

G 단백질 연결 수용체 (GPCR)의 생리활성 기전 및 고아 GPCR 연구 동향

고려대학교 의과대학 대학원 의학과

오 다 영 · 성 재 영

Physiological Function of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) and Research Trends for Orphan GPCRs

Da Young Oh and Jae Young Seong

Korea University College of Medicine

서 론

G 단백질 연결 수용체 (G protein-coupled receptor, GPCR)는 세포막에 존재하는 단백질 중 가장 큰 대가족 (superfamily) 수용체 군으로 세포 바깥으로부터 오는 신호를 세포 안으로 전달시켜주는 역할을 한다. 인간 유전체에는 현재까지 약 800여종의 GPCR 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다. GPCR은 인간의 몸 안팎에 존재하는 다양한 리간드 (ligand)의 표적 단백질로, 크게 후각 및 미각 자극에 반응하는 감각 수용체 그룹 (olfactory/gustatory GPCR)과 신경전달물질, 호르몬 등 각종 신호전달물질에 반응하는 수용체 그룹 (transmitter GPCR)으로 분류할 수 있다. 인간 유전체에는 약 367종의 transmitter GPCR이 발견되고 있으며, 이들은 인간의 생식, 대사, 면역, 운동, 소화, 호흡, 순환, 수면, 심리작용 등 대부분의 생리적 기능 조절에 중요한 역할을 수행한다. GPCR 작용 리간드는 다양한 질병·질환과 관계되어 있어 GPCR은 제약 시장에서 가장 주목받는 약물 작용점으로 여겨지고 있다. Transmitter GPCR 중 그 리간드와 기능이 밝혀지지 않은 것들을 고아 GPCR (orphan GPCR, oGPCR)이라 하며, 이들의 리간드를 찾는 deorphanization 연구는 신약개발의 핵심적인 위치에 있다. 본 리뷰에서는 GPCR의 전반적인 생리활성 기전과 oGPCR 연구동향에 대하여 논의하였다.

본 론

1. GPCR 가족 (family)

GPCR의 N-말단 (N-terminal)은 세포막 바깥쪽으로 C-말단 (C-terminal)은 세포막 안쪽에 위치한다. N-말단과 C-말

단 사이에는 세포막을 관통하는 transmembrane domain (TMD)이 7개 존재하며 이들을 이어주는 extracellular loop (ECL)과 intracellular loop (ICL)이 각각 3개씩 존재한다 (Fig. 1). N-말단, ECL, TMD의 세포막 바깥쪽은 작용 리간드와의 결합에 중요한 역할을 하며, C-말단, ICL 및 TMD의 세포막 안쪽은 세포내 신호전달, 탈감작, 세포내 합입기전에 중요한 역할을 한다.

GPCR은 일차 아미노산 서열을 기본으로 크게 세 그룹으로 분류할 수 있다 (Fig. 1)[1,2]. 대부분의 olfactory GPCR과 241종의 transmitter GPCR이 family 1 그룹 (rhodopsin-like 그룹)에 속해있다. Family 1 그룹은 7번째 TMD (TMD7) 하단에 Asn/Asp-Pro-X-X-Tyr (N/DPXXY) motif를 가지고 있으며, TMD3와 두 번째 ICL (ICL2) 연결부위에 Asp/Glu-Arg-Tyr (D/ERY) motif가 있다. TMD2의 Asp/Asn과 TMD7의 Asn/Asp간의 수소결합을 통한 상호작용이 구조형성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [3]. 첫번째, 두번째 ECL을 연결해주는 이황화 결합 (disulfide bond)이 있고, C-말단에 있는 시스테인 (cysteine)은 palmitoylation에 사용되어 세포막에 정박 (anchoring)하는데 중요한 역할을 한다. 또한 TMD 내에 여러 군데 프롤린 (proline)이 있어 α -helix 구조에 꺾임을 유도한다. Family 1 그룹은 다시 1a, 1b, 1c 아그룹 (subgroup)으로 분류된다. 1a 아그룹은 아민 (amine), 옵신 (opsin), odorants, 카나비노이드 (cannabinoid), 아데노신 (adenosine), 라이소스핑고리피드 (lysospingolipid), 프로스타글란딘 (prostaglandin) 계열의 수용체군으로 나누어 진다. 1b 아그룹에는 성선호르몬 유리 호르몬 (gonadotropin-releasing hormone), 옥시토신 (oxytocin), 뉴로텐신 (neurotensin)과 같은 짧은 펩타이드 및 케모카인 (chemokine) 계열 수용체가 속한다. 1c 아그룹에는 당

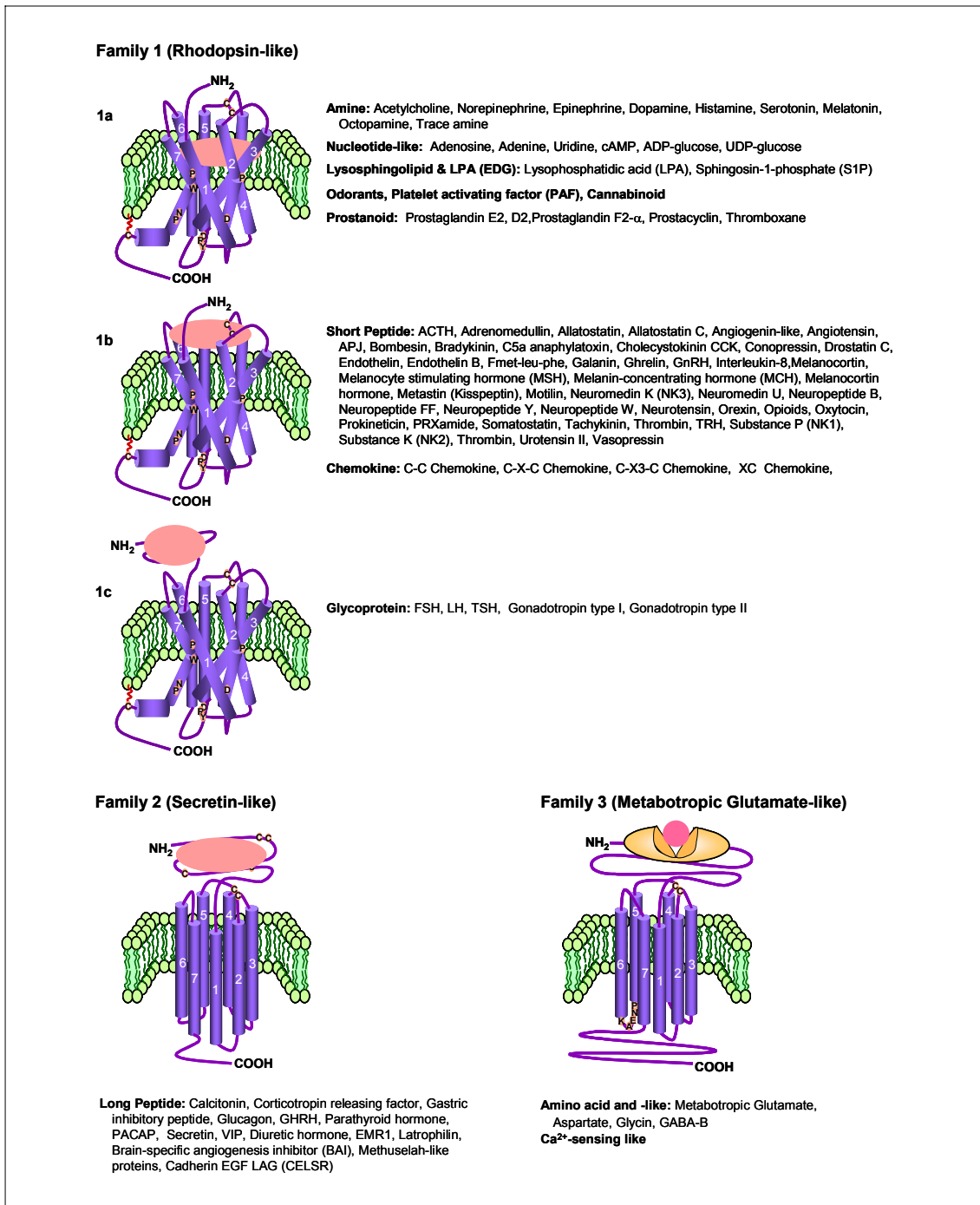


Fig. 1. GPCR의 일반적인 구조적 특징 및 가족 분류. GPCR은 세포 바깥쪽의 N-말단과 세포 안 쪽의 C-말단 사이에 세포막을 관통하는 7개의 transmembrane domain (TMD)이 존재하며 이들을 세포 바깥과 안 쪽에서 이어주는 loop이 각각 3개씩 있다. GPCR은 일차 아미노산 서열에 의해 family 1, family 2, 그리고 family 3 그룹으로 구분할 수 있으며 family 1은 리간드의 종류와 그 결합양상에 따라 1a, 1b, 1c의 아그룹으로 분류된다.

