

## M<sub>1</sub> Muscarine 성 수용체에서 <sup>123</sup>Arginine 잔기의 Site-mutagenesis 가 신호전달계에 미치는 영향

이 석 용<sup>#</sup>

성균관대학교 약학부

(Received January 10, 2000)

### Effects of Site-mutagenesis of <sup>123</sup>Arginine residue in M<sub>1</sub> Muscarinic Receptor on the Signal Transduction System

Seok-Yong Lee<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

**Abstract** — An exceptionally conserved sequence that is shared among most G protein-coupled neurotransmitter receptors is an aspartate-arginine-tyrosine triplet that is located at the second cytoplasmic domain. Using the m1 subtype of muscarinic acetylcholine receptors as an example, a point mutation of the arginine residue at position 123 into asparagine was induced. This mutation resulted in a complete blockade of the carbachol-induced increases of PI hydrolysis and intracellular Ca<sup>2+</sup> level, in spite of the expression of the wild-type and mutant receptors at similar concentrations in Chinese hamster ovary cells. In marked contrast, the muscarinic agonist carbachol induced concentration-dependent enhancement of the activity of NO synthase at mutant m1 receptors although the enhancement was significantly smaller than at wild-type m1 receptors. These data suggest that this highly conserved arginine residue plays an important role in coupling of muscarinic receptors to the second messenger systems and the presence of alternate mechanisms of activation of neuronal NO synthase which might be operative in the absence of large changes in the concentration of cellular Ca<sup>2+</sup>.

**Keywords** □ m1 muscarinic receptors, the second cytoplasmic loop, arginine residue, PI hydrolysis, intracellular Ca<sup>2+</sup>, NO synthase

중추신경계와 자율신경계에 널리 분포되어 있는 muscarine성 acetylcholine 수용체(이하 muscarine성 수용체라 함)는 수용체의 molecular cloning에 의해 5 가지 subtype(M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>)가 존재하는 것으로 확인되었다.<sup>1-5)</sup> 이들 cloning된 muscarinic receptor subtype의 유전자를 cell line에 전이(transfection)시켜 특정 subtype의 수용체만을 발현시킨 세포를 실험에 사용하게됨으로서 각 수용체 subtype의 기능적 특성과 이들 수용체 subtype의 흥분에 따른 세포내 반응을 연구 하는데 많은 발전이 이루어지고 있다.

Muscarine성 수용체 subtype들은 세포내 이차신호전달계(second messenger system)와의 연결(coupling)에서 많은 차이를 나타내며 연결된 G-protein의 종류에 따라 두 부류로 나누어 진다. 홀수로 표기된 muscarine성 수용체(M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>5</sub>)는 pertussis toxin-insensitive G protein(G<sub>q</sub> 또는 G<sub>11</sub> family)과 결합하여 phospholipase C의 활성화, IP<sub>3</sub>와 diacylglycerol의 증가, 세포내 Ca<sup>++</sup>의 증가 등을 일으키는 것을 주 기전으로 하고 있으며 짝수로 표기된 muscarine성 수용체(M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>)는 pertussis toxin-sensitive G protein (G<sub>i</sub> 또는 G<sub>o</sub>)을 통한 adenylate cyclase의 활성억제를 주 기전으로 하고 있다.<sup>6)</sup> 또한 M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>5</sub>들은 부가적으로 phospholipase A<sub>2</sub>, phospholipase D, tyrosine kinase,

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0331-290-7718 (팩스) 0331-292-8800

voltage-insensitive calcium channel, adenylyl cyclase 등의 활성화를 일으키며, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>들은 부가적으로 phospholipase C와 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성화를 일으킨다.<sup>7-9)</sup>

Muscarine성 수용체가 효능제(agonist)에 의해 흥분이 되면 입체구조상 변화(conformational change)가 일어나고 세포내에 존재하는 수용체의 특정부위가 특정 G protein과의 coupling을 통하여 이차신호전달계의 변화를 일으킨다.<sup>10)</sup> 이때 특정 G protein을 인식하고 흥분을 전달하는 수용체의 부위로는 3번째 세포내 고리(the 3th intracellular loop) 및 2번째 세포내 고리와 C-말단 꼬리(C-terminal tail)이며 이곳에 있는 몇몇 특정 아미노산 잔기들이 이차신호전달계와의 coupling에 관여하는 것으로 생각되고 있다.<sup>10,11)</sup> 근래에 이러한 역할을 하는 amino acid 잔기들을 밝히기 위한 연구들이 보고되고 있다.<sup>10-14)</sup> 이러한 연구는 수용체의 amino acid sequence중 특정부위에서의 site-mutagenesis 또는 chimera를 사용하여 이루어지고 있으며 주로 각 수용체의 subtype에 높은 정도로 conserve되어 있는 잔기들이 이러한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

