

PC12 세포에서 신경전달물질 방출을 저해하는 생리활성물질 FS11052의 탐색

이윤식¹ · 이준화*

¹원광대학교 의과대학 감염생물학교실, 전북대학교 수의과대학 생체안전성연구소
(게재승인: 2006년 6월 9일)

Screening of active substance FS11052 as an inhibitor of neurotransmitter release from PC12 cells

Yun-Sik Lee¹, John Hwa Lee*

¹Department of Infection Biology, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: June 6, 2006)

Abstract : We established an in vitro experimental system using the following procedure. We first introduced tritium-labeled norepinephrine (³H-NE) into PC12 cells. The ³H-NE incorporated into PC12 cells were then stimulated by a high concentration (60 mM) of K⁺ buffer during 12 minutes. Then, we collected 100 μ l supernatant and counted the amount of ³H-NE release from PC12 cells with a scintillation counter. After screening fungal, *Streptomyces* spp. or bacterial product using this experimental system, we obtained FS11052 from *Streptomyces* spp. which inhibited ³H-NE release from PC12 cells. FS11052 also inhibits the release of ATP as a neurotransmitter of PC12 cells and rat cortical neurons. The inhibitory effect was seen even when the PC12 cells were treated with low K⁺ buffer containing ionomycin (1 μ M) as an ionopore. This result suggests that the inhibitory action of FS11052 on neurotransmitter release appeared after the influx of Ca²⁺.

Key words : exocytosis, inhibitor, neurotransmitter release, PC12 cells, *Streptomyces* spp.

서 론

Pheochromocytoma 12(PC12) 세포는 rat 부신수질 갈색세포종양에서 유래된 세포로서, 신경세포의 기능을 해석하기 위해서 많이 사용되고 있다. Nerve growth factor 등의 성장인자 처리로 카테콜아민류 합성효소가 유도되어, 형태적으로도 긴 신경돌기와 유사한 돌기를 신장시키는 것 등이 좋은 예이다. PC12 세포는 시냅스 등의 신경계 특이적인 분비관련 단백질을 발현하고 있어, 신경전달물질 방출의 제어기구의 해석에도 적합한 모델로 사용되어지고 있다. 이 분화된 PC12세포의 세포막에는 전위의존성 Ca²⁺ 채널이 있어, 탈분극 자극에 따른 Ca²⁺의 세포내 유입에 의해 여러 세포내 인자가 활성화되어

최종적으로 시냅스같이 소포체가 세포질막과 융합하는 것에 의해 신경전달물질이 세포외로 방출(exocytosis)된다. 하지만 PC12 세포와 신경세포의 신경전달물질 방출 기구는 몇 가지 점에서 차이가 있다. 신경세포로부터의 방출이 millisecond 단위의 매우 짧은 반면, PC12 세포의 경우는 분 단위의 order로써 훨씬 느린 반응이다 [5]. 또한 exocytosis에 필요한 세포 내 Ca²⁺의 농도에서도, 신경세포에서는 20 μ M인 것에 반해 PC12 세포는 1 μ M로 고감수성이다. 이 사실들은 PC12 세포가 본래는 내분비계의 세포로서, 신경세포와는 다른 성질을 갖고 있다는 것을 시사한다. 그러나 PC12 세포는 각종의 신경계 특이적인 분비장치를 갖추고 있어 탈분극 자극에 따라 신경전달물질을 방출하는 성질을 가지고 있는 것, 신

*Corresponding author: John Hwa Lee
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: +82-63-270-2553, Fax: +82-63-270-3780, E-mail: johnhlee@chonbuk.ac.kr]

경전달물질의 재흡수 기구를 이용하여 배지에 첨가한 방사표식 신경전달물질을 incorporation시킬수 있는 것과 cell line으로서 균질의 세포집단으로 실험이 가능한 유리한 점 등이 있어 신경전달물질의 방출제어기구의 해석에 널리 이용되어지고있다. 신경전달물질이 방출될 때의 일련 과정중에서 현재 활발히 연구되어지고있는 부분은 Ca^{2+} 의 유입 이후의 세포내 처리과정이다. 이미 Ca^{2+} 센서로서 작용하고 있는 것으로 밝혀진 synaptotagmin [4, 21, 26]과 저분자량 GTP 결합 단백질 rab3A [11, 24, 27]와 이의 조절인자 Rim [25], 신경계 특이적인 v-SNARE, T-SNARE등 다수의 인자가 발견되었다 [18, 20]. 이 신경전달물질의 방출과정에는 Ca^{2+} binding domain을 갖고 Ca^{2+} 센서로서 작용하고 있는 synaptotagmin의 발현량이 외부의 자극으로 탈분극이 유도된 hippocampal neuron이나 PC12 세포에서 발현량이 현저하게 증가되는 보고로부터 이 synaptotagmin의 증가가 exocytosis를 촉진하는 중요한 역할을 하고 있는 것으로 사료 된다 [20, 24, 29]. 현재 신경전달물질 방출 과정에 kinase, phosphatase[9]와 특이적 단백질로서 복합체를 형성하는 syntaxin, synaptogmin, neurexin(α -latrotoxin receptor), Ca^{2+} Channel [15, 16], G단백질 중의 rab family와 fusion pore 단백질 등의 관여가 알려져 있다 [10, 24, 26].

한편 고등동물 등과 같이 유전학적 수법을 이용한 연구가 곤란한 재료를 사용하는 경우, 선택적인 저해제나 신경계 특이적인 tetanus toxin의 이용은 대단히 중요한 접근 방법이다 [12, 22]. 이제까지 수많은 channel blocker, receptor agonist, antagonist가 발견되어, 이들을 이용한 전기생리학적 해석으로부터 시냅스 전달기구에 관한 기초적인 지식이 얻어졌다 [16, 22, 23]. 그러나 보다 상세한 신경전달물질 방출의 분자기구의 해석에 관해서는 유효한 저분자 저해제가 발견되지 않고 있으며, 또한 그런 저해 물질을 적극적으로 천연물질로부터 탐색하는 시도도 없는 것이 사실이다.

