신경세포 내 칼슘채널의
전압비의존적 조절 메커니즘

연세대학교 대학원

의 학 과

조 성 민

신경세포 내 칼슘채널의
전압비의존적 조절 메커니즘

지도 정 성 우 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 12 월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
조 성 민

조성민의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12 월 일

감사의 글

본 연구를 위한 박사과정의 처음과 끝을 주관하여 주신 우리의 소망이신 하나님께 먼저 감사의 기도를 드립니다. 논문의 주제 선정에서부터 마지막 완성되기까지 물심양면으로 지도, 편달을 아끼지 않으신 정성우 교수님과 세세한 부분까지 지적하여 주시며, 조언해주시고, 심사하는데 시간을 내주신 조용준 교수님, 황 금 교수님, 이지용 교수님, 박규상 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한, 늘 인자한 웃음으로 격려해주신 생리학 교실의 이중우 교수님, 공인덕 교수님, 기술적인 자문을 아끼지 않으신 황학수 선생님 및 생리학 교실 여러분과 언제나 따뜻한 미소로 감싸주시는 박종구 교수님께도 진심어린 감사의 글을 올립니다. 병상에서도 늘 어버이 같은 큰 사랑을 보내 주신 한용표 교수님, 항상 따뜻한 가르침을 주시는 김헌주 교수님, 한결같은 관심을 보여주신 홍순기 교수님, 허 철 교수님, 변진수 교수님, 또한, 바쁜 일정 속에서도 연구에 정진할 수 있도록 배려를 해준 춘천성심병원 신경외과 식구들에게도 감사드립니다.

그리고 언제나 바쁘다고 연락도 못하는 아들을 항상 멀리서 이해해 주시는 아버지와 어머니, 사위로서의 역할을 제대로 못해도 기도로 힘주시는 장인, 장모님께도 깊은 감사를 드립니다. 특히 남편으로서, 아빠로서의 책임을 다하지 못해도 한결같이 응원을 보내준 사랑하는 아내 혜원, 아들 유상이와 유승이에게 고개 숙여 진심어린 고마움을 전하고 싶습니다.

2005년 12월

저자 씀

차 례

표차례 ····· iii

그림차례 ····· iv

국문요약 ····· v

제 **1**장. 서론 ····· **1**

1.1. 전압의존적 칼슘채널의 분류 ····· **1**

1.2. 칼슘채널 $Ca_v\beta$ 서브유닛의 기능 ····· 3

1.3. 단백질 인산화에 의한 Ca_v**1** 아과 칼슘채널의 조절 ····· **5**

1.4. G 단백질에 의한 Ca_v**2** 아과 칼슘채널 조절의 일반적 특성 ····· 6

1.5. 칼슘채널 VD 억제의 세포 및 분자적 메카니즘 ····· **11**

1.6. 칼슘채널의 전압비의존적(VI) 억제 ····· **1**3

1.7. 연구목적 ····· **1**4

제 **2**장. 재료 및 방법 ····· **15**

2.1. 모델 세포주 및 배양 ····· **15**

2.2. 단일 신경세포의 분리 및 유지 ····· **15**

2.3. 외래 유전자의 이종 발현 ····· **1**6

2.3.**1**. 외래 유전자 ····· **1**6

2.3.**2**. COS-7 세포에 외래 유전자의 이종발현 ····· **1**7

2.3.3. 내심신경절 세포에 외래 유전자의 이종발현 ····· **1**7

2.4. 역전사 연쇄중합반응 ····· **1**8

2.5. 실험용액 및 약물 ····· **1**9

2.5.1. 실험용액 ····· **1**9

2.5.2. 약물 ····· **1**9

2.6. 칼슘전류 측정 ····· **20**

2.7. 데이터 분석 및 통계처리····· **21**

제 3장. 결과····· **25**

3.**1**. 쥐 내심신경 세포에서 내재적 M_2 무스카린성 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VD 억제····· **25**

3.**2**. 쥐 내심신경세포에 이종발현된 인간 M_1 무스카린성 수용체 발현에 의한 칼슘채널 억제의 특성····· **2**6

3.3. 쥐 내심신경세포에서 칼슘채널의 VI 억제를 매개하는 G 단백질 아형의 규명····· 33

3.4. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 Gβγ 서브유닛의 역할····· 36

3.**5**. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 Gα 서브유닛의 역할 36

3.6. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 세포내 유리 칼슘의 역할····· **41**

3.7. N-형 칼슘채널과 C. elegans 아세틸콜린 수용체 GAR-3 간의 기능적 연결····· **44**

3.8. GAR-3 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제의 일반적 특성····· 46

3.9. GAR-3 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제에 관여하는 G 단백질의 동정····· **50**

3.**10**. GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 Gα 및 Gβγ 서브유닛의 역할····· **50**

3.**11**. GAR-3 수용체 활성에 으한 칼슘채널 억제모드의 $Ca_v\beta$ 서브유닛 의존성····· **51**

제 **4**장. 고찰····· **5**6

제 **5**장. 결론····· 6**5**

참고문헌····· 67

영문초록····· 86

표 차 례

표 1　전압의존적 칼슘채널의 분류 ····· 4

그 림 차 례

그림 **1** 칼슘채널의 VD 억제의 대표적 생물리학적 특징····· **10**

그림 **2** 성체 쥐에서 내심신경절의 위치····· **22**

그림 3 세포 핵 내 cDNA 미세주입방법····· **23**

그림 4 막전압 고정법에 의한 이온채널 전류 측정 장치의 set-up····· **24**

그림 **5** 내심신경세포에서 신경전달물질에 의한 HVA 칼슘전류 억제의 시간 경과····· **28**

그림 6 내심신경세포에 이종발현된 M_1 뮤스카린성 수용체와 칼슘채널의 기능적 연결····· **29**

그림 7 무스카린성 수용체 아형에 따른 칼슘전류 억제크기 및 prepulse facilitation의 상관관계····· **30**

그림 8 내심신경세포에서 미세주입 피펫 내 cDNA 농도에 따른 인간 M_1 수용체의 발현정도 평가····· **31**

그림 9 M_1 및 M_2 수용체의 활성에 의한 칼슘채널 억제 효능 및 역가 비교····· **32**

그림 **10** 역전사 연쇄중합반응에 의한 내심신경에 발현되는 G 단백질 α 서브유닛의 동정····· **34**

그림 **11** 내심신경세포에서 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제를 매개하는 G 단백질의 약리학적 동정····· **35**

그림 **12** M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에서의 Gβγ의 역할····· **38**

그림 **13** M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에서의 $G\alpha_{q/11}$의 역할····· **39**

그림 **14** M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 $G\alpha_{q/11}$ 완충의 효과 요약····· **40**

그림 **15** 세포내 칼슘 완충이 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 효과····· **42**

그림 **16** 세포내 칼슘 완충이 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 효과의 요약····· 43

그림 **17** 꼬마선충 GAR-3 무스카린성 수용체와 N-형 칼슘채널의 기능적 연결····· **45**

그림 **18** GAR-3 및 M_2 수용체의 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제 효능 및 역가 비교····· 47

그림 **19** GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제의 전압의존성 평가····· 48

그림 **20** GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널 억제에 미치는 GDPβS의 효과····· 49

그림 **21** COS-7 세포에서 GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류 억제를 매개하는 G 단백질의 약리학적 동정····· **53**

그림 **22** GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제에서의 Gα 및 Gβγ의 역할····· **54**

그림 **23** GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제에 미치는 $Ca_v\beta$ 보조 서브유닛의 효과····· **55**

국 문 요 약

신경세포 내 칼슘채널의 전압비의존적 조절 메커니즘

전압의존적 칼슘채널은 세포 내 칼슘의 농도를 조절하는 데에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 세포 내 칼슘의 조절과 이와 관련된 세포기능의 항상성을 이해하기 위해서는 전압의존적 칼슘채널이 조절되는 메커니즘을 세포 및 분자수준에서 규명하는 것이 반드시 필요하다 하겠다. 일반적으로 시냅스전달이 지나치게 항진이 될 경우 방출된 신경전달물질이 시냅스 말단에 존재하는 칼슘채널을 억제함으로써 신경기능을 정상으로 회복시켜주는 일종의 음성되먹임 메커니즘이 작동된다. 이러한 신경전달물질에 의한 칼슘채널의 억제는 전압의존적 억제와 전압비의존적 억제로 나누어진다. 전압의존적 억제의 메커니즘은 N-형 칼슘채널을 대상으로 분자수준에서 많이 규명되었지만 현재까지 칼슘채널의 전압비의존적 억제의 메커니즘은 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 신경 칼슘채널의 전압비의존적 억제 메커니즘의 일부를 분자수준에서 규명하였다. 이를 위해 무스카린성 수용체인 인간 M_1 수용체와 꼬마선충 GAR-3 수용체를 부교감 내심신경 및 COS-7 세포에 각각 이종발현을 시키고 전세포 패치클램프 방법을 사용하여 칼슘전류를 기록하였다.

연구의 결과로 내심신경세포에 이종발현을 시킨 M_1 무스카린성 수용체는 고전압에서 활성화되는 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 카바콜(carbachol)의 농도에 의존적인 억제를 일으켰다. 역전사 연쇄중합반응의 분석결과 내심신경세포는 $G_{q/11}$ 아과의 아형들을 모두 발현함을 확인할 수 있었다. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 억제는 전압비의존적으로 일어났으며, 광견병 독소에 민감한 $G_{q/11}$ 단백질에 의해 매개되었다. 유리 Gβγ를 트랜스듀신과 GRK2-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제 정도는 현저히 감소하였다. 반면에 유리 $G\alpha_{q/11}$ RGS2나 PLCβ-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제 정도는 영향을 받지 않았으나, 억제모드가 전압비의존적 모드에서 전압의존적 모드로 전환되었다. 세포 내 칼슘을 BAPTA로 완충하였을 때는 전압비의존적 억제가 일어나는

속도가 감소하였다.

한편, COS-7 세포에 이종발현을 시킨 GAR-3 수용체는 $\alpha_1B/\beta_3/\alpha_2\delta$로 이루어진 N-형 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 아트로핀에 민감한 억제를 일으켰다. GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 억제는 옥소트레모린(oxo-M)의 농도의존적 및 전압비의존적으로 일어났으며, 억제작용의 역가는 M_1 수용체를 발현하였을 때와 거의 차이가 없었다. GDPβS를 세포 내로 넣어주었을 때, oxo-M에 의한 칼슘채널의 억제가 차단되었다. GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 억제는 콜레라 독소와 백일해 독소의 전 처치에 의해서는 차단되지 않았지만 광견병 독소의 전 처치에 의해서는 차단되었다. 유리 Gβγ를 트랜스듀신과 GRK**2**-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제 정도는 현저히 감소하였다. 뿐만 아니라 유리 $G\alpha_{q/11}$을 PLCβ-ct로 완충하였을 때에도 칼슘채널의 억제정도가 **50**% 정도 감소되었다. 한편, 억제모드가 전압비의존적 모드에서 전압의존적 모드로 전환되는 것을 kinetic slowing으로 확인하였지만 prepulse facilitation은 뚜렷하게 나타나지 않았다. 또한 GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 억제 모드는 칼슘채널 β 보조 서브유닛에 의존적으로 나타났다.

이상의 결과로부터 칼슘채널의 전압비의존적 억제에는 $G_{q/11}$ 단백질의 α 및 βγ 서브유닛이 모두 필요한데 Gβγ가 칼슘채널의 억제에 주된 역할을 하며, $G\alpha_{q/11}$은 전압비의존적 모드를 유지하는 데 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 세포 내 칼슘은 $G\alpha_{q/11}$이 작용하는 속도를 빠르게 해주는 보조인자의 역할을 할 것으로 추측되며, 칼슘채널을 이루고 있는 보조서브유닛, 특히 $Ca_v\beta$의 역할이 중요함을 알 수 있었다.

핵심되는 말 : 전압의존적 칼슘채널, 무스카린성 수용체, M_1 수용체, GAR-3, G 단백질, 내심신경세포, COS-7 세포, $G\alpha_{q/11}$, Gβγ

신경세포 내 칼슘채널의 전압비의존적 조절 메커니즘

<지도 정 성 우 교수>

연세대학교 대학원 의학과

조 성 민

제 1장 서론

세포 내 칼슘(Ca^{2+})은 신경전달물질 방출(neurotransmitter release), 호르몬 분비(hormone secretion), 신경의 흥분성(excitability), 시냅스연접의 가소성(synaptic plasticity), 근육의 수축, 화학주성(chemotaxis), 유전자 발현, 세포의 성장과 분화 및 apoptosis 등의 다양한 과정의 조절에 중요한 역할을 담당한다(Hille, **1**994). 세포 내 칼슘 농도를 조절하는 데에는 여러 가지 다양한 리간드에 의해 활성화되는 채널(ligand-gated channel)과 펌프들의 기능도 필요하지만 무엇보다도 전압의존적 칼슘채널(voltage-dependent Ca^{2+} channel)이 그 중심 역할(key role)을 담당하고 있다(Bootman 등, **2001**). 따라서 세포 내 칼슘의 조절과 이와 관련된 세포기능의 항상성(homeostasis)을 이해하기 위해서는 전압의존적 칼슘채널의 종류 및 특성과 이들이 조절되는 메커니즘을 세포 및 분자수준에서 이해하는 것이 반드시 필요하다 하겠다.

1.1 전압의존적 칼슘채널의 분류

표 **1**에 나타낸바와 같이 전압의존적 칼슘채널을 전기적 특성에 따라 분류하면 강한 탈분극(depolarization) 자극에 의해서만 활성화되는 고전압활성(high

voltage-activated, HVA) 칼슘채널과 낮은 전압에서 활성화되어 안정막 전압 근처에서 칼슘이 세포 내로 유입되도록 하는 저전압활성(low voltage-activated, LVA) 칼슘채널로 나눌 수가 있다(Nowycky 등, **1**985; Fox 등, **1**987). HVA 칼슘채널은 칼슘이 지나가는 통로(pore)를 형성하는 α_1 서브유닛을 중심으로 β, $\alpha_2\delta$, 그리고 γ의 보조 서브유닛들로 이루어져 있다. 전압의존적 칼슘채널의 α_1 서브유닛은 전압의존적인 소디움 채널이나 포타슘 채널처럼 6개의 막횡단 도메인(trans-membrane domain)을 가지고 있으며 각 도메인은 6개의 분절(segment)로 이루어져 있다. 이 중 4번째 분절(S4)은 생리적 pH에서 양성전하를 띠는 아미노산인 알기닌(arginine)과 라이신(lysine)이 배열되어 있어 세포막 전압의 변화를 감지하여 칼슘채널을 개폐하는 데 관여하고 있으며, **5**번째(S**5**)와 6번째(S6) 분절사이의 연결루프(hairpin loop이라 불림)는 칼슘채널의 내벽을 형성함으로써 칼슘이온에 대한 선택성(selectivity)을 부여한다. 현재 α_1 서브유닛의 분자생물학적 클로닝에 의해 HVA 칼슘채널은 Ca_V**1** 아과(subfamily)와 Ca_V**2** 아과로 나눌 수 있다. Ca_V**1** 아과는 dihydropyridine(DHP)에 민감한 L-형 칼슘채널을 코딩하는 **α1**S(Ca_V**1.1**), **α1**C (Ca_V**1.2**), **α1**D(Ca_V**1**.3), 그리고 **α1**F(Ca_V**1**.4)의 네 가지 아형(isoform)으로 이루어져 있다. Ca_V**2** 아과는 주로 신경에 많이 분포되어 있는 데 P/Q-형, N-형, 및 R-형을 각각 코딩하는 **α1**A(Ca_V**2.1**), **α1**B(Ca_V**2.2**), 그리고 **α1**E(Ca_V**2**.3)의 세 가지 아형으로 이루어져 있다. 이중 시내스 전달에서의 역할이 크고 특수한 독소에 민감한 N-형과 P/Q-형 칼슘채널에 관해 집중적으로 연구되고 있다. N-형 채널은 바다 달팽이의 한 종류인 *Conus geographus*로부터 분리된 독소인 ω-conotoxin GVIA (ω–CgTxVIA)에 의해 선택적으로 억제 된다(Aosaki 및 Kasai, **1**989; Plummer 등, **1**989). N-형 채널은 또한 *Conus magnus*에 분리한 ω-conotoxin MVIIC (ω–CgTxMVIIC)에 의해서도 억제되나 이 독소는 P/Q-형 채널도 같이 억제시킨다. 따라서 P/Q-형 채널이 기여하는 신경의 칼슘전류요소를 동정하려면 먼저 ω–CgTxVIA로 N-형 칼슘채널을 먼저 억제시켜야한다. P/Q-형 채널은 또한 독거미 *Agelenopsis aperta*에서 분리한 독소인 ω-AgaIVA에 의해 선택적으로 억제된다 (Mintz 등, **1**99**2**; Sather 등, **1**993). P- 및 Q-형 채널은 같은 유전자(Ca_v**2.1**)의 alternative splicing을 통해 만들어지는 데 신경에서는 ω–CgTxMVIIC와

ω-AgaIVA에 대한 민감도의 차이에 의해 구별될 수 있다. 즉, P-형 채널은 ω-AgaIVA에, Q-형 채널은 ω–CgTxMVIIC에 더 민감하게 억제된다(Zhang 등, 1993; Randall 및 Tsien, 1995). R-형 칼슘채널은 DHP와 이들 독소들(ω–CgTxVIA, ω–CgTxMVIIC 및 ω-AgaIVA)에 억제되지 않는 것으로 확인되는데 일부 R-형 채널이 독거미 *Histerocrates gigas*로부터 분리된 SNX-482에 민감한 것으로 보고되었다(Tottene 등, 2000; Wilson 등, 2000). LVA 칼슘채널은 T-형 칼슘채널로 알려져 있는데 최근에 Ca_V3 아과에 속하는 α1G($Ca_V3.1$), α1H($Ca_V3.2$), 그리고 α1I($Ca_V3.3$)의 세 가지 아형으로 존재함이 밝혀졌다(Cribbs 등, 1998; Perez-Reyes, 1998; Lee 등, 1999a; Williams 등, 1999; McRory 등, 2001). HVA 칼슘채널의 보조 서브유닛으로 현재까지 4개의 β 서브유닛, 4개의 $\alpha_2\delta$ 서브유닛(Qin 등 2005), 그리고 8개의 γ 서브유닛(Tomita 등 , 2003)이 클로닝되었다. 그러나 HVA 칼슘채널과는 달리 LVA 칼슘채널의 선택적 차단제와 보조 서브유닛의 존재는 현재 알려져 있지 않다.

1.2 칼슘채널 $Ca_v\beta$ 서브유닛의 기능

세포내 칼슘채널 β 보조 서브유닛($Ca_v\beta$)은 골격근, 심근, 평활근, 뇌 조직으로부터 각각 클로닝된 β_1(Ruth 등, 1989), β_2(Perez-Reyes 등, 1992), β_3(Castellano 등, 1993b) 및 β_4(Castellano 등, 1993a)의 4개의 아형이 현재 알려져 있다. $Ca_v\beta$의 역할은 HVA α1 서브유닛의 세포막 이동, 키네틱 및 전압의존적 특성 등을 조절하는데 예를 들면, $Ca_v\beta$를 antisense-knockdown시키면 내인성(endogenous) 칼슘전류의 크기가 감소하며 전류의 활성이 느려지게 된다(Berow 등, 1995; Campbell 등, 1995). 실제로 많은 연구결과 네 종류의 $Ca_v\beta$ 모두 칼슘채널 α_1 서브유닛의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다(Dolphin, 2003). 뿐만아니라 모든 $Ca_v\beta$는 splicing variant인 β_{2a}를 제외하고 칼슘채널 활성 및 steady-state 비활성의 전압의존성을 과분극쪽으로 이동시키고(Birnbaumer 등, 1998), 칼슘전류의 비활성 키네틱을 결정하는데 칼슘전류의 비활성속도를 증가시키는 효과는 $\beta_3>\beta_{1b}>\beta_4>\beta_2$ 순서로 나타난다고 알려져 있다(Olcese 등, 1994; Meir 및 Dolphin, 2002).

표1. 전압의존적 칼슘채널의 분류

	Numerical Classification	Ca^{2+} current type	Name of α_1 genes	Distribution	Specific blocker
HVA	$Ca_V1.1$	L	α1S	skeletal muscle	DHPs
	$Ca_V1.2$	L	α1C	heart/smooth muscle	DHPs
	$Ca_V1.3$	L	α1D	neurons/endocrine	DHPs
	$Ca_V1.4$	L	α1F	retina	DHPs
	$Ca_V2.1$	P/Q	α1A	neurons	ω-agatoxin IVA
	$Ca_V2.2$	N	α1B	neurons	ω-conotoxin GVIA
	$Ca_V2.3$	R	α1E	neurons	SNX-482
LVA	$Ca_V3.1$	T	α1G	neurons	no specific blocker
	$Ca_V3.2$	T	α1H	neurons/heart	Ni^{2+}, Zn^{2+}
	$Ca_V3.3$	T	α1I	neurons	no specific blocker

$Ca_v\beta$ 보조 서브유닛은 모든 HVA칼슘채널의 도메인 I과 도메인 II사이의 세포내 linker에 높은 친화성(affinity)을 가지고 결합하는데 그 I-II linker 위의 결합부위를 alpha interaction domain(AID)라 하며 18개의 아미노산으로 이루어져 있다(Pragnell 등, 1994). 칼슘채널 I-II linker와 결합하는 $Ca_v\beta$ 보조 서브유닛의 부위를 BID라고하며 41개의 아미노산으로 이루어져 있는데 이 작은 BID만으로도 칼슘채널의 세포막 발현을 증가시킬 수 있다고 알려졌다(DeWaard 등, 1994; 1996). 칼슘채널 I-II linker외에도 C- 및 N-말단에 $Ca_v\beta$ 보조 서브유닛의 결합부위가 확인되었다(Qin 등, 1997; Walker 등, 1998; 1999; Stephens 등, 2000).

1.3 단백질 인산화에 의한 Ca_v1 아과 칼슘채널의 조절

다양한 호르몬이나 신경전달물질들에 의한 Ca_v1 아과에 속하는 L-형 칼슘채널의 조절은 평활근, 골격근, 심근, 내분비세포, 및 신경에서 알려져 있는데, 이들 조직 들 중 단일 칼슘채널 $\alpha1$ 서브유닛(즉, $\alpha1S$ 또는 $\alpha1C$)만이 발현되는 골격근과 심근에서의 연구가 가장 활발히 이루어져 있다.

골격근에서 흥분-수축 연결(excitation-contraction coupling)을 위해 횡세관(T-tubule)의 dihydropyridine(DHP)에 민감한 L-형 칼슘채널과 근소포체(sarcoplasmic reticulum)의 ryanodine 수용체사이의 물리적 작용이 필요하다. 골격근의 수축력은 고주파(high frequency) 자극이나 에피네프린과 같은 호르몬에 의해 증가하는데 이는 칼슘채널의 전압의존적 gating 및 cAMP에 의존적인 단백질 인산화효소 A(protein kinase A 또는 PKA)의 활성에 의한 인산화에 의한 것으로 보고 되었다(Schmid 등, 1985; Arreola 등, 1987). 골격근에서 PKA는 15-kDa의 크기를 가지는 A kinase-anchoring protein(AKAP-15)에 결합된 형태로 L-형 칼슘채널이 분포되어 있는 횡세관 막에 붙어 있게 되는데, 이 AKAP-15/18이 PKA와 L-형 칼슘채널사이의 물리적 연결고리(adaptor) 역할을 함으로써 골격근 L-형 칼슘채널의 PKA에 의한 조절이 매우 빠르게 일어나게 한다(Gray 등, 1997; 1998).

심근에 베타 아드레날린성 효현제(agonist)를 가하면 수축력, 박동수, 활동전압의 크기가 증가하는데 이는 cAMP 의존적 인산화효소의 활성에 의한 L-형 칼슘전류

의 항진이 일어나기 때문이다(Reuter, 1967; 1974). 전압고정법에 의한 칼슘전류의 분석결과 베타 아드레날린성 항진의 생물리학적 메커니즘은 인산화에 의해 최대 칼슘 콘덕턴스가 증가되고, 평균채널개방시간(mean channel open time) 및 개방확률(open probability)의 증가로 밝혀졌다(Reuter 및 Scholz, 1977; Reuter 등, 1982; Cachelin 등, 1983; see also Bean, 1994). 한편, L-형 칼슘채널의 베타 아드레날린성 항진은 PKA가 Ca_v1.2 α1 서브유닛의 카르복시기 말단에 위치한 단일 serine residue 1928의 인산화로 일어난다는 분자적 메커니즘도 확인되었다(De Jongh 등, 1996). 최근에는 칼슘채널 β 서브유닛의 Ser 478과 Ser 479 두 아미노산 residue가 PKA에 의해 인산화되면 Ca_v1.2 α1 서브유닛의 카르복시기 말단이 잘려진(truncated) spliced 칼슘채널도 β 아드레날린성 효현제에 의해 조절될 수 있다고 하여 심근 칼슘채널의 조절에 있어 β 서브유닛의 중요성이 알려졌다(Bunemann 등, 1999). 심근에서도 골격근에서와 마찬가지로 AKAP 단백질이 PKA에 의한 L-형 칼슘채널의 인산화에 중요한데 AKAP-15/18이 심장에 발현되는 것으로 확인되었다(Fraser 등, 1998).

