

초파리 Schneider2 세포와 Chinese hamster ovary-K1 세포에서 *Aedes aegypti* 5-Hydroxytryptamine₇ 수용체의 발현비교

이대원

서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부

Comparative Expression of the *Aedes aegypti* 5-Hydroxytryptamine₇ Receptor in *Drosophila* Schneider2 and Chinese Hamster Ovary-K1 Cells

Dae-Weon Lee

School of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

ABSTRACT : Serotonin receptor binds to serotonin (5-HT) and activates effector proteins such as adenylyl cyclase, phospholipase C, cyclic GMP phosphodiesterase or ion channel through G protein on the cell membrane, resulting in various physiological responses like diuresis, memory and development. To examine the comparative expression of the 5-HT₇ receptor of *Aedes aegypti*, the *Aedes* 5-HT₇ receptor gene was transfected into *Drosophila* Schneider2 (S2) cells and mammalian Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells. The expression of the *Aedes* 5-HT₇ receptor gene in selected cell lines, Tr-CHO and Tr-S2, was confirmed with reverse transcription-PCR, Western blot and immunocytochemistry. Compared with the induced intracellular cAMP level of Tr-S2 cell line to 5-HT, the induced cAMP in the Tr-CHO cell line was over 9 times higher and was dose-dependent. These results suggest that the functionality of *Aedes* 5-HT₇ receptor is much more effective in mammalian CHO-K1 cells and that the Tr-CHO cell line expressing *Aedes* 5-HT₇ receptor can be used for synthetic agonist or antagonist candidate screening.

KEY WORDS : Serotonin receptor, *Aedes aegypti*, cAMP, Serotonin, Immunocytochemistry

초 록 : 세로토닌 수용체는 세로토닌과 반응하여 세포막의 G 단백질을 통해 중개단백질 (adenylyl cyclase, phospholipase C, cGMP phosphodiesterase, ion channel)을 활성화시켜, 이뇨, 기억, 발생 등의 다양한 생리적 반응에 관여한다. 곤충세포인 Schneider2 (S2)와 척추동물 세포인 Chinese hamster ovary (CHO)-K1에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자 발현을 비교하기 위해, *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자를 형질입시켰다. 선발된 세포주들(Tr-S2, Tr-CHO)에서 세로토닌 수용체 유전자의 발현은 reverse transcription-PCR, Western blot, immunocytochemistry를 이용하여 확인하였다. 세로토닌 농도증가에 대한 *Aedes* 5-HT₇ 수용체의 기능을 세포 내 cAMP 수준을 통해 조사한 결과, Tr-CHO 세포주는 Tr-S2 세포주보다 9배 이상 cAMP 수준이 높게 나타났으며, 농도에 의존적이었다. 이 결과는 수용체 유전자가 세포에서 발현되었으나, 세포의 종류와 세포막에 존재하는 G 단백질 차이에 따라 중개단백질 활성 차이가 있다는 것을 보여주었다. CHO-K1 세포에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체의 기능이 S2 세포보다 더 효율적이며, *Aedes* 5-HT₇ 수용체를 발현하는 Tr-CHO 세포주는 동력제 또는 대립제 검정에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

검색어 : 세로토닌 수용체, *Aedes aegypti*, cAMP, 세로토닌, Immunocytochemistry

*Corresponding author. E-mail: 71dwlee@hanmail.net

곤충에서 이노작용은 호르몬들과 수용체에 의해서 조절되는 복잡한 과정을 거치며, 이러한 생리적인 반응에 관여하는 수용체는 G 단백질 연관 수용체(G protein coupled receptor)로 생각되고 있다(Schooley, 1991; Coast, 1996, 1998; Pietrantonio *et al.*, 2000). 특히 흡혈성 곤충들에서 빠른 수분제거는 매우 중요하며, 흡혈 후 과도한 수분에 대해 신속한 제거작용이 요구된다(Adams, 1999). 이노작용에 관여하는 호르몬은 biogenic amines와 4개 그룹의 펩타이드(cardioacceleratory peptides, the calcitonin-like diuretic peptides (DPs), Corticotropin Releasing Factor (CRF)-related DPs and kinins)로 나눌 수 있다(Yu and Beyenbach, 2002). CRF-DPs는 30-47개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 말피기소관에서 adenylyl cyclase를 활성화시켜, 세포내의 cAMP 농도를 증가시킨다(Kay *et al.*, 1991; Lehmborg *et al.*, 1991; Audsley *et al.*, 1993). Leukokinin-like peptides는 후장의 근육수축(Schoofs *et al.*, 1992) 또는 말피기소관의 이노를 자극한다(Holman *et al.*, 1999). 이노호르몬과 kinins 이외에, 신경호르몬, 신경전달물질, 또는 신경조절물질(Lange *et al.*, 1989; Roeder, 1994; Nassel, 1996) 기능을 하는 세로토닌(5-hydroxytryptamine)은 몇몇 곤충에서 이노작용(Coast *et al.*, 2002) 뿐만 아니라 다양한 활성화에 관여하는데, 여기에는 섭식작용의 변화, 신경내분비활성(Valles and White, 1988), 발생(Colas *et al.*, 1999), 학습과 기억(Bicker and Menzel, 1989) 등이 있다. 세로토닌은 특히 흡혈성 곤충의 섭식활동, 중장, 말피기소관의 활성화, 타액분비(salivation)에도 영향을 준다는 보고가 있다(Novak and Rowley, 1994; Novak *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1999). 세로토닌은 *Aedes aegypti* 유충의 말피기소관 상피세포에서 세포내 cAMP 증가를 통해 이노작용을 하며(Clark and Bradley, 1996, 1997), *A. aegypti* 성충의 말피기소관에서 이노속도를 증가시켜 후장부피를 증가시킨다(Veenstra, 1988). 그러나 이노호르몬으로서 세로토닌의 기능은 성충 *A. aegypti*에서는 명확하지 않다. *A. aegypti* 성충에서 세로토닌이 이노호르몬으로 작용하기 위해서는 *Rodnius prolixus*에 비해 약 10^3 - 10^5 배 정도 높은 세로토닌이 요구되기 때문이다.

