

N형 칼슘통로 비활성화와 연계된 세포 신호전달 체계로서의 인산화과정

가천의과대학교 생리학교실, *충북대학교 의과대학 생리학교실

임원일 · 구용숙*

N형 칼슘통로의 비활성화기전에 관하여는 아직까지도 막전압의존성 기전과 칼슘의존성 기전간에 논란이 계속되고 있다. 2003년에 의학물리에 발표한 논문¹⁾에서 본 연구자는 N형 칼슘통로의 비활성화 기전은 2가지 성분 -빠른 성분과 느린 성분-을 가지고 있고 빠른 성분은 칼슘의존적이 아니며 오직 느린 성분만이 칼슘의존적일 가능성을 제시하였다. 본 논문에서는 막전압의존성 기전이 옳건 칼슘의존성 기전이 옳건 간에 세포 신호전달 체계로서 비활성화와 연계된 기전이 필요하므로 이러한 맥락에서 인산화 기전을 연구하였다. 흰쥐 경동맥 결절뉴론을 단일 세포로 얻은 후 whole cell patch clamp technique를 사용하여 N형 칼슘전류를 기록하고 대조 세포내액을 사용하였을 때와 phosphatase inhibitor인 okadaic acid를 포함한 세포내액을 사용하였을 때의 차이를 비교하였다. Okadaic acid에 의하여 비활성화정도가 증가되었고 이러한 okadaic acid 효과는 주로 N형 통로를 통하여 영향을 미침을 N형 칼슘통로 억제제인 ω -conotoxin GVIA를 사용함으로써 확인하였다. Okadaic acid에 의한 비활성화 증가 효과는 protein kinase를 비특이적으로 억제하는 staurosporine에 의하여 억제되었고 또한 calmodulin dependent protein kinase의 특이적 억제제인 fluvastatin C에 의하여 억제되었으므로 인산화과정이 N형 칼슘통로 비활성화와 관련되어 있고 특히 calmodulin을 통한 인산화과정이 주로 관여함을 확인하였다. 본 연구자가 발표한 선행논문¹⁾에 의해 외부의 2가 양이온에 의해 빠른 비활성화가 진행되며, 본 논문에 의하여 인산화 과정에 의해 빠른 비활성화가 촉진된다는 사실이 확인되었다. 그러나 본 연구결과만으로는 인산화과정이 비활성화 자체라고는 볼 수 없으며 단지 인산화과정에 의해 비활성화가 가속되었다고 해석할 수 밖에 없다. 인산화과정이 비활성화 자체인지 여부는 2가 양이온이 칼슘통로에 작용하는 결합부위에 관한 연구 및 인산화 부위가 칼슘통로인지 아니면 다른 조절 부위인지 여부를 확인할 수 있는 연구가 진행되어야 확실히 알 수 있을 것이다.

중심단어: N형 칼슘통로, 비활성화, 인산화, 막전압의존성, 칼슘의존성, 결합부위

서 론

현재까지 칼슘통로 비활성화(inactivation) - 이온통로를 열게 하는 자극이 지속됨에도 불구하고 이온통로를 닫는 과정 -에 관한 연구는 주로 심장 및 혈관 평활근의 L형 칼슘통로를 대상으로 수행되어온 바, 막전압의존성 기전인 느린 비활성화(slow inactivation component due to voltage dependent mechanism)^{2,4)}와 칼슘의존성 기전인 빠른 비활성

화(rapid inactivation component due to Ca^{2+} dependent mechanism)^{3,8)}이 관여, 작용함이 정설로 인정되어 왔다. 즉 칼슘통로를 지나는 charge carrier로 바륨을 사용할 경우에는 느린 비활성화에 의하여, 칼슘을 사용할 경우에는 느린 비활성화와 빠른 비활성화 모두에 의하여 칼슘통로 비활성화가 촉진된다^{3,4)}고 알려졌다.

막전압의존성 기전이란 막전압이 증가함에 따라 전류가 단조롭게 감소함을 의미하며, 칼슘의존성 기전이란 비활성화 속도 및 정도가 칼슘통로 주위의 칼슘농도에 의존적인 것을 의미하며 다음과 같은 특징을 보인다. 1. “U형 비활성화(U-shaped inactivation)^{9,10)}”: 즉 최대전류(peak current)를 보이는 전압에서 비활성화 정도가 최대이며 과분극 또는 최대저분극 전압에서 비활성화 정도가 감소한다. 2. 칼슘통로 charge carrier로 칼슘 대신 바륨 또는 1가 양이온으로 대체시 비활성화가 소실된다. 3. 세포속 칼슘 완충제를 사용, 자유 칼슘이온 농도($free [Ca^{2+}]_i$)를 낮추는 경우에는 비활

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음(This work was supported by Chungbuk National University Grant in 2004 to YS Goo).

이 논문은 2004년 10월 30일 접수하여 2004년 12월 6일 채택되었음.

책임저자 : 구용숙, (361-763) 충북 청주시 흥덕구 개신동 산 48

충북대학교 의과대학 생리학교실

Tel: 043)261-2870, Fax: 043)272-1603

E-mail: ysgoo@chungbuk.ac.kr

성화가 소실된다.