1.4 G 단백질에 의한 Ca_v2 아과 칼슘채널 조절의 일반적 특성

Ca_V2 아과 칼슘채널들, 즉 α1A(Ca_V2.1), α1B(Ca_V2.2), 그리고 α1E(Ca_V2.3)는 호르몬이나 신경펩티드의 분비를 조절하는 Cav1 채널과는 달리 시냅스에서 빠르게 이루어지는 신경전달물질의 방출을 조절한다. 신경전달물질은 시냅스 전달을 매개할 뿐만 아니라 음성 또는 양성 되먹임(negative or positive feedback)으로 N- 및 P/Q-형 칼슘전류를 조절함으로써 시냅스 전달 및 호르몬 분비를 조절하게 된다. 이러한 칼슘채널의 조절은 주로 다양한 G 단백질(multiple G-protein)에 연결된 신호전달에 의해 조절되는 데 주로 쥐 상경신경절(superior cervical ganglion)에서 N-형 칼슘채널 억제에 대한 연구가 많이 이루어져 있다(Hill 1994, Ikeda 및 Dunlap, 1999; Catterall, 2000; Elmslie, 2003).

G 단백질에 의한 칼슘채널 억제에는 크게 전압의존적(voltage-dependent, VD) 및 전압비의존적(voltage-independent, VI) 억제로 나눌 수 있는 데 현재 세포 및

분자 수준에서 가장 잘 알려진 것은 VD 억제로 이차신호전달 메신저가 필요가 없는 세포막에 국한되어(membrane-delimited) 나타나는 것으로 알려져 있다 (Hille, 1994; Dolphin, 1995; Wickman and Clapham, 1995). 전압의존성은 칼슘전류를 유도하기 위해 사용된 막전압(membrane voltage)(테스트펄스, test pulse 또는 potential이라고도 함)과 그 전압에서 신경전달물질에 의한 칼슘전류의 억제정도의 상관관계에서 나타난다. 일반적으로 -10 mV에서 +10 mV 사이의 테스트펄스에서 최대의 전류억제가 나타나면 그 후의 강한 테스트펄스에서는 감소하는 종모양(bell shape)의 관계를 보여준다. 반면에 VI 억제는 칼슘채널의 억제 정도에 전압의 영향은 크게 나타나지 않는다. 칼슘채널의 VD 억제는 N-형 칼슘채널 억제의 전형으로 norepinephrine, somatostatin, prostaglandin, adenosine, acetylcholine, GABA, opioid, serotonine, glutamate, vasoactive intestinal polypeptide(VIP) 등에 의해 유도될 수 있다.

Bean(1989) 박사가 제안한 이론에 따르면 N-형 칼슘채널은 “willing" 또는 ”reluctant" 모드로 존재할 수 있다. 신경전달물질에 의한 조절이 없을 때는 N-형 채널은 기본적으로 willing 모드로 존재하여 안정막 전압에서 적당한 탈분극이 되어도 열릴 수 있지만 신경전달물질이 가해지면 채널의 일부가 willing 모드에서 reluctant 모드로 전환되어 강한 탈분극 자극이 있어야 열릴 수 있기 때문에 칼슘전류의 억제가 초래된다는 것이다. 따라서 강한 탈분극동안에는 willing 모드와 reluctant 모드에 있는 채널 모두가 열리기 때문에 전류가 최소한으로 억제되는 것이다. 이러한 VD 억제 여부는 N-형 채널의 활성곡선(activation curve)의 전압 범위가 우측으로 이동(shift)이 일어나는 지 확인하면 알 수 있다. N-형 칼슘채널의 VD 억제를 확인할 수 있는 두 가지 대표적인 특징은 “kinetic slowing"과 "prepulse facilitation" 이다(그림 1). 신경전달물질이 가해지기 전에는 칼슘전류가 활성 되는 속도는 단상성(monophasic)으로 매우 빠르게 일어나지만 신경전달물질이 가해진 후에는 이상성(biphasic)으로 느리게 활성이 일어나게 되는 데 이를 kinetic slowing이라한다(Luebke 및 Dunlap, 1994)(그림 1A). 위에서 언급한 것처럼 강한 탈분극 자극에 의해 칼슘채널이 reluctant 모드에서 willing 모드로 전환되는 재 평형(reequilibrium)이 일어나는데 이는 ”double-pulse voltage protocol"에

의해 확인 될 수 있다(Elmslie 등, 1990; Ikeda, 1991). 이 프로토콜은 두개의 동일한 테스트펄스(보통 0～+20 mV 사이)와 이 사이에 강한 탈분극 자극(prepulse, 보통 +80～+120 mV 사이)으로 이루어져 있다(그림 1B). 신경전달물질이 없을 때에는 아래쪽 trace처럼 두 번째 테스트펄스 동안에 전류 크기나 모양의 변화가 거의 나타나지 않지만 신경전달물질이 존재할 때는 펄스 후 전류(postpulse current)의 크기가 크게 증가되며, kinetic slowing이 없어져서 빠른 전류의 활성이 나타난다. 이러한 VD 억제에서 prepulse facilitation의 생리학적 의의는 실제 신경에서 짧게 일어나는 단일 활동전압 시 보다는 연속적인 활동전압의 train이 올 때 신경전달물질에 의한 칼슘채널의 억제가 감소되어 활동전압 빈도의존적인(frequency-dependent) 신경전달물질 방출의 촉진으로 설명될 수 있다(Toth 및 Miller, 1995; Song 및 Surmeier, 1996; Williams 등, 1997; Brody 및 Yue, 2000).

신경전달물질 수용체가 heterotrimeric G 단백질에 의해 N-형 칼슘채널에 연결되어 있는 지 확인하는 일반적 방법은 가수분해가 되지않는 구아닌 뉴클레오타이드 유사체(analog)인 guanosine 5′-O-(2-thiodiphosphate)(GDPβS)를 패치피펫 안에 넣어 세포내로 dialysis 시켜 신경전달물질에 의한 칼슘채널 조절에 미치는 효과를 확인하는 것이다. 이때 GDPβS는 G 단백질에 GTP 결합을 상경적으로 억제함으로써 G-단백질 신호전달경로를 이용하는 신경전달물질의 작용을 감소시키거나 차단하게 된다(Eckstein 등, 1979). 한편, guanosine 5′-O-(2-thiotriphosphate)(GTPγS) 또는 guanylylimidodiphosphate(GppNHp)는 GTP의 가수분해저항(hydrolysis-resistant) 유사체로 신경전달물질의 작용 후 G-단백질을 항구적으로 활성화시켜 비가역적인 VD 억제를 유도할 뿐만 아니라(Lewis 등, 1986) 신경전달물질이나 수용체 효현제가 없는 기초상태에서도 GTP-GDP 교환 속도에 따라 칼슘채널의 VD 억제를 일으키는데 이는 kinetic slowing이나 prepulse facilitation을 관찰하여 알 수 있다. 칼슘채널의 VD 억제에 특정 G 단백질이 관여하는 지 여부는 백일해 독소(pertussis toxin, PTX)를 사용하여 확인할 수 있다. PTX는 G 단백질 $G\alpha_i$(α_{i1}, α_{i2}, 및 α_{i3})와 $G\alpha o$(α_{oA} 및 α_{oB}) 서브유닛의 C-말단 시스틴(cysteine) residue를 ADP-ribosylation 시킴으로써 heterotrimer($G\alpha\beta\gamma$)와 수용체의 기능적 연결을 차단시키는데(Holz 등, 1986), N-형 칼슘채널의 VD 억제를 일으키는 거의 모든 신경

전달물질이 PTX에 민감한 경로를 이용하는 것으로 밝혀졌다(Hille, **1**994). 예외적으로 쥐 상경신경절 세포에서 콜레라 독소에 민감한 Gs 아형이 VIP에 의해 유도되는 VD 억제를 매개한다고 밝혀졌다(Zhu 및 Ikeda, **1**994b).

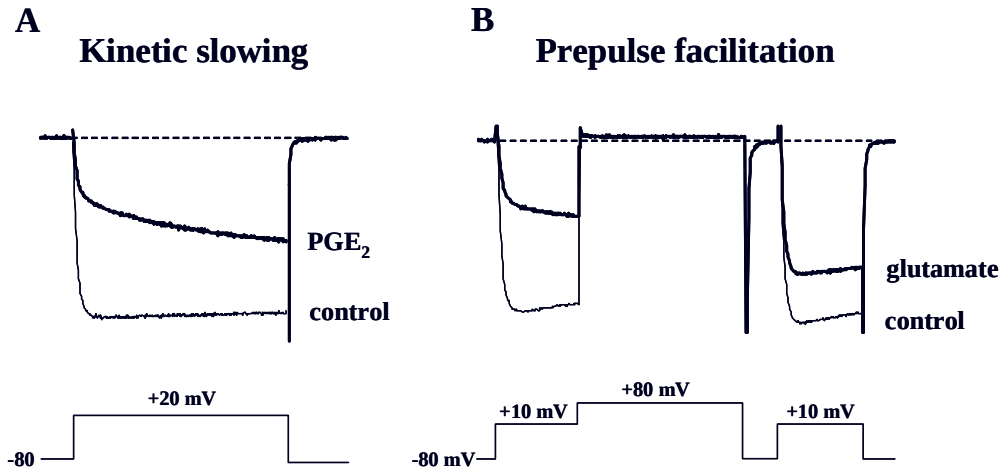

그림 1. 칼슘채널의 VD 억제의 대표적 생물리학적 특징. A. kinetic slowing. 세포를 -80 mV에 고정하고 +20 mV로 단일 시험자극을 주었을 때 나타나는 최대 전류를 기록한 것으로 효현제에 의해 전류가 억제될 때 steady-state 전류의 크기로 활성이 되기까지 속도가 느려짐, B. prepulse facilitation, 최대 전류를 유발하는 두개의 동일(+10 mV) 시험자극들(P1와 P2)사이에 강한 탈분극 자극(+80 mV)으로 이루어진 double pulse 프로토콜로 칼슘전류를 유발하였을 때 효현제에 의해 억제된 전류는 prepulse에 의해 facilitation이 일어남.

1.5 칼슘채널 VD 억제의 세포 및 분자적 메커니즘

초기에는 G 단백질과 수용체사이의 연결 특이성을 G 단백질 α 서브유닛이 결정할 것이라는 보고는 많이 있었지만(Dolphin, 1995; Wickman 및 Clapham, 1995) 칼슘채널의 VD 억제에 Gα 및 Gβγ 서브유닛 중 어느 것이 관여하는 지 명확하지 않았다. 그 후 Ikeda(1996)와 Herlitze 등(1996)이 독립적으로 수행한 실험을 통해 Gβγ가 N-형 및 P/Q-형 칼슘채널의 VD 억제를 매개한다는 것을 각각 밝혀내었다. Ikeda의 실험을 예를 들면 여러 조합의 Gβγ를 상경신경절에 핵내미세주입법(intranuclear microinjection)으로 과발현을 시켰을 때 칼슘채널의 긴장성 억제(tonic inhibition)가 유도되었고 신경전달물질에 의한 추가적인 억제가 폐쇄(occlusion)되었지만 Gα나 Gβ 또는 Gγ 서브유닛의 발현은 칼슘채널에 영향을 주지 않는 것이 관찰되었다. 한편, GDP-bound 형태의 Gα을 과발현시키면 Gβγ를 완충함으로써 칼슘채널의 긴장성 억제나 신경전달물질에 의한 억제를 차단시키는데(Ikeda, 1996) 이때 Gα와 Gβγ사이의 특이성은 없는 것이 확인되어 hetero-trimeric G 단백질의 종류와 관계없이 유리된 Gβγ는 기본적으로 VD 억제를 일으킬 수 있음이 알려졌다(Jeong 및 Ikeda, 1999).

과거에 세포부착(cell-attached) 패치클램프 방법을 이용한 실험에서 N-형 칼슘채널의 VD 억제는 세포막에 국한되어(membrane-delimited) 나타나는 것이 밝혀져 G 단백질과 칼슘채널이 직접적으로 작용할 것으로 추측된 바 있다(Forscher 등, 1986). 최근에 G 단백질 작용속도의 Gβγ 농도 의존성을 조사한 연구에서 Gβγ에 의한 VD 억제는 칼슘채널의 여러 부위에 직접적인 결합에 의해 나타난다고 하였다. 칼슘채널의 Gβγ 결합 motif는 도메인 I과 II사이의 세포내 루프(L_{I-II})(De Ward 등, 1997; Zamponi 등, 1997; Furukawa 등, 1998), C-말단(Qin 등, 1997; Furukawa 등, 1998a; Kinoshita 등, 2001), 그리고 N-말단(Page 등, 1998)으로 알려졌다. 이전의 Gβγ의 직접적인 결합에 의해 조절되는 제 2형 adenylyl cyclase와 phospholipase C β_2(Chen 등, 1995)와 동일하게 칼슘채널 L_{I-II}의 Gβγ 결합 motif도 QXXER로 Cav2.1, Cav2.2, 그리고 Cav2.3에서 공통적으로 존재한다. 흥미롭게도 G 단백질에 의해 직접적으로 조절되지 않는 L-형 칼슘채널의 경우 QXXER 대

신에 QXXEE를 가지고 있어 Gβγ가 결합하지 않는 것으로 밝혀졌다(Bell 등, **2001**). L_{I-II}의 Gβγ 결합 motif는 Ca_vβ의 결합 motif, 즉 AID(α**1**-interaction domain) (QQIERELNGY-WI-KAE)내에 들어 있어 G 단백질에 의한 칼슘채널의 VD 억제에 Ca_vβ의 역할을 시사한다. Gβγ가 칼슘채널 L_{I-II}에 결합하는 것은 확실하지만 G 단백질 조절에 있어 L_{I-II} Gβγ 결합 motif의 역할에 대해서는 논란의 여지가 많이 있다. Zhang 등(**1**996)은 G 단백질 조절이 약한 Ca_v**2.1**(P/Q-형)이나 G 단백질 조절이 없는 Ca_v**1.2**(L-형)의 L_{I-II}를 Ca_v**2.2**(N-형)의 그것과 치환하였을 때 Ca_v**2.2** 칼슘채널 조절에는 영향을 주지 않음을 확인하였다. 이와 일치하여 Ca_v**2.2**의 L_{I-II}을 N-말단이 잘려진 Ca_v**2**.3(RbEII)(Soong 등, **1**993)에 넣었을 때나(Page 등, **1**997), Cav**1**.**2**에 넣었을 때 G 단백질 조절이 나타나지 않았다(Canti 등, **1**999). 뿐만 아니라 칼슘채널의 도메인 I이 G 단백질에 의한 칼슘채널의 조절과정에 중요한 것으로 보고 되었다(Zhang 등, **1**996; Stephens 등, **1**998b). 이상의 결과를 종합하면 칼슘채널의 L_{I-II}이 Gβγ 결합 motif인 것은 확실하지만 Gβγ에 의한 Ca_v**2** 아과의 칼슘채널 조절에는 절대적으로 필요하지 않은 것을 알 수 있다(Dolphin, **200**3).

칼슘채널의 N-말단도 G 단백질 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 초기에 클로닝이 된 쥐 Ca_v**2**.3(RbEII)는 N-말단이 일정부분 잘려져 있는 데 이를 PCR을 이용하여 사람이나 토끼의 Ca_v**2**.3 N-말단 배열을 넣어주면 이전에는 볼 수 없었던 강력한 G 단백질에 의한 조절이 나타난다(Page 등, **1**998). 뿐만 아니라 Ca_v**2.2**의 N-말단을 부분적으로 제거하면 G 단백질 조절이 없어지고(Page 등, **1**998), Ca_v**2.2** N-말단을 넣어준 Ca_v**1.2** 키메라에서는 G 단백질 조절이 나타나는 것이 확인되었다(Canti 등, **1**999). G 단백질 조절에서 중요한 N-말단의 **11**개 아미노산 motif(YKQSIAQRART)는 Ca_v**2** 아과에 속하는 모든 칼슘채널에 존재하며 이 중 YKQ나 RAR을 AAA로 돌연변이를 만들면 G 단백질 조절이 감소되는 것이 확인되었다. 특히, N-말단은 칼슘채널 β 서브유닛과의 작용이 있는 부위로도 알려져 있다(Stephens 등, **2000**).

G 단백질 조절에 있어 칼슘채널 C-말단의 역할은 아직 명확하지 않다. 몇몇 연구에서 Ca_v**2**.3 채널의 C-말단이 Gα 및 Gβγ와 결합하여 G 단백질 조절에 중요하다고 하였다(Qin 등, **1**997; Furukawa 등, **1**998a; Kinoshita 등, **2001**). 그러나

$Ca_v2.2$의 C-말단을 제거하여도 G 단백질 조절에 영향을 주지 않으며(Meza 및 Adams, 1998), somatostatin에 의한 칼슘채널 조절을 감소시키기는 하지만 완전히 억제하지는 못한다는 연구결과(Hamid 등, 1999)로부터 G 단백질 조절에 있어 칼슘채널의 C-말단은 큰 역할을 하지 못하는 것으로 예상 된다(Dolphin, 2003).

1.6 칼슘채널의 전압비의존적(VI) 억제

신경에서 한 개의 신호전달 경로(signal transduction pathway)가 관여하는 칼슘채널의 VD 억제와는 달리 VI 억제는 여러 개의 다른 경로들이 존재하는 것으로 보인다. 이러한 VI 억제는 활성 키네틱(activation kinetics)의 변화없이 전류의 크기가 감소하는 특징을 가지며 강한 탈분극자극에 의한 facilitation이 일어나지 않는 특징을 가지고 있다. 현재, 교감신경세포인 상경신경절 세포에서 억제 속도 및 확산할 수 있는 이차신경전달물질(diffusible second messenger)의 관여 여부에 따라 두 종류의 VI 억제가 구별될 수 있다(Beech 등, 1992). M_1 무스카린성 수용체나 안지오텐신 II 수용체의 활성에 의한 칼슘채널의 억제는 몇 십초에 걸쳐 느리게 일어나며 아직 확인되지 않은 BAPTA에 민감한 이차신호전달물질에 의해 일어난다고 하였다(Delmas 등, 1998a; Bernheim 등, 1992; Shapiro 등, 1994b). 두 번째 종류의 VI 억제는 substance P에 의해 유도되는 데 1 초 내에 아주 빠르게 일어난다고 하였다(Shapiro 및 Hille, 1993). 칼슘채널의 VI 억제의 또 다른 형태는 닭의 감각신경에서 연구되었다(Diverse-Pierluissi 등, 1997). 이 신경세포에서 N-형 칼슘채널의 억제를 일으키는 경로는 적어도 두 가지가 있는 데 첫 번째 경로는 노에피네프린에 의해 일어나는 억제로 단백질 인산화효소 C(protein kinase C)가 관여한다고 알려져 있으며(Diverse-Pierluissi 및 Dunlap, 1993), 두 번째 경로는 Gβγ가 매개하는 것으로 제안되었다(Diverse-Pierluissi 등, 1995; 2000; Lu 등, 2001). 한편 같은 세포에서 GABA에 의한 타이로신 인산화 효소(Tyrosine kinase)의 활성이 VI 억제를 유도한다고 보고되었고 이 경우 Gβγ 대신 Gα가 관여하는 것으로 제안되었다(Diverse-Pierluissi 등, 1997).

1.7 연구목적

앞에서 서술한대로 뇌나 말초신경조직에만 존재하는 N-형 칼슘채널의 조절은 VD 및 VI 신호전달경로에 의해 일어난다고 알려져 있다. 이 두 가지 조절 중 VD 조절은 칼슘채널과 PTX에 민감한 $G_{i/o}$형 G 단백질에서 방출된 Gβγ 사이의 직접적인 결합에 의해 일어난다고 **1**996년 네이쳐(Nature)지 등에 발표되었고 지금은 정설로 받아들여지고 있다. 하지만 특히 포유동물의 신경세포에서 칼슘채널의 VI 조절의 경우 세포 및 분자수준에서 어떠한 메커니즘으로 일어나는 지에 관해서는 아직까지 확립된 이론이 없는 실정이다. 따라서 본 연구의 궁극적인 목적은 칼슘채널의 VI 조절에 관여하는 신호전달인자들이 무엇인지 탐색하고 그 조절의 메커니즘을 세포 및 분자수준에서 이해하는 것이다. 본 연구에서는 전압비의존적인 칼슘채널의 조절은 (**1**) PTX에 민감하지 않으며, (**2**) $G_{q/11}$ 단백질로부터 방출된 Gα와 Gβγ가 모두 칼슘채널에 결합하여, (3) 세포막에 국한되어(membrane-delimited) 나타날 것이며, 그리고 (4) Ca_vβ 아형의 종류에 의존적일 것이라는 가설을 세웠다. 이를 검증하기 위해 쥐의 심장을 지배하는 부교감신경인 내심신경절 세포(Intracardiac neuron)에 인간 M_1 수용체를 이종발현시키거나 COS-7 세포에 *C. elegans*의 무스카린성 수용체인 GAR-3를 Ca_v**2.2**(N-형) 칼슘채널과 함께 이종발현시킨 후 (**1**) $G_{q/11}$형 G 단백질에 연결된 무스카린성 수용체의 활성에 의한 칼슘채널의 조절이 일어날 때 약리적 및 생물리적인 특성들이 무엇인지 세포수준에서 조사하였고, (**2**) 칼슘채널의 전압비의존적 억제에 관여하는 실제 G-단백질의 활성 서브유닛을 확인하였으며, (3) G-protein 활성의 down-stream에 있는 신호전달인자 들 중 세포 내 칼슘의 역할을 규명하였다.

제 2장 재료 및 방법

2.1. 모델 세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 아프리카 녹색 원숭이(African green monkey) 신장에서 기원된 섬유모세포(fibroblast)인 COS-7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. COS-7 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, GiocoBRL, Grand Island, NY, USA), 2.5 g/L sodium bicarbonate, 100,000 unit/L penicillin, 100 mg/L streptomycin이 포함된 배지에서 배양하였다. COS-7 세포 주는 7일을 주기로 계대 배양하였다.

2.2. 단일 신경세포의 분리 및 유지

실험동물로는 250 g 내외의 수컷 쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였으며, 단일 내심 신경세포(intracardiac neuron)의 분리를 위해 Jeong 및 Wurster 방법(1997a)을 사용하였다. Pentobarbital sodium(40 mg/kg ip)으로 마취시킨 후 좌우 심방(atrium)을 함께 적출하여 차가운(4℃) Hank's balanced salt 용액(HBSS, Sigma)이 들어 있는 100 ml 비이커에 옮겨 피를 씻어내었다. 이때 HBSS는 3.6 g/L glucose와 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(Hepes)를 첨가하여 만들었다. HBSS가 들어있는 Sylgard 184 silicone elastomer(World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)로 바닥이 코팅되어 있는 100 mm 플라스틱 배양접시에 좌우심방이 바닥 쪽(ventral)으로 위치하도록 핀으로 고정하였다. 해부현미경(40X) 아래에서 기관(trachea) 및 좌우 폐동맥을 차례로 제거하여 지방(fat)에 둘러싸여 있는 내심신경절(intracardiac ganglion; ICG) 클러스터 I-IV를 노출시켰다. 그림 2에서 보는 바와 같이 ICG 클러스터들은 넓은 범위에 퍼져 있는데 이중 클러스터 I은 가장 크기가 크며 심방간 중격(interatrial septum)과 우심방사이에 위치하여 있으며, 클러스터 II는 좌심방의 문측(rostral)에 위치하며 좌폐동맥 및 대동

맥에 의해 가려져 있다. 클러스터 III과 IV는 폐정맥의 근위(proximal)쪽 주위에 위치해 있다. 분리된 내심신경절을 예리한 가위로 작은 조각들로 자르고, 이를 **1.2** mg/ml collagenase(type D)(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), **0**.4 mg/ml trypsin(Sigma, St. Louis, MO, USA)과 **0.1** mg/ml의 DNAse type I (Sigma)이 들어있는 6 ml의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4, Sigma)이 들어 있는 **25** cm^2 배양플라스크로 옮기고 3**5** ℃에서 **50**분 동안 빠른 속도(**100** strokes/min)로 흔들면서 배양하였다. 배양직전 배양플라스크 내로 9**5**% O_2-**5**%CO_2를 약 **2**분간 공급하였다. 이때, EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 **10** mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 배양플라스크를 **10** 초 정도 세게 흔들어 단일 신경세포들로 분리한 후 **1**% glutamin, **1**% penicilin- streptomycin, 그리고 **10**% FBS이 포함되어 있는 minimal essential media(MEM)(GiocoBRL)를 8 ml 정도 넣어 trypsin을 비활성화 시켰다. 임상용 원심분리기(Hanil, Korea)를 이용하여 **1,200** rpm의 속도로 **5**분간 원심분리해서 세포를 두 번 씻어내고 분리된 단일 신경세포들을 MEM에 재부유(resuspend)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 3**5** ㎜ 폴리스티렌 배양접시(Corning, NY, USA)에 plating 하였다. 이를 37℃ 세포 배양기(humidified CO_2 incubator; 9**5**% air-**5**% CO_2)에서 사용 때까지 배양하였다.

