

파지 디스플레이 방법을 이용한 **Protein**
Tyrosine Phosphatase-1B (PTP-1B)에
효과적인 펩타이드 저해제 탐색

연세대학교 대학원
의 과학과
최수정

파지 디스플레이 방법을 이용한 **Protein**
Tyrosine Phosphatase-1B (PTP-1B)에
효과적인 펩타이드 저해제 탐색

지도교수 김 중 선

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

최 수 정

최수정의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

용기, 열정 그리고 꿈을 가지고 시작했던 대학원 석사과정은 어느덧 막바지에 이르렀습니다. 새로운 학문을 접하며 평생의 진로를 바꾼다는 것이 쉽지 않았던 만큼, 2년 반에 걸친 학업과정 동안 많은 경험을 하였습니다. 학문과 실험에 대한 열정은 자신의 희생과 노력이 절실히 필요하다는 것도 배웠고, 모든 것은 자기 자신과의 싸움이라는 것 역시 깨닫게 되었습니다. 새로운 학문의 길이 제 인생의 큰 전환점이 되도록 해주시고, 무엇보다 가르쳐야 할지도 모를 철부지였던 저를 위해 끝까지 너그러운 마음으로 믿고 이끌어주시며, 많은 가르침을 주셨던 저의 지도 교수님이신 김종선 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 졸업 논문을 성심 성의껏 지도해 주시고, 항상 인자하신 모습으로 관심을 가져 주신 신전수 교수님과 해부학교실 이종은 교수님께 또한 깊은 감사를 드립니다. 미생물학교실에서 실험과 학업을 시작한 그날부터 학업 과정 내내 깊은 관심과 배려로 지도해주신 박전한 교수님께도 깊은 감사를 드리며, 교실 세미나 발표 때 마다 좋은 조언과 가르침을 주신 김세종 교수님, 이원영 교수님, 이봉기 교수님, 최인홍 교수님, 조상래 교수님, 조성애 교수님, 송택선 교수님, 그리고 이재면 교수님께도 감사드립니다.

항상 실험에 대한 열정과 인내에 대해 깨닫게 해주시고, 올바른 충고와 가르침을 주시며 힘들어 할 때 곁에서 용기를 북돋아주셨던 최용준 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 비록 졸업하셔서 멀리 계시지만 늘 제게 크고

작은 가르침을 주신 박상면 선생님, 가까이서 늘 충고를 아끼지 않으시고 도움을 주신 안근재 선생님, 항상 곁에서 부족한 부분을 섬세하게 가르쳐 주는 형란언니, 즐거울 때나 힘들 때나 변함없이 달려와 제게 후배 사랑을 가르쳐 준 은주언니, 처음에 들어와서 새로운 환경과 학업에 많이 힘겨워 할 때 때론 친 언니처럼, 때론 포근한 엄마처럼 늘 저에게 큰 힘이 되어주셨던 최윤희 선생님. 모두들 정말 감사 드립니다. 항상 저를 친동생 이상으로 아껴주는 선화언니, 석사 동기이자 저의 정신적 지주 역할을 해주는 성희언니, 많은 애정과 관심으로 늘 함께 해주는 은정언니, 친 오빠처럼 늘 자상함을 잃지 않는 주영오빠, 비록 늦게 친해졌지만 늘 넓은 마음으로 헤아려주시던 방혜은 선생님, 석사과정 동안 함께한 든직한 석사동기 승은이, 자상한 모습으로 항상 보듬어주시는 조장은 선생님, 착한 마음의 소유자인 주영언니, 푹푹한 이미지의 은계언니, 같이 졸업 앞두고 동고동락한 현진언니, 늘 열심히 하는 귀여운 정화, 애교로 날 항상 즐겁게 해주는 혜정이, 차분한 모습으로 열심히 하는 진민이, 마음이 깊은 지영언니, 평소에 실험과 공부 모든 면에 진심으로 조언을 아끼지 않으셨던 윤주호 선생님, 밝은 모습으로 늘 대해주시고 많은 가르침을 주시던 김은숙&연수인 선생님, 편안한 큰 언니의 모습으로 항상 잘해주시고 많은 가르침을 주신 김지수 선생님께도 깊은 감사를 전합니다. 그 외에도 많은 미생물학교실 선생님들께 감사의 말씀을 드립니다.

항상 믿어주고 의지가 되어주는 소중한 친구인 현숙이, 언제봐도 든든하고 서로 말이 필요 없는 오랜 친구 서진이, 이 외에도 저의 단짝이자 우정

과 신뢰로 뭉친 친구 은영이를 비롯해서 항상 제 곁에서 힘이 되어주는 고려대학교 98학번 동기인 은아, 미현, 현, 은경, 희원, 규석, 태주, 봉석, 현석, 희석, 강민, 명섭, 승현, 상철, 민규에게 고맙다고 전하고 싶습니다. 그리고, 제 평생의 소중한 선배들인 고려대학교 97학번 운영언니, 성원언니, 경진언니, 혜영언니께도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 지금은 비록 졸업하고 미국에 있지만, 제가 이곳에서 학문의 길을 시작할 수 있도록 조언을 해주시고 이끌어주셨던 기한오빠께도 감사 드립니다. 이 외에도 미처 다 언급하지 못한 고려대학교 선배님들께 감사 드립니다.

그 누구보다, 제가 이 자리에 설 수 있도록 깊은 사랑과 관심으로 키워주시고 항상 저를 믿어주시고, 하고 싶은 꿈을 향해 매진할 수 있도록 늘 뒷받침해주시는 존경하는 아빠와 엄마, 저의 세상에 둘도 없는 소중한 들쭉직한 동생 하영이, 저와 우리 가족 모두에게 늘 기쁨과 웃음을 주는 귀염둥이 천사 재성이에게 정말 사랑한다고, 정말 감사 드린다고 전하고 싶습니다. 혼자 서울 생활을 하는 내내 가까이서 관심을 주시고 예뻐해 주시는 막내 외삼촌께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 마지막으로, 지금은 이 세상에 안 계시지만 제게 큰 사랑을 주셨던 외할머니와 큰외삼촌께도 감사 드리고 싶습니다. 그 외 저의 삼촌들을 비롯한 친지 모두 감사합니다.

부족한 저에게 많은 도움과 관심을 주신 모든 분들께 다시 한번 감사 드리며, 앞으로도 겸손한 마음으로 차근차근 배워나갈 수 있는 자세를 간직한 채로 더욱 열심히 해나가겠습니다.

최수정

차 례

국 문 요 약.....	1
I. 서 론.....	3
II. 재료 및 방법	10
1. 시약.....	10
2. 재조합 PTP-1B의 성상.....	10
3. PTP-1B에 결합하는 파지 라이브러리 스크리닝	11
4. 선택된 파지 플라크의 대량 배양.....	11
5. ELISA를 이용한 PTP-1B에 대한 결합력 시험	12
6. 파지 클론들의 DNA 분리.....	13
7. 파지 DNA 서열 분석.....	14
8. 선택된 파지 클론들의 펩타이드 서열 비교	14
9. 파지 클론을 이용한 PTP-1B 효소 활성 저해 실험.....	14
10. 펩타이드 합성	15
11. 합성된 펩타이드의 PTP-1B 효소활성 저해 실험.....	15

III. 결 과	16
1. PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지 추출	16
2. 파지 ELISA를 통한 PTP-1B와 파지의 결합력 확인	17
3. 추출된 파지 클론들의 DNA sequencing 결과	21
4. 파지 클론을 이용한 효소 활성 저해 시험	23
5. 합성한 펩타이드를 이용한 PTP-1B의 저해효과.....	27
IV. 고 찰	29
V. 결 론	33
VI. 참고 문헌.....	35
Abstract	41

그림 차례

그림 1. 파지 농도에 따른 PTP-1B와 파지의 결합 친화도	20
그림 2-1. 파지 46, I, 2-14, 55에 의한 PTP-1B의 저해 양상.....	24
그림 2-2. 파지 2-10, o, p, j에 의한 PTP-1B 저해 양상.....	25
그림 2-3. 파지 53, B69, B76에 의한 PTP-1B 저해 양상.....	26
그림 3. 합성한 펩타이드 농도에 따른 PTP-1B 저해 양상.....	28

표 차례

표 1. PTP-1B에 선택적으로 결합된 파지의 증폭 확인.....	17
표 2. 파지 ELISA에 의한 결합력 확인	18
표 3. 선택된 파지 클론들의 DNA 서열분석 결과 오류! 책갈피가 정의되어 있지 않습니다.	
표 4. 합성한 펩타이드 서열.....	27

국 문 요 약

파지 디스플레이 방법을 이용한 **Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP-1B)**에 효과적인 펩타이드 저해제 탐색

단백질 인산화 효소(protein tyrosine kinases, PTK)와 단백질 탈 인산화 효소 (protein tyrosine phosphatases , PTP)에 의한 가역적 인산화 반응의 조절은 인슐린 신호전달을 비롯한 다양한 세포 내 신호전달 과정에서 중요한 역할을 한다. PTP는 다양한 기질들을 탈 인산화 시킬 수 있는 기질 특이성이 낮은 효소로 알려져 왔으나, 최근 여러 가지 PTP 유전자의 적출 연구에 따르면, 다양한 PTP가 각각 생체 내 기질 특이성이 있음을 시사하고 있다. 특히, PTP-1B 유전자를 적출시킨 생쥐의 경우 인슐린 감수성과 비만에 대한 저항성이 증가된다는 것이 보고됨으로써 PTP-1B가 실제로 인슐린의 기능을 조절하는데 핵심적인 역할을 하고 있다는 것이 판명되었다. 이러한 연구결과는 PTP-1B 저해제 개발에 대한 연구의 필요성을 뒷받침해주고 있다.