지금까지 알려진 N형 칼슘통로 비활성화기전은 L형 칼슘통로의 비활성화기전에 비해 훨씬 복잡하다. 몇몇 연구^{11,12)}에서는 L형 칼슘통로에서와 같이 칼슘의존성 비활성화 기전이 존재한다고 보고하였다. 그러나 아직까지도 N형 칼슘통로 비활성화 기전에 관하여는 막전압의존성 기전과 칼슘의존성 양 기전이 대립하고 있으며 아직 확실한 비활성화 모델이 확립되지 않은 상황이다. 그러므로 본 연구자는 비활성화기전에 관한 연구를 수행하여 선행 논문에서 N형 칼슘통로의 비활성화는 2가지 성분 -빠른 성분과 느린 성분-을 가지고 있고 빠른 성분은 칼슘의존적이지 아니며 단지 느린 성분만이 칼슘의존적일 가능성을 제시하였다.¹⁾

막전압의존성 기전이 옳건 칼슘의존성 기전이 옳건 간에 세포 신호전달 체계로서 비활성화와 연계된 기전이 필요하다. 이러한 기전으로는 인산화 가설이 유력하다. Werz 등¹³⁾은 phosphatase inhibitor인 okadaic acid를 처치시에는 비활성화가 촉진된 반면 protein kinase inhibitor인 staurosporine를 처치하였을 때는 okadaic acid의 효과가 사라지는 것을 보고함으로써 인산화과정이 비활성화와 관련된 기전일 가능성을 시사하였다. 이와는 반대로 Yakel¹⁴⁾은 okadaic acid를 처치하였을 때 비활성화 속도가 느려진다는 정반대의 결과를 얻었고 이와 동시에 놀랍게도 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II의 펩티드 억제제인 CKIP를 사용시 비활성화 속도가 느려짐을 보고함으로써 인산화과정이 역시 칼슘통로 개폐를 조절하는 기전일 가능성을 시사하였다. 이와 같은 Yakel의 연구는 calmodulin이 비활성화를 유도하는 칼슘센서로 동작한다는 보고 및¹⁵⁻¹⁷⁾ calmodulin-binding isoleucine-glutamine ('IQ') motif가 L형과 P/Q형 칼슘통로의 칼슘의존성 비활성화를 결정한다는 연구^{18,19)}와 잘 부합한다. 그러나 L형과 P/Q형 칼슘통로와는 달리 아직까지 N형 칼슘통로에서 'IQ' motif가 칼슘의존성 비활성화를 결정한다는 연구는 없다. 더군다나 아직까지 N형 칼슘통로에서는 칼슘의존성 비활성화 자체가 정설로써 인정되고 있지 않은 상황이다.

본 연구자는 비활성화기전 자체에 관하여는 이미 연구를 수행하였으므로¹⁾ 본 연구에서는 N형 칼슘통로 비활성화와 연관된 세포신호전달 체계로서의 인산화과정을 검증하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구를 통하여 다음과 같은 실험 및 분석기법을 사용

하였다.

1. 실험 및 분석기법

1) 세포분리 방법

Ikeda 등²⁰⁾의 방법을 개선하여 시행하였다. 체중 200 gm 내외의 수컷 흰쥐(Sprague Dawley rat)를 마취하여 희생시킨 후 양쪽 경동맥 분지부위(carotid bifurcation)에서 상경동맥 신경절(superior cervical ganglion)을 분리하였다. 신경절을 몇 조각으로 자른 후 trypsin, collagenase D, DNAase type I 이 함유된 Earle's balanced salt solution (EBSS) 속으로 이동시킨 후 5% CO₂, 95% O₂ 함유 공기하에서 34°C에서 1시간 진탕처리하였다. 세포부유액을 HBSS 용액(10% fetal calf serum (GIBCO), 8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES (pH 7.4) 함유)에 옮긴 후 500×g에서 5분간 원심분리하였다. 이렇게 하여 얻은 pellet을 위의 HBSS 용액에서 재부유시킨 후 4°C 냉장고에 사용할 때까지 보관하였다.

2) 전기생리학적 기록(Electrophysiological recording)

(1) 전극의 제작: Garner 7740 유리(I.D. 0.9 mm, O.D. 1.5 mm, Garner Glass Co)를 사용하여 micropipette puller pp-83 (Narishige., Japan)로 저항이 1~2 MΩ이 되는 전극을 제작하였다.

(2) 칼슘전류 기록: Whole cell configuration patch clamp technique²¹⁾을 사용하여 칼슘전류를 기록하였으며 사용한 용액의 조성은 다음과 같다. 세포외용액(단위 mM): TEA-Cl 140, HEPES 11, glucose 5, MgCl₂ 1, BaCl₂ or CaCl₂ 5, 세포내용액(단위 mM): NMG-Cl 120, TEA-Cl 10, Creatine-PO₄ 14, MgCl₂ 6, NMG-HEPES 10, Tris-ATP 5, NMG₂-EGTA 11, Li₃GDP-β-S 2. 순수한 비활성화 효과만을 관찰하기 위하여 G 단백질에 의한 경로를 차단하고자 Li₃GDP-β-S를 사용하였다. Protein phosphatase와 protein kinase inhibitor를 세포내 용액에 사용시에는 DMSO에 녹여 사용하였고 대조군 세포내 용액에 첨가하는 DMSO 용액의 농도는 0.1~0.3%를 사용함으로써 칼슘전류에 아무 영향을 미치지 않도록 하였다.

