

도파민 수송체의 기능적 특성 및 발현에 관한 연구

이상훈** · 이송득 · 성기욱 · 이동섭 · 이용성* · 고재경*
국립보건안전연구원, *한양대학교 의과대학

(Received February 23, 1995)

Functional Characterization and Regional Expression of Dopamine Transporter

Sang-Hun Lee**, Song-Deuk Lee, Ki-Wug Sung, Dong-Sup Lee,
Yong-Sung Lee*, Jai-Kyung Koh*

National Institute of safety Research, Seoul 122-020, *College of Medicine, Hanyang University

Abstract—Brain dopamine systems play a central role in the control of movement, hormone release, and many complex behavior. The action of dopamine at its synapse is terminated predominately by high affinity reuptake into presynaptic terminals by dopamine transporter (DAT). The dopamine transporter(DAT) is membrane protein localized to dopamine-containing nerve terminals and closely related with cocaine abuse, Parkinsonism, and schizophrenia. In present study, the recombinant plasmid pRc/CMV-DAT, constructed by subcloning of a cDNA encoding a bovine DAT into eukaryotic expression vector pRc/CMV, was stably transfected into CV-1 cells(monkey kidney cell line). The DAT activities in the cell lines selected by Geneticin^R were determined by measuring the uptake of [³H]-dopamine. The transfected cell lines showed 30-50 fold higher activities than untransfected CV-1 cell line, and this result implies that DAT is well expressed and localized in transfected cells. The transfected cells accumulated [³H]-dopamine in a dose-dependent manner with a K_m of 991.6 nM. Even though high doses of norepinephrine, epinephrine, serotonin, and choline neurotransmitters inhibited the uptake of [³H]-dopamine, DAT in transfected cell line was proven to be much more specific to dopamine. The psychotropic drugs such as GBR12909, CFT, normifensine, clomipramine, desipramine, and imipramine inhibited significantly the dopamine uptake in tissue culture cells stably transfected with DAT cDNA. Radioactive *in situ* hybridization was done to map the cellular localization of DAT mRNA-containing cells in the adult rat central nervous system. The strong hybridization signals were detected only in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. The restricted anatomical localization of DAT mRNA-containing cells confirms the DAT as a presynaptic marker of dopamine-containing cells in the rat brain.

Keywords □ Dopamine transporter(DAT), stable expression, CV-1 cells, uptake of [³H]-dopamine, psychotropic drugs, *in situ* hybridization, substantia nigra.

중추신경계에서 신경전달물질로 작용하는 도파민은 운동의 조절, 홀몬의 분비, 행동 및 각종 정신활동과 관련이 있는 것으로 알려지고 있으며,^{1, 3)} 신경말단에서 분비된 도파민은 dopamine transporter(도파민 수송체)라는 막단백에 의해 Na⁺과 함께 동시수송 방식으로^{4, 6)} 재흡수됨으로써 그 신호전달 작용이 증식되는 것으로 알려졌다.⁷⁾

도파민 수송체는 presynaptic neuron의 세포막에

존재하는 분자량 60,000~80,000의 당단백으로서 12개의 세포막 통과 부위, 5개의 세포막내 고리 및 6개의 세포막외 고리로 구성되어 있으며, 특히 2번째 세포막외 고리가 다른 고리에 비해 크고 N-말단과 C-말단이 모두 세포내에 존재한다는 구조적 특징을 가지고 있다.^{8, 10)}

도파민 수송체는 파킨슨씨병, 정신분열증, 및 Gilles de la Tourette syndrome 등의 정신과적 병변과 깊은 관련이 있을 뿐만 아니라, 각종 독성물질들이 본 수

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

송체를 통해 신경세포에 침입함으로써 그 세포독성을 나타내며, 각종 정신 신경계용 약물들도 도파민 수송체의 도파민 수송작용을 저해함으로써 그 약리작용을 나타냄이 밝혀졌다.¹¹⁻¹³⁾ 특히 도파민 수송체는 코카인 중독과 깊은 관련이 있는데, 항정신성 약물인 코카인에 대한 self-administration 실험^{11,12)}에 의하면 코카인중독시 생기는 코카인 의존성은 mesolimbic system에 존재하는 도파민 수송체에 본 약물이 작용함으로써 생기는 것으로 설명되어지고 있다.¹⁴⁾

도파민 이외의 다른 monoamine 신경전달물질도 각각에 대해 높은 친화력을 보이는 수송체가 존재하여 중추신경계의 기능유지에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며^{15,16)} 최근 이들에 대한 분자생물학적인 연구의 결과로 GABA 수송체의 cDNA가 cloning된 것¹⁷⁾을 필두로 noradrenaline, serotonin 및 도파민 수송체의 cDNA가 cloning되어¹⁸⁻²³⁾ 이들의 구조와 기능에 관한 많은 부분이 밝혀지고 있다.