M<sub>1</sub> muscarine성 수용체의 2번째 세포내 고리는 Aspartic acid-Arginine-Tyrosine의 구조로 시작되며 이들 잔기는 muscarine성 수용체의 5가지 subtype 모두에서 동일하며 다른 종류의 G protein-coupled receptor에도 높은 정도로 conserve되어 있다. 그러므로 이들 잔기들이 G protein과의 coupling에서 중요한 역할을 할 가능성이 크다. 따라서 본 연구에서는 그 중 반응성이 높은 123번째 아미노산인 arginine 잔기를 site-mutagenesis시켜 asparagine으로 치환시킨 mutant M<sub>1</sub> muscarine성 수용체를 만들어 muscarine성 효능제의 자극에 따른 G protein과의 coupling, PI hydrolysis 반응, 세포내 calcium농도의 변화, nitric oxide생성 반응 등의 변화를 관찰하고자 하며 이를 통하여 수용체와 이차신호전달계간의 coupling에서 두 번째 세포내 고리에 있는 arginine잔기의 역할을 규명하여 muscarine성 수용체의 흥분에 따른 이차신호전달계 변화의 기전을 밝히고자 하였다.

## 실험방법

### Site-directed mutagenesis

원래의 m1 muscarine성 수용체를 encoding하는

cDNA를 사용하였다. DNA sequence의 mutation은 Altered Sites mutagenesis system(Promega사, 미국)을 사용하여 만들며 123번째 amino acid인 arginine을 asparagine으로 치환하였다. DNA sequencing으로 mutation을 확인하고 정상 m1수용체의 gene과 mutation된 m<sub>1</sub>수용체 gene을 pCMV-3 vector에 subclone하였다. pCMV-3와 pMSV<sub>neo</sub>를 CHO cell에 같이 transfection시키고 배양한 후 geneticin(600 µg/ml)을 가하여 transfection되지않은 세포를 제거하였다. 여러 개의 단일세포를 분리배양하여 [<sup>3</sup>H]methylscopolamine으로 수용체 saturation binding실험을 하여 정상 m1수용체가 표현된 세포와 mutation된 m1수용체가 표현된 세포의 수용체 수가 서로 같은 정도로 표현된 세포를 찾아내어 실험에 사용하였다.

### CHO 세포의 배양

CHO세포를 세포배양용 flask(75 cm<sup>2</sup>/250 ml)에 담아 배양하며 배양액은 10% bovine calf serum, 50 µg/ml geneticin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하고 배양액의 용량은 20 ml로 하였다. CO<sub>2</sub>배양기의 온도는 37°C로 하고 CO<sub>2</sub>의 농도는 5%로 하며 습도는 포화되도록 하였다. subculture는 배양후 4일째 되는 날 시행하며 6배로 희석하였다. 배양시작 3일 후에 배양액의 1/2을 신선한 배양액으로 바꾸어 주며 4일째 되는 날 세포를 실험에 사용하였다.

### N1E-115 세포의 배양

Mouse neuroblastoma(N1E-115)세포를 세포배양용 flask(75 cm<sup>2</sup>/250 ml)에 담아 배양하며 배양액은 10% bovine calf serum, 20 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하였다. CO<sub>2</sub>배양기의 온도는 37°C로 하고 CO<sub>2</sub>의 농도는 10%로 하며 습도는 포화되도록 하였다. subculture는 배양후 14일째 되는 날 시행하며 flask로부터 세포를 분리하기 위해 Puck's D<sub>1</sub> solution(NaCl 8, KCl 0.4, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.024, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03, D-glucose 1, sucrose 20, g/L)을 사용하였다. subculture 3일 후부터 매 24시간마다 배양액의 1/2을 신선한 배양액으로 바꾸어 주며 실험에는 subculture후 16~20일째 되는 세포만을 사용하였다.

### CHO 세포에 표현된 muscarine 성 수용체수 측정

Subculture 4일후 세포배양용 flask로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 원심분리관에 옮기고 300 g에서 1분간 원심분리하여 상등액을 버린 뒤 10 ml의 modified Krebs-Henseleit buffer(KHB: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.2 mM D-glucose, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ )로 세포를 2회 세척하였다. 세포를 적당한 용량의 KHB에 현탁시키고 각 시험관에 300  $\mu\text{Ci}$ 씩 분배하였다. 각 시험관에 100  $\mu\text{l}$ 의 여러가지 농도의 [ $^3\text{H}$ ]NMS(0.1 ~ 40 nM)를 추가하고 총용량을 1 ml가 되게한 다음 37°C의 shaking water bath에서 1시간 배양하였다. 이때 non-specific binding을 위하여는 50  $\mu\text{M}$ 의 atropine을 포함하도록 하였다. 배양이 끝난 다음 cell harvester를 이용하여 G/F filter에 여과시킨 후 냉각한 생리식염수로 2회 세척한 다음 결합한 [ $^3\text{H}$ ]NMS양을 측정하였다.