막전류의 기록을 위하여 전압자극(voltage steps)은 pClamp software (Axon Instruments, USA)로 필요한 자극 protocol을 만든 후 세포에 인가하였고 이때 기록된 전류 data는 EPC-7 (List Electronics, Germany)의 4 pole low pass Bessel filter를 거쳐 12 bit A/D converter (Labmaster, Warner Instrument Corp)로 digitization 후 PC에 저장하였다.

3) Data 분석(data analysis)

(1) PC로부터 전류 데이터를 재생한 후 Igorpro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR)를 사용하여 분석하였고

curve fitting을 위하여 Marquardt-Levenberg algorithm을 사용하여 전류기록을 가장 잘 반영하는 이중지수함수($Y = A_{\text{offset}} + A_s \exp(-t/\tau_s) + A_f \exp(-t/\tau_f)$)를 도출하였다; A_{offset} : offset amplitude, A_s : 느린 지수함수의 amplitude, A_f : 빠른 지수함수의 amplitude, τ_s : 느린 지수함수의 시정수, τ_f : 빠른 지수함수의 시정수

(2) 통계분석: 위의 5개의 변수를 비교분석하기 위하여

Student t-test를 사용하였다.

실험 결과

1. Okadaic acid에 의한 비활성화의 강화(Fig. 1A, 1B) (Enhancement of inactivation with okadaic acid)

세포내 용액에 1 uM okadaic acid를 처치한 세포의 비활성성

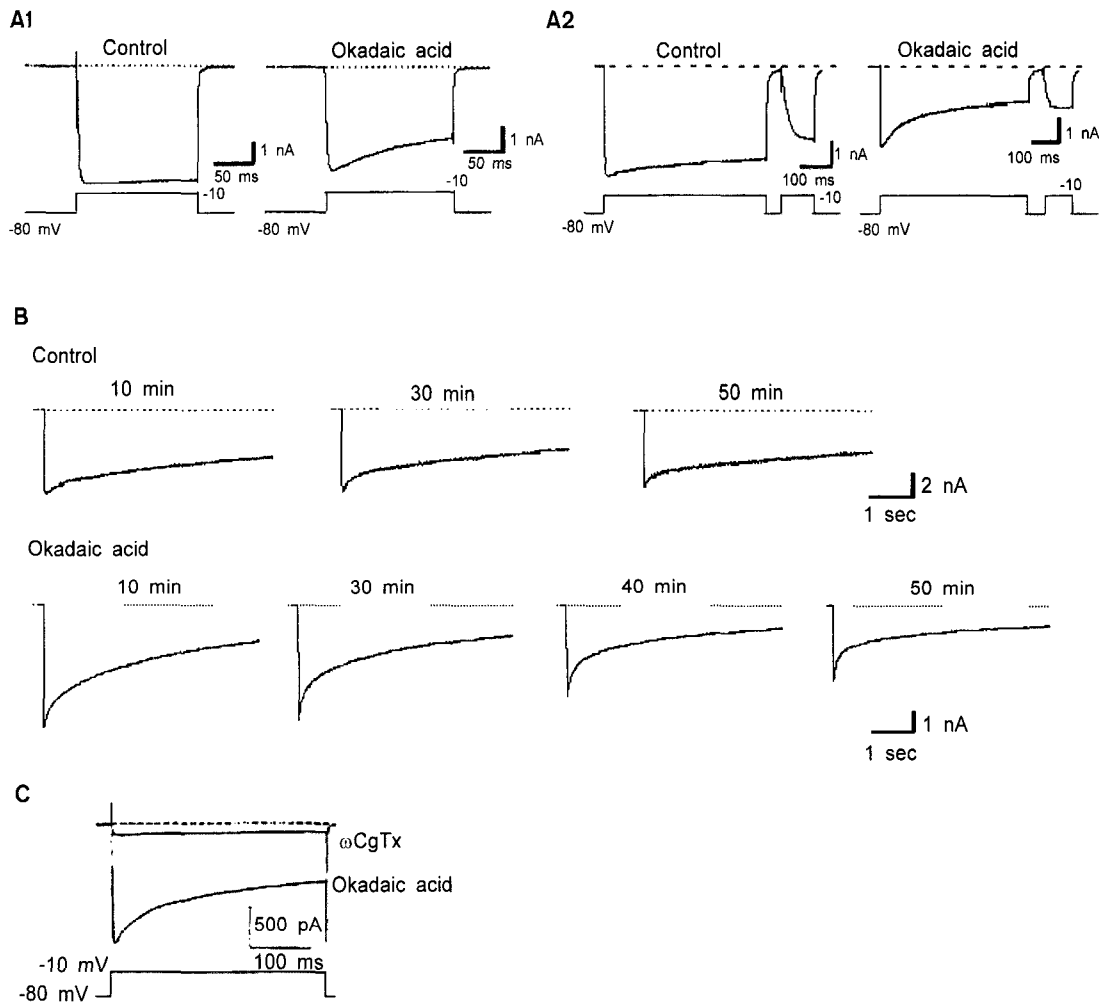


Fig. 1. Okadaic acid increases inactivation of calcium channel current. A1 Currents recorded in response to 150 ms depolarizations after 50 min dialysis in a control cell and a cell dialyzed with intracellular solution containing 1 uM okadaic acid. The depolarizing step was to -10 mV. A2 Currents recorded in response to 500 ms depolarizations in the same two cells. A postpulse following a brief return to -80 mV is given to ensure that the decline of current during the long duration prepulse is indeed due to inactivation and is not complicated by the development of an outward current. B Changes in inactivation with time of dialysis. Currents were recorded at various times in a control cell and a cell dialyzed with 1 uM okadaic acid. Voltage steps were to -10 mV. C Effects of ω cgTx on calcium channel currents in a cell dialyzed with 1 uM okadaic acid. ω cgTx blocks the rapidly inactivating component of the current, and it also blocks most of the remaining current at the end of this 500 ms depolarization.