본 연구의 목적은 신경전달물질의 방출, 특히 Ca^{2+} 의 세포내 유입 이후의 복잡하고 잘 알려지지 않은 과정을 특이적으로 저해하는 저분자 생리활성물질을 탐색하여, 이의 작용메카니즘을 통하여 신경전달물질의 방출기구를 밝히고자 방사선균으로부터 분자량 413으로 추정되는 신규활성물질 FS11052을 탐색하였다.

재료 및 방법

배지

Dulbecco's 수정 Eagle 배지는 분말 D-MEM(GIBCO, USA)를 증류수에 녹여 3.7g의 탄산수소나트륨 및 항생제로 50 U/ml 페니실린(Meiji, Japan)과 100 μ g/ml 스트

렙토마이신(Meiji, Japan)을 넣어 1 N HCl로 pH 7.3에 조정 한 후, 0.22 μ m pore 멸균필터를 이용하여 멸균했다. 혈청은 소 태아혈청(Fetal Calf Serum; Japan Bio-Test, Japan) 및 말 혈청(Horse Serum; GIBCO, USA)을 사용, 세포계대배양용 배지로서는 5% FCS와 5% HS를 가하여 사용했다. 신경세포 초대배양용 배지로서는 D-MEM 5 μ g/ml 인슐린(Sigma, USA), 5 μ g/ml 트란스페린(Sigma, USA), 1 mM 피루빈산 나트륨(Sigma, USA), 5% HS를 첨가하여 실험에 사용했다.

완충액

Phosphate-Buffered Saline(PBS)은 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g을 1/의 증류수에 녹여 121°C에서 20분간 멸균 하였다. 고농도 또는 저농도 K^+ 완충액은 15 mM의 Hepes(Dojindo, Japan)와 1.2 mM KH_2PO_4 를 증류수에 녹인 후, 고농도의 K^+ 완충액은 85 mM NaCl과 4.7 mM KCl을 각각 첨가해 각각 넣어 2 M의 Tris로 pH 7.3으로 조정하여 121°C에서 20분간 멸균했다. 여기에 멸균한 2.5 mM $CaCl_2$ 및 0.22 μ m pore의 멸균필터로 멸균한 11 mM glucose를 실험에 사용했다.

파파인 희석액으로서는 PBS에 5 mM L-시스테인, 1 mM EDTA, 10 mM Hepes, NaOH, 100 μ g/ml Bovine Serum Albumin을 넣어 0.22 μ m의 멸균필터로 필터 멸균했다.

PC 12 세포배양

PC12 세포배양 PC12의 subtype PC12-B3, PC12-h, PC12-22a 세포는 콜라겐 coat한 플레이트에, D-MEM에 5% FCS와 5% HS를 첨가한 배지로 유지했다. 계대배양은 배지를 suction 후 PBS를 5 ml/ 넣어 2분 후 피펫팅하여 세포를 dish벽으로부터 분리하여 1000 rpm에서 5분간 원심하여 세포를 모은후 PBS를 suction 후, 새로운 배지를 넣어 피펫팅함으로써 세포 pellet을 분산하여 일정량을 새로운 dish에 접종했다. Neuro 2A(mouse 신경아세포종), C6 (rat glioma)은 D-MEM에 5% FCS를 첨가한 배지에 유지했다. 계대배양은 3일에 한 번씩 PBS로 세포를 세정한 후, 5분간 원심하여 세포를 모아 PBS를 suction 후 새로운 배지를 넣어 피펫팅에 의해 세포를 분리하여 일정량을 새로운 dish에 접종하여 배양했다.

본 실험에 사용한 모든 세포는 37°C, 10% CO_2 의 탄산가스 인큐베이터 내에 습기를 공급한 상태에서 배양하였다.

대뇌피질신경세포의 초대배양

임신 18일의 rat을 단두하여, 전신을 70% ethanol로 세정 후 복부로부터 배(embryo)를 자궁과 함께 추출했

다. 배를 자궁으로부터 분리하여, 두피 두개를 해부하여 선단이 완곡한 핀셋으로 뇌를 집어내어, 얼음위에서 4°C를 유지한 완충액속에 넣어 해부현미경하에서 메스로 좌우의 대뇌반구를 잘라냈다. 핀셋으로 수막을 떼어 피질부분을 예리한 핀셋으로 잘라내어 메스로 잘게 잘라서 10 mg/m²의 파파인(Worthington, USA)을 함유한 파파인 희석액 5 ml에 현탁하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 또한 피펫으로 세포를 분산시켜, 40 µg/ml DNase I(Sigma, USA)를 첨가 후 10분간 더 반응시켰다. 5% HS를 포함한 D-MEM을 첨가하여 다시 한번 피펫팅한 후 멸균해둔 lens paper로 여과하여 세포를 분산시킨후 1000 rpm에서 5분간 원심을 2회 반복하여 세포를 세정하였다. 세포수를 센 후, 초대배양용 배지에 현탁하여 24 well plate(Nunc Co., LA Abcoude, Netherlands)에 접종하여 배양했다. 신경세포 초대배양용 배지로서는 D-MEM 5 µg/ml 인슐린(Sigma, USA), 5 µg/ml 트란스페린(Sigma, USA), 1 mM 피루빈산 나트륨(Sigma, USA), 5% HS를 첨가하여 실험에 사용했다. 본 실험에 사용한 모든 초대배양 신경세포는 37°C, 10% CO₂의 탄산가스 인큐베이터 내에 습기를 공급한 상태에서 배양하였다.

Assay buffer

[³H]-노르에피네프린(NE, LEVO-[7-³H]-, specific activity 10~30 Ci/mmol)은 Dupont(USA)사로부터 구입하여 사용했다. Incorporation시에는 저농도 K⁺ 완충액에 산화방지제로서 0.1 mM 아스코르빈산(Sigma, USA) 고정용액을 1% 첨가한 노르에피네프린 assay buffer에 [³H]-NE를 1.5 µCi/ml의 농도로 희석하여 사용했다.

세포배양 플레이트의 코팅

콜라겐 코팅: Becton Dickinson사(USA)로부터 구입한 콜라겐 IV를 0.02 N 초산에 50 µg/ml의 농도로 녹여 15×100 mm의 Nunc사의 dish에 3 ml/dish 첨가하여 실온에서 4시간 처리한 후, 멸균수로 3회, PBS로 1회 세정하여 PC12 세포배양에 사용했다.