### Muscarine 성 수용체에 대한 carbachol의 결합을 측정

Carbachol의 결합을 측정은 내인성 GTP의 영향을 피하기 위하여 세포막 분획을 가지고 하였다.<sup>15)</sup> 5개의 배양용 flask로부터 분리한 세포를 8 ml의 20 mM tris/5 mM EGTA(pH 7.4)용액에 현탁시키고 Polytron homogenizer를 사용하여 23000 rpm에서 15초간씩 2회 균질화시켰다. 700 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이를 다시 27000 g에서 30분간 원심분리하여 침전층을 취하였다. 침전물을 20 mM tris/10 mM  $\text{MgCl}_2$ (pH 7.4)로 2회 세척한 다음 30 ml에 현탁시키고 glass homogenizer를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 용액 300  $\mu\text{l}$ 씩을 각 시험관에 분배하고 일정량의 [ $^3\text{H}$ ]NMS와 여러가지 용량의 carbachol을 가한 후 총용량이 1 ml가 되게 하며 non-specific binding을 위하여는 50  $\mu\text{M}$ 의 atropine을 포함하도록 하였다. 이를 37°C의 shaking water bath에서 3시간 배양한 다음 cell harvester를 이용하여 G/F filter에 여과시키고 냉각한 생리식염수로 2회 세척한 다음 결합한 [ $^3\text{H}$ ]NMS양을 측정하였다.

### PI hydrolysis 측정

Subculture 후 4일째 되는 CHO 세포를 배양용 flask로부터 분리한 후 KHB용액으로 2회 세척하고 2.5 ml의 KHB용액에 현탁시켰다. Coulter counter를

사용하여 세포 수를 측정한 다음 [ $^2\text{-}^3\text{H}$ ]inositol(10  $\mu\text{Ci/ml}$ )와 37°C의 shaking water bath에서 1시간 배양하였다. 표지된 세포를 KHB용액으로 2회 세척하여 여분의 [ $^2\text{-}^3\text{H}$ ]inositol을 제거하고 10 mM LiCl를 함유한 적당량의 KHB용액에 현탁시킨 다음 각 tube에  $3\text{-}5 \times 10^5$  개씩의 세포를 나누어 옮기고 37°C에서 15분간 전배양 하였다. muscarine성 수용체를 흥분시키기 위하여 carbachol을 가하고(최종용량 400  $\mu\text{l}$ ) 37°C에서 1시간 배양하였다. 각 tube에 1 ml의 반응정지액(chloroform : methanol : HCl=2 : 2 : 0.01의 비율로 혼합함)을 가하고 chloroform 0.25 ml를 추가하였다. 생성된 [ $^2\text{-}^3\text{H}$ ]inositol phosphates를 column을 사용하여 분리할 때 수득물의 차이를 보정하기 위하여 각 tube에 약 1500 dpm의 [ $^{14}\text{C}$ ]inositol-1-phosphate를 추가하고 또한 증류수 0.25 ml를 가한 다음 잘 혼합하고 원심분리하여(2000 rpm, 5 min) chloroform층과 수용액층이 분리되도록 하였다. 분리된 상층의 수용액층 800  $\mu\text{l}$ 를 취하여 Dowex AG 1-X-8 column (regin: 1 g, formate form)에 통과시켰다. column을 10 ml의 증류수와 20 ml의 60 mM ammonium formate/5 mM sodium borate로 차례로 세척한 다음 column 밑에 scintillation vial을 놓고 4 ml의 1 M ammonium formate/0.1 M formic acid로 inositol phosphates를 유출시켰다. 시료가 담긴 vial에 scintillation cocktail을 가하여 잘 혼합한 후  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  dual channel을 사용하여 beta counter로 radioactivity를 측정하고 측정한 [ $^{14}\text{C}$ ]inositol-1-phosphate의 양으로부터 수득물을 계산하여 생성된 [ $^2\text{-}^3\text{H}$ ]inositol phosphates 양을 보정하였다. 각 tube에 나누어 옮긴 양과 동일한 양의 세포를 취하여 단백질양의 분석에 사용하며 PI hydrolysis는 dpm/mg protein으로 계산하였다.