본 연구는 이러한 연구적 배경을 바탕으로 파지 디스플레이 방법을 이용하여 PTP-1B에 효과적인 펩타이드 저해제를 발굴하고자 하였다. 우선, PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지들을 추출하여 각 파지 클론들의 DNA 서열을 분석한 후, 서로 다른 파지 클론들 중에서 PTP-1B 효소 활성을 저해하는 펩타이드 저해제를 찾고자 효소 활성 저해 실험을 수행하였다. PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지 클론들 중에서 PTP-1B에 대한 저해 양상을 보이

는 파지 클론의 아미노산 서열을 바탕으로 4개의 펩타이드, WRQ7 (WRQTRKD), TAP7 (TAPPNKL), LRT7 (LRTNSTL) 그리고 ATK7 (ATKTRRP), 를 합성하였다. 다음으로 이 펩타이드들의 PTP-1B 효소 활성화에 대한 저해 양상을 살펴보았다. 저해 양상 실험을 한 결과 TAP7 펩타이드가 비교적 강하게 PTP-1B를 저해하는 것으로 관찰되었으며, WRQ7, LRT7, 그리고 ATK7 등의 펩타이드는 거의 PTP-1B의 효소활성을 저해하지 않는 것으로 나타났다. 본 연구결과, TAP7 펩타이드는 PTP-1B에 대한 선택적인 저해제로서의 가능성을 확인하였으며, 앞으로 TAP7 펩타이드 서열을 체계적으로 바꾸는 작업을 통하여 PTP-1B에 대한 좀더 강력하고 선택적인 저해제를 개발할 수 있을 것으로 기대한다.

핵심 되는 말: Protein Tyrosine Phosphatase, PTP-1B, 파지 디스플레이, 펩타이드 저해제

파지 디스플레이 방법을 이용한 Protein tyrosine phosphatase-1B
(PTP-1B)에 효과적인 펩타이드 저해제 탐색

< 지도교수 김 종 선 >

연세대학교 대학원 의과학과

최 수 정

I. 서 론

대부분의 세포 내 신호전달과정은 단백질 인산화에 의해 조절된다. 단백질의 인산화는 단백질-단백질 간 상호작용, 단백질 안정성 조절에 대한 인식 모티프 형성, 효소 활성화도 조절 등에 핵심적인 역할을 하고 있다. 세포 내 단백질 인산화의 정도는 단백질 인산화 효소(protein kinases)와 단백질 탈인산화 효소(protein phosphatases)의 활성화도에 의해 조절된다.¹ 단백질 탈인산화 효소는 거대한 효소 집단으로, 그들의 구조적 다양성과 복합성에 있어서 단백질 인산화 효소와 대등하다. 게다가, 단백질 탈인산화 효소는 신호

전달과정에서 긍정적인 효과와 부정적인 효과 모두 발휘할 수 있으며, 다양한 포유류 조직(mammalian tissues)과 세포에서 중요한 생리적인 역할을 한다. 단백질 인산화 효소와 마찬가지로, 단백질 탈 인산화 효소의 활성도의 변화는 인류 질병의 원인이 되기도 한다. 따라서 단백질 인산화의 생리학적 조절과 단백질 기능, 그리고 세포 생리기능의 가역적인 조절과정에 대한 연구는 단백질 인산화 효소와 더불어 단백질 탈 인산화 효소의 생물학적 기능에 대한 이해를 필요로 한다.¹

Protein tyrosine phosphatases (PTP)는 신호전달과정에서 중요하게 작용하는 조절자 역할을 하는 거대한 효소 집단을 형성하고 있다.^{2,6} PTP는 많은 중요한 단백질들의 가역적 인산화 반응을 조절하고, protein tyrosine kinases (PTK)와 함께 물질대사, 세포 성장, 증식, 분화, 세포 주기, 세포-세포 정보전달, 세포 이동, 유전자 전사, 그리고 이온 채널 활성도와 같은 기본적인 세포 내 과정의 조절에 결정적으로 관여하고 있으며 면역 반응 및 생존에서도 중요한 역할을 하고 있다. PTP는 크게 tyrosine-specific, dual-specific, 그리고 low-molecular weight (LMW) phosphatases의 3가지 계통으로 분류되며, tyrosine-specific PTP는 다시 receptor-like PTP와 intracellular PTP의 2가지 계통으로 나뉜다. 현재까지 알려진 것만 해도 수백 여 종에 달하고 계속해서 새로운 것들이 발견되고 있는 실정이다.^{1,7} Receptor-like PTP는 특정 리간드 결합을 위한 다양한 길이의 세포 외 부위, 하나의 세포막 투과 부위, 한 두 개의 세포 내 PTP 효소활성부위로 구성되며, LAR (leukocyte common antigen-related protein tyrosine phosphatase), PTP- α 그리고 CD45등이 여기에 속한다.⁸

Intracellular PTP는 약 240개의 아미노산으로 이루어진 하나의 효소활성부위와 세포 내 국부화(localization)나 효소활성을 조절할 것으로 기대되는 C-말단 혹은 N-말단으로 구성되며, PTP-1B, SHP-1,2, TC-PTP, PTP-PEST등이 여기에 속한다. Dual specificity phosphatases는 MAP kinase phosphatases (MKPs), cell-cycle regulator Cdc25 phosphatases, tumor suppressor phosphatases, 그리고 PTEN 등을 포함하고 있다.^{1,9,10} 모든 PTP는 11개의 아미노산으로 이루어진 특정 서열 모티프 [I/V]HCXXGXXR[S/T]를 효소활성부위에 가지고 있다. 활성 부위 내 cysteine 잔기는 효소활성 시 thiol-phosphate intermediate를 형성하는 nucleophile의 기능을 함으로써 PTP의 효소활성에 중요한 역할을 한다.^{11-12,16} Cysteine잔기는 sulfhydryl oxidizing 제제나 alkylating 제제에 의해 쉽게 활성을 잃는 특성이 있다.

사람의 PTP 중 비교적 먼저 분리되어 특징이 잘 알려진 PTP-1B는 435개의 아미노산으로 구성된 50 kDa 단백질로 N-말단에 위치한 321개의 아미노산 부위가 PTP 영역(PTPD)으로 알려졌다.⁷⁻⁸ 소수성의 C-말단의 35개의 아미노산 부위는 소포체(ER)내로의 표적화에 관여하는데, subcellular location을 조절함으로써 간접적으로 활성도를 조절할 수 있을 뿐만 아니라, 촉매작용에 있어서도 직접적인 조절 역할을 해준다. 또한, 나머지 부위에는 인산화될 수 있는 serine잔기가 여러 개 있어 세포 내 신호에 따라 조절될 수 있음을 보여준다.¹⁰⁻¹² 실제로 이 serine의 인산화 양상은 세포의 분열주기에 따라 다르게 변화함이 보고되었다. PTP-1B의 세포 내 기능으로 맨 처음 알려진 것은 Src와 같은 종양 유발 PTK의 기능을 상쇄시킨다는 것이었고, 1993

년에 처음으로 인슐린의 기능을 조절하는 것과 관련이 있다고 보고되었다.¹³ 그리고 PTP-1B의 PTPD는 혈소판의 응고 반응에도 관여한다고 알려졌는데¹⁴ PTPD의 삼차구조는 Barford¹⁵ 등에 의하여 밝혀져 PTP의 작용 기전에 대한 많은 궁금증을 구조적인 측면에서 해결해 주었다. PTP는 초기 in vitro 연구나 세포 내 유전자 과발현 연구에서 세포 내 다양한 기질들을 탈 인산화시킴으로써 기질 특이성이 매우 낮은 효소로 알려져 왔다.^{2,18,19} 그러나 최근 여러 가지 PTP 유전자의 적출 연구에 따르면, 다양한 PTP가 각각 생체 내 기질 특이성이 있음을 시사하고 있다. PTP-1B 유전자를 적출시킨 생쥐의 경우 인슐린 감수성과 비만에 대한 저항성이 증가된다는 것이 보고됨으로써 PTP-1B가 실제로 인슐린의 기능을 조절하는데 핵심적인 역할을 하고 있다는 것이 판명되었으며 제 2형 당뇨병과 비만 치료를 위한 중요한 치료약 개발의 표적물질임을 말해주고 있다.²⁰⁻²¹ 이들의 연구결과를 보면 PTP-1B가 인슐린의 결합으로 인산화된 인슐린 수용체내의 tyrosine 잔기를 탈 인산화시킴으로써 인슐린의 세포 내 기능을 차단하는 것을 알 수 있다. 따라서 PTP-1B가 적출된 생쥐에서는 인슐린 수용체가 적은 양의 인슐린에 의해서도 쉽게 인산화 됨으로써 활성화되어 인슐린에 대한 감수성이 현저하게 증가하게 되는 것이다. 또한, LAR이라는 PTP가 적출된 생쥐에서도 유즙 분비의 손상을 나타내고, 인슐린에 대한 감수성이 증가하는 등의 유사한 현상이 보고되었다.²² TC-PTP 유전자가 적출된 생쥐는 골수의 이상과 면역기능의 이상이 초래되는 것으로 보아 면역반응의 중요한 매개체임을 알 수 있다.²³ 그리고 SHP-2, PTP-PEST, PTP- σ 의 유전자가 적출된 생쥐의 배아세