폴리에틸렌이민(PEI)코팅: Sigma사로부터 구입한 PEI의 0.2% 수용액을 96 well 타이타 플레이트에 50 µl/well 첨가 후 실온에서 overnight 처리 후, 멸균수로 4회, PBS로 1회 세정하여 실험에 사용했다.

실험계의 설립

PC12 세포의 플레이트에서 배지를 suction 후 노르에피네프린 assay buffer([³H]-NE 1.5m/ Ci/ml)를 7 ml 첨가 후 탄산가스 인큐베이터 내에서 90분간 incorporation 시켰다. 완충액을 제거 후 PBS를 넣어 피펫팅에 의해 세

포를 플레이트 벽으로부터 분리하여, 1000 rpm에서 5분간 원심하여 세포를 모은 후 또 한번 PBS에서 세포를 세정하여, 세포수를 헤마사이토메타로 측정 한 후 5% HS와 5% FCS를 첨가한 새로운 배지에 분산하여, PEI로 코팅한 96 well 타이타 플레이트에 3×10⁵ cell/cm²의 농도로 접종했다. 25분간 배양하여 세포를 플레이트벽에 정착시킨 후, 배지를 제거 후 고농도의 K⁺ 완충액을 100 µl/well 넣었다. 12분간 탄산가스인큐베이터내에서 배양한 후 상등액을 회수하여 0.7~0.9 cm²로 자른 두께 3 mm의 크로마토그래피 종이에 흡수시켜서, 건조후 액체 scintillation 카운타로 방사능을 측정함으로써 [³H]-NE의 방출을 저해하는 물질을 검색하였다.

ATP assay

PEI 코팅한 24 well-plate에 세포를 5×10⁵ cells/well의 농도로 37°C, 10% CO₂의 인큐베이터안에 5시간 배양했다. 그 후 저농도 K⁺ 완충액으로 1회 세정하였다. 샘플은 고농도 K⁺ 완충액에 5%(v/v) 농도로 희석하여 12분간 처리 후, 상등액을 회수하여 바로 측정하거나 또는 동결보존하였다가 해동 후 즉시 측정하였다. 측정은 Luciferu LU kit(Kikkoman, Japan)를 이용하여, kit 내의 25 mM HEPES완충액(pH 7.75)에 20배 희석하여, 이 샘플 200 µl에 발광시약액 100 µl를 첨가하여 잘 혼합한 후, cube을 루미노메타로 발광량을 측정했다.

Antibiotics의 작용

각종의 약제에 대한 검토는 저농도의 K⁺ 완충액중에 15분간 처리한 후, 같은 농도의 약제를 포함하는 고농도의 K⁺ 완충액에 12분간 자극하여 상등액을 회수했다. 그 후 약물에 의한 세포독성을 확인하기 위해 세포가 플레이트에 정착되어 있는가를 현미경으로 관찰, 처리하지 않은 대조군과 비교 확인했다. 모든 약제는 동물세포에 대하여 통상 사용하는 농도를 기준으로 하여 10배의 고농도로부터 순차적으로 희석하여, 넓은 농도범위에서 검토했다.

미생물 대사산물의 탐색

곰팡이, 박테리아, 방선균 등의 균주는 제약회사로부터 분주받아 실험에 사용했다. 미생물균체를 80% 아세톤으로 추출한 샘플은 본 실험계에서는 고농도의 K⁺ 완충액에 5%(v/v)의 농도를 고농도로 하여 3배씩 순차적으로 희석하여 PC12 세포를 이용한 탐색계에 처리했다. 방사선균 2200주의 배양 추출액에 대하여 1차 행하여, [³H]-NE 방출을 저해하는 후보의 샘플을 선택했다. 이들 물질 중에는 Ca²⁺ 채널에 작용하여, 세포 내 Ca²⁺의 유입을 막음으로서 [³H]-NE 방출을 저해하는 물질도 포함되어 있다고 생각되었다. 그래서 2차 검색계로서

ionopore인 ionomycin 존재 하에서의 활성을 조사함으로써, Ca²⁺의 세포 내 유입 이후의 과정을 저해하는 물질의 선택을 행했다. Ca²⁺ inophore인 ionomycin의 존재하에서 [³H]-NE와 신경전달물질의 일종인 ATP의 방출을 저해하는 신규활성물질을 방사선균에서 추출한 생리활성물질을 가지고 screening하였다.

기기분석

HPLC 분석은 waters pump와 UV-detector SSC-5200 (Senshu Scientifics, Japan), column은 Senshu PAK column ODS-H-4251(φ 10×250 mm)와 CAPCELL PAK column C18(φ 2.5×250 mm, shiseido)을 사용했다. ¹H-NMR은 Joel JNM GX-400 FT NMR spectrometer (Japan)로 측정 주파수 400 MHz, 내부기준물질로는 TMS(tetrametylsilane)을 사용하여 측정했다. Mass spectrum 분석에는 JEOL JMS AX-505 mass spectrometer를 사용하여, 측정용marix에 NBA (M-nitro benzylalcohol)을 사용하여, 충돌활성화를 Xe gas에 의해서 측정했다.

통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA 검증)을 수행하였으며, 분산분석의 결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's-HSD test에 의해 분석하였다. 각 parameter간의 상관관계는 SAS package program을 이용하여 correlation coefficient를 구하여 분석하였다.

결 과

PC12 세포의 노르에피네프린 방출

PC12 세포에 [³H]-NE를 incorporation 시킨 후, 저농도 K⁺ 버퍼로 세정 후 고농도 K⁺ 버퍼의 처리에 의한 탈분극 자극을 주어 상등액 중에 방출되는 [³H]-NE를 측정했다(Fig. 1). PC12 세포에는 다수의 subcell line들이 알려져 있다. 그래서 본 실험에서는 PC12의 subcell line인 PC12-h, PC12-22a와 PC12-B3 세포로부터 방출되는 [³H]-NE의 양을 비교했다. 그 결과 PC12-B3에서 고농도의 K⁺이온의 자극에 의해 exocytosis되는 [³H]-NE의 방출량이 triton X-100를 처리한 전체 [³H]-NE의 량을 100%의 control의 26%로 제일 많아서(Fig. 2), 이후 실험에서는 모두 PC12-B3을 실험에 사용했다. [³H]-NE의 방출은 고농도 K⁺ 버퍼의 자극에 의한 탈분극 후 30분에 거의 최고치에 도달했다(Fig. 3). 1%의 Triton -100으로 세포를 용해하여, incorporation된 전량을 측정한 결과 고농도 K⁺ 자극에 의한 방출량은 전량의 약 25% 정도였다(Fig. 4).

