

Metabotropic glutamate receptor 5
(mGluR5)에 의한 tubby 단백질
조절 연구

연세대학교 대학원
의과학과
임 미 경

Metabotropic glutamate receptor 5
(mGluR5)에 의한 tubby 단백질
조절 연구

지도교수 김 철 훈

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

임 미 경

임미경의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 6월

감사의 글

미로 같은 의대 건물의 약리학교실을 못 찾아서 헤매던 저에게 이제는 집보다도 실험실이 더 편안한 곳이 될 수 있도록 많은 도움을 주신 모든 분들께 깊이 감사 드립니다.

교수님의 지치지 않는 학문에 대한 열정을 늘 본받고 싶었지만 따라가지 못한 저에게 부족한 부분을 지적해 주시고 이를 보완할 수 있는 능력을 가르쳐주신 김철훈 교수님께 감사의 마음을 드리고 싶습니다. 크고, 멀리 볼 수 있도록 이끌어 주셨던 김정환 교수님, 과학자로서 실험에 임하는 자세를 바로 잡을 수 있도록 지도해주시고 심사위원으로 많은 조언을 해주신 안영수 교수님, 따뜻한 격려와 배려로 약리학교실을 이끌어 주시는 김동구 교수님, 항상 밝은 모습으로 학생들을 맞이해주시는 김혜영 교수님, 보다 좋은 연구를 위하여 많은 조언을 해주신 이민구 교수님, 무한한 연구열정을 가지신 박경수 교수님, 열정적인 연구자의 모습을 보여주신 임주원 교수님, 많은 격려를 해주신 김주영 교수님, 언제나 열심히 일하시는 정재용 교수님, 실험에 대한 많은 조언을 해주신 이진우 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 심사위원으로 제 연구에 관심을 가져주시고 제가 미처 발견하지 못한 점까지 꼼꼼히 검토해 주시고 아낌없는 조언을 해주신 김재우 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

고갈되지 않는 많은 지식을 가지고 있는 정호오빠, 석사과정을 함께한 동기 기호오빠, 빠른 손 재연언니, 최고를 추구하는 영신이, 많은 조언과 관심을 가져주신 김영화선생님, 실험실 생활을 재미나게 해준 종화오빠, 보람언니, 스마트한 주경돈선생님, 착한 순옥언니, 멋쟁이 현영오빠, 아름다운 정수언니, 엉뚱매력 재석오빠, 따뜻한 정남언니, 귀여운 우영이, 푸근한 이성희선생님, 현명한 광진오션생님, 아리송한 진이언니, 허풍쟁이 현우오빠, 똑똑한 지현언

니, 4차원 소원이, 까칠한 준오오빠, 포토제닉 윤정, 개구쟁이 임아영선생님, 인기쟁이 선은, 바쁜 성복오빠, 궁금한 것 언제나 해결해 준 지현오빠, 맛있는 거 많이 사준 승근오빠, 맥가이버 임종수선생님, 예쁜 민선혜선생님, 삼촌 같은 김건태선생님에게도 감사를 드립니다.

그리고 사랑하는 나의 친구들 수화, 정연, 지희, 혜영, 혜란, 서진, 미애, TILer에게도 감사의 말을 전합니다.

마지막으로 항상 딸 걱정하시는 사랑하는 부모님, 세실언니, 새나언니에게도 감사의 마음을 전합니다.

2008. 6.

임미경

목 차

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 시약과 항체	6
2. 세포 배양	6
3. Transfection	7
4. Mutagenesis	8
5. Immunoprecipitation and Immunoblotting	8
6. Confocal microscopy	9
7. Pull-down assay	9
8. 통계처리	10
III. 결 과	11
1. Tubby의 세포내 위치 결정	11
2. MPEP에 의한 tubby의 핵으로의 이동 억제	13
3. mGluR5 C-terminus상 tubby의 결합 motif 확인	16
4. 신경세포에서 내인성 mGluR5에 의한 tubby의 핵내 이동	18
IV. 고 찰	20
V. 결 론	23
참고문헌	25
영문요약	29

그림 차례

- 그림 1. Tubby mutants에 따른 세포내 위치 변화
..... 12
- 그림 2. MPEP에 의한 mGluR5 유도 tubby 핵내 이동
억제 14
- 그림 3. Tubby와 결합하는 mGluR5 C-terminus상 부위
결정 17
- 그림 4. Hippocampal neuron에서 mGluR5 자극에 의한
tubby의 핵내 이동 실시간 이미지 19

표 차례

표 1. mGluR5와 tubby를 같이 발현시킨 Neuro 2A와 HeLa 세포에서 MPEP 처리에 따른 tubby의 핵으 로의 이동 변화	15
--	----

국문요약

Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)에 의한 tubby 단백 조절 연구

후천적 비만과 망막변성, 청력손실과 같은 감각신경 결손을 나타내는 *tubby mouse*는, 시상하부의 뇌실옆 핵과 해마상 용기 등 여러 뇌 영역에서 발현하는 *tubby* 단백을 만들어내는 *tub* 유전자의 돌연변이에 의한다고 알려져 있다. *Tubby*는 신경계 기능 이상과 관련된 *tubby mouse*의 표현형과 *tubby* 단백질의 특징적 분포 영역 때문에 뇌 기능에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있으나 아직까지 *tubby* 단백질의 기능과 관련된 분자적 작용기전은 명확하게 규명된 바가 없다. *Tubby*는 세포막 phosphoinositide의 일종인 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2)와의 결합으로 원형질막에 위치하고 있다가 활성화된 G protein-coupled receptor (GPCR)에 의한 phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$)의 작용으로 PIP_2 가 가수분해되면, 원형질막에서 핵으로 이동된다. 이런 과정은 $G\alpha_q$ -coupled receptor인 acetylcholine receptor M_1 과 serotonin receptor $5-HT_{2c}$ 에 의해 일어난다고 알려졌다. 하지만 뇌에서 신경 가소성, 신경 발달, 신경계 질환에서 중요한 역할을 하는 GPCR인 metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)와의 상관관계는 아직 규명되어 있지 않았다. 이에 본 연구는 우선, rat의 뇌 단백질에서 *tubby*와 mGluR5의 결합을 immunoprecipitation 분석법을 통해 확인 하였고, pull-down 분석법으로 *tubby*가 mGluR5 C-terminus의 아미노산 828-944 부위에 결합한다는 것을 확인하였다. 그리고 형광물질이 달린 *tubby*와 mGluR5를 Neuro 2A 세포와 HeLa 세포에 발현시켜서 *tubby* 단백질의 세포내 이동을 confocal microscopy로 관찰하였다. mGluR5가 있을 때 *tubby* 단백질이 핵으로 이동되어 있었으며, *tubby*의 위치가 바뀌는 것을 확인한 후 mGluR5의 길항제인 MPEP를 처리하면 Neuro 2A

세포와 HeLa 세포에서 mGluR5에 의한 tubby의 핵으로의 이동이 방해되는 것을 볼 수 있었다. Hippocampal neuron에서는 mGluR5의 효현제인 DHPG에 의해 내인성 tubby가 핵으로 이동하는 것을 실시간 이미지 기법을 통해 확인하였다. 이를 종합해 볼 때, mGluR5가 뇌 세포에서 tubby의 세포내 이동을 조절할 수 있는 내인성 GPCR로 생각된다.

