의 GALR3-관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0038] GALR3-관련 질환 또는 장애는 통증(pain), 발작(seizure), 학습과 기억(learning and memory), 불안(anxiety)

등의 감정조절(mood disorder), 그리고 섭식(feeding) 및 체중조절(body weight control) 등일 수 있다.

[0039] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 GALR3 작용제의 스펙신-관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료를 위한 의학의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0040] 스펙신-관련 질환 또는 장애는 중추신경계 장애 및 말초신경계의 장애일 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1> 스펙신/갈라닌/갈라닌-유사 펩타이드 간의 상동성 조사

[0043] 본 발명자들은 Ensemble(<http://www.ensembl.org/index.html>)에서 제공하는 인간 유전체 및 제브라피시 유전체에서의 스펙신, 갈라닌, 갈라닌-유사 펩타이드를 암호화 하는 유전자 및 단백질 서열을 내려 받았다. 이들의 아미노산 서열 중, 세포 내에서 전사 및 번역 이후의 공정과정을 마친 기능적인 펩타이드들의 아미노산 서열을 정렬(alignment)하여 각 펩타이드들 간의 상동성 또는 유사성을 비교 분석하였다.

[0044] 도 1에서와 같이, 스펙신 1형과 2형은 높은 상동성을 보이며, 이들 스펙신 아류형 아미노산들은 대략적으로 갈라닌 및 갈라닌-유사 펩타이드의 아미노기 말단과 매우 유사한 서열들로 이루어져 있는 것을 확인할 수 있다. 놀랍게도 갈라닌 또는 갈라닌-유사 펩타이드의 일부 아미노산 서열을 변이시킨 후 갈라닌 수용체에 대한 결합을 실험한 과거의 연구들에서, 2번째 아미노산인 트립토판[Trp²], 3번째 아미노산인 트레오닌[Thr³], 그리고 9번째 아미노산인 티로신[Tyr⁹]의 변이는 공히 갈라닌 수용체를 활성 시키지 못하거나 그 효과가 매우 미미한 것으로 드러났다. 나아가 전술한 3가지의 아미노산 서열은 본 실험에서 스펙신의 아미노산 서열에서 매우 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수 있다. 뿐만 아니라, 갈라닌 및 갈라닌-유사 펩타이드의 아미노기 구역에 존재하는 아미노산들은 구조적으로 알파 나선구조를 취함으로써 수용체의 활성화에 매우 중대한 역할을 수행하는 것으로 알려졌다. 최근 핵자기공명분광학(Nuclear, magnetic resonance spectroscopy)을 이용한 스펙신의 구조 연구에서 알파 나선형 구조를 갖는 것으로 밝혀짐에 따라(네모 박스), 스펙신, 갈라닌 및 갈라닌-유사 펩타이드는 구조적으로 공히 갈라닌 수용체와 결합하여 활성화할 수 있는 구조로 되어 있다.

[0045] 한편, 이들의 결합 상대로서 G 단백질-연결 수용체 가족의 짧은 펩타이드성 수용체인 갈라닌 수용체의 아미노산 구조는 도 2에 도식화되어 있다. 갈라닌 수용체 아류형 간의 아미노산 서열은 상호 높은 상동성을 가지고 있으며, 특히 갈라닌 수용체 2형과 3형 간의 유사성이 1형보다 높은 것으로 드러났다(예컨대, 인간형 갈라닌 수용체 1형과 2형 사이, 42%; 2형과 3형 사이, 58%; 3형과 1형 사이, 38%). 이는 과거 연구의 상동성 조사와 일치하는 결과이며, 본 실험에서는 막관통단백질(transmembrane protein, TM)으로 추정되는 소수성(hydrophobic) 아미노산 잔기들을 Signal P 프로그램을 이용하여 분석하였다(TM I ~ TM VII).

[0046] <실시예 2> 갈라닌 수용체 1형, 2형 및 3형에 대한 스펙신 및 갈라닌의 결합력 분석 실험

[0047] 갈라닌과 스펙신 펩타이드에 chloride T 방법을 사용하여 125-요오드를 표지(Human ¹²⁵I-SPX1: NWTPQAMLY(¹²⁵I)LKGAQ-NH₂)한 후, 0.01M 아세트산과 0.1%의 소 혈청 유래의 알부민(BSA)이 코팅된 sephadex G-25와 sephadex G-10 컬럼을 이용하여 동위원소가 표지된 갈라닌과 스펙신을 각각 분리하였다.

[0048] 인간 배아 신장 세포(Human embryonic kidney 293T, HEK293T)를 배양하고 있는 12 웰-플레이트(5×10⁴/well)에 인간형 갈라닌 수용체 1형(GenBank accession no. NM_001480), 2형(NM_003857), 그리고 3형(NM_003614) 각각을 암호화 하는 유전자가 포함된 플라스미드를 Effectene 시약(Qiagen, Chatsworth, CA, USA)과 혼합(DNA, 300 ng/well; Effectene, 6μl)한 후, 처리하여 형질전환을 유도하였다. 3시간 후 배지는 10%의 소 혈청(BSA)이 포함된 DMEM 배지(Dulbecco's modification of Eagle's medium)로 교체하여 주었다. 형질전환이 실시된 지 만 48시간 후, 0.1%의 BSA와 다양한 농도의 갈라닌 또는 스펙신이 존재하는 배지에 125-요오드가 표지된 갈라닌(100,000 cpm, 도 3A와 B)과 스펙신(100,000 cpm, 도 3C)이 포함된 DMEM 배지를 1시간 처리하였다. 차가운 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 HEK293T 세포를 두 번 씻어낸 후, 1%의 SDS와 0.2M NaOH가 포함된

PBS 용액을 처리하였다. 10분 후 동위원소활성을 Wallac 1489 Wizard 3γ-counter(PerkinElmer Life Science)로 측정하였다.