지금까지 신경전달물질 재흡수에 관한 많은 연구에도 불구하고 이에 관한 정보는 매우 적은 형편인데 이는 아직까지 신경전달물질 재흡수에 관여하는 수송체 단백 어느것도 완전하게 뇌조직으로부터 분리, 정제되지 않았기 때문이다. 또한 지금까지 알려진 신경전달물질 수송체의 특성 및 재흡수 기전에 관한 정보들도 순수하지 않은 실험모델을 이용하여 얻은 것이므로 실제와는 많은 차이를 보이는 것으로 밝혀졌다.⁹⁾ 이에 본 연구에서는 순수한 도파민 수송체 실험모델을 얻기 위해 cloning된 도파민 수송체 cDNA²³⁾를 원숭이 신장세포인 CV-1 세포에 도입하여 도파민 수송체 발현체계를 확립하고 이를 이용하여 도파민 수송체의 기능적 특성을 구명하였으며, 이와 아울러 도파민 수송체에 특이한 탐침을 이용한 *in situ* hybridization을 실시하여 중추신경계에서 도파민 수송체 유전자의 발현 양상도 추구하고 보고자 하였다.

실험재료 및 방법

CV-1 배양세포로 도파민 수송체 유전자의 stable transfection

도파민 수송체 cDNA²³⁾를 CMV promoter를 가진 eukaryotic expression vector인 pRc/CMV(Invitrogen사)의 multiple cloning site중 *Hind*III와 *Not*I site사이에 삽입하여 expression plasmid pRc/CMV-

DAT를 제조하였으며, 이를 대장균주 DH5 α 에 calcium chloride방법²⁴⁾에 의해 형질전환(transformation)하고 형질전환된 균주로 부터 plasmid를 alkali lysis 방법²⁵⁾에 의해 분리하였으며 polyethylene-glycol 방법²⁶⁾에 의해 그 plasmid를 정제하였다.

60 mm 배양접시에 CV-1세포, 1~2 \times 10⁵개를 접종하여 DMEM배지로 18~24시간 배양하여 세포가 바닥에 30~50%정도 깔리도록 하였다. OPTI-MEM I배지 100 μ l에 pRc/CMV-DAT plasmid DNA가 2 μ g포함되어 있는 용액 A와 OPTI-MEM I 배지 100 μ l에 10 μ l의 Lipofectin[®](BRL사)이 함유된 용액 B를 섞어 실온에서 15분간 방치하였다. 세포는 2 ml의 OPTI-MEM I 배지로 한번 세척하고 위에서 제조한 Lipofectin-DNA용액에 1.8 ml의 OPTI-MEM I을 가하여 세척된 세포위에 가한 후 18시간 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 4 ml DMEM으로 배양액을 교환하고 48시간 더 배양한 후 5개의 배양접시에 나눠 Geneticin[®](BRL사)이 400 μ g/ml로 함유된 DMEM배지에서 배양하였다. Geneticin[®]으로 2개월 이상 선택하여 tranfection된 세포만으로 구성된 군락(colony)중 임의로 11개만 선택했으며, 각 colony위에 trypsin-EDTA용액(Sigma사)을 가하여 배양접시 밑바닥에서 colony를 띄어 내어 각각 다른 배양접시에 접종하고 지속적으로 Geneticin[®] 존재하에 배양함으로써 도파민 수송체 유전자가 stable하게 transfection된 세포주들을 얻었다.

도파민 수송체 활성 측정

12-well plate에 도파민 수송체 유전자가 transfection된 세포주, 2 \times 10⁴개를 접종하여 하룻밤 동안 Geneticin[®]이 함유된 DMEM배지에서 키운후 세포를 완충액 [25 mM HEPES(pH 7.4), 125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 1 mM ascorbic acid, 100 μ M pargyline] 1 ml로 세척하고 완충액 존재하에서 15분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응하였다. 완충액을 제거한 후 완충액으로 제조한 0.5 μ M [³H]-dopamine 용액 (51 Ci/mmol, Amersham사), 100 μ l을 각 plate에 가하고 실온에서 흔들면서 10분간 반응하였다. Plate를 미리 차게해 둔 완충액으로 반응을 중단시킨 후, 완충액 1 ml로 3번 세척하여 세포안으로 수송되지 못한 [³H]-dopamine를 제거하였다. 0.5M NaOH용액, 200

μ 로 세포막을 파괴시키고 이를 수거하여 세포질내로 수송된 [3 H]-dopamine의 양을 scintillation counter (Tri-Carb 2010, Packard 사)로 측정하였다. 또한 각 well에 0.5% triton X-100, 200 μ 를 가해 세포막을 파괴한 후 이를 수거하여 단백 함량을 Bio-Rad사의 protein assay kit[®](Bio-Rad사)를 사용하여 측정하였다. 도파민 수송체의 특이성을 구명하기 위해 사용된 dopamine, epinephrine, norepinephrine, choline, serotonin과 향정신성 약물의 도파민 수송체에 대한 영향을 구명하기 위해 사용한 GBR12909, CFT, nomifensine, clomipramine, desipramine, imipramine 시약은 Research Biochemical International(RBI)사에서 구입하였다.