### 세포내 calcium 농도 측정

100-mm culture dish로부터 배양액을 제거하고 HBSS로 1회 세척하였다. 3 ml의 ECD-Light를 사용하여 세포를 분리하고 세포를 phosphate saline buffer(PBS: 118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM CaCl, 25 mM HEPES, 16.5 mM D-glucose, 7.5 mM pyruvate, 0.68 mM glutamine, pH 7.35)에 현탁시켰다. 2 ml의 PBS에 현탁시킨 세포에 1 mM fura 2/AM 10  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 후 34°C에서 20분간 배양하였다. 원심분

리하여 상등액을 제거하고 5 ml의 PBS에 다시 현탁시킨 다음 10분간 배양하였다. 원심분리하여 상등액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 다음  $2 \times 10^6$ 개의 세포를 2 ml의 PBS에 현탁시켜 fluorescence spectrophotometer용 cuvette에 옮기고 Luminescence spectrometer에서 fluorescence의 변화를 측정하여 세포내  $Ca^{++}$  농도를 측정하였다.  $Ca^{++}$ 농도의 계산은 Luminescence spectrometer에 연결된 computer의 FLDM program (Perkin Elmer, U.S.A.)으로 산출하였다. fluorescence 측정시의 조건은 excitation wave length는 340 nm와 380 nm이고 emission wave length는 500 nm이며 온도는 34°C이었다. standard값을 위해 사용된 약물은 10  $\mu$ M ionomycin과 5 mM  $MnCl_2$ 이었다.

#### Neuronal NOS gene의 transfection

Muscarine성 수용체가 expression되어 있는 CHO세포에 nNOS gene을 transfection 시켰다. nNOS의 full length cDNA를 expression vector pCMV-3의 Cla I/Xba I restriction site에 subclone하고 이를 Promega사(미국)의 Profection system을 사용하여 standard DEAE-dextran 방법으로 CHO세포에 transfection시켰다. transfection 조작후 37°C의 CO<sub>2</sub>배양기에서 62~68시간 배양한 후에 실험에 사용하였다.

#### NO 생성을 측정

CHO 세포로부터 생성-유리되어 나오는 NO의 양은 Hu와 El-Fakahany의 방법<sup>16)</sup>을 사용하여 측정하였다. 즉 모든 muscarine성 수용체를 PBCM으로 alkylation하여 차단하고 세포내 GTP pool을 <sup>3</sup>H으로 표지시킨 N1E-115세포를 detector로서 CHO세포에 함께 가하여 NO생성율을 측정하였다. 유리된 NO가 N1E-115에 작용하여 cGMP를 증가시키므로 [<sup>3</sup>H]guanine으로 표지된 N1E-115세포로부터 생성되는 [<sup>3</sup>H]cGMP의 양으로 NO유리율을 표시하였다.

#### [<sup>3</sup>H]cGMP 생성량 측정

N1E-115세포를 20 mM HEPES용액(110 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM glucose, 58.4 mM sucrose 함유, pH 7.4, osmolality: 335~340 mOsm)에 현탁시킨 후 [<sup>3</sup>H] guanine(10  $\mu$ Ci/ml)과 37°C에서 30분간 배양하여 세포내 GTP pool을 <sup>3</sup>H으로 표지시켰다. 10 ml의 HEPES용액으로 3회 세

척하고 다시 HEPES용액에 현탁시킨 다음 multiwell plate의 각 well에  $2 \times 10^5$ 개씩의 세포를 나누어 옮기고 37°C에서 15분간 전배양(preincubation)하였다. muscarine성 수용체를 흥분시키기 위하여 carbachol을 가하고 (최종용량 300  $\mu$ l) 일정시간 배양한 다음 50%(w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 30  $\mu$ l 가하여 반응을 정지시켰다. 생성된 [<sup>3</sup>H]cyclic GMP를 column을 사용하여 분리할 때 수득율의 차이를 보정하기 위하여 각 well에 약 1500 dpm의 [<sup>14</sup>C]cyclic GMP를 추가한 다음 잘 섞어주고 전체용액을 0.1 M HCl로 equilibrate된 Dowex AG50W-X2(200~400 mesh, hydrogen form) ion-exchange column에 통과시켰다. 10%(w/v) TCA용액 500  $\mu$ l로 각 well을 세척하여 함께 column에 통과시켰다. column을 0.1 M HCl 4.4 ml와 증류수 0.8 ml로 차례로 세척한 다음 다시 증류수 1.7 ml를 column에 통과시켜 cyclic GMP를 유출시키고 이를 microcentrifuge tube에 모았다. 이 용액에 2.7 M ZnSO<sub>4</sub>용액과 2.7 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 각각 40  $\mu$ l 씩을 가하여 남아있는 GDP와 GTP를 침전시켰다. 12400 g에서 5분간 원심분리후 상등액을 scintillation vial로 옮기고 liquid scintillation cocktail(Ecolite, ICN Biomedical Inc., U.S.A.) 10 ml를 가해준 후 <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C dual channel을 사용하여 beta counter로 radioactivity를 측정하고 측정된 [<sup>14</sup>C]cGMP의 양으로부터 수득률을 계산하여 생성된 [<sup>3</sup>H]cGMP양을 보정하였다. 각 well에 나누어 옮긴 양과 동일한 양의 세포를 취하여 단백질양을 분석하였으며 생성된 [<sup>3</sup>H]cGMP양은 dpm/mg protein으로 계산하였다.

