

코카인 결합과 관련된 도파민 수송체의 아미노산 구조

장미윤* · 진대준* · 오동렬** · 이용성* · 이상훈**

*한양대학교 의과대학 생화학교실 및 정신건강연구소, **국립정신병원

(Received July 15, 1999)

Amino Acid Structure of Dopamine Transporter Responsible for Cocaine Binding

Mi-Yoon Chang*, Dae-Joon Cheon*, Dong-Yul Oh**,
Yong-Sung Lee* and Sang-Hun Lee**

*Department of Biochemistry and Institute of Mental Health Hanyang University College of Medicine

**Seoul National Mental Hospital

Abstract – Human and bovine dopamine transporters (DAT) demonstrate discrete functional differences in the dopamine (DA) transport and cocaine binding. The functional analyses on the chimeras of human and bovine DAT have revealed that the region from the 133rd to 186th residue(encompassing the 3rd transmembrane domain (TM)) is responsible for the substrate transport and cocaine binding. The present studies have been done to find out the specific amino acid(s) which is essential for the binding of cocaine to DAT by interchanging the amino acids in that region between human and bovine DAT. When isoleucine, the 152nd residue of chimera B3 (bovine DAT sequence), was transformed back to valine, the human DAT residue at the identical position, the cocaine binding was remarkably recovered to 98% of the human DAT values. In addition, the cocaine binding of the human DAT was decreased by 57% by substituting isoleucine for valine at position 152. When isoleucine at position 152 of the chimera B3 was converted to the other amino acids to provide an possible molecular basis for the functional role of the 152nd residue, only the conversion to alanine among the amino acids tested significantly increased the cocaine binding by 34%, but these effects were not as much as those by the conversion to valine. In conclusion, valine at position 152 is a crucial amino acid for the interaction of cocaine to the DAT.

Keywords □ Dopamine transporter, cocaine binding, site-directed mutagenesis.

도파민(dopamine)은 대뇌에서 운동과 각종 호르몬의 분비 및 행동양상 변화 등의 기능조절을 시행하고 있는 가장 중요한 신경전달물질 중의 하나이다. 신경세포(presynaptic terminal)로의 도파민의 재흡수는 신경연접(synaptic)부위와 세포 외부의 도파민 농도를 조절하고, presynaptic 및 postsynaptic 수용체에서의 도파민의 활성을 제한하는 역할을 하는 도파민 수송체(DAT)라고 하는 특이적인 막단백질에 의해서 조절되어진다(Kuhar and Zarbin, 1978; Kanner and Schul-

diner, 1987; Horn, 1990; Johnstone, 1990; Shimada *et al.*, 1991; Uhl, 1992; Iversen, 1992). 도파민 수송체는 이와 같이 도파민의 신호 전달을 조절하는 정상 생리 기능 이외에도, 신경독, 항우울제, 및 코카인 같은 정신흥분제의 작용부위가 된다. 그래서 코카인 중독과 파킨슨씨병, 정신분열증, 및 Gilles de la Tourette syndrome 등의 정신질환과도 깊은 관련이 있는 것으로 보고되어 있다. 또한 여러 신경 독성 물질들이 본 수송체를 통해 신경세포 내로 침입되며, 항우울제를 비롯한 각종 정신 신경계 약물들도 본 수송체에 결합하여 그 작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다(Ritz *et al.*, 1987; Bergman *et al.*, 1989; Speal-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-2290-0620 (팩스) 02-2294-6270

man *et al.*, 1989). 특히 코카인은 도파민 수송체에 특이적으로 결합하는데 이로 인해 도파민 흡수를 억제하며 코카인 중독증을 유발한다(Ritz *et al.*, 1987; Kuhar *et al.*, 1991; Kuhar *et al.*, 1992).