[0049] 갈라닌 아류형 1형과 2형에서는 스펙신의 강한 결합이 관찰되지 않았으므로, 1형과 2형이 형질전환된 HEK293T 세포에서 ^{125}I -갈라닌을 이용하였으며, 3형의 갈라닌 수용체가 형질전환된 경우에는 ^{125}I -표지된 스펙신을 이용하였다.

[0050] 도 3에 나타난 바와 같이, 갈라닌의 갈라닌 수용체 1형에 대한 결합력은 65.16 ± 6.76 nM, 2형에 대한 결합력은 68.55 ± 11.21 nM, 그리고 3형에 대한 결합력은 881.05 ± 150.73 nM로 검증되었다. 한편 스펙신 1형의 갈라닌 수용체 1형에 대한 결합력은 관찰되지 않았으나, 2형에 대한 결합력은 1573.98 ± 250.83 nM, 3형에 대한 결합력은 23.77 ± 2.93 nM로 평가되었다. 스펙신 2형의 갈라닌 수용체 1형에 대한 결합력은 스펙신 1형의 갈라닌 수용체 1형에 대한 결합력과 마찬가지로 관찰되지 않았으나, 수용체 2형에 대한 결합력은 3169.57 ± 1187.13 nM, 그리고 3형에 대한 결합력은 37.84 ± 7.04 nM로 각각 밝혀졌다.

[0051] 이들의 결과에서 갈라닌 수용체 2형 및 3형이 스펙신의 리간드이며, 특히 3형에 대한 스펙신의 결합력이 2형보다 높은 것을 알 수 있다.

[0052] <실시예 3> 스펙신에 의한 갈라닌 수용체 2형 및 3형의 세포 내 활성 조사

[0053] 기존의 문헌들에 따르면 G 단백질-연결 수용체들은 작용제와 결합한 후, 세포 내로 신호전달을 야기하기 위해 기존의 G 단백질의 알파 서브유닛(subunit)에 연결된 GDP(guanosine diphosphate)형을 GTP(guanosine triphosphate)형으로 치환하는 것으로 알려져 있다. G 단백질은 알파(α), 베타(β), 및 감마(γ)의 세 가지 서브유닛(subunit)으로 이루어진 이중 삼중체(hetero trimer)이다. 이중 세포 내로의 신호전달에 있어서 가장 중요한 신호는 알파 서브유닛에서 발생한다. 예컨대, 알파 서브유닛이 s형인 경우($G_{\alpha s}$)는 세포 내 효소의 하나인 아데닐 사이클레이즈(adenyl cyclase)를 활성화함으로써 ATP로부터 대표적인 이차전달자(second messenger)인 cyclic AMP(cAMP)를 생산하며, protein kinase A(PKA)를 활성화 시킨다. 반면, i형인 경우($G_{\alpha i}$)는 전술한 아데닐 사이클레이즈의 활성을 억제하는 신호를 보낸다. 또 다른 알파 서브유닛인 q/11형의 경우는 세포 내에서 칼슘의 양을 증가시키거나, protein kinase C(PKC)를 활성화한다. 이와 같이, G 단백질-연결 수용체와 G 단백질 간의 결합은 수용체 유형에 의존적인 고유한 특성이다. 갈라닌 수용체 아류형들의 G 단백질 상대는 1형, 2형, 그리고 3형에 각각 $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q/11}$, 그리고 $G_{\alpha i}$ 로 알려져 있다.

[0054] 그러므로, 갈라닌 수용체 아류형의 활성을 모두 포괄할 수 있는 시스템을 구축하기 위해, $G_{\alpha q}$ 를 안정적으로 발현하는 HEK293- $G_{\alpha q}$ 세포를 이용하여 스펙신 및 갈라닌의 활성을 관찰하였다. 왜냐하면, $G_{\alpha q}$ 는 $G_{\alpha q}$ 서브유닛의 카르복실기 말단을 이에 상응하는 $G_{\alpha i}$ 의 아미노산 3개로 치환한 돌연변이로서 $G_{\alpha i}$ 의 신호를 $G_{\alpha q/11}$ 의 신호전달 경로로 전환할 수 있는 단백질이기 때문이다. 이와 같은 방식을 적용하여, 스펙신 또는 갈라닌으로 활성화된 갈라닌 수용체 아류형들은 결국 발광측정기를 통해 Serum Responsive Element(SRE) 프로모터의 조절로 발현하는 루시페레이즈(luc)와 이의 기질인 루시페린(luciferin)의 반응으로 초래되는 빛을 감지함으로써 수용체 아류형-특이적, 또는 작용제-특이적인 세포활성을 관찰할 수 있다(도 4).