#### 단백질양 측정

단백질양의 분석은 Lowry 들<sup>17)</sup>의 방법에 따라 측정하였다.

#### 통계처리

실험결과는 평균과 표준오차로 표시하였고 유의성은 Student's t-test로 판정하였다.

### 실험결과

#### 수용체의 효능제 친화력에 대한 mutagenesis의 영향

Wild type m1수용체와 123번째 amino acid인

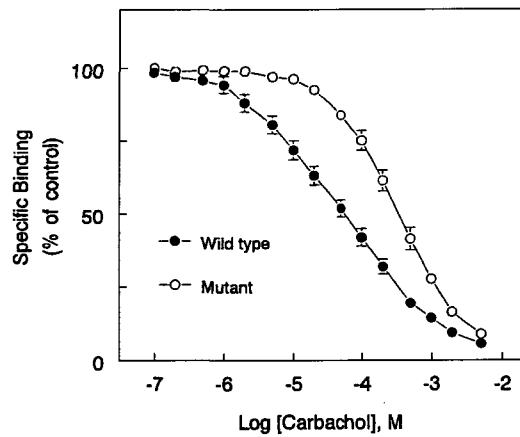


Fig. 1—Effects of mutagenesis of  $^{123}$ arginine on agonist binding to m1 muscarinic receptors. Intact CHO cells expressing wild-type or mutant m1 receptors were incubated with 0.2 nM NMS, in the absence or in the presence of increasing concentrations of the agonist carbachol, for 60 min at 37°C. Data are shown as the means  $\pm$  S.E.M. from five experiments performed in triplicate.

arginine을 asparagine으로 치환한 mutant m1수용체가 표현된 CHO세포에서 [ $^3$ H]NMS를 사용하여 결합능을 측정된 결과  $B_{max}$ 는 각각  $893 \pm 125$  fmol/mg protein과  $981 \pm 97$  fmol/mg protein이었으며,  $K_d$ 값은 각각  $287 \pm 22$  pM과  $183 \pm 18$  pM이었다. 두가지 수용체의 carbachol에 대한 친화력을 측정된 결과 mutant receptor에서 약간의 친화력 감소가 나타났다. 그러나 wild type 수용체는 고친화력( $K_d=5 \pm 1.6$   $\mu$ M)과 저친화력( $K_d=120 \pm 11$   $\mu$ M)의 두가지 conformation으로 작용을 나타내었고 mutant 수용체에서는 한가지 conformation( $K_d=148 \pm 19$   $\mu$ M)으로 작용함을 보여 mutant수용체의 친화력이 wild type수용체의 저친화력 conformation의 친화력과 차이가 없음을 보였다(Fig. 1).

#### PI hydrolysis 증가 반응에 대한 mutagenesis의 영향

Wild type과 mutant m1 수용체가 표현된 CHO세포에 myo- $^3$ Hinositol은 각각  $132,000 \pm 14,000$ 과  $146,000 \pm 21,000$  dpm/ $10^6$  cells이었으며 inositol phosphates의 basal 농도는 각각  $2000 \pm 500$ 과  $3400 \pm 1100$  dpm/ $10^6$  cells이었다. wild type m1수용체를 carbachol로 흥분시켰을 때 용량의존적으로 PI hydrolysis를 증가시켰으며  $3 \times 10^{-5}$  M에서 최고반응에