포들이 각각 독특한 표현형을 나타냄으로써 각 PTP의 세포 내 반응기질이 다르다는 것을 제시해 준다.²⁴⁻²⁷

PTP-1B가 인슐린의 기능을 조절한다는 연구결과가 보고된 이후로, PTP-1B는 제 2형 당뇨병 치료제 개발의 표적물질로서 각광 받게 되면서 PTP-1B의 저해제에 대한 관심도 높아졌다. PTP-1B의 대표적인 저해제로 알려진 vanadate은 오래 전부터 인슐린과 같은 효과를 나타내는 것으로 알려져 왔다.²⁵ 즉 vanadate은 지방세포에서 글루코스의 흡수 및 분해를 촉진시키며 간세포에서는 글리코겐의 합성을 촉진시키고 근육세포에서도 글루코스의 흡수 및 분해를 촉진시키는 등 인슐린의 전반적인 기능을 모방하는 것으로 밝혀졌다. 이후, vanadate은 동물실험과 인체실험에서 긍정적인 효과를 나타낸 반면, 여러 가지 문제점을 보이기도 하였다. 우선 in vitro 실험과는 달리, vanadate의 양을 100배 가까이 투여해야만 치료효과가 관찰되었으며, 약의 투여를 중단한 상태에서도 치료효과는 몇 주간 지속되는 것으로 보았을 때 세포 내에 축적되는 성질이 있는 것으로 보였다. 특히 vanadate을 투여 받은 환자의 신장과 뼈에 vanadate의 농도가 높게 나타나는 것이 관찰됨으로써, 장기간 투여 시 이들 장기에 축적되는 부작용이 우려되기도 하였다. 이와 같은 vanadate의 독성 및 부작용 때문에 현재는 vanadate 자체보다는 vanadate의 유도체를 개발하여 안전성을 확보하려는 노력이 경주되고 있으며, 일부 가시적인 결과도 보고되고 있으나 실제 효과는 아직 검증되어 있지 않다. 이 외에도 difluoromethylene phosphonates, 2-carbomethoxybenzoic acids, 2-oxalylaminobenzoic acids, KR61639 그리고 lipophilic compounds 등을

포함한 많은 PTP-1B 저해제가 꾸준히 보고되고 있다.^{29-31,45} PTP-1B에 대한 선택적인 저해제들을 찾기 위한 수많은 연구에도 불구하고, 실제 효과의 부진 및 독성, 그리고 부작용 등의 문제점들로 인해 아직까지 PTP-1B에 대한 선택적이고 효과적인 약물은 개발되어 있지 않은 실정이다.

본 연구에서 사용될 파지 디스플레이 기술(phage display technique)은 현재 면역학, 세포 생물학, 치료 약 개발, 그리고 약리학 등의 다양한 분야에서 활용되고 있다.³²⁻³⁴ 파지 디스플레이는 1985년 G. smith에 의해 처음 개발되었으며, 파지 미립자들의 표면에 펩타이드, 단백질, 혹은 항체 조각을 발현하는 특징을 이용하여, 원하는 다양한 변이체(variants)에 특정 결합하는 펩타이드나 단백질을 발굴할 수 있는 유용한 기술이다.³⁵ 그리고 파지 디스플레이 ‘라이브러리’는 다른 외부 DNA 삽입체(insert)를 운반하는 파지 클론들의 이질성 혼합물로 구성되어 있다. 우선 표적 단백질을 고정시키고 준비된 파지들을 방치시키면, panning으로 알려진 친화도 선택(affinity selection) 과정에 의해 표적 단백질과 결합 친화력이 높은 파지들, 즉 표적에 특이적으로 결합한 파지들은 선택되어 추출되고, 결합하지 못한 파지들은 씻겨 나가게 된다.³⁶⁻³⁸ 추출된 파지 클론들을 이용하여 박테리아 숙주 세포를 감염시키면, 숙주 세포의 세포 분열 주기가 반복되는 동안 파지들은 숙주세포는 죽이지 않고 증폭하게 된다. 이때, 파지의 표면에 동일한 펩타이드가 나열하게 되고 결과적으로 동일한 자손(progeny) 파지들이 생산되는 것이다.³⁹ 이 과정을 통해 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 발굴하게 되는 것이다.

본 연구는 파지 디스플레이 방법을 이용하여 PTP-1B에 결합할 수 있는 펩타이드를 발견하고, 이들 펩타이드 중에서 PTP-1B와 기질 사이의 결합을 저해 가능한 펩타이드를 탐색하고자 한다. 문헌조사 결과, 아직까지 파지 디스플레이를 이용하여 PTP-1B의 펩타이드 저해제를 찾는 연구를 시행한 예는 없다. PTP-1B의 효소활성부위(active site)에 결합하는 펩타이드를 발굴하고 이 펩타이드에 의해 저해효과를 확인하는 것이 주 목적이라고 하겠으나, 최근 저해물질이 PTP-1B의 효소활성부위가 아닌, PTP-1B의 또 다른 부위에 결합함으로써 PTP-1B의 3차 구조를 변형시키고, 변형된 구조로 인해 PTP-1B가 기질과 결합하지 못함으로써 저해효과를 나타낼 수 있다는 연구가 보고된 바 있다.²⁸ 따라서 발굴하게 될 펩타이드 저해제는 이상의 두 가지 결합부위를 모두 표적으로 겨냥할 수 있다. 본 연구를 통해 발굴하게 될 PTP-1B에 대한 선택적인 펩타이드 저해제는 당뇨병을 비롯한 여러 가지 대사성 질환의 치료적 약물로서의 사용뿐만 아니라 PTP-1B 효소의 생물학적 기능의 연구에 있어서도 유용할 것으로 사료된다.⁴⁰⁻⁴¹

II. 재료 및 방법

1. 시약

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B)는 ATGen (성남, 경기도)에서 구입하였고, phage display library kit는 New England Biolabs (Beverly, MA)에서 구입하였다. 기질로 쓰인 pNPP (ρ -nitrophenyl phosphate)를 비롯하여 β -mercaptoethanol (β -ME), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), Tris, DTT (dithiothreitol), NaCl, IPTG (isopropylthiogalactoside)등 대부분의 시약은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다. TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component)는 KPL (Maryland, USA)에서 구입하였고, PEG 8,000 (Polyethylene Glycol 8,000)은 Yakuri (Kyoto, Japan)에서 구입하였다.

2. 재조합 PTP-1B의 성상

사람 유래 PTP-1B의 catalytic domain (amino acid 1-321)을 대장균에 수용성 단백질로 과발현 한 후 크로마토그래피 방법으로 순수 분리한 것으로 순도는 SDS-PAGE로 확인한 결과 95% 이상이였다. 분자량은 37,312이고, 농도는 1 mg/ml였으며, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA,

1 mM DTT, 20% Glycerol의 수용액 상태로 공급되었다.

3. PTP-1B에 결합하는 파지 라이브러리 스크리닝

PTP-1B의 펩타이드 저해제를 스크리닝 하기 위해 사용된 7-mer 파지 디스플레이 라이브러리 kit는 New England Biolab (Beverly, MA)에서 구입하였다. 세포 배양 용기(60-mm-diameter)에 PTP-1B를 coating하였다. PTP-1B 단백질은 1.5 ml의 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) coating buffer에 50 µg/ml을 첨가하였고, 4°C에서 밤새 방치하였다. Blocking buffer (0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6), 5 mg/ml BSA, 0.02% NaN₃)로 1시간 동안 방치하고 3 ml의 TBST (TBS+0.1% [v/v] Tween-20)로 6회 세척한 후, 2 × 10¹¹ 파지를 1 ml의 TBST (TBS+0.1% [v/v] Tween-20)에 희석시켜 coated plate에 첨가하고 1시간 동안 상온에서 방치하였다. 다시 TBST (TBS+0.1% [v/v] Tween-20)로 10회 세척한 후, 1 ml의 0.2 M Glycine-HCl (pH 2.2), 1 mg/ml BSA로 10분 동안 골고루 뿌려주며 추출하고, 즉시 1 M Tris-HCl (pH 9.1) 150 µl로 중화시켰다. 이렇게 얻은 파지 상층액의 파지 농도를 결정하고, 위의 bio-panning 과정을 총 4회 반복하여 PTP-1B에 결합하는 파지를 최종 선택하였다.

4. 선택된 파지 플라크의 대량 배양

선택된 파지 플라크는 37 °C에서 O.D=0.5로 배양된 *E. coli* ER2537 1 ml에

각각 4.5 시간 동안 배양 시킨 후, 30초 동안 원심 분리하여 상층액만 얻어서 stock으로 보관하였다. 파지 ELISA 실험 수행에 필요한 파지 농축액을 얻기 위해, stock을 이용하여 다시 한번 대량 배양하였다. 각각의 파지 stock 5 μ l를 O.D=0.5로 배양된 *E. coli* ER2537 20 ml에 감염시켰다. 감염 후 37 $^{\circ}$ C에서 4.5 시간 동안 배양시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 10000 rpm으로 원심 분리하였고, 얻은 상층액에 20% PEG/2.5 N NaCl을 1/6 volume으로 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 13000 rpm으로 원심 분리하여 얻은 침전물을 1xTBS 1 ml로 용해시켰고, 다시 한번 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 10000 rpm으로 원심 분리하였다. 원심 분리한 후, 상층액만 새로운 tube에 옮겨 담은 후에 1/6 volume의 20% PEG/2.5 N NaCl를 첨가하여 얼음 속에서 1시간 동안 방치하였다. 파지 상층액은 다시 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 13000 rpm으로 원심 분리하여 얻은 침전물만 1xTBS 50 μ l로 용해 시켰다. 이렇게 얻은 파지 상층의 파지 숫자를 정량 한 후 PTP-1B에 대한 결합력을 ELISA 방법으로 확인하였고, PTP-1B 효소활성에 대한 저해 실험에 사용하였다.