2.3. 외래 유전자의 이종 발현

2.3.1. 외래 유전자

본 연구에 사용된 무스카린성 수용체, G 단백질 신호와 이와 관련된 단백질들을 코딩하는 cDNA는 포유동물 세포에서 발현될 수 있도록 cytomegalo-virus (CMV) 프로모터가 들어 있는 일정 벡터에 서브클로닝되어 있는 상태로 사용하였다. 무스카린성 아세틸콜린 수용체인 M_1(hM_1R) 및 GAR-3b, N-형 칼슘채널을 코딩하는 α_{1B}와 $\alpha_2\delta$, β_{2a}, β_3 보조 서브유닛, 그리고 MAS-GRK**2**-ct는 pcDNA3.**1**에, 해면 녹색형광단백질(GFP)은 pEGFP-N**1** (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA)에, transducin($G\alpha_{tr}$)과 RGS**2**는 pCI에, PLCβ**1**-ct는 pEGFP-C**1**에 서브클로닝되었다. 본 연구에서 사용한 GAR-3b는 조남정 박사(충북대학교 생명과학과)가, 칼

슘채널 보조서브유닛 β_{2a}와 β_3가 들어있는 벡터들은 Edward Perez-Reyes 박사(Department of Pharmacology, University of Virginia, USA)가, 그 외의 모든 벡터들은 Stephan R. Ikeda 박사(Laboratory of Molecular Physiology, NIH/NIAAA, USA)가 제공하였다.

2.3.2. COS-7 세포에 외래 유전자의 이종발현

본 연구에서는 COS-7 세포에 N-형 칼슘채널 아형과 무스카린성 아세틸콜린 수용체 등을 발현하기 위해 칼슘포스페이트($CaPO_4$) 트란스펙션 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. $CaPO_4$를 이용하여 원하는 cDNA 벡터들을 트란스펙션시키기 **24**시간 전에 **35** mm 배양접시(Corning)에 총 **2x10^5** 세포를 플레이팅하여 배양하였다. transfection 3~4 시간 전에 새로운 배지로 교환하였다. 이종발현을 위한 cDNA 농도는 α1B와 보조 서브유닛 $\alpha_2\delta$, β 서브유닛, MASGRK**2**-ct, Gαtr, PLCβ**1**-ct은 각각 **2** μg, GFP **0**.6 μg, 그리고 GAR-3b와 hM_1R는 각각 **1** μg으로 사용하였다.

한 개의 에펜돌프 튜브에 **7**.5 $\mu\ell$ **2** M $CaCl_2$와 원하는 cDNA 조합을 만든 후 총 **60** $\mu\ell$ 부피로 맞춘 후 부드럽게 교반하였다. **60** $\mu\ell$ **2**X Hank's buffered saline (HBS)이 들어있는 다른 튜브에 **1**~**2**분 간 천천히 cDNA를 떨어뜨리면서 bubbling을 이용하여 교반하였다. cDNA 침전물이 형성되면 실온에서 **30**분 간 방치하고, 세포가 플레이팅되어 있는 **35** mm 배양접시에 천천히 떨어뜨렸다. cDNA 침전물이 잘 혼합되도록 부드럽게 배양접시를 흔들어 준 뒤 CO_2 배양기에서 **24**시간 동안 배양한 후, 새로운 배지로 교환하여 주었다. 칼슘전류를 측정하기 6~**12**시간 전에 트립신을 이용하여 세포를 배양접시로부터 떼어낸 후 단일 세포로 **35** mm 배양접시에 다시 플레이팅 하였다. 보통 트란스펙션 후 **2**~3일이 지나 발현이 최대로 될 때에 칼슘전류를 측정하였다.

2.3.3. 내심신경절 세포에 외래 유전자의 이종발현

내심신경절 세포에 인간 M_1 수용체 및 G 단백질 관련 유전자를 발현시키기 위해 세포 핵 내 미세주입방법(intranuclear microinjection)이 사용되었다(Ikeda,

1996; Jeong 및 Ikeda, 1999)(그림 4). 원하는 이온채널이나 수용체를 코딩하는 cDNA(1 ㎍/㎕ stock)와 세포 내 발현 표식자로 EGFP-N1(0.05 ㎍/㎕ stock)를 각각 1 ㎕씩 넣고, TE 완충액(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 8 ㎕를 잘 혼합한 후 GELoader(Eppendorf, Madison, WI, USA)를 이용하여 한쪽 끝이 막힌 모세관에 옮겼다. 모세관을 에펜돌프 튜브로 옮긴 후 원심분리기 5415R(Eppendorf)을 이용하여 상온에서 30 분간 10,000 rpm으로 원심분리하여 이물질을 침전시키고 순도 높은 cDNA 혼합물을 얻었다. 미세주입 피펫은 얇은 벽을 가진 유리튜빙(외경: 1.2 mm, w/filament, WPI)을 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)를 사용하여 만들었다. cDNA 혼합물을 GELoader를 이용하여 미세주입관(microinjection tube)에 주입하고, Eppendorf 5246 microinjector(Eppendorf)에 연결된 홀더에 삽입하였다. 위상차 도립현미경(TE 2000, Nikon)하에서 Eppendorf 5171 micromanipulator(Eppendorf)를 이용하여 세포의 핵 중앙에 관 끝이 위치하도록 한 다음 주입하였고, 주입되는 cDNA의 양은 압력(100~200 hPa)과 주입시간(0.2～0.4 초)에 의해 조절되었다. 특정 단백질을 성공적으로 발현하는 세포는 cDNA 주입 후 14-24 시간에 형광 유닛(B-2A filter cube, Nikon)이 장착된 도립현미경(Nikon)하에서 GFP가 내는 녹색형광을 관찰하여 알 수 있었다.

2.4. 역전사 연쇄중합반응

내심신경절로부터의 전체 RNA는 Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 방법을 이용하여 분리하였다(Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 내심신경절을 분리한 후 즉시 Trizol reagent 1 mL로 lysis 시킨 후 chloroform 200 ㎕ 잘 섞은 후 4℃에서 10,000×g로 15분 원심 분리하고 상층액만 조심스럽게 취하여 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70℃에서 2시간 이상 RNA를 침전시켰다. 다시 4℃에서 10,000×g로 15분간 원심 분리하여 RNA 펠렛을 얻었으며, 이를 다시 75% 에탄올로 씻어낸 후 4℃에서 10,000×g로 5분간 원심 분리하여 RNA 샘플을 얻었으며 상온에서 잘 건조시킨 후 spectrophotometer을 사용하여 정량하였다. 정량한 RNA 1 ㎍, 1 mM dNTP, 50 mM oligod(T), 20 U RNase inhibitor와 50 U murine

leukemia virus reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)와 함께 37℃에서 60분 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이어 PCR은 여러 G-protein의 아형들에 대한 primer을 이용하여 이루어 졌으며 이들의 염기서열은 다음과 같다. G_i: 5′-GCAACACCATCCAGTCTATCA, 3′-ACCACCCACATCAAACATCTT, G_q: 5′-CGAGAGGTTGATGTGGAGAAG, 3′-GTGGGAGTAGATTTTGTC, G_{11}: 5′-TGGCGAGAGCGGGAAGAG, 3′-AGGGGTAGGTGATGATTGTC, G_{14}: 5′-GTATCGCCATGCCCTCTTTC, 3′-AGGATTCTGGTCTTGATACAG, G_{15}: 5-CAGCACGCCAGCCTAGTGATG, 3′-AGCCTTTCCTGCCACCGTCCTG (Thomas, 1991). PCR 반응액(25 ㎕)에는 합성된 cDNA(1 ㎕), 각각의 primer(10 pmoles; 1 ㎕), 2.5mM dNTP(1.6 ㎕), Taq polmerase(Promega Co, Madison, WI, USA; 0.2㎕), 10× PCR buffer(2.4 ㎕), 멸균 증류수(17.8 ㎕)등이 포함되게 하여 94℃ 45초, 57℃ 60초, 72℃ 90초로 35 cycle 동안 반응시켰다. 연쇄중합반응의 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

2.5. 실험용액 및 약물

2.5.1. 실험 용액

칼슘전류 측정을 위해 사용된 전극 내 용액의 조성(mM)은 120 N-methyl-D-glucamine(NMG) methanesulfonate(MS), 20 tetraethylammonium(TEA)-MS, 20 HCl, 11 EGTA, 10 HEPES, 1 $CaCl_2$, 4 MgATP, 0.3 Na_2GTP, 14 tris-phosphocreatine(pH 7.2, 290 mOsm)으로 이루어졌다. 세포외 관류액의 조성(mM)은 155 tris[hydroxymethyl]aminomethane, 20 HEPES, 10 glucose, 10 $CaCl_2$, 0.0003 tetrodotoxin(TTX)(pH 7.4, 320 mOsm)으로 하였다. COS-7 세포 내 G 단백질을 억제하는 실험에서는 전극 내 용액에 2 mM guanosine 5′-[β-thio] diphosphate trilithium salt(GDP-βS)를 포함시켜 사용하였다.

2.5.2. 약물

Oxotremorine M(oxo-M), norepinephrine(NE), EGTA, BAPTA, 그리고 GDP-βS

는 Sigma로부터 구입하였다. 백일해 독소(Pertussis toxin, PTX)과 광견병독소(pasteurella multocida toxin, PMT)은 List Biological Laboratory(Campbell, CA, USA)로부터, Tetrodotoxin(TTX)는 Tocris(Avonmouth, Bristol, U.K.)로부터 구입하였다. 약물은 7-array-polyethylene tube와 연결된 가스크로마토그라피용 모세관 끝을 신경세포의 **100** ㎛ 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.6. 칼슘전류의 측정

전압의존적 칼슘전류는 전형적인 전세포패치클램프(whole-cell patch-clamp) 방법으로 기록하였다(Hamil 등, **1**981; Jeong 및 Ikeda, **1**998). 전극은 Corning **7**052 borosilicate glass capillary(외경-**1**.6**5** mm; 내경-**1**.**2** mm, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)로부터 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co.)를 사용하여 만들었다. 만들어진 전극은 Sylgard **1**84로 코팅을 하고 microforge로 열처리하여 다듬었고, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 **2**~3 ㏁이 되는 것을 사용하였다. 세포가 들어 있는 배양접시를 도립현미경(Nikon)위에 올려놓고, 세포외액을 중력에 의해 약 **1**～**2** ml/min 속도로 관류되도록 하였다. 세포막의 전기용량(membrane capacitance)과 직렬 저항(series resistance)은 patch-clamp amplifier(Axopatch **1**D, Axon Instruments, Foster city, CA, USA)에 내장된 기능으로 **8**0% 이상 보정하였다. 전압자극 프로토콜 생성 및 칼슘전류의 기록은 ITC-**1**8 아날로그/디지털 전환기(Instrutech, Port Washington, NY, USA)가 연결된 맥킨토시 컴퓨터에 장착되어 있는 S**5**(Stephen R. Ikeda 박사제작) 프로그램을 이용하였다. 칼슘전류는 **2**～**5** kHz로 고대역 필터링(-3 dB: four-pole Bessel) 한 뒤, 컴퓨터의 하드디스크에 저장하였고, IGOR PRO(Wave-Metrics, Lake Oswego, OR, USA)로 분석하였다. 모든 실험은 실온(**20**～**22**℃)에서 시행하였다. 본 실험에 사용된 전류측정 장치는 그림 **5**에 도식적으로 나타내었다.

2.7. 데이터 분석 및 통계처리

모든 데이터 분석과 그래프 구성을 위해 IGOR 프로그램을 사용하였다. 전류의 크기는 시험펄스 (test pulse) 시작 후 **10** ms에서 측정하였다. 세포막 전기용량 (C_m)은 **20** ms, **10** mV 과분극 자극을 가한 뒤 얻은 용량전류(capacitative current)의 면적을 측정하는 IGOR 매크로를 사용하여 구하였다. 모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였고 통계적인 의의는 Student t-검정(unpaired)이나 필요한 경우 one-way ANOVA와 post-hoc Dunnett-검정으로 확인하였다. $p<0.05$ 인 경우 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

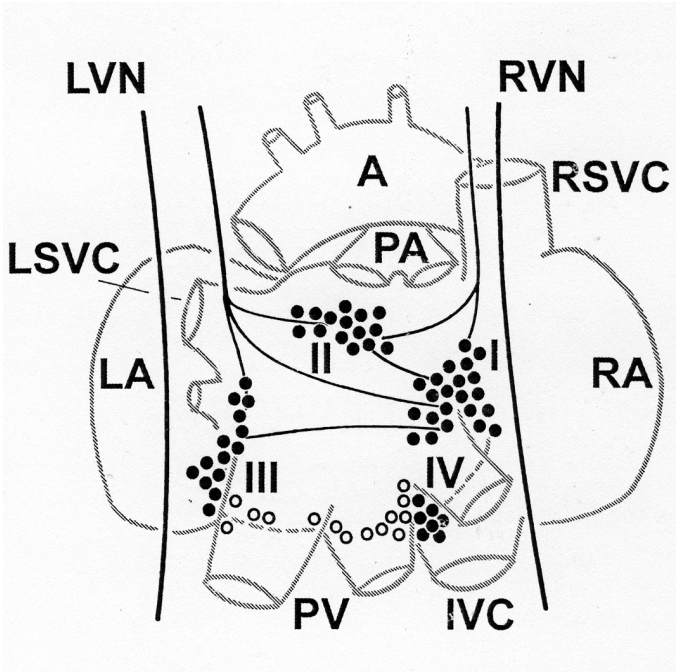

그림 2. 성체 쥐에서 내심신경절의 위치. 네 개의 내심신경절 클러스터(I-IV)가 좌우 심방의 배측(dorsal aspect)에서 확인되었다. A, aorta; IVC, inferior vena cava; L(R) A, left(right) atrium; L(R) SVC, left(right) superior vena cava; L(R) VN, left(right) vagus nerve; PA, pulmonary artery; PV, pulmonary vein.

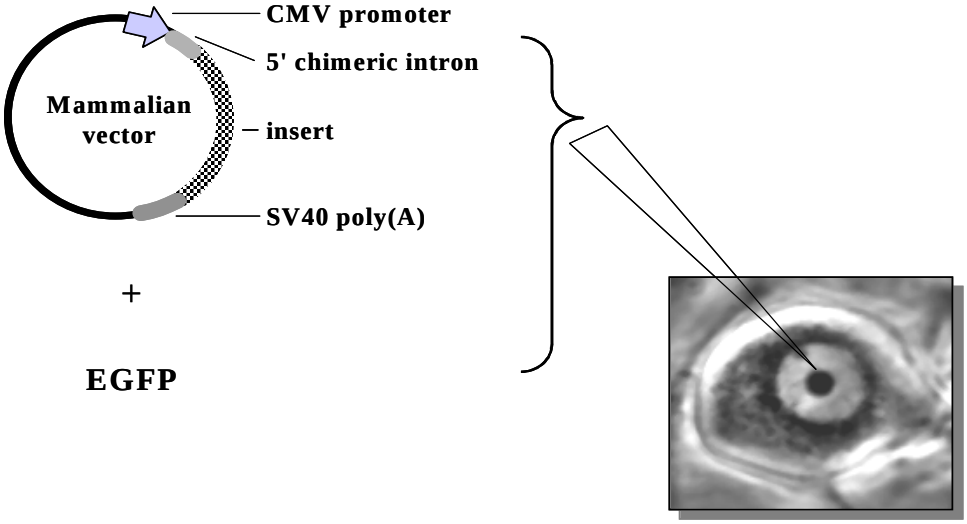

그림 3. 세포 핵 내 cDNA 미세주입방법. Eppendorf 미세주입시스템(Eppendorf 5246 transjector /5171 micromanipulator)을 이용하여 효소처리에 의해 분리된 상경신경절 신경세포의 핵 내에 M_1 무스카린성 수용체를 코딩하는 cDNA를 100-200 hPa 사이의 압력으로 주입(pressure injetion) 하였다. 이때 발현 표시자로 GFP를 코딩하는 cDNA(pEGFP-N1)를 같이 주입시켜 발현시킨다. 모든 cDNA 들은 CMV 프로모터가 있는 포유동물 발현 벡터(pCDNA 3.1, pCI 등)에 서브클로닝 된 것을 사용하였다.

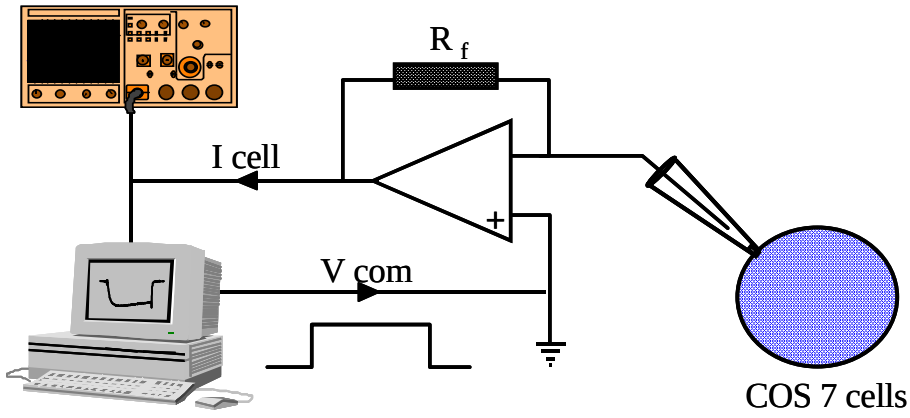

그림 4. 막전압 고정법에 의한 이온채널 전류 측정 장치의 set-up. Patch-clamp 전용 software(S5)를 이용하여 만든 펄스 프로토콜로 고정하고자 하는 전압(Vcom)을 A/D converter(ITC-18)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 피펫을 통하여 세포에 전달하고 세포막에 존재하는 이온채널의 활성정도에 따라 변화하는 전압을 영점(null)하기 위해 증폭기(Axo-1D)를 통하여 흘려주는 전류(I cell)를 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터의 하드 디스크에 저장하였다.

제 3장 결과

3.1. 쥐 내심신경세포에서 내재적 M_2 무스카린성 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VD 억제

본 연구에서 주로 사용된 모델 시스템은 쥐 심장을 지배하는 부교감 내심신경세포인데 이전의 선행연구에서 HVA 칼슘채널의 동정이 이루어져서 가장 많이 발현되는 칼슘채널의 아형이 N-형이며(Jeong 및 Wurster, 1997a), M_2 무스카린성 수용체를 내재적으로 발현하고 있으며 이 수용체의 활성에 의해 HVA 칼슘채널의 VD 억제가 백일해 독소(PTX)에 민감한 경로를 통해 일어난다는 것이 확인된 바가 있다(Jeong 및 Wurster, 1997b). 따라서 이 내심신경세포를 이용할 경우 이종발현된 M_1 수용체의 칼슘채널의 VI 억제 메커니즘을 VD 억제의 그것과 비교할 수 있다는 장점이 있다.

그림 5는 단일 내심신경세포에서 전세포패치클램프 방법으로 시간에 따른 HVA 칼슘전류의 변화를 기록한 것이다. 내심신경세포에서 10 mM의 Ca^{2+}을 charge carrier로 사용하였을 때 내향 칼슘전류는 -25 mV 근처에서 처음 활성이 되기 시작하여 +10 mV에서 최대의 값을 나타내었다. 따라서 세포를 -80 mV로 고정한 후 칼슘전류의 억제가 전압의존적인지 여부를 확인하기 위해 두 개의 동일한 +10 mV 시험자극과 이들 자극 사이의 강한 탈분극(+80 mV) 자극으로 이루어진 double-pulse 프로토콜로 0.1 Hz의 빈도로 칼슘전류를 유발하였다. 먼저 NE(10 μM)을 가하였을 때 가역적인 칼슘전류의 억제가 빠르게 나타났는데 그 억제 양상은 이전에 보고 된 바와 같이(Jeong 등, 1999) “kinetic slowing”과 “prepulse facilitation”이 나타나는 전형적인 VD 억제였다(참고: 그림7A). 무스카린성 수용체 효현제인 carbachol(Cch)(10 μM)을 가하였을 때 NE과 유사한 칼슘전류의 억제를 유발하였다. 이러한 NE과 Cch에 의한 칼슘전류의 억제는 G_i 및 G_o G 단백질 α 서브유닛을 ADP-ribosylation 시켜 비활성화시키는 PTX(500 ng/ml)로 24 시간 처리된 내심신경세포에서 거의 차단되었다. 평균적으로 대조군에서 NE과 Cch에 의한 칼슘전류의 억

제크기는 각각 53±5%(n=6)와 69±3%(n=9)이었으며, PTX 처리 후 각각 7±2%(n=4)와 10±2%(n=6)로 통계적으로 의의 있게(P<0.01) 감소하였다. 일반적으로 prepulse facilitation은 double pulse 프로토콜에서 자극 P_2에 의한 전류크기에 대한 자극 P_1의 그것의 비(ratio, 이후로 PFR을 사용)로 나타낸다. 대조군에서 NE과 Cch에 의한 칼슘전류의 억제가 일어날 때 PFR은 1.2±0.1에서 2.1±0.1 및 2.4±0.2로 각각 증가하였다. 한편, M_2 수용체 차단제인 methoctramin(MTT, 300 nM)(Lazareno 및 Roberts, 1989)을 전처치하였을 때 Cch에 의한 칼슘전류의 억제가 61±6%(n=2)에서 12±5%(n=2)로 감소되었다. 이러한 결과는 Cch에 의한 칼슘전류의 억제가 내심신경에 내재적으로 발현되어 있는 M_2 무스카린성 수용체를 통해서 일어남을 확인하였다.

3.2. 쥐 내심신경세포에 이종발현된 인간 M_1 무스카린성 수용체 발현에 의한 칼슘채널억제의 특성

M_2 수용체에 비교하여 M_1 수용체에 의한 칼슘채널 조절을 관찰하기 위해 쥐 내심신경 세포 핵 내에 인간 M_1 수용체(10 ng/μl) 및 GFP(5 ng/μl)를 코딩하는 유전자(cDNA)를 미세주입하여 이종발현을 시켰다. 그림 6A에서 나타낸 바와 같이 M_1 수용체를 이종발현시킨(즉, GFP 형광이 나타나는) 내심신경세포에서 칼슘전류는 Cch(10 μM)에 의해 현저하게 억제되었는데 평균적인 칼슘전류의 억제크기는 77±2%(n=3)로 나타났다(그림 6B). PFR도 M_1 수용체가 발현되지 않았을 때인 2.4±0.2에서 1.5±0.2로 감소하였으나 여전히 VD 억제의 특징인 "kinetic slowing"이 일어났다. PTX가 들어 있는 배지에서 overnight 배양된 내심신경세포에서 Cch에 의한 칼슘전류의 억제크기는 55±3%(n=9)로 대조군에 비해 약간만 감소하여 주로 이종발현시킨 M_1 수용체가 칼슘채널에 연결(coupling)이 되었음을 알 수 있었다. 내심신경세포에서 보통 신경전달물질 수용체의 효현제가 없는 기초 상태에서는 0.9~1.4의 PFR 값을 가지는 데 효현제를 가하게 되면 전압의존적 억제의 경우 보통 2 이상의 값으로 증가한다(그림 7A). 앞에서 언급한 M_2 수용체에 의한 칼슘전류억제의 경우 한 개의 케이스(PFR=1.6)를 제외하고는 모두 PFR이 2 이상으로 나타났다 (그림 7B). 그러나 M_1 수용체를 이종발현시키고 PTX를 처리했을 때의 칼

슘전류억제는 “kinetic slowing"과 ”prepulse facilitation"이 나타나지 않는 전압비의존적 양상으로 나타났다(그림 6A). 평균적인 PFR은 **1.1**±**0.1** (n=9)로 효현제가 없을 때의 그것과 유사하였다(그림 7B). 이러한 칼슘채널의 VI 억제크기는 M_1 수용체의 선택적 차단제로 알려진 M_1 독소(MT-**2**, **100** ng/ml)(Karlsson 등, **2000**)를 **1**hr 전처치하였을 때 **12**±**1**%(n=3)으로 통계적으로 유의하게(P<**0.01**) 차단되어(그림 6B) 내심신경세포에 이종발현시킨 M_1 수용체가 칼슘전류의 VI 억제를 매개함을 재확인 할 수 있었다.

내심신경세포에 인간 M_1 수용체의 이종 발현은 해당 유전자를 가지고 있는 플라스미드를 세포 핵 내에 미세주입하여 이루어지기 때문에 주입한 플라스미드의 양에 따라 M_1 수용체의 발현량과 이에 따른 칼슘채널의 억제크기가 비례하게 된다. 그러나 세포핵에 주입되는 양은 플라스미드가 들어있는 미세주입용 관의 저항, 관 끝에 가해지는 압력, 주입반복 횟수 등 여러 변수들에 의해 결정되기 때문에 정확히 알 수가 없지만 칼슘채널의 억제크기를 측정하여 발현된 수용체의 양을 간접적으로 추측할 수 있다. 본 실험에서는 미세주입 관련 물리적 변수는 동일하다고 가정하고 미세주입용 관 내 플라스미드의 농도에 따른 칼슘채널의 억제크기를 측정하여 M_1 수용체의 발현정도를 간접적으로 확인하였다. 그림 8에 나타낸 바와 같이 내심신경세포에서 Cch에 의한 칼슘전류의 억제크기는 미세주입용 관 내 M_1 수용체 플라스미드의 농도가 **1**, **10**, **100** ng/μl 일 때 각각 3**1**±7%(n=3), **55**±3%(n=9), **55**±**1**%(n=4)로 농도에 비례하며, **100** ng/μl에서 포화되는 경향이 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 M_1 수용체 발현을 위해 **10** ng/μl의 농도로 플라스미드를 사용하였다.