In situ hybridization

조직 slide 제조—조직 절편을 부착하기 위하여 Scott Young의 방법²⁷⁾에 따라 gelatin을 2번 coating한 유리 slide를 제작하였다. 흰쥐를 이산화탄소 가스로 질식사 시킨후 즉시 뇌를 꺼내 Tissue-Tek[®]과 함께 -70°C 냉동고에 얼렸다. -15°C에서 microtome(Histostat[®], AO사)을 이용하여 12 μ m 두께로 부위별로 뇌조직 절편을 만들어 앞에서 제작한 gelatin coated slide에 부착하였으며 다음 실험에 사용하기전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

도파민 수송체에 특이한 oligonucleotide 탐침의 제작—도파민 수송체 mRNA를 검출하기 위한 oligonucleotide 탐침으로는 신경전달물질 수송체간에 상동성을 띠는 염기서열중에서 다른 monoamine 신경전달물질 수송체와는 달리 흰쥐 도파민 수송체에만 특이한 cDNA의 염기서열(염기서열번호 1015~1057; Shimada *et al.*, 1991)에 상보적인 43개의 antisense oligonucleotide를 합성하여 사용하였다.

Hybridization 반응 및 autoradiography—앞에서 제작한 조직절편 slide를 paraformaldehyde 용액 [4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)]에 5분간 방치하고 PBS(phosphate-buffered saline)로 2번 세척한 후 10분간 acetic anhydride 용액 [0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine HCl(pH 8.0)]에 담겼다. 70%, 80%, 95%, 100% ethanol, chloroform, 100% ethanol 및 95% ethanol로 순차적으로 1~5분간 담귀 조직의 지방성분을 제거하고 상온에서 말려 사용하였다.

Oligonucleotide 탐침에 방사선 동위원소를 표지하기 위한 반응액 50 μ 에는 2 pmole의 탐침, 1 mM dithiothreitol, 25 mM CoCl₂, 0.2M potassium cacodylate, 25 mM Tris-HCl, 0.25 mg/ml bovine serum albumin, 25U terminal transferase(BM사), 및 1 μ M의 ³⁵S-dATP(600 Ci/mmol, Amersham사)가 포함되었으며 36°C에서 90분간 반응하였다. Yeast transfer RNA 용액(27.5 ng/ μ) 4 μ 를 가하고 phenol : chloroform extraction, ethanol precipitation 과정을 실시하여 방사성동위원소가 표지된 탐침을 정제한 후 50 μ TE 완충액으로 녹여 그 방사선양을 scintillation counter(Tri-carb 2000CA, Packard 사)로 측정하였다.

각 조직절편주위에 경계를 설정하고, 2 \times 10⁶ DPM의 탐침이 함유된 hybridization 용액 [50% formamide, 600 mM NaCl, 80 mM Tris-Cl(pH 7.5), 4 mM EDTA, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, 0.2 mg/ml sodium heparin, 10% dextran sulfate, 100mM dithiothreitol] 50 μ 가하여 37°C humid chamber 안에서 24시간 동안 hybridization 반응을 실시하였다. 2 \times SSC와 formamide가 50%로 포함된 2 \times SSC(sodium chloride/sodium citrate, 1 \times 150 mM sodium chloride, 15 mM sodium citrate) 용액으로 hybridization 반응이 끝난 slide를 순차적으로 세척하고, 45°C에서 가볍게 흔들면서 formamide가 50%로 포함된 2 \times SSC 용액으로 15분간씩 3번 세척하였다. 다시 상온에서 1 \times SSC로 30분간씩 2번 세척하고 증류수에 잠깐동안 담귀되었다. 70% ethanol로 1분간, 80% ethanol로 1분간, 95% ethanol로 2분간, 100% ethanol로 1분간씩 2번, 100% xylene로 5분간, 100% ethanol로 1분간, 100% acetone으로 1분간, 100% ethanol로 1분간, 95% ethanol로 1분간씩 순차적으로 세척하고 상온에서 건조시켰으며 Hyperfilm β max[®] X-ray 필름에 2주간 노출시켰다. 또한 동시에 emulsion autoradiography도 실시하였는데, 암실에서 미리 40~45°C로 데워놓은 emulsion액(NTB2, Kodak 사)에 세척과정이 끝난 slide를 10초 이상 담귀 후 완벽하게 빛이 차단된 암상자에서 2시간 건조시켰다. 그 후 4°C에서 약 30일간 놓아둔 후 현상하였다.