Table 1. Inactivation kinetics of cells dialyzed with okadaic acid (OA) and OA& staurosporine (stauro).

Condition	Parameter				
	Time constants (ms)		Amplitudes (Fraction of total current)		
	Slow	Fast	Slow	Fast	Offset
Control (n=18)	3672.86 ± 946.56	113.79 ± 26.06	0.57 ± 0.11	0.17 ± 0.1	0.25 ± 0.05
OA (n=20)	2267.55 ± 510.75***	116.29 ± 37.06	0.39 ± 0.1***	0.41 ± 0.14***	0.19 ± 0.06
OA + stauro (n=9)	3114.61 ± 708.77	142.27 ± 81.02	0.54 ± 0.09	0.22 ± 0.09	0.24 ± 0.03

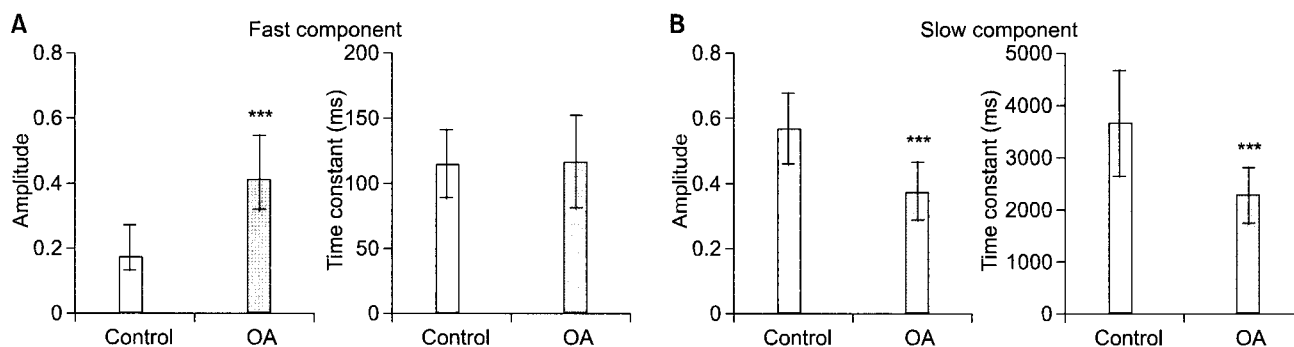


Fig. 2. Slow inactivation speed enhanced in okadaic acid containing cell. Both amplitudes of inactivation were changed by okadaic acid. Inactivation during 5-sec voltage steps was fit with a double exponential function to obtain parameters (τ and amplitude) for fast (A) and slow (B) components of inactivation. Currents obtained from cells containing either control internal or 1 μ M okadaic acid (OA) were compared. Student's t-test was used to test for significant differences (***: $p < 0.001$). The error bars represent standard deviation. Total 18 of cells were tested with control internal and total 20 of cells were tested with okadaic acid containing internal.

화 정도는 대조 세포내 용액을 사용한 세포에 비하여 증가하였다. Okadaic acid는 비활성화 정도를 증가시킬 뿐만 아니라, 비활성화의 속도 또한 빠르게 하였다. 이러한 변화는 저분극자극의 기간을 150 ms, 500 ms, 5 sec로 늘림에 따라 더욱 확실해졌다. Okadaic acid의 효과는 세포내 용액에 들어가 분해(dialysis) 되는 시간이 증가함에 따라 점차 커졌다. 5초의 저분극 자극을 반복적으로 주며 비교해 보았을 때 okadaic acid 효과는 통상 whole cell mode를 만든 후 20~50분에서 최대를 보였다(n=20)(Fig. 1B). Okadaic acid에 의한 칼슘전류의 감소가 외향전류가 커짐으로써 생긴 artifact 효과가 아니라 실제로 칼슘 내향전류를 감소시키는 비활성화에 미치는 영향임을 긴 prepulse 후 잠시 안정막전압으로 돌아왔다가 다시 저분극전압을 걸어주는 이중 펄스를 줌으로써 확인할 수 있었다(Fig. 1A2).