핵심되는 말: mGluR5, tubby, $G\alpha_q$ -coupled receptor, PLC β

Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)에 의한 tubby 단백질 조절 연구

<지도교수 김 철 훈>

연세대학교 대학원 의과학과

임 미 경

I. 서론

Tubby mice는 *tub* 유전자의 자연적인 돌연변이에 의해서 일어나며, 후천적 비만과 망막변성, 청력손실과 같은 감각신경 결손을 나타낸다.¹⁻⁵ Tubby 단백질은 시상하부의 뇌실옆 핵과 해마상 용기 등 여러 뇌 영역과 일부 다른 조직에서 발현한다고 알려져 있다.^{2,6,7} Tubby 단백질은 tubby, TULP-1, -2, -3로 이루어진 tubby-like protein (TULP) family 4가지 단백질 가운데 하나로, 분자적 구조를 살펴보면, C-terminus에 270개의 아미노산으로 구성된 double-stranded DNA와 결합하는 domain을 가지고 있으며, 여기에는 phosphatidylinositol binding region이 포함되어 있다.⁶⁻¹⁰ 또한 N-terminus에는 nuclear localization signal (NLS)을 가진다.¹¹

Tubby 단백질은 소포체 이동과 insulin 신호전달 그리고 유전자 전사에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.¹¹⁻¹⁴ Insulin 신호전달과 관련하여 insulin receptor kinase인 ABL, JAK2에 의해 tubby 단백질의 tyrosine기가 인산화 되는 것이 알려져 있으며, 인산화된 tubby 단백질은 SRC homology 2 (SH2) domain을 가지고 있는 ABL, LCK, phospholipase C γ (PLC γ)와 결합하여 insulin 신호 전달을 SH2 domain 함유 단백질로 전달해 주는 역할을 할 것으로 생각된다.¹⁵ Tubby 단백질과 관련된 가장 대표적인 조절기전은 tubby가 $\text{G}\alpha_q$ -

coupled receptor에 의해 핵으로 이동되는 일련의 과정으로, tubby 단백질의 C-terminus부분에 있는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 결합 motif를 통해 원형질막에 결합하고 있던 tubby 단백질이 Gα_q-coupled receptor의 활성화에 의한 결과로 Gα_q가 PLCβ를 자극시키면 PIP₂가 가수분해되면서 원형질막에 결합하고 있던 tubby가 떨어져 나오게 된다. 이렇게 세포막으로부터 분리된 tubby 단백질은 N-terminus에 있는 NLS에 의해 핵으로 이동된다.^{16,17} 이 과정은 Gα_q signaling에 특이적으로 영향을 받는 것으로 보이며 acetylcholine receptor M₁과 serotonin receptor 5-HT_{2c}와 같은 Gα_q 연관 G protein-coupled receptor (GPCR)들이 전형적으로 이러한 신호전달을 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁹ 위에서 설명한 바와 같이 tubby 단백질의 핵으로의 이동은 매우 세밀한 조절 기전을 통해 결정될 뿐 아니라, *in vitro*에서 tubby 단백질이 double-stranded DNA와 결합하는 것이 보고되어 있어 이 단백질이 전사 인자로서 작용할 가능성이 높은 것으로 생각되고 있다. 하지만 어떤 유전자를 전사하는지는 아직 알려져 있지 않다.

한편 tubby 단백질이 뇌에 많이 발현할 뿐 아니라 유전자 발현 조절에 적합한 신호 전달기전을 가지고 있는 것을 감안할 때, 뇌에서 중요한 역할을 담당하고 있는 다양한 GPCR들과 상호 작용을 통해 뇌의 중요 기능들을 제어할 것으로 생각되어지나, 아직 제한된 수의 GPCR과의 상관관계만이 알려져 있다. 특히 뇌에서 신경 가소성, 신경 발달, 신경계 질환에서 중요한 역할을 하는 GPCR인 metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)와의 상관관계는 아직 연구된 바가 없다.

포유동물의 중추신경계에서 흥분성 신경전달물질인 glutamate는 ligand-gated channel (ionotropic receptor)와 G protein-coupled (metabotropic) receptor를 활성화 시킨다.^{20,21} Ionotropic glutamate receptor는 약리적인 작용과 그 구조에 따라 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 그리고 kainic acid (KA)로 나뉘고, metabotropic glutamate receptor는 각각의 subcellular localization에 따라 3

개의 그룹 즉, post-synaptic에 위치하는 Group-I (mGluR1, mGluR5)과 axon terminal에 위치하는 Group-II (mGluR2, mGluR3), Group-III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8)로 나뉜다.²⁰⁻²² mGluR은 일반적으로 7개의 transmembrane domain을 가지며, mGluR1a와 mGluR5a, mGluR5b는 특징적으로 긴 C-terminus를 가진다.²¹ 또한 mGluR은 여러 G protein과의 결합을 통해 다양한 signal pathway를 활성화 시킨다. 이 중 가장 특징적인 것은 $G_{q/11}$ 과 결합한 mGluR은 PLC를 활성화시키고, 활성화된 PLC는 PIP_2 를 diacylglycerol (DAG)과 IP_3 로 분해한다는 것이다. IP_3 는 소포체의 Ca^{2+} channel을 열어 Ca^{2+} 이온이 세포질 내로 나오게 된다.²⁰⁻²⁴

mGluR이 G_q 단백질과 결합한다는 것과 이로 인해 활성화된 PLC가 PIP_2 를 가수분해 시킨다는 것은 $G\alpha_q$ 연관 GPCR들이 전형적으로 tubby의 신호전달을 유도하는 것과 유사하다. 이를 바탕으로 본 연구는 세포주와 일차배양 hippocampal neuron을 이용하여 mGluR5에 의한 tubby의 작용을 배양 세포 시스템에서 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약과 항체

Tubby (T-19)와 anti-goat 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, anti-rabbit 항체는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. mGluR5와 tubby 항체는 New Zealand White (NEW)종 토끼에 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 항원을 첫번째는 Complete Freund's Adjuvant (CFA)와, 그 이후부터는 Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)와 섞어서 피하주사 하여 항체를 만들었다. mGluR5 항체는 C-terminus를 인식하는 peptide, KSSPKYDTLIIRDYTNSSSL을 항원으로 사용하였고, tubby 항체는 N-terminus를 인식하는 아미노산 1-189를 His tag이 달린 fusion protein으로 만들어서 항원으로 사용하였다. Group I mGluR 효현제인 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG)과 mGluR5의 길항제인 2-methyl-6-(2-phenyl-1-ethynyl) pyridine (MPEP)은 Tocris Bioscience (Ellisville, Missouri, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

HeLa와 Neuro 2A 그리고 HEK293T 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, Korea)에 10% fetal bovine serum과 항생제 (100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

Primary neuron culture는 다음과 같이 시행하였다. 임신 18일 Sprague-Dawley (SD) rat을 100% CO₂로 희생시킨 후 자궁에서 태아를 꺼내서 dissection solution (1% HEPES와 1% penicillin/streptomycin이 들어있는 Hanks' balanced salt solution; Invitrogen)으로 옮긴 후 참수하였다. 태아의 뇌에서 hippocampus를 분리해서 잘게 자른 다음 0.5% trypsin (Invitrogen)이 포함된 dissection solution에 넣고 37°C에서 12분간 배양하였다. Dissection solution으로 3번 씻어낸 다음 fire-polished glass pipette을 이용해서 단일세포로 분리하였다. 1,000 rpm 8분간 원심분

리 한 후 plating media (2% B-27와 1% L-glutamine이 들어있는 neurobasal media; Invitrogen)로 hippocampal neuron을 poly-L-ornithine (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 fibronectin (Invitrogen)으로 코팅된 glass cover slip에 심었다. 배양일로부터 14일 후에 사용하였다.