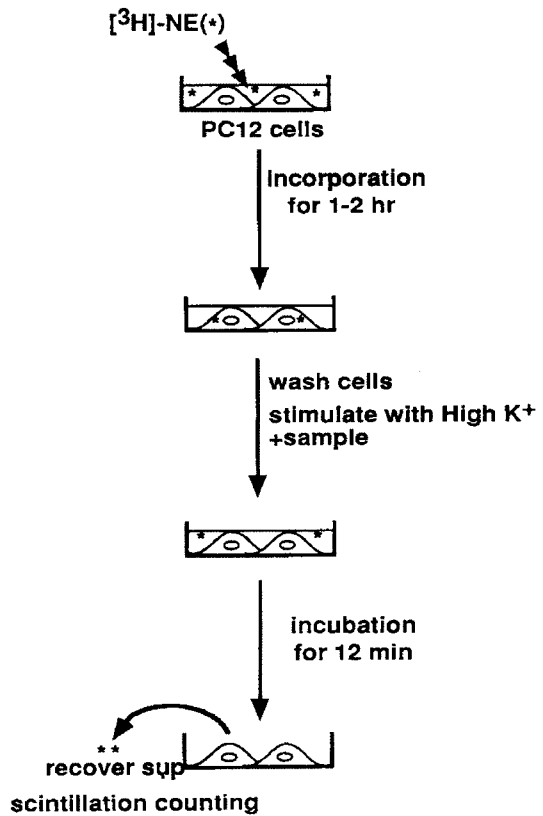


Fig. 1. The schematic procedure for screening of FS11052 in PC12 cell.

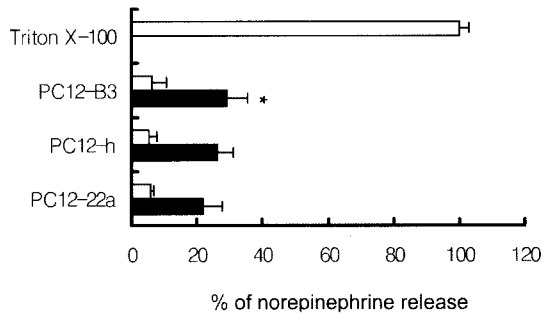


Fig. 2. Comparison of [³H]-NE release in PC12 cells treated with potassium. PC12-B3, PC12-h and PC12-22a cells were pretreated with [³H]-NE for 2 hours. Cells (2 × 10⁴) were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with 1% triton X-100, low concentration (4.7 mM, open bar) or high concentration (60 mM, closed bar) of potassium. [³H]-NE was quantified by scintillation counting as described in Materials and Method. Data means SD value of three independent samples. Asterick (*) indicates results with significant different at the p > 0.05 provability levels as compared to the values obtained from the result of PC12-22a.

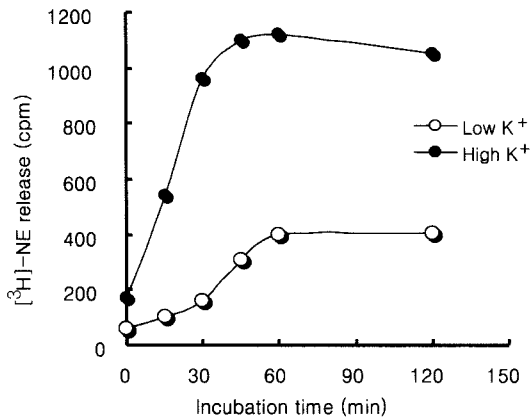


Fig. 3. Time course of release of [3H]-NE in PC12-B3 cells. Release levels were estimated in PC12-B3 cells (2×10⁴) pretreated with [3H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with low (open circle) potassium buffer for the time intervals indicated. After 30 minutes incubation, the release of [3H]-NE reached a plateau by stimulation with high concentration of potassium (closed circle). [3H]-NE was quantified by scintillation counting, and analyzed the average of each three wells. Data represent the mean of two independent experiments.

[3H]-NE 방출은 탈분극자극 후 버퍼 중에 포함된 세포외로부터의 Ca²⁺ 유입에 의존하였다(Fig. 4). 고농도 K⁺ 완충액처리시 Ca²⁺의 chelator인 EGTA를 첨가했을 때는 [3H]-NE 방출은 억제되었다. 이 경우 [3H]-NE의 낮은 level의 수치를 보이는 것은 완전히 incorporation이 되지 않은 [3H]-NE가 세척되지 않은 상태로 세포외에 잔류한 것이라고 생각된다. [3H]-NE의 방출은 탈분극 자극을 주지 않아도 Ca²⁺ ionopore인 ionomycin의 첨가에 의한 전위의존성의 Ca²⁺ 채널이 활성화되어 Ca²⁺의 세포 내 유입 후 exocytosis되는 신경전달물질방출의 일련의 과정을 재현하고 있음을 시사했다.