실험결과

Stable transfection 결과—위에 제시한 실험 방법

Table I—DAT activity in CV-1 cells transfected with pRc/CMV-DAT

Transfected cell Lot No.	Amount of [³ H]-dopamine uptake* (pmole/g protein)
No transfected CV-1	555.6
1	26124.2
2	NG
3	870.5
4	3750.9
5	933.6
6	NG
7	638.5
8	17660.1
9	NG
10	NG
11	25125.4

*Means of duplicated determinations. Dopamine transporter activity was determined by measuring the amounts of [³H]-dopamine uptake in the CV-1 cells in the presence of 0.5 μM [³H]-dopamine for 10 min. NG=No Growth

대로 transfection을 실시하고 2개월 이상 stable한 세포주를 선택한 결과 5개의 세포배양접시에서 부터 150개 정도의 colony를 얻을 수 있었다. 이중 임의로 11개의 colony를 선택해 각각을 다른 배양접시에 접종하여 키웠으며 각각의 세포주에 임의로 번호를 부여하였다. 선택한 4개의 colony는 실험에 사용할 정도로 세포수가 증가하지 않아 다음 실험에 사용할 수 없었으며 나머지 7개의 세포주에 대해서 도파민 수송체 활성측정을 실시하였다. 그 결과 1번, 11번, 8번 세포주의 도파민 수송체에 의한 도파민 수송능력은 각각 26124, 25125 및 17660 pmole/g protein으로 도파민 수송체 유전자로 transfection되지 않은 세포주의 수송능력 555 pmole/g protein에 비해 30~50배 가량 높았으며 반복된 여러번의 실험에서도 비슷한 결과를 보였다(Table I). 나머지 4개 세포주도 transfection되지 않은 세포주보다는 높은 도파민 수송능을 보였으나 그 차이가 현저하지는 않았다. 이에 가장 활성이 높은 1번 세포주로 다음의 모든 실험을 실시하였다.

항정신성 약물이 도파민 수송체의 도파민 수송능력에 미치는 영향—본 연구에서 발현된 도파민 수송체는 첨가된 [³H]-dopamine의 양에 비례하여 [³H]-

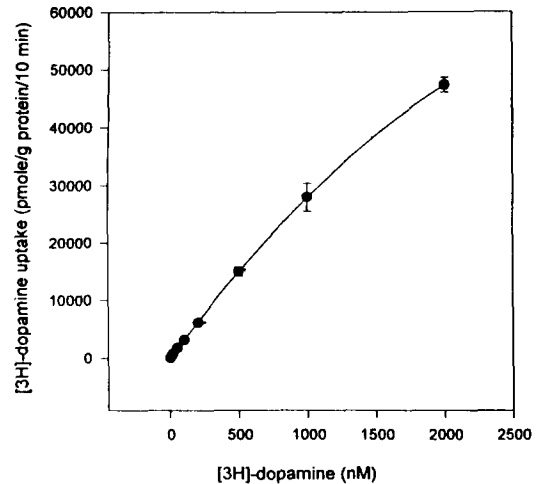


Fig. 1—Dose effect on the uptake activity of dopamine transporter. DAT-transfected CV-1 cells were incubated with increasing concentrations of [³H]-dopamine for 10 min as described in 'Materials & Methods'. Values in representative curve reflect the mean ± SD. K_m value was calculated using personal computer program 'PCS(Pharmacologic Calculation System) version 4.0'.

dopamine을 세포안으로 수송하였으며(Fig. 1), 본 수송체의 K_m 치(Michaelis constant)는 991.6 nM로 분석되었다.

또한 50 nM의 [³H]-dopamine이 함유되어 있는 반응액에 방사선이 표지되지 않은 신경전달물질 dopamine, norepinephrine, epinephrine, serotonin, 및 choline을 각각 10 μM 되게끔 첨가하여 각 신경전달물질에 의해 [³H]-dopamine의 수송이 얼마나 차단되는지를 측정함으로써 본 도파민 수송체의 특이성을 평가하고자 하였다. 그 결과 도파민 수송체의 [³H]-dopamine 수송은 방사선이 표지되지 않은 도파민을 첨가하였을 때 첨가하지 않았을 때의 28%로 현저히 감소하였으며 도파민 이외의 다른 신경전달물질을 첨가한 반응액에서도 첨가하지 않은 반응액의 61~76%로 그 수송능이 감소하였다(Table II).