세로토닌 수용체는 유전자의 구조, 기능과 동력제(agonist)와 대립제(antagonist)에 대한 약리반응(pharmacology)에 따라 크게 7개의 subfamily로 나눌 수 있다(Gerhardt and van Heerikhuizen, 1997; Barnes and

Sharp, 1999). 5-HT₁과 5-HT₅ 수용체 subfamily는 G_i 단백질을 통해 adenylyl cyclase 활성을 억제하여, 세포내의 cAMP 농도를 낮추는 반면, 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇ 수용체 subfamily는 G_s 단백질을 통해 adenylyl cyclase 활성을 높여, 세포내 cAMP 농도를 증가시킨다. 5-HT₂ 수용체 subfamily는 G_{q/11} 단백질을 통해 세포내 Ca²⁺와 protein kinase C의 농도를 높이며, 5-HT₃ 수용체 subfamily는 구조적으로 ligand-gated 이온통로(ion channel)로 보고되어 있다. 곤충에서 5-HT₇ 수용체는 *Drosophila melanogaster*에서 처음 발견되었으며(Witz *et al.*, 1990), 최근에 *A. aegypti* 말피기소관에 결합된 기관소지 세포(tracheolar cell)에서 5-HT₇ 수용체 유전자가 보고되었다(Pietrantonio *et al.*, 2001). 이들 유전자들은 척추동물의 5-HT₇ 수용체와 구조적인 유사성을 가지는 것으로 분석되었다(Colas *et al.*, 1995; Pietrantonio *et al.*, 2001). 초파리의 5-HT₇ 수용체에서 발견된 Gly-Ser 반복서열은 *Neurospora*의 *Frequency*와 초파리의 *Clock* 유전자에서도 발견되어, 일일리듬(circadian rhythm)에 관여하는 것으로 생각되며(Gerhardt and van Heerikhuizen, 1997), *Aedes* 5-HT₇ 수용체는 Gly-Ser와 같은 서열이 발견되지 않았으며, 말피기소관에 붙어있는 기관소지 세포에서 발견되는 것으로 보아 앞에서 언급한 이노작용과 관련있는 것으로 여겨진다.

본 연구는 *A. aegypti* 5-HT₇ 수용체 유전자를 곤충세포인 Schneider2와 척추동물세포인 Chinese hamster ovary (CHO)-K1에서 발현시켜, 세로토닌에 의해 유도되는 세포내의 cAMP 농도 변화를 비교·분석함으로써, 보다 더 효율적인 수용체 발현을 통해 세로토닌 관련 동력제 또는 대립제 검정체계에 활용하려 한다.

재료 및 방법

발현벡터 제작

Schneider2 (S2) 세포에 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자를 발현시키기 위해, pCR2.1/5-HT₇으로부터 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여, 5-HT₇ 수용체 유전자를 증폭시켰다. 이 반응의 프라이머로는 Sero-F (5'-CGGGGTACCACCCTCTTTCAGTATGG, 밑줄 친 부분은 Kozak 서열(Kozak, 1987))와 Sero-R (5'-CCCCGAATTCTCATAGGAAGCTCT, 밑줄 친 부분은 정지코돈)이 이용되었으며, PCR 조건은 다음과 같

다: 96°C, 3분; 96°C, 1분, 64°C, 1분, 72°C, 2분(40 cycles); 72°C 5분. 증폭된 DNA 단편을 pCR2.1 벡터 (Invitrogen Co., USA)에 클로닝하여, pCR5-HT₇로 명명하고, DNA 염기서열을 분석하였다. pCR5-HT₇ 벡터를 *Kpn*I, *Eco*RI으로 처리한 다음, *Aedes* 5-HT₇ 유전자를 pAc5.1/V5-HisA 벡터(Invitrogen)에 옮겨 pAc5-HT₇ 벡터를 제작하였다.