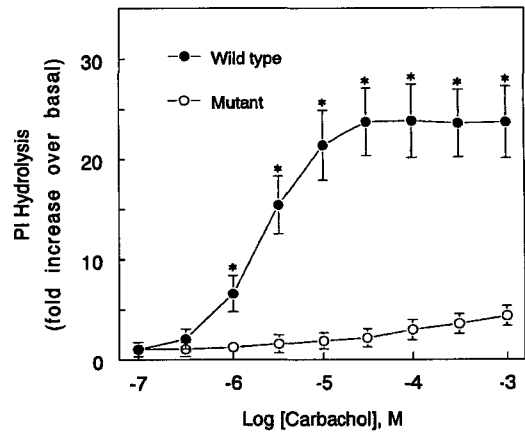


Fig. 2—Effects of mutagenesis of  $^{123}$ arginine on the carbachol-induced increase of PI hydrolysis at m1 muscarinic receptors. Accumulation of total labeled inositol phosphates in response to receptor activation by carbachol was measured after 1 hr in the presence of 10 mM LiCl. Data are shown as the means  $\pm$  S.E.M. from five experiments performed in triplicate. \*: significantly different from basal level ( $P < 0.05$ ).

도달하여 약 23.7배의 증가를 나타내었다. mutant m1 수용체를 carbachol로 흥분시켰을 경우 PI hydrolysis가 유의하게 증가하지 않았다(Fig. 2).

#### 세포내 $Ca^{2+}$ 농도 증가 반응에 대한 mutagenesis의 영향

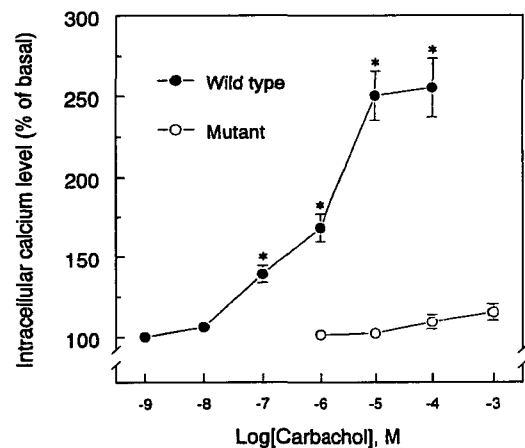


Fig. 3—Effects of mutagenesis of  $^{123}$ arginine on the carbachol-induced increase of intracellular  $Ca^{2+}$  level at m1 muscarinic receptors. Data are shown as the means  $\pm$  S.E.M. from four experiments. \*: significantly different from basal level ( $P < 0.05$ ).

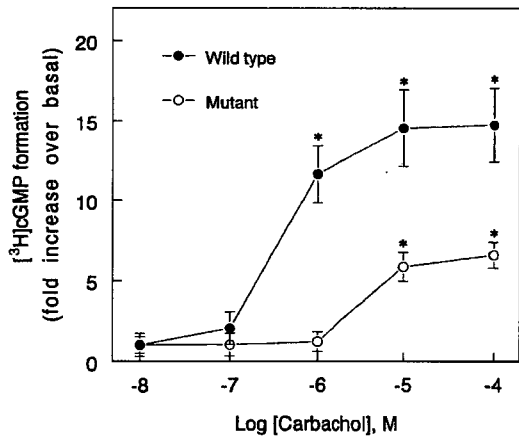


Fig. 4—Effects of mutagenesis of <sup>123</sup>arginine on the carbachol-induced increase of cGMP level at m1 muscarinic receptors. Data are shown as the means ± S.E.M. from five experiments. \*: significantly different from basal level (P<0.05).

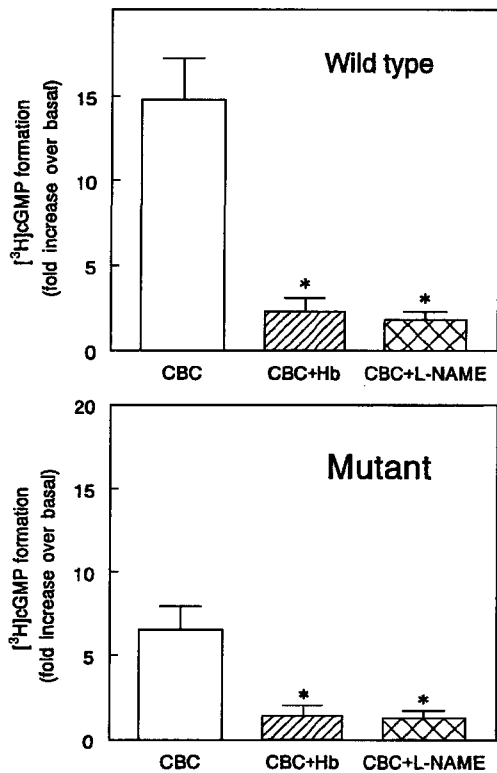


Fig. 5—Effects of a scavenger of NO and an inhibitor of NO synthase on m1 receptor mediated stimulation of cGMP formation in detector mouse neuroblastoma cells. Data are shown as the means ± S.E.M. from five experiments. CBC; carbachol 0.1 mM, Hb; hemoglobin 10 μM, L-NAME; L-nitroarginine methyl ester 0.1 mM, \*: significantly different from CBC alone (P<0.05).