[0055] HEK293- $G_{\alpha q}$ 세포를 48 웰-플레이트에 계대배양(2×10^4 cells/well)한 지 하루 후, 인간형(1형(NM_001480), 2형(NM_003857), 3형(NM_003614)), 제노푸스형(1a형(Ensembl ID: ENSXETG00000014693), 2a형(Ensembl ID: ENSXETG00000012621), 2b형(Ensembl ID: ENSXETG00000009147), 3형(Ensembl ID: ENSXETG00000006335)), 그리고 제브라피시형(1a형(Ensembl ID: ENSDARG00000005522), 1b형(Ensembl ID: ENSDARG000000079165), 2a형(Ensembl ID: ENSDARG000000020853), 2b형(Ensembl ID: ENSDARG000000044969)) 갈라닌 수용체를 각각 암호화하는 플라스미드 DNA와 SRE-luc 플라스미드 DNA를 1:1로 섞고{(100 ng+100ng)/well} Effectene 시약을 혼합(1.68μl/well)한 용액을 처리하였다. 한 시간 후, 10% FBS가 포함된 DMEM으로 교체하여 주었다. 3일째 되던 날 FBS가 없는 DMEM 배지로 교체해 주고, 이로부터 16시간 후 스펙신 또는 갈라닌을 다양한 농도로 처리하였다. 작용제들의 처리가 완료된 후 6시간 동안 37°C에서 추가 배양하였으며, 이 단계가 끝난 세포들은 PBS로 세척한 후 Lysis buffer(0.1% Triton X-100, 0.2 M Tris, pH8.0)로 20 분간 상온에서 용해되었다. 루시페레이즈의 활성은 루시페린 용액(0.5M MgCl_2 , 0.1M ATP, 0.05M D-luciferin, 1M KH_2PO_4 , pH7.8)이 자동적으로 투입되는 Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader(BioTek, Winooski, VT, USA)로 측정되었다.

[0056] 도 5에 나타난 바와 같이, 포유류 갈라닌 수용체 1형에 대한 스펙신의 수용체 활성은 나타나지 않았다. 또한 3

형의 갈라닌 수용체는 2형에 비해 스펙신에 대한 루시퍼레이즈 활성정도가 높게 나타났다. 특히 스펙신 1형의 경우 갈라닌 수용체 2형에 대한 반수영향농도(EC₅₀)는 161.06±47.64 nM를, 3형에 대한 반수영향농도는 626.61±82.42 nM를 보였지만, 스펙신 2형의 경우 2형에 대한 반수영향농도는 317.6±98.46 nM를, 3형에 대해서는 724.44±149.53 nM를 나타내었다. 한편 갈라닌의 경우는 수용체 1형에 대해 60.53±14.31 nM를, 2형에 대해 88.51±18.24 nM를, 그리고 3형에 대해 1383.57±316.72 nM가 측정되었다. 전반적으로 스펙신은 3형의 갈라닌 수용체에서 갈라닌에 비해 높은 활성을 보였다.

[0057] 한편, 비포유류의 대표적 예시로서 표본화된 제노푸스 및 제브라피시의 갈라닌 수용체 아류형들에 대한 스펙신과 갈라닌의 루시퍼레이즈 활성도는 도 6에 나열되어 있다. 흥미롭게도, 제노푸스 갈라닌 수용체 2-a형은 갈라닌에 대한 높은 활성도를 보였으나, 포유동물의 2형 수용체와는 다르게 스펙신에 대한 활성은 매우 미미하였으며, 3형의 경우는 역시 높은 활성을 보였다. 한편, 제노푸스 갈라닌 수용체 2-b형 및 3형은 갈라닌에 비해 스펙신에 대해 높은 활성을 나타냈다. 제브라피시의 갈라닌 수용체 아류형도 마찬가지로 1a 및 1b형에 대한 스펙신 1형 및 2형의 활성은 관찰되지 않았으나, 2a형에 대한 스펙신 1, 2형, 그리고 갈라닌은 비슷한 루시퍼레이즈 활성도를 보였다. 그러나 2b형에 대한 수용체 활성도는 스펙신에 의한 반응이 갈라닌에 의한 것보다 큰 것으로 조사되었다.

[0058] <실시예 4> 생쥐의 뇌에서 스펙신의 결합부위 동정

[0059] 6주령의 검은 수컷 생쥐(C57BL/6)는 대한바이오링크(<http://www.dhbiolink.com>)로부터 구입하였다. 구입한 생쥐는 사료와 물이 적절히 주어지고 20-24℃로 온도가 유지되며, 40-70%의 습도가 있는 쥐 우리(cage)에서 사육되었다. 또한 이 야생형 생쥐는 빛 개시가 8:00 am이고 빛 꺼짐이 8:00 pm인 12/12 Light/Dark cycle에서 훈련되었다. 모든 실험은 가장 적은 수의 생쥐를 사용하도록 설계되었으며 실험동물윤리에 따라 마취법을 실시하여 실험에 사용된 생쥐의 고통을 최소화하였고, 이는 고려대학교의 동물 관리 및 이용 위원회에 의해 증명되었다(Animal Care and Use Committee of the Korea University, KUIACUC-08).

[0060] 상기의 방법으로 2주간 관리된 8주령의 수컷 생쥐는 소듐 펜토바비탈(sodium pentobarbital)(50mg/kg, i.p.)로 마취된 후, 스테레오탁식(stereotaxic) 장치에서 26-게이지 카눌라를 우측 뇌실(ventricle)로 삽입하였다. 작은 나사 두 개를 이용하여 뇌의 두개골에 단단히 고정된 후 치과용 시멘트로 봉합되었다. 2 주간 회복기를 거친 생쥐에 FITC가 표지된 인간형 스펙신 1형(Human FITC-SPX1: NWTQAMLVLK(FITC)GAQ-NH₂)을 1M, 1μl의 농도와 양으로 해밀턴 주사기(Hamilton syringe)를 이용하여 분당 0.2μl의 속도로 주입하였다. 펄타이드가 주입된 지 여섯 시간 후, 생쥐는 우레탄 0.5 cc/100 g으로 복강 마취가 실시된 후, 차가운 PBS 용액 및 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 용액으로 관류(perfusion)되었다. 어둡힌 빛의 조건하에 두개골로부터 생쥐의 뇌를 얻은 후, 저온 유지 장치(cryostat)하에서 30 μM의 두께로 절편화(section) 되었고, 슬라이드 글라스에 붙여(mounting)졌다.