2. Okadaic acid를 처치한 세포에서의 N-전류의 분리 (Fig. 1C) (Isolation of N-current in cells treated with okadaic acid)

Okadaic acid의 효과가 N-channel을 통하여 나타나는 것인지, 다른 빠른 비활성화를 보이는 칼슘통로(T-channel)의 활성을 유도하여 나타나는 것인지를 감별하고자 N형 칼슘통로의 선택적인 억제제인 ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx)을 처치하여 보았다. 1 μ M ω -CgTx에 의하여 okadaic acid를 처치한 세포에서 기록된 칼슘전류의 78 ± 13% (n=6)가 억제되었다. 또한 ω -CgTx은 빠른 비활성화 성분 뿐만 아니라 느린 비활성화 성분도 억제함을 볼 수 있었다.

3. 비활성화 역학에 미치는 okadaic acid의 효과(Table 1, Fig. 2) (Effects of okadaic acid on inactivation kinetics)

5초 동안의 저분극 자극을 인가하면서 peak 전류를 100%

로 간주하고 peak 전류로부터 5초 후에 남아있는 전류(end current) 크기의 분율을 구함으로써 비활성화 정도(1-end current/peak current)를 비교하였다. Okadaic acid가 포함된 세포내용액을 사용한 세포에서는 대조 세포내용액을 사용한 세포에 비하여 비활성화정도가 유의하게 증가하였다($p < 0.001$)(Fig. 1B. control vs okadaic acid). 5초 저분극 자극을 주어 기록한 전류를 이중지수함수로 curve fitting하여 봄으로써 비활성화의 parameter를 추출하였다. okadaic acid는 빠른 비활성화 성분의 분율을 증가시켰을 뿐만 아니라($p < 0.001$), 느린 비활성화의 속도를 빠르게 하였다($p < 0.001$).

4. Protein kinase 억제제를 사용함으로써 okadaic acid 효과 차단(Fig. 3) (Block of okadaic acid effect on inactivation by protein kinase inhibitors)

Okadaic acid는 잘 알려진 phosphatase inhibitor로써 지금까지 기술한 비활성화에 미치는 okadaic acid의 효과는 인산

화과정을 촉진시킴으로써 일어난 것으로 해석된다. 그러므로 인산화과정을 억제하는 약물인 1 uM staurosporine (비특이성 protein kinase 억제제)을 사용하여 비활성화에 미치는 okadaic acid의 효과가 사라지는 지 여부를 확인하였다. staurosporine을 각각 세포외용액 또는 세포내용액에만 첨가할 경우에는 okadaic acid 효과를 억제시키지 못하였고, 세포외용액에 미리 관류(>40 min) 시킬 뿐만 아니라 세포내용액에도 같이 주어야 okadaic acid의 효과가 억제되었다(Fig. 3Ab, Table 1). 5초 저분극 자극 후 비활성화된 분율을 비교시에는 대조군과 차이를 보였으나, 실제 비활성화와 관련된 parameter (Table 1)를 비교시에는 대조군과 차이가 없었다.

비활성화 과정에 관여하는 특정 인산화 기전을 감별하고자 1 uM chelerythrine chloride (specific protein kinase C inhibitor, $IC_{50}=660$ nM), 1 uM lavendustin C (inhibitor of CaM kinase II, $IC_{50}=200$ nM), 1 uM PKA inhibitor 6~22

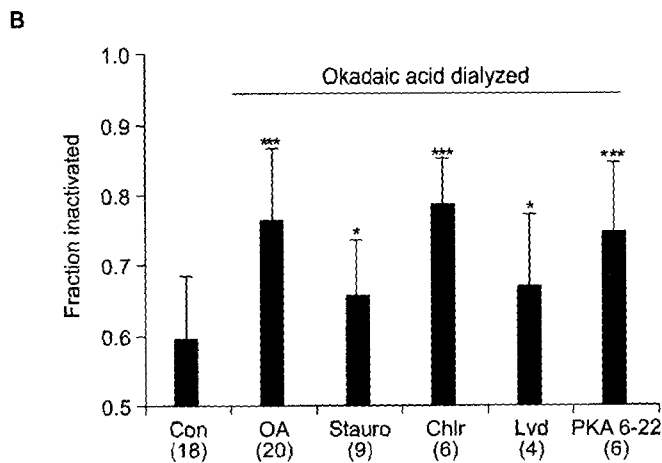
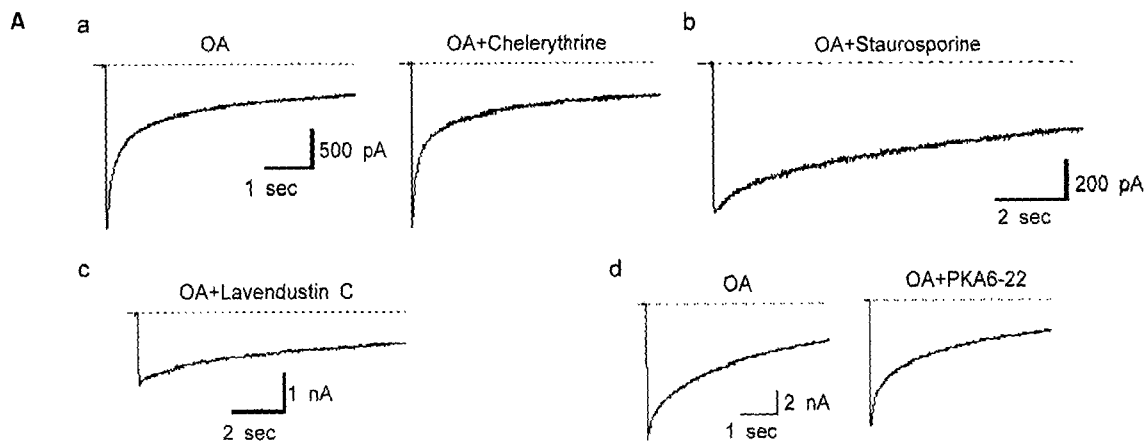