단백질 (glycoprotein)에 대한 수용체군이 속한다. 1a 그룹 수용체는 TMD3와 TMD4 사이에 리간드 결합주머니가 있어 카테콜아민과 같은 작은 분자가 이 안에 결합하게 된다. 로돕신의 경우에도 레티날 (retinal)이 이러한 주머니에 공유 결합의 형태로 묻혀있어 빛이 있고 없음에 따라 구조의 변화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 짧은 펩타이드에 의해 활

성화되는 1b 그룹 수용체는 ECL과 N-말단이 리간드 결합에 중요한 역할을 하며, 펩타이드 리간드의 C-말단이 1a 그룹 수용체처럼 TMD 안의 결합주머니에 결합하는 것으로 밝혀지고 있다[4~6]. 당단백질과 같은 거대 단백질을 리간드로 쓰는 1c 그룹 수용체는 상대적으로 긴 N-말단을 가지고 있는데 이 부위에 리간드가 결합하며, 이러한 결합이 결

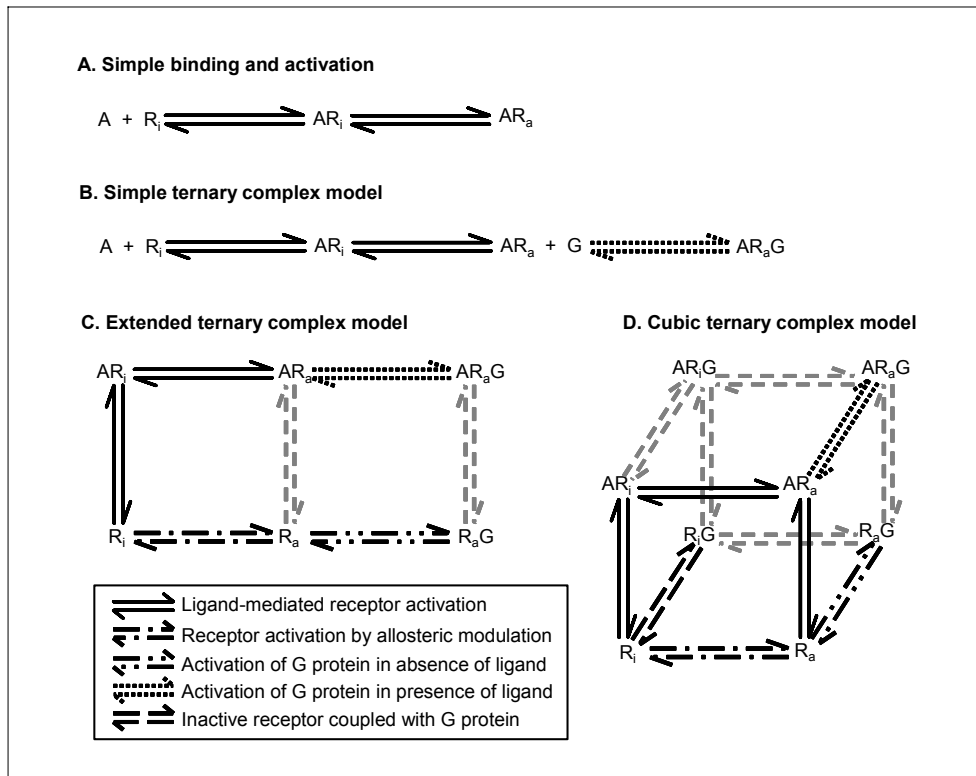


Fig. 2. GPCR 활성 모델. GPCR의 활성화에 관해 제시되는 여러가지 가설들에 대한 모식도이다. A. 가장 단순한 모델로 리간드와의 결합을 통한 활성화이다. B. 작용제 (A)가 있는 경우에 수용체가 G 단백질과의 결합을 통해 활성을 나타내는 모델이다. C. 작용제가 없는 경우에도 활성화된 수용체가 G 단백질에 작용하여 (R_aG)하여 G 단백질을 활성화 시키는 모델이다. D. A, B, C 모델에서 더 나아가 비활성 상태의 수용체가 G 단백질과 결합한 형태 (R_iG)까지 가정한 모델이다. 이는 리간드가 어떠한 상태의 수용체와 결합하느냐에 따라 작용제의 능력과 효율의 차이를 나타낸다.

과적으로 ECL과 상호작용하여 수용체를 활성화시킨다[7,8]. Family 2 그룹 (혹은 Secretin-like 그룹) 수용체는 세크레틴 (Secretin), 성장호르몬 유리호르몬 (growth hormone-releasing hormone) 과 같이 비교적 긴 펩타이드를 리간드로 사용한다. Family 2 그룹 수용체는 세포막 바깥쪽의 N-말단이 400개 이상의 아미노산으로 구성되어 N-말단이 매우 긴 특징이 있다. N-말단에는 시스테인이 여럿 있어 이황화 결합 네트워크를 구성하고 있으며, 이곳에 리간드 결합부위가 존재한다[9]. 구조적으로는 family 1과 유사한 면도 있으나 C-말단에 palmitoylation site가 존재하지 않는 특징이 있다. Family 3 그룹 (혹은 Glutamate-like 그룹)은 글루탐산 (Glutamate), 감마아미노뷰틸산 (γ -aminobutyric acid, GABA)과 같은 흥분성 혹은 억제성 신경전달물질 및 Ca^{2+} 을 리간드로 사용한다[1]. Family 3 그룹 수용체는 세포막 바깥쪽에 600개 이상의 아미노산으로 구성된 긴 N-말단을 가지고 있으며, 그 C-말단도 다른 GPCR과 비교할 때 매우 길다. Family 1, 2에 비해 매우 짧은 ECL3를 가지고 있으며 이곳의 아미노산 서열은 그룹간에 진화적으로 잘 보존된 특징이 있다. Family 3 그룹의 N-말단에는 리간드 결합부위가 매우

잘 보존되어 있다. X-ray crystallography 연구결과 중합체 (dimer)로 된 리간드 결합부위가 이황화 결합에 연결되어 있음이 밝혀졌다[11]. Family 1, 2, 3 그룹 이외에 adhesion 수용체 그룹, frizzles/taste2 수용체 그룹이 있다. adhesion 수용체 그룹은 세포막 바깥쪽 N-말단의 아미노산이 짧게는 200에서 길게는 2800개 정도이며, EGF-like, mucin-like, cysteine-rich motif를 가지고 있다[12,13]. frizzles/taste2 수용체 그룹은 TMD2에 Ile-Phe-Leu, TMD5에 Ser-Phe-Leu-Leu, TMD7에 Ser-X-Lys-Thr-Leu motif를 가지고 있는 특징이 있다[14]. 그 밖에 이들 그룹에 속하지 못한 23종의 GPCR이 더 있는 것으로 알려지고 있다[15].