[0061] 도 7에 나타난 바와 같이, 형광 현미경을 통해 뇌의 전반적인 구역에서 FITC-스펙신을 내재화(internalization)한 세포들을 관찰할 수 있었으며 대표적으로는 M1(primary motor cortex), M2(secondary motor cortex), S1(primary somatosensory cortex), GI(granular insular cortex), Pir(piriform cortex) 등의 피질 영역, CA1(field CA1 of hippocampus), CA2(field CA2 of hippocampus) 등의 해마영역, 치아 랑(dentate gyrus), 그리고 다양한 다른 시상하부 구역인 시각교차위핵(suprachiasmatic nucleus, SCN), 뇌실결핵(paraventricular nucleus, PVN), 시상하부외측핵(lateral hypothalamic area, LH), 정중융기(median eminence, ME), 궁상핵(arcuate hypothalamic nucleus, ARC), 배쪽안쪽시상하부핵(ventromedial hypothalamic nucleus, VMH), 등쪽안쪽시상하부핵(dorsomedial hypothalamic nucleus, DMH)등이 있다. 위의 결과는 기존 문헌들에서 보고된 갈라닌 수용체 2형 및 3형의 발현 위치와 부합함을 보임과 동시에, 뇌 조직-특이적인 스펙신의 결합위치를 증명하는 것이다.

[0062] <실시예 5> 생쥐의 뇌에서 스펙신과 갈라닌 수용체 2형 및 3형 간의 동일 위치 검증

[0063] 상기의 방법으로 준비된 야생형 생쥐의 뇌 조직(FITC가 표지된 스펙신 1형을 뇌실로 주입한 표본)에서 갈라닌 수용체 2형 및 3형 특이적인 항체를 이용한 면역조직화학을 수행하였다.

[0064] 보다 구체적으로 설명하면, 보관된 생쥐의 뇌 조직 절편이 담겨 있는 슬라이드 글라스 각각을 PBS 용액에서 20

분 동안 씻어내었다. 3% 소혈청 유래의 알부민이 포함된 PBST 용액(10% TritonX-100이 PBS에 포함된 용액)으로 1시간 블럭킹 하였다. 결과적으로 보여질 형광이미지에서 주변의 비특이적 항원-항체 반응을 지양하고, 스펙신 특이적 발현부위를 좀 더 정확히 구분하기 위하여 스펙신 항체와 용액의 비율이 적절히 조절되었다. 예컨대, 항-갈라닌 수용체 2형에 대한 항체(토끼 기원, Alomone Labs)는 1:200으로, 항-갈라닌 수용체 3형에 대한 항체(토끼 기원, Sigma-Aldrich)는 1:1,000으로 블럭킹 용액과 혼합하여 사용하였다. 각각의 수용체에 대한 항체와 항원의 반응은 4℃에서 하룻밤동안 실시하였다. 1차 항체-항원반응이 끝난 후 PBS 용액으로 10분간 세 차례씩 뇌 조직 절편을 씻어낸 후 2차 항체로서 Cy3(Cyanine Dyes 3)가 표지된 Goat-anti rabbit IgG secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR)를 1:500의 비율로 사용하였다. 2차 항체-항원반응이 끝난 후 PBS 용액으로 10분간 세 차례에 걸쳐 뇌 조직절편을 씻어낸 후, 상온에서 약 5분간 건조시켰다. crystal/mount 용액(Biomedal, USA)을 조직 위에 도포하여 커버 글라스를 덮음으로써 표본을 준비하였다. 모든 실험은 빛의 밝기가 약한 미세조명 속에서 진행되었다. 준비된 표본의 형광 이미지는 공초점 현미경{confocal laser scanning microscope (CLSM, Carl-Zeiss), LSM 710 NLO Exciter}을 이용해 얻었다.

[0065]

도 8에 나타난 바와 같이, FITC가 표지된 스펙신은 갈라닌 수용체 2형 또는 3형이 발현하는 세포에서만 특이적으로 관찰되었다. 특히 해마, 궁상핵, 배쪽안쪽시상하부핵, 그리고 CA1 부위의 해마구역에서 그 형광신호의 강도가 강하게 나타났다.

[0066]

도 3 및 5-7에 나타난 바와 같이, 본 결과는 스펙신이 갈라닌 수용체 3형에 직접적인 결합상대임을 다각적인 실험방법을 통해 여실히 보여주는 결과이다.