Fig. 3. The role of phosphatase inhibition in the effects on calcium channel current inactivation. (A) calcium channel currents at -10 mV from cells dialyzed for 50 min with 1 uM okadaic acid (OA), 1 uM chelerythrine chloride (Chlr), 1 uM lavendustin C (Lvd), and PKA inhibitor 6~22 amide (PKA 6~22). Protein kinase inhibitors were both treated in internal and external solution. (B) Fraction inactivated measured using 5 sec depolarization pulse. Control cells were dialyzed with 0.1% DMSO (the concentration in okadaic acid dialyzed cells). Inactivation was most significantly different from control and cells treated with OA, OA+Chlr, OA+PKA 6~22 (***: $p < 0.001$). Inactivation was also different from control and OA+Stauro, OA+Lvd (*: $p < 0.05$).

amide (potent and competitive inhibitor of protein kinase A, $K_i=1.7$ nM) 처치한 후 okadaic acid의 효과 억제 여부를 관찰하였다. 이들 약물 중 staurosporine과 비슷한 정도로 okadaic acid의 비활성화 효과를 억제하는 약물은 lavendustin C 뿐이었다.

결론 및 고찰

본 연구를 통하여 내린 N형 칼슘통로 비활성화 기전에 관한 결론은 다음과 같다.

인산화를 억제시키는 효소인 protein phosphatase inhibitor 인 okadaic acid를 세포내용액에 처치한 경우 비활성화는 촉진되었고 이러한 okadaic acid 효과는 protein kinase를 비특이적으로 억제하는 staurosporine에 의하여 억제되었고 calmodulin dependent protein kinase의 억제제인 lavendustin C에 의하여 억제되었으므로 인산화과정이 N형 칼슘통로 비활성화와 관련된 세포 신호전달 체계이며 특히 Calmodulin을 통한 인산화과정이 주로 관여함을 확인하였다.

1. Okadaic acid에 의한 비활성화의 강화

Okadaic acid로 인해 phosphatase가 억제되는 경우에 비활성화가 강화된 현상은 다음과 같이 설명될 수 있다. 1) 안정 상태(basal condition)에서 항상 인산화(phosphorylation)와 탈인산화 (dephosphorylation)는 진행되고 있고, 2) 인산화 과정은 상대적으로 빠른 모드로 진행되는 반면 탈인산화 과정은 상대적으로 느린 모드로 진행된다고 가정한다. 3) 대조 상태에서는 평형이 탈인산화 쪽으로 이루어지는 반면 okadaic acid를 처치한 경우에는 평형이 좀더 인산화 쪽으로 치우침을 시사한다. Okadaic acid의 효과가 나타나기까지 20~50분 정도의 오랜 시간을 기다려야 한다는 사실은 본 연구에서 사용한 세포에서 phosphatase의 활성도가 낮을 가능성을 시사한다.

2. Okadaic acid를 처치한 세포에서의 N-전류의 분리

Okadaic acid 처치한 세포의 칼슘전류 중 $78 \pm 13\%$ ($n=6$)가 ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx)(N형 칼슘통로의 선택적인 억제제)을 처치하였을 때 억제되었다. 이는 본 연구자가 이미 발표한 논문 결과¹⁾($61 \pm 12\%$, $n=6$)와 부합한다. 그러므로 okadaic acid가 비활성화에 미치는 효과는 주로 N형 칼슘통로에 대한 영향임을 확인할 수 있었다.