사람과 흰쥐의 도파민 수송체의 도파민 수송능과 코카인 결합력은 비교적 높게 나타나고 있으나, 소 도파민 수송체에서는 그 값이 사람에 비해 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 1996). 따라서 도파민 수송체 단백질의 chimeric 접근을 통한 중간 도파민 수송체의 기능적 다양성 연구는 도파민 수송체의 구조적, 기능적인 관계와 코카인의 인식 위치를 밝혀줄 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 가설 하에 사람과 소의 도파민 수송체 사이의 재 조합된 chimera를 기능적으로 분석한 결과, 사람 도파민 수송체 기능의 절대적 역할을 하는 곳이 세 번째 세포막 통과부위(the 3rd TM)을 둘러싼 부위라는 것은 이미 증명되었다(Lee *et al.*, 1998). 그러나 이러한 연구는 도파민 수송체의 구조적, 기능적 중요한 실마리는 제공하였으나 도파민 수송체의 보다 상세한 작용기전을 설명하기에는 미흡했다. 그래서 도파민 수송체의 기능을 더욱 명확히 하기 위해서 세 번째 세포막 통과부위(the 3rd TM)을 둘러싼 영역의 기능과 구조 사이의 관계를 명확히 밝혀야 한다는 것이 제안되었으며, 본 연구는 코카인 결합력과 관련하여 세 번째 세포막 통과부위(the 3rd TM)을 둘러싼 부위의 기능적 중요성에 기여하는 아미노산을 결정하는데 방향을 두었다. 이 부위내에서 사람 도파민 수송체와 소 도파민 수송체 간의 54개의 아미노산 염기서열 중 차이를 보이는 곳은 7개가 있었으며, 본 실험에서는 chimera B3에서 7개의 소 도파민 수송체의 아미노산을 site-directed mutagenesis에 의해 사람 도파민 아미노산으로 변환 시켰다(Fig. 1). 또한 사람 도파민 수송체에서 이 7개의 특정 아미노산 중 하나를 그 특정 아미노산에 해당되는 소 도파민 수송체의 아미노산으로 치환한 사람 돌연변이 도파민 수송체를 제조하여 활성변화를 관찰하고 이를 자연형태 수송체 및 chimeric 수송체의 활성과 비교 검토하였다.

실험방법

돌연변이 도파민 수송체 유전자의 제조 - 먼저 Lee 등(1998)의 방법으로 도파민 수송체 chimera B3, 즉 사람 도파민 수송체의 염기서열 133번째에서 186번째

지의 영역인 세 번째 세포막 통과부위(the 3rd TM)을 둘러싼 부위를 소 도파민 수송체의 같은 부위로 치환한 chimeric 도파민 수송체 cDNA를 제조하고, 이를 이용하여 진핵세포 발현 유전자 pCDNA3.1(+)(Invitrogen Co., San Diego, CA, USA)-based plasmid를 만들었다.

이 부위(the 3rd TM) 내에서 사람 도파민 수송체와 소 도파민 수송체 간의 54개의 아미노산 염기서열 중 차이를 보이는 곳은 7개가 있었으며, chimera B3에서 7개의 소 도파민 수송체의 아미노산을 site-directed mutagenesis에 의해 사람 도파민 아미노산으로 변환 시켰다. 또한 사람 도파민 수송체에서 이 7개의 특정 아미노산 중 하나를 해당되는 소 도파민 수송체의 염기로 치환한 돌연변이 사람 도파민 수송체를 제조하였다. 이때 site-directed mutagenesis는 QuickChange^R site-directed mutagenesis system(Stratagene, LaJolla, CA, USA)을 사용하여 시행하였다.

Site-directed mutagenesis 후, 돌연변이 부위를 644-base-pair HindIII-ScaI(nucleotide 1-644) DNA 조각에서 분리하였고, chimera B3 cDNA에 삽입하였다. 그 후 돌연변이된 조각의 염기서열은 Cy5TM AutoreadTM automatic sequencing system(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하여 DNA 염기서열을 결정함으로써 확인하였다.

본 연구에서 사용된 용어들은 Chi B3(I152V)를 예로 들면, chimera B3에서 152번째 아미노산인 isoleucine을 valine으로 돌연변이 시켰다는 뜻이고, hDAT(V152I)는 사람 도파민 수송체에서 152번째 아미노산인 valine을 isoleucine으로 돌연변이 시켰다는 뜻으로 사용하였으며, 다른 돌연변이의 용어에도 이와 같은 방법으로 적용하였다.