5. ELISA를 이용한 PTP-1B에 대한 결합력 시험

PTP-1B 10 μ g/ml을 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) coating buffer에 첨가하여 ELISA plate 각 well당 100 μ l씩 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 coating하였다. Blocking buffer (PBST (PBS+0.2% [v/v] Tween-20), 10% skim milk)로 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 방치하였다. TBST (TBS+10% [v/v] Tween-20)로 5회 세척한 후, TBS와 1:30으로 희

석한 파지를 4배씩 연속적으로 희석하여 각 ELISA plate well당 100 μ l씩 넣고, 상온에서 1시간 동안 방치하였다. TBST (TBS+0.1% [v/v] Tween-20)로 5회 세척한 후, blocking buffer와 1:5000으로 희석한 HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody로 1시간 동안 상온에서 방치한 후, TBST (TBS+0.1% [v/v] Tween-20)으로 5회 세척하였다. TMB substrate를 100 μ l씩 첨가하여 어두운 상온에서 15분 정도 방치하고, 즉시 2.5 N H₂SO₄ 100 μ l씩을 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 파지 클론들의 DNA 분리

ELISA 방법으로 PTP-1B 결합력 분석을 통해 선택된 파지 클론들의 DNA를 순수 정제하였다. 파지가 포함된 상층액 500 μ l에 200 μ l의 20% PEG/2.5 N NaCl을 첨가한 후, 상온에서 10분 동안 방치하였다. 4°C에서 10000 rpm으로 10분 정도 원심 분리한 후, 다시 원심 분리해서 남아있는 상층액을 제거하였다. 침전물은 100 μ l의 Iodide buffer로 녹이고, 100% 에탄올을 250 μ l 첨가하였다. 상온에서 10분 정도 방치하였고, 10분 정도 원심 분리한 후, 상층액을 제거하였다. 70% 에탄올로 침전물을 세척하고 10분 정도 다시 한 번 원심 분리하여 에탄올을 완전히 제거하였다. 에탄올이 완벽하게 제거될 때까지, 공기 중에서 건조하였다. 20 μ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)로 침전물을 용해시켰다.

7. 파지 DNA 서열 분석

파지 클론들의 DNA 서열은 -96 gIII primers (5' - CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3')를 이용하여 (주)마크로젠(서울, 대한민국)에 의뢰하여 분석하였다.

8. 선택된 파지 클론들의 서열 비교

DNA 서열 분석을 통해 나온 DNA의 결과를 분석하여, 7-mer 펩타이드 부위의 아미노산 서열이 서로 다른 파지 클론들을 선택하여 PTP-1B의 효소 활성 저해할 수 있는지를 실험하였다.

9. 파지 클론을 이용한 PTP-1B 효소 활성 저해 실험

p-NPP를 기질로 10 mM로 고정시키고, 파지의 pfu 값을 고려하여 선택된 파지 클론을 농도 별로 변화시키면서 PTP-1B 효소활성의 저해 정도를 분석하였다. 전체 200 μ l의 반응 부피로 37°C에서 30분 동안 반응시켜 측정하였다. PTP-1B 효소를 첨가하여 반응을 시작하고, 1 N NaOH 1ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 효소활성 측정 시 사용된 반응용액은 2 mM DTT를 첨가한 QA 완충용액(25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM β -ME, 1 mM EDTA)이었다. p-NPP 기질의 자가 가수분해는 효소를 첨가하지 않은 반응물로 보정하였다. 효소 반응 결과 생성된 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도를 측

정함으로써 결정하였다.

10. 펩타이드 합성

DNA 염기서열 정보를 바탕으로, 7개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 4개를 합성 전문회사인 펩트론(서울, 대한민국)에 의뢰하여 85%의 순도 (purity)로 합성하였다.

11. 합성된 펩타이드의 PTP-1B 효소활성 저해 실험

합성된 펩타이드들의 PTP-1B에 대한 효소활성 저해 효과를 확인하고자, p-NPP를 기질로 사용한 PTP 효소활성 측정법을 수행하였다. PTP-1B의 효소활성은 10 mM p-NPP를 기질로 이용한 전체 200 μ l의 반응 부피로 37°C에서 30분 동안 반응시켜 측정하였다. PTP-1B 효소를 첨가한 상태에서 합성된 펩타이드들은 0, 25, 50, 100, 200, 350 μ M 농도 별로 첨가한 후 얼음 속에서 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 10 mM p-NPP 기질을 각각 첨가하여 반응을 시작하고 1 N NaOH 1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 효소활성 측정 시 사용하는 반응용액은 2 mM DTT를 첨가한 QA 완충용액(25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM β -ME, 1 mM EDTA)이었다. p-NPP 기질의 자가 가수분해는 효소를 첨가하지 않은 반응물로 보정하였다.

III. 결 과

1. PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지 추출

PTP-1B의 효소활성 도메인(amino acid 1-321)에 특이적으로 결합하는 파지들을 선택적으로 추출하기 위해 파지 디스플레이 방법을 수행하였다. 7-mer 파지 디스플레이 라이브러리를 ELISA plate에 고정시킨 PTP-1B에 결합시키기 위해서, 2×10^{11} 개의 파지 라이브러리를 배양시키고 강하게 결합한 파지만 떼어내어 증폭시키는 친화도 선택 (affinity selection) 과정을 4번에 걸쳐 수행 하였다. 표적 단백질인 PTP-1B에 선택적으로 결합된 파지는 0.2 M glycine-HCl (pH 2.2), 1 mg/ml BSA를 첨가하여 용출한 후, 1 M Tris-HCl (pH 9.1) 용액으로 중화시켰다. 추출된 파지 상층액을 다양한 농도로 희석시키고, O.D=0.5로 배양된 대장균(E. coli)에 감염시킨 후 IPTG/X-gal plate에서 파지의 수를 확인하였다. 그 결과, PTP-1B에 선택적으로 결합한 파지의 수가 0.6×10^{12} - 6.5×10^{13} 개 정도로 증폭된 것을 확인할 수 있었다 (표 1).

표 1. PTP-1B에 선택적으로 결합된 파지의 증폭 확인.

PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지들을 추출하기 위해 4회의 biopanning을 수행한 결과, 파지의 수가 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

Phage display Experiments	Phage titer of input (pfu/ml)	Phage titer of output (pfu/ml)
First	2×10^{11}	1.16×10^{13}
Second	2×10^{11}	0.6×10^{12}
Third	2×10^{11}	1.04×10^{13}
Fourth	2×10^{11}	6.5×10^{13}

2. 파지 ELISA를 통한 PTP-1B와 파지의 결합력 확인

선택적으로 추출된 파지들과 PTP-1B 간에 결합력을 알아보기 위해 파지 ELISA를 수행하였다 (표 2). 추출된 1×10^{12} 개의 파지를 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 PTP-1B가 고정되어있는 ELISA plate에 첨가하여 반응시켰고, 결합된 파지들을 측정하기 위해 anti-M13 phage antibody를 사용하였다. 음성 대조군으로는 PTP-1B 대신, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 Lysozyme을 고정시켰고, 이를 통해 파지와 결합 정도를 확인하였다. 그 결과, 226개의 클론들 중에서 73개의 파지 클론이 PTP-1B에 강하게 결합하는 것으로 확인되었다 (표 2). 85개의 파지 클론은 약하게 결합하였고 68개의 파지 클론은 잘 결합하지 않는 것으로 나타났다.

표 2. 파지 ELISA에 의한 결합력 확인

증폭된 파지들을 파지 ELISA를 통해서 PTP-1B에 결합하는지 여부를 총 4회의 biopanning에 의해 나온 파지들을 이용하여 확인한 결과이며, 결합력 정도는 strong, medium, 그리고 low로 각각 나타내었다.

Phage display Experiments	# Clones assayed	Binding Affinity*		
		Strong	Medium	Low
First	32	10	9	13
Second	13	3	9	1
Third	65	25	36	4
Fourth	116	35	31	50
Total	226	73	85	68

* Strong: O.D=2.5 이상, medium: O.D=1 이상, low: O.D=1 이하 값을 첫 O.D값으로 가지는 클론들을 의미한다.

결합력 정도를 살펴본 결과를 토대로, 강하게 결합하는 것으로 보이는 파지 클론들을 선택하여 파지 농도에 따른 결합 정도를 측정하기 위해 ELISA 그래프로 나타내었다 (그림 1). 대조군으로는 PTP-1B 대신 10 µg/ml lysozyme을 고정시킨 것과 PTP-1B에 거의 결합하지 않는 것으로 판명된 파지를 이용하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 선택된 파

지 클론들과 **PTP-1B** 사이의 결합력이 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다 (그림 1). 이들 파지 클론 중에서 어떠한 파지 클론들이 **PTP-1B**의 효소 활성을 저해하는지를 확인하기 위해 선택된 파지 클론들을 이용하여 **PTP-1B** 저해 양상을 관찰하는 실험을 수행하였다.