내심신경에 내재적으로 발현되는 M_2 수용체와 이종발현시킨 M_1 수용체에 의한 칼슘전류의 억제의 효능(efficacy)과 역가(potency, IC_{50})를 Cch 농도에 따른 칼슘전류의 억제 크기를 측정하여 비교하였다(그림9). 두 수용체에 의한 칼슘전류의 억제는 농도의존적으로 나타났으며, Cch 농도가 **10** μM일 때 최고로 나타났다. M_2와 M_1 수용체 활성에 의해 나타나는 칼슘전류억제의 효능은 각각 **5**9±**2**%(n=6), **5**4±3%(n=4)로 나타났으며, 역가도 **0**.3 μM과 **0.5** μM로 비슷하였다.

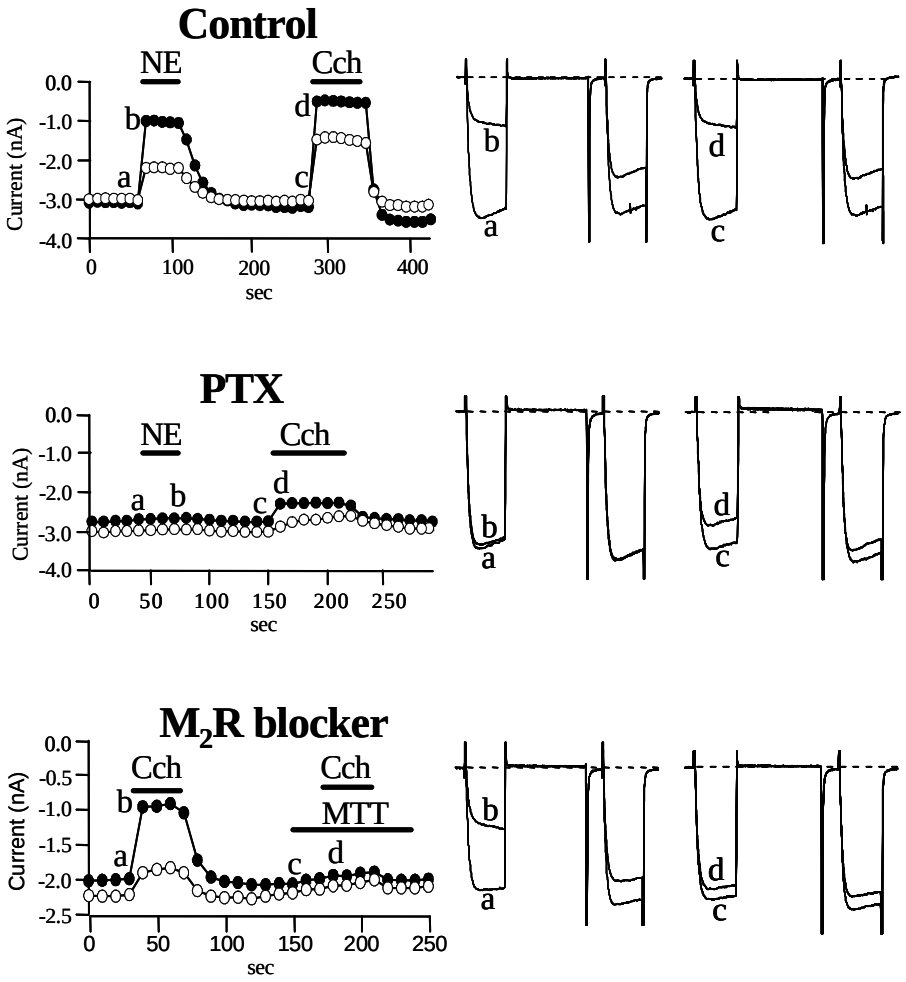

그림 5. 내심신경세포에서 신경전달물질에 의한 HVA 칼슘전류 억제의 시간경과. 칼슘전류는 double pulse 프로토콜에 의해 유발되었으며 각 시간 point에서 기록된 전류의 trace들을 나타내었다. Top: 대조군 세포에서 NE(**10** μM)과 Cch(**10** μM)을 외부 용액에 각각 가하였을 때 칼슘전류의 빠른 억제가 일어났으며, kinetic slowing과 prepulse facilitation이 관찰되었다. Middle: G_i/G_o 단백질을 비활성 시키는 PTX(**500** ng/ml)를 **1**8 시간 처리한 세포에서 Cch에 의한 칼슘전류의 억제가 거의 차단되었다. Bottom: Cch에 의한 칼슘전류 억제는 M_2 수용체 차단제인 methoctramin(MTT, 3**0**0 nM)의 전 처치에 의해 억제되었다.

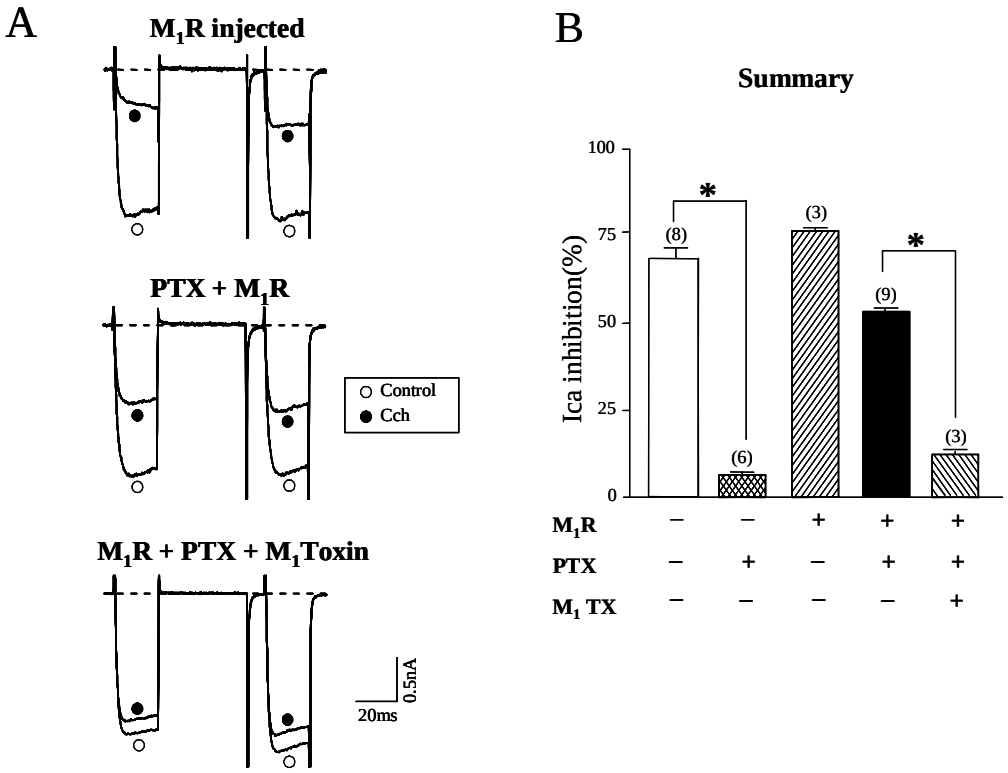

그림 6. 내심신경세포에 이종발현된 M_1 무스카린성 수용체와 칼슘채널의 기능적 연결. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류의 전압비의존적 억제(A) 및 결과 요약(B). 내심신경세포에 세포핵 내 미세주입법으로 인간 M_1 수용체를 이종발현시켰다. 미세주입된 세포는 PTX가 들어있는 배양액에 **500** ng/ml의 농도로 **1**8시간 배양되었으며, M_1 독소(M_1 TX 또는 MT-**2**)는 **100** ng/ml의 농도로 실험 **1**시간 전에 배양액에 넣어주었다. 칼슘전류는 double pulse 프로토콜을 사용하여 **10**초 간격으로 유발하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험 례수(n)를 나타낸다. * $p<0.01$

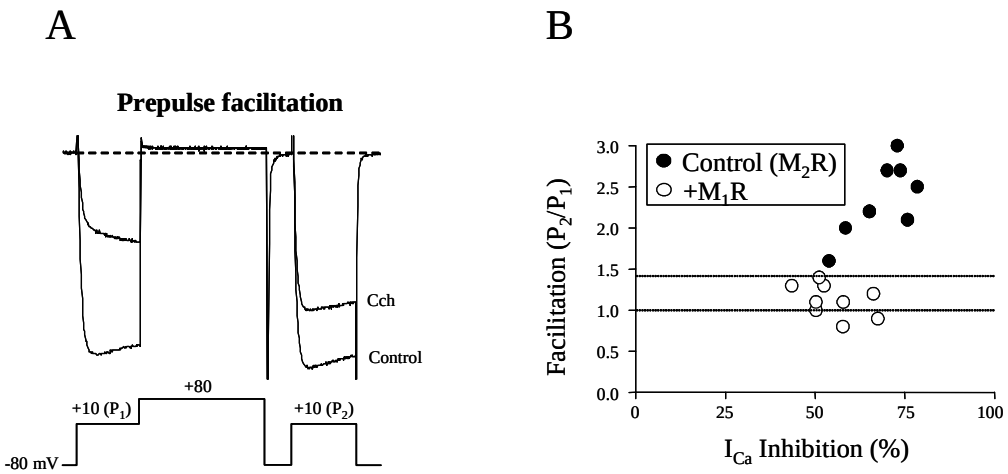

그림 7. 무스카린성 수용체 아형에 따른 칼슘전류 억제크기 및 prepulse facilitaion의 상관관계. (A) prepulse facilitation의 예, 최대 전류를 유발하는 두개의 동일(+10 mV) 시험자극들(P1와 P2)사이에 강한 탈분극 자극(+80 mV)으로 이루어진 double pulse 프로토콜로 칼슘전류를 유발하였을 때 효현제(Cch)에 의해 억제된 전류는 prepulse에 의해 facilitation이 일어남. (B) M_1 및 M_2 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제모드의 비교. 실선은 효현제 없이도 일어날 수 있는 basal facilitaion의 PFR 1.4를 표시하였고 이를 VI 억제의 기준을 삼았다. M_1 수용체(M_1R)에 활성에 의한 칼슘채널 억제의 PFR은 ≤1.4로 나타났다.

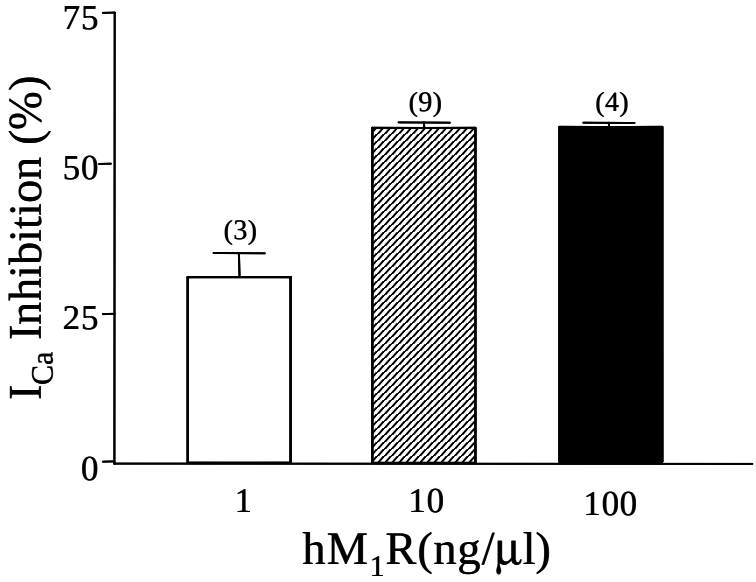

그림 8. 내심신경세포에서 미세주입 피펫 내 cDNA 농도에 따른 인간 M_1 수용체의 발현정도 평가. 칼슘전류를 유발하기 위해 세포를 -80 mV에 고정하고 +10 mV의 시험자극을 주었다. 수용체 발현정도는 칼슘전류의 억제크기를 측정하여 평가하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다.

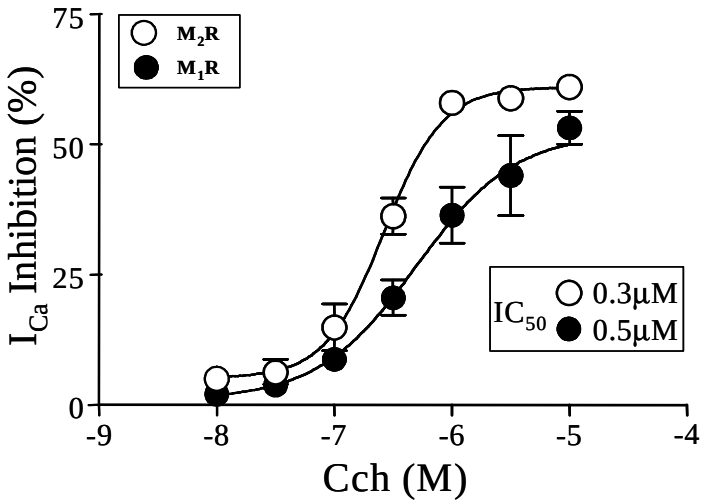

그림 9. M_1 및 M_2 수용체의 활성에 의한 칼슘채널 억제 효능 및 역가 비교. Cch 농도와 칼슘전류 억제 크기의 상관관계를 나타내었다. Cch을 **10** nM에서 **10** μM 사이에서 누적되지 않게 가하였을 때 peak 칼슘전류의 억제 %를 얻었다. Peak 칼슘전류를 유발하기 위해 세포를 **-80** mV에 고정하고 **+10** mV의 시험자극을 주었다. 각 데이터 점을 연결하는 곡선은 Hill 공식, 즉, $I_{Ca}=MaxI(1+IC_{50}/[Cch])^{-1}$을 사용하였다. 이때 MaxI는 최대 칼슘전류 억제 %, IC_{50}는 MaxI의 절반을 억제하는데 필요한 Cch의 농도이다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였다.

3.3. 쥐 내심신경세포에서 칼슘채널의 VI 억제를 매개하는 G 단백질 아형의 규명

수용체에 연결되어 있는 heterotrimeric G 단백질은 크게 G_s, $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, 그리고 G_{12}의 네 아과(subfamily)로 나누어져 있는 데 이 중에서 G_s/$G_{i/o}$는 칼슘채널의 VD 억제를 매개하는 것으로 알려져 있으며(Zhu 및 Ikeda, 1994; Ikeda 및 Dunlap, 1999), $G_{q/11}$이 VI 억제를 매개하는 것으로 알려져 있다(Hille, 1994; Elmslie, 2003). 따라서 M_1 수용체의 활성에 의한 칼슘전류의 VI 억제를 매개하는 G 단백질을 기능적으로 확인하기에 앞서 내심신경세포에 $G_{q/11}$ 아과에 속한 아형들이 내재적으로 발현되는 지를 역전사 중합연쇄반응으로 확인하였다. 그림 10에서 보는 것과 같이 쥐 내심신경세포는 $G_{q/11}$ 아과에 속한 G_q, G_{11}, G_{14}, 그리고 G_{15}의 네 아형이 모두 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이외에도 G_i 아과에 공통된 염기서열로 제작된 프라이머로 G_i 단백질을 동정할 수 있었다. 이때, 양성 대조군으로 뇌 조직으로부터 분리된 mRNA를 사용하였으며, 게놈 DNA로부터의 오염여부를 확인하기 위한 음성 대조군으로 역전사 효소 없이 증폭을 하였다.

무스카린성 수용체는 M_1-M_5의 5개 아형으로 존재하는데 일반적으로 M_1, M_3, M_5는 $G_{q/11}$에, M_2와 M_4는 $G_{i/o}$ 단백질에 연결되어 있다고 알려져 있다(Lanzafame 등, 2003). 그림 5에서 이미 확인된 바와 같이 내심신경세포에 내재적으로 발현된 M_2 수용체에 의한 칼슘채널의 억제는 $G_{i/o}$ 단백질을 비활성화 시키는 PTX에 민감하게 차단되었다. 반면에 내심신경세포에 이종발현된 M_1 수용체에 의한 칼슘전류의 억제는 G_s에 내재된 GTPase 활성을 차단하여 비활성화시키는 콜레라 독소(Cassel 및 Selinger, 1977; CTX, 1 μg/ml, 18시간 처리)나 PTX에 의해서 차단되지 않았다(그림 5, 그림 11A). 그러나 $G_{q/11}$에 작용한다고 알려진 광견병 독소(Pasteurella multocida toxin, PMT; Wilson 및 Ho, 2004)로 내심신경세포를 장시간 (18 시간) 1 μg/ml 농도로 처리하였을 때 칼슘전류 억제의 크기는 55±3% (n=9)에서 7±1%(n=5)로 통계적으로 유의하게 감소하였다($P<0.01$)(그림 11B). 이러한 결과로부터 내심신경에서 M_1 수용체에 의한 칼슘전류의 억제는 PMT에 민감한 $G_{q/11}$ 단백질에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

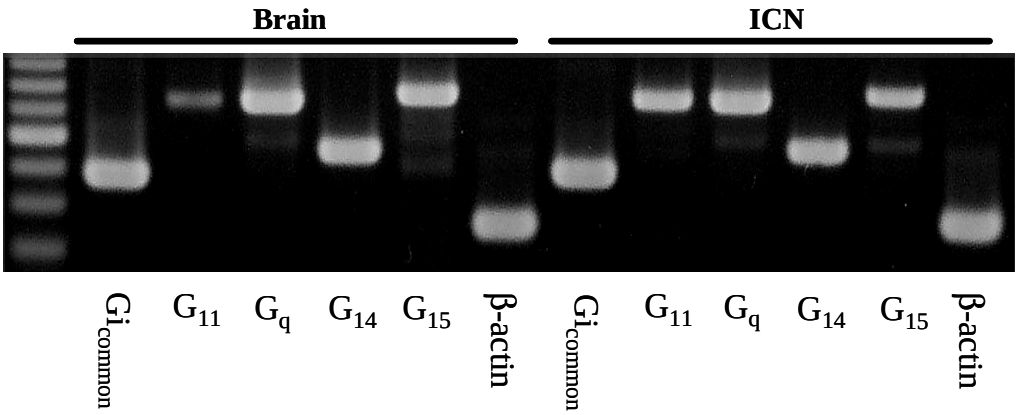

그림 10. 역전사 연쇄중합반응에 의한 내심신경에 발현되는 G 단백질 α 서브유닛의 동정. 내심신경절로부터 전체 RNA를 추출하여 역전사한 후 Gα에 특이적인 또는 공통 프라이머(본문 참조)를 사용하여 연쇄중합반응에 의해 증폭하였다. 반응물은 ethidium bromide가 들어있는 agarose gel 상에서 분리하고 확인하였다. 내부 대조군으로 β-actin을, 양성 대조군으로 뇌 조직을 각각 사용하였다. 역전사 효소 없이 역전사연쇄중합반응 과정을 실시하여 게놈 DNA의 오염이 없음을 확인하였다.

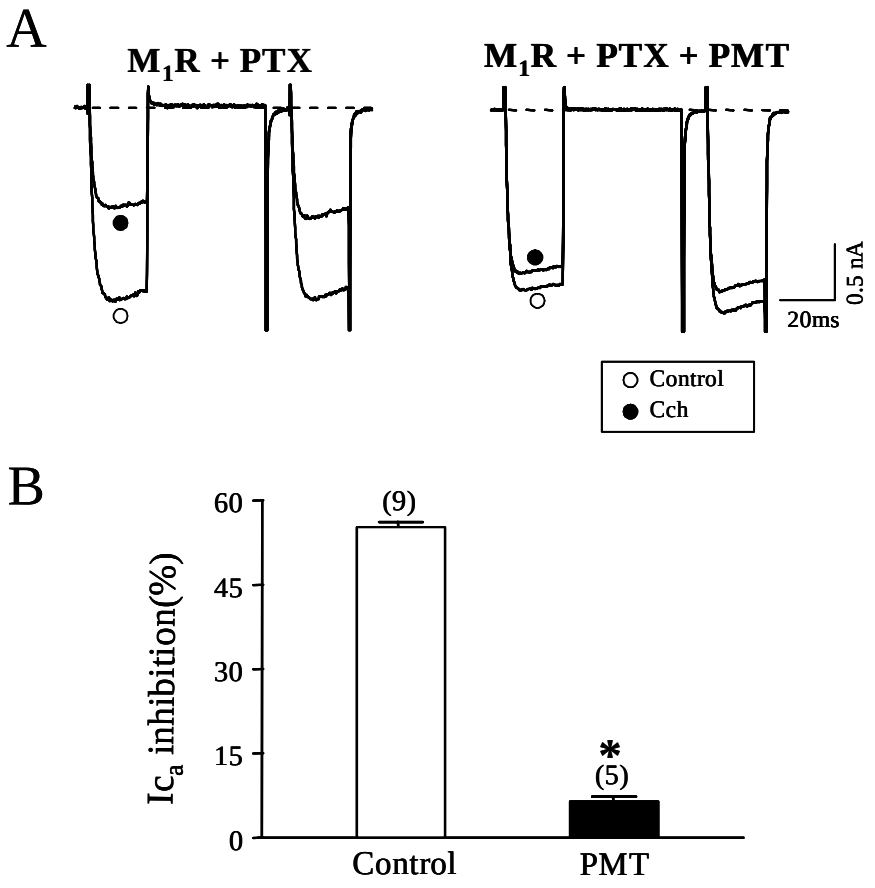

그림 11. 내심신경세포에서 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제를 매개하는 G 단백질의 약리적 동정. 칼슘전류 억제에 미치는 PMT의 효과(A) 및 요약(B). M_1 수용체를 코딩하는 cDNA가 미세주입된 내심신경세포를 PTX와 PMT(각각 **500** ng/ml)를 함께 **18** 시간동안 전 처치한 후 peak 전류에 미치는 Cch의 효과를 기록하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. *****$p<0.01$

3.4. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 Gβγ 서브유닛의 역할

이전의 연구에서 신경전달물질에 의한 N-형 칼슘채널의 VD 억제에 Gβγ가 관여하는 지를 확인하는 대표적인 실험전략은 Gβγ 결합 단백질을 세포에 과발현을 시키는 것 이었다(Ikeda, 1996; Jeong 및 Ikeda, 1999; Kammermeier 및 Ikeda, 1999). 이때 이종발현 된 Gβγ 결합단백질은 충분히 많은 양이 발현될 경우 G 단백질 활성 시에 방출되는 유리 Gβγ를 완충하여 효과기(effector)인 칼슘채널에 작용하는 것을 방해할 것이다. 본 연구에서는 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 억제에 Gβγ가 관여하는 지를 확인하기위해 Gβγ 결합단백질인 트랜스듀신 Gαtr)과 G 단백질 수용체 인산화 효소 2의 카르복시기 말단(G-protein receptor kinase 2-ct, GRK2-ct)을 사용하였다. Gαtr은 망막에서 발견되는 Gα 서브유닛으로(Conklin 및 Bourne, 1993; Wittinghofer, 1994) 이종발현 되었을 때 GDP-bound 형태로 존재하여 Gβγ를 완충시키게 된다(Jeong 및 Ikeda, 1999). GRK2-ct 경우 myristic acid attachment(MAS)을 N 말단에 결합시켜 세포 내에 발현되었을 때 G-단백질이 존재하는 세포막에 연합이 잘되도록 만들어졌는데(Resh, 1994; Toby 등, 1997) 이는 Gβγ의 완충능력을 극대화시키기 위한 것이다(Kammermeier 및 Ikeda, 1999). PTX를 처리한 내심신경 세포에 트랜스듀신이나 GRK2-ct을 이종발현 시켰을 때 대조군에서 볼 수 있는 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류의 억제를 현저하게 차단시켰다(그림 12A). 평균적으로 대조군에서의 억제크기는 57±0.3%(n=4) 이었으나, 트랜스듀신이나 GRK2-ct을 과발현 시켰을때는 각각 7±1(n=5)%와 12±2(n=7)%로 감소하였다(그림 12B). 이러한 결과로부터 칼슘전류의 VI 억제에서도 VD 억제처럼 Gβγ가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

3.5. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 Gα 서브유닛의 역할

내심신경세포에 이종발현된 M_1 수용체의 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제가 $G\alpha_{q/11}$에 의해 매개되는 지 확인하였다. 이를 위해서 regulator of G protein

signaling **2**(RGS**2**)를 이종발현 시켰다. 이전의 연구에서 RGS**2**는 RGS 과에 속한 여러 아형들 중에서도 $G\alpha_q$-GTP에 선택적으로 결합하여 효과기, 즉, PLCβ의 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다(Heximer 등, **1**997). 그림 **1**3에서 나타낸 것 같이 PTX가 처리된 내심신경 세포에 RGS**2**를 이종 발현시켰을 때 Cch에 의한 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류의 억제크기에는 별 영향을 주지 않았지만 흥미롭게도 칼슘전류의 억제모드를 VI에서 VD로 전환시켰다. 대조군(PTX+M_1 수용체)에서의 칼슘전류억제의 크기는 **5**6±4%(n=4)이었고, RGS**2**를 추가로 발현한 실험군에서는 **5**8±4%(n=7)로 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다($p>0.05$)(그림 **1**4). 그러나 대조군과 실험군에서 PFR은 **1**.**2**±**0**.**1**과 **1**.6±**0**.**1**로 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.01$). 이와 같이 RGS**2**에 의한 $G\alpha_{q/11}$-GTP를 완충시켰을 때 칼슘전류의 억제크기에는 영향을 주지 않고 억제모드만 변환시키는 효과를 더 검증하기위해 역시 PLCβ**1** 카르복시기 말단(PLCβ**1**-ct)을 테스트하였다. PLCβ**1**-ct는 활성화된 $G\alpha_{q/11}$.GTP는 결합하지만 PLC의 효소활성은 없는 것으로 알려져 있다(Wu 등, **1**993). 내심신경세포에 PLCβ**1**-ct의 이종발현은 RGS**2**의 그것과 같은 효과를 나타내었다. 즉, Cch에 의한 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류의 억제크기에는 영향을 주지 않고 칼슘전류의 억제모드를 VI에서 VD로 전환시켰다(그림 **1**3). 대조군(PTX+M_1 수용체)에서의 칼슘전류억제의 크기(**5**6±4%)에 비교하여 PLCβ**1**-ct를 추가로 발현한 실험군에서는 **51**±4%(n=8)로 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 그러나 대조군의 PFR(**1**.**2**±**0**.**1**)에 비해 실험군에서는 **1**.8±**0**.**1**로 통계적으로 유의하게 증가되었다($p<0.01$)(그림 **1**4). 이상의 결과로부터 내심신경세포에서 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제모드는 Gα가 중심 역할을 함을 알 수 있었다.