도파민 수송체의 코카인 결합력 측정 - 자연형태의 도파민 수송체 cDNA와 돌연변이된 도파민 수송체 cDNA를 각각 pCDNA3.1(+에 삽입시키고 FuGENETM6 transfection reagent(Boehringer Mannheim Co., Mannheim, Germany)를 사용하여 COS-7 세포에 발현 시켰다. 그 후 24-well plate에 COS-7세포를 각 well당 3×10^4 개씩 접종하고 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에서 24시간 동안 배양했다. 각 well당 0.3 μ g의 DNA를 0.5 μ l의 FuGENETM6 reagent와 혼합하여 상온에서 15분간 배양하였다. 이 DNA-

FuGENE™6 복합체를 세포들에 첨가한 후 이틀간 배양하고, 변형된 Krebs-Ringer HEPES(KRH) 완충액 [23 mM HEPES(pH 7.4), 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5.6 mM glucose, 1 mM sodium ascorbate] 속에서 코카인의 유사물질인 2β-carbomethoxy-3β-(4-fluorophenyl)tropane ([³H]CFT, [³H]WIN35,428)의 결합력을 측정하였다. 각 세포들은 변형된 KRH 완충액으로 세척하고 10 nM의 [³H]CFT(87 Ci/mmol, Dupont-New England Nuclear Co., Boston, MA, USA)가 함유된 KRH 완충액에서 4°C로 2시간 동안 세포를 배양시켰으며, NaOH용액으로 세포를 용해시키고 Liquid Scintillation Counter를 사용해 방사선 양을 측정하였다. 이때 도파민 수송체 cDNA 가 삽입되지 않은 pCDNA3.1 벡터를 동일한 조건하에 세포 내로 도입하고 동일한 방법으로 각 도파민 수송체의 각각의 수송능과 결합력 값으로부터 특이적 수송능과 결합력을 결정하였다.

실험결과

Chimera B3의 단일 아미노산 치환 - 사람 도파민 수송체의 세 번째 세포막 통과부위(the 3rd TM)를 포함하는 부분(133번째부터 186번째 염기서열)을 소 도파민 수송체로 치환시킨 chimera B3는 코카인 결합력이 사람 도파민 수송체의 20.3±5.5% 수준으로 감소

하였다(Lee *et al.*, 1998, Fig. 2). 이러한 코카인 결합력의 감소에 중요한 역할을 하는 아미노산을 찾기 위하여 chimera B3에서 소의 염기서열에 해당하는 각각의 염기를 본래의 사람 도파민 수송체 염기로 되돌린 후 도파민 수송체의 활성도를 측정하였다.

Chimera B3의 1st intracellular loop 139 번째 위치에 있는 alanine을 같은 위치의 사람 도파민 수송체 염기인 lysine으로 전환시켰을 때(Chi B3(A139K)), 코카인 결합력에 아무런 영향을 미치지 못하고 chimera B3 에서와 같이 낮게 관찰되었다(Fig. 2). 또한 chimera B3의 2nd extracellular loop에 있는 아미노산(168, 178, 182번째)들을 위와 같은 방법으로 전환시켰을 때 코카인 결합력은 약간 상승하였으나 사람 수송체의 활성에는 현저히 미치지 못하였다.

사람과 소의 도파민 수송체의 세번째 세포막 통과 부위에서 3가지의 아미노산에서 차이를 보이는데, 사람 도파민 수송체의 143번째 phenylalanine과 소의 tyrosine, 145번째 valine과 alanine, 152번째 valine과 isoleu- cine 등이 이에 해당된다. 이 중, 143번째와 145번째 chimera B3의 염기를 사람 도파민 수송체 아미노산으로 변환(Chi G (Y143F), Chi G(A145V))시켰을 때 코카인 결합력은 chimera B3과 별 차이가 없

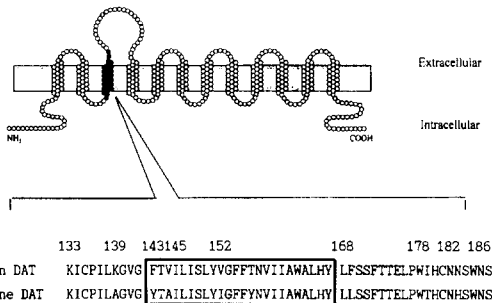


Fig. 1 - Schematic of the chimera B3 structure. The region consist of filled circles represents the bovine DAT sequences comprising from the 133rd to 186th position, whereas the portion of open circle represent the human DAT sequences. Comparison of primary amino acid sequences from the 133rd to 186th amino acid residue in human and bovine DAT. The region in box indicate the 3rd transmembrane domain.