ATP 방출

PC12 세포는 시냅스와 유사한 소포중에 고농도의 ATP를 신경전달물질로서 축적하고 있어 [3H]-NE와 같이 탈분극자극에 의해 세포외에 방출한다. 그래서 ATP의 방출에 관해서도 실험하였다. ATP 정량에 사용된 루시페라제의 반응계는 세포의 자극에 쓰인 고농도 K⁺ 완충액에 희석하였을 때, 루시페라제의 반응이 현저히 저해되었다. 그래서 이들 이온의 영향을 제거하기 위하여 측정 전에 샘플을 20배로 희석하여 사용하였으며, 그 결과 이들에 의한 효소저해영향을 배제할 수가 있었다(Data 생략). 세포를 자극하여 회수한 상등액 샘플에서 ATP의 방

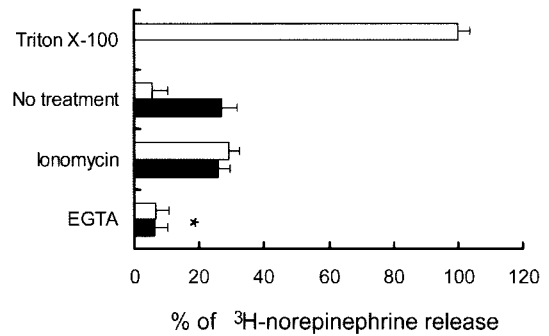


Fig. 4. Effect of calcium ion on the release of [3H]-NE from PC12-B3 cells. Release levels were estimated in PC12-B3 (2×10⁴) cells pretreated with [3H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with 1% triton X-100 or low concentration (4.7 mM) and high concentration (60 mM) of potassium in the absence or presence of ionomycin (10 μM) or EGTA (5 μM). [3H]-NE was quantified by scintillation counting. Data represent the mean of each three wells. Asterick (*) indicates results with significant different at the p > 0.05 provability levels as compared to the values obtained from the results of no treated and ionomycin treated controls.

출량을 측정하였다. 사용된 세포는 모두 5×10⁵ cells/well의 농도로 counting하여 실험에 사용하였다. PC12 세포의 고농도 K⁺ 자극에 의해 exocytosis되는 신경전달물질로서 ATP의 방출량을 비교한 결과, [3H]-NE의 방출과 유사하게 PC12-B3에서 다량의 ATP의 방출을 보였다(Fig. 5). 한편 동일수의 rat의 대뇌피질신경세포에서도 신경전달물질로서 ATP를 고농도의 K⁺ 자극에 의해 방출했다. 그 방출량에 있어서는 PC12-B3과 유사한 양이 방출되었다. 그러나 마우스의 신경아세포종양 유래의 Neuro 2A에서는 실험결과 ATP의 방출은 보이지 않았다(Fig. 5).

Antibiotics의 작용

각종 기존의 약제에 대한 검토는 재료 및 방법에서 언급한 것처럼 저농도 K⁺ 완충액으로 희석한 넓은 농도 범위로 전처리하여 같은 농도의 약제 함유의 고농도의 K⁺ 완충액으로 자극하여 [3H]-NE의 방출량을 측정했다. Exocytosis가 저해되어 있어도 약제의 세포독성에 의해 세포가 well로부터 분리되어 버리거나, 세포막이 손실을 입어 incorporation된 [3H]-NE가 상등액 중에 방출되어 버리면 exocytosis가 정상적으로 일어나고 있는 것으로 오인할 가능성이 있다. 이에 실험 후 플레이트상에 세포가 잘 정착되어 있는가를 현미경하에서 확인하여 세포독성의 영향에 대해서도 검토했다. 검토결과, 본 실험에

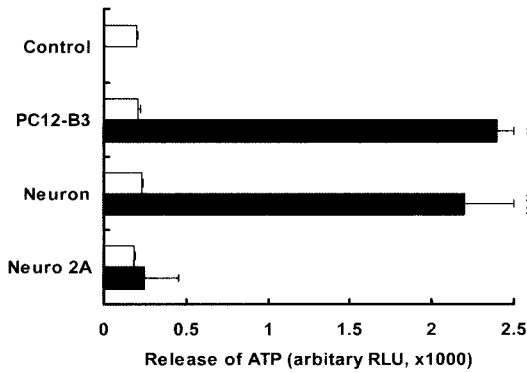


Fig. 5. Comparison of ATP release by stimulation of high concentration of potassium. The effect of the potassium ion on the release of ATP by stimulation of high concentration of potassium in PC12 cells, rat cortical neurons and Neuro 2A. Cells (2×10^4) were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with low concentration (4.7 mM, open bar) or high concentration (60 mM, closed bar) of potassium. Amount of released ATP was estimated by luciferase reaction assay as described in Materials and Methods. Control was treated with a low concentration K⁺ buffer. RUL presents a relative light unit of luciferase. Data represent the mean of each three wells. Astericks (*, **) indicate results with significant different at the $p > 0.05$ provability levels as compared to the values obtained from the result of Neuro 2A, and there was no significance between PC12-B3 and neuron.

서 사용한 처리농도에서 억제치리에 의한 세포의 유리 및 부유는 관찰되지 않았다.

미소관 중합저해제인 nocodazole, vinblastine, phosphatase 저해제인 okadaic acid, calyculin A, kinase 저해제인 staurosporine, wortmannin, 단백질 합성 저해제인 cycloheximide, 단백질의 세포 내 수송저해제인 brefeldin A, concanamycin A, 호흡저해제인 antimycin A, oligomycin 등을 처리한 결과 현저한 저해활성은 보이지 않았다. 그러나 protein kinase C의 활성화 물질인 포볼에스테르(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)는 [³H]-NE의 방출을 약간 촉진했다. 또한 Ca²⁺ 채널의 antagonist인 nifedipine과 RNA 합성 저해제인 actinomycin D를 처리한 경우는 저해작용이 보였다. 한편 1가 양이온 ionopore인 monensin은 강한 저해작용을 보인 것처럼 보이나 이것은 저농도 K⁺ 완충액에서 이미 incorporate된 [³H]-NE의 대부분이 유리되어졌기 때문이다(Da ta 생략).

미생물 대사산물의 탐색

곰팡이 3600주, 방사선균 2200주, 박테리아 500주의 배양 추출액, 1만 1000여 시료를 분탐색계로 1차로 탐

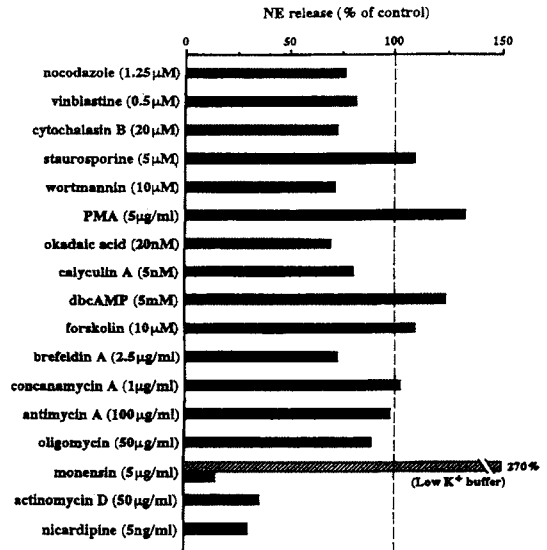


Fig. 6. Effects of various antibiotics on the release of [³H]-NE from PC12-B3 cells. PC12-B3 cells (2×10^4) were pre-treated with [³H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After over night incubation with each antibiotics, the 96-wells cell plate was sampled for scintillation counting and inspected with a microscope at 100 magnification. Data represent the mean of each three wells.