CFT를 비롯한 항정신성 약물은 도파민 수송체의 도파민 수송능을 저해하는 경향을 보였는데 도파민 수송을 50% 감소시키는 약물의 농도인 IC_{50} 치로 각 약물의 저해 강도를 평가하였을때, 코카인 유사체인 CFT의 IC_{50} 치가 267 nM로 가장 낮아 측정된 항정신

Table II—Inhibitory effects of various neurotransmitters on DAT in CV-1 cells transfected with pRc/CMV-DAT

Neurotransmitter	Amount of [³ H]-Dopamine uptake ^{a,b} (%) ^c
Control ^d	1819.5± 28.7(100)
Dopamine	522.4± 126.8(28)
Norepinephrine	1379.4± 65.7(76)
Epinephrine	1239.8± 98.7(68)
Serotonin	1108.4± 113.1(61)
Choline	1255.9± 25.6(69)

^aAll values derived from three determinations and expressed as mean± SD

^bValues are the amounts of [³H]-dopamine uptaked from DAT-transfected cells for 10 min in the presence of 50 nM [³H]-dopamine and 10 μM various unlabelled neurotransmitters(pmole/g protein).

^cRelative activities of that of control

^dNo unlabelled neurotransmitter added.

Table III—IC₅₀ values(nM) of various psychotropic drugs at the dopamine transporter

Drugs	IC ₅₀ *(nM)
CFT	267
GBR12909	453
Nomifensine	856
Clomipramine	4642
Imipramine	7350
Desipramine	9815

* Concentrations of drugs at which 50% of [³H]-dopamine uptake are inhibited.

성 약물중 도파민 수송 저해능이 가장 강력한 것으로 평가 되었으며 그 다음은 역시 코카인 유사체인 GBR 12909이었다. Tricyclic antidepressant의 도파민 수송 저해능은 코카인 유사체보다는 크지 않았으며, 항우울제중에는 nomifensine이 그 IC₅₀치가 856 nM로서 가장 강력한 도파민 수송 저해제였으며, 그 다음은 clomipramine, imipramine, 및 desipramine순이었다(Table III과 Fig. 2).

In situ hybridization—*In situ* hybridization을 실시한 결과 도파민 수송체 mRNA의 발현은 도파민을 분비하는 세포가 존재하는 부위에만 제한되는 것으로 분석되었다. 즉 film autoradiography상 도파민 분비 세포가 집중되어 있는 중뇌의 substantia nigra pars compacta와 ventral tegmental area부위에서만 강한

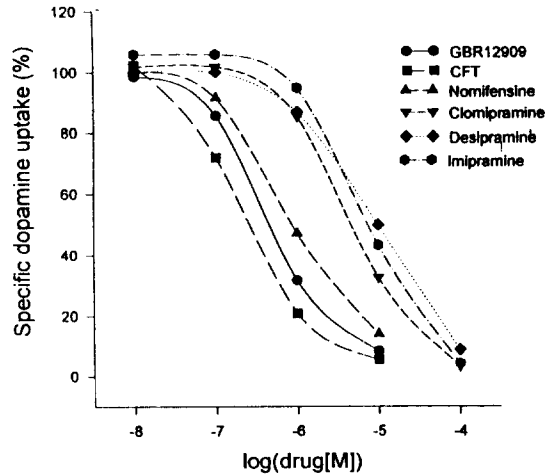


Fig. 2—Inhibition of dopamine transport by psychotropic drugs. DAT-transfected CV-1 cells were simultaneously incubated with 0.2 μM [³H]-dopamine and various concentrations of drugs as described in 'Materials & Methods'.

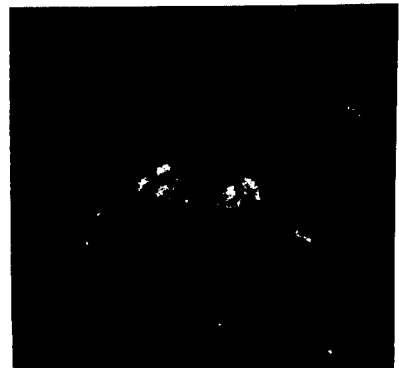


Fig. 3—Film autoradiography showing the distribution of DAT mRNA in the rat midbrain as revealed by *in situ* hybridization. Note the intense hybridization signal in the substantia nigra and ventral tegmental area.

signal이 검출되었으며, emulsion autoradiography를 실시하고 Nissl staining으로 세포를 염색하였을때 이들 부위중에서도 도파민 분비세포인 magnocellular cell에서만 도파민 수송체 mRNA가 검출되었다(Fig. 3과 4)