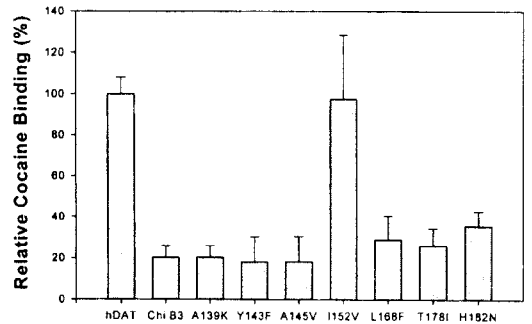


Fig. 2 - Cocaine binding activities of the chimera B3 mutants. Each of amino acids in the substituted region of chimera B3 (amino acid 133-186) was transformed back to that of the human DAT sequences, then followed by the functional assays. The term I152V as an example, refers to the mutation of 152nd amino acid isoleucine to valine in chimera B3. The identical way of designation is applied to the other mutations. Cocaine bindings were determined by incubating with 10 nM [³H]CFT for 2 hours at 4°C, as described in the text. The column represent the means and the vertical lines represent SEM as determined from four to ten independent experiments performed in duplicate.

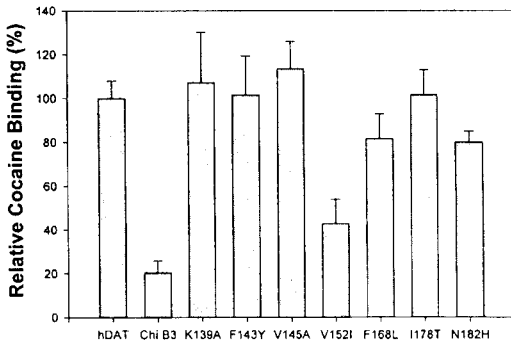


Fig. 3—Effects of amino acid substitutions on the cocaine binding activities of the human DAT. Cocaine binding assays were done on the human DAT mutants in which one of the seven amino acids in the region from the 133rd to 186th residue was substituted by the respective one of bovine DAT. The term V152I designate the mutation on the 152nd residue of the human DAT from valine to isoleucine. The identical way of designation is applied to the other mutations. The column represent the means and the vertical lines represent SEM as determined from four to ten independent experiments performed in duplicate.

었다 (Fig. 2). 그러나 152번째 isoleucine을 valine으로 변환하였을 때 코카인 결합력이 사람 도파민 수송체의 활성도의 97.5±30.8%까지 회복하는 양상을 보였다 (Fig. 2). 이는 chimera B3의 152번째 아미노산이 기능 결합에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 것이다.

사람 도파민 수송체의 단일 아미노산 치환 - 이번에는 152번째 염기인 valine의 기능적 중요성을 재차 확인하기 위하여 다른 방법의 돌연변이, 즉 사람 도파민 수송체 3rd TM 부위의 아미노산을 소 도파민 수송체의 대응되는 아미노산으로 변환을 시켰다. Fig. 3에 나타나는 바와 같이, 152번째 valine을 isoleucine으로 변환한 hDAT(V152I)을 만들어서 코카인 결합력을 측정하였을 때 사람 도파민 수송체의 42.7±11.1% 수준으로 의미 있는 감소를 보였다. 한편 168번째 및 182번째 아미노산의 치환시에는 약간의 코카인 결합력 감소 현상을 관찰할 수 있었으나, 152번째 아미노산과 같은 현저한 효과는 관찰할 수 없었다. 그 외 사람 도파민 수송체의 139, 143, 145, 178번째 아미노산을 소 도파민 수송체의 아미노산으로 변환 시에는 코카인 결합력에 의미 있는 변화가 없었다.

Chimera B3의 152번째 isoleucine의 치환 - 먼저, 도파민 수송체의 코카인 결합력과 관련된 152번째 아

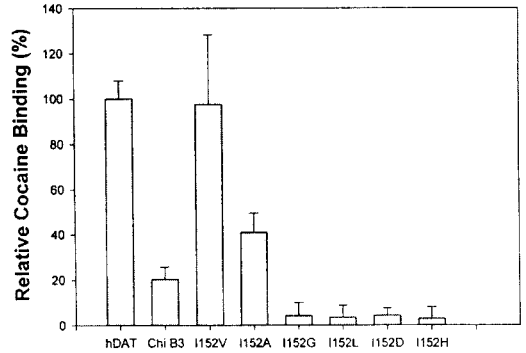


Fig. 4—Effects of the substitutions of isoleucine to various amino acids at position 152 of the chimera B3. The conversions of isoleucine to the other monoamino-, monocarboxylic-amino acids or amino acid whose side groups are similar to that of leucine were followed by the functional assays for DAT. The column represent the means and the vertical lines represent SEM as determined from four to ten independent experiments performed in duplicate.