Aedes 5-HT₇ 수용체를 Chinese hamster ovary (CHO)-K1 세포에서 발현시키기 위해, pCR2.1/5-HT₇로부터 PCR을 이용하여, 5-HT₇ 수용체 유전자를 증폭시켰다. PCR 프라이머로는 5-HT-F (5'-ATAGGGCCCTCTTTAAGTATGGAT, 밑줄 친 부분은 Kozak 서열)와 5-HT-R (5'-CCGCGAATTCTCATAGGAAGCTCT, 밑줄 친 부분은 정지코돈)이 이용되었다. PCR 조건은 다음과 같다: 96°C, 3분; 96°C, 1분, 62°C, 1분, 72°C, 2분(40 cycles); 72°C 5분. 증폭된 DNA 단편을 pCR2.1 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여, pCR5-HT_{7A}로 명명하였다. 유전자 서열을 확인하기 위해 DNA 염기서열을 분석하였다. pCR5-HT_{7A} 벡터를 *Eco*RI, *Apa*I으로 처리한 다음, 5-HT₇ 수용체 유전자를 pCDNA3.1(-) 벡터(Invitrogen)에 옮겨 p5-HT₇ 벡터를 제작하였다.

세포배양 및 형질이입(transfection)

Chinese hamster ovary (CHO)-K1 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, EquiTech BIO, USA)가 첨가된 F-12K 배지(Invitrogen)에서 배양하였다. CHO-K1 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 증식시켰다. Schneider2 (S2)세포는 10% FBS가 첨가된 Schneider 배지(Invitrogen)에서 배양하였으며, 27°C 배양기에서 증식시켰다. CHO-K1과 S2 세포의 형질이입에는 LipoFECTIN (Invitrogen)과 CellFECTIN (Invitrogen)을 각각 이용하였으며, 제조자의 방법에 따라 수행되었다. 형질이입된 S2와 CHO-K1 세포 중에서 각각 hygromycin과 neomycin에 저항성을 보이는 세포주를 선발하고, Tr-S2와 Tr-CHO로 명명하였다.

Reverse transcription-PCR

선발된 세포주에서 total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen)을 사용하여, 제조자의 방법에 따라 추출되었다. Total RNA 추출 후, DNaseI (5 units; Roche, German)를 처리하여, genomic DNA에 의한 오염을 제거하였다. 5-HT₇ 수용체 유전자의 cDNA 합성은

SuperScriptII reverse transcriptase (SuperScriptII first-strand synthesis system; Invitrogen)을 사용하였다. 이 반응에 사용된 프라이머는 RT-R (5'-CCTCTGTGC-CATCTCAGTTGACCGGT; 위치: 1306-1331 bp)이고, 합성된 cDNA는 PCR 반응을 이용하여 dsDNA를 합성하였다. PCR 반응에 이용된 프라이머는 RT-R, RT-F (5'-GGATCGCCGTACTGACTGTGGTAGAA, 위치: 603-628 bp)이며, PCR 반응 조건은 다음과 같다: 94°C 3분; 94°C, 1분, 61°C, 1분, 72°C, 1분(40 cycles); 72°C, 5분. p5-HT₇ 벡터가 양성대조구, pAc5.1/V5-HisA 또는 pCDNA3.1 (-)로 형질이입된 세포가 음성대조구로 사용되었다. PCR 반응산물은 1% agarose gel을 이용하여, 전기영동을 수행하였다.

세포 내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 측정

Aedes 5-HT₇ 수용체 유전자를 발현하는 세포를 6-well plate에서 약 8×10^5 cells/well 농도로 배양하고, 700 × g, 3분간 원심분리하여 배지를 제거하였다. 세포를 1 mM EDTA, 20 mM HEPES (pH 7.4)가 들어있는 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 씻어주고, 700 × g, 2분동안 원심분리하였다. 10 mM HEPES (Sigma Co., USA), 10 μM Pargyline (monoamine oxidase 저해제; Sigma, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, cAMP phosphodiesterase 저해제; Sigma)가 들어있는 F-12K 배지(CHO-K1) 또는 Schneider 배지(S2)를 넣고, 37°C, 30분동안 반응시켰다. 세포농도를 10⁶ cells/ml로 맞춘 후, 495 μl 세포액을 세로토닌(1 nm-10 μM)이 들어있는 튜브에 넣고, 최종부피를 500 μl로 맞추고, 37°C, 30분동안 반응시켰다. 10 μM Forskolin (Sigma)은 양성대조구로 사용하였다. 반응은 5분동안 중탕하여 정지시켰다. 9,000 × g, 3분동안 원심분리한 다음, 100 μl 상청액을 cAMP 측정에 이용하였다. cAMP 농도는 Cyclic AMP [³H] assay system (Amersham, UK)을 이용하였다. 세포 내 cAMP 농도변화는 Excel (Microsoft, USA)를 사용하여 계산하였고, SigmaStat (SPSS, USA)를 이용하여 통계처리하였다.