색하여, [³H]-NE 방출을 저해하는 후보의 샘플을 선택했다. 이들 물질 중에는 Ca²⁺ 채널에 작용하여, 세포 내 Ca²⁺의 유입을 막음으로서 [³H]-NE 방출을 저해하는 물질도 포함되어 있다고 생각되었다. 그래서 2차 검색계로서 ionopore인 ionomycin 존재 하에서의 활성을 조사함으로써, Ca²⁺의 세포 내 유입 이후의 과정을 저해하는 물질의 선택을 행했다. 이 결과, ionomycin 존재하에서도 [³H]-NE 방출을 현저히 저해했고 또한, 신경전달물질의 일종인 ATP의 방출도 저해하는 FS11052을 방선균으로부터 screening하였다(Fig. 6).

본 배양의 정제과정은 fermentor에 배양한 30 l의 배양액을 세라이트에 여과하여, 활성물질을 균체로부터 80% 아세톤으로 추출했다. 아세톤을 제거하여 초산에틸에 전용한 후 감압농축하여 활성물질을 포함하는 2.9 g의 물질을 얻었다. 이것을 핵산-메탄올 용매계의 silica gel column chromatography를 이용하여, 핵산-초산에틸(500 ml), 초산에틸용매(500 ml)에 분획된 active fraction을 evaporation한 결과 294 mg을 얻었다. 다음으로, 클로로포름-메타놀 용매계의 2차 silica gel column chromatography를 통해서, 클로로포름-메타놀 50 : 1에 용출된 활성획분(fraction no.34-48, 200 ml)를 감압 농축하여서 92 mg을 얻었다. 이 전량을 100% 메타놀을 용매로 sepha-

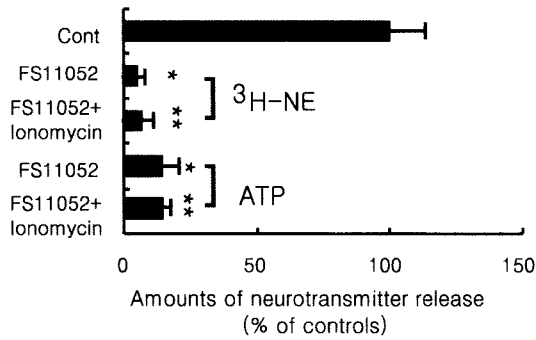


Fig. 7. Effects of FS11052 on the release of [³H]-NE and ATP from PC12-B3 cells. PC12-B3 cells (2×10^4) were pre-treated with [³H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with 5 μ g/ml of FS11052 in low concentration of potassium (4.7 mM) with 1 μ M ionomycin or high concentration (60 mM) of potassium without ionomycin. Amount of released [³H]-NE and ATP by the stimulation of high concentration (60 mM) of potassium were calculated as a 100% of control (0.5% triton X-100 treated), respectively. Released [³H]-NE and ATP were analyzed by scintillation counting and luciferase reaction assay. This graph shows the represent data of two independent experiments. Asterisks (*, **) indicate results with significant different at the $p > 0.05$ provability levels as compared to the values obtained from the result of no treated control, and there was no significance between FS11052 and FS11052 plus ionomycin.

dex LH20 gel chromatography의 활성획분(fraction no.15-18, 20 ml)를 감압 농축하여 얻어진 3 mg을 thin layer chromatography(TLC)로 분리하였다. 이 시료는 요도로 검출하여 클로로포름-메타놀 10:1의 용매계에서 Rf치 0.67를 나타내는 밴드부위에 활성을 가지고 있어 이를 같은 용출액으로 용출하여서 감압건조한 결과, 최종적으로 1.3 mg의 활성물질을 얻었다. 이 물질은 메타놀층에 UV흡수치는 201, 237, 264, 305 nm에서 최대흡수치를 표시했다(Fig. 7A). FS11052를 중탄올층의 ¹H-NMR의 spectrum(Fig. 7B)과 FAB-MS spectrum(Fig. 7C)으로부터 (N+H)⁺: m/z 413(M+Na)⁺: m/z 429가 측정되어서 분자량 402로 추정되는 저분자물질로 방향족환을 다수 포함하는 물질로 분석되었으나 수%의 불순물의 peak가 보여져서 활성물질과 관련 이 약간의 불순물에 대한 재검토가 요구된다.