미노산 valine의 역할이 side chain의 길이에 영향받는지 여부를 검증하기 위하여 chimera B3의 152번째 isoleucine을 다른 monoamino, monocarboxylic 아미노산으로 변환시켰다. 그 결과 isoleucine을 alanine으로 변환시켰을 때 chimera B3의 코카인 결합력이 사람 수송체의 50% 이상 수준으로까지 증가하였으나 valine으로의 변환했을 때보다는 크게 미치지 못하였다 (Fig. 4). 그 외 leucine이나 glycine으로 변환 시에는 chimera B3의 활성에 전혀 영향을 주지 못하였다.

또한 도파민 수송체의 기능을 결정하는 것이 152번째 염기의 side group의 크기에 영향받는지를 검증하기 위하여 isoleucine을 valine과 크기가 비슷한 aspartic acid나 histidine으로 변환시켜 보았으나 chimera B3 기능에는 큰 영향을 주지 못하였다. 이러한 결과는 152번째 위치의 아미노산의 크기가 도파민 수송체의 코카인 결합기능을 결정하는 요인이 아니라는 것을 말해 주는 것이다.

고 찰

도파민 수송체는 presynaptic neuron의 세포막에 존재하는 당단백으로서 중추신경계에서 기억, 운동신호 전달, 약물중독 등과 깊은 관련이 있는 도파민성 신호 전달을 조절하는 주체로 알려져 있다(Kuhar and

Zarbin, 1978; Kanner and Schuldiner, 1987; Johnstone, 1990; Iversen, 1975). 또한 임상적으로 코카인 중독과 파킨슨씨병, 정신분열증 등의 정신과적 병변과의 직접적인 관련성이 입증(Ritz *et al.*, 1987; Bergman *et al.*, 1989; Spealman *et al.*, 1989)됨으로써 의학적으로 가장 관심이 집중되어지고 있다. 그 구조는 분자량이 60~80 kDa 내외로 추정되며 12개의 세포막 통과 부위와 5개의 세포막내 고리 및 6개의 세포막외 고리로 구성되어 있다. 또한 2번째 세포막외 고리가 다른 고리에 비해 크고 N-말단과 C-말단이 모두 세포막내에 존재한다는 것이 특징이다. 지금까지 도파민 수송체의 기능을 결정하는 기본 구조를 확인하려는 여러 연구(Kitayama *et al.*, 1992b; Kitayama *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995; Buck *et al.*, 1995; Giros *et al.*, 1994; Pifl *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998)가 시행되어 왔으나, 아직 까지 명확하게 판명되지 않고 있다. 도파민 수송체와 같은 monoamine 수송체 계열로서 코카인 결합력을 갖는, 세로토닌 수송체(serotonin transporter: SERT)의 경우, 3번째 세포막 통과 부위중 172 번째와 179 번째 isoleucine이 기능을 결정하는데 중요한 역할을 하고(Chen *et al.*, 1997), 이 두 monoamine 수송체의 1 번째 세포막 통과 부위의 aspartate(쥐 세로토닌 수송체의 98 번째와 사람 도파민 수송체의 79 번째)의 돌연변이체에서는 기질 수송력과 코카인 결합력의 결함이 생기는 것으로 보고 되었다(Barker *et al.*, 1999, Kitayama *et al.*, 1992). 현재의 연구들은 도파민 수송체의 기질 수송능과 코카인 결합력의 기전과 분자 구조를 밝히는 쪽으로 접근하고 있다.

본 연구에서는 도파민 수송체의 3rd TM을 포함하는 부위(아미노산 133-186)가 수송체의 활성 발현에 중요한 역할을 한다는 것에 기초하여 이 부위에서 도파민 수송체의 코카인 결합력에 관여하는 특정 아미노산을 찾아내고자 하였다. 소수성 분석(hydrophobic analysis)에 기초를 둔 도파민 수송체의 가상 구조도에 따르면(Uhl and Hartig, 1992; Amara and Kuhar, 1993; Giros and Caron, 1993), 아미노산 133번째에서 186번째까지의 지역은 the 1st intracellular loop(133-142), the 3rd TM(143-166), 및 the 2nd extracellular loop(167-186) 등을 포함한다(Fig. 1).