Immunocytochemistry

Tr-CHO 세포주를 PBS로 씻은 후, 10⁵ cells/ml 농도로 1-well cytofuge concentrator (StatSpinTechnologies Co., USA)에 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를

3.7% formaldehyde (Fisher, USA)와 50 mM EGTA가 들어있는 PBS로 15분간 고정된 다음, 70% 에탄올로 10분간 3회 얼음 위에서 씻어주었다. 세포를 10% normal goat serum (NGS, Sigma)으로 24시간 동안 blocking하고, 2% NGS가 포함된 PBST 완충액에 anti-rabbit 5-HT₇ 항체를 1:2,000 비율로 희석하여 20시간 동안 배양하였다. 양성 대조구로 anti-rabbit β -integrin (Molecular Probes Inc., USA) 항체를 이용하였다. 세포를 2% NGS가 포함된 PBST 완충액으로 15분, 3회 씻어준 후, biotinylated anti-rabbit goat IgG (Vector, USA)를 1:2,500으로 희석한 다음, 2시간 동안 상온에서 배양하였다. PBST-NGS로 15분, 3회 씻어준 다음, 1:2,000 희석비율로 Streptavidin-Texas Red-X (Molecular Probes)을 넣고, 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 세포를 PBST로 20분, 8회 씻어준 다음, 슬라이드에 Vectashield™와 DAPI를 첨가하여 형광현미경관찰에 이용하였다. 형광현미경관찰은 Zeiss Axiophot 현미경(Carl Zeiss Co., Germany)을 이용하였다. 세포는 C5810 CCD 카메라(Hamamatsu Photonic, Japan)로 촬영하였고, DAPI와 Texas Red에 대해 각각 청색, 적색 필터를 사용하였다. 세포에 대한 이미지는 Photoshop (Adobe System Inc., USA)으로 분석하였다.

Western blot

배양된 세포를 1000 × g, 3분동안 원심분리하여, 상청액을 제거한 다음, PBS로 3회 씻어주었다. 세포를 200 μ l lysis 완충액(0.05 M Tris, 0.15 N NaCl, 1% Nonidet P-40 (pH 7.8))을 첨가하여 37°C, 10분동안 배양하였다. 시료를 1200 × g, 5분동안 원심분리하고, 상청액을 시료완충액(0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.004% Bromophenol blue)에 넣고, 3분간 중탕한 다음, 3,000 × g, 4°C에서 5분동안 원심분리하였다. 상청액을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)와 Western blot에 이용하였다.

Aedes 5-HT₇ 수용체의 항체는 N말단 부분의 TSES-SPAEPVNVLT를 합성한 다음, 토끼에 주입하여 생산하였다. Western blot은 Laemmli의 방법(1970)으로 SDS-PAGE한 후, Towbin의 방법(1979)에 따라 수행되었다. 단백질을 Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Advantec, USA)으로 옮긴 후, 50 ml PBST 완충액에 넣고, 10% blocking (5 g skim milk/50 ml

PBST 완충액) 용액에 상온에서 2시간 동안 처리하였다. *Aedes* 5-HT₇ 수용체의 탐지는 토끼에서 얻은 항체를 이용하였으며, 1,000배 희석하여 3시간 동안 반응시키고, PBST 완충액으로 5분간 3회 씻어주었다. Anti-rabbit goat IgG-alkaline phosphatase conjugate를 10,000배 희석하여, PVDF membrane과 1시간 동안 반응시키고, PBST 완충액으로 5분간 5회 씻어주었다. 단백질 탐지는 Supersignal detection kit (Pierce, USA)를 이용하여 X-ray 필름을 현상하였다.

결과 및 고찰

Hill *et al.* (2002)은 *Anopheles gambiae*의 genome에서 276개 G 단백질 연관 수용체(G-protein coupled receptor, GPCR)를 동정하였으며, 이들 중에서 biogenic amine 수용체가 18개 존재한다고 보고하였다. 유전자의 특성들이 많이 알려진 *Drosophila* genome의 amine 수용체 family는 rhodopsin 관련 GPCR superfamily에 속하는 것으로 생각되고 있다(Vanden Broeck, 2001). 세로토닌 수용체에 관한 연구는 *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Heliothis virescens* 등에서 수행되었으며, 세로토닌 수용체의 신호전달에 대한 분석은 *D. melanogaster*의 수용체들(5-HT_{7Dro}, 5-HT_{1ADro}, 5-HT_{1BDro})에서 보고되었다(Witz *et al.*, 1990; Saudou *et al.*, 1992). Pietrantonio *et al.* (2001)은 *Aedes aegypti*의 말피기소관에 있는 기관소자 세포(tracheolar cell)에서 세로토닌 수용체(*Aedes* 5-HT₇ receptor)가 존재하는 것을 확인하였으며, 최근에 Lee and Pietrantonio (2003)는 *Aedes* 5-HT₇ 수용체의 기능에 대한 분석을 보고하였다. 본 연구는 G 단백질 연관 수용체인 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자의 효율적인 발현세포계를 조사하고자, 곤충세포 Schneider2 (S2)와 척추동물 세포 Chinese hamster ovary (CHO)-K1를 이용하여 발현시키고, 세로토닌에 대한 5-HT₇ 수용체의 발현 및 기능을 세포 내의 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 유도를 통해서 비교·분석하였다.

Aedes 5-HT₇ 수용체 유전자를 S2 세포와 CHO-K1 세포에서 발현시키기 위해, 5-HT₇ 수용체 유전자를 PCR 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 제한효소와 T4 DNA ligase를 이용하여 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자를 발현백터인 pAc5.1/V5-HisA와 pCDNA3.1(-) 벡터에 클로닝하여, pAc5-HT₇과 p5-HT₇ 벡터를 제작하였다.