2. GPCR의 활성

GPCR에 작용 리간드가 결합하면 수용체 구조의 변화가 일어나고, 이러한 변화는 G 단백질의 활성을 유도한다[16]. G-단백질은 α subunit과 $\beta\gamma$ subunit 복합체로 구성된다. α subunit에는 GDP가 결합되어 있는데, GPCR이 활성화되면 GDP가 분리되고 그 자리에 GTP가 붙는다. 이러한 과정은 $\beta\gamma$ subunit과 α subunit의 분리를 수반한다[17]. 분리된

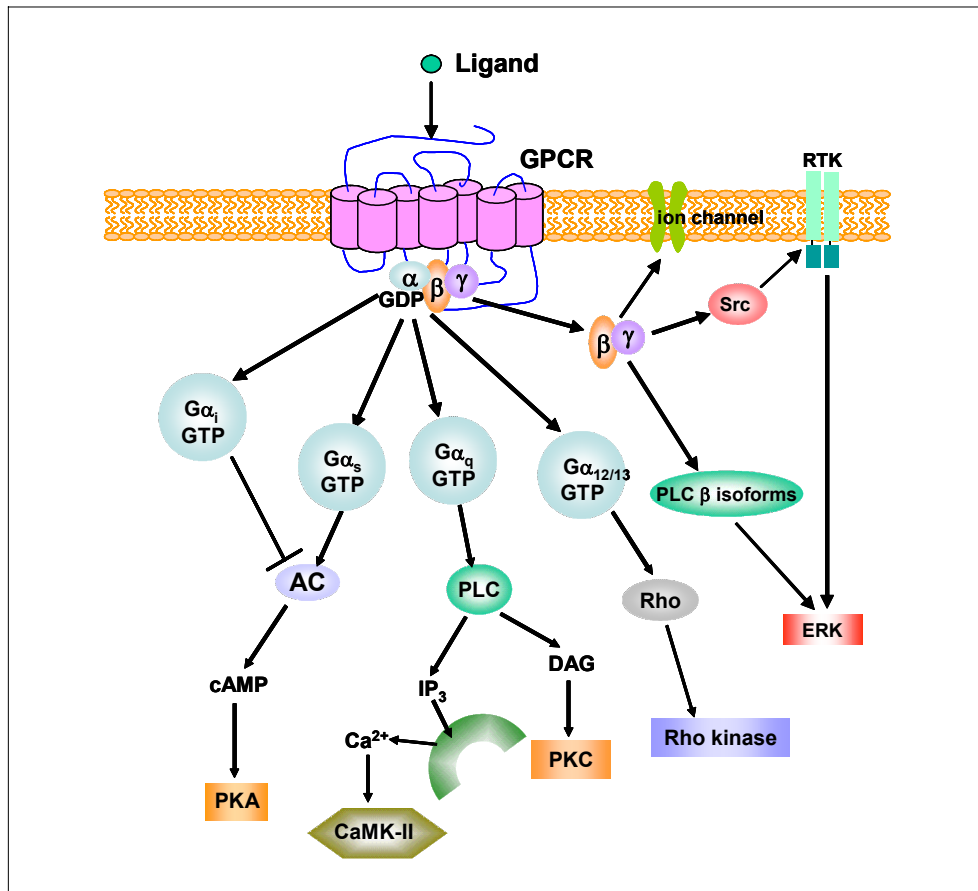


Fig. 3. GPCR의 다양한 신호전달 경로. 리간드에 의해 활성화된 GPCR은 세포 내 G 단백질을 활성화시켜 하위 단계로의 신호전달이 이루어지게 한다.

subunit들은 각각 하위단계 효소나 이온채널에 작동한다 [18]. Gα subunit의 GTPase 활성화에 의해 Gα-GTP가 Gα-GDP 형태로 바뀌게 되면서 신호전달은 정지된다. Gα-GDP는 다시 βγ subunit 재결합하게 된다. 이러한 일련의 과정은 GPCR 활성화 뒤 수초 이내에 일어난다[19,20].

GPCR 활성화에는 여러 가지 가설이 있다 (Fig. 2). 가장 간단한 이론은 리간드와의 결합으로 인한 활성화이다. 비활성 상태의 수용체 (R_i)가 작용제 (A)와 결합하여 (AR_i) 활성화된 수용체 (AR_a)가 되는 것이다 (Fig. 2A). 수용체의 활성화는 이와 같이 간단한 방식에 조금 복잡한 단계를 추가할 수 있다. 즉 AR_a 상태에서 G 단백질 (G)과 결합 (AR_aG)하는 상황을 설정할 수 있다 (Fig. 2B). 이 경우 G 단백질의 활성화는 작용제가 있는 상황에서 이루어진다. 하지만 작용제가 없는 상황에서도 수용체의 활성화는 이루어 질 수 있기 때문에 수용체는 리간드가 없는 상태에서도 비활성화 구조 (R_i)와 활성화 상태 (R_a)의 구조 사이에서 평형상태를 유지한다고 볼 수 있다. 이러한 경우 작용제 없이 활성화된 수용체가 G 단백질에 작용 (R_aG)하여 G 단백질을 활성화시킬 수 있다. 즉 작용제에 의존적이지 않은 G 단백질의 활성을 의미한다 (Fig. 2C). 여기서 한 단계 더 나아가 비활성화된 수용체가

G 단백질과 결합한 형태 (R_iG)도 가정할 수 있다 (Fig. 2D). 실제로 리간드에 의존적이지 않은 수용체와 G 단백질과의 상호작용은 광범위하게 받아들여지고 있다. 따라서 리간드가 R_i , R_iG , R_a , R_aG , 중 어떠한 상태의 수용체와 결합하느냐에 따라 작용제의 능력 (potency)과 효율 (efficacy)의 차이를 보일 수 있다[21].

GPCR 리간드는 그 기능에 따라 agonist, inverse agonist, antagonist로 분류할 수 있다. GPCR는 리간드 결합과 관계없이 활성화 상태와 비활성화 상태를 오가는 평형상태를 유지하고 있다. Agonist는 수용체의 활성화 비율을 높여 생물학적 반응을 유도한다. Inverse agonist는 반대로 수용체의 활성화 비율을 낮춘다. 즉 수용체의 기저활동 (basal activity) 수준을 감소시킨다. Antagonist는 agonist나 inverse agonist의 기능을 억제한다. Inverse agonist의 경우 기저활동이 낮은 수용체에 대해서는 최소화된 역할을 하며, 단지 이 수용체가 agonist에 의해 활성화 된 경우에만 효과를 발휘하게 된다. 따라서 이 경우 이 작용제가 inverse agonist인지 antagonist인지 구별하기 힘들다. 하지만 기저활동이 높은 수용체에 대해서는 inverse agonist의 기능이 antagonist와는 확연히 구별된다. 따라서 지금까지 antago-

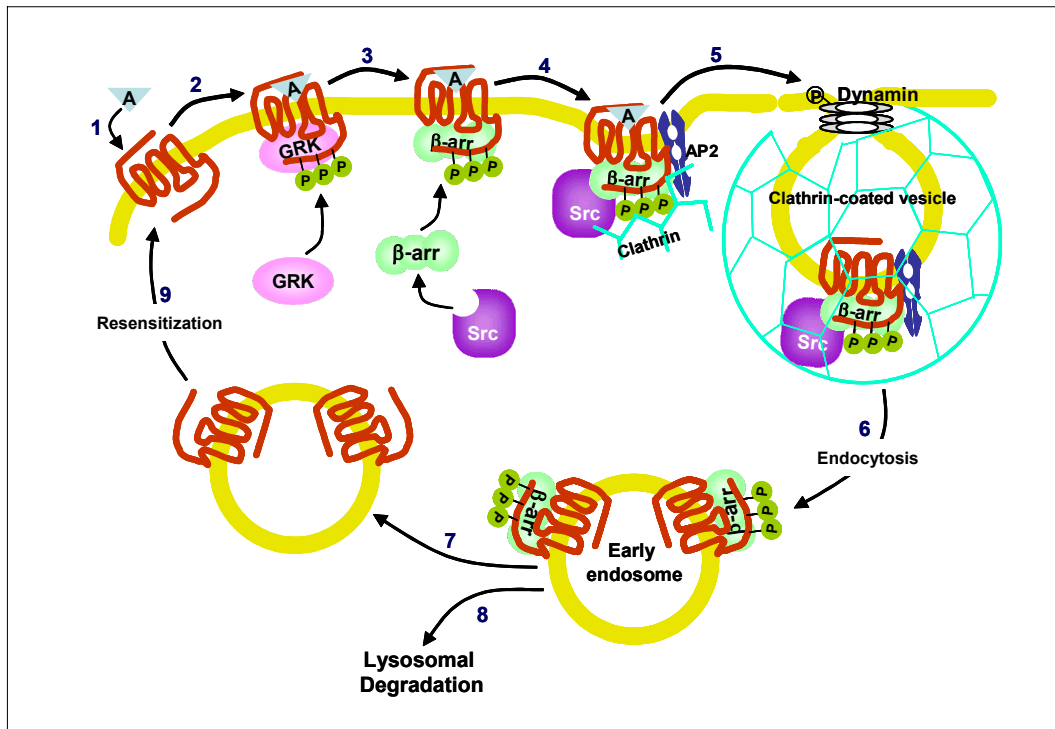


Fig. 4. GPCR 탈감작 및 세포 내 합입기전. 리간드와 결합한 GPCR에 의해 활성화된 G 단백질은 세포 내 여러 effector들을 자극하여 세포 내로 다양한 신호들을 전달하게 한다 (1단계). GRK는 활성화된 GPCR을 인식하여 수용체의 C-말단을 인산화 시킴으로써 GPCR의 탈감작 및 세포 내로의 합입 기전을 초기화하고 (2단계), GRK에 의해 인산화된 아미노산 잔기들에 β-arrestin이 결합하게 되면 Src, AP2와 같은 adaptor 단백질들이 결합하여 GPCR의 세포 내 합입을 촉진하게 한다 (3, 4단계). Clathrin-coated vesicle이 형성이 되면 수용체는 세포 내로 합입이 되어 (5, 6단계) 초기 endosome에 위치하다가 라이소좀으로 옮겨져 분해가 되거나 (8단계), GPCR이 탈인산화되어 다시 세포막으로 복귀해 리간드에 반응할 수 있게 된다 (7, 9단계).

nist로 분류되었던 약물들이 실제로는 inverse agonist일 가능성이 높으며 antagonist의 엄밀한 정의는 agonist, 혹은 inverse agonist의 작용을 억제하지만 수용체의 기저활동의 증감에 영향을 주지 않는 약물을 의미한다.