사람 도파민 수송체에 소 도파민 수송체 3rd TM 부위를 포함한 부위(133번째에서 186번째 아미노산)를

치환시키면 도파민 수송체의 도파민 수송능과 코카인 결합력이 감소한다는 연구 결과(Lee *et al.*, 1998)로 이 부위의 어떤 아미노산이 도파민 수송체의 이러한 기능감소에 결정적인 역할을 할 것이라는 가설을 세울 수 있었다. 사람과 소의 도파민 수송체의 이 부위 염기서열을 비교해보면 54개중에서 7개만 다른 것을 알 수 있다. 따라서 이 7개의 서로 다른 아미노산을 site-directed mutagenesis를 통해 상호 교차 시켜 3rd TM을 둘러싼 부위의 기능적 중요성에 기여하는 아미노산을 결정하고자 하였다.

이들 화합물의 planar aromatic moieties가 소수성 결합 및 반데르발스결합시의 표면과 유사하다고 믿어지고 있기 때문에 monoamine의 암모늄 말단이 수송체의 음전하를 지닌 아미노산과 연관돼 있다는 것은 알려져 있다(Maxwell *et al.*, 1976; DePaulis *et al.*, 1978). 이러한 가설 하에서는 사람 도파민 수송체의 168번째 염기인 phenylalanine이 도파민 및 코카인과 효율적으로 반응할 수 있고, chimera B3의 168번째 염기인 leucine은 그렇지 못하다고 가정되고 있다. 사람과 소의 도파민 수송체의 143번째와 178번째 아미노산은 그들의 소수성(hydrophobicity)에 있어서 상대적으로 다르다. 143번째 아미노산은 사람 도파민 수송체에서는 phenylalanine이지만 소 도파민 수송체에서는 tyrosine고, 178번째에서는 사람에서는 isoleucine이지만 소에서는 threonine이다. 아미노산의 소수성(hydrophobicity)이 단백질의 기능적 구조를 결정하는 중요한 요소가 된다는 것을 고려한다면, 3rd TM을 포함하는 부위의 치환으로 생기는 기능적 결함이 이 아미노산들 때문일 것이라고 가정될 수 있을 것이다. 그러나 본 연구의 결과는 이 이론적 가설에 부합되지 않았다. 먼저 사람과 소의 143, 168, 및 178번째 위치의 염기를 서로 치환하였을 때 비록 168번째 염기의 치환에서만 코카인 결합력에 약간의 영향을 주었을 뿐 다른 도파민 수송체의 코카인 결합에는 아무런 변화를 주지 못하였다. 반면에 chimera G의 152번째 염기인 isoleucine을 valine으로 치환하였을 때 코카인 결합력이 사람 도파민 수송체의 값만큼 극적으로 증가하였다. 마찬가지로 사람 도파민 수송체의 기능적 활성도는 valine에서 isoleucine으로 치환하였을 때 거의 chimera B3 수준으로 감소함을 보였다. 이러한 발견은 도파민 수송체의 152번째 염기가 사람 도파민 수송체의 3rd TM 부위를 포함한 부위의 전환 시에 관

찰되는 기능적 결합에 책임이 있다는 것을 밝혀 주었고, 그래서 152번째 염기인 valine이 사람 도파민 수송체의 코카인 결합에 있어서 절대적이고 핵심적인 역할을 한다는 것이 입증되었다.