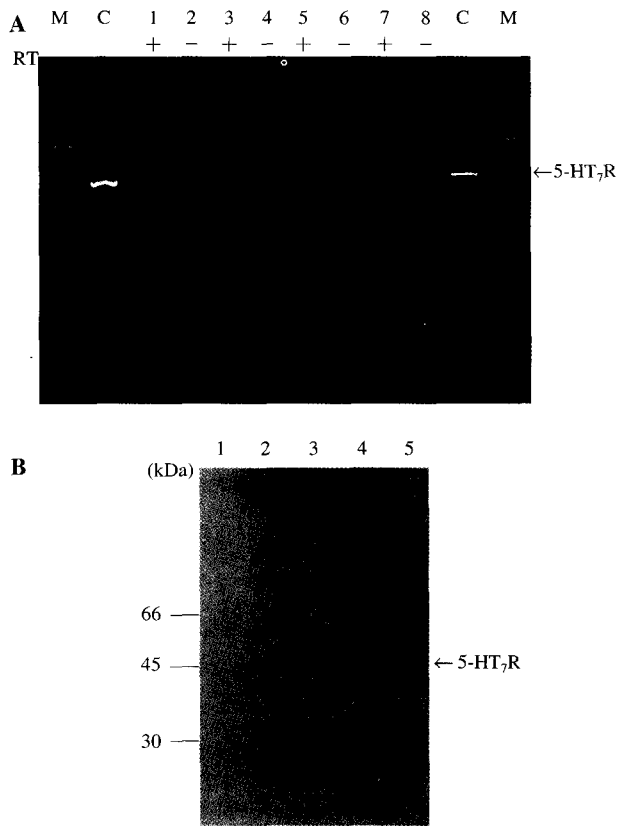


Fig. 1. Detection of the *Aedes* 5-HT₇ receptor by reverse transcription-PCR (A) and anti-5-HT₇ receptor antibody (B). (A) The cDNA synthesis was done with RT(+), or absent (-) as a control for genomic DNA contamination. M: 100-bp DNA ladder, C: positive control (PCR product from p5-HT₇). Lanes 1 and 2: negative control of vector-only (pAc5.1/V5-HisA) transfected cells, lane 3 and 4: negative control of vector-only (pCDNA3.1 (-)) transfected cells, lane 5 and 6: Tr-S2 cell line and lane 7 and 8: Tr-CHO cell line. (B) Lane 1: vector only (pAc5.1/V5-HisA)-transfected S2 cells, lane 2: vector only (pCDNA3.1 (-))-transfected S2 cells, lane 3: Tr-S2 cell line, lane 4: Tr-CHO cell line and Lane 5: Malpighian tubules from *Aedes aegypti*.

제작된 발현벡터를 S2 세포와 CHO-K1 세포에 형질 도입하고, 각각 hygromycin과 neomycin에 저항성을 보이는 Tr-S2와 Tr-CHO 세포주를 선발하였다. Tr-S2와 Tr-CHO 세포주에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자의 발현을 조사하기 위해, total RNA를 추출하여 reverse transcription-PCR을 수행하였다(Fig. 1A). 음성대조구는 pAc5.1/V5-HisA와 pCDNA3.1(-) 벡터로 형질 도입된 세포에서 추출한 total DNA를 이용하였고, genomic DNA 오염을 확인하기 위해 역전사효소(reverse transcriptase)를 첨가하지 않은 시료를 대조구로 이용하였다. 양성대조구로는 p5-HT₇ 벡터를 이용하였다. RT-F와 RT-R 프라이머로 증폭된 PCR 산물크기는 750 bp였으며, 양성대조구, Tr-CHO와 Tr-S2 세포주에

서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자 특이적인 DNA 단편을 확인하였다(Fig. 1A).

선발된 세포주에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 발현을 단백질 수준에서 조사하기 위해, anti-5-HT₇ 수용체의 항체를 이용하여, Western blot을 수행하였다(Fig. 1B). 음성 대조구로는 pAc5.1/V5-HisA와 pCDNA3.1(-) 벡터가 형질 도입된 세포를 이용하였으며, 양성대조구로 성충의 말피기소관을 사용하였다(Fig. 1B). Tr-CHO, Tr-S2 세포주와 양성대조구에서 anti-5-HT₇ 수용체 항체와 반응하였으나, 음성대조구에서는 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 단백질 발현을 확인할 수 없었다. 이상의 결과들은 선발된 세포주에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자가 mRNA 수준 뿐만 아니라 단백질 수준에서도 발현되고 있음을 보여준다.