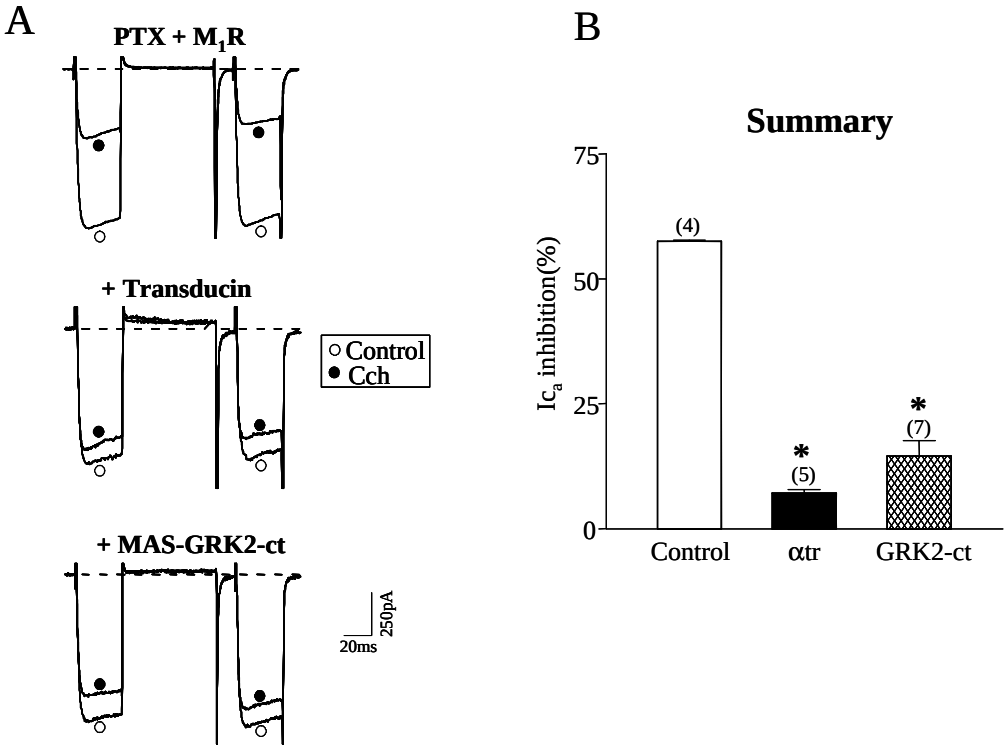

그림 12. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에서의 Gβγ의 역할. Gβγ를 완충(chelation)하는 트랜스듀신(αtr) 및 GRK**2**-ct의 Cch에 의한 칼슘전류억제의 차단효과(A) 및 요약(B). GRK**2**-ct가 세포막에 잘 발현되도록 myristic acid attachment (MAS)을 N 말단에 결합시켰다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. *****p<**0.01**

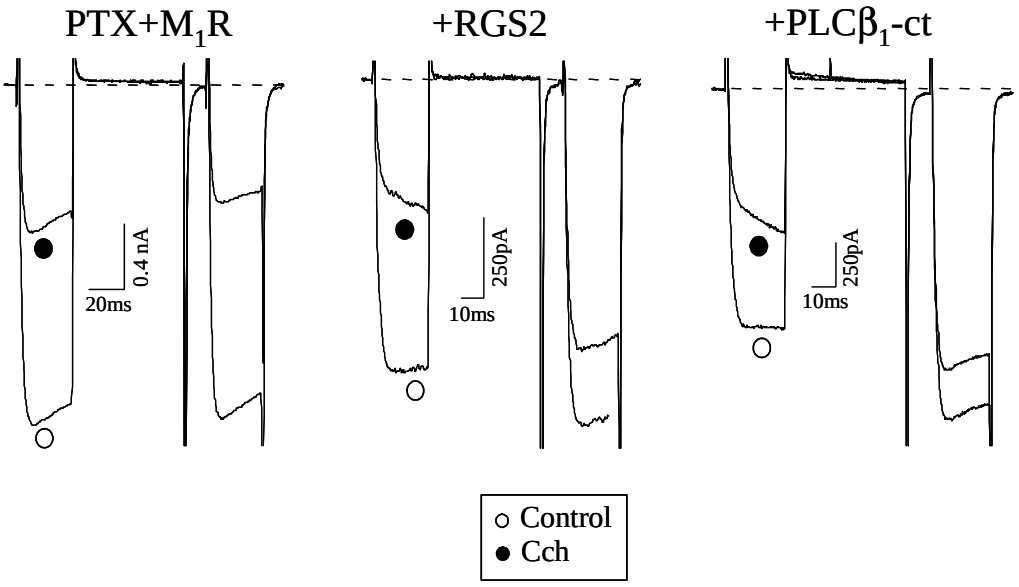

그림 13. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에서의 $G\alpha_{q/11}$의 역할. G 단백질 $\alpha_{q/11}$ 서브유닛을 완충(chelation)하는 RGS2 및 PLCβ1-ct을 과발현시켜 Cch에 의한 칼슘전류의 억제 및 모드에 미치는 효과를 관찰하였다.

Summary

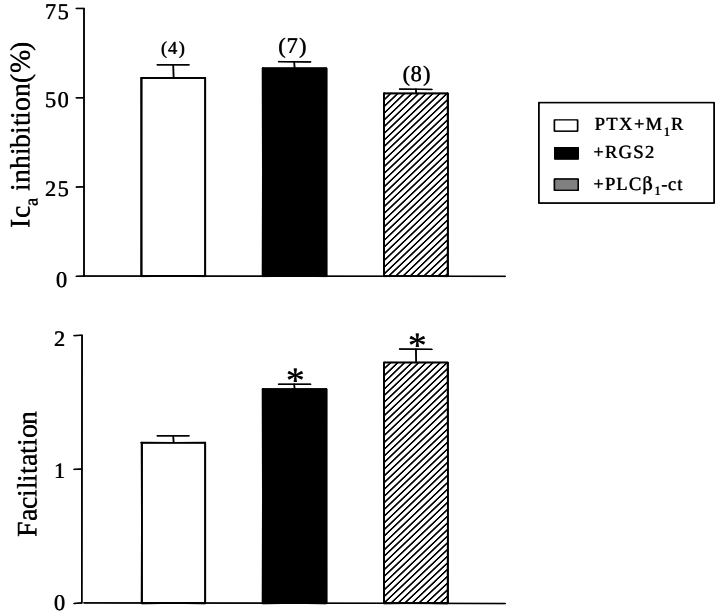

그림 14. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 $G\alpha_{q/11}$ 완충의 효과

요약. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. *****$p<0.01$

3.6. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 세포 내 유리 칼슘의 역할

쥐의 상경신경절 세포를 사용해서 이루어진 이전의 연구에서 M_1 및 안지오텐신 수용체에 의한 칼슘채널의 VI 억제는 세포 내 칼슘을 완충하는 BAPTA에 민감하다고 보고 된 바 있다(Bernheim 등, 1992; Shapiro 등, 1994; Delmas 등, 1998a). 따라서 본 연구에서도 내심신경에서 일어나는 칼슘채널의 VI 억제에 미치는 칼슘 chelator의 영향을 확인하였다. 이를 위해 double-pulse 프로토콜로 칼슘전류를 5초 간격으로 유발하고 Cch을 가하여 시간에 따른 칼슘전류의 크기 변화를 나타내었다(그림 15A). 먼저 낮은 농도(0.1 mM)의 BAPTA를 패치피펫을 통해 세포 내로 넣어주었을 때 Cch에 의한 칼슘전류의 억제는 느리게 일어나 최대 억제가 일어나기까지 4～5번의 시험펄스(TP; 15-20초)가 필요하였다. 이를 정량화하기 위해 첫 번째와 다섯 번째 TP 후 측정한 칼슘전류의 억제크기는 각각 28±5%(n=3)와 50±9%이었다(그림 16). 이때, 칼슘전류의 억제모드는 prepulse 억제나 postpulse의 억제의 크기가 같은 VI 모드를 처음부터 유지하였다(그림 15A). 평균적으로 첫 번째와 다섯 번째 TP 후 측정한 칼슘전류의 PFR은 각각 0.9±0.1과 0.8±0.1이었다(그림 16). 이와는 달리 높은 농도를 BAPTA(10 mM)을 세포 내에 가하였을 때 Cch에 의한 칼슘전류의 억제는 매우 빠르게 일어나 1～2번의 TP에 의해 최대 억제가 일어났다(그림 15B). 첫 번째와 다섯 번째 TP를 가하였을 때 칼슘전류의 억제크기는 각각 45±6%(n=4)와 50±7%로 통계적으로 차이가 없었다. 무엇보다도 흥미로운 사실은 내심신경세포 내에 칼슘이 고농도의 BAPTA에 의해 완충 될 때 칼슘전류의 억제는 처음에는 VD 모드로 일어났으나 시간이 지날수록 VI 모드로 이동한다는 것이었다. 평균적으로 첫 번째와 다섯 번째 TP를 가하였을 때 칼슘전류의 PFR은 각각 1.5±0.1과 1.1±0.1으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($p<0.05$). 이러한 결과는 세포 내로 유입된 칼슘이 칼슘채널 억제의 속도 또는 모드의 변환에 중요한 요소로 작용할 수 있음을 시사하였다.

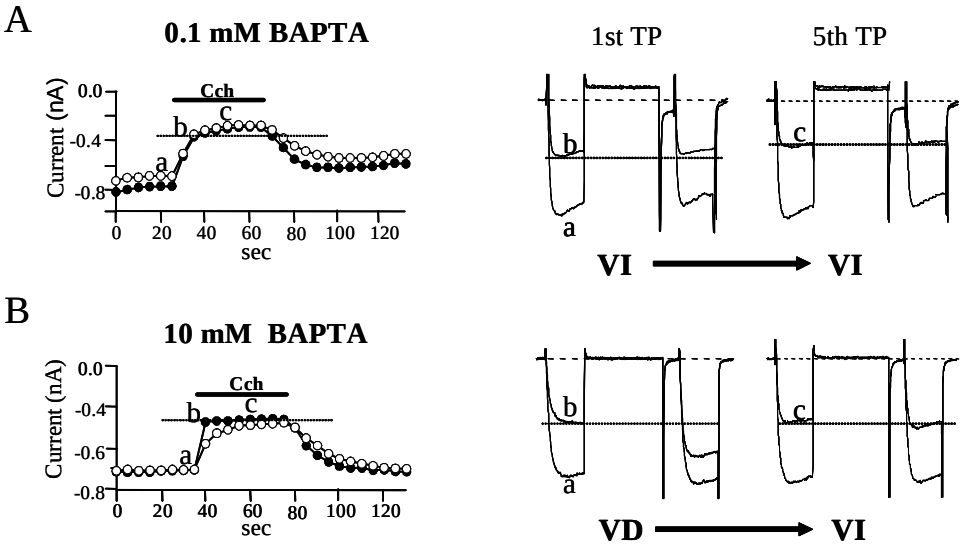

그림 15. 세포 내 칼슘 완충이 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 효과. 패치 피펫 내에 **0.1** mM(A) 또는 **10** mM BAPTA(B)를 넣어 세포 내로 dialysis하였다. Cch(**10** μM)에 의한 칼슘전류 억제의 시간경과(left) 와 첫 번째와 다섯 번째 시험펄스 시 기록된 전류의 모양(right)을 나타내었다. 시험펄스는 매 **5** 초 간격으로 주었다. VD: voltage-dependent, VI: voltage-independent

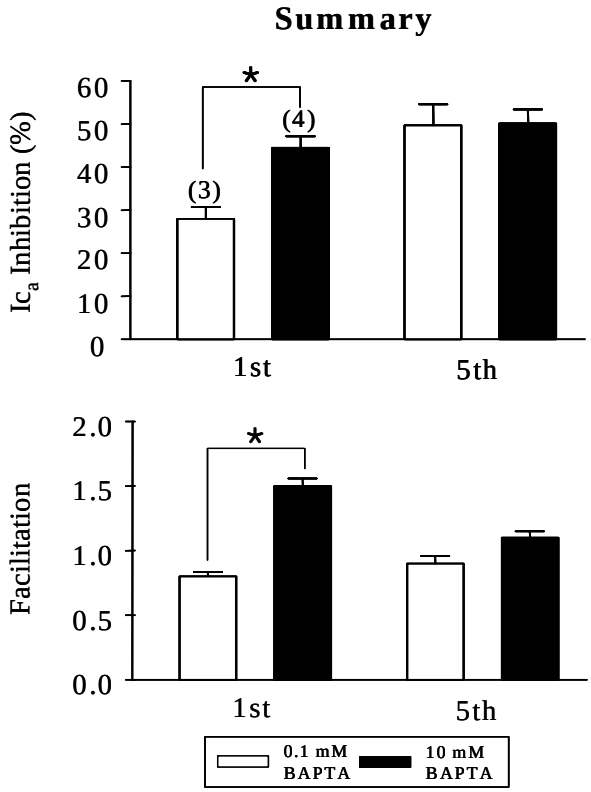

그림 16. 세포 내 칼슘 완충이 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 효과의 요약. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. *$p<0.05$

3.7. N-형 칼슘채널과 *C. elegans* 아세틸콜린 수용체 GAR-3 간의 기능적 연결

GAR-3는 충북대학교 조남정 박사에 의해 꼬마선충 *Caenorhabditis elegans*(*C. elegans*)로부터 클로닝 된 G-protein-coupled 수용체로 그 구조와 약리학적인 특성이 기존에 알려진 척추동물의 무스카린성 수용체와 비슷하다는 것이 밝혀졌다(Hwang 등, 1999). 그러나 현재까지 GAR-3 수용체의 기능, 특히, 이온채널의 조절과 관련된 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 GAR-3가 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 있는 지를 최초로 확인하고 그 칼슘채널 조절의 메커니즘을 인간 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널 조절의 그것과 비교하였다. 먼저 COS-7 세포에 GAR-3를 N-형 칼슘채널을 코딩하는 α1B, 보조 서브유닛인 $Ca_v\beta_3$ 및 $\alpha_2\delta$, 그리고 GFP와 함께 칼슘포스페이트 트랜스펙션 방법으로 이종발현을 시켰다. 전세포파열패치방법으로 칼슘전류를 측정하였는데, 이때 charge carrier로 10 mM Ca^{2+}을 사용하였다. COS-7 세포를 -80 mV에 고정하고 +10 mV로 단일 시험펄스를 주어 최대크기의 N-형 칼슘전류를 유발하였다. 그림 17A에서 보는 바와 같이 GAR-3 수용체를 제외한 나머지 유전자를 발현시킨 대조군(GFP alone)에서 시험펄스에 유발된 내향전류는 무스카린성 수용체 효현제인 oxotremorine(oxoM, 100 μM)에 의해 영향을 거의 받지 않았다. 평균억제 크기는 1% 이하로 COS-7 세포에 내재적으로 발현되는 무스카린성 수용체가 없다는 것이 확인되었다(그림 17B). 한편, GAR-3 수용체를 발현시킨 COS-7 세포에서 oxoM은 N-형 칼슘전류를 현저하게 억제하였다. 평균 억제크기는 64±12%(n=5)로 나타났으며 이 값은 인간 M_1 수용체 활성에 의한 억제크기인 70±4%(n=9)와 비슷하였다. COS-7 세포에서 GAR-3와 M_1 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류의 억제는 비특이적 무스카린성 수용체 차단제인 atropine(50 μM)의 전처치에 의해 차단되었다. 평균적으로 atropine 전 처치 후 GAR-3와 M_1 수용체 활성에 의한 억제크기는 각각 7±3%(n=4)와 2±2%(n=4)로 나타났다. 이러한 결과로부터 GAR-3 수용체는 N-형 칼슘채널에 기능적으로 연결되며 인간 무스카린성 수용체와 약리학적으로 유사함을 알 수 있었다.

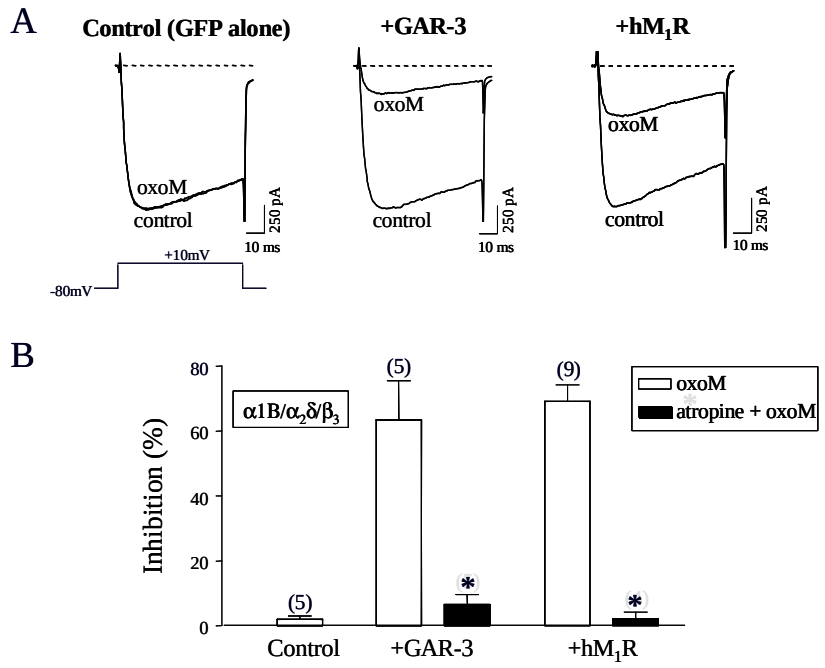

그림 17. 꼬마선충 GAR-3 무스카린성 수용체와 N-형 칼슘채널의 기능적 연결. GAR-3 및 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘전류의 억제효과 (A) 및 결과 요약 (B). COS-7 세포에 GAR-3 또는 M_1 수용체를 $\alpha 1B/\beta_3/\alpha_2\delta$ 및 GFP와 함께 $CaPO_4$ 트랜스펙션 방법으로 이종발현 시켰다. 전세포파열패치방법으로 칼슘전류를 측정하였으며, charge carrier로 **10** mM Ca^{2+}을 사용하였다. COS-7 세포를 **-80** mV에 고정하고 **+10** mV로 단일 시험펄스를 주어 peak N-형 칼슘전류를 유발하였다. 대조군으로 GFP만 발현하는 COS-7 세포를 사용하였다. OxM(**100** μM)에 의한 효과가 무스카린 수용체에 의해 매개되는 지를 atropine(**50** μM)을 전처치하여 확인하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. * $p<0.01$

3.8. GAR-3 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제의 일반적 특성

GAR-3가 발현되는 COS-7 세포에서 oxoM에 의한 N-형 칼슘채널의 억제가 농도 의존적으로 일어나는 지 확인하고, 그 효능과 역가를 인간 M_1 수용체를 발현시켰을 때와 비교하였다. 그림 **1**8에 나타낸 바와 같이 GAR-3가 발현된 경우 칼슘전류의 억제는 oxoM의 농도에 비례하여 증가하였으며 최대 억제크기는 **80**±6% (n=**5**)로 M_1 수용체 활성에 의한 최대 억제크기(**70**±**5**%, n=**5**)와 비슷하였다. 효현제 각 농도에서의 억제크기를 최대 크기에 정규화(normalization)하였을 때 역가는 GAR-3와 M_1 수용체가 활성화 된 경우 각각 **0**.**35** μM과 **0**.6 μM로 효능과 마찬가지로 두 수용체 사이에 비슷하였다.

앞에서 설명한 바와 신경전달물질 수용체의 활성에 의한 칼슘채널의 억제의 특성은 전압의존성 여부로 판명 된다(Hille, **1**994, Ikeda 및 Dunlap, **1**999; Catterall, **2000**; Elmslie, **200**3). 따라서 GAR-3와 N-형 칼슘채널사이의 연결에 관련된 분자적 메커니즘 규명에 앞서 전압의존성을 평가하였다. 일반적으로 칼슘채널의 VD 억제의 경우 가해진 시험펄스와 억제크기사이에 "종(bell)" 모양의 관계가 나타나며, 효현제에 의해 전유-전압곡선(I-V curve) 상에서 우측으로의 이동이 일어난다 (Ikeda 및 Dunlap, **1**999). 그림 **1**9에 나타낸 바와 같이 COS-7 세포에서 oxoM(**100** μM)으로 GAR-3 수용체를 활성화 시켰을 경우 **-20** mV～**+50** mV 범위에서 뚜렷한 칼슘전류의 억제가 일어났으나 종 모양의 상관관계가 뚜렷하지 않았고, 최대전류가 나타나는 전압의 우측이동도 관찰되지 않아 전압비의존적인 억제의 가능성을 시사하였다. 다음은 GAR-3를 발현하는 COS-7 세포에서 oxoM에 의한 N-형 칼슘전류의 억제가 heterotrimeric G 단백질에 의해 매개되는 지를 확인하였다. GDPβS는 가수분해가 되지 않는 GDP 유사체로 Gα에 GTP가 결합하는 것을 경쟁적으로 방해하여 G 단백질을 매개하여 일어나는 신경전달물질의 작용을 억제시킨다(Holz 등, **1**986; Ikeda, **1991**; Wanke 등, **1**987). 그림 **20**은 GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널의 억제에 대한 세포 내 GDPβS의 효과를 보여주고 있다. GDPβS(**2** mM)를 **10** 분간 세포 내에 주입하였을 때 oxoM(**100** μM)에 의한 칼슘전류의 억제가 **80**±4%(n=**5**)에서 4±**2**%(n=**5**)로 현저하게 감소하였다.

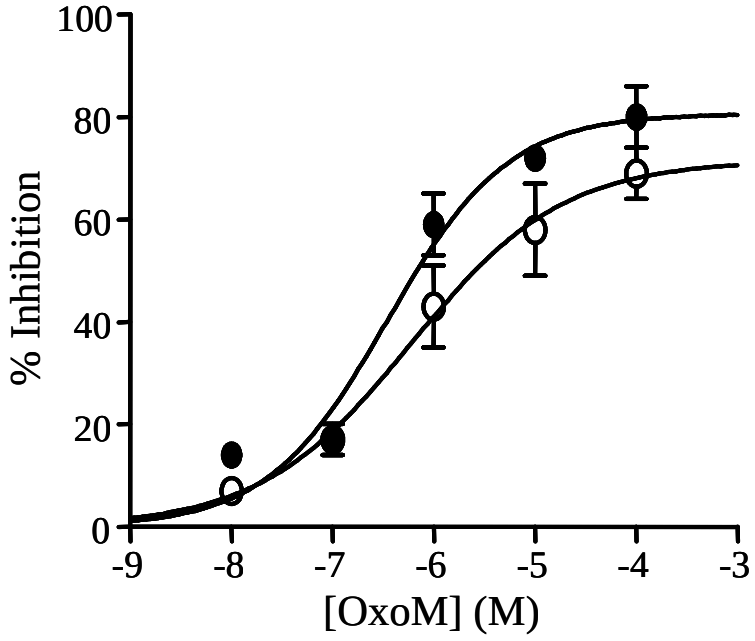

그림 18. GAR-3 **및 M_2 수용체의 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제 효능 및 역가 비교.** OxoM 농도와 칼슘전류 억제 크기의 상관관계를 나타내었다. Cch을 **10** nM에서 **100** μM 사이에서 누적되지 않게 가하였을 때 peak 칼슘전류의 억제 % 를 얻었다. Peak 칼슘전류를 유발하기 위해 세포를 **-80** mV에 고정하고 **+10** mV 의 시험자극을 주었다. 각 데이터 점을 연결하는 곡선은 Hill 공식, 즉, $I_{Ca}=MaxI(1+ IC_{50}/[oxoM])^{-1}$을 사용하여 얻었다. 이때 MaxI는 최대 칼슘전류 억제%, IC_{50}는 MaxI의 절반을 억제하는데 필요한 Cch의 농도이다. open circle: GAR-3 수용체, closed circle: M_1 수용체. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였다.