3. 비활성화 역학에 미치는 okadaic acid의 효과

본 연구에서 대조 세포내용액으로 기록한 전류기록 및 okadaic acid를 포함한 세포내용액으로 기록한 전류기록 모두가 이중지수함수로 잘 설명된다는 사실은 okadaic acid 처치로 인해 전혀 새로운 비활성화가 유도되었다기보다는 기존의 비활성화 과정이 가속화되었음을 의미한다. 그러나 okadaic acid로 인해 대조군에서는 발견할 수 없었던 전혀 새로운 비활성화 과정이 유도되었을 가능성을 완전히 배제하고자 대조 세포내용액으로 기록한 전류기록 및 okadaic acid를 포함한 세포내용액으로 기록한 전류기록 모두를 $\tau_1=15$ ms로 고정된 후 삼중지수함수로 강제적인 피팅(constrained fitting)을 실시해 보았다. 분석 결과 대조군과 okadaic acid 처치군 간에 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었으므로, okadaic acid는 새로운 비활성화 과정을 유도했다기보다는 기존의 비활성화 과정을 촉진시킴을 확인하였다. 이러한 실험결과는 Werz 등¹³⁾이 보고한 okadaic acid가 전혀 새로운 비활성화(rapid inactivation) 과정($t_1=15$ ms)을 유도한다는 보고와는 차이를 보이는 것으로 이러한 차이는 Werz 등이 사용한 2초의 저분극 자극은 15 ms (t_1), 150 ms (t_2)의 시정수로 설명하기에는 적절하나 ~1500 ms (t_3)에 달하는 느린 시정수를 설명하기에는 적절하지 않은 까닭에 생긴 오류라고 판단된다. 본 연구에서 5초 자극을 사용한 경우에는 2개의 시정수만으로(t_1 : ~150 ms, t_2 : ~2500 ms) 비활성화 과정을 충분히 설명할 수 있었다. Okadaic acid에 의하여도 대조군과 마찬가지로 2가지 비활성화 성분 - 빠른 성분, 느린 성분 -이 관찰되었으므로 위에서 기술하였던 (고찰 1항) 인산화과정을 빠른 비활성화 성분, 탈인산화 성분을 느린 비활성화 성분과 연관시켜 생각해도 큰 무리는 없으리라 생각된다. 즉 okadaic acid 처치로 인해 평형이 좀더 인산화과정으로 이동하였고 그 결과 비활성화가 촉진되었다고 가정한다면 본 실험결과가 잘 설명된다. 그러나 본 실험결과만으로는 인산화과정 자체가 곧 비활성화라고 주장할 근거가 미약하므로 이러한 가능성은 추후 인산화되는 위치(site)가 과연 칼슘통로 자체인지 아니면 칼슘통로를 조절하는 위치(regulatory site of channel) 인지에 관한 정보가 수집되어야 검증될 수 있을 것이다.

4. Protein kinase 억제제를 사용함으로써 okadaic acid 효과 차단

Staurosporine을 세포외용액에 미리 관류(>40 min) 시킬 뿐만 아니라 세포내 용액에도 같이 주어야 okadaic acid의

효과가 억제되었다(Fig. 3Ab, Table 1)는 사실은 본 연구에서 사용한 신경절세포에서 protein kinase의 활성이 낮을 가능성을 시사한다. 5초 저분극 자극 후 비활성화된 분율(1-end current/peak current)만을 비교시에는 대조군에 비해 커졌으나, 실제 비활성화와 관련된 parameter (Table 1)를 비교시에는 대조군과 차이가 없었다. 이러한 상반된 결과는 staurosporine의 효과를 관찰하고자 처치 후 최소한 40분 이상 기다려주는 과정에서, leak가 커짐과 동시에 전류크기도 감소되므로 생기는 오류라고 생각된다. 실제로 leak가 그다지 크게 커지지 않은 세포(n=4)만을 골라서 비교하였을 때는 5초 후 비활성된 분율이 대조군과 차이가 없었다.

본 연구를 통하여 여러 가지 인산화 과정 중 calmodulin dependent protein kinase를 통한 인산화과정이 비활성화를 일으키는 데 가장 중요하다고 판단된다. 이는 칼슘채널의 calmodulin binding IQ motif가 L형, P/Q형의 비활성화와 관련된 부위(site)라는 보고와 잘 일치한다.^{6,7)} 그러나 아직까지 N형 칼슘통로에서 'IQ' motif가 칼슘의존성 비활성화를 결정하는지는 확실하지 않다.

Staurosporine, lavendustin C 모두 okadaic acid가 비활성화에 미치는 효과를 완전히 억제하지는 못하였으므로, calmodulin을 직접 억제하는 식의 좀더 상위과정(upstream process)을 변화시켜 봄으로써 비활성화와 인산화의 관계를 좀더 진행해 볼 생각이다.