Chimera B3과 사람 도파민 수송체의 152번째 염기인 isoleucine과 valine을 비교해 보면 둘 다 side group이 단지 hydrocarbon chain으로 구성된 mono-amino-, monocarboxylic-아미노산이라는 것을 알 수 있다. 그들의 소수성(hydrophobicity)을 포함한 물리화학적 성향은 거의 동일하다. 그러므로 이러한 치환이, 물론 예외도 있겠지만, 도파민 수송과 코카인의 결합에 영향을 주는 수송체의 2차적 혹은 3차적 구조의 근본적인 변화를 주지는 못하는 것으로 보인다. 그 대신 단지 기질을 인식하고 전환시키는데 있어서는 어떤 특이한 화학적 그룹이 관여 할 것으로 생각되어진다. 이들 chimera B3과 사람 도파민 수송체의 152번째 염기인 isoleucine과 valine의 차이점은 단지 hydrocarbon chain의 길이와 side group이 차지하는 크기에서만 다르다. Chimera B3의 152번째 위치의 isoleucine을 alanine으로 전환 시 기능적 활성도가 의미 있게 증가하였으나, valine으로 전환시의 값에는 못 미치는 결과였다. 반면 isoleucine을 glycine이나 leucine으로 전환 시에는 기능적 활성도에 영향을 주지 못하였다.

또한 본 연구에서는 chimera B3의 isoleucine을 valine과 크기가 비슷한 aspartic acid와 proline으로 전환 시켜보았으나 chimera B3의 152번째의 aspartic acid와 proline은 도파민 수송체의 기능을 회복시키지 못하였다. 이런 결과들은 152번째 염기의 크기가 도파민 수송체의 코카인 결합을 특이화시키는데 중요할지는 모르나 유일한 요소가 아니라는 것을 제시해 준다.

152번째 염기의 기능적 중요성과 더불어 본 연구의 결과는 182번째 위치의 asparagine와 168번째 위치의 phenylalanine이 코카인 결합에 관여한다는 것을 암시해 준다. 그러나 아직 이들 아미노산의 구체적 기능이나 구조적 모델에 대해서는 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 코카인 결합과 관련하여 도파민 수송체의 핵심적인 특정 아미노산을 밝혀주었고, 이번 연구에서 밝혀진 염기와 관련된 더 고차원적인 구조가 밝혀진다면 도파민 수송체로의 도파민 및 코카인 작용 기전에 대한 분자생물학적 기초가 확립되어질 것으로

사료된다.

결 론

본 연구에서는 도파민 수송체의 코카인 결합에 중요한 역할을 하는 특이 아미노산을 규명하기 위하여, 사람 도파민 수송체와 chimera B3의 아미노산을 서로 교차 변환시켜 돌연변이된 수송체의 코카인 결합력을 서로 비교, 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 3rd TM 부위를 포함한 부위(133번째에서 186번째 염기)가 소의 아미노산 서열로 치환된 사람의 chimera B3 수송체 코카인 결합력은 사람 도파민 수송체의 $20.3 \pm 5.5\%$ 수준으로 감소되었다.

2. chimera B3의 152번째 아미노산 isoleucine을 valine으로 치환하였을 때 코카인 결합력은 사람 도파민 수송체 활성의 $97.5 \pm 30.8\%$ 까지 회복되었다.

3. 사람 도파민 수송체의 152번째 valine을 isoleucine으로 치환하였을 경우, 코카인 결합력은 자연형태 사람 도파민 수송체의 $42.7 \pm 11.1\%$ 수준으로 의미 있는 감소를 보였다.

4. chimera B3의 152번째 isoleucine을 다른 monoamino-, monocarboxylic 아미노산인 alanine으로 변환시켰을 때 코카인 결합력은 약간 증가하였으나 valine과 크기가 비슷한 aspartic acid나 histidine으로 변환시켰을 경우에는 의미 있는 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과는 도파민 수송체의 코카인 결합에 152번째 아미노산 valine의 역할이 중요함을 의미한다. 또한 valine의 기능이 아미노산 side chain의 크기에 따른 공간배치에 있기보다는 전하에 의한 코카인과의 결합특이성을 결정짓는데 있음을 시사하는 것으로 판단된다.

문 헌

- 1) Amara, S. G. and Kuhar, M. J.: Neurotransmitter transporters. Recent progress. *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**, 73 (1993).
- 2) Barker, E. L., Moore, K. R., Rakhshan, F. and Blakely R. D.: Transmembrane domain I contributes to the permeation pathway for serotonin and ions in the serotonin transporter. *J. Neurosci.* **19**, 4705 (1999).
- 3) Bergman, J., Madras, B. K., Johnson, S. E., and Speelman, R. D.: Effect of cocaine and related drugs