고 찰

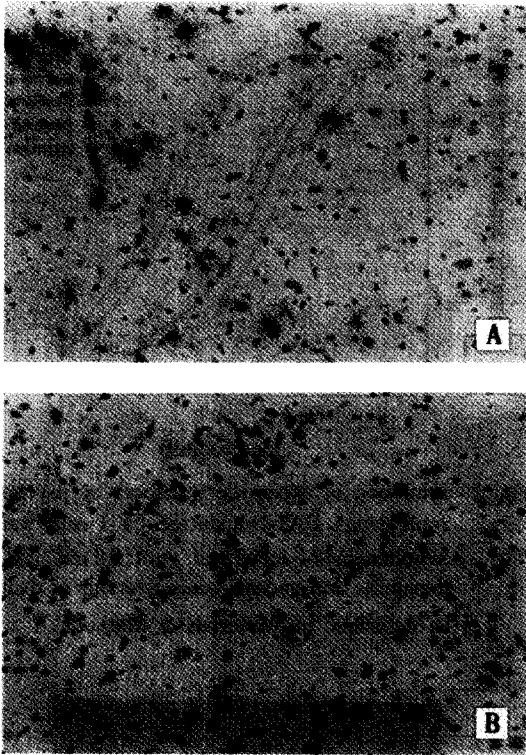


Fig. 4—Photomicrography showing the cellular localization of DAT mRNA within coronal section of rat midbrain. A: Sites of DAT mRNA are visualized by the clustering of silver grains over dopaminergic magnocellular cell bodies in the substantia nigra pars compacta. Section has been counterstained to allow visualization of the cell bodies with cresyl violet. B: Counterstained section(control) of substantia nigra pars compacta hybridized with ^{35}S -labeled oligonucleotide probe in the presence of an excess(100-fold) of unlabeled oligonucleotide.

인간의 정신활동 및 각종 행동 양식은 신경전달물질에 의한 신호 전달에 기인하는 것으로 설명되어지며 이런 신경전달물질은 신경세포 말단에서 분비되어 postsynaptic membrane 수용체에 결합하여 그 신호를 전달한 후 빠른 시간내에 각 신경전달물질에 특이한 수송체에 의해 신경세포로 재흡수됨으로써 제거되는 것으로 알려지고 있는데, 이런 방식의 신경전달물질의 제거가 monoamine 신경전달물질의 신호 전달 작용을 종식시키는 주요 기전이라 여겨지고 있다.⁷⁾

최근 분자생물학적 연구에 의해 GABA 수송체를 비롯하여 noradrenaline, serotonin 및 도파민 수송체의 cDNA가 cloning되었으며¹⁷⁻²³⁾ 이에 대한 연구가 활발히 진행중이다. 본 연구에서는 순수한 도파민 수송체 실험모델을 얻기 위해 cloning된 도파민 수송체 cDNA²³⁾를 원숭이 신장세포인 CV-1 세포에 도입하여 발현체계를 확립하였으며 이를 이용하여 도파민 수송체의 기능적 특성을 추구해 보고자 하였다. 이를 위해 CMV promoter에 의해 발현이 주도되는 eukaryotic expression vector인 pRc/CMV의 *HindIII*, *NotI* site 사이에 소뇌 도파민 수송체 cDNA가 삽입된 재조합 plasmid pRc/CMV-DAT를 분리 정제하였으며 이를 liposome을 이용한 방법으로 도파민 수송체가 발현되지 않는 세포인 CV-1세포에 도입한 후 Geneticin[®]으로 2개월간 지속적으로 도파민 수송체 cDNA가 도입된 세포를 선택하는 과정을 통해 영구적으로 도파민 수송체를 발현하는 순수한 세포주를 얻을 수 있었다. 도파민 수송체 cDNA가 도입된 세포군락 11개를 각각 따로 배양한 후 이중 실험에 사용할 수 있도록 충분히 배양된 7개의 세포주로 도파민 수송체 활성을 측정하였다. 도파민 수송체 활성은 일정수의 세포에 [^3H]-dopamine을 가하여 세포내로 흡수된 [^3H]-dopamine양을 측정함으로써 평가하였는데 이때 사용된 완충액에는 125 mM의 Na이온을 포함시켜 수송체의 수송작용을 원활하도록 하였으며 도파민 등의 monoamine 신경전달물질을 분해하는 monoamine oxidase에 대한 저해제인 pargyline을 포함시킴으로써 첨가된 [^3H]-dopamine의 분해를 최소화하였다. 본 연구 체계에서 발현된 도파민 수송체의 도파민 수송능의 K_m 치는 991.6 nM로서 본 연구와 같은 방법으로 흰쥐 도파민 수송체 cDNA를 HeLa cell에 transfection한 Kilty 등의 연구²¹⁾에서의 K_m 치인 885 nM과 비슷하였다. 도파민 수송체의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 방사선이 표지되지 않은 dopamine, epinephrine, norepinephrine, choline, serotonin을 [^3H]-dopamine과 동시에 세포에 첨가하여 [^3H]-dopamine의 세포내로의 수송이 이들 신경전달물질에 의해 얼마만큼 저해되는지를 평가하였다. 본 발현체계에서 발현된 도파민 수송체에 의한 [^3H]-dopamine의 세포내로의 수송능은 다른 신경전달물질보다 도파민에 의해 가장 현저히 감소하여 도파민에 특이성을 보이는 것으로 분석되었으나