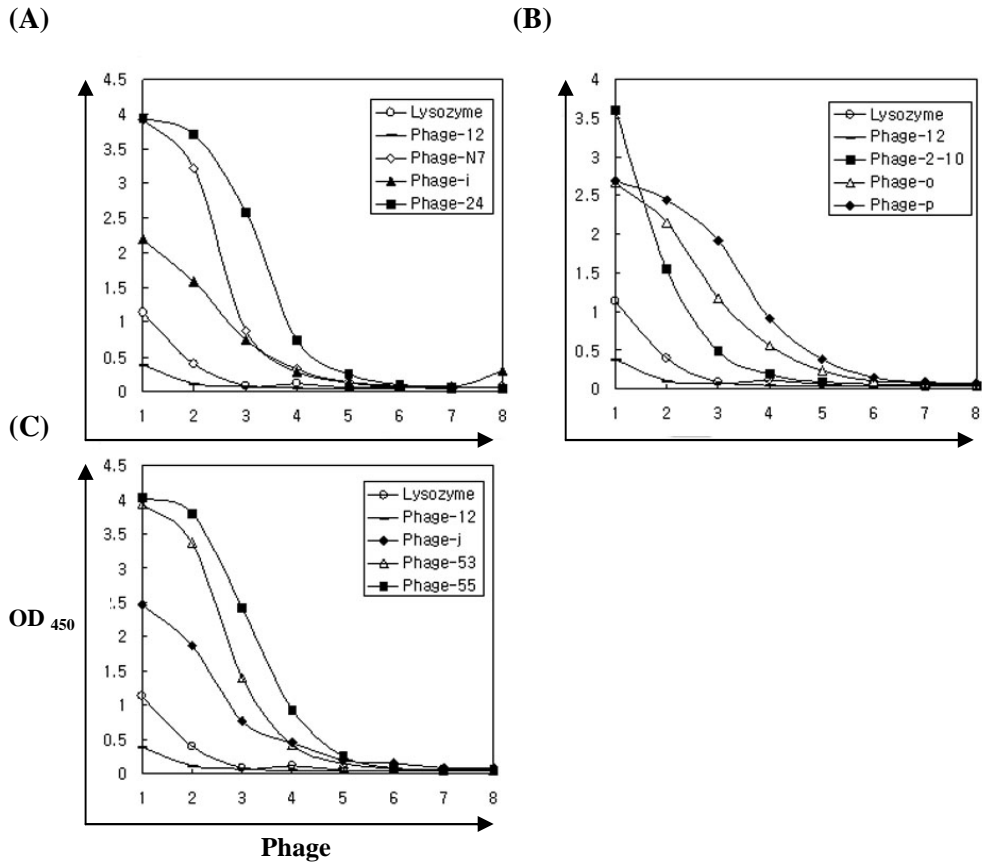


그림 1. 파지 농도에 따른 PTP-1B와 파지의 결합 친화도. 3×10^{13} 의 파지를 연속적으로 4배씩 희석한 농도 별로 PTP-1B의 결합력을 ELISA로 확인한 결과, 대조군으로 사용된 lysozyme과 파지의 결합력이나 PTP-1B와 phage-12 (non-binding phage) 사이의 결합력에 비해서 추출된 파지 클론들과 PTP-1B 간의 결합 친화력이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이 실험에 사용한 파지 클론은 강하게 결합하는 클론 (표 2) 중에서 선택한 것이다.

3. 추출된 파지 클론들의 DNA 서열 분석 결과

ELISA 방법을 통해 PTP-1B와 결합하는 파지 클론들을 결합 정도에 따라 분류하였고, 그 중 강하게 결합하는 것으로 보여지는 대표적인 클론들을 선택하여 DNA 서열을 분석하였다. 총 73개의 선택된 파지 클론들 중에서 39개의 클론들을 추출하여 DNA 서열을 분석한 결과, 크게 11개의 서로 다른 펩타이드 서열로 분류되는 것을 확인하였다. 서로 다른 펩타이드 서열은 같은 서열을 지닌 개수의 양이 많은 순서대로 나열하였다 (표 3). 나열해 본 결과에 따르면, 총 39개 중에 38%에 해당하는 15개의 파지 클론에서 WRQTRKD 서열을 확인할 수 있었고, 그 다음으로 TAPPNKL 서열이 30%를 차지하는 것으로 확인되었다. 이 외에도 서로 다른 9개의 서열들을 확인할 수 있었다. Group 1에는 한 개의 아미노산이 치환된 WGQTRKD 서열이 1개 포함되어 있고, Group 4에도 두 개의 아미노산이 치환된 RFHPSRR 서열이 1개 포함되어 있다 (표 3).

표 3. 선택된 파지 클론들의 DNA 서열 분석 결과

Phages	Peptide sequences	No. of clones
Phage No.1	WRQTRKD	15/ 39
	WGQTRKD	1/ 39
Phage No.2	TAPPNKL	12/ 39
Phage No.3	LRTNSTL	2/ 39
Phage No.4	RLRPSRR	1/ 39
	RFHPSRR	1/ 39
Phage No.5	NGAPHRA	1/ 39
Phage No.6	YGPNPML	1/ 39
Phage No.7	ATKTRRP	1/ 39
Phage No.8	SCSCNNK	1/ 39
Phage No.9	TQKLWTP	1/ 39
Phage No.10	CPHLFTR	1/ 39
Phage No.11	STYGPTL	1/ 39

펩타이드 서열의 오른쪽 부분에는 서열을 분석한 전체 파지 클론의 수 중에서 각각의 서열을 나타내는 개수를 표기하였다.

4. 파지 클론을 이용한 효소 활성 저해 시험

PTP-1B에 결합하는 파지 클론들의 아미노산 서열을 토대로 펩타이드를 합성하기에 앞서 농축한 파지 클론들을 이용하여 PTP-1B의 효소 활성을 저해 할 수 있는지 확인하기 위해서 효소 활성 저해 실험을 수행하였다 (그림 2). 대장균 내에서 발현된 뒤 순수 정제된 사람 유전자 재조합 단백질인 PTP-1B의 효소활성을 10 mM pNPP 기질을 이용하여 측정해 보았다. PTP-1B의 효소활성은 thiol을 포함하는 환원 제제인 DTT등에 의해 조절되는 것이 보고된 바 있다.⁴² 즉, DTT를 첨가하지 않은 반응용액에서의 활성과 DTT를 첨가한 반응용액에서의 활성을 비교해 보면, 2mM DTT를 첨가한 반응용액에서의 활성이 70% 이상 증가되고, PTP의 효소활성이 EDTA에 의해서 50% 까지 상승되는 것 역시 보고된 바 있다. 따라서, 효소활성을 측정할 때는 항상 2 mM DTT와 1 mM EDTA가 첨가된 반응용액을 사용하였다. 파지 클론 그룹별로 선택된 파지들을 이용하여 0, 5, 10, 20, 40, 70 μ l의 농도 별로 처리하였을 때, 효소의 활성도가 감소되는 양상이 파지 별로 다르게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 2). 특히, group 1, 2, 3, 그리고 7의 경우 비교적 PTP-1B의 활성도가 크게 저해되는 것으로 나타났다. 그 외의 group의 경우에는 PTP-1B의 효소 활성도의 저해 정도에 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 저해 양상이 좀 더 높게 관찰되는 4가지 group의 경우를 선택하여 펩타이드를 합성하였다.

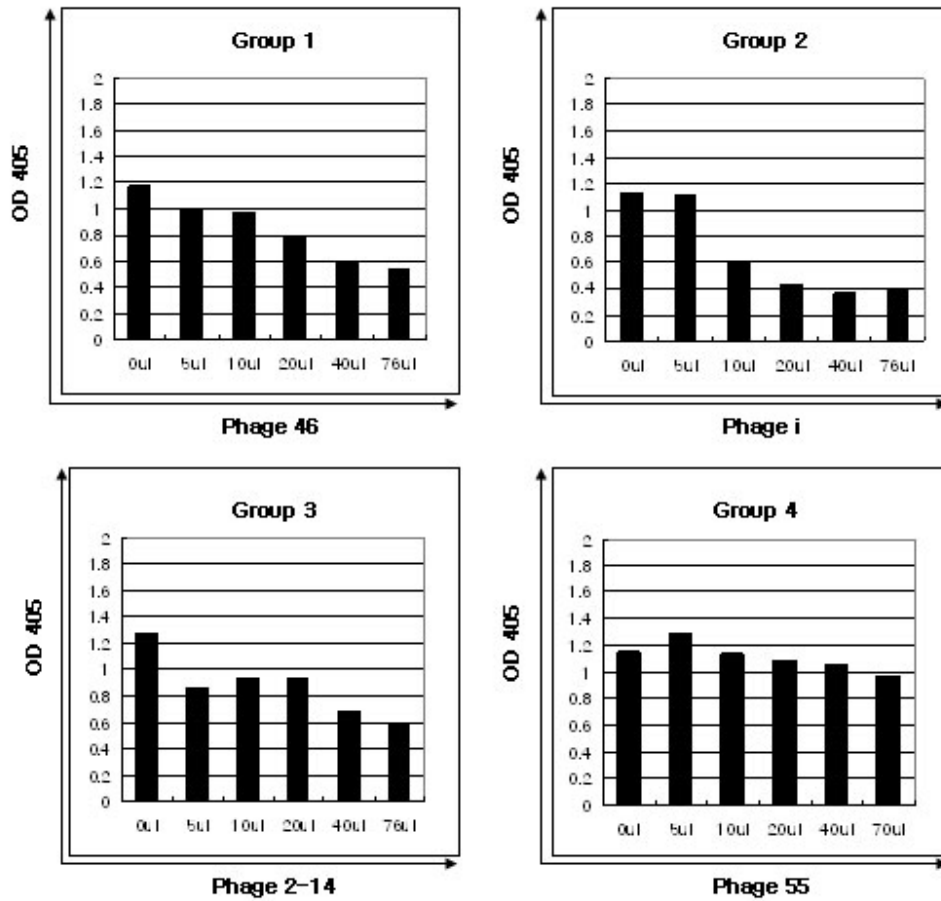


그림 2-1. 파지 46, I, 2-14, 55에 의한 PTP-1B의 저해 양상. 각각의 파지 균별로 농축된 파지들을 저해제로 사용하여 0, 5, 10, 20, 40, 70 μ l 의 서로 다른 양으로 변화시키면서 효소의 활성을 측정함으로써 저해양상을 관찰하였다. 각 그룹에 해당하는 임의의 파지 46, I, 2-14, 55를 사용하였다.