GPCR의 작용 리간드는 orthosteric하게 혹은 allosteric하게 수용체에 결합한다. 대부분의 작용 리간드는 내재적인 (endogenous) 리간드가 결합하는 부위에 결합하며 이를 orthosteric 결합이라 한다. 반면 작용 리간드가 다른 위치에 결합하면 이를 allosteric 결합이라 한다. 이때 작용 리간드를 allosteric modulator라 한다. 이들은 비록 내재적 리간드가 결합하는 곳과는 다른 위치에 결합하지만, 내재적 리간드와 수용체의 결합, 수용체 활성화에 간접적으로 영향을 줄 수 있다.

3. GPCR 신호전달 경로

GPCR은 한 종류 혹은 둘 이상의 G 단백질과 상호작용하며 이때 ICL과 C-말단이 중요한 역할을 한다[22~24]. G 단백질은 α, β, γ 세 가지 subunit으로 구성되는데, 인간의 유전체에는 20종의 α, 5종의 β, 11종의 γ subunit 유전자가

있는 것으로 밝혀졌다[25]. α subunit은 아미노산 서열의 유사도와 그 기능에 따라 G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ 으로 구분된다 [26,27]. 리간드 자극에 의해 GPCR이 활성화되면, α subunit이 βγ subunit으로부터 분리되고 α subunit은 세포 내 여러 효소 혹은 이온채널을 활성화시키거나 억제한다. G_s 는 adenylate cyclase (AC)를 활성화시켜 세포 내 cAMP의 농도가 증가된다. 반면 $G_{i/o}$ 는 AC의 작용을 억제하여 cAMP 농도를 감소시킨다. $G_{q/11}$ 은 phospholipase C (PLC)를 활성화시켜 inositol 3 phosphate (IP_3) 및 diacylglycerol (DAG)를 생성한다. $G_{12/13}$ 은 small G protein Rho 혹은 Na^+/H^+ exchanger 신호전달 경로를 활성화시킨다 (Fig. 3) [28,29]. βγ 복합체는 매우 안정적인 구조를 가지고 있어 마치 하나의 기능단위로 여겨지고 있다. 5종의 β, 11종의 γ subunit이 있으므로 최소한 55개의 βγ 조합이 만들어 질 수 있다. 하지만 이러한 다양성이 가지는 중요성은 아직 명확하지 않다. 오히려 현재까지의 연구는 이와 같이 다양한 조합의 βγ 복합체가 기능적으로는 매우 유사하다고 밝혀지고 있다[30, 31]. βγ 복합체도 α subunit과 같이 다양한 세포내 효소 혹은 이온채널과 상호작용을 하고, βγ 복합체가 PLCβ iso-

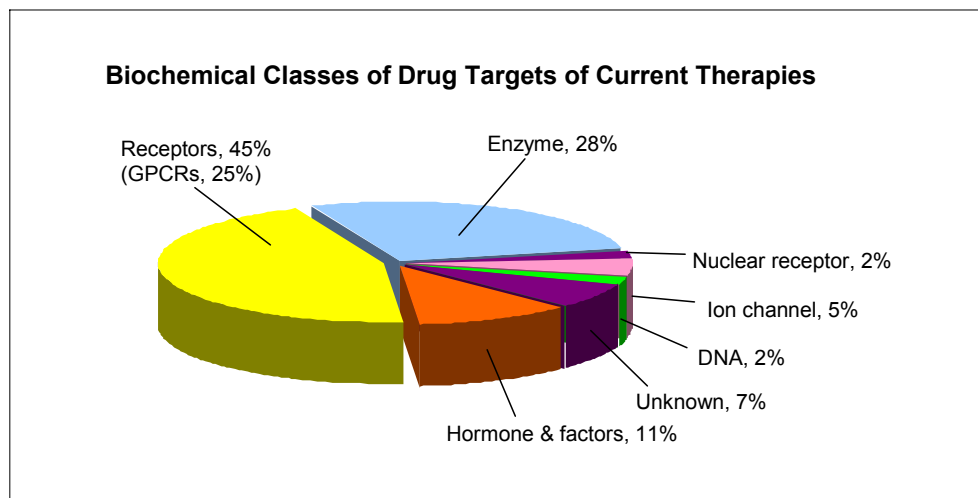


Fig. 5. 최근 의· 제약 시장에서 신약 개발의 작용점이 되는 물질들의 분포도.

form에 작용하여 mitogen-activated protein (MAP) kinase 경로를 활성화시키는 것은 잘 알려진 일이다[32,33]. G 단백질 subunit과 이들에 의해 조절 받는 하위 단백질의 종류와 기능이 매우 다양하기 때문에 한 종의 GPCR을 경유한 신호라 하더라도, 세포마다 생화학적 전기생리적 반응은 매우 다양하고 복잡하다.

4. GPCR 탈감작 및 세포 내 함입기전

리간드에 의해 활성화된 GPCR은 곧이어 탈감작(desensitization)의 단계로 들어간다. 리간드에 의해 활성화된 수용체는 G protein-coupled receptor kinases (GRKs)나 다른 여러 종류의 단백질 인산화 효소(kinase)에 의해 인산화된다[34]. 수용체 인산화는 수초에서 수분단위로 진행되며, 수용체의 활성을 정지시키는 가장 빠른 방법이다[35]. GRK는 리간드에 의해 활성화된 수용체를 인산화시켜 수용체의 탈감작을 유도한다. 즉 수용체 자신의 활성화가 탈감작을 유도하기 때문에 이를 자가탈감작(homologous desensitization)이라 한다[36]. 반면 GRK 이외의 단백질 인산화 효소는 수용체의 활성화 여부와 관련 없이 수용체를 활성화시킬 수 있다. 따라서 활성화되지 않은 인접 수용체를 인산화하여 그 수용체의 탈감작을 유도할 수 있으며 이를 heterologous desensitization이라 한다. 단백질 인산화 후 수용체는 endocytosis에 의해 세포 내로 함입되고, endosome안에서 제거되거나 다시 재활용되어 세포막으로 복귀하게 된다(Fig. 4). 수용체의 세포 내 함입도 수초에서 수분 안에 진행되며, 세포막의 수용체 수를 줄여주는 방법으로 탈감작을 유도한다. 세포 내 수용체 총합의 감소(down-regulation)는 리간드에 장시간 노출에 의해 진행되며 수분에서 수시간에 걸쳐 일어난다. 전체 수용체 양의 감소는 세포 내로 함입된 수용체가 라이소좀에서 제거되는 과정, 전사율, 번역물의 감소로 일어난다[37,38].

수용체의 세포 내 함입에는 두 가지 대표적인 경로가 있다. Clathrin-coated vesicles 경로는 매우 잘 밝혀진 것으로 GRK에 의한 GPCR 인산화가 필수적으로 요구되며 β -arrestin1 혹은 arrestin2에 의존적이다[39~42]. 다른 하나의 경로는 caveolae를 경유하는 것이다. 엔도텔린 A형 수용체(endothelin receptor type A)의 세포 내 함입은 caveolae에 의존적임이 밝혀졌고[43], 이러한 과정은 cholesterol, GTPase, dynamin에 의해 촉진됨이 밝혀졌다[44,45]. 하지만 caveolae에 의한 GPCR의 자세한 함입기전은 더 연구되어야 한다. GPCR이 세포 내로 함입되면, GPCR은 초기 endosome에 위치하다가 라이소좀으로 옮겨져 이곳에서 분해되는데 이때 ubiquitination이 관여한다고 알려지고 있다[46]. GPCR이 라이소좀으로 가지 않게 되면 탈인산화가 된 뒤 리간드에 반응할 수 있는 상태가 되어 다시 세포막으로 복귀하게 된다. 이러한 과정을 resensitization이라 한다.