도면

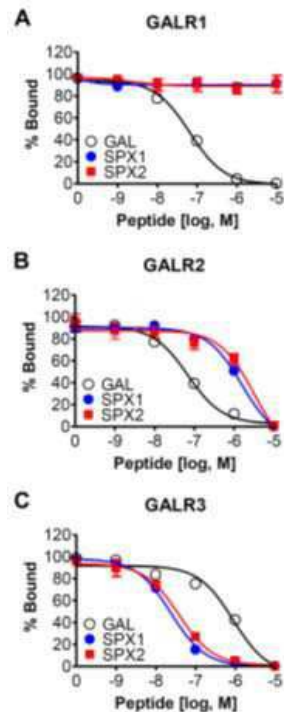
도면1

Hu_SPX1 (14 a.a.)	NWTFQAMLYLKGAG-NH ₂
Zf_SPX2 (16 a.a.)	NWGPQSMYLYLKGKH-NH ₂
Hu_GAL (30 a.a.)	SWTLNSAGYLLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Hu_GALP (60 a.a.)	APAHRGRGSWTLNSAGYLLGPVLHLPQMGDQDGKRETALEILDWKAIDGLPYSHPPQPS

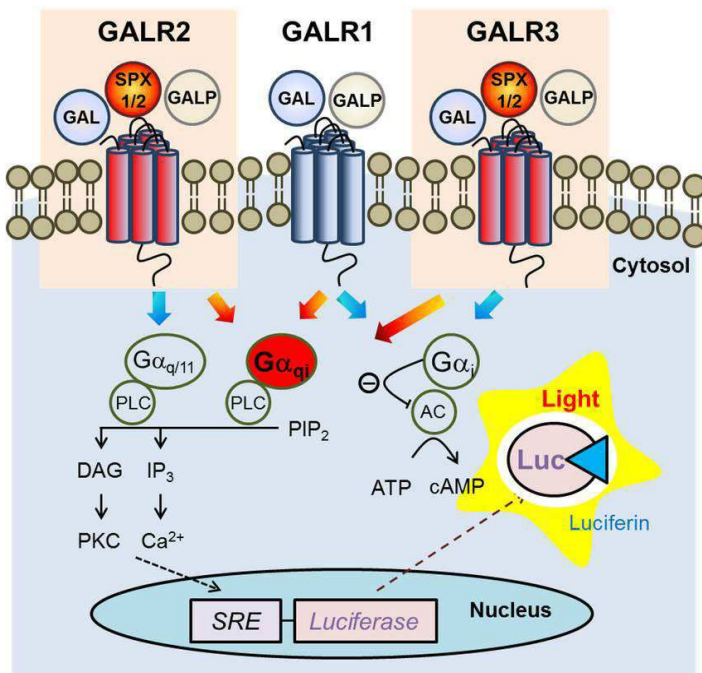
도면2

		TM I	
Hu_GALR1	MELAVGNLSEGNA-SWPEPPAPEPGPLFGIGVENFVTLVVFGLIFALGVLGN	51	
Hu_GALR2	MNVS-GCPGAGNA-S-----QAGGGGWHPPEAVIVPLLFLIFLVGTVGN	43	
Hu_GALR3	MADAQ-NISLDSPGS-----VGAVAVPVVFALIFLLGTVGN	35	
		TM II	
Hu_GALR1	SLVITVLARSKPG---KPRSTTNLFILNLSIADLAYLLFCIPFQATVYALPT	100	
Hu_GALR2	TLVLAVLLRGG-----QAVSTTNLFILNLGVADLCFILCCVPFQATIIYTLDG	90	
Hu_GALR3	GLVLAVLLQPGPSAWQEPGSTTDLFILNLAVADLCFILCCVPFQATIIYTLDA	87	
		TM III	
Hu_GALR1	WVLGAFICKFIHYFFTVSMLVSIPTLAAMSVDRYVAIVHSRRSSSLRVSRNA	152	
Hu_GALR2	WVFGSLICKAVHFLIFLTMHASSFTLAAVSLDRYLAIKPLHSRELRTPRNA	142	
Hu_GALR3	WLFGLVCKAVHLLIYLTMYASSFTLAAVSVDRYLAVRHPLRSRALRTPRNA	139	
		TM IV	
Hu_GALR1	LLGVGCIWALSITAMASF-VAYHQGLFHPRASNTFCWEQWPDFRHKKAYVVC	203	
Hu_GALR2	LAAIGLIWGLSLLFSGPYLSYYR---QSQLANLTVCHPAWSAPR-RRAMDIC	190	
Hu_GALR3	RAAVGLVWLLAALFSAPYLSYYG---TVRYGALELCVPAWEDAR-RRALDVA	187	
		TM V	
Hu_GALR1	TFVFGYLLPLLICFCYAKVLNHLHKKLNMS---KKSEASKKKTAQTVLV	251	
Hu_GALR2	TFVESYLLPVLVLGLTYARTLRYLWRVAVDEV--AAGSGARRAKRKVTRMILI	240	
Hu_GALR3	TFAAGYLLPVAVVSLAYGRTLRLFWAAVGFAGAAAAEARRRATGRAGRAMLA	239	
		TM VI	TM VII
Hu_GALR1	VVVVFGISWLEPHH--IIHLWAEFGVF-PLTPASFRLFRITAHCLAYSNSSVNP	300	
Hu_GALR2	VAALFCLCWMPPHHALILCVW--FGQF-PLTRATYALRILSHLVSYANSCVNP	289	
Hu_GALR3	VAALYALCWGEPHHALILCFWYGRFAFSPATYACRL---ASHCLAYANSCLNP	288	
Hu_GALR1	IIYAFLESENFRKAYKQVFKCHIRKDSHLSDTKESKSRIDTPP-----STN	345	
Hu_GALR2	IVYALVSKHFRKGFRTICAGLLGRAPGRASGRVCAAARGTHSGSTLERESSD	341	
Hu_GALR3	LVYALASRHRFRARFRLWP--CGRRRRHRARRALRRVRPASSG-----PPG	332	
Hu_GALR1	CTHV-----	349	
Hu_GALR2	LLHMSEAAGALRPCPGASQPCILEPCFGESWQGPAGDSILTVDVA	387	
Hu_GALR3	CPGDARPSGRLLAGGGQGP----EPREGPVHVGGEAARGPE-----	368	