- in nonhuman primates III. self-administration by squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **251**, 150 (1989).
- 4) Buck, K. J. and Amara, S. G. : Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12584 (1994).
 - 5) Buck, K. J. and Amara, S. G. : Structural domains of catecholamine transporter chimeras involved in selective inhibition by antidepressants and psychomotor stimulants. *Mol. Pharmacol.* **48**, 1030 (1995).
 - 6) Chen J. G., Sachpatzidis A. and Rudnick G. : The third transmembrane domain of the serotonin transporter contains residues associated with substrate and cocaine binding. *J. Biol. Chem.* **272**, 28321 (1997).
 - 7) DePaulis, T., Kelder, D., and Ross S. B. : On the topology of the norepinephrine transport carrier in rat hypothalamus. The site of action of tricyclic uptake inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **14**, 596 (1978).
 - 8) Giros, B., Mestikawy, S., Godinot, N., Zheng, K., Han, H., Yang-Feng, T. and Caron, M. G. : Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol. Pharmacol.*, **42**(3), 383 (1992).
 - 9) Giros, B., and Caron, M. G. : Molecular characterization of dopamine transporter. *Trend in Pharm. Sci.*, **14**, 43 (1993).
 - 10) Giros B., Wang Y. M., Suter S., McLeskey S. B., Pifl C., and Caron M. G. : Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J. Biol. Chem.* **269**, 15985 (1994).
 - 11) Horn, A. S. : Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Prog. Neurobiol.* **34**, 387 (1990).
 - 12) Iversen L. L., In *Handbook of psychopharmacology*. New York, Plenum press, p. 381 (1975).
 - 13) Iversen L. L. : Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmitter. *Crit. Rev. Biochem.*, **22**, 1 (1992).
 - 14) Kitayama S., Shimada S., Xu H., Markham L., Donoban D. M., and Uhl G. R. : Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7782 (1992).
 - 15) Kitayama S., Wang J. B., and Uhl G. : Dopamine transporter mutants selectively enhance MMP⁺ transport. *Synapse* **15**, 58 (1993).
 - 16) Kuhar, M. J. and Zarbin, M. A. : Synaptosomal transporter: a chloride dependence for choline, GABA, glycine, and several other compounds. *J. Neurochem.*, **31**, 251 (1978).
 - 17) Kuhar M. J., Ritz M. C., and Boja J. W. : The dopamine hypothesis of reinforcing properties of cocaine. *Trends. Neurosci.* **14**, 299 (1991).
 - 18) Kuhar, M. J. : Molecular pharmacology of cocaine : a dopamine hypothesis and its implication. *Ciba Found Symp.*, **166**, 81(1992).
 - 19) Lee, S. H., Rhee J., Koh, J. K., and Lee, Y. S. : Species differences in functions of dopamine transporter : paucity of MPP⁺ uptake and cocaine binding in bovine dopamine transporter. *Neurosci. Lett.* **214**, 199 (1996).
 - 20) Lee, S. H., Kang, S. S., Son, H., and Lee, Y. S. : The region of dopamine transporter encompassing the 3rd transmembrane domain is crucial for function. *BBRC* **246**, 347-352 (1998).
 - 21) Maxwell, R. A., Ferris, R. M., and Burscu, J. E. : *Mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines*, p. 95. Raven Press, New York (1976).
 - 22) Pifl, C., Giros, B., and Caron, M. G. : The dopamine transporter: the cloned target site of Parkinsonism-inducing toxins and of drugs of abuse. *Adv. Neurol.* **69**, 235 (1996).
 - 23) Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, S. R. and Kuhar, M. J. : Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*, **237**, 1219 (1987).
 - 24) Shimada, S., Kitayama, S., Lin, C. L., Patel, A., Nanthakumar, E., Gregor, P., Kuhar, M., and Uhl, G. : Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* **254**, 576 (1991).
 - 25) Spealman, R. D., Madras, B. K. and Bergman, J. : Effect of cocaine and related drug in nonhuman primates II. Stimulant effects on schedule-controlled behavior. *J. Pharmacol Exp Ther* **261**, 142 (1989).
 - 26) Uhl, G. R. : neurotransmitter transporters (plus)

- promising new gene family. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 421 (1992).
- 27) Uhl, G. R., and Hartig, P. R. : Transporter explosion : uptake on uptake. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 421 (1992).
- 28) Wang J. B., Moriwaki A., and Uhl, G. R. : Dopamine transporter cysteine mutants : second extracellular loop cysteines are required for transporter expression. *J. Neurochem.* **64**, 1416 (1995).