고찰

PC12 세포를 [³H]-NE를 포함하는 노르에피네프린

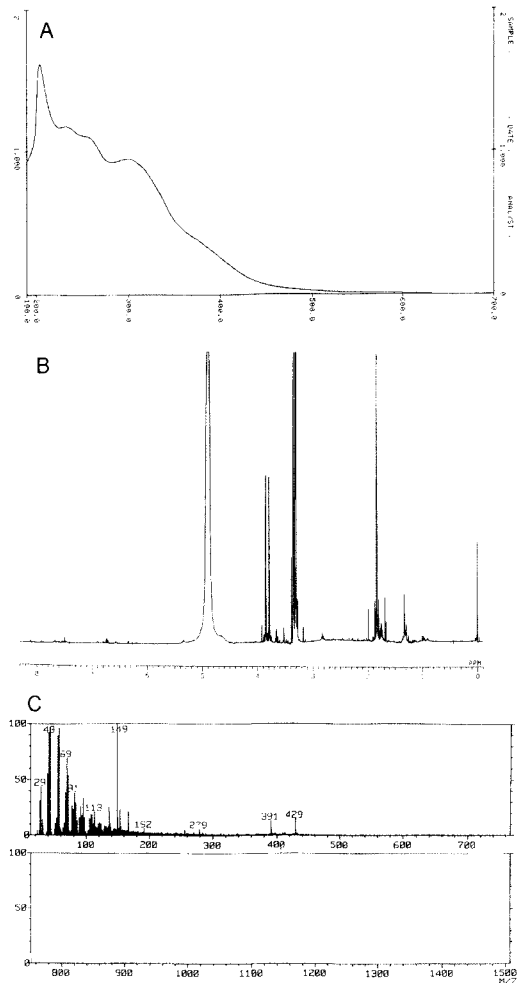


Fig. 8. ¹H-NMR spectrum of FS11052 in CD₃OD. The spectrum was analyzed with the condition described in Materials and Methods. NMR spectrum of FS390 in CD₃OD. The spectrum was analyzed with the condition as described in Materials and Methods. Panels A, B and C show a spectrum of UV, ¹H-NMR and FAB-MS with NBA, KI in CD₃OD (400 MHz), respectively.

assay버퍼에서 90분 동안 incubation한 후, 고농도의 K⁺에 의한 탈분극자극을 주어 상등액중에 방출되는 [³H]-NE의 양을 측정했다. [³H]-NE의 방출은 탈분극 자극 후, 세포외의 Ca²⁺에 의존하고 있는 것과 Ca²⁺ ionopore인 ionomycin에 의해서도 고농도의 K⁺ 자극과 거의 동일하게 일어나고 있는 것으로부터 이 고농도의 K⁺ 자극에 의해 방출되는 [³H]-NE는 exocytosis에 의한 것이라고 판단했다.

본 실험계에 각종의 antibiotics의 작용을 검토한 결과, 미소관중합 저해제, 단백질의 세포내 수송 저해제,

호흡저해제 등에는 현저한 작용이 보이지 않았다. 그러나 protein kinase C의 활성화제로 알려진 PMA는 [³H]-NE의 방출을 약간 촉진했다. 이는 표층의 actin 섬유는 시냅스 소포와 세포질막의 접촉을 막는 barrier로 되어 있는 것이 알려져 있어 PMA에 의한 이 actin 섬유가 탈중합하여 release-ready 소포의 양이 증가하는 것이 보고되어 있다 [23]. PKC의 target로서는 myosin light chain, MARCKS 등이 예상되어 있어, 본 실험에서 보인 촉진 작용도 PMA의 이런 작용에 의한 것이라고 사료 된다.

Actinomycin D의 처리에서 보인 저해작용은 actinomycin D가 RNA 합성저해 작용 외에도 NK2 수용체의 antagonist로서의 작용도 알려져 있지만 [7], 본 실험계가 exocytosis를 재현하고 있으며, 또한 기존의 antibiotics 중에는 actinomycin D 이외에는 이 과정을 특이적으로 저해하는 물질은 없는 것을 기준으로 하여 [³H]-NE 방출을 지표로한 1차 검색한 결과 FS11052을 신경전달물질 방출을 특이적으로 저해하는 후보로서 선택했다. FS11052은 ionomycin 존재하에서도 저해 반응을 보여 Ca²⁺ 유입이후의 세포내 processing을 저해하고 있다고 생각된다. 지금까지 신경전달물질 방출에 관련된 Ca²⁺ sensitive factor로서는 synaptotagmin, rab family, synaptophysin이 알려져 있다 [1, 20, 25, 28]. Synaptotagmin과 rab family은 protein kinase의 Ca²⁺ 결합영역인 C2 domain과 homology가 있는 영역을 각각 2개씩 가지고 있어, 이 부분에서 Ca²⁺이 결합한다고 추정된다 [2, 9, 27]. Synaptotagmin은 Ca²⁺ 채널과 결합하고 있어, 막융합에 관련된 NSF-SNAP-SNARE 복합체의 형성을 저해하는 것으로 막융합과정을 negative하게 제어하고 있다고 생각된다 [17]. 한편 이들 Ca²⁺ sensitive factor 이외에도 신경전달물질의 방출에 필요한 인자로서는 syntaxin, SNAP-25, synaptobrevin 등의 SNAREs가 알려져 있다 [3, 8, 10, 30]. 이들이 필수적으로 역할하고 있음은 botulinum toxin, 파상풍신경독이 이들을 특이적으로 분해하고 있는 것으로부터 알 수 있다 [12, 19]. 한편 α -latrotoxin등의 독소가 신경세포에서 신경전달물질이 spontaneous release 뿐만아니라 자극에 따른 exocytosis에 강력한 촉진반응을 나타내는 결과가 보고 되어 신경세포의 분비장치외에 특이적으로 작용하는 독소와의 상관관계에 대한 해명을 위한 적극적인 연구가 요구 된다 [6, 12, 13, 14]. 이러한 일련의 결과로부터 FS11052이 어떠한 작용으로 [³H]-NE의 방출을 억제하고 있는가는 불분명하지만, Ca²⁺ 유입 이후에 탈분극 되거나 활성화 되어서 exocytosis에 관여하고 있는 rab G-protein, kinase나 phosphatase 또는 세포질막에 있는 분비장치에 관련된, SNARE를 구성하는 단백질을 저해함으로써, 결과적으로 synaptic vesicle의 생합성이나 synaptic transmission

process를 저해하는 저분자 물질로 사료된다.