3. Transfection

실험하기 하루 전 날 HeLa, Neuro 2A, HEK293T 세포를 심어서 transfection할 때 50% confluence가 되도록 하였다. pcDNA3.1 His C vector (Invitrogen)를 EcoR I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)으로 잘라 tubby를 넣은 pcDNA3.1 His C-tubby construct는 pull-down 실험에 사용하였고, pEGFP C1 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA)를 EcoR I으로 잘라 tubby를 넣은 pEGFP C1-tubby와 mGluR5의 stop codon 바로 전에 Mlu I (New England Biolabs)을 이용해서 mRFP를 넣은 pRK5-mGluR5-mRFP construct는 이미징 실험에 이용하였다. 각 construct의 양은 CalPhos mammalian transfection kit (Clontech)의 manual을 참고하여 사용하였다. Transfection 후 4시간째에 transfection solution을 complete growth media로 바꿔주었다. Transfection 하고나서 48시간 이내에 실험에 사용하였다.

Hippocampal neuron의 경우, 배양일로부터 14일째 되는 neuron의 conditioned media를 모아 놓고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 한 번 씻은 후 DMEM에 kynurenic acid와 $MgCl_2$ 를 넣은 transfection media를 넣고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 40분간 배양하였다. 이 배양시간 동안 CalPhos mammalian transfection kit을 이용하여 pEGFP C1-tubby와 pRK5-mGluR5-mRFP DNA 희석용액을 준비하였다. Transfection 후 정확히 45분째에 transfection solution을 앞서 준비해둔 conditioned media와 plating media 섞은 것으로 바꿔주었다. Transfection 하고나서 24시간째에 실험에 사용하였다.

4. Mutagenesis

Tubby WT DNA sequence에서 332번째 arginine를 alanine로 전환시키는 것 (R332A)과 327번째 tyrosine을 lysine으로 전환시키는 (Y327K) primer를 각각 QuickChange Primer Design Program을 이용해서 design한다. pEGFP C1-tubby WT DNA 10 ng에 위에서 design한 primer (10 pmole/ μ l)를 forward, reverse 각각 1 μ l 넣고 10 mM dNTP 1 μ l와 10X Pfu buffer 5 μ l를 넣은 후 나머지는 distilled water로 채워 49 μ l를 맞춰준다. 마지막으로 PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase (2.5 units/ μ l) 1 μ l (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 넣고 다음과 같이 PCR를 수행하였다. 95 $^{\circ}$ C 30초로 1 cycle 돌리고 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 68 $^{\circ}$ C 13분 순으로 16 cycle 돌렸다. PCR product에 Dpn I (20 units/ μ l) 1 μ l (New England Biolabs)씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation하였다. *E. coli* XL1-Blue에 transformation한 후 LB broth에서 키운 다음 selection된 colony로부터 DNA를 추출하여 mutagenesis가 잘 되었는지 확인하였다.

5. Immunoprecipitation and Immunoblotting

SD rat의 뇌를 분리하여 무게를 잰 후 complete protease inhibitor mixture, EDTA-free (Roche Applied Science)를 넣은, 뇌 질량의 10배에 해당하는 homogenization buffer (320 mM sucrose, 10 mM HEPES)로 균질화하였다. 이것을 4 $^{\circ}$ C에서 1,500g로 10분간 centrifugation하였다. 상층액을 다시 한 번 4 $^{\circ}$ C에서 1,500g로 10분간 centrifugation하여 깨끗한 상층액을 얻었다. 여기에 lysis buffer (100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% Na-deoxycholate)를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 용해하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 30분간 centrifugation해서 얻어진 lysate에 적정량의 tubby antibody를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 incubation한 후 protein A agarose를 2시간 결합시킨 다음 PBS-T (Phosphate-buffered saline with 1% Triton X-100)를 이용해서 4번 씻어내었다. 2X SDS sample buffer를 넣고 5분간 끓였다.

Sample을 SDS-PAGE gel에 전기 영동하여 단백을 분리한 후 PVDF

membrane으로 옮겼다. 5% 탈지분유를 함유한 TBS-T (Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20)를 넣고 상온에서 1시간 blocking 한 후 mGluR5와 tubby 항체를 1:2,500 또는 1:1,000으로 희석한 후 4°C에서 16시간 표지하였다. TBS-T로 3번 씻은 후 horseradish peroxidase로 conjugate된 2차 항체 (anti-goat or anti-rabbit)를 결합시켰다. 발광 반응의 측정에 enhanced chemiluminescence kit (PIERCE, Rockford, IL, USA)를 사용하였다.

6. Confocal microscopy

15 mm glass cover slip (Deckglaser, Germany)에 30% confluence의 HeLa와 Neuro 2A 세포가 있을 때 pEGFP C1-tubby와 pRK5-mGluR5-mRFP를 발현시켰다. 24시간 후에 세포를 상온 PBS로 3번 씻은 후 37°C로 맞춰 놓은 4% paraformaldehyde를 넣고 15분간 두었다. PBS로 5분씩 3번 씻은 후 ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 slide에 고정하였다.

실시간 이미징용은 25 mm glass cover slip에 50% 정도의 hippocampal neuron이 있을 때 pEGFP C1-tubby를 발현시킨 다음 30 mM HEPES가 들어있는 neurobasal media에 있는 상태로 Zeiss LSM 510 confocal microscopy를 이용하여 이미지를 얻었다.