다른 신경전달물질에 의한 [³H]-dopamine 수송의 저해 효과도 무시할 수 있을 만큼 적은 것은 아니었다. 이와 같은 현상은 Giros 등의 연구²⁸⁾ 등을 비롯하여 다른 많은 연구에서도 일반적으로 나타났으며, 이는 세포막에 존재하는 도파민 수송체가 이들 신경전달물질에 의해 비특이적으로 점유됨으로써 [³H]-dopamine과 도파민 수송체의 결합을 저해한 것에 기인한 것으로 분석되어지며 monoamine 신경전달물질 수송체 간의 구조적 유사성을 고려할때 충분히 설명되어질 수 있는 것으로 사료된다.

또한 코카인, amphetamine, tricyclic antidepressant 등의 항정신성 약물이 도파민 수송체의 도파민 수송능을 특이적으로 저해하는 것으로 알려져 있다.^{21,23,28)} 이에 본연구에서는 코카인 유사체인 GBR 12909와 CFT, tricyclic antidepressant인 nomifensine, desipramine, imipramine, 및 clomipramine의 도파민 수송체의 저해정도를 평가해 보았는데, 도파민 수송체의 도파민 수송의 저해능은 CFT, GBR12909, nomifensine, clomipramine, imipramine, desipramine순으로 분석되었으며, 이는 Usdin등의 연구²⁹⁾와 유사한 결과였다.

In situ hybridization histochemistry에서 도파민 수송체 mRNA는 ventral mesencephalon의 도파민을 분비하는 세포에서만 발현되는 것으로 분석되었는데, 이는 Augood 등의 연구²⁹⁾ 및 Usdin 등의 연구²³⁾와 일치하는 결과였으며, 본 실험 방법은 중추신경계에서 도파민 분비 세포만을 특이하게 검출하는 방법으로 이용될 수 있음을 시사한다.

본 연구는 아직까지 우리나라에서 연구가 진행되고 있지 않은 도파민 수송체에 관한 기초적인 실험방법 및 정보를 제공하였으며, 이에 본 연구를 통하여 도파민 수송체와 깊은 관련이 있는 파킨슨씨병등의 정신질환의 발병 기전 및 치료의 근본적인 근거를 제공하고자 하는 많은 연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 순수한 도파민 수송체 실험모델을 얻기 위해 cloning된 도파민 수송체 cDNA를 원숭이 신장세포인 CV-1 세포에 도입하여 도파민 수송체 발현체계를 확립하였고 이를 이용하여 도파민 수송체의

기능적 특성을 추구해 보고자 하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 도파민 수송체 cDNA가 eukaryotic expression vector인 pRc/CMV의 multiple cloning site에 삽입되어 있는 재조합 plasmid pRc/CMV-DAT를 원숭이 신장세포인 CV-1세포에 stable transfection하여 영구적으로 도파민 수송체를 발현하는 순수한 세포주를 얻었으며, 도파민 수송능을 평가한 결과 본 유전자가 도입되지 않은 CV-1 세포에 비해 이들 세포에서의 도파민 수송능이 30~50배로 평가되었으며 이에 확립된 세포주로 부터 우수한 도파민 수송능을 지닌 도파민 수송체가 잘 발현됨을 확인할 수 있었다.

2. 본 세포주에서 발현된 도파민 수송체의 K_m치 (Michaelis constant)는 991.6 nM로 분석되었고, 다른 신경전달물질보다는 도파민에 특이성을 보이는 것으로 분석되었다.

3. 코카인 유사체인 CFT와 GBR12909는 도파민 수송체의 도파민 수송능을 비교적 낮은 농도에서도 현저히 저해하였으며, 항우울제 중에는 nomifensine이 가장 강력한 도파민 수송저해제인 것으로 분석되었고, 그 다음은 clomipramine, imipramine, 및 desipramine순이었다.