결론

PC12세포를 이용하여 미생물대사 산물로부터 신경전달물질의 방출에 영향을 미치는 생리활성 물질을 탐색하기 위한 *in vitro*의 실험계를 세웠다. 먼저, tritium-labeled norepinephrine([³H]-NE)을 PC12세포에 incorporation 시킨 후에 60 mM의 고농도의 K⁺의 자극에 의해서 탈분극후에 방출되는 [³H]-NE의 량을 scintillation counting 하여 정량하였다. 이 탐색계를 이용하여, 곰팡이, 방선균과 박테리아의 대사산물 1만 1000여 샘플을 탐색한 결과, PC12세포에서 고농도의 K⁺의 자극에 의해서 탈분극후에 유도되는 [³H]-NE의 방출을 효과적으로 저해하는 FS11052를 방선균 유래의 대사산물로부터 얻었다. FS11052은 또한 PC12세포와 rat cortical neurons에서 동일한 고농도의 K⁺의 자극의 탈분극후에 유도되는 신경전달 질로서 ATP의 방출에도 유의한 저해 효과를 나타냈다. PC12세포에서 저해 효과는 ionopore로 알려진 ionomycin(1 μ M)을 포함하는 저농도의 K⁺의 버퍼를 처리하였을 때에도 보여져, 이들 결과로부터 FS11052의 신경전달 물질의 방출에 대한 저해작용은 세포내 Ca²⁺ 유입 이후의 반응으로 추정하며 이 작용기구에 대한 해석을 하였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI05-03-02) 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Alder J, Xie ZP, Valtorta F, Greenfard P, Poo MM. Antibodies to synaptophysin enter with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 1992, **9**, 759-768.
2. Boomert K, Charlton MP, DeBello WM, Chin GJ, Betz H, Augustine G.J. Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* 1993, **363**, 163-165.
3. Brennwald P, Kearns B, Champion K, Keranen S, Bankaitis V, Novick P. Sec9 is sSNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* 1994, **79**, 245-258.
4. Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic

- vesicle surface. *Science* 1992, **256**, 1021-1025.
5. **Cutler DF, Cramer LP.** Sorting during transport to the surface of PC 12 cells: Divergence of synaptic vesicle and secretory granule proteins. *J Cell Biol* 1990, **110**, 721-730.
 6. **Daikoku S, Hisano S, Kagotani Y.** Neuronal associations in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Comp Neurol* 1992, **325**, 559-571.
 7. **Delay-Goyet P, Lundberg JM.** Actinomycin is a competitive neurokinin receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **180**, 1342-1349.
 8. **Hirling H, Steiner P, Chaperon C, Marsault R, Regazzi R, Catsicas S.** Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur J Neurosci* 2000, **12**, 1913-1923.
 9. **Hunter T.** Protein kinase and phosphatases The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995, **80**, 225-236.
 10. **Kikuchi A, Yamashita T, Kawata M, Yamamoto K, Ikeda K, Tanimoto T, Takai Y.** Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 24,000 from bovine brain membranes. *J Biol Chem* 1988, **263**, 2897-2904.
 11. **Kishida S, Shirataki H, Sasaki T, Kato M, Kaibuchi K, Takai Y.** Rab3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of rabphilin3A, a putative rat3A target protein. *J Biol Chem* 2000, **268**, 22259-22261.
 12. **Li MF, Shi YL.** Toosendanin interferes with pore formation of botulinum toxin type A in PC12 cell membrane. *Acta Pharmacol Sin* 2006, **27**, 66-70.
 13. **Liu J, Mislis S.** Alpha-Latrotoxin alters spontaneous and depolarization-evoked quantal release from rat adrenal chromaffin cells: evidence for multiple modes. *J of Neurosci* 1998, **18**, 6113-6125.
 14. **Moriyama Y, Futai M.** H⁺-ATPase, a Primary pump for accumulation of neurotransmitter, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem Biophys Commun* 1990, **173**, 443-448.
 15. **O'Connor VM, Shamotienko O, Grishin E, Betz H.** On the structure of the 'synaptosecretosome'-Evidence for a neuexin/synaptotagmin/syntaxin/Ca²⁺ channel complex. *FEBS* 1993, **326**, 255-260.
 16. **Petrenko AG, Perin MS, Davletov BA, Ushkaryov YA, Geppert M, Sudhof TC.** Binding of synaptotagmin to the alpha-latrotoxin receptor implicates both in synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 1991, **353**, 65-68.
 17. **Popov SV, Poo M.** Synaptotagmin: a calcium-sensitive inhibitor of exocytosis? *Cell* 1993, **73**, 1247-1249.
 18. **Sakaba T, Stein A, Jahn R, Neher E.** Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. *Science* 2005, **309**, 491-494.
 19. **Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de L, DasGupta BR, Montecucco C.** Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992, **359**, 832-835.
 20. **Shin OH, Rhee JS, Tang J, Sugita S, Rosenmund C, Sudhof TC.** Sr²⁺ binding to the Ca²⁺ binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions. *Neuron* 37, 99-108.
 21. **Shoji-Kasai Y, Yoshida A, Sato K, Hoshino T, Ogura A, Kondo S, Fujimoro Y, Kuwahara R, Kato R, Takahasahi M.** Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells. *Science* 1992, **256**, 1821-1823.
 22. **Tuz K, Pasantes-Morales H.** Hyposmolarity evokes norepinephrine efflux from synaptosomes by a depolarization- and Ca²⁺-dependent exocytotic mechanism. *Eur J Neurosci* 2005, **22**, 1636-1642.
 23. **Vitale ML, Seward EP, Trifao JM.** Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 1995, **14**, 353-363.
 24. **Wang CT, Bai J, Chang PY, Chapman ER, Jackson MB.** Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J Physiol* 2006, **570**, 295-307.
 25. **Wang P, Chicka MC, Bhalla A, Richards DA, Chapman ER.** Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Mol Cell Biol* 2005, **25**, 8693-8702.
 26. **Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC.** Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 1997, **388**, 593-598.
 27. **Yamaguchi T, Shirataki H, Kishida S, Miyazaki M, Nishikawa J, Wada K, Numata S, Kaibuchi K, Takai Y.** Two functionally different domains of rabphilin-3A, rab 3Ap25/smg p25A-binding and phospholipids

- and Ca²⁺-binding domains. *J Biol Chem* 1993, **268**, 27164-27170.
28. **Yelamanchili SV, Reisinger C, Becher A, Sikorra S, Bigalke H, Binz T, Ahnert-Hilger G.** The C-terminal transmembrane region of synaptobrevin binds synaptophysin from adult synaptic vesicles. *Eur J Cell Biol* 2005, **84**, 467-475.
29. **Zhang YQ, Rodesch CK, Broadie K.** Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin-GFP. *Genesis* 2002, **34**, 142-145.
30. **Zhou Q, Xiao J, Liu Y.** Participation of syntaxin 1A in membrane trafficking involving neurite elongation and membrane expansion *J Neurosci Res* 2000, **61**, 321-328.