S2 세포와 CHO-K1 세포는 다른 생물체들의 다양한 수용체를 발현시키는 세포주로 널리 이용되고 있으며, 현재까지 S2 세포에서 자연적으로 발현되는 G 단백질 연관 수용체에 대한 활용할 수 있는 보고는 아직까지 없으나, CHO-K1, HEK-293, HeLa 등의 여러 세포들에 대한 G 단백질 연관 수용체들은 밝혀져 있다(출처: <http://www.tumor-gene.org/GPCR/gpcr.html>). 세포들 간의 G 단백질 연관 수용체의 종류는 서로 다르며, 이들과 반응하는 G 단백질도 다양할 것으로 생각된다. CHO-K1 세포에서는 9개 수용체가 밝혀져 있으며, 이 중에서 5-HT_{1B} 수용체는 세로토닌을 처리했을 때, G_i 단백질을 활성화시켜 세포내의 cAMP 농도를 낮추는 기능을 한다(Giles *et al.*, 1996). Tr-CHO와 Tr-S2 세포주에서 발현된 *Aedes* 5-HT₇ 수용체가 세로토닌에 반응하는지를 확인하기 위해, ³H으로 표시된 cAMP를 이용하여 세로토닌의 농도증가에 따른 세포내의 cAMP 농도변화를 조사하였다. 양성대조구로 이용된 Forskolin은 수용체없이 직접 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cAMP 의존적인 생리반응들을 유도한다(Seamon *et al.*, 1981; Laurenza *et al.*, 1989). Tr-CHO 세포주에서 세로토닌의 농도가 증가함에 따라 세포내의 cAMP 농도도 비례적으로 증가하였으며, 세로토닌에 의한 세포 내 cAMP 증가는 Tr-S2 세포주에서 보다 9배이상 높았다(Fig. 2). 음성대조구에서는 통계적으로 차이를 보이는 cAMP 증가를 관찰할 수 없었다. Tr-CHO 세포주에 5-HT_{1B} 수용체가 발현되고 있으나, 세로토닌 처리에 의해 세포 내 cAMP 농도가 증가하는 것은 형질 도입된 *Aedes* 5-HT₇ 수용체에 의한 adenylyl cyclase 활성 수준이 5-HT_{1B} 수용체에 의한 adeny-

yl cyclase 억제 수준보다 높은 것으로 생각된다. mRNA나 단백질 수준에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체가 발현이 되었으나, 세로토닌에 의해 세포 내 cAMP 농도

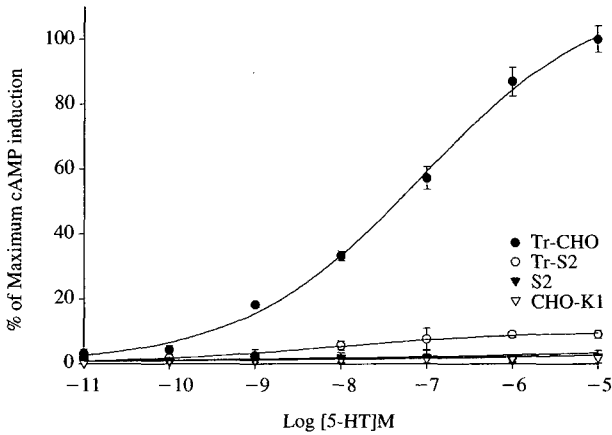


Fig. 2. Dose-response of Tr-CHO and Tr-S2 cell line expressing the *Aedes* 5-HT₇ receptor. The 1.48 ± 0.26 and 0.43 ± 0.13 pmol of cAMP (obtained with $10 \mu\text{M}$ 5-HT) in the vector-only transfected cell line of CHO-K1 and S2 cells was considered as 0% response, respectively. The 20.4 ± 0.74 pmol of cAMP production in the Tr-CHO cell line was considered as 100% response (obtained with $10 \mu\text{M}$ 5-HT). Data are the mean \pm SD of duplicate assays from three independent experiments.

가 Tr-S2 세포주에서 매우 낮게 나타난 것은 세포 내에서 유전자 발현의 양적인 차이보다는 세포에서 외부신호의 매개체 역할을 하는 G 단백질 subunit가 각 세포마다 다른 조성을 가지기 때문으로 생각된다. 이러한 경향은 곤충세포인 Sf9에 다른 종의 수용체 단백질을 발현시켰을 때, 세포에 적당한 G 단백질이 발현되지 않거나 너무 낮은 농도로 존재할 경우, G 단백질을 통한 매개 단백질을 활성화시키지 못한다는 보고와 일치한다(Butkerait *et al.*, 1995; Boundy *et al.*, 1996; Ohtaki *et al.*, 1998). 그러므로 Tr-S2 세포주에서 세로토닌에 의한 cAMP 농도의 증가를 유도하기 위해서는 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자와 적당한 G 단백질 subunit 유전자도 동시에 발현하는 것이 필요하다고 판단된다.

Tr-CHO 세포주에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체의 분포는 anti-5-HT₇ 수용체의 항체를 이용한 immunocytochemistry로 조사하였다. 형광신호를 증폭시키기 위해, 2차 항체로 biotinylated anti-rabbit goat IgG와 Streptavidine-Texas Red를 이용하였다. Anti-5-HT₇ 수용체의 항체는 Tr-CHO 세포주에 발현된 *Aedes* 5-HT₇ 수용체에 결합하여 형광을 나타내었다(Fig. 3. E and F). 양성

Cell	Antibody	DAPI	Texas-Red	Merged
Vector only	5-HT ₇ R	A	B	C
		D	E	F
Tr-CHO	5-HT ₇ R			
Vector only	β -integrin	G	H	I

Fig. 3. Immunocytochemistry of Tr-CHO cell line with anti-5-HT₇ receptor antibody. There was no immunofluorescence detected from vector only-transfected cells (A, B and C). The positive signal was detected in the cytoplasm and plasma membrane (E and F). The red fluorescence emitted from β -integrin was shown as a positive control (H and I). Blue color indicated nuclei (DAPI; A, D, and G).