4. 도파민 수송체에 특이한 antisense oligonucleotide 탐침을 이용한 *in situ* hybridization에서 도파민 수송체 유전자는 ventral mesencephalon의 substantia nigra pars compacta와 ventral tegmental area의 도파민 분비 세포에서만 발현되는 것으로 분석되었다.

문 헌

- 1) Ferland, L., Labrie, F., Cusan, L., Dupont, A., Lepine, J., Beaulieu, M., Denizeau, F. and Lemay, A.: *in* The endocrine functions of the brain. Raven press, New York, pp 271-296 (1980).
- 2) Bjoklund, A. and Lindvall, O.: *in* Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier press, Amsterdam, pp 55-122 (1984).
- 3) Iversen, S.: *in* Handbook of psychopharmacology. Plenum press, New York, pp 333-384 (1977).
- 4) Kuhar, M. J. and Zarbin, M. A.: Synaptosomal transporter. a chloride dependence for choline, GABA, glycine, and several other compounds. *J. Neuro-*

- chem.*, **31**, 251-256 (1978).
- 5) Johnstone, R.: Ion-coupled cotransporter. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2**, 735-41 (1990).
 - 6) Kanner, B. I. and Schuldiner, S.: Mechanism of transporter and storage of neurotransmitter. *Crit. Rev. Biochem.*, **22**, 1-38 (1987).
 - 7) Iversen, L. L.: in Handbook of psychopharmacology. Plenum press, New York, pp 381-442 (1975).
 - 8) Amara, S. G. and Kuhar, M. J.: Neurotransmitter transporters. Recent progress. *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**, 73-93 (1993).
 - 9) Giros, B. and Caron, M. G.: Molecular characterization of dopamine transporter. *Trend in Pharm. Sci.*, **14**, 43-49 (1993).
 - 10) Uhl, G. R. and Hartig, P. R.: Transporter explosion. update on uptake. *Trend in Pharm. Sci.*, **13**, 421-425 (1992).
 - 11) Bergman, J., Madras, B. K., Johnson, S. E. and Spealman, R. D.: Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates III. self-administration by squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 150-155 (1989).
 - 12) 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**, 1219-1223 (1987).
 - 13) Spealman, R. D., Madras, B. K. and Bergman, J.: Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates II. Stimulant effects on schedule-controlled behavior. *J. pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 142-149 (1989).
 - 14) Kuhar, M. J.: Molecular pharmacology of cocaine: a dopamine hypothesis and its implication. *Ciba Found Symp.*, **166**, 81-89 (1992).
 - 15) Glowniak, J. V., Kilty, J. E., Amara, S. G., Hoffman, B. J. and Turner, F. E.: Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine, and serotonin transporter. *J. Nuc. Med.*, **34**, 1140-1146 (1993).
 - 16) Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Mahesh, V. B. and Ganapathy, V.: Partial purification and characterization of the human placental serotonin transporter. *Placenta*, **14**, 449-461 (1993).
 - 17) Guastella, J., Nelson, N., Nelson, H., Czyzk, L. and Keynan, S.: Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science*, **249**, 1303-1306 (1990).
 - 18) Pacholczyk, T., Blakely, R. D. and Amara, S. G.: Expression cloning of a cocaine-and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*, **350**, 350-353 (1991).
 - 19) Blakely, R. D., Berson, H. E., Fremeau, R. T., Caron, M. G. and Peek, M. M.: Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature*, **354**, 66-70 (1991).
 - 20) Hoffman, B. J., Mezby, E. and Brownstein, M. J.: Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science*, **254**, 79-80 (1991).
 - 21) Kilty, J. E., Lorang, D. and Amara, S. G.: Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science*, **254**, 578-579 (1991).
 - 22) Shimada, S., Kitayama, S., Lin, C. L., Patel, A. and Nanthakumar, E.: Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science*, **254**, 576-578 (1991).
 - 23) Usdin, T. B., Mezey, E., Chen, C., Brownstein, M. J. and Hoffman, B. J.: Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 11168-11671 (1991).
 - 24) Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557 (1983).
 - 25) Birnboim, H. C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513 (1979).
 - 26) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: in Molecular cloning. a laboratory manual. Cold Spring Hsrbor: Laboratory Press, 2ed: 140-141 (1989).
 - 27) Wilkinson, D. G.: in *In Situ Hybridization*. IRL press, pp 34-35 (1992).
 - 28) 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), 383-390 (1992).
 - 29) Augood, S. J., Westmore, K., McKenna, P. J. and Emson, P. C.: Co-expression of dopamine transporter mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA in ventral mesencephalic neurons. *Mol. Br. Res.*, **20**, 328-334 (1993).