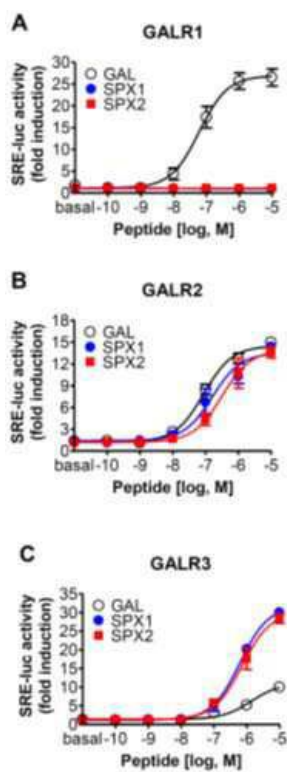
도면3



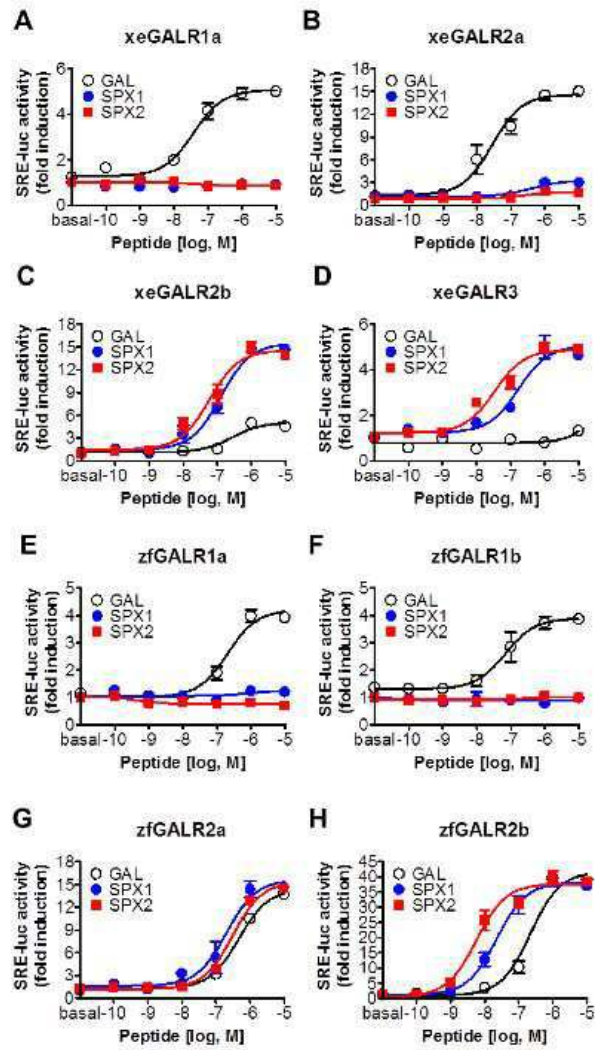
도면4



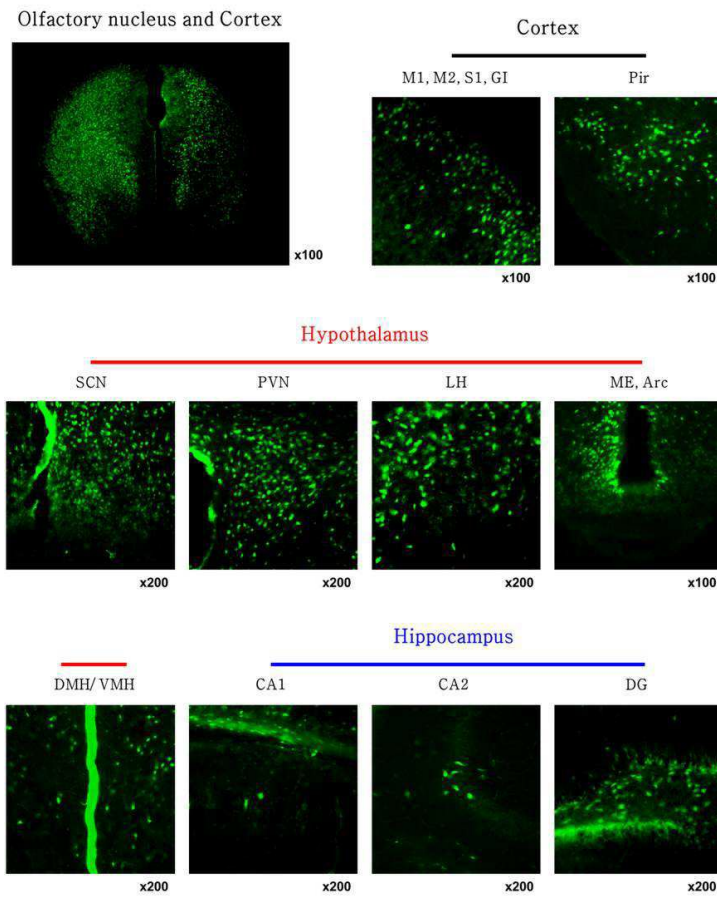
도면5



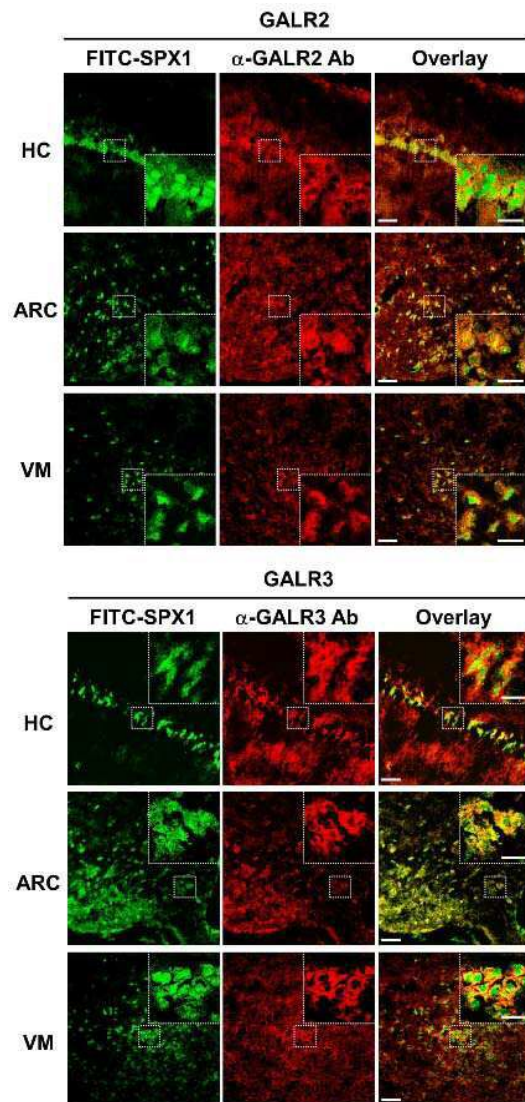
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Use of spexin as ligand of galanin receptor type 3
- <130> P131572
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Human SPX1
- <400> 1

Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala Gln

1 5 10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Rat SPX

<400> 2

Asn Trp Thr Pro Gln Ala Met Leu Tyr Leu Lys Gly Ala Gln His

1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Zebrafish SPX2

<400> 3

Asn Trp Gly Pro Gln Ser Met Leu Tyr Leu Lys Gly Lys His

1 5 10

<210> 4

<211> 368

<212> PRT

<213> Human Galanin receptor 3

<400> 4

Met Ala Asp Ala Gln Asn Ile Ser Leu Asp Ser Pro Gly Ser Val Gly

1 5 10 15

Ala Val Ala Val Pro Val Val Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Gly Thr

20 25 30

Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Gln Pro Gly Pro Ser

35 40 45

Ala Trp Gln Glu Pro Gly Ser Thr Thr Asp Leu Phe Ile Leu Asn Leu

50 55 60

Ala Val Ala Asp Leu Cys Phe Ile Leu Cys Cys Val Pro Phe Gln Ala

65 70 75 80

Thr Ile Tyr Thr Leu Asp Ala Trp Leu Phe Gly Ala Leu Val Cys Lys

85	90	95	
Ala Val His Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Met Tyr Ala Ser Ser Phe Thr			
100	105	110	
Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Arg His Pro Leu			
115	120	125	
Arg Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Arg Asn Ala Arg Ala Ala Val Gly			
130	135	140	
Leu Val Trp Leu Leu Ala Ala Leu Phe Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Tyr			
145	150	155	160