Wild type m1수용체가 표현된 CHO세포에서 세포 내 basal Ca<sup>2+</sup>농도가 83±8.9 nmol/L이었으며 carbachol에 의하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도가 유의하게 증가하였으나 mutant m1수용체에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

### NO 생성 반응에 대한 mutagenesis의 영향

NO생성반응을 detector세포에서의 [<sup>3</sup>H]cGMP생성량의 변화로서 측정하였는데 wild type m1수용체에서 carbachol 10<sup>-6</sup> M 이상의 농도에서 [<sup>3</sup>H]cGMP생성량이 유의하게 증가하였으며 10<sup>-5</sup> M에서 최고반응에 도달하여 약 14.5배의 증가를 보였다. mutant m1수용체에서는 10<sup>-5</sup> M 이상에서 유의하게 증가하였으나 wild type에 비하여 매우 낮은 증가를 보였다(Fig. 4). 두 수용체에서 나타난 carbachol에 의한 [<sup>3</sup>H]cGMP생성량 증가반응이 NO scavenger인 hemoglobin이나 NOS억제제인 L-NAME의 전처치에 의하여 유의하게 차단됨을 보여 [<sup>3</sup>H]cGMP생성량의 증가가 NO생성의 증가에 기인함을 보여 주었다(Fig. 5).

### 고찰

M<sub>1</sub> muscarine성 수용체는 pertussis toxin-insensitive G protein(G<sub>q</sub> 또는 G<sub>11</sub> family)과 결합하여 phospholipase C의 활성화, IP<sub>3</sub>와 diacylglycerol의 증가, 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가 등을 일으키는 것을 주 기전으로 하고 있다.<sup>6)</sup> muscarine성 수용체가 효능제에 의해 흥분이 되면 입체구조상 변화가 일어나고 세포내에 존재하는 수용체의 특정부위가 특정 G protein과의 coupling을 통하여 이차신호전달계의 변화를 일으키는 데 이때 특정 G protein을 인식하고 흥분을 전달하는 수용체의 부위로는 3번째 세포내 고리 및 2번째 세포내 고리와 C-말단 꼬리이며 이곳에 있는 몇몇 특정 아미노산 잔기들이 이차신호전달계와의 coupling에 관여하는 것으로 생각되고 있다.<sup>10,11)</sup>

Muscarine성 수용체의 2번째 세포내 고리는 Aspartic acid-Arginine-Tyrosine의 구조로 시작되며 이들 잔기는 muscarine성 수용체의 5가지 subtype 모두에서 동일하며 다른 종류의 G protein-coupled receptor에도 높은 정도로 conserve되어 있으므로<sup>10)</sup> 이들 잔기들이 G protein과의 coupling에서 중요한 역할을 할 가능성이 매우 크다.

본 연구에서는 m1수용체를 사용하여 2번째 세포내 고리의 arginine을 aspartic acid로 치환시킨후 수용체의 기능변화를 관찰하였는데 carbachol에 대한 결합 친화력에서 wild type은 고친화성 conformation과 저친화성 conformation이 각각 50%씩 존재하는 형태의 결합특성을 보인 반면에 mutant 수용체에서는 wild type의 저친화성 conformation과 비슷한 친화력을 가진 단일 conformation의 특성을 나타내어 arginine의 site-mutagenesis가 약간의 친화력이 감소된 입체구조의 변화를 일으키지만 효능제와의 결합에는 직접적으로 영향을 주지 않음을 보였다. 그러나 M<sub>1</sub>수용체의 주 2차신호전달 기전인 PI hydrolysis 증가와 이로 인한 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도 증가가 arginine의 site-mutagenesis에 의하여 완전히 억제됨을 보여 이 arginine 잔기가 M<sub>1</sub>수용체에서 G-protein과의 coupling에 매우 중요한 역할을 가지고 있음을 나타내었다.