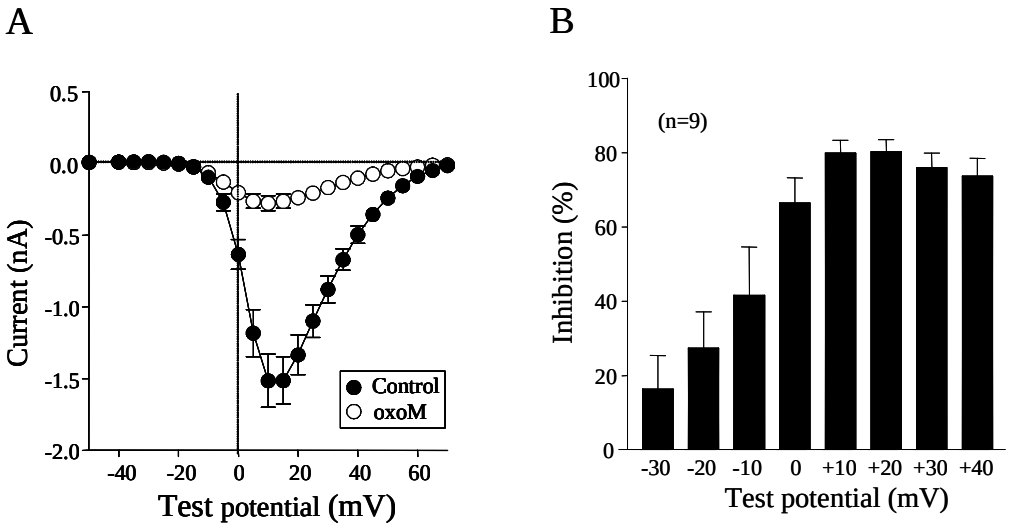

그림 19. GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제의 전압의존성 평가. OxoM(**100** μM) 존재 유무에 따른 전류-전압 상관 곡선(A) 및 각 전압에서의 전류 억제 크기 요약(B). 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수 (n)를 나타낸다.

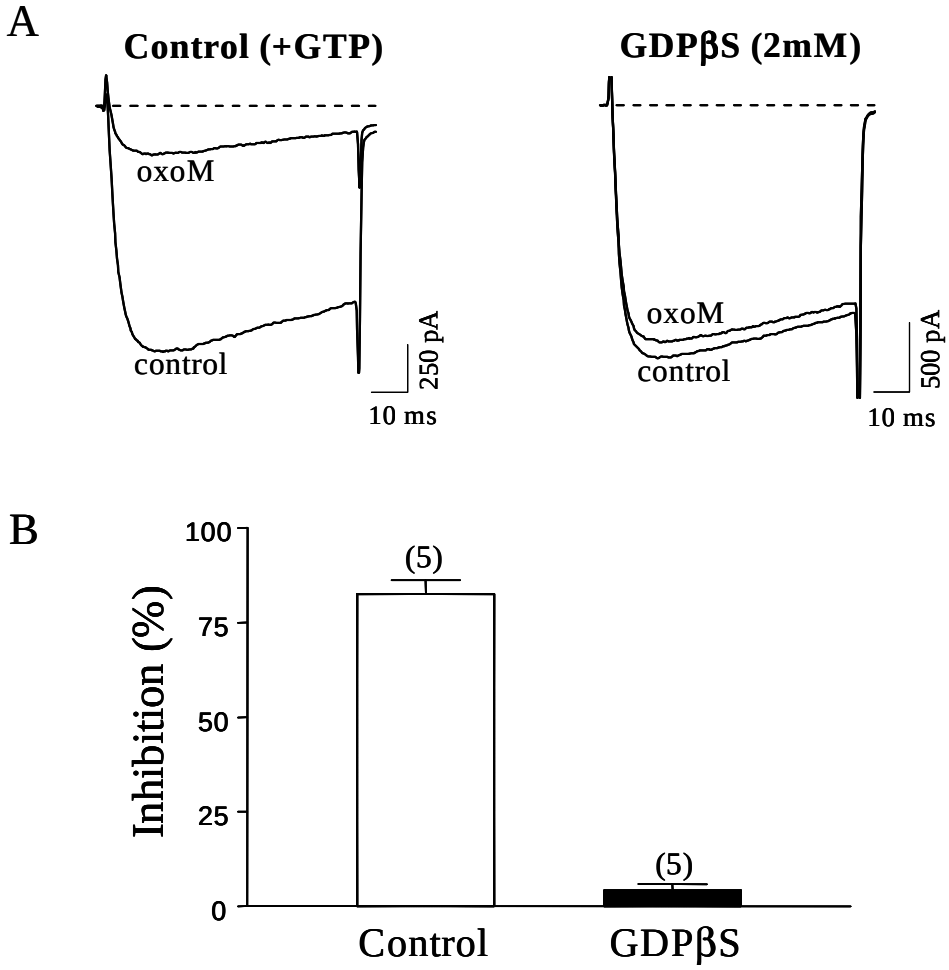

그림 20. GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 GDPβS의 효과. GDPβS(**2** mM)을 **10**분간 COS-7 세포 내로 dialysis 한 후 oxoM(**100** μM)의 유무에 따른 칼슘전류 traces(A) 및 GDPβS 효과 요약(B). 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다.

3.9. GAR-3 활성에 의한 N-형 칼슘채널 억제에 관여하는 G 단백질의 동정

이전의 연구에서 COS-7 세포는 내재적으로 $G\alpha_s$(Rauly 등, **2000**), $G\alpha_{i/o}$(Wurch 및 Pauwels, **2001**), $G\alpha_q$(Yuan 등, **2001**), 그리고 $G\alpha_z$/$G\alpha_{12}$(Belcheva 등, **2000**)의 G 단백질 아형들을 발현하는 것으로 알려져 있다. 따라서 COS-7 세포에서 GAR-3 수용체와 N-형 칼슘채널사이를 연결하는 G 단백질의 아형을 약리학적으로 동정하였다. 이때, 칼슘전류 억제가 VD인지 VI인지를 명확히 하기위해 double pulse 프로토콜을 사용하여 칼슘전류를 유발하였다. 대조군에서 oxoM을 가하기 전에 이미 칼슘전류의 PFR이 **<1**로 나타나 강한 prepulse(+**80** mV)에 의해 칼슘전류의 비활성(inactivation)이 이미 일어났음을 알 수 있었다. 칼슘전류가 oxoM에 의해 억제될 때도 prepulse facilitation이 나타나지 않는 VI 모드로 일어나는 것을 확인하였다(그림 **21**A). 따라서 GAR-3 활성에 의한 칼슘전류의 억제가 전압의존적으로 일어나지 않았기 때문에 G_i/G_o나 G_s 단백질이 매개할 가능성은 상대적으로 매우 낮았다. 이와 일치하여 COS-7 세포를 PTX(**500** ng/ml) 나 CTX(**1** μg/ml)로 전 처치(**1**8 시간)하였을 때 oxoM에 의한 칼슘전류의 억제는 별 영향을 받지 않았다(그림 **21**A). 평균적으로 칼슘전류의 억제 크기는 대조군, PTX 실험군, 그리고 CTX 실험군에서 각각 **75**±**5**%(n=**15**), **70**±**5**%(n=6), 그리고 64±**5**%(n=**1**3)로 두군 사이에 유의한 차이가 없었다(그림 **21**B). 그러나 $G\alpha_{q/11}$을 비활성화 시키는 PMT (**500** ng/ml)를 전 처치(**1**8 시간)하였을 때 oxoM에 의한 칼슘전류의 억제는 **2**9±**5**% (n=**5**)로 대조군에 비해 현저히 억제되었다. 이러한 결과로부터 GAR-3는 M_1 수용체와 비슷하게 $G_{q/11}$ 단백질을 매개하여 N-형 칼슘전류를 억제한다는 것을 알 수 있었다.

3.10. GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제에서 Gα 및 Gβγ 서브유닛의 역할

이미 설명한대로 내심신경세포에서 M_1 수용체의 활성에 의한 칼슘채널억제의 경우 Gβγ가 직접 억제를 매개하고, Gα는 억제모드를 결정하는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 다음 실험에서는 M_1 수용체와 마찬가지로 $G_{q/11}$에 연결되어 있는

GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류의 억제에서 Gα와 Gβγ의 역할을 규명하였다. 이를 위해 M_1 수용체의 경우 사용했던 연구방법, 즉, 각 서브유닛을 완충할 수 있는 단백질을 과발현시켜서 oxoM에 의한 칼슘전류 억제 크기 및 모드의 변화를 확인하는 방법을 이용하였다. 먼저 Gβγ를 완충하는 MAS-GRK3와 트랜스듀신을 각각 과발현시켰을 때, GAR-3 수용체의 활성에 의한 칼슘전류의 억제를 현저하게 감소시켰다(그림 **22**A). 이러한 Gβγ chelator에 의한 N-형 칼슘전류억제의 차단은 같은 COS-7 세포에서 M_1 수용체를 활성화 시킨 경우에도 볼 수 있었다. 평균적으로 대조군 세포, MAS-GRK3및 드랜스듀신이 발현된 COS-7 세포에서의 GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘전류의 억제크기는 각각 **75**±4%(n=**15**), 9±**2**%(n=**5**), 그리고 **12**±3%(n=6)이었으며, M_1 수용체의 경우 각각 78±3%(n=7), **10**±**5**%(n=6), 그리고 **1**8±3%(n=6)이었다(그림 **22**B). Gα-GTP를 완충하기 위해 PLCβ-ct를 과발현 시켰을 때 GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류의 억제크기는 3**1**±**5**%(n=6)로 대조군보다 유의하게 작았다. 흥미롭게도 M_1 수용체의 경우 칼슘전류의 억제에는 영향이 없었던 내심신경에서의 결과와는 다르게 PLCβ-ct를 과발현에 의한 Gα-GTP의 완충에 의해 칼슘전류의 억제크기가 49±6%(n=7)으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(그림 **22**B). 더 중요한 것은 COS-7 세포에서는 Gα-GTP을 완충하더라도 VI 모드가 VD 모드로 전환이 되지 않는다는 결과인데 내심신경에서 관찰되었던 것과는 크게 차이가 있었다.

3.11. GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널 억제모드의 $Ca_v\beta$ 서브유닛 의존성

이종발현시스템인 COS-7에서 발현된 N-형 칼슘채널 전류는 강한 탈분극 prepulse(+8**0** mV)에 의해 비활성(inactivation)이 일어났는데 이는 $Ca_v\beta_3$ 서브유닛이 같이 발현되었기 때문이다(Stotz 등, **200**4). 이러한 $Ca_v\beta$에 의한 N-형 칼슘채널 비활성에 의해 GAR-3 수용체 활성에 의한 칼슘채널 억제모드가 VI로 나타났는지를 확인하기 위해 COS-7 세포에 $Ca_v\beta_3$ 대신에 $Ca_v\beta_{2a}$를 발현시킨 후 double

pulse 프로토콜로 칼슘전류를 유발시켰다. 그림 **2**3A에 나타낸 바와 같이 $Ca_v\beta_{2a}$를 발현시켰을 때 oxoM이 없는 기초 상태에서 N-형 채널의 비활성은 나타나지 않았으며 오히려 facilitation이 나타났다. 놀랍게도 oxoM에 의한 칼슘전류의 억제는 VD 모드로 나타났으며 $Ca_v\beta_3$을 발현시켰을 때보다는 그 전류억제 크기가 감소되었다. 평균적으로 $Ca_v\beta_{2a}$ 또는 $Ca_v\beta_3$를 발현시켰을 때 N-형 칼슘채널의 억제 크기는 각각 43±4%(n=**5**)와 **75**±4%(n=8)이었다. PFR은 $Ca_v\beta_{2a}$의 경우 oxoM을 가하였을 때 **1**.**05**±**0**.**04**에서 **1**.8±**0**.**25**로 증가하였으나, $Ca_v\beta_3$의 경우 **0**.84±**0**.**02**에서 **0**.**54**±**0**.**04**로 오히려 감소하였다. 이상의 결과로부터 N-형 칼슘채널 억제의 크기와 모드는 같이 발현된 $Ca_v\beta$의 아형에 따라 많은 영향을 받음을 알 수 있었다.

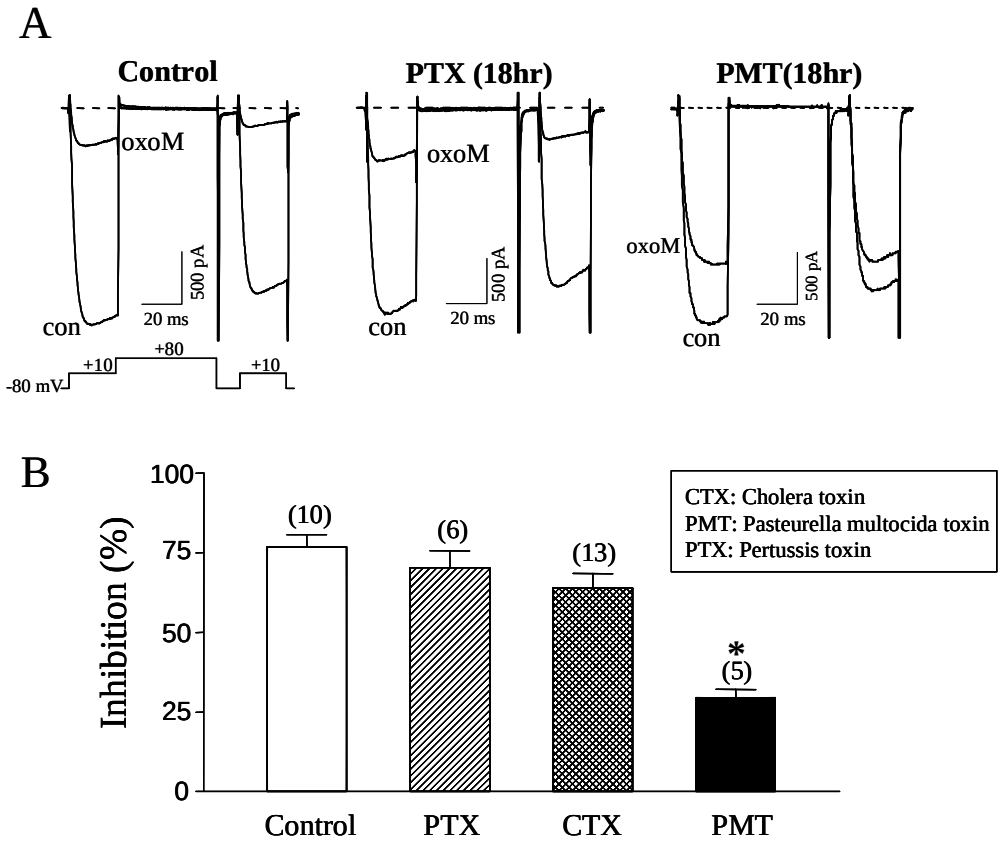

그림 21. COS-7 세포에서 GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류 억제를 매개하는 G 단백질의 약리적 동정. 칼슘전류 억제에 미치는 PTX 및 PMT의 효과(A) 및 요약(B). GAR-3를 이종발현시킨 COS-7세포를 CTX, PTX, 및 PMT(각각 **500** ng/ml)를 각각 **1**8 시간동안 전 처치한 후 peak 전류에 미치는 oxoM(**100** μM)의 효과를 기록하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. *****p<**0.01**

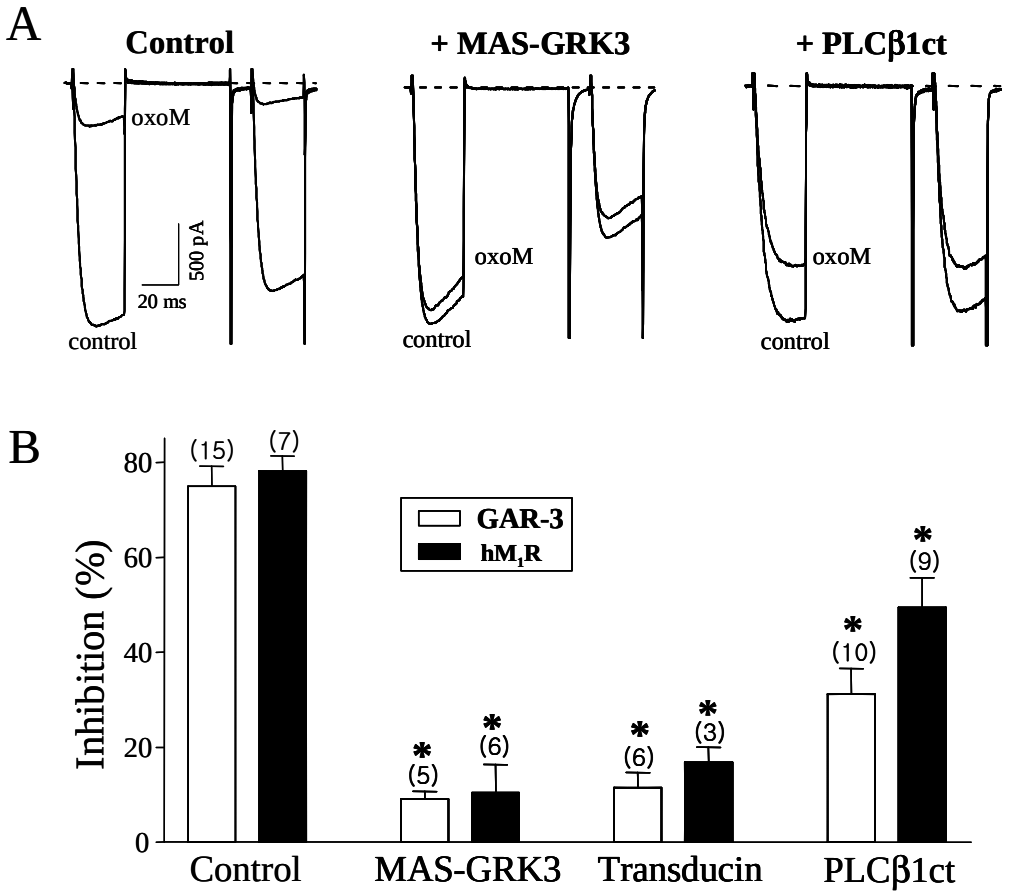

그림 22. GAR-3 **수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류 억제에서의 Gα 및 Gβγ의 역할.** $G\alpha_{q/11}$을 완충(chelation)하는 PLCβ**1**-ct와 Gβγ를 완충하는 GRK3-ct의 oxoM (**100** μM)에 의한 칼슘전류억제의 차단효과(A) 및 요약(B). GRK3-ct가 세포막에 잘 발현되도록 myristic acid attachment(MAS)을 N 말단에 결합시켰다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. *****$p<0.01$

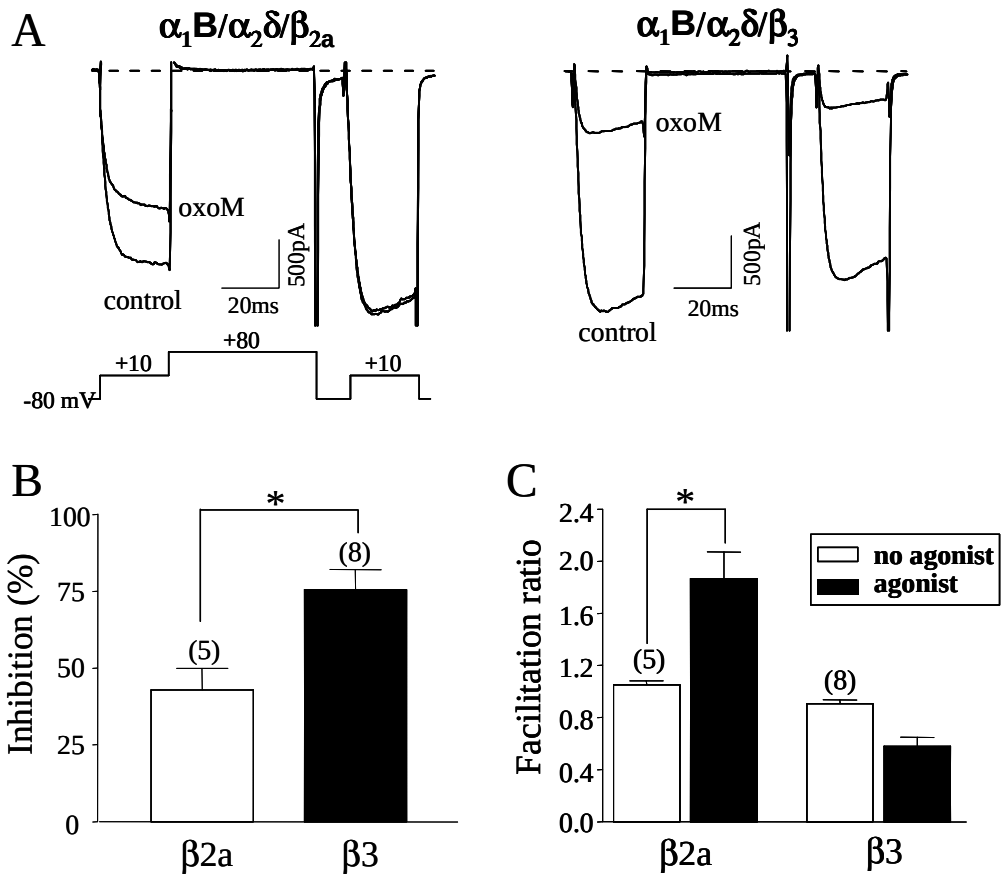

그림 23. GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘전류 억제에 미치는 $Ca_v\beta$ 보조 서브유닛의 효과. $Ca_v\beta_{2a}$와 $Ca_v\beta_3$를 각각 발현시킨 COS-7 세포에서 oxoM(**100** μM) 유무에 따른 칼슘전류 traces(A), 억제% 요약(B), 및 prepulse facilitation 요약 (C). 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였고, 괄호 안의 숫자는 실험례수(n)를 나타낸다. ***p<0.05** Inset:칼슘전류 유발에 사용된 double pulse 프로토콜을 나타냄.

제 4장 고찰

신경전달물질이나 호르몬에 의한 칼슘채널의 조절은 크게 인산화 및 G 단백질에 의한 것으로 나누어질 수 있다. 인산화에 의한 칼슘채널의 조절에 관한 연구는 주로 골격근, 심근, 그리고 평활근 분포하는 L-형 칼슘채널이 cAMP 의존적 PKA에 의해 항진되는 것에 초점을 맞추어 이루어졌다(Catterall, **2000**). 최근에는 Xenopus oocyte에 발현된 LVA T-형 칼슘채널 중 $Ca_v3.2$(H-형)이 PKC 활성에 의해 3배 이상 항진된다는 것이 보고 된 바 있다(Park 등, **200**3). 반면에 G 단백질에 의한 칼슘채널의 조절은 L-형을 제외한 HVA 칼슘채널(주로 N-형이나 P/Q-형)에서 일어나는 데, 활성화되는 신경전달물질 수용체에 따라 생물리학적으로 크게 두 가지 경로, 즉, 전압의존적(VD) 및 전압비의존적(VI) 경로로 항진보다는 주로 억제가 일어난다는 것이 밝혀졌다. 현재 PTX에 민감한 $G_{i/o}$ 단백질에 의해 매개되는 칼슘채널의 VD 억제의 메커니즘이 분자수준에서 거의 밝혀졌으나(Ikeda and Dunlap, **1**999), PTX에 민감하지 않은 G 단백질에 의해 매개되는 VI 억제에 관련된 분자적 메커니즘의 규명은 아직 부족한 상태에 있다. 따라서 본 연구에서는 무스카린성 수용체 활성에 의한 HVA 칼슘채널의 VI 억제 메커니즘의 일부를 밝혀내려고 노력하였다. 본 연구에서 밝혀낸 두 가지 주요 결과는 첫째, 인간 M_1 수용체 활성에 의한 HVA 칼슘채널의 VI 억제는 PMT에 민감한 heterotrimeric $G_{q/11}$ 단백질의 α와 βγ 서브유닛의 협동작용에 의해서 일어나며, Gα와 Gβγ는 각각 칼슘채널 억제의 모드와 크기를 결정하는 중요한 요소들이라는 것과 둘째, 꼬마선충 GAR-3 무스카린성 수용체가 HVA 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 있으며, M_1 수용체 활성 시와 마찬가지로 $G_{q/11}$에 의해 매개되는 VI 억제를 일으킨다는 것이다.

본 연구에서 세포모델로 쥐의 심장을 지배하는 부교감 신경세포를 사용한 것은 다음의 두 가지 이유 때문이다. 첫째, 칼슘채널의 아형들이 약리학적으로 잘 동정이 되어 있다는 것이다(Jeong 및 Wurster, **1**997a). 성숙 쥐 내심신경세포에 발

현되는 칼슘채널 아형은 L-, N-, Q-, 그리고 R-형이며 이중 N-형 칼슘채널은 전체의 60% 이상을 차지하여 신경전달물질에 의한 조절의 주 대상이라 할 수 있다. 둘째, 다양한 신경전달물질(예, NE, NPY, opioid, Ach)들이 일으키는 칼슘채널의 VD 억제 메커니즘이 잘 밝혀져 있다는 것이다(Jeong 등, 1999). 특히, Ach에 의한 M_2 수용체 활성이 유발하는 칼슘채널의 VD 억제 메커니즘이 잘 밝혀져 있어(Jeong 및 Wurster, 1997b) M_1 수용체가 매개하는 VI 억제의 중요한 양성 대조군(positive control)을 제공한다는 것이었다. 무엇보다도 내심신경세포에는 5가지 무스카린성 수용체 아형들(M_1-M_5) 중 MTT에 민감한 M_2 수용체만(신생 쥐의 경우 M4; Cuevas 등 1997)이 기능적으로 발현되어 있고, 그 수용체의 기능도 PTX에 의해 거의 100% 차단될 수 있기 때문에 신경세포에 이종발현된 M_1 수용체를 비교 연구하기가 용이하다고 할 수 있다.