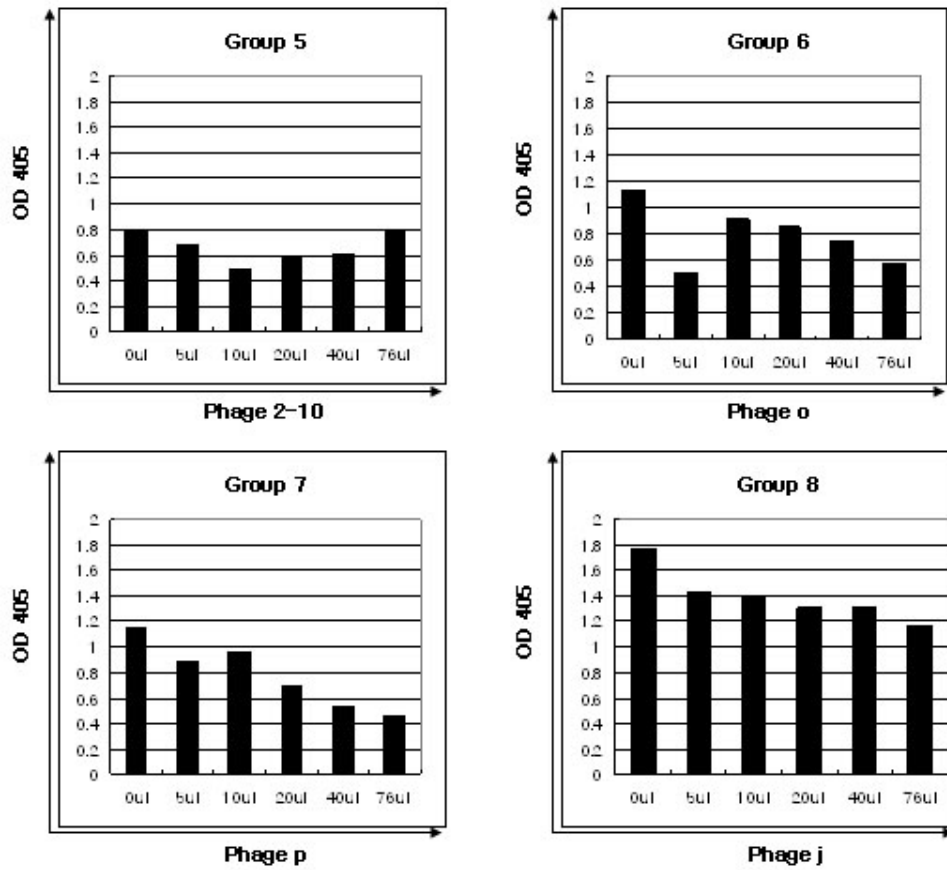


그림 2-2. 파지 2-10, o, p, j에 의한 PTP-1B 저해 양상. 각각의 파지군 별로 농축된 파지들을 저해제로 사용하여 0, 5, 10, 20, 40, 70 μ l 의 서로 다른 양으로 변화시키면서 효소의 활성을 측정함으로써 저해양상을 관찰하였다. 각 그룹에 해당하는 임의의 파지 2-10, o, p, j를 사용하였다.

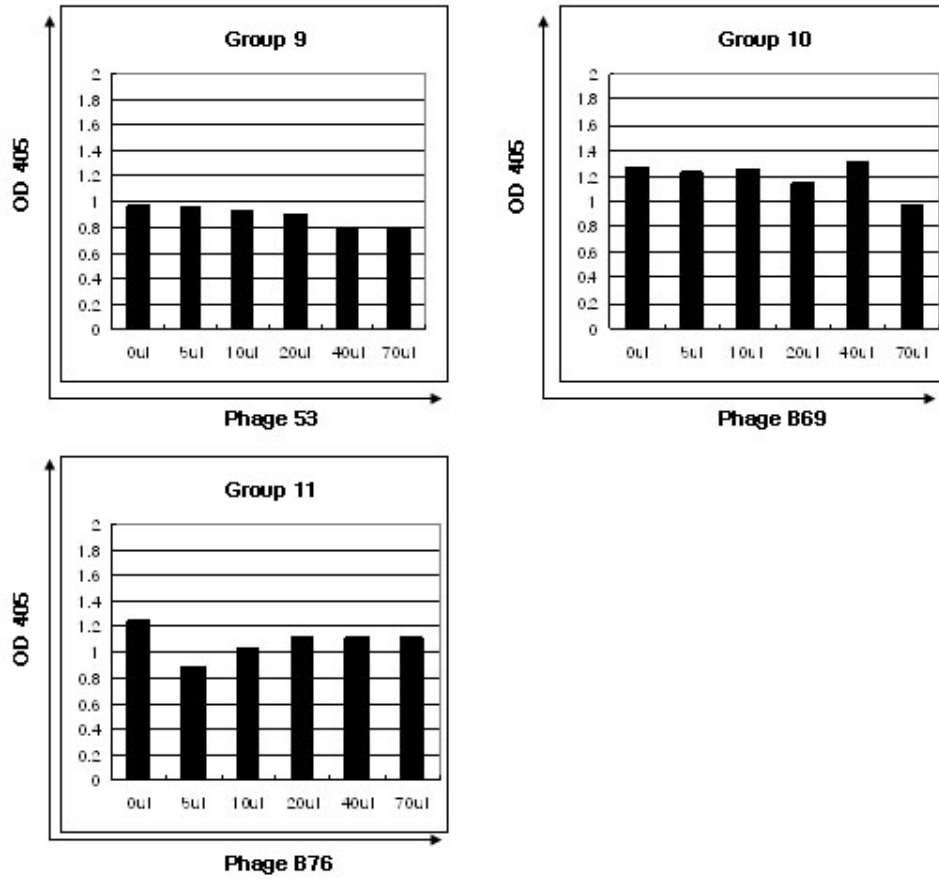


그림 2-3. 파지 53, B69, B76에 의한 PTP-1B 저해 양상. 각각의 파지군 별로 농축된 파지들을 저해제로 사용하여 0, 5, 10, 20, 40, 70 μ l 의 서로 다른 양으로 변화시키면서 효소의 활성을 측정함으로써 저해양상을 관찰하였다. 각 그룹에 해당하는 임의의 파지 53, B69, B76을 사용하였다.

5. 합성한 펩타이드를 이용한 PTP-1B의 저해효과

상기 결과를 바탕으로 4종의 펩타이드, WRQ7 (WRQTRKD), TAP7 (TAPPNKL), LRT7 (LRTNSTL)과 ATK7 (ATKTRRP), 를 합성하였고 (표 4), 실제로 이들 펩타이드가 PTP-1B를 저해하는지를 실험하였다. 기질로는 10 mM p-NPP를 사용하였고 PTP-1B의 저해 정도는 각 펩타이드들을 농도 별로 처리하여 측정하였다. 각각의 합성된 펩타이드들 중에서 특히 펩타이드 TAPPNKL를 0, 25, 50, 100, 200, 350 μ M 의 농도 별로 처리한 결과에서 비교적 저해 양상을 보이는 반면, 그 외 WRQTRKD, LRTNSTL, ATKTRRP는 0, 25, 50, 100, 200, 350 μ M로 처리하였을 경우, PTP-1B에 대한 저해 효과가 거의 없는 것으로 나타났다 (그림 3).