Tyr Gly Thr Val Arg Tyr Gly Ala Leu Glu Leu Cys Val Pro Ala Trp			
165	170	175	
Glu Asp Ala Arg Arg Arg Ala Leu Asp Val Ala Thr Phe Ala Ala Gly			
180	185	190	
Tyr Leu Leu Pro Val Ala Val Val Ser Leu Ala Tyr Gly Arg Thr Leu			
195	200	205	
Arg Phe Leu Trp Ala Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Ala Ala Ala Glu			
210	215	220	
Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gly Arg Ala Gly Arg Ala Met Leu Ala Val			
225	230	235	240
Ala Ala Leu Tyr Ala Leu Cys Trp Gly Pro His His Ala Leu Ile Leu			
245	250	255	
Cys Phe Trp Tyr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Pro Ala Thr Tyr Ala Cys			
260	265	270	
Arg Leu Ala Ser His Cys Leu Ala Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro			
275	280	285	
Leu Val Tyr Ala Leu Ala Ser Arg His Phe Arg Ala Arg Phe Arg Arg			
290	295	300	
Leu Trp Pro Cys Gly Arg Arg Arg His Arg Ala Arg Arg Ala Leu			
305	310	315	320
Arg Arg Val Arg Pro Ala Ser Ser Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Asp			
325	330	335	

Ala Arg Pro Ser Gly Arg Leu Leu Ala Gly Gly Gly Gln Gly Pro Glu
340 345 350

Pro Arg Glu Gly Pro Val His Gly Gly Glu Ala Ala Arg Gly Pro Glu
355 360 365

<210> 5

<211> 384

<212> PRT

<213> Xenopus Galanin receptor 3

<400> 5

Met Ser Gln Ala Trp Asn Ser Ser Val Ser Ser Glu Leu Pro Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ile Ile Val Pro Val Val Phe Ser Leu Ile Phe Ala Leu Gly Thr
20 25 30

Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Arg Asn Gly Gln Thr
35 40 45

Lys Tyr Asn Thr Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Gly Val Ala Asp
50 55 60

Leu Cys Phe Ile Leu Leu Cys Val Pro Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Thr