M_1 수용체가 이종 발현된 내심신경세포를 PTX로 처리한 후 Cch을 가하면 M_1 독소(MT-2)에 민감한 칼슘채널의 억제가 일어나는 데 그 억제 모드가 VI 라는 사실을 효현제 존재 시 칼슘전류의 “kinetic slowing”과 “prepulse facilitation”이 일어나지 않는 것으로 확인할 수 있었다. 일반적으로 칼슘채널의 VD 억제는 주로 PTX에 민감한 $G_{i/o}$에 의해 매개되는 것으로 밝혀졌지만(Ikeda and Dunlap, 1999) 예외적으로 VIP 수용체에 연결된 CTX에 민감한 G_s(Zhu 및 Ikeda, 1994) 나 PTX에 민감하지 않는 G_i 아과의 한 멤버인 G_z(Jeong 및 Ikeda, 1998)에 의해서도 매개된다고 알려졌다. 칼슘채널의 VD 억제를 일으키는 이들 다양한 종류의 heterotrimeric G 단백질의 active moiety는 공통적으로 Gβγ인데(Herlitze 등, 1996; Ikeda, 1996) 이는 Gβγ를 완충하는 Gα-GDP를 과발현시켰을 때 칼슘채널 억제가 차단되는 지를 관찰하면 쉽게 확인 할 수 있다(Jeong 및 Ikeda, 1999). 그런데 흥미롭게도 내심신경세포에서 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제를 매개하는 것도 Gβγ 임을 트랜스듀신(Gαtr-GDP)과 GRK2-ct를 과발현하여 확인할 수 있었다. 따라서 칼슘채널의 억제모드와 상관없이 억제여부나 크기를 결정하는 공통인자는 유리된 Gβγ 임을 알 수 있다. M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널 억제에 있어서 Gβγ의 소스는 $G_{q/11}$ 단백질로 광견병 독소인 PMT를 사용하여 확인할 수 있었다. PMT는 짧은 시간 가하면 활성화된 $G\alpha_{q/11}$-GTP를 많이 만들어내고 PLC-IP_3

경로에 의한 세포 내 칼슘을 증가시켜 여러 가지 다양한 생리작용을 일으키지만 실험에서와 같이 장시간 처리를 하면 오히려 $G_{q/11}$를 비활성화시키는 효과를 가져온다(Wilson 및 Ho, **2004**). 내심신경세포는 $G_{i/o}$ 및 $G_{q/11}$ 단백질을 발현하고 있는 것이 역전사 연쇄중합반응에 의해 확인되었으며, M_2 수용체는 PTX에 민감한 $G_{i/o}$를, M_1 수용체는 PMT에 민감한 $G_{q/11}$을 매개하여 칼슘채널 억제를 일으키는 것으로 생각된다. 그런데 현재까지 **5**개의 Gβ(β_1-β_5)과 **11**개의 Gγ(γ_1-γ_{12}, γ_6는 γ_2로 재명명됨)가 밝혀졌는 데(Watson 및 Arkinstall, **1**994; Clapham 및 Neer, **1**997) 이들 Gβ와 Gγ 사이에 이루어지는 조합은 많지만 어떤 조합의 Gβγ 서브유닛이던지 신경세포에 발현되면 칼슘채널의 긴장성 억제를 유발할 수 있다는 것이 밝혀졌다(Ruiz-Velasco 및 Ikeda, **2000**). 하지만 몇몇 연구에서는 특정 heterotrimeric G 단백질 조합이 무스카린성 수용체에 특이성을 가지고 연결된다고 하였다. 예를 들어 쥐 뇌하수체 세포주(GH_3)에서 M_4 수용체는 $\alpha_{oA}\beta_3\gamma_4$로 이루어진 G 단백질에 연결된다고 하였다(Schneider 등, **1**997). 따라서 내심신경세포에 발현된 M_1 수용체는 어떤 $G_{q/11}$ heterotrimer에 연결되어 특이성을 가지고 칼슘채널을 억제하는 지 확인한다면 흥미로울 것이다.

내심신경세포에서 M_1 수용체에 의한 칼슘채널의 억제에는 M_2 수용체에 의한 것처럼 Gβγ가 관여하지만 VI 억제를 유발하기 위해서는 $G\alpha_{q/11}$이 더 필요한 것으로 확인되었다. 어떤 신호전달과정에서 $G\alpha_{q/11}$이 관여하는 지를 확인하는 방법 중의 하나는 이 서브유닛을 완충하는 단백질(예, RGS**2** 또는 PLCβ-ct)을 과발현시켰을 때 해당 신호전달이 억제되는 지 유무를 관찰하는 것이다. 대부분의 RGS과에 속한 아형들은 $G_{i/o}$나 $G_{q/11}$의 종류와 상관없이 Gα 서브유닛에 내재된 GTPase의 활성을 증가시켜 G 단백질에 의한 신호전달의 종결(termination)을 촉진하게 된다. 그러나 RGS**2**는 활성화된 $G\alpha_{q/11}$에만 선택적으로 작용하는 것으로 확인되었다(Heximer 등, **1**997). 내심신경세포에서 RGS**2**와 PLCβ-ct를 과발현시켜 $G\alpha_{q/11}$-GTP를 완충하였을 때 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 억제크기에는 영향이 없었으나, 억제모드가 VI에서 VD 모드로 전환이 일어났다. 현재 $G\alpha_{q/11}$이 어떻게 VI 억제를 일으킬 수 있는지 명확하지 않다. 일반적으로 칼슘채널의 VD 억제의 경우 칼슘채널에 결합되어 있던 Gβγ가 강한 탈분극 prepulse에 의해 떨어져

나오기 때문이며 이러한 relief 후 재결합 속도는 칼슘채널 주위의 유리 Gβγ의 농도에 비례하는 것으로 알려져 있다(Emslie, 2003). 그러나 만약 $G\alpha_{q/11}$이 직접적으로 칼슘채널에 작용하거나 아니면 간접적으로 신호전달물질이 칼슘채널에 결합되어 있는 Gβγ의 결합을 더욱 강화시킨다면 강한 탈분극 prepulse(+80 mV)에 의해서도 Gβγ가 유리되지 못해서 VI 억제모드가 나타날 수 있을 것이다. 이러한 추론의 사실여부와 상관없이 왜 다른 종류의 Gα는 $G\alpha_{q/11}$과 같이 VI 모드를 유지하지 못하는가에 대한 의문이 생길 수 있다. 예를 들면 NE에 의한 α_2 수용체나 Cch에 의한 M_2 수용체가 활성화될 때 Gβγ와 같이 유리되는 $G\alpha_{i/o}$는 칼슘채널의 억제에서의 역할이 명확하지 않다. 현재 $G\alpha_{i/o}$-GTP는 단순히 RGS 단백질의 작용으로 내재적인 GTPase의 활성이 증가하면 $G\alpha_{i/o}$-GDP로 빠르게 전환되어 Gβγ와 다시 재결합함으로써 칼슘채널 조절의 과정을 끝내는 수동적인 역할만 하는 것으로 보인다.

Delmas 등(1999)은 M_1 수용체 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제를 위해서 $G\alpha_{q/11}$ 또는 밝혀지지 않은 어떤 물질이 직접적으로 N-형 칼슘채널에 작용하여 Gβγ의 결합이 떨어지지 않을 것이라 주장하였으나 칼슘채널 위에 $G\alpha_{q/11}$의 결합부위가 아직 명확하지 않다. 한편, $G\alpha_{i/o}$와 $G\alpha_{q/11}$의 칼슘채널억제에서의 역할이 차이가 나는 것은 $G\alpha_{q/11}$이 활성화시키는 신호전달과정 때문일 수 있을 것이다. 구체적으로 $G\alpha_{q/11}$은 세포막에 존재하는 PLCβ를 활성화하여 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP_2)를 diacylglycerol(DAG)과 IP_3로 분해 시킨다. 이 신호전달과정에 의해 나타나는 주된 신호전달물질의 변화는 PKC의 활성증가, 세포 내 칼슘의 증가, 그리고 세포막 내 PIP_2의 고갈(depletion)이다. 과거의 연구에서 칼슘채널 α_1 서브유닛의 $L_{I\text{-}II}$에 Gβγ의 결합부위(AID)가 PKC에 의해 인산화되면 G 단백질에 의한 칼슘채널의 억제가 일어나지 않아 오히려 칼슘채널의 항진이 나타난다고 하였다(Stea 등, 1995). 따라서 PKC에 의한 인산화는 칼슘채널의 VI 억제와는 관련이 없을 것이다. 최근의 Xenopus oocyte를 이용한 연구에서 세포 내 칼슘의 증가는 PIP_2와 함께 Gβγ를 결합할 수 있는 $Ca_v2.1$(P/Q-형)의 상태를 안정화시켜 칼슘 채널의 긴장성 억제(효현제가 없을 때의 tonic inhibition)를 일으킨다고 하였다(Rousset 등, 2004). 같은 실험에서 oocyte에 BAPTA를 주입하여 세포 내 칼슘을

완충시키면 칼슘채널의 억제가 풀리며 칼슘전류의 증가가 나타나는 것을 관찰하였다. 이러한 결과와 유사하게 쥐 상경신경절 세포에서 M_1 수용체 활성에 의해 느리게 일어나는 L- 및 N-형 칼슘채널의 억제가 BAPTA에 민감하다는 사실이 확인되었으나 칼슘채널 억제의 전압의존성에 미치는 영향은 평가되지 않았다 (Mathie 등, **1**992). 하지만 본 연구에서 세포 내 칼슘을 고농도(**10** mM)의 BAPTA로 빠르게 완충하였을 때 Cch에 의한 칼슘전류의 초기 억제가 VD 모드로 나타나 억제모드의 Ca^{2+} 의존성을 확인하였다. 물론 VD 모드는 지속적으로 유지되지 못하고 몇 번의 시험펄스 후 VI로 전환되었지만 만약 charge carrier를 **2** mM Ca^{2+}을 사용했거나 Ba^{2+}을 사용했다면(이 경우 내심신경에서 M_1 수용체 활성에 의해 ER로부터 칼슘이 어느 정도 유리가 될 것을 전제로 하기 때문에 앞으로 이를 확인해보아야 할 것임) BAPTA의 완충능이 포화되는 것을 지연 또는 억제하여 VD 모드가 오랫동안 유지되었을 것이다. 이러한 추론을 뒷받침하는 예로 Ca^{2+} 완충제로 BAPTA 대신 완충이 느리게 일어나는 EGTA를 사용했을 때 초기에 나타나는 칼슘전류 억제의 VD 모드가 명확히 관찰되지 않았다는 것을 들 수 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 Gβγ는 칼슘채널에 직접 결합하여 억제를 일으킨다고 하였다(Page 등, **1**997; Qin 등, **1**997; Meza 및 Adams, **1**998; Simen 등, **2001**). 칼슘채널의 Gβγ 결합 부위는 도메인 I과 II사이의 세포내 루프(L_{I-II})에 두 개(De Ward 등, **1**997; Furukawa 등, **1**998; Zamponi 등, **1**997), C-말단(Qin 등, **1**997; Furukawa 등, **1**998a; Kinoshita 등, **2001**) 및 N-말단(Page 등, **1**998)에 각 한개씩 모두 4개가 있는 것으로 알려졌다. 한 연구에 의하면 한 개의 Gβγ만 있으면 칼슘채널을 통한 conduction을 억제한다고 하였다(Zamponi 및 Snutch, **1**998). 따라서 G-단백질에 의해 활성화 되는 K_{Ach} 채널 (GIRK)의 경우(Huang 등, **1**997; Mirshahi 등, **2002**)와 유사하게 칼슘채널의 4개의 결합부위가 모여 한 개의 Gβγ 분자가 결합할 수 있는 결합 포켓(pocket)을 형성할 것으로 보인다. 그러나 이들 부위에 Gβγ가 결합하는 과정에는 칼슘의존성이 없는 것으로 밝혀져(Qin 등, **1**997; De Ward 등, **1**997) 앞으로 칼슘채널의 VI 억제에서 Ca^{2+}의 작용기전(calmodulin의 역할 포함)이 명확히 밝혀져야 할 것이다.

최근에 PIP_2는 칼슘채널을 비롯하여 ATP-sensitive K^+ 채널, K_{Ach} 채널(GIRK),

KCNQ(M-전류), TRPM7, ENaC, 그리고 Na^+/Ca^{2+} transporter 등의 활성을 조절하는 중요한 조절자(modulator)라는 것이 많이 알려져 있다(Suh 및 Hille, **2005**). 앞에서 언급한 바와 같이 PIP_2는 Ca^{2+}과 함께 Gβγ가 결합하는 칼슘채널의 상태를 안정하게 해준다고 하였다(Rousset 등, **2004**). 따라서 $G\alpha_{q/11}$의 활성에 의해 일시적으로 PIP_2의 고갈이 나타나면 칼슘채널에 Gβγ의 결합이 불안정해질 수 있을 것이다. 이런 경우에는 오히려 칼슘채널에 결합되어 있는 Gβγ가 강한 탈분극 prepulse에 의해 쉽게 떨어져 나오는 VD 모드의 억제가 일어날 것으로 예상되기 때문에 본 연구결과의 설명으로는 적합하지 않다. 최근의 한 연구에서 PIP_2가 P/Q-형 및 N-형칼슘채널에 존재하는 두 결합부위(S 및 R)에 결합하는 정도에 따라 칼슘채널의 VD 억제에서 볼 수 있는 "reluctant 모드"(제**1** 장 서론 참조)를 촉진시키는 역할과 이와 반대로 비활성에 의한 "run-down"을 방지하는 역할을 한다고 하였다(Wu 등, **2002**). 전자의 PIP_2 역할은 본 연구결과와 상충되는 것인데 반해 후자의 경우 $G\alpha_{q/11}$의 활성에 의해 일시적으로 PIP_2의 고갈이 와서 칼슘채널의 비활성이 증가할 경우 prepulse facilitation이 정상적으로 일어나더라도 비활성효과에 의해 가려질 것으로 추측된다. 이러한 가능성은 COS-7 세포에 GAR-3 수용체와 함께 발현된 N-형 칼슘채널이 $Ca_v\beta3$에 의해 비활성이 증가할 때 $G\alpha_{q/11}$를 완충하더라도 Cch에 의한 칼슘채널 억제가 VI에서 VD 모드로 전환되지 않는다는 결과에 의해 뒷받침 될 수 있다. 앞으로 PIP_2의 세포막 농도를 증감시키거나(예, PI3 및 PI4 kinase 차단제인 wortmannin의 사용, anti-PIP_2 주입, PIP_2 dialysis 등) 칼슘채널의 비활성을 줄이는 방법(예, prepulse 기간의 조절) 등을 이용하여 $G\alpha_{q/11}$ 및 PIP_2의 역할을 확인해야할 것이다.

본 연구에서는 M_1 수용체에 활성에 의한 HVA 칼슘채널의 VI 억제 메커니즘 규명 외에 꼬마선충 무스카린성 수용체인 GAR-3가 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 있다는 사실을 최초로 규명하였다. GAR 수용체 과에 속하는 GAR-**1**, GAR-**2**, 그리고 GAR-3의 세 가지 아형이 최근에 클로닝이 되었는데 이중 GAR-**2** 수용체의 경우 세 개의 splicing variant가 알려졌는데 GIRK**1**에 기능적으로 연결되는 것으로 확인되었다(Suh 등, **2001**). 일반적으로 포유동물 세포에서의 GIRK의 활성화는 Gβγ에 의해 매개되는 것으로 알려져 있기 때문에 GAR-**2**는 M_2 수용체

와 유사하다고 볼 수 있다. COS-7 세포에 발현된 GAR-3 수용체를 무스카린성 수용체 효현제인 oxoM으로 활성화시켰을 때 N-형(α1B/$Ca_v\beta_3$/$\alpha_2\delta$) 칼슘채널을 억제시켰는데 PMT에 의해 그 억제가 차단되는 것으로 보아 $G_{q/11}$ 단백질이 매개함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Xenopus oocyte에 발현시킨 GAR-3 수용체가 PLC-IP_3 경로에 의한 Ca^{2+}-activated Cl^- 채널의 활성을 $G_{q/11}$ 단백질이 매개한다는 사실과 비슷하였다(Hwang 등, 1999). GAR-3는 기능면에서나 약리학적인 효능이나 역가에 있어서도 인간 M_1 수용체와 매우 유사함을 알 수 있었다. GAR-3에 활성에 의한 칼슘채널의 억제는 $Ca_v\beta_3$를 α1B/$\alpha_2\delta$와 같이 발현시켰을 때는 VI 모드로 나타났다. 이 경우 M_1 수용체의 경우에서와는 달리 G$\beta\gamma$외에도 Gα 서브유닛이 칼슘채널 억제에 어느 정도 관여하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 앞에서 설명한바와 같이 $G\alpha_{q/11}$-PLC 경로에 의해 PIP_2를 고갈시켜 칼슘채널의 일시적인 억제(run-down에 의한)가 유발되는 것으로 설명할 수 있겠다(Wu 등, 2002). PLCβ-ct를 과발현시켜 $G\alpha_{q/11}$를 완충시켰을 때 kinetic slowing만 나타나고 prepulse facilitation은 관찰되지 않았다. 그 이유는 이전에 보고 된 바와 같이(Olcese 등, 1994; Meir 및 Dolphin, 2002) 다른 보조 서브유닛들($Ca_v\beta_1$, $Ca_v\beta_2$, $Ca_v\beta_4$)에 비교하여 $Ca_v\beta_3$을 발현시킨 경우에는 효현제가 없는 상태에서 이미 칼슘전류의 kinetics가 빨라지는 비활성화가 나타나고 prepulse 후 그 정도가 더 커져서 prepulse facilitation에 반대로 작용하기 때문이다. 내심신경에서 이러한 현상을 볼 수 없었던 것은 칼슘채널의 비활성에 $Ca_v\beta_3$보다는 덜 영향을 주는 보조 서브유닛(특히, $Ca_v\beta_1$)이 같이 혼재하기 때문일 것으로 추측된다. 참고로 COS-7 세포는 Xenopus oocyte와는 달리 내재적으로 $Ca_v\beta$를 발현하지 않는 것으로 확인된 바 있다(Meir 등, 2000). 무엇보다 흥미로운 사실은 GAR-3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널의 억제 모드는 $Ca_v\beta_3$ 대신 $Ca_v\beta_{2a}$를 발현시켰을 때 VD 모드로 바뀌면서 oxoM에 의한 전류의 억제크기도 현저히 감소한다는 것이었다. 이러한 결과는 이전에 COS-7 세포에 이종발현된 $\beta_1\gamma_2$ 서브유닛이 N-형 칼슘채널의 긴장성 억제를 유발할 때 prepulse facilitation이 $Ca_v\beta$ 종류에 상관없이 일어난다는 보고(Meir 및 Dolphin, 2002)와 Xenopus oocyte에서 $Ca_v\beta_3$이 무스카린성 수용체(이 경우 M_2)에 의해 유도되는 G 단백질 억제의 prepulse facilitation을 오히려 증가시킨다는 보고

(Roche 및 Treistman, **1**998)와는 전혀 일치하지 않는다고 볼 수 있다. $Ca_v\beta_{2a}$의 발현에 의한 칼슘채널의 VD 억제의 이유는 두가지로 말할 수 있는 데 첫째는 칼슘채널 L_{I-II} 에 결합하기 위한 G 단백질 $\beta_1\gamma_2$ 서브유닛과의 경쟁에서 $Ca_v\beta_{2a}$이 $Ca_v\beta_3$보다 약하거나 $Ca_v\beta_{2a}$이 칼슘채널의 비활성에 영향을 주지 않아 (또는 비활성을 억제하여) 상대적으로 $G\alpha_{q/11}$의 역할이 작은 때문이다. 앞으로 칼슘채널의 VI 억제에서 $Ca_v\beta$의 작용과 관련 메커니즘이 무엇인지 내심신경세포에서 구체적으로 확인하는 것이 필요할 것이다.

본 연구에서 확인한 칼슘채널의 VI 억제의 생리학적인 의의는 아직 명확하지 않다. VD 억제에서 볼 수 있는 prepulse facilitation은 신경에서 연속적으로 활동전압의 train이 올 때 나타날 수 있는데 신경전달물질에 의한 시냅스전 칼슘채널의 음성되먹임 억제 (negative feedback inhibition)가 감소되어 활동전압 빈도의존적 (frequency-dependent) 신경전달물질의 유리를 촉진시키는 역할을 할 것이다 (Toth 및 Miller, **1**99**5**; Song 및 Surmeier, **1**996; Williams 등, **1**997; Brody 및 Yue, **2000**). 따라서 칼슘채널의 VI 억제의 경우 이와 반대로 신경세포의 활동이 증가하여도 시냅스에서 칼슘채널의 음성되먹임 억제를 그대로 유지시킴으로써 신경전달물질 방출을 감소시키는 역할을 할 것으로 추정된다. M_1 수용체의 활성에 의한 칼슘채널의 VI 억제는 RGS**2**의 과발현에 의해 VD 억제로 전환된다. 이러한 RGS**2**는 RGS과에 속한 여러 아형들 중에 매우 특이한 데 항우울제(Robinet 등, **2001**) 나 seizure(Gold 등, **2002**) 등에 의해 그 전사(transcription)가 증가한다고 알려졌다. 따라서 본 연구결과로부터 RGS**2**의 발현수준이 증가하면 M_1 수용체를 활성화하더라도 칼슘채널의 VD 억제가 일어나서 강한 자극이 오면 신경전달물질의 유리를 오히려 증가시켜 신경활동을 더 항진시키는 한편 $G\alpha_{q/11}$-PLC-IP_3 경로에 의한 세포 내 칼슘도 증가시켜 세포에 영향을 줄 것으로 짐작된다. 한편, 꼬마선충은 유전자의 수가 포유동물에 비해 매우 적으며 이들 유전자의 종류가 모두 밝혀져 있다. 따라서 이들 유전자를 SiRNA silencing 방법으로 제거하여 streotyped 행동(예, 섭식, 생식, 도피 등)의 변화를 관찰함으로써 유전자-기능의 관계를 용이하게 규명할 수 있다. 꼬마선충에서 발견된 단백질의 대부분이 인간의

뇌에서 발견되기 때문에 해당유전자의 기능을 간접적으로 유추할 수 있다. 특히, 무스카린성 수용체인 GAR-3의 칼슘채널 조절에서의 역할을 파악하고, 꼬마선충에서의 기능을 규명할 수 있다면 앞으로 인간 뇌 기능에 있어 무스카린성 수용체의 역할 연구에 많은 도움이 될 수 있을 것이다.

제 5장 결 론

쥐 내심신경세포 및 COS-7 세포에 각각 이종발현이 된 인간 M_1 및 꼬마선충 GAR-3 무스카린성 수용체의 활성에 의한 HVA(특히, N-형) 칼슘채널의 전압비의존적 조절 메커니즘을 세포 및 분자수준에서 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 내심신경세포에서 M_1 수용체는 고전압에서 활성화되는 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 효현제의 농도의존적으로 억제를 일으켰다.

2. 역전사 연쇄중합반응 분석결과 내심신경세포에는 $G_{q/11}$ 아과의 아형들이 모두 발현됨을 확인할 수 있었는데, M_1 수용체활성에 의한 칼슘채널의 억제 작용은 전압비의존적으로 일어나며, 광견병 독소에 민감한 $G_{q/11}$ 단백질에 의해 매개되었다.

3. 유리 Gβγ를 트랜스 듀신과 GRK**2**-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제 정도는 현저히 감소하였다. $G\alpha_{q/11}$을 RGS**2**나 PLCβ-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제 정도에는 크게 영향이 없었으나, 억제모드가 전압비의존적 모드에서 전압의존적 모드로 전환되었다.

4. 세포 내 칼슘을 고농도의 BAPTA로 완충하였을 때 전압비의존적 억제가 일어나는 속도가 증가하였다.

5. 한편, COS7 세포에 이종발현시킨 꼬마선충 GAR-3 무스카린성 수용체는 N-형 칼슘채널에 기능적으로 연결되어 억제작용을 일으켰으며, 아트로핀에 의해 그 억제작용이 차단되었다.

6. GAR3 수용체활성에 의한 N-형 칼슘채널의 억제 작용은 효현제의 농도의존적으로 일어났으며, 억제작용의 역가는 M_1 수용체를 발현하였을 때와 거의 차이가 없었다.

7. G 단백질을 비활성화시키는 GDPβS를 세포 내로 넣어주었을 때, oxo-M에 의한 N-형 칼슘채널의 억제가 차단되었다.

8. GAR-3 수용체활성에 의한 N-형 칼슘채널의 억제 작용은 전압비의존적으로 일어났으며 CTX와 PTX의 전 처치에 의해서는 차단되지 않았지만 PMT의 전 처치에 의해서는 차단되었다.

9. 유리 Gβγ를 트랜스듀신과 GRK**2**-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제 정도는 현저히 감소하였다. $G\alpha_{q/11}$을 PLCβ-ct로 완충하였을 때 칼슘채널의 억제정도가 **50**% 정도 감소되었다. 이때 칼슘전류의 kinetic slowing이 일어났지만 prepulse facilitation은 뚜렷하지 않았다 .