대조구로는 세포막에 발현되는 β -integrin 단백질의 항체를 이용하여 CHO-K1 세포를 반응시켰다. anti- β -integrin 항체는 세포막에 존재하는 β -integrin 단백질을 인식하여, Tr-CHO 세포주에서와 같은 형광을 보였다(Fig. 3. H and I). 음성대조구로 쓰인 CHO-K1 세포에서는 anti-5-HT₇ 항체와 반응한 형광을 관찰할 수 없었다(Fig. 3. B and C). 이 결과는 Tr-CHO 세포주에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체가 발현되어 세포막에 존재함으로써 세로토닌과 결합하여 G_s 단백질을 매개로 세포 내 cAMP 농도의 증가와 일치한다는 것을 보여준다. S2 세포에서 *Aedes* 5-HT₇ 수용체 C-말단에 green fluorescence protein (GFP) 유전자를 결합시켜, 일시 발현 (transient expression)을 수행한 결과, 세포전체에서 GFP에 의한 형광이 관찰되었다(자료 미제시). 그러므로 Tr-S2 세포주에서 세로토닌에 의한 낮은 세포 내 cAMP 증가는 5-HT₇ 수용체가 세포막에 존재하지 않는 분포상의 문제점도 요인이 될 수 있으며, 위에서 언급한 수용체의 외부신호를 전달하는 적절한 G 단백질의 결핍으로도 설명될 수 있다.

이상의 결과들을 종합하면, *Aedes* 5-HT₇ 수용체 유전자가 S2와 CHO-K1 세포에서 모두 발현되었으나, 세로토닌에 대한 신호전달은 선발된 Tr-CHO 세포주에서 월등히 높았다. 이것은 세포주에서 발현되는 세로토닌 수용체와 같은 GPCR의 기능은 세포의 종류와 세포막에 존재하는 G 단백질의 조성에 따라 의존적이며, 결과적으로 세포내 2차 전달자(secondary messenger)의 변화가 달라질 수 있다는 것을 보여준다. 본 연구에서 선발된 Tr-CHO 세포주는 세로토닌과 구조와 기능이 비슷할 것으로 생각되는 동력제 또는 대립제 후보물질 등의 검정에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Literature Cited

- Adams, T.S. 1999. Hematophagy and hormone release. *Ann. Entom. Soc. Am.* 92: 1-13.
- Audsley, N., I. Kay, T.K. Hayes and G.M. Coast. 1993. The effect of *Manduca sexta* diuretic hormone on fluid transport by the Malpighian tubules and cryptonephric complex of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 178: 231-243.
- Barnes, N.M. and T. Sharp. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol.* 38: 1083-1152.
- Bicker, G. and R. Menzel. 1989. Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. *Nature* 337: 33-39.
- Boundy, V.A., L. Lu and P.B. Molinoff. 1996. Differential coupling of rat D2 dopamine receptor isoforms expressed in *Spodoptera frugiperda* insect cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 784-794.
- Butkerait, P., Y. Zheng, H. Hallak, T.E. Graham, H.A. Miller, K.D. Burris, P.B. Molinoff and D.R. Manning. 1995. Expression of the human 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor in Sf9 cells. Reconstitution of a coupled phenotype by co-expression of mammalian G protein subunits. *J. Biol. Chem.* 270: 18691-18699.
- Clark, T.M., A. Koch and D.F. Moffett. 1999. The anterior and posterior 'stomach' regions of larval *Aedes aegypti* midgut: regional specialization of ion transport and stimulation by 5-hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 202: 247-252.
- Clark, T.M. and T.J. Bradley. 1996. Stimulation of Malpighian tubules from larval *Aedes aegypti* by secretagogues. *J. Insect Physiol.* 42: 593-602.
- Clark, T.M. and T.J. Bradley. 1997. Malpighian tubules of larval *Aedes aegypti* are hormonally stimulated by 5-hydroxytryptamine in response to increased salinity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34: 123-141.
- Coast, G.M. 1996. Neuropeptides implicated in the control of diuresis in insects. *Peptides* 17: 327-336.
- Coast, G.M. 1998. Insect diuretic peptides: structures, evolution and actions. *Am. Zool.* 38: 442-449.
- Coast, G.M., I. Orchard, J.E. Philips and D.A. Schooley. 2002. Insect diuretic and antidiuretic hormones. *Adv. Insect Physiol.* 29: 279-409.
- Colas, J.-F., J.-M. Launay and L. Maroteaux. 1999. Maternal and zygotic control of serotonin biosynthesis are both necessary for *Drosophila* germband extension. *Mech. Dev.* 87: 67-76.
- Colas, J.-F., J.-M. Launay, O. Kellermann, P. Rosay and L. Maroteaux. 1995. *Drosophila* 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with *fushi-tarazu* during segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5441-5445.
- Gerhardt, C.C. and H. van Heerikhuizen. 1997. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 334: 1-23.
- Giles, H., S.J. Lansdell, M.L. Bolofo, H.L. Wilson and G.R. Martin. 1996. Characterization of a 5-HT_{1B} receptor on CHO cells: functional responses in the absence of radioligand binding. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1119-1126.
- Hill, C.A., A.N. Fox, R.J. Pitts, L.B. Kent, P.L. Tan, M.A. Chrystal, A. Cravchik, F.H. Collins, H.M. Robertson and L.J. Zwiebel. 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 176-178.
- Holman, G.M., R.J. Nachman and G.M. Coast. 1999. Isolation, characterization and biological activity of a diuretic myokinin neuropeptide from the housefly, *Musca domestica*. *Peptides* 20: 1-10.
- Kay, I., G.M. Coast, O. Cusinato, C.H. Wheeler, N.F. Totty and G.J. Goldsworthy. 1991. Isolation and characterization of a diuretic peptide from *Acheta domesticus*, evidence for a family of insect diuretic peptides. *Biochem. Chem.* 372: 505-512.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* 15: 8125-8148.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lange, A.B., I. Orchard and F.M. Barrett. 1989. Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 35: 393-399.
- Laurenza, A., E.M. Sutkowski and K.B. Seamon. 1989. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 442-447.
- Lee, D.-W. and P.V. Pietrantonio. 2003. *In vitro* expression and pharmacology of the 5-HT₇-like receptor present in the mosquito *Aedes aegypti* tracheolar cells and hindgut-associated nerves. *Insect Mol. Biol.* 12: 561-569.
- Lehmbert, E., R. Ota, K. Furuya, D. King, S. Applebaum, H.