5. GPCR의 의·제약학적 중요성과 orphan GPCR

GPCR은 인체의 대부분의 생리적 활동에 관여하며 다양한 질병·질환과 관련되어 있다[47]. 판매수익 200위 안에 25%의 약물이 GPCR을 작용점으로 하고 있으며 이들은 연간 270억불의 매출을 보인다(Fig. 5) [48]. 이들 약물은 심혈관질환, 소화기관질환, 중추신경계질환을 포함한 다양한 질병 질환·치료에 사용된다. 예를 들어 비중추신경계 질환으로 Zantac (ranitidine)이 β_2 -adrenergic 수용체를 통한 케양치료, Cozaar (Losartan)은 안지오텐신(angiotensin) 수용체를 경유하여 고혈압치료, Claritin (loratadine)은 Histamin 수용체를 경유하여 알레르기 치료, Lupron (leuprolide)는 GnRH 수용체를 경유하여 전립선암 치료에 사용된다. 중추신경계 질환에는 Zyprexa (Olanzapine), Risperdal (Risperidone)이 세로토닌(5-HT) 수용체를 경유하여 정신분열증

Table 1. Ligand-oGPCR Pairing Identified using Reverse Pharmacology Strategy

oGPCR	Assay used	Ligand	Year found	Reference
BRS-3	oocytes	Bombesin	1993	[53]
ORL-1	cAMP	Nociceptin/OFQ	1995	[54]
AZ3B	[Ca ²⁺] _i , oocytes	C3a	1996	[55]
CIRL	Radioligand binding	Latrotoxin	1997	[14]
Orexin-1 and -2	[Ca ²⁺] _i	Orexin-A and -B	1998	[56,57]
GPR10	Arachidonic acid	PrRP	-	[58]
APJ	ext, pH	Apelin	-	[59]
CRLR	oocytes	CGRP	-	[60]
EDG1, 3, 5, 6, 8	[Ca ²⁺] _i , cAMP	S1P	1998~2000	[61,62]
EDG2, 4, 7	[Ca ²⁺] _i , cAMP	LPA	1998~2000	[62]
GSG-R	[Ca ²⁺] _i	Ghrelin	1999	[63]
GPR14	[Ca ²⁺] _i	Urotensin II	-	[64,65]
Cys-LT1R	[Ca ²⁺] _i	LTD4	-	[66]
GPR38	[Ca ²⁺] _i	Motilin	-	[67]
KIAA0001	yeast	UDP-glucose	2000	[68]
OGR-1	[Ca ²⁺] _i	SPC	-	[69]
Cys-LT2R	[Ca ²⁺] _i , oocytes	LTC4 and D4	-	[70,71]
GPR16	cAMP, radioligand binding	LTB4	-	[72]
FM-3/4	[Ca ²⁺] _i	Neuromedin U	-	[73,74]
HLWAR77	[Ca ²⁺] _i	NPFF and NPAF	-	[75]
GPR54	[Ca ²⁺] _i	Kiss-1/Metastatin	2001	[76]
CRTH2	[Ca ²⁺] _i	Prostaglandin D2	-	[77]
G2A	[Ca ²⁺] _i	LPC	-	[78]
GPRv53	cAMP, radioligand binding	Histamine	-	[79]
P2Y12	oocytes	ADP	-	[80]
MCH2	[Ca ²⁺] _i	MCH	-	[81]
TDAG-8	cAMP	Psychosine	-	[82]
TA1, TA2	oocytes	Trace amines (tyramine)	-	[83]
GPR4	[Ca ²⁺] _i	SPC, LPC	-	[84]
TG1019	GTP-γS binding	Eicosanoids	2002	[85]
LGR7 and 8	cAMP	Relaxin	-	[86]
GPR73	[Ca ²⁺] _i	Prokineticin1	-	[87]
GPR7 and 8	cAMP	NPB and NPW	2002~2003	[88]
TGR5	cAMP	Bile acids	2002~2003	[89]
GPR77	Radioligand binding	C5a, C5a des Arg	2002~2003	[90]
GPR40	[Ca ²⁺] _i	Medium-long-chain fatty acids	2003	[91]
GPR41 and 43	yeast	short chain fatty acids	-	[92]
HM74A	GTP-γS binding	Nicotinic acid	-	[93]
MrgX2	[Ca ²⁺] _i	Cortistatin	-	[94]
GPR103	[Ca ²⁺] _i	QRFP	-	[95]
MrgD	[Ca ²⁺] _i	β-alanine	2004	[96]
GPR80	[Ca ²⁺] _i	α-ketoglutarate	-	[97]
GPR81	[Ca ²⁺] _i	succinate	-	[97]

치료, Neurontin (Gabapentin)은 GABA 수용체를 경유하여 간질 및 통증 치료에 사용된다. GPCR은 다양한 질병·질환에 관여하기 때문에 많은 제약회사들이 표적 GPCR에 대한 특성을 분석하고 이들의 활성을 조절할 수 있는 신규물질 개발에 투자하고 있다. 현재까지 약 400종의 GPCR이 약물의 작용점이 될 수 있음이 예견되고 있다. 또한 GPCR 리간드는 주로 작은 분자로 이루어져 있어 구강투여가 가능하거나 약물 선택성을 높일 수 있는 리간드 변형이 용이하다는 장점을 가지고 있다[49]. 최근에는 로돕신 삼차구조 [50]에 근거한 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 리간드-수용체간의 분자적 상호작용을 계산할 수 있어 보다 효과적으로 약물을 개발할 수 있다.

인간유전체사업 결과 transmitter GPCR로 예상되면서 그 리간드가 밝혀지지 않은 GPCR이 150여 종이 있음이 밝혀졌고 이를 고아 GPCR (orphan GPCR, oGPCR)이라 한다 [51,52]. oGPCR의 리간드를 찾아내는 것은 신규 생리 활성 물질을 발굴하는 것이며, 이들은 신약 개발의 주요 표적이 된다. 지난 10여년 간의 연구결과 약 50여종의 oGPCR에 대한 리간드가 밝혀지고 (Table 1), 현재 약 100여종의 진성 oGPCR들이 남아 있다. oGPCR에 대한 리간드 발굴연구는 역약리학 (reverse pharmacology)적 방법의 개선을 가져왔다. 기존의 전형적인 약물개발 방법은 질병·질환을 선택하고 그 병리생리적 기전을 이해하여 이를 표적으로 약물을 개발하는 forward pharmacology 방법이다. 이러한 방법을 통해 결과적으로 그 약물이 GPCR을 표적으로 함이 밝혀지게 된다. 반면 역약리학적 방법은 그 리간드와 기능을 모르는 GPCR의 리간드를 먼저 발굴하고, 이들의 기능을 역추적하여 어떠한 질병·질환에 연관되는 지를 찾는 것이다.

6. 고아 GPCR 리간드 스크리닝법

역약리학적 방법은 기존의 GPCR 신호전달 분석 시스템을 기본으로 하여 생물정보학, 인실리코 약물디자인 (in silico drug design) 방법 및 고속 스크리닝 시스템이 적용되고 있다. 신규 작용 리간드 발굴을 위해서는 다양한 조직 추출물, 펩타이드 라이브러리, 유기화합물 라이브러리가 사용되고 있다. 리간드 스크리닝을 위해서 첫번째 수행되어야 할 일은 GPCR 전장유전자 (full-length gene)를 진핵세포 발현 벡터에 도입하는 것이다. 주로 사용되는 진핵세포는 포유류 세포, 제노푸스 난자, 혹은 제노푸스 melanophore이다[98]. 세포주를 사용할 때 가장 중요한 사항은 그 세포주에 도입하고자 하는 GPCR 유전자가 존재하지 않아야 한다. 이러한 관점에서 제노푸스 난자는 고아 GPCR 발현에 좋은 조건을 가지고 있다. 하지만 제노푸스 난자 시스템은 고속 리간드 스크리닝에는 적합하지 않은 단점이 있다. 따라서 포유류 세포인 HEK293나 Chinese hamster ovary (CHO) 세포주가 자주 사용되는데, 이 세포주들은 다양한 G 단백질