7. Pull-down assay

mGluR5의 C-terminus를 아미노산 828-944, 아미노산 945-1054, 아미노산 1055-1171으로 3등분한 각각의 cDNA를 PCR로 증폭시킨 다음 pTYB1 vector (New England Biolabs)에 넣었다. Intein-fusion construct를 *E. coli* JM109 (DE3)에 transformation한 후 LB broth에서 OD₅₅₀ 값이 0.6-0.8이 될 때까지 37°C에서 키운 다음, 0.4 mM IPTG를 넣고 37°C에서 4시간 동안 fusion protein 합성을 유도하였다. 이것을 4°C에서 3000rpm으로 25분간 centrifugation하였다. Pellet을 lysis buffer (PBS, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, complete protease inhibitor mixture, EDTA-free) 10 ml로 풀어준 후 flat

tip을 이용하여 12 W로 2분간 sonication하였다. 이 때 power는 2 초 간격으로 on-off하였다. 이것을 4°C에서 13000rpm으로 20분간 centrifugation하여 상층액을 fusion protein으로 얻었다. 각각의 fusion protein을 chitin bead와 4°C에서 2시간 결합시키고 wash buffer (PBS with 500 mM NaCl)를 이용해서 5번 씻었다. 이것을 다시 tubby 단백질과 4°C에서 2시간 결합시킨 다음 5번 씻었다. Tubby 단백질은 HEK293T 세포에 pcDNA3.1 His C-tubby를 발현시킨 후 lysis buffer (PBS, 1% Triton X-100, complete protease inhibitor mixture, EDTA-free) 1 ml로 cell lysate를 만든 다음 4°C에서 13000rpm으로 10분간 centrifugation한 상층액으로 얻었다. Fusion protein과 tubby가 결합된 bead에 2X SDS sample buffer를 넣고 5분간 끓인 후 immunoblotting하였다.

8. 통계처리

통계 검정은 paired t-test를 사용하여 결정하였고, P값이 0.05 이하일 때 의미 있는 변동으로 규정하였다. 모든 값은 평균±표준 오차 (mean±S.E)로 표현하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Tubby의 세포내 위치 결정

Tubby는 C-terminus에 phosphatidylinositol-binding region를 가지며 N-terminus에는 NLS을 가진다고 알려졌다.¹³ 배양한지 14일째 되는 primary hippocampal neuron에 wild-type tubby construct (TUB WT)와 tubby N-terminus만 발현시키는 construct (TUB NT), tubby C-terminus만을 발현시키는 construct (TUB CT)를 발현시켰다. 이들은 모두 EGFP로 표지 되었다. 세포들은 고정된 후 confocal microscopy를 이용해서 이미지를 얻었다. 배양과 고정 방법은 재료 및 방법에서 기술하였다. NLS domain을 가지고 있고, phosphatidylinositol binding domain은 없는 TUB NT는 핵에 위치하고 있었고, phosphatidylinositol binding domain을 가지고 있고, NLS domain은 없는 TUB CT는 원형질막에 위치하고 있었다. 아무런 외부 자극 없는 상태에서 TUB WT는 원형질막에 위치하고 있었다 (그림 1A). Hippocampal neuron과 Neuro 2A 세포에서 EGFP가 달린 tubby를 mRFP가 달린 mGluR5와 같이 발현시키면 tubby는 핵 쪽에 위치하였다 (그림 1B).

Phosphatidylinositol 결합 영역의 332번째 arginine를 alanine로 전환시킨 것 (R332A)과 327번째 tyrosine을 lysine으로 전환시킨 것 (Y327K)을 Neuro 2A 세포에 발현시킨 다음 tubby의 위치를 확인하였다. Lysine으로 전환된 것은 tubby의 원형질막 위치를 결정하는 phosphatidylinositol 결합 영역에 아무런 영향을 주지 못하는 것으로 알려진 mutation으로 원형질막에 위치하였고, alanine으로 전환된 것은 원형질막에 위치하는 것을 저해하는 것으로 알려진 mutation으로, 이 경우 tubby가 핵에 위치하는 것을 확인하였다 (그림 1C).

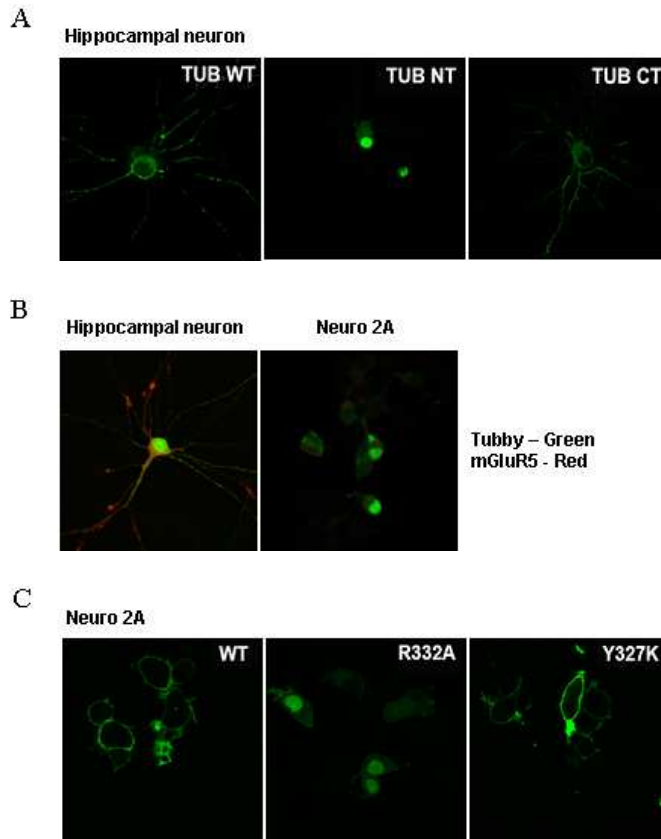


그림 1. Tubby mutants에 따른 세포내 위치 변화.

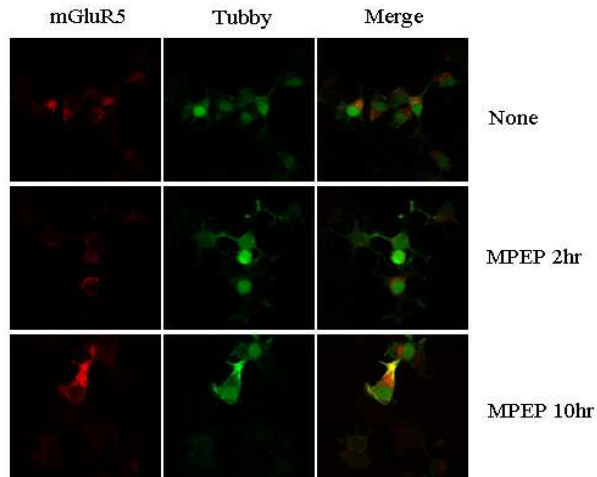
(A) Hippocampal neuron에 tubby construct와 tubby의 N-terminus만 발현하는 construct (TUB NT)와 tubby의 C-terminus만 발현하는 construct (TUB CT)을 transfection시켜서 각각의 tubby의 위치를 confocal microscopy을 이용해서 확인하였다. (B) Hippocampal neuron과 Neuro 2A 세포에 EGFP가 달린 tubby와 mRFP가 달린 mGluR5를 발현시켜서 confocal microscopy을 이용해서 이미지를 얻었다. (C) Neuro 2A 세포에 mGluR5와 phosphatidylinositol 결합 영역의 332번째 arginine를 alanine로 전환시킨 tubby (R332A)와 327번째 tyrosine을 lysine으로 전환시킨 tubby (Y327K)를 발현시킨 다음 각각의 위치를 confocal microscopy을 이용해서 확인하였다.