표 4. 합성한 펩타이드 서열

Peptides	Peptide sequences
WRQ7 peptide	WRQTRKD
TAP7 peptide	TAPPNKL
LRT7 peptide	LRTNSTL
ATK7 peptide	ATKTRRP

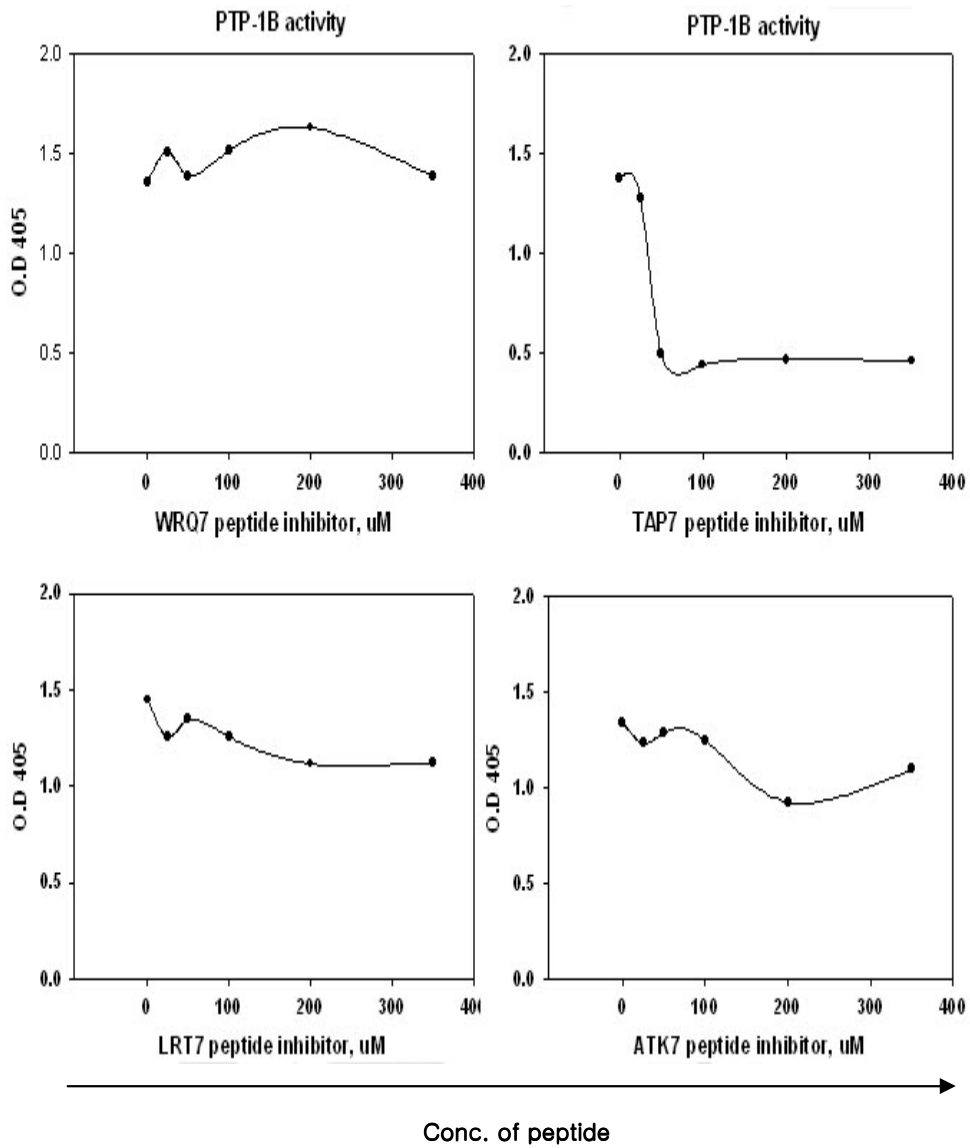


그림 3. 합성한 펩타이드 농도에 따른 PTP-1B 저해 양상. 각 펩타이드들을 0, 25, 50, 100, 200, 350 μM 의 서로 다른 농도로 변화 시키면서 효소의 활성을 측정함으로써 저해 양상을 관찰하였다.

IV. 고찰

Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B)는 인슐린 수용체 및, 인슐린 수용체 기질-1(IRS-1)의 탈 인산화를 촉진하여 인슐린 신호전달을 차단하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁻²¹ 최근 보고된 PTP-1B 적출 생쥐의 실험 결과, PTP-1B는 제2형 당뇨병 치료제 개발을 위한 표적물질임이 입증되었으며²³⁻²⁴, 현재 이 타겟에 대한 많은 신약개발 연구들이 진행되고 있다.

제2형 당뇨병은 인슐린 감수성의 저하로 인한 글루코스의 항상성과 지방, 단백질대사의 불균형으로 일어나는 질병으로 인식되고 있으며 이러한 인슐린의 신호전달은 인슐린 수용체와 인슐린 결합, 인산화의 경로를 거쳐 이루어지는데, 이 때 인슐린 수용체와의 결합이 억제되거나 탈 인산화가 유도되면 인슐린 작용이 억제되는 것으로 보고되고 있다.¹⁷ 이러한 탈 인산화에 중요한 효소로써 PTP-1B가 있으며 그 기능은 인슐린 수용체의 탈 인산화를 촉진하여 신호전달을 약화시키는 것으로 알려져 있다. 그러므로 인슐린 수용체의 탈 인산화를 차단하면 인슐린 감수성이 증가하여 인슐린 저항성 당뇨병인 제2형 당뇨병을 치료할 수 있는 방법에 있어 좀 더 개선할 수 있는 의의를 갖게 된다. 즉, PTP-1B의 활성을 억제하는 방법을 이용하여 인슐린 수용체의 탈 인산화를 막음으로써 제2형 당뇨병에 대한 약물개발이 이론적으로 가능하다.

PTP-1B 저해제를 발굴하기 위해서 PTP-1B 효소에 대한 전반적인 성질과 그 활성부위에 대한 지식이 필요하며, 효소에 대한 이러한 지식을 기반으로 PTP-1B가 활성화된 인슐린 수용체의 탈 인산화를 막는 여러 화합물 등의 개발이 요구된다고 할 수 있다. 일반적으로 PTPase는 transmembrane PTPase와 intracellular PTPase로 분류할 수 있는데^{1,7}, PTP-1B의 경우 탈 인산화가 일어나는 효소 활성 부위는 약 240개의 아미노산으로 이루어져 있다. 다른 종과 아미노산의 유사성을 나타내는 아미노산 sequence identity(%)는 rat, mouse, chicken등에 대해 73-80% 정도이며 효소 반응이 일어나는 부위의 주요한 아미노산은 종에 따른 차이가 없는 것으로 알려져 있다. 효소 활성 부위에서 일어나는 반응은 cysteine 215번에 의한 인산화된 tyrosine의 탈 인산화 반응이다.^{11-12,16} PTP-1B 저해제의 발굴은 이러한 활성 부위에 결합하는 기질-효소 복합체에 대한 연구를 토대로 기질과 PTP-1B 효소간의 작용에 있어 좀 더 효과적으로 그리고 좀 더 선택적으로 저해할 수 있는데 초점을 두고 있다고 할 수 있다.

본 연구는 파지 디스플레이 방법을 이용한 PTP-1B의 펩타이드 저해제를 발굴하는 것을 목적으로 하였으며, 파지 디스플레이는 표적 단백질에 결합하는 변이체들을 선택적으로 추출할 수 있고, 무작위 서열을 지닌 펩타이드들로 이루어진 변이체들을 다양한 집합으로 분류할 수 있는 효과적인 기술로 알려져 있다.³¹⁻³⁴ 본 연구는 우선 파지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝 하여 PTP-1B에 강하게 결합하는 양성 파지 클론들을 확인하였다. 무작위 7-mer 파지 디스플레이 라이브러리로부터, PTP-1B에 결합하는 양상을 보

이는 226개의 파지 클론을 확보하였고 파지 클론들과 PTP-1B의 결합 여부를 좀더 자세히 확인하기 위하여 파지 ELISA 실험을 수행하였다. 특히, PTP-1B에 강하게 결합하는 것으로 보이는 파지 클론 73개를 선택하여 무작위로 39개의 파지 클론을 선택, 추출하고 DNA 서열 분석을 수행하였다. 서열을 분석한 결과, 11개의 group으로 분류되었다. 이들 11개의 group에서 선택된 파지들을 이용하여 PTP-1B의 효소 활성 부위에 결합하고 저해할 수 있는지를 효소활성 측정법을 통해 시험 해본 결과, 다른 group에 비해서 저해 양상이 높게 관찰되는 4개의 group을 확인하였다. 이 group들의 아미노산 서열을 토대로 4개의 펩타이드를 합성하여 실험에 사용하였다.

합성된 펩타이드들 중에서 펩타이드 TAPPNKL이 DNA 서열 분석한 파지들의 30%를 차지하였고, PTP-1B를 비교적 높게 저해하는 반면, WRQTRKD 등을 포함하는 나머지 펩타이드들은 저해작용을 거의 보이지 않았다. 앞서 PTP-1B 저해물질을 스크리닝 하는 연구와 펩타이드 저해제를 발굴한 연구들이 보고된 바 있지만, 파지 디스플레이 방법을 이용하여 PTP-1B에 대한 펩타이드 저해제를 찾고자 하는 연구는 진행된 바 없으므로 본 연구에서의 저해효과를 관찰하는 실험결과에 기대를 하였다. 그러나, 4개의 펩타이드 중에서 비교적 높은 저해 양상을 띄는 TAPPNKL을 제외하고 나머지 펩타이드들은 PTP-1B의 활성을 거의 저해하지 못하는 것으로 나타났다. PTP-1B 효소의 활성은 측정 조건에 따라 즉, 사용된 기질, 반응 온도, 반응 시간, 사용된 용액의 조성, pH조건 등에 많은 영향을 받기 때문에 저해 정도를 직접 비교할 수는 없다. 하지만 본 연구에서는 다른 저해제들을 이용한 기준

의 실험과 동일한 반응 조건에서 저해 정도를 비교 해봄으로써 합성된 펩타이드들의 저해 정도를 확인하였다.