repertoire를 가지고 있어 GPCR이 활성화 되었을 때 그 하위 단계 신호전달 측정이 용이한 장점이 있기 때문이다. 하지만 각 GPCR들은 고유의 신호전달 체계를 갖추고 있기 때문에 다양한 세포주들을 시험해 보는 것이 권장된다[99, 100]. 신호전달활성에 대한 측정은 주로 2차 전달자 즉 cAMP, IP₃, or Ca²⁺의 변화를 관찰하는 방법과 세포의 대사를 측정하는 cytosensor microphysiometer 방법도 사용된다 [101]. 모든 신호전달시스템은 에너지를 사용하게 되어 있어 GPCR이 활성화 될 때 세포바깥의 배양액의 pH 변화가 발생한다. Cytosensor microphysiometer assay방법은 이러한 원리에 착안하고 있다[102]. 따라서 이러한 방법은 세포 신호전달 특이성으로 발생할 수 있는 문제를 피할 수 있는 장점이 있으나 측정방법의 특성상 고속 리간드 스크리닝에는 불리한 점이 있다. 이러한 방법을 이용하여 APJ 및 RF-amide peptides에 대한 고아 GPCR 리간드 발굴에 이용되었다[59,103]. 제노푸스 난자를 이용하는 방법은 GPCR이 제노푸스 난자에 내재적으로 존재하는 G_q를 활성화시켰을 때 Cl⁻ 전류흐름이 관찰된다는데 착안하고 있다. 즉 제노푸스 난자에 고아 GPCR mRNA를 도입하고 전압을 고정한다음, 여러 리간드 소스를 투여하고 전류의 흐름 측정한다. 이러한 방법을 이용하여 CysLT1 고아 GPCR의 내재적인 리간드로 LTD4를 밝힐 수 있었다[66]. 제노푸스 멜라노포어는 다량의 멜라닌 색소를 가지고 있는 melanosome을 가지고 있으며 이 기관에서 멜라닌 색소의 분산은 GPCR 신호전달에 의존적이다. PLC나 AC의 활성화는 색소의 멜라닌 색소의 분산을 유도하여 세포의 색깔이 어두어진다. 하지만 이 방법은 세포에 유전자 도입이 용이하지 않은 문제를 가진다[98]. 최근에 개발된 Ca²⁺ 이미지 측정법은 GPCR 리간드 고속스크리닝을 가능하게 하였다. 형광현미경에 charge-coupled device (CCD) 카메라를 연결하여, 96-well이나 384-well에 있는 세포에서 발생하는 Ca²⁺ 이미지를 측정하는데, 이때 사용하는 장비를 Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR™)라 한다. 이러한 방법은 G_{q/11}, PLC 활성화에 따른 세포 내 Ca²⁺의 증가를 측정하는 것으로 민감성이 매우 높은 장점을 가지고 있다. 또한 키메라 G 단백질을 세포 내에 도입하여 다양한 G 단백질로부터 내려오는 신호 측정이 가능하다[104]. 또 다른 고속스크리닝 법으로 단백질이동 형광측정법 (Fluorescence-based protein translocation assay)이 있다. β-arrestin2이 세포질에 있다가 GPCR이 활성화 되었을 때 세포막으로 이동하는 특성을 이용하여 β-arrestin2에 형광물질을 붙인 융합단백질을 제작하고 이들의 움직임을 형광현미경으로 분석하는 것이다[105]. 하지만 수용체의 활성이 약할 경우 β-arrestin2 이동이 잘 관측되지 않을 수 있으며, 모든 GPCR이 β-arrestin2과 결합하는 것은 아니다. 또한 Ca²⁺ 이미지 측정법과 마찬가지로, 이 방법은 inverse agonist나 antagonist 분석은 용이하지 않은 단점이 있다. 이

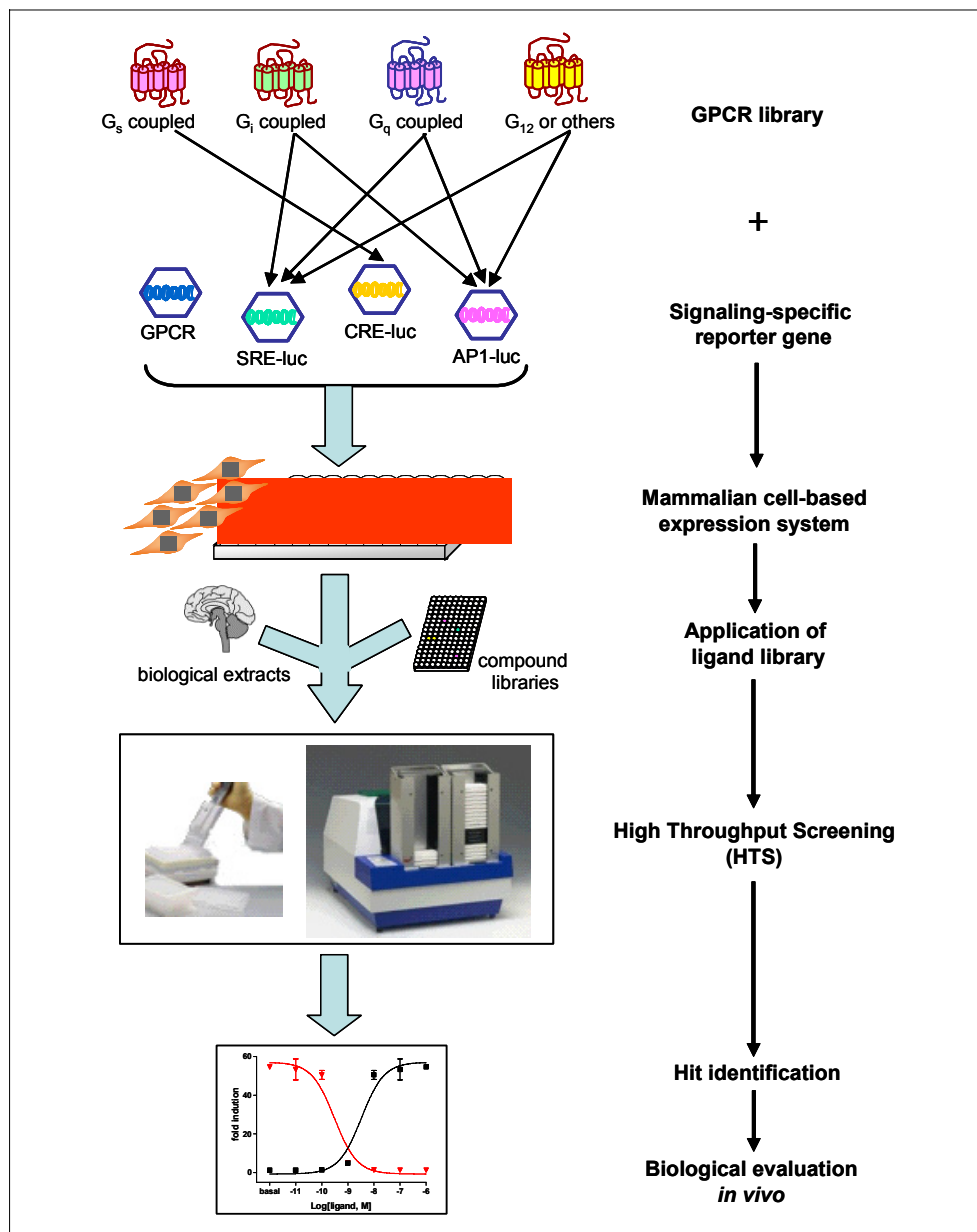


Fig. 6. 2차 신호전달자를 매개로 한 유전자 발현 분석 시스템을 이용한 고아 GPCR 리간드 스크리닝 법. GPCR에 의해 활성화 된 2차 신호전달자에 의해 조절되는 CRE- 혹은 SRE- 를 포함하는 프로모터와 루시페레이스 유전자를 융합한 표지 벡터를 사용한다. 다양한 신호들이 중첩되고 증폭이 되는 경향이 있어 GPCR에 의한 다양한 신호전달을 측정 할 수 있을 뿐만 아니라 96-well 이상에서의 측정이 가능하므로 고속스크리닝에도 적합하다.