2. MPEP에 의한 tubby의 핵으로의 이동 억제

앞 실험에서 tubby의 localization과 mGluR5가 관련되어 있음을 추정할 수 있었으므로, mGluR5가 tubby의 이동에 직접 관련하는지를 보기 위하여 다음 실험을 수행하였다. Neuro 2A와 HeLa 세포에 pEGFP C1-tubby와 pRK5-mGluR5-mRFP를 같이 발현시켰다. Transfection 시킨 후, 24시간 후 mGluR5 길항제인 MPEP를 100 μ M 처리하였으며, 2시간 처리군과 10시간 처리군으로 나누었다. 각 처리 시간이 지난 후 세포를 slide에 고정하였다. 고정 방법은 재료 및 방법에서 기술하였다.

Neuro 2A와 HeLa 세포 모두에서 mGluR5와 tubby를 같이 발현시키고 아무런 처리를 하지 않은 경우에는 많은 수의 세포에서 tubby가 핵에 위치하고 있는 것을 볼 수 있었다 (그림 2A, 2B). MPEP를 2시간 처리했을 때에는 두 종류의 세포 모두에서 tubby가 아직 핵에 남아있는 세포들이 상당수 있었으나, MPEP을 10시간 처리하면 HeLa 세포의 경우 mGluR5에 의한 tubby의 핵으로의 이동이 현저히 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2A, 2B). Neuro 2A 세포의 경우에는 MPEP의 처리시간에 따른 큰 차이는 볼 수 없었다 (그림 2A). 각 군에서 얻은 이미지를 바탕으로 전체 세포 수 90개 중에서 tubby가 핵으로 이동된 세포 수를 측정하였다. 측정한 각각의 세포 수는 표1에 기술한 바와 같다. 즉, Neuro 2A 세포에서는 MPEP를 처리하지 않은 경우 핵으로 이동된 수는 90개 중 18개였다. MPEP를 2시간 처리했을 때는 10개였고, 10시간 처리했을 때에는 8개였다. HeLa 세포에서는 MPEP를 처리하지 않은 경우 핵으로 이동된 수는 90개 중 17개였다. MPEP를 2시간 처리했을 때는 9개였고, 10시간 처리했을 때에는 2개였다. 이 결과로, tubby의 핵 이동이 MPEP 처리에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

A Neuro 2A



B HeLa

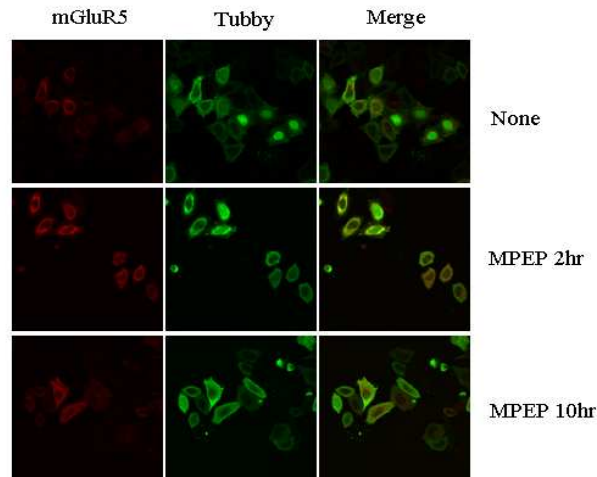


그림 2. MPEP에 의한 mGluR5 유도 tubby 핵내 이동 억제.

(A) Neuro 2A 세포에 mRFP가 달린 mGluR5와 EGFP가 달린 tubby를 발현시킨 후 MPEP 100 μ M를 2시간 처리한 것과 10시간 처리한 것에서의 tubby의 위치를 confocal microscopy을 이용해서 이미지를 얻었다. (B) HeLa 세포에 mRFP가 달린 mGluR5와 EGFP가 달린 tubby를 발현시킨 후 MPEP 100 μ M를 2시간 처리한 것과 10시간 처리한 것에서의 tubby의 위치를 confocal microscopy을 이용해서 이미지를 얻었다.

표 1. mGluR5와 tubby를 같이 발현시킨 Neuro 2A와 HeLa 세포에서 MPEP 처리에 따른 tubby의 핵으로의 이동 변화

실험군	Neuro 2A ¹		HeLa ¹	
	핵으로 이동 ²	% ³	핵으로 이동 ²	% ³
MPEP 비처리군	18	20.0	17	18.9
MPEP 2hr 처리군	10	11.1	9	10.0
MPEP 10hr 처리군	8	8.9	2	2.2

¹ 전체 세포수는 90.

² 값은 세포수를 나타냄.

³ 핵으로 이동된 세포수를 전체 세포수로 나눈 값을 %로 나타내었다.

3. mGluR5 C-terminus상 tubby의 결합 motif 확인

Rat의 뇌에 분포하고 있는 tubby와 mGluR5와의 결합을 immunoprecipitation (IP) assay를 통해 조사하였다. 뇌 단백질 추출은 재료 및 방법에서 기술하였다. 정제된 tubby 항체를 뇌 단백질에 넣어 immunoprecipitation 수행 후 mGluR5로 immunoblotting을 수행하였을 때, mGluR5가 tubby에 co-immunoprecipitation되어 나오는 것을 관찰하였다 (그림 3A). 음성 대조군으로는 normal rabbit serum을 사용하였고, input으로 30 μ g의 rat 뇌 단백질을 사용하였다. 또한 tubby가 mGluR5 C-terminus의 어느 부위와 결합하는지 알아보기 위해, pull-down assay를 수행하였다. Intein tag이 달린 mGluR5 C-terminus fusion protein 제작에 대해서는 재료 및 방법에서 기술하였다. mGluR5의 C-terminus를 아미노산 828-944, 아미노산 945-1054, 아미노산 1055-1171으로 3등분 한 각각의 fusion protein이 잘 분리 정제되었는지 보기 위해서 SDS-PAGE로 protein을 분리시킨 다음 Coomassie staining으로 확인하였다 (그림 3B). 각각의 fusion protein을 intein tag을 인식하는 chitin bead와 결합시키고, 이것을 다시 HEK293T 세포에서 발현시킨 tubby 단백질과 결합시킨 다음 2X SDS sample buffer로 elution하여 tubby로 immunoblotting하였을 때, tubby는 mGluR5의 C-terminus의 아미노산 828-944와 결합하고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 음성 대조군으로는 intein tag만을 가지는 공 vector pTYB1를 사용하였다 (그림 3C).