- Ferenz and D. Schooley. 1991. Identification of a diuretic hormone of *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1036~1041.
- Nässel, D.R. 1996. Neuropeptides, amines, and amino acids in an elementary insect ganglion: functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. *Prog. Neurobiol.* 48: 325~420.
- Novak, M.G., J.M. Ribeiro and J.G. Hildebrand. 1995. 5-hydroxytryptamine in the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* and its role in regulation of salivation. *J. Exp. Biol.* 198: 167~174.
- Novak, M.G. and W.A. Rowley. 1994. Serotonin depletion affects blood-feeding but not host-seeking ability in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 31: 600~606.
- Ohtaki, T., K. Ogi, Y. Masuda, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, C. Kitada, H. Sawada, H. Onda and M. Fujino. 1998. Expression, purification, and reconstitution of receptor for pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide: Large-scale purification of a functionally active G protein-coupled receptor produced in Sf9 insect cells. *J. Biol. Chem.* 273: 15464~15473.
- Pietrantonio, P.V., C. Jagge and C. McDowell. 2001. Cloning and expression analysis of a 5HT₇-like serotonin receptor cDNA from mosquito *Aedes aegypti* female excretory and respiratory systems. *Insect Mol. Biol.* 10: 357~369.
- Pietrantonio, P.V., G. Gibson, D. Petzel, A. Strey and T.K. Hayes. 2000. Characterization of a leucokinin binding protein in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Malpighian tubule. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1147~1159.
- Roeder, T. 1994. Biogenic amines and their receptors in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C: 1~12.
- Saudou, F., U. Boschert, N. Amlaiky, J.-L. Plassat and R. Hen. 1992. A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signaling properties and expression patterns. *EMBO J.* 11: 7~17.
- Schoofs, L., G.M. Holman, P. Proost, J. Van Damme, T.K. Hayes and A. De Loof. 1992. Locustakinin, a novel myotropic peptide from *Locusta migratoria*, isolation, primary structure and synthesis. *Regul. Pept.* 37: 49~57.
- Schooley, D.A. 1991. Chemical identification of insect diuretic peptides. pp. 83~94. *In Insect Neuropeptides: Chemistry, Biology and Action*, eds. by J.J. Menn, T.J. Kelly and E.P. Malser. 453pp. American Chemical Society, Columbus, OH.
- Seamon, K.B., W. Padgett and J.W. Daily. 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3363~3367.
- Towbin, H.R., R. Stachelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350~4354.
- Yu, M.J. and K.W. Beyenbach. 2002. Leucokinin activates Ca²⁺-dependent signal pathway in principal cells of *Aedes aegypti* Malpighian tubules. *Am. J. Physiol.* 283: F499~F508.
- Vallés, A.M. and K. White. 1988. Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: development and distribution. *J. Comp. Neurol.* 268: 414~428.
- Vanden Broeck, J. 2001. Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48: 1~12.
- Veenstra, J.A. 1988. Effects of 5-hydroxytryptamine on the Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 34: 299~304.
- Witz, P., N. Amlaiky, J.-L. Plassat, L. Maroteaux, E. Borrelli and R. Hen. 1990. Cloning and characterization of a *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8940~8944.

(Received for publication 12 April 2004;
accepted 10 May 2004)