러한 여러 가지 스크리닝 방법들의 단점을 극복하고자 최근에 2차 신호전달자를 매개한 유전자 발현 분석시스템을 사용한 방법이 개발되었다. 이 시스템은 2차 신호전달자에 의해 조절되는 cAMP-responsive element (CRE) 혹은 serum-responsive element (SRE)를 포함하는 프로모터와 루시페레이스 (luciferase) 유전자를 융합한 표지벡터를 사용한다. 이와 같은 신호전달 특이적 유전자 발현시스템을 사용하면 리간드 의존적 활성 및 리간드 비의존적인 constitutive 활성도 측정되기 때문에 inverse agonist 스크리닝도 가능하다.

서로 다른 G 단백질에 의해 활성화되었다고 유전자 발현 수준에서는 중첩되는 경향이 있어 다양한 신호전달을 측정할 수 있는 장점이 있다. 또한 96-well이나, 384-well 시스템에서 측정이 가능하기 때문에 고속스크리닝에도 적합하다 (Fig. 6).

결론

GPCR은 인체내에 다양한 리간드를 가지고 있으며, 그

활성화 및 신호전달 기전은 매우 복잡하고 세포별 특이성을 가진다. GPCR과 작용 리간드의 분자적 상호작용 및 작용 리간드 특이적인 세포내 신호전달에 대한 연구는 신규 작용제·억제제 개발에 필수적인 과정이다. 최근에는 리간드-수용체 상호작용에 대한 생화학적 결과, 컴퓨터 분자모델링 기법, 자동화장비를 이용한 초고속 리간드 활성검사법의 결합으로 신규작용물질 개발속도가 빨라지는 추세이다. 기존에 작용 리간드가 알려지지 않은 고아 GPCR에 대한 리간드가 속속 밝혀지면서 이를 이용한 약물개발은 거대 다국적 제약회사의 가장 큰 관심분야로 떠오르고 있다. 국내에서도 GPCR 관련 기초연구가 매우 빠른 속도로 발전하고 있다, 따라서 이러한 기초연구, 제약회사에서의 신규 약물개발에 대한 투자, 의학계에서 임상연구의 협력이 이루어진다면 국내 GPCR 관련 신약개발도 빠르게 진행될 수 있을 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

1. Attwood TK and Findlay JB: *Fingerprinting G-protein-coupled receptors*. *Protein Eng* 7:195-203, 1994
2. Kolakowski LF Jr: GCRDB: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2:1-7, 1994
3. Blomenrohr M, Bogerd J, Leurs R, Schulz RW, Tensen CP, Zandbergen MA and Goos HJ: *Differences in structure-function relations between nonmammalian and mammalian gonadotropin-releasing hormone receptors*. *Biochem Biophys Res Commun* 238:517-522, 1997
4. Trumpp-Kallmeyer S, Chini B, Mouillac B, Barberis C, Hoflack J and Hibert M: *Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors*. *Pharm Acta Helv* 70:255-262, 1995
5. Bockaert J and Pin JP: *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: and evolutionary success*. *EMBO J* 18:1723-1729, 1999
6. Gether U: *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. *Endocr Rev* 21:90-113, 2000
7. Ji I and Ji TH: *Differential roles of exoloop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation*. *J Biol Chem* 270:15970-15973, 1995
8. Fernandez LM and Puett D: *Lys583 in the third extracellular loop of the lutropin/choriogonadotropin receptor is critical for signaling*. *J Biol Chem* 271:925-930, 1996
9. Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Housami S, Spengler D, Bockaert J and Journot L: *Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation*. *J Biol Chem* 271:22146-22151, 1996
10. Pin JP and Bockaert J: *Get receptive to metabotropic glutamate receptors*. *J Curr Opin Neurobiol* 5:342-349, 1995
11. Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H and Morikawa K: *Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor*. *Nature* 407:971-977, 2000
12. Hayflick JS: *A family of heptahelical receptors with adhesion-like domains: a marriage between two super families*. *J Recept Signal Transduct Res* 20:119-131, 2000
13. Harmar AJ: *Family-B G-protein-coupled receptors*. *Genome Biol* 2:REVIEWS3013, 2001
14. Krasnoperov VG, Bittner MA, Beavis R, Kuang Y, Salnikow KV, Chepurny OG, Little AR, Plotnikov AN, Wu D, Holz RW and Petrenko AG: *Alpha-Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor*. *Neuron* 18:925-937, 1997
15. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG and Schioth HB: *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272, 2003
16. Bourne HR: *How receptors talk to trimeric G proteins*. *Curr Opin Cell Biol* 9:134-142, 1997
17. Bourne HR, Sanders DA and McCormick F: *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. *Nature* 349:117-127, 1991
18. Neves SR, Ram PT and Iyengar R: *G protein pathways*. *Science* 296:1636-1639, 2002
19. Chidiac P, Markin VS and Ross EM: *Kinetic control of guanine nucleotide binding to soluble Galpha(q)*. *Biochem Pharmacol* 58:39-48, 1999
20. Mukhopadhyay S and Ross EM: *Rapid GTP binding and hydrolysis by G(q) promoted by receptor and*

- GTPase-activating proteins. Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9539-9544, 1999
21. Kenakin T: *Efficacy at G protein-coupled receptors. Nature Rev Drug Discov* 1:103-110, 2002
 22. Cotecchia S, Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG and Lefkowitz RJ: *Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. J Biol Chem* 267:1633-1639, 1992
 23. Arora KK, Sakai A and Catt KJ: *Effects of second intracellular loop mutations on signal transduction and internalization of the gonadotropin-releasing hormone receptor. J Biol Chem* 270:22820-22826, 1995
 24. Damaj BB, McColl SR, Neote K, Songqing N, Ogborn KT, Hebert CA and Naccache PH: *Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. FASEB J* 10:1426-1434, 1996
 25. Wong SK: *G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. Neurosignals* 12:1-12, 2003
 26. Conklin BR and Bourne HR: *Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. Cell* 73:631-641, 1993
 27. Rens-Domiano S and Hamm HE: *Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J* 9:1059-1066, 1995
 28. Le Page SL, Bi Y and Williams JA: *CCK-A receptor activates RhoA through G alpha 12/13 in NIH3T3 cells. Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1197-1206, 2003
 29. Lin X, Voyno-Yasenetskaya TA, Hooley R, Lin CY, Orłowski J and Barber DL: *Galpha12 differentially regulates Na⁺-H⁺ exchanger isoforms. J Biol Chem* 271:22604-22610, 1996
 30. Clapham DE and Neer EJ: *G protein beta gamma subunits Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203, 1997
 31. Wess J: *Molecular basis of receptor/G protein-coupling selectivity. Pharmacol Ther* 80:231-264, 1998
 32. Katz A, Wu D and Simon MI: *Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. Nature* 360:686-689, 1992
 33. Murthy KS, Coy DH and Makhoul GM: *Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by G?i1 and G?o. J Biol Chem* 271:23458-23463, 1996
 34. Krupnick JG and Benovic JL: *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319, 1998
 35. Lefkowitz RJ: *G protein-coupled receptor kinases. Cell* 74:409-412, 1993
 36. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG and Lefkowitz RJ: *Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2797-2801, 1986
 37. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A, Kobilka BK, MacGregor C, Irons GP, Caron MG and Lefkowitz RJ: *Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. J Biol Chem* 264:16786-1679, 1989
 38. Valiquette M, Bonin H, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ and Bouvier M: *Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. Proc Natl Acad Sci USA* 87:5089-5093, 1990
 39. Takei K and Haucke V: *Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. Trends Cell Biol* 11:385-391, 2001
 40. Tsuga H, Kameyama K, Haga T, Kurose H and Nagao T: *Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. J Biol Chem* 269:32522-32527, 1994
 41. Ferguson SS, Menard L, Barak LS, Koch WJ, Colapietro AM and Caron MG: *Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1. J Biol Chem* 270:24782-24789, 1995
 42. Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, and Benovic JL: *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. Nature* 383:447-450, 1996

43. Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S and Masaki T: *Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem* 275:6439-6446, 2000
44. Chang WJ, Rothberg KG, Kamen BA and Anderson RG: *Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. J Cell Biol* 118:63-69, 1992
45. Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ and McNiven MA: *Dynamin-mediated internalization of caveolae. J Cell Biol* 141:85-99, 1998
46. Marchese A and Benovic JL: *Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. J Biol Chem* 276:45509-45512, 2001
47. Marinissen MJ and Gutkind JS: *G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci* 22:368-376, 2001
48. Navigant Consulting Inc.: *GPCR-based drug discovery: Tactical assessment and strategic outlook. Report # 1690*, 2004
49. Hopkins AL and Groom CR: *The druggable genome. Nat Rev Drug Discov* 1:727-730, 2002
50. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M: *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science* 289:739-745, 2000
51. Lander ES et al: *Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature* 409:860-921, 2001
52. Venter JC et al: *The sequence of the human genome. Science* 291:1304-1351, 2001
53. Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA and Battey JF: *BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. J Biol Chem* 268:5979-5984, 1993
54. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al: *Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature* 377:532-535, 1995
55. Ames RS, Li Y, Sarau HM, Nuthulaganti P, Foley JJ, Ellis C, Zeng Z, Su K, Jurewicz AJ, Hertzberg RP, Bergsma DJ and Kumar C: *Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. J Biol Chem* 271:20231-20234, 1996
56. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ and Yanagisawa M: *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell* 92:573-585, 1998
57. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM and Sutcliffe JG: *The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci USA* 95:322-327, 1998
58. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H and Fujino M: *A prolactin-releasing peptide in the brain. Nature* 393:272-276, 1998
59. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H and Fujino M: *Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. Biochem Biophys Res Commun* 251:471-476, 1998
60. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG and Foord SM: *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature* 393:333-339, 1998
61. Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S and Hla T: *Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. Science* 279:1552-1555, 1998
62. An S, Goetzl EJ and Lee H: *Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. J Cell Biochem Suppl* 30-31:147-157, 1998
63. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H and Kangawa K: *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature* 402:

- 656-660, 1999
64. Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O and Fujino M: *Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)*. *Biochem Biophys Res Commun* 265:123-129, 1999
65. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Douglas SA, et al: *Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14*. *Nature* 401:282-286, 1999
66. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT and Evans JF: *Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor*. *Nature* 399:789-793, 1999
67. Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong SS, Austin CP, Figueroa D, MacNeil D, Cascieri MA, Nargund R, Bakshi R, Abramovitz M, Stocco R, Kargman S, O'Neill G, Van Der Ploeg LH, Evans J, Patchett AA, Smith RG and Howard AD: *Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system*. *Science*. 284:2184-2188, 1999
68. Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S and Livi GP: *A G protein-coupled receptor for UDP-glucose*. *J Biol Chem* 275: 10767-10771, 2000
69. Xu Y, Zhu K, Hong G, Wu W, Baudhuin LM, Xiao Y and Damron DS: *Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1*. *Nat Cell Biol* 2:261-267, 2000
70. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR and Evans JF: *Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor*. *J Biol Chem* 275:30531-30536, 2000
71. Nothacker HP, Wang Z, Zhu Y, Reinscheid RK, Lin SH and Civelli O: *Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist*. *Mol Pharmacol* 58:1601-1608, 2000
72. Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto M, Saito T, Ohishi T, Ishii H and Furuichi K: *Molecular cloning and characterization of another leukotriene B4 receptor*. *J Biol Chem* 275:27000-27004, 2000
73. Howard AD, Wang R, Pong SS, Mellin TN, Strack A, Guan XM, Zeng Z, Williams DL Jr, Feighner SD, Nunes CN, Murphy B, Stair JN, Yu H, Jiang Q, Clements MK, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, McDonald TP, Lynch KR, Evans JF, Austin CP, Caskey CT, Van der Ploeg LH and Liu Q: *Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding*. *Nature* 406:70-74, 2000
74. Szekeres PG, Muir AI, Spinage LD, Miller JE, Butler SI, Smith A, Rennie GI, Murdock PR, Fitzgerald LR, Wu H, McMillan LJ, Guerrero S, Vawter L, Elshourbagy NA, Mooney JL, Bergsma DJ, Wilson S and Chambers JK: *Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3*. *J Biol Chem* 275:20247-20250, 2000
75. Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres PG, Evans NA, Schmidt DB, Buckley PT, Dytko GM, Murdock PR, Milligan G, Groarke DA, Tan KB, Shabon U, Nuthulaganti P, Wang DY, Wilson S, Bergsma DJ and Sarau HM: *Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor*. *J Biol Chem* 275:25965-25971, 2000
76. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O and Fujino M: *Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor*. *Nature* 411:613-617, 2001
77. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura

- M, Takano S and Nagata K: *Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2*. *J Exp Med* 193:255-261, 2001
78. Kabarowski JH, Zhu K, Le LQ, Witte ON and Xu Y: *Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A*. *Science* 293:702-705, 2001
79. Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytco GM, Mannan IJ, Boyce R, Alston J, Tierney LA, Li X, Herrity NC, Vawter L, Sarau HM, Ames RS, Davenport CM, Hieble JP, Wilson S, Bergsma DJ and Fitzgerald LR: *Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor*. *Mol Pharmacol* 59:434-441, 2001
80. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D and Conley PB: *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. *Nature* 409:202-207, 2001
81. Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK and Muir AI: *Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor*. *J Biol Chem* 276:20125-20129, 2001
82. Im DS, Heise CE, Nguyen T, O'Dowd BF and Lynch KR: *Identification of a molecular target of psychosine and its role in globoid cell formation*. *J Cell Biol* 153:429-434, 2001
83. Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artyushyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA and Gerald C: *Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8966-8971, 2001
84. Zhu K, Baudhuin LM, Hong G, Williams FS, Cristina KL, Kabarowski JH, Witte ON and Xu Y: *Sphingophosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4*. *J Biol Chem* 276:41325-41335, 2001
85. Hosoi T, Koguchi Y, Sugikawa E, Chikada A, Ogawa K, Tsuda N, Suto N, Tsunoda S, Taniguchi T and Ohnuki T: *Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o)*. *J Biol Chem* 277:31459-31465, 2002
86. Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD and Hsueh AJ: *Activation of orphan receptors by the hormone relaxin*. *Science* 295:671-674, 2002
87. Lin DC, Bullock CM, Ehler FJ, Chen JL, Tian H and Zhou QY: *Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor*. *J Biol Chem* 277:19276-19280, 2002
88. Shimomura Y, Harada M, Goto M, Sugo T, Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Asami T, Kitada C, Mori M, Onda H and Fujino M: *Identification of neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptors GPR7 and GPR8*. *J Biol Chem* 277:35826-35832, 2002
89. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H and Tanaka K: *Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)*. *Biochem Biophys Res Commun* 298:714-719, 2002
90. Cain SA and Monk PN: *The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg (74)*. *J Biol Chem* 277:7165-7169, 2002
91. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y and Fujino M: *Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40*. *Nature* 422:173-176, 2003
92. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Stepkowski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A and Dowell SJ: *The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids*. *J Biol Chem* 278:11312-11319, 2003
93. Wise A, Foord SM, Fraser NJ, Barnes AA, Elshourbagy N, Eilert M, Ignar DM, Murdock PR, Stepkowski K, Green A, Brown AJ, Dowell SJ, Szekeres PG, Hassall DG, Marshall FH, Wilson S and Pike NB: *Molecular identification of high and low affinity*

- receptors for nicotinic acid. J Biol Chem* 278:9869-9874, 2003
94. Robas N, Mead E and Fidock M: *MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. J Biol Chem* 278:44400-44444, 2003
95. Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Lavery M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F Jr and Zhang FL: *Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. J Biol Chem* 278:27652-27657, 2003
96. Shinohara T, Harada M, Ogi K, Maruyama M, Fujii R, Tanaka H, Fukusumi S, Komatsu H, Hosoya M, Noguchi Y, Watanabe T, Moriya T, Itoh Y and Hinuma S: *Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. J Biol Chem* 279:23559-23564, 2004
97. He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H and Ling L: *Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. Nature* 429:188-193, 2004
98. Lerner MR: *Tools for investigating functional interactions between ligands and G-protein-coupled receptors. Trends Neurosci* 17:142-146, 1994
99. Stadel JM, Wilson S and Bergsma DJ: *Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. Trends Pharmacol Sci* 18:430-437, 1997
100. Milligan G: *Strategies to identify ligands for orphan G-protein-coupled receptors. Biochem Soc Trans* 30:789-793, 2002
101. McConnell HM, Owicki JC, Parce JW, Miller DL, Baxter GT, Wada HG and Pitchford S: *The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. Science* 257:1906-1912, 1992
102. Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH and Patchett AA: *Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. Trends Pharmacol Sci* 22:132-140, 2001
103. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y and Fujino M: *New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. Nat Cell Biol* 2:703-708, 2000
104. Szekeres PG: *Functional assays for identifying ligands at orphan G protein-coupled receptors. Receptors Channels* 8:297-308, 2002
105. Pierce KL and Lefkowitz RJ: *Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. Nat Rev Neurosci* 2:727-733, 2001