앞으로, 비교적 높은 저해 양상을 보이는 펩타이드 TAPPNKL의 아미노산 서열을 바탕으로, PTP-1B과 결합하는데 중요하게 여겨지는 아미노산 부위를 찾고 그 외 다른 아미노산 부위를 치환하는 방법을 이용하여 여러 가지 펩타이드들을 합성할 수 있을 것으로 기대된다. 그리고, 합성될 이들 펩타이드를 이용하여 PTP-1B에 대한 저해 효과를 분석할 수 있을 것이다. 이러한 향후 연구를 통해 PTP-1B에 대한 선택적이고 강력한 펩타이드 저해제를 발굴한다면, 당뇨병을 비롯한 여러 가지 대사성 질환의 치료적 약물 개발에 대한 의의가 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 파지 디스플레이 방법을 이용하여 PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지들을 추출하고, 이들 파지 중에서 PTP-1B의 효소 활성을 저해하는 파지 클론을 스크리닝 함으로써, 사람 유래 PTP-1B에 대한 펩타이드 저해제 발굴을 목적으로 하였다. 본 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 파지 디스플레이 방법을 이용하여 PTP-1B에 선택적으로 결합하는 파지 라이브러리를 구축하였고, 각 파지 별로 PTP-1B에 결합하는 친화력을 파지 ELISA를 통해 확인하였다. 228개의 파지 클론들 중에서 73개의 강한 친화력을 지닌 파지 클론을 확보하였다. 이들 73개의 파지 클론들 중에서 39개의 아미노산 서열을 분석해본 결과 각 11개의 서로 다른 집합으로 분류되는 것을 확인하였다.

2. 서로 다른 집합으로 분류된 아미노산 서열을 지닌 파지들을 이용하여 확립된 효소활성 측정법을 바탕으로 PTP-1B의 저해 정도를 확인해본 결과, 파지 그룹 1, 2, 3, 그리고 7의 네 종류가 비교적 높게 PTP-1B를 저해하는 양상을 보였다. 따라서, 이 그룹에 속한 파지 클론의 아미노산 서열을 토대로 펩타이드를 합성하였다.

3. 합성된 4종의 펩타이드 WRQ7, TAP7, LRT7과 ATK7을 이용하여 효소활성 측정법을 바탕으로 PTP-1B에 대한 저해 양상을 관찰한 결과, TAP7 펩타이드의 경우 비교적 높은 저해효과를 나타내는 반면, 나머지 펩타이드들의 경우에는 저해효과를 거의 나타내지 않았다.

이상의 결과로부터 TAP7 펩타이드는 PTP-1B에 대한 선택적인 펩타이드 저해제로서의 가능성이 보이며, 앞으로 이 펩타이드 서열을 바탕으로 체계적으로 점 돌연변이를 도입함으로써 PTP-1B의 효소 활성을 강력하고 선택적으로 저해하는 펩타이드 저해제 개발이 가능할 것으로 기대한다.

VI. 참고 문헌

1. Zhang ZY, Zhou B, Xie L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 2002;93:307-317.
2. Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998;33(1):1-5.
3. Neel BG, Tonks NK. Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1997;9:405-420.
4. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 1991;253:401-406.
5. Tonks NK. PTP1B: from the sidelines to the front lines. *FEBS Lett* 2003;546:140-148.
6. Hooft van Huijsduijnen R. Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest. *Gene* 1998;225:1-8.
7. Denu JM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2:633-641.
8. Neel BG, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:193-204.

9. Zhang ZY. Structure, mechanism, and specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Top Cell Regul* 1997;35:21-68.
10. Guan KL, Dixon JE. Evidence for protein tyrosine phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J Biol Chem* 1991;266:17026-17030.
11. Cho H, Krishnaraj R, Kitas E, Bannwarth W, Walsh CT, Anterson KS. Isolation and structural elucidation of a novel phosphocysteine intermediate in the LAR protein tyrosine phosphatase enzymatic pathway. *J Am Chem Soc* 1992;114:7296-7298.
12. Zhou G, Denu JM, Wu L, Dixon JE. The catalytic role of Cys124 in the dualspecificity phosphatase VHR. *J Biol Chem* 1994;269:28084-28089.
13. Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem* 1993;268:11479-11481.
14. Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J* 1993;12:4843-4856.
15. Barford D, Flint AJ, Tonks NK. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 1994;263:1397-1404.

16. Zhang ZY, Dixon JE. Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* 1993;32:9340-9345.
17. Goldstein BJ, Bitter-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein tyrosine phosphatase 1B. possible facilitation by the formation of a ternary complex with the GRB2 adaptor protein. *J Biol Chem* 2000;275:4283-4289.
18. Tonks NK, Neel BG. From to function. Signaling by protein tyrosine phosphatase. *Cell* 1996;87:365-368.
19. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 1993;74:143-156.
20. Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L, Tsui FW. Mice with mutations in the hematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 1993;4:124-129.
21. Johnson TO, Ermoloeff J, Jirous MR. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:696-709.
22. Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, Yi T, Ihle JN, Matthews RJ et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993;73:1445-1454.

23. Ren JM, Li PM, Zhang WR, Sweet LJ, Cline G, Shulman GI et al. Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. *Diabetes* 1998;47:493-497.
24. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283:1544-1548.
25. Yon-Ten KE, Muise ES, Itie A, Michaliszyn E, Wagner J, Jothy S et al. Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J Exp Med* 1997;186:683-693.
26. Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, Shen R, Rossi DJ, Shalaby F et al. Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J* 1997;16:2352-2364.
27. Cote JF, Charest A, Wagner J, Tremblay ML. Combination of gene targeting and substrate trapping to identify substrates of protein tyrosine phosphatases using PTP-PEST as a model. *Biochemistry* 1998;37:13128-13137.
28. Wiesmann C, Barr KJ, Kung J, Zhu J, Erlanson DA, Shen W et al. Allosteric inhibition of Protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:730-737.
29. Burke TR., Kole HK., Roller PP. Potent inhibition of insulin receptor dephosphorylation by a hexamer peptide containing the phosphotyrosyl mimetic F2Pmp. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:129-134.

30. Liljebris C, Larsen SD, Ogg D, Palazuk BJ, Bleasdale JE. Investigation of potential bioisosteric replacements for the carboxyl groups of peptidomimetic inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: identification of a tetrazole-containing inhibitor with cellular activity. *J Med Chem* 2002;45:1785-1789.
31. Wrobel J, Sredy J, Moxham C, Dietrich A, Li Z, Sawicki DR et al. PTP-1B inhibition and antihyperglycemic activity in the ob/ob mouse model of novel 11-arylbenzo[b]naphtho[2,3-d]furans and 11-arylbenzo[b]naphtho[2,3,-d]thiophenes. *J Med Chem* 1999;42:3199-3202.
32. Il'ichev AA, Minenkova OO, Tat'kov SI, Karpyshev NN, Eroshkin AM. Production of a viable variant of the M13 phage with a foreign peptide inserted into the basic coat protein. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1989;307:481-483.
33. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318.
34. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315-1317
35. Uetz P. Two-hybrid arrays. *Curr Opin Chem Biol* 2001;6:57-62.
36. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990;249:386-390.
37. Cwirla SE. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6378-6382.

38. Devlin JJ. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 1990;249:404-406.
39. George P. Smith, Valery A. Petrenko. Phage Display. *Chem Rev* 1997;97:391-410.
40. Watters JM, Telleman P. and Junghans RP. An optimized method for cell based phage display panning. *Immunotechnology* 1997;3:21-29.
41. Huyer G., Liu S. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* 1997;272:843-851.
42. Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 1999;274:34543-34546.

Abstract

**Screening of potent peptide inhibitors for
protein tyrosine phosphatase-1B by phage display technique**

Su-jeong Choi

Division of Medical Sciences, The Graduate School, Yonsei University

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences

(Directed by Professor Jongsun Kim)

The reversible protein tyrosine phosphorylations, controlled by competing activities between protein-tyrosine kinases (PTKs) and protein-tyrosine phosphatases (PTPs), are critically involved in regulating many cellular signaling processes. PTPs have been considered to have extremely low substrate specificity, since they are known to dephosphorylate multiple target molecules unrelated to one another, when assayed *in vitro*. However, recently reported knockout mice, deficient of particular PTPs, all appear to exhibit unique phenotypes, suggesting that each PTP might have a specific target. Studies of PTP-1B knockout mice show that PTP-1B is a major negative regulator of insulin signaling, and the loss of PTP-1B activity leads to enhanced

insulin sensitivity and obesity resistance. These findings suggest a need to develop a selective PTP-1B inhibitor.

In this study, we used the phage display technique to screen peptide inhibitors for PTP-1B and to identify peptides that bind to the catalytic domain of human PTP-1B. Selected phages that bound to PTP-1B were eluted, and then the phage DNA sequences were analyzed. After analyzing the phage DNA sequences, independent phage clones were tested whether they could inhibit the catalytic activity of PTP-1B. Based on the amino acid sequences of phage clones which inhibited PTP-1B, four peptides, WRQ7 (WRQTRKD), TAP7 (TAPPNKL), LRT7 (LRTNSTL), and ATK7 (ATKTRRP) were synthesized. Using these synthetic peptides, PTP-1B inhibition assay was performed. TAP7 peptide appeared to significantly inhibit PTP-1B activity, but WRQ7, LRT7, and ATK7 peptides did not inhibit PTP-1B activity. These results suggest that TAP7 peptide can be used to develop a better peptide inhibitor for PTP-1B. Inhibitory potential and selectivity of TAP7 peptide could be improved by introducing point mutations on the TAP7 sequence in a systematic manner.

Key word: Protein tyrosine phosphatase, PTP-1B, Phage display, Peptide inhibitor