M<sub>1</sub> 또는 M<sub>3</sub> 수용체의 흥분은 여러 세포에서 NOS 활성의 증가를 일으키며 이러한 증가는 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가에 기인한다고 추측하고 있다. 즉 muscarine성 수용체의 흥분은 PLC의 활성증가를 일으켜 IP<sub>3</sub>의 생성을 증가시키고 이는 다시 endoplasmic reticulum으로부터 Ca<sup>2+</sup>의 유리를 일으키며, 세포질내 Ca<sup>2+</sup>의 증가는 다시 Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex의 증가를 일으킨다. 따라서 증가된 Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex에 의해 NOS활성화가 일어난다고 생각하고 있다. 그러나 muscarine성 수용체에 의한 NO생성의 증가가 항상 절대적으로 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가에 기인한다고 할 수는 없는 것으로 보인다. Wang 등<sup>18)</sup>은 M<sub>2</sub> 수용체에서 carbachol에 의하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가는 미미하였으나 NO생성의 증가는 현저하게 나타남을 보고하여 nNOS활성의 증가가 반드시 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가와 일치하여 나타나지 않을 수 있음을 제기하였다. 본 연구에서도 mutant m1수용체에서 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도에 유의한 변화를 일으키지 않는 농도의 carbachol에 의하여 NO생성이 유의하게 증가됨을 보였다. 따라서 이는 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도의 유의한 변화 없이도 nNOS를 활성화시키는 또 다른 기전이 존재함을 의미하며 본 연구의 결과는 이러한 가능성을 제기하는 두 번째 보고이다.

M<sub>1</sub> muscarine성 수용체의 2번째 세포내 고리의 Aspartic acid-Arginine-Tyrosine구조 중 반응성이 높은 arginine잔기를 asparagine으로 site-mutagenesis시켜 muscarine성 효능제의 자극에 따른 이차신호전

달계의 변화에서 이 arginine잔기의 역할을 관찰한 결과 PI hydrolysis 반응, 세포내 calcium농도의 변화가 완전히 차단되어 이 arginine이 PI turnover와 endoplasmic reticulum의 Ca<sup>2+</sup>유리와 관련된 이차신호전달계와의 연결에서 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였다. 그러나 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도의 변화가 미미한 상태에서 nitric oxide생성 증가반응이 일부분 나타남을 보여 세포내 Ca<sup>2+</sup>농도의 유의한 변화 없이도 nNOS를 활성화시키는 또 다른 기전이 존재할 가능성을 제기하였다.

### 감사의 글

본 연구의 일부는 성균학술연구비로 수행되었으며 이에 감사를 표합니다.

### 문 헌

- 1) Kubo, T. K., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Ichijima, A., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. and Numa, S.: Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**, 411 (1986).
- 2) Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C. and Brann, M. R.: Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**, 527 (1987).
- 3) Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Smith, D. H., Ramachandran, J. and Capon, D. J.: Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* **6**, 3923 (1987).
- 4) Bonner, T. I., Young, A. C., Brann, M. R. and Buckley, N. J.: Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**, 403 (1988).
- 5) Liao, C. F., Themmen, A. P. N., Joho, R., Barberis, C., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L.: Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7328 (1989).
- 6) McKinney, M. and Coyle, J. T.: The potential for muscarinic receptor subtype-specific pharmaco-

- therapy for Alzheimer's disease. *Mayo Clin. Proc.* **66**, 1225 (1991).
- 7) Baumgold, J. : Muscarinic receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase. *Trend Pharmacol. Sci.* **13**, 339 (1992).
  - 8) Felder, C. C. : Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* **9**, 619 (1995).
  - 9) Felder, C. C., Ma, A. L., Briley, E. M. and Axelrod, J. : Muscarinic acetylcholine receptor subtypes associated with release of Alzheimer amyloid precursor derivatives activate multiple signal transduction pathways. *Ann. NY Acad. Sci.* **695**, 15 (1993).
  - 10) Wess, J., Blin, N., Mutschler, E. and Bluml, K. : Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. *Life Sci.* **56**, 915 (1995).
  - 11) Bonner, T. I. : Domains of muscarinic acetylcholine receptors that confer specificity of G protein coupling. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 48 (1992).
  - 12) Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. and Dixon, R. A. F. : Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101 (1994).
  - 13) Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. : Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 653 (1991).
  - 14) Savarese, T. M. and Fraser, C. M. : In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **283**, 1 (1992).
  - 15) Nathanson, N. M. : Binding of agonists and antagonists to muscarinic acetylcholine receptors on intact cultured heart cells. *J. Neurochem.* **41**, 1545 (1983).
  - 16) Hu, J. and El-Fakahany, E. E. : Role of intercellular and intracellular communication by nitric oxide in coupling of muscarinic receptors to activation of guanylate cyclase in neuronal cells. *J. Neurochem.* **61**, 578 (1993).
  - 17) Lowry, O., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
  - 18) Wang, S. Z., Lee, S. Y., Zhu, S. Z., Wotta, D. R., Parsons, A. M. and El-Fakahany, E. E. : Activation of neuronal nitric oxide synthase by M2 muscarinic receptors associated with a small increase in intracellular calcium. *Pharmacology* **55**, 10 (1997).