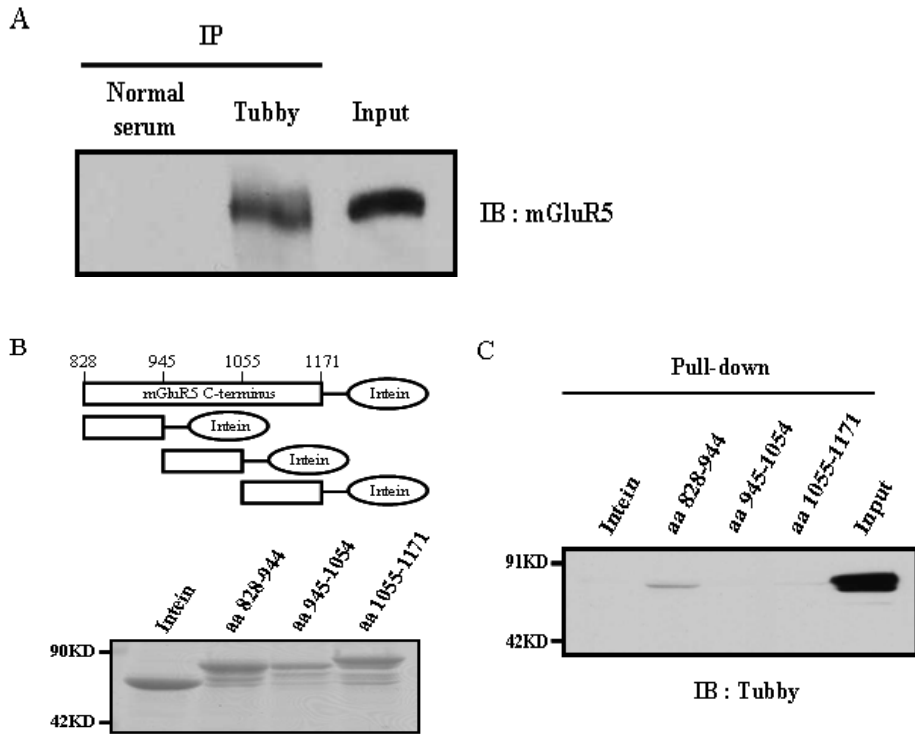


그림 3. Tubby와 결합하는 mGluR5 C-terminus상 부위 결정.

(A) Rat의 뇌 단백을 추출하여 tubby 항체로 immunoprecipitation (IP)하고 이것을 mGluR5의 항체로 immunoblotting (IB)하여 두 단백질의 결합여부를 확인하였다. (B) mGluR5의 C-terminus를 아미노산 828-944, 아미노산 945-1054, 아미노산 1055-1171으로 3등분 하여 각각을 PCR로 증폭시킨 다음 pTYB1 vector에 넣었다. Intein-fusion construct를 *E. coli* JM109 (DE3)에 transformation하여 발현을 유도한 후, 만들어진 각각의 fusion protein을 SDS-PAGE로 protein을 분리한 다음 Coomassie staining으로 발현양을 확인하였다. (C) 각각의 fusion protein을 chitin bead와 결합시키고, 이것을 다시 HEK293T 세포에서 발현시킨 tubby 단백질과 반응시켰다. 이 결합체를 2X SDS sample buffer로 우려내어 tubby로 immunoblotting (IB)해서 tubby의 mGluR5 C-terminus상 결합부위를 확인하였다.

4. 신경세포에서 내인성 mGluR5에 의한 tubby의 핵내 이동

배양한지 14일째 되는 hippocampal neuron에 pEGFP C1-tubby와 pDSRED2-nucleus를 transfection시켜 발현시키고 나서 24시간 후에 cover slip을 caster로 옮겼다. 30 mM HEPES가 들어간 neurobasal media로 hippocampal neuron을 유지시키면서 실시간 이미지를 매 5분마다 Zeiss LSM 510 Confocal microscopy 를 이용해서 얻었다. 첫 번째 이미지를 얻고 나서 바로 group I mGluR의 효현제인 DHPG를 50 μ M 처리하였다. 그 결과, mGluR5에 의해 핵내 tubby 형광신호가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 4A). 이러한 이미지를 MetaMorph software를 이용하여 pDSRED2-nucleus에 의해 표시된 핵 주위의 영역을 지정한 뒤 형광의 세기를 측정한 후 0분을 기준으로 각각을 비교하여, 정량화한 후 그래프로 나타내었다 (그림 4B). 핵내 tubby 형광신호가 조금씩 증가하다가 45분 후에는 0분을 기준으로 20% 증가했음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과, mGluR5는 여러 세포주에서 다른 GPCR과 같이 tubby 단백질이 핵으로 이동되는 것을 조절하는 역할을 할 뿐만 아니라 뇌에서 tubby를 조절하는 내인성 GPCR중의 하나임을 알 수 있었다.

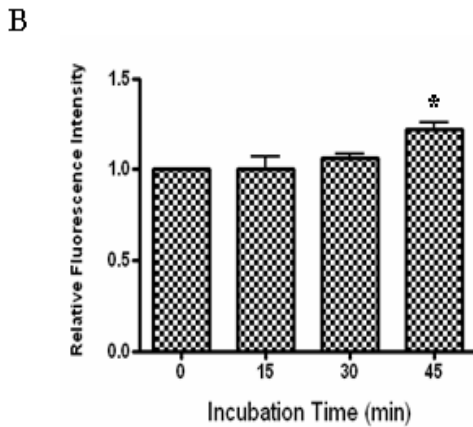
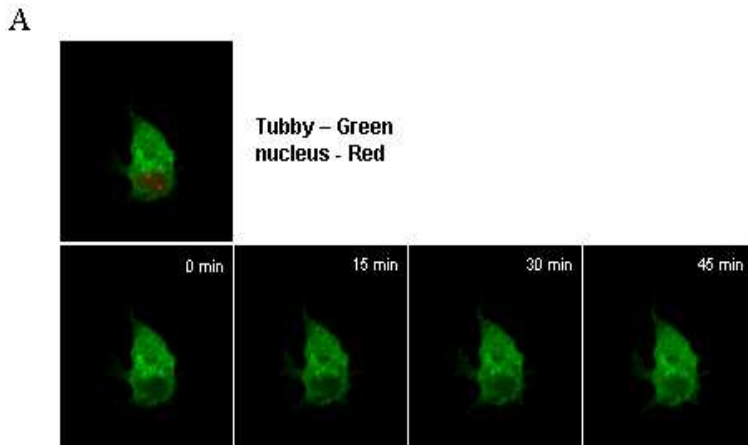


그림 4. Hippocampal neuron에서 mGluR5 자극에 의한 tubby의 핵내 이동 실시간 이미지.

(A) 배양한지 14일째 되는 hippocampal neuron에 pEGFP C1-tubby를 발현시키고 나서 24시간 후에 실시간 이미지를 측정하였다. 첫 번째 이미지를 얻고 난 후 DHPG를 50 μ M 처리하여 그 이후의 이미지를 confocal microscopy를 이용하여 확인하였다. (B) 매 5분마다 얻은 이미지를 MetaMorph software를 이용하여 핵 주위의 영역을 지정한 뒤 형광의 세기를 측정한 후 0분을 기준으로 각각을 비교하여 그래프로 나타내었다. * $P < 0.05$ vs. 0분.