본 연구자의 선행논문에 의해, 외부의 2가 양이온에 의해 빠른 비활성화가 진행되며, 본 논문에 의하여 인산화 과정에 의해 빠른 비활성화가 촉진된다는 사실이 확인되었다. 그러나 2가 양이온과 인산화 과정이 어떻게 상호 연관되어있는 지, 인산화과정이 곧 비활성화 자체인지에 관한 해답은 본 연구와 같은 순수한 전기생리학적 방법만으로는 얻기 어렵다. 본 연구가 해결해 줄 수 없는 결합부위(binding site)에 관한 확실한 데이터없이 둘 사이의 연결고리를 그려 본다는 것은 무리가 따른다. 그러므로 독립적인 두 기전 - 2가 양이온 의존성 기전과 인산화 기전 - 간의 연결고리에 대한 확실한 해답을 얻기 위해 molecular biology와 전기생리학이 접목된 연구가 추후 절실히 요구되는 바이다. 즉 분자생물학(molecular biology)과 연계하여 이들 2가 양이온이 칼슘통로와 결합하는 부위 및 칼슘통로의 인산화의 정확한 부위(칼슘통로 자체 또는 다른 통로를 조절하는 부위)를 알아낸 후, 이러한 특정부위를 돌연변이 시킨 후 비활성화의 변화가 초래되는 지를 알아보는 실험을 통하여야만 확실한 결론을 내릴 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Goo YS, Elmslie KS: Role of Ca^{2+} for inactivation of N-type calcium current in rat sympathetic neurons. Korean J Med Physics 14(1):54-67 (2003)
2. Fox AP: Voltage-dependent inactivation of a calcium channel. Proc Natl Acad Sci USA 78(2):953-956 (1981)
3. Giannattasio B, Jones SW, Scarpa A: Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line: calcium dependent and voltage dependent inactivation. J Gen Physiol 98: 987-1003 (1991)
4. Gutnick MJ, Lux HD, Swandulla D, Zucker H: Voltage-dependent and calcium-dependent inactivation of calcium channel current in identified snail neurons. J Physiol (London) 412:197-220 (1989)
5. Brehm E, Eckert R, Tillotson D: Calcium-mediated inactivation of calcium current in Paramecium. J Physiol (London) 306:193-203 (1980)
6. Brown AM, Morimoto K, Tsuda Y, Wilson DL: Calcium current-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in *Helix aspera*. J Physiol (London) 320: 193-218 (1981)
7. Kay AR: Inactivation kinetics of Calcium current of acutely dissociated CA1 pyramidal cells of the mature guinea-pig hippocampus. J Physiol (London) 437:27-48 (1991)
8. Yue DT, Backx PH, Imredy JP: Ca-sensitive inactivation in the gating of single Ca^{2+} channels. Science 250:1735-1738 (1991)
9. Jones SW, Marks TN: Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons: II. Inactivation. J Gen Physiol 94:169-182 (1989)
10. Patil PG, Brody DL, Yue DT: Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. Neuron 20:1027-1038 (1998)
11. Schroeder JE, Fischbach PS, Mamo M, McClesley EW: Two components of high threshold Ca^{2+} current inactivate by different mechanisms. Neuron 5:445-452 (1990)
12. Cox DH, Dunlap K: Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. J Gen Physiol 104:311-336 (1994)
13. Werz MA, Elmslie KS, Jones SW: Phosphorylation enhances inactivation of N-type calcium channel current in bullfrog sympathetic neurons. Pflgers Arch 424:538-545 (1993)
14. Yakel JL: Inactivation of the Ba^{2+} current in dissociated *Helix* neurons: voltage dependence and the role of phosphorylation. Pflgers Arch 420:470-478 (1992)
15. Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT: Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels. Neuron 22:549-558 (1999)
16. Levitan IB: It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. Neuron 22:645-648 (1999)
17. Ehlers MD, Augustine GJ: Calmodulin at the channel gate. Nature 399:105-108 (1999)
18. Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter

- H: Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399:159-162 (1999)
19. Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T, Catterall WA: Ca^{2+} /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399:155-159 (1999)
20. Ikeda SR, Schofield GG, Weight FF: Na^+ and Ca^{2+} currents of acutely isolated adult rat nodose ganglion cells. *J Neurophysiol* 55(3):527-539 (1986)
21. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100 (1981)

Phosphorylation as a Signal Transduction Pathway Related with N-channel Inactivation in Rat Sympathetic Neurons

Wonil Lim, and Yong Sook Goo*

Department of Physiology, Gachon Medical School & *Chungbuk National University Medical School

In N-type Ca^{2+} channels, the mechanism of inactivation – decline of inward current during a depolarizing voltage step – is still controversial between voltage-dependent inactivation and Ca^{2+} -dependent inactivation. In the previous paper we demonstrated that fast component of inactivation of N-type calcium channels does not involve classic Ca^{2+} -dependent mechanism and the slowly inactivating component could result from a Ca^{2+} -dependent process. However, there should be signal transduction pathway which enhances inactivation no matter what the inactivation mechanism is. We have investigated the effect of phosphorylation on calcium channels of rat sympathetic neurons. Intracellular dialysis with the phosphatase inhibitors okadaic acid markedly enhanced the inactivation. The rapidly inactivating component is N-type calcium current, which is blocked by ω -conotoxin GVIA. Staurosporine, a nonselective protein kinase inhibitor, prevented the action of okadaic acid, suggesting that protein phosphorylation is involved. More specifically lavendustin C, inhibitor of CaM kinase II, prevented the action of okadaic acid, suggesting that calmodulin dependent pathway is involved in inactivation process. It is not certain to this point whether phosphorylation process is inactivation itself. Molecular biological research regarding binding site should be followed to address the question of how the divalent cation binding site is related to phosphorylation process.

Key Words : N-type Ca^{2+} channels, Inactivation, Voltage-dependent, Ca^{2+} -dependent, Phosphorylation, Binding site