65 70 75 80

Leu Asp Gly Trp Leu Phe Gly Ala Phe Leu Cys Lys Ala Val His Phe
85 90 95

Ser Ile Tyr Leu Ser Met Tyr Ala Ser Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val
100 105 110

Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Arg Tyr Pro Leu Lys Ser Arg Asp
115 120 125

Leu Arg Thr Ser Arg Asn Ala Leu Ala Ala Ile Gly Val Ile Trp Ala
130 135 140

Leu Ser Ile Leu Phe Ala Gly Pro Tyr Leu Ser Tyr Tyr His Ile Ile
145 150 155 160

Leu Tyr Asn Gln Val Pro Ile Cys Ile Pro Asn Trp Glu Asp Arg Arg
165 170 175

Arg Lys Ile Met Asp Val Ser Thr Phe Val Phe Gly Tyr Leu Leu Pro

180 185 190
Val Leu Ile Leu Gly Leu Ser Tyr Ala Arg Thr Ile Cys Phe Leu Trp

195 200 205
Thr Ser Val Asp Pro Val Lys Thr Ala Ser Glu Ser Arg Lys Ala Lys

210 215 220
His Lys Val Thr Lys Met Ile Ile Ile Val Ala Val Leu Phe Cys Ile

225 230 235 240
Cys Trp Leu Pro His His Leu Val Ile Leu Cys Phe Trp Phe Gly His

245 250 255
Phe Pro Phe Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Phe Arg Leu Val Ser His Cys

260 265 270
Met Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Val Tyr Ala Leu Ile

275 280 285

Ser Lys His Phe Arg Lys Arg Phe Lys Gln Val Phe Thr Cys Leu Leu
290 295 300

Thr Gln Lys Arg Ala Arg Asn Lys Val His Ala Val Gln Ala Ala Asn
305 310 315 320

Thr Ile Ala Gly Phe Tyr Ala Gly His Thr Glu Val Thr Gln Val Gln
325 330 335

Glu Asp Ser Gly Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Glu Glu Gly Ala Asp
340 345 350

Ser Gly Ser Pro Glu Asp Ser Val Asn Gln Arg Met Glu Gly Gly Ser

355 360 365
Trp Cys Thr Arg Leu Pro Lys Ser Val Gly Phe Val Thr Gln Thr Ala

370 375 380

<210> 6

<211> 378

<212> PRT

<213> Zebrafish Galanin receptor 2b

<400> 6

Met Ser Asp His Glu Asp Leu Asn Lys Ala Met Gly His Trp Asn Ala

1 5 10 15

Ser Glu Ser Tyr Gln Leu Asn Pro Ala Ser Val Ile Val Ser Val Val
20 25 30

Phe Ser Leu Ile Phe Leu Leu Gly Thr Ile Gly Asn Ser Leu Val Leu
35 40 45

Ala Val Leu Leu Arg Ser Gly Gln Val Gly Tyr Asn Thr Thr Asn Leu
50 55 60

Phe Ile Leu Asn Leu Ser Val Ala Asp Phe Phe Phe Ile Ile Phe Cys
65 70 75 80

Val Pro Phe Gln Ala Thr Ile Tyr Ser Leu Glu Gly Trp Val Phe Gly
85 90 95

Ser Phe Met Cys Lys Val Val His Phe Phe Ile Asn Leu Thr Met Tyr

100 105 110

Ala Ser Ser Phe Thr Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala
115 120 125

Ile Arg Tyr Pro Leu Arg Ser Arg Glu Leu Arg Thr Pro Cys Asn Ala
130 135 140

Val Val Ala Met Val Val Ile Trp Gly Leu Ser Leu Val Phe Ala Gly
145 150 155 160

Pro Tyr Leu Ser Tyr Tyr Asp Leu Ile Asp Phe Glu Asn Ser Asn Val
165 170 175

Cys Val Pro Gly Trp Glu Glu His Asn Arg Lys Val Leu Asp Thr Cys
180 185 190

Thr Phe Val Phe Gly Tyr Val Ile Pro Val Leu Ile Val Ser Leu Ser
195 200 205

Tyr Thr Arg Thr Ile Lys Tyr Leu Trp Thr Ala Val Asp Pro Leu Asp
210 215 220

Gly Met Ser Glu Ser Lys Arg Ala Lys Arg Lys Val Thr Lys Met Ile
225 230 235 240

Ile Ile Val Thr Val Leu Phe Cys Ile Cys Trp Leu Pro Tyr His Val

245 250 255

Val Ile Leu Cys Tyr Leu Tyr Gly Asp Phe Pro Phe Asn Gln Thr Thr

260	265	270
Tyr Ala Phe Arg Leu Leu Ser His Cys Met Ala Tyr Ala Asn Ser Cys		
275	280	285
Leu Asn Pro Ile Val Tyr Ala Leu Val Ser Lys His Phe Arg Lys Gly		
290	295	300
Phe Lys Lys Val Phe Ser Cys Ile Leu Ser Lys Lys Gly Arg Asn Lys		
305	310	315
		320
Val His Val Val Asn Val Ala Asn Thr Val Pro Gly Phe Glu Ala Gly		
325	330	335
Ser Thr Glu Val Ser Gln Met Asn Glu Glu Asn Ala Arg Gln Asn Glu		
340	345	350
Ser Glu Met Val Asn Arg Pro Leu Ala Gln Pro Gln Asp Thr Thr Met		
355	360	365
Thr Ile Thr Leu Pro Phe Gln Asn Gln Pro		
370	375	