IV. 고찰

Tubby는 tubby mouse가 발견되고 나서 그 연구가 활발해졌는데 이는 tubby mouse가 인간과 유사한 후천적 비만과 감각신경 결손과 같은 표현형을 가지기 때문이다.¹⁻³ 하지만 아직까지도 tubby와 관련된 기초적인 연구는 부족하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 tubby와 관련된 분자적 기전을 밝혀내어 tubby 연구의 기초를 제공하고자 하였다. Tubby는 tubby 단백질의 위치를 결정하는 2개의 특징적인 domain 즉, N-terminus의 NLS와 C-terminus의 phosphatidylinositol-binding region을 갖는다는 것이 Neuro 2A 세포를 이용한 실험을 통해 알려져 있다.⁴⁻⁸ 이를 바탕으로 세포주가 아닌 일차배양 신경세포인 hippocampal neuron에서도 동일한 결과가 나오기를 확인하였다 (그림 1A). 이는 hippocampal neuron에서 내재적으로 발현하고 있는 tubby도 NLS와 phosphatidylinositol-binding region에 의해 동일하게 조절됨을 의미한다. 또한 tubby는 GPCR에 의해 핵으로의 이동이 조절되는 특징적인 조절기전을 가지고 있다고 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁹ 이 과정은 여러 G 단백질 즉, $G\alpha_o$, $G\alpha_s$ 와 같은 $G\alpha$ 단백질이나, $G\beta\gamma$ 가 아닌 $G\alpha_q$ 에 의해서만 특이적으로 영향을 받는다.¹⁶ 몇몇 시상하부의 GPCR은 에너지 항상성, 식이조절 그리고 비만에 중요한 역할을 한다.²⁷⁻³³ 여기에 관여된 GPCR인 serotonin, bombesin, melanin-concentrating hormone, melanocortin 4 (MC4) 그리고 dopamine D1 receptor는 모두 $G\alpha_q$ signaling과 연관되어 있다.³⁴⁻³⁸ 이 중에서 serotonin receptor $5HT_{2c}$ 는 tubby 단백질의 핵으로의 이동에 전형적인 신호전달을 유도한다고 알려져 있다. Serotonin receptor $5HT_{2c}$ 는 tubby처럼 시상하부의 뇌실옆 핵에 많이 발현되어 있으며, serotonin receptor가 없으면 tubby mouse처럼 후천적 비만의 특징을 나타낸다.^{37,38} 이를 바탕으로 신경세포에서 많이 발현되며 신경 가소성, 신경 발달, 신경계 질환에서 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 glutamate를 ligand로 갖는 GPCR인 metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)도 tubby의 신호전달에 영향을 줄 가능성이 높다고 예상할 수 있다.

mGluR의 3가지 group 중 group II와 III는 $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ 와 couple을 이루는데 비해 group I은 $G\alpha_q$ 와 couple을 이룬다. 또한 PLC를 자극하는 특징을 가진다.²⁰ 따라서 본 연구에서는 group I mGluR, 그 중에서도 mGluR5와 tubby와의 연관성을 조사하였다. Rat 뇌 단백질에서 mGluR5와 tubby가 결합하고 있음을 통해 두 단백질 모두 뇌 영역에서 발현하고 있으며 서로 상호작용하고 있음을 알 수 있었다 (그림 3A). 그리고 tubby의 결합부위를 찾기 위해 mGluR5 C-terminus를 3부분으로 나눈 fusion protein을 제작하여 실험하였는데, 이는 mGluR5가 다른 mGluR에 비해 긴 C-terminus를 가지고 있어서 이 부분의 결합 가능성이 높고, 이미 여러 단백질의 결합부위로 알려져 있을 뿐만 아니라 tubby의 핵내 이동에 영향을 주는 것으로 알려진 G_q 와 결합한다고 알려져 있기 때문이었다.^{21,25,26} 또한 다른 활성화 물질 없이 mGluR5와 tubby가 같이 발현되면 tubby가 핵으로 이동하는 것을 통해 (그림 1B) mGluR5는 serotonin receptor $5HT_{2c}$ 처럼 constitutive activity를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.^{37,38} mGluR5 길항제인 MPEP이 tubby의 핵으로의 이동을 봉쇄하는 것을 확인한 실험에서 (그림 2), MPEP는 세포에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 최대 농도, 최대 시간으로 처리하였다.⁴⁰ MPEP 처리시간을 늘려서 constitutive activity를 가지고 있는 mGluR5를 최대한 억제하면 tubby의 핵내 이동이 완전히 차단될 것으로 예상하였으나 일부는 핵으로 이동되었는데, 이는 MPEP의 영향을 받지 않은 mGluR5의 활성화에 의한 것으로 생각된다. Neuro 2A 세포와 HeLa 세포에 MPEP를 처리한 실험 결과에서와 같이 같은 수용체라 하더라도 세포주에 따라서 조금씩 다른 조절 양상을 보이기 때문에 세포주와 neuron에서 같은 결과를 예상하기는 어려울 것으로 생각된다. 하지만 hippocampal neuron에서 mGluR5를 활성화시켰을 때 tubby의 핵내 이동이 유도되는 것으로 보아 neuron에서도 mGluR5에 의한 tubby의 세포내 위치 변화 조절이 실제 일어남을 알 수 있었다.

지금까지의 연구는 acetylcholine receptor M_1 과 serotonin receptor $5-HT_{2c}$ 가 tubby의 핵내 이동을 유도한다는 것을 세포주에서만 각각을 발현시켜서 확인하였다.¹⁶ 하지만 세포주는 대부분 병

변이 있는 비정상적인 세포에서 유래한 것이기 때문에 실제 정상 세포 상태와는 다른 양상을 보일 가능성도 있다. 따라서 본 실험에서는 세포주 뿐만 아니라 일차배양 신경세포에서 mGluR5가 내재적으로 발현하는 환경에서 mGluR5가 tubby의 신호전달 조절에 관여한다는 것을 확인했다는 것에 의의가 있겠다. 이는 생체 내 환경에서도 이와 유사한 조절 작용이 일어날 수 있음을 예상할 수 있으며, 이를 통해 tubby와 관련된 연구를 발전해 나갈 수 있을 것이다.

V. 결론

Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)가 다른 Gαq-coupled receptor와 같이 tubby의 신호전달에 관여하는지를 규명하고자 분자적으로 접근하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Hippocampal neuron에 wild-type tubby construct, tubby의 N-terminus만 발현시키는 construct (TUB NT) 그리고 C-terminus만 발현시키는 construct (TUB CT)을 transfection시킨 후 confocal microscopy을 이용해서 조사한 결과 tubby의 N-terminus는 핵내 이동에, tubby의 C-terminus는 세포막 결합에 중요하다는 것을 확인하였다. 그리고 wild-type tubby는 자극이 없는 상황에서 NLS가 있어도 핵으로의 이동이 일어나지 않는 것을 확인하였다.

2. Immunoprecipitation 방법을 이용하여 rat brain에서 tubby는 mGluR5와 결합한다는 것을 확인하였다.

3. Pull-down 실험에서 tubby는 mGluR5 C-terminus의 아미노산 828-944에 결합한다는 것을 확인하였다.

4. Neuro 2A와 HeLa 세포에 tubby와 mGluR5를 같이 발현시키면 tubby가 핵으로 이동되었다. 이 때 mGluR5의 길항제인 MPEP를 처리하면 tubby의 핵으로의 이동이 봉쇄되는 것으로 보아 tubby의 핵 이동에 mGluR5가 작용함을 알 수 있었다.

5. Hippocampal neuron에 tubby를 발현시키고 mGluR5의 효현제인 DHPG를 처리하면, tubby가 핵으로 이동하는 것을 실시간 이미지로 확인하였다.

이상의 결과를 보아 mGluR5는 여러 세포주에서 다른 GPCR과 같이

tubby 단백질이 핵으로 이동되는 것을 조절하는 역할을 할 뿐만 아니라, tubby와 rat brain extract에서 결합하며, hippocampal neuron에서 mGluR5의 효현제인 DHPG에 의해 내인성 tubby가 핵으로 이동하기 때문에 mGluR5가 뇌에서 tubby를 조절하는 내인성 GPCR중의 하나로 생각된다.

참고문헌

1. Coleman DL, Eicher EM. Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered.* 1990;81:424-7.
2. Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, et al. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a member of a novel gene family. *Cell.* 1996;85:281-90.
3. Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishina PM. A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature.* 1996;380:534-8.
4. Stubdal H, Lynch CA, Moriarty A, Fang Q, Chickering T, Deeds JD, et al. Targeted deletion of the tub mouse obesity gene reveals that tubby is a loss-of-function mutation. *Mol Cell Biol.* 2000 ;20:878-82.
5. Heikenwälder MF, Koritschoner NP, Pajer P, Chaboissier MC, Kurz SM, Briegel KJ, et al. Molecular cloning, expression and regulation of the avian tubby-like protein 1 (tulp1) gene. *Gene.* 2001;273:131-9.
6. North MA, Naggert JK, Yan Y, Noben-Trauth K, Nishina PM. Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3128-33.
7. He W, Ikeda S, Bronson RT, Yan G, Nishina PM, North MA, et al. GFP-tagged expression and immunohistochemical studies to determine the subcellular localization of the tubby gene family members. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;81:109-17.
8. Nishina PM, North MA, Ikeda A, Yan Y, Naggert JK. Molecular characterization of a novel tubby gene family member, TULP3, in mouse and humans. *Genomics.* 1998;54:215-20.
9. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
10. Hagstrom SA, North MA, Nishina PL, Berson EL, Dryja TP. Recessive

- mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1998;18:174-6.
11. Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L. Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science.* 1999;286:2119-25.
 12. Hagstrom SA, Duyao M, North MA, Li T. Retinal degeneration in *tulp1*^{-/-} mice: vesicular accumulation in the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 ;40:2795-802.
 13. Hagstrom SA, Adamian M, Scimeca M, Pawlyk BS, Yue G, Li T. A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1955-62.
 14. Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, Stubdal H, Theriault K, Siebert E, et al. Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin. *J Biol Chem.* 1999;274:24980-6.
 15. Ikeda A, Nishina PM, Naggert JK. The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function. *J Cell Sci.* 2002;115:9-14.
 16. Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS, et al. G-protein signaling through tubby proteins. *Science.* 2001;292:2041-50.
 17. Carroll K, Gomez C, Shapiro L. Tubby proteins: the plot thickens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:55-63.
 18. Julius D, MacDermott AB, Axel R, Jessell TM. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science.* 1988;241:558-64.
 19. Cantley LC. Transcription. Translocating tubby. *Science.* 2001;292:2019-21.
 20. Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J. Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15:289-98.

21. Hermans E, Challiss RA. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J.* 2001;359:465-84.
22. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999;51:7-61.
23. Putney JW Jr. TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14669-71.
24. Sternweis PC, Smrcka AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:502-6.
25. Francesconi A, Duvoisin RM. Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J Biol Chem.* 1998;273:5615-24.
26. Sosa R, Hoffpaur B, Rankin ML, Bruch RC, Gleason EL. Metabotropic glutamate receptor 5 and calcium signaling in retinal amacrine cells. *J Neurochem.* 2002;81:973-83.
27. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell.* 1998;92:437-40.
28. Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature.* 1996;381:415-21.
29. Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS, Alaynick WA, Marck BT, Matsumoto AM, Palmiter RD. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12138-43.
30. Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature.* 1995;374:542-6.
31. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, et al. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet.* 2000;26:97-102.
32. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997;88:131-41.

33. Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K, Ogura H, Yamano M, Yamada K, et al. Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature*. 1997;390:165-9.
34. Jian X, Sainz E, Clark WA, Jensen RT, Battey JF, Northup JK. The bombesin receptor subtypes have distinct G protein specificities. *J Biol Chem*. 1999;274:11573-81.
35. Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*. 1999;400:265-9.
36. Wang HY, Undie AS, Friedman E. Evidence for the coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. *Mol Pharmacol*. 1995;48:988-94.
37. Hartman JL IV, Northup JK. Functional reconstitution in situ of 5-hydroxytryptamine_{2c} (5HT_{2c}) receptors with alphaq and inverse agonism of 5HT_{2c} receptor antagonists. *J Biol Chem*. 1996;271:22591-7.
38. Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK. 5-Hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol Ther*. 1998;79:231-57.
39. Barker EL, Westphal RS, Schmidt D, Sanders-Bush E. Constitutively active 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. *J Biol Chem*. 1994;269:11687-90.
40. Lea PM 4th, Faden AI. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. *CNS Drug Rev*. 2006;12:149-66.

Abstract

Regulation of tubby protein by metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5)

Mi Kyung Lim

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Chul Hoon Kim)

Tubby mice, which is characterized by late-onset obesity and neurosensory deficits such as retinal and cochlear degeneration, arise from spontaneous mutation in the *tubby* gene. The tubby protein is expressed in the various brain regions and other tissues. Tubby is thought to be important for brain function because of its specific localization and prominent phenotypes of tubby mice, but the mechanism remains unknown. Tubby has two domains consisting of an amino-terminal domain which contains the nuclear localization signal (NLS) and a carboxy-terminal domain which includes the phosphatidylinositol-binding region. In addition, tubby has a characteristic signal transduction mechanism that is stimulated by G α_q -coupled receptors such as acetylcholine receptor M₁ and serotonin receptor 5HT_{2c}. Present study is aimed to investigate whether metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is the regulator of tubby in brain. Tubby was associated with mGluR5 in brain lysate and was bound to the amino acids 882-944 region of the C-terminus of mGluR5. Transfection with mGluR5 and tubby showed that mGluR5 induced nuclear translocation of tubby in Neuro 2A and HeLa cells. Nuclear translocation of tubby was blocked by MPEP, a antagonist mGluR5, in Neuro 2A and HeLa cells. Tubby was translocated by activation of mGluR5 in hippocampal neuron. These suggest that mGluR5 is an endogenous GPCR

that regulates tubby subcellular localization that might be linked to its unknown, but important, functions in neurons.

Key words: mGluR5, tubby, G α_q -coupled receptor, PLC β