10. GAR3 수용체 활성에 의한 N-형 칼슘채널의 억제 작용의 모드는 칼슘채널 β 보조 서브유닛에 의존적으로 나타났다.

이상의 결과로부터 칼슘채널의 전압비의존적 억제에는 $G_{q/11}$ 단백질의 α 및 βγ 서브유닛이 모두 필요한데 Gβγ가 칼슘채널의 억제에 주된 역할을 하며, Gα는 전압비의존적 모드를 유지하는 데 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 세포 내 칼슘은 Gα가 작용하는 속도를 빠르게 해주는 역할을 할 것으로 추측되며, 칼슘채널을 이루고 있는 보조 서브유닛, 특히 $Ca_v\beta$의 역할이 중요함을 알 수 있었다. 앞으로 Gα가 칼슘채널에 직접적으로 작용하는 지를 FRET 등의 방법으로 확인하고, 칼슘채널 억제에 있어 여러 보조 서브유닛의 역할을 구체적으로 규명하는 것이 필요할 것이다.

참고문헌

Arreola J, Calvo J, Garcia MC, and Sanchez JA. Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibers of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate. *J Physiol* **1**987, 393:3**0**7-33**0**

Aosaki T and Kasai H. Characterization of two kinds of voltage-gated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotocin GVIA. *Pflugers Arch* **1**989, 4**1**4:**150-15**6

Bean BP. α-adrenergic modulation of cardiac calcium channel gating. In Ion Channels in the Cardiovascular System; Function and Dysfunction, ed. PM Spooner, AM Brown, WA Catterall, GJ Kaczorowski, HC Strauss, pp. **2**37-**252**. New York: Futura. **58**0 pp

Bean BP. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage-dependence. *Nature***1**989, 34**0**:**15**3-**155**.

Bell DC, Butcher AJ, Berrow NS, Page KM, Brust PF, Nesterova A, Stauderman KA, Seabrook GR, Nurnberg B, and Dolphin AC. Biophysical properties, pharmacology and modulation of human, neuronal L-type (α**1**D, Ca_V**1**.3) voltage-dependent calcium currents. *J Neurophysiol* **2001**, 85:8**1**6-8**2**7.

Beech DJ, Bernheim L, and Hille B. Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron* **1**99**2**, 8:97-**10**6.

Belcheva MM, Wong YH, and Coscia CJ. Evidence for transduction of mu but not kappa opioid modulation of extracellular signal-regulated kinase activity by G(z) and G(**12**) proteins. *Cell Signal* **2000**, **12**:48**1**-489.

Bernheim L, Mathie A, and Hille B. Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci* **1**99**2**, 89(**20**):9**5**44-9**5**48.

Bernheim L, Mathie A and Hille B. Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci* **1**999, 89:9**5**44 -9**5**48.

Berrow NS, Campbell V, Fitzgerald EG, Brickley K, and Dolphin AC. Antisense depletion of β-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol* **1**99**5**, 48**2**:48**1**-49**1**.

Birnbaumer L, Qin N, Olcese R, Tareilus E, Platano D, Costantin J, and Stefani E. Structures and functions of calcium channel subunits. *J Bioenerg Biomembr* **1**998, 3**0**:3**5**7-37**5**

Bootman MD, Lipp P, and Berridge MJ. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. *J Cell Science* **2001**, **11**4: **221**3-**2222**.

Brody DL and Yue DT. Relief of G-protein inhibition of calcium channels and short-term synaptic facilitation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **2000**, **20**:889-898.

Bunemann M, Gerhardstein BL, Gao T, and Hosey MM. Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the β_2 subunit. *J Biol Chem* **1**999, **2**74:338**51**-338**5**4.

Cachelin AB, DePeyer JE, Kokubun S and Reuter H. Ca^{2+} channel modulation by 8-bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature* **1**983, 3**0**4:46**2**-464.

Campbell V, Berrow NS, Fitzgerald EM, Brickley K, and Dolphin AC. Inhibition of the interaction of G protein G_o with calcium channels by the calcium channel β-subunit in rat neurones. *J Physiol* **1**99**5**, 48**5**:36**5**-37**2**.

Canti C, Page KM, Stephens GJ, and Dolphin AC. Identification of residues in the N-terminus of α**1**B critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by Gβγ. *J Neurosci* **1**999, **1**9:68**55**-6864.

Cassel D and Selinger Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc Natl Acad Sci* **1**977, 74(8):33**0**7-33**11**.

Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, and Perez-Reyes E. Cloning and expression of a neuronal calcium channel subunit. *J Biol Chem* **1**993a, **2**68:**12**35**9**-**12**366.

Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, and Perez-Reyes E. Cloning and expression of a third calcium channel subunit. *J Biol Chem* **1**993b, **2**68:34**50**-34**55**.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels *Annu Rev Cell Dev Biol* **2000**, **1**6: **521**-**555**.

Chen J, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, and Stoffel RH. A region of adenylyl cyclase **2** critical for regulation by G protein gamma subunits. *Science* **1**99**5**, **2**68:**11**66-**11**69.

Clapham DE and Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1**997, 37:**1**67-**20**3.

Conklin BR and Bourne HR. Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell* **1**993, 73(4):63**1**-64**1**.

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williansom MP, Fox M, Rees M, and Perez-Reyes E. Cloning and characterization of α**1**H from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res* **1**998, 83: **10**3-**10**9.

De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, and Takahashi M. Specific phosphorylation of a site in the full length form of the α**1** subunit of the cardiac L-type calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, **1**996 3**5**:**10**39**2**-**10**4**02**.

Delmas P, Abogadie FC, Dayrell M, Haley JE, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA, and Buckley NJ. G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-Type calcium currents in sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* **1**998, **10**:**16**5**4** -**1**666.

Delmas P, Abogadie FC, Milligan G, Buckley NJ, and Brown DA. Betagamma dimers derived from Go and Gi proteins contribute different components of adrenergic inhibition of Ca^{2+} channels in rat sympathetic neurones. *J Physiol*, **1**999 **51**8:**2**3-36.

De Waard M, Pragnell M, and Campbell KP. Ca^{2+} channel regulation by a conserved subunit domain. *Neuron* **1**994, **1**3:49**5**-**50**3.

De Waard M, Scott VES, Pragnell M, and Campbell KP. Identification of critical amino acids involved in α**1**-β interaction in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *FEBS Lett* **1**996, 38**0**:**27**2-**2**76.

De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VES, Gurnett CA, and Campbell KP. Direct binding of G-protein βγ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* **1**997, 38**5**:446-4**50**.

Diverse-Pierluissi M and Dunlap K. Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron* **1**993, **10**:75**3**-76**0**.

Diverse-Pierluissi M, Goldsmith PK, and Dunlap K. Transmitter-mediated inhibition of N-type calcium channels in sensory neurons involves multiple GTP-binding proteins and subunits. *Neuron*, **1**99**5 1**4:**19****1**-**200**.

Diverse-Pierluissi M, Remmers AE, Neubig RR, and Dunlap K. Novel form of crosstalk between G-protein and tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci* **1**997, 94:**541**7-**542****1**.

Diverse-PierLuissi M, Mclntire WE, Myung CS, Lindorfer MA, Garrison JC, Goy MF, and Dunlap K. Selective coupling of G protein beta gamma complexes to inhibition of Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* **2000**, **27**5(37):**2**838**0**-**2**838**5**.

Dolphin AC. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp Physiol* **1**99**5**, 8**0**:**1**-36.

Dolphin AC. β Subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **200**3, 3**5**(6):**5**99-6**20**.

Eckstein F, Cassel D, Levkovitz H, Lowe M, and Selinger Z. Guanosine **5**′-O-(thiodiphosphate): An inhibitor of adenylate cyclase stimulation by guanine nucleotides and fluoride ions. *J Biol Chem* **1**979, **25**4:98**2**9-9834.

Elmsilie KS. Neurotransmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **200**3, 3**5**(6):477-489.

Elmslie KS, Zhou W, and Jones SW. LHRH and GTPγS modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* **1**99**0**, **5**:7**5**-8**0**.

Forscher P, Oxford GS, and Schulz D. Noradrenaline modulates calcium channels in avian dorsal root ganglion cells through tight receptor-channel coupling. *J Physiol* **1**986, 379:**13****1**-**1**44.

Fox AP, Nowycky MC, and Tsien RW, Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* **1**987, 394:**1**49-**17****2**.

Fraser IDC, Tavalin SJ, Lester LB, Langberg LK, and Westphal AM. A novel lipid-anchored A-kinase anchoring protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J* **1**998, **17**:**22**6**1**-**22**7**2**.

Furukawa T, Miura R, Mori Y, Strobeck M, Suzuki K, Ogihara Y, Asano T, Morishita R, Hashii M, and Higashida H. Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein alpha and beta

gamma subunits. II. Evidence for direct binding. *J Biol Chem* 1998a, 273:17595-17603.

Furukawa T, Nukada T, Mori Y, Wakamori M, Fujita Y, Ishida H, Fukuda K, Kato S, and Yoshii M. Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. I. Molecular determination. *J Biol Chem* 1998b, 273:17585-17594.

Gary PC, Johnson BD, Westernbroek RE, Hays LG, and Yates IJ. Primary structure and function of an A kinase chahoring protein associated with calcium channels. *Neuron* 1998, 20:1017-1026.

Gary PC, Tibbs VC, Catterall WA, and Murphy BJ. Identification of a 15-kDA cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1997, 272:6279-6302.

Gold SJ, Heifets BD, Pudiak CM, Potts BW, and Nestler EJ. Regulation of regulators of G protein signaling mRNA expression in rat brain by acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurochem* 2002, 82(4):828-838.

Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, and Zamponi GW. Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 1999, 274:6195-6202.

Hamil OP, Marty A, Neher E., Sakmann B, and Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patchs. *Pflugers Arch* 1981, 391: 85-100.

Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, and Catterall WA. Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein gamma subunits. *Nature* 1996, 380:258-262.

Heximer SP, Watson N, Linder ME, Blumer KJ, and Hepler JR. RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of $G_q\alpha$ function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 14389-14393.

Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 1994, 17:531-536.

Holz GG, Rane SG, and Dunlap K. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1986, 319:670-672.

Huang CL, Jan YN, and Jan LY. Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K^+ channels. *FEBS Lett* 1997, 405(3):291-298.

Hwang JM, Chang DJ, Kim US, Lee YS, Park YS, Kaang BK, and Cho NJ. Cloning and functional characterization of a Caenorhabditis elegans muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors Channels* 1999, 6(6):415-424.

Ikeda SR. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 1991, 439:181-214.

Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G protein gamma subunits. *Nature* 1996, 380:255-258.

Ikeda SR and Dunlap K. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **1**999, 33:**13**1-**151**.

Jeong SW and Ikeda SR. G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. *Neuron* **1**998, **21**(**5**):**1201**-**1212**.

Jeong SW and Ikeda SR. Sequestration of G-protein beta gamma subunits by different G-protein alpha subunits blocks voltage-dependent modulation of Ca^{2+} channels in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* **1**999, **1**9:47**55**-476**1**.

Jeong SW and Wruster RD. Calcium channel currents in acutely dissociated intracardiac neurons from adult rats. *J Neurophysiol* **1**997a, 77(4):**1**769-**1**778.

Jeong SW and Wruster RD. Muscarinic receptor activation modulates in rat intracardiac neurons via a PTX- and voltage-sensitive pathway. *J Neurophysiol* **1**997b, 78(3):**1**476-**149**0.

Jeong SW, Ikeda SR, and Wurster RD. Activation of various G-protein coupled receptors modulates Ca^{2+} channel currents via PTX-sensitive and voltage-dependent pathways in rat intracardiac neurons. *J Auton Nerv Syst* **1**999, 76(**1**):68-74.

Kammermeier PJ and Ikeda SR. Expression of RGS**2** alters the coupling of metabotropic glutamate receptor **1**a to M-type K^+ and N-type Ca^{2+} channels. *Neuron* **1**999, **22**(4):8**1**9-8**2**9.

Karlsson E, Jolkkonen M, Mulugeta E, Onali P, and Adem A. Snake toxin with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* **2000**, 82:793-806.

Kinoshita M, Nukada T, Asano T, Mori Y, Akaike A, Satoh M, and Kaneko S. Binding of Galpha(o) N-terminus is responsible for the voltage-resistant inhibition of alpha (1A) (P/Q-type, $Ca_{(v)}2.1$) Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* **2001**, 276:28731-28738.

Lanzafame AA, Christopoulos A, and Mitchelson F. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* **2003**, 9(4):241-260.

Lazareno S and Roberts FF. Functional and binding studies with muscarinic M_2-subtype selective antagonists. *Br J Pharmacol* **1989**, 98(1):309-317.

Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, and Perez-Reyes E. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* **1999**, 19: 1912-1921.

Lewis DL, Weight FF, and Luini A. A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**, 83:9035-9039.

Lu Q, AtKisson MS, Jarvis SE, Feng ZP, Zamponi GW, and Dunlap K. Syntaxin 1A supports voltage-dependent inhibition of α1B Ca^{2+} channels by Gbetagamma in chick sensory neurons. *J Neurosci* **2001**, 21(9):2949-2957.

Luebke JI and Dunlap K. Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pfluegers Arch* **1**994, 4**2**8:499-**50**7.

Mathie A, Bernheim L, Hille B. Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons. *Neuron* **1**99**2**, 8(**5**):9**0**7-9**1**4.

McRory JE, Santi CM, Hamming KS, Mezeyova J, Sutton KG, Bailie DL, Stea A, and Snutch TP. Molecular and functional characterization of a family of rat brain T-type calcium channels. *J Biol Chem* **2001**, **2**76: 3999-4**011**.

Meir A and Dolphin AC. Kinetics and Gβγ modulation of $Ca_{(v)}$**2.2** channels with different auxiliary beta subunits. *Pflueg Arch-Eur J Physiol* **2002**, 444:**2**63-**27**5.

Meir A, Bell DC, Stephens GJ, Page KM, and Dolphin AC. Calcium channel β subunit promotes voltage-dependent modulation of α**1**B by Gβγ. *Biophysical J* **2000**, 79:73**1**-76.

Meza U and Adams B. G-protein-dependent facilitation of neuronal α**1**A, α**1**B and α**1**E Ca channels. *J Neurosci* **1**998, **1**8:**52**40-**52**52.

Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, and Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω-Aga-IVA. *Nature* **1**99**2**, 3**55**:8**2**7-8**2**9.

Mirshahi T, Robillard L, Zhang H, Hebert TE, and Logothetis DE. Gbeta residues that do not interact with Galpha underlie agonist-independent activity of K^+ channels. *J Biol Chem* **2002**, **2**77(9):7348-73**55**.

Nowycky MC, Fox AP, and Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **1**98**5**, 3**1**6: 44**0**-443.

Olcese R, Qin N, Schneider T, Neely A, Wei X, Stefani E, and Birnbaumer L. The amino terminus of a calcium channel β subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron* **1**994, **1**3:**1**433-**1**438.

Page KM, Canti C, Stephens GJ, Berrow NS, and Dolphin AC. Identification of the amino terminus of neuronal Ca^{2+} channel **α1** subunits **α1**B and **α1**E as an essential determinant of G protein modulation. *J Neurosci* **1**998, **1**8:48**15**-48**2**4.

Page KM, Stephens GJ, Berrow NS, and Dolphin AC. The intracellular loop between domains I and II of the B type calcium channel confers aspects of G protein sensitivity to the E type calcium channel. *J Neurosci* **1**997, **1**7:**1**33**0**-**1**338.

Park JY, Jeong SW, Perez-Reyes E, and Lee JH. Modulation of Ca(v)3.**2** T-type Ca^{2+} channels by protein kinase C. *FEBS Lett* **200**3, **5**47(**1**-3):37-4**2**.

Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei X, and Birnbaumer L. Cloning and expression of a cardiac/brain subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* **1**99**2**, **2**67:**1**79**2**-**1**797.

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, and Lee JH. Molecular characterization of a neuronal low voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **1**998, 39**1**: 896-9**00**.

Plummer MR, Logothetis DE, and Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivity of calcium channels in mammalian peripheral

neurons. *Neuron* **1**989, **2**(**5**):**14**53-**1**463.

Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, and Campbell KP. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha **1**-subunit. *Nature***1**994, 368: 67-7**0**.

Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, and Birnbaumer L. Direct interaction of Ggamma with a C terminal Ggamma binding domain of the calcium channel α**1** subunit is responsible for channel inhibition by G protein coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1**997, 94:8866-887**1**.

Qin N, Yagel S, Momplaisir ML, Codd EE, and D'Andrea MR. Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(**2**)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* **2005**, 6**2**(3):48**5**-496.

Randall A and Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **1**99**5**, **15**:**2**99**5**-3**012**.

Rauly I, Alihaud M, Wurch T, and Pauwels PJ. α(**2**A)-adrenoceptor:G(α_{i1}) protein-mediated pertussis toxin-resistant attenuation of G(s) coupling to the cyclic AMP pathway. *Biochem Pharmacol* **2000**, **5**9:**15**3**1**-**15**38.

Resh MD. Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **1**994, 76(3):4**11**-4**1**3.

Reuter H and Scholz H. The regulation of calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. *J Physiol* **1**977, **2**64:49-6**2**.

Reuter H, Stevens CF, Tsein RW, and Yellen G. Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature* **1**98**2**, **2**97:**501**-**50**4.

Robinet EA, Wurch T and Pauwels PJ. Different regulation of RGS**2** mRNA by haloperidol and clozapine. Neuroreport **2001**, **12**:**1**73**1**-**1**73**5**.

Roche JP and Treistman SN. Ca^{2+} channel β_3 subunit enhances voltage-dependent relief of G-protein inhibition induced by muscarinic receptor activation and Gβγ. *J Neurosci* **1**998, **1**8:4883-489**0**.

Rousset M, Cens T, Gouin-Charnet A, Scamps F, and Charnet P. Ca^{2+} and phosphotidylinositol 4,**5**-bisphosphate stabilize a Gβγ-sensitive state of Ca_v**2** Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* **200**4, **2**79:**1**46**1**9-**1**463**0**.

Ruiz-Velasco V and Ikeda SR. Multiple G-protein βγ combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons. *J Neurosci* **2000**, **20**:**21**83-**21**9**1**.

Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, and Hofmann F. Primary structure of the subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **1**989, **245**:**1115**-**111**8.

Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, and Adams ME. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A(BI) calcium channel a**1** subunits. *Neuron* **1**993, **11**:**2**9**1**-30**3**.

Schmid A, Renaud J, and Lazdunski M. Short term and long term effects of beta-adrenergic effectors and cyclic AMP on nitrendipine-sensitive voltage-

dependent Ca^{2+} channels of skeletal muscle. *J Biol Chem* **1**985, **2**60:**1**3041-13046.

Schneider PG and Rodriguez de Lores Arnaiz G. Area-dependent CNS membrane response of muscarinic receptor to convulsant 3-mercaptopropionic acid. *Mol Chem Neuropathol* **1**997, 3**2**(**1**-3):**21**3-**221**.

Shapiro MS and Hille B. Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron* **1**993, **10**:**11**-**20**.

Shapiro MS, Wollmuth LP, and Hille B. Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron* **1**994, **12**:**1**3**1**9 -**1**3**2**9.

Simen AA, Lee CC, Simen BB, Bindokas VP, and Miller RJ. The C terminus of the Ca channel alpha**1**B subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* **2001**, **21**(**1**9):7587-7597.

Song WJ and Surmeier DJ. Voltage-dependent facilitation of calcium channels in rat neostriatal neurons. *J Neurophysiol* **1**996, 76:**22**9**0**-**2**30**6**.

Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, and Snutch TP. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* **1**993, **2**60:**11**33-**11**36.

Stea A, Soong TW, and Snutch TP. Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* **1**995, **15**(4):9**2**9-94**0**.

Stephens GJ, Canti C, Page KM, and Dolphin AC. Role of domain I of neuronal Ca^{2+} channel α**1** subunits in G protein modulation. *J Physiol* **1**998, **50**9:**1**63-**1**69.

Stephens GJ, Page KM, Bogdanov Y, and Dolphin AC. The α1B calcium channel amino terminus contributes determinants for subunit mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol* **2000**, **525**:377-390.

Stotz SC, Barr W, McRory JE, Chem L, Jarvis SE, and Zamponi GW. Several structural domains contribute to the regulation of N-type calcium channel inactivation by the beta 3 subunit. *J Biol Chem* **2004**, **279**(**5**):3793-3800.

Suh BC and Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,**5**-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* **2005**, **15**(3):370-378.

Suh SJ, Park YS, Cho TJ, Kaang BK, and Cho Nj. Three functional isoforms of GAR-**2**, a Caenorhabditis elegans G-protein-linked acetylcholine receptor, are produced by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, **288** (**5**):**1238**-**1243**.

Toby G, Law SF, and Golemis EA. Vectors to target protein domains to different cellular compartments. *BioTechniques* **1997**, **24**:637-640.

Toth PT and Miller RJ. Calcium and sodium currents evoked by action potential waveforms in rat sympathetic neurons. *J Physiol* **1995**, **485**:43-**57**.

Tottene A, Volsen S, and Pietrobon D. Alpha(**1**E) subunits from the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci* **2000**, **20**(**1**):**171**-**178**.

Walker D, Bichet D, Campbell KP, and De Waard M. A β_4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca^{2+} channel α_{1A}

subunit. *J Biol Chem* 1998, 273:2361-2367.

Walker D, Bichet D, Geib S, Mori E, Cornet V, Snutch TP, Mori Y, and De Waard M (1999) A new subtype-specific interaction in α1A subunit controls P/Q type Ca^{2+} channel activation. *J Biol Chem* 1999, 274:12383-12390.

Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, and Meldolesi J. Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84(12):4313-4317.

Wickman K and Clapham DE. Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 1995, 75:865-885.

Williams ME, Washburn MS, Hans M, Urrutia A, Brust PF, Prodanovich P, Harpold MM, and Stauderman KA. Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem*, 1999, 72:791-799.

Williams S, Serafin M, Muhlethaler M, and Bernheim L. Facilitation of N-type calcium current is dependent on the frequency of action potential-like depolarizations in dissociated cholinergic basal forebrain neurons of the guinea pig. *J Neurosci* 1997, 17:1625-1632.

Wilson BA and Ho M. Pasteurella multocida toxin as a tool for studying G_q signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004, 152:93-109.

Wilson SM, Toth PT, Oh SB, Gillard SE, Volsen S, Ren D, Philipson LH, Lee EC, Fletcher CF, Tessarollo L, Copeland NG, Jemkins NA, and Miller RJ. The

status of voltage-dependent calcium channels in alpha 1E knock-out mice. *J Neurosci* 2000, 20(23):8566-8571.

Wittinghofer A. The structure of transducin G alpha t: more to view than just ras. *Cell* 1994, 76(2):201-204.

Wu, D, Jiang H, Katz A, and Simon MI. Identification of critical regions on phospholipase C-β_1 required for activation by G-proteins. *J Biol Chem* 1993, 268:3704-3709.

Wu, L. Bauer CS, Zhen X-G, Xie C, and Yang J. Dual regulation of voltage-gated calcium channels by Ptdlins(4,5)P_2. *Nature* 2002, 419:947-952.

Wurch T and Pauwels PJ. Coupling of canine serotonin 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptor subtypes to the formation of inositol phosphates by dual interactions with endogenous G(i/o) and recombinant G(α15) proteins. *J Neurochem* 2001, 75:1180-1189.

Yuan J, Slice L, Walsh JH, and Rosengurt E. Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q). *J Biol Chem* 2001, 275:21557-21564.

Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, and Snutch TP. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α1 subunit. *Nature* 1997, 385:442-446.

Zamponi GW and Snutch TP. Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single Gbeta subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95(7):4035-4039.

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, and Sather WA. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacol* **1**993, 3**2**:**10**7**5-10**88.

Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, and Tsien RW. Multiple structural elements in voltage-dependent Ca^{2+} channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* **1**996, **1**7:99**1-100**3.

Zhu Y and Ikeda SR. VIP inhibits N-type Ca^{2+} channels of sympathetic neurons via a pertussis toxin-insensitive but cholera toxin-sensitive pathway. *Neuron* **1**994, **1**3:6**5**7-669.

ABSTRACT

Mechanism underlying voltage-independent modulation of calcium channels in neuron

Cho, Sung Min

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(*Directed* by *Professor Jeong Seong Woo*)

Voltage-dependent calcium channels (VDCCs) play pivotal roles in regulation of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$). For understanding homeostasis in cellular functions related to regulation of $[Ca^{2+}]_i$, the mechanisms underlying regulation of VDCCs should be defined at a molecular level. In general, the VDCCs at presynpatic terminals are inhibited by transmitter as a negative feedback mechanism for restoration of normal functions when synaptic transmission is overly stimulated. There are two types of Ca^{2+} channel inhibition: voltage-dependent (VD) and voltage-independent (VI). Although the mechanisms underlying VD inhibition of Ca^{2+} channels have been well defined, those for the VI inhibition remain unclear. In the present study, thus, molecular mechanisms underlying the VI inhibition of neural Ca^{2+} channels in part was examined. In this regard, Ca^{2+} currents (I_{Ca}) were recorded using the whole-cell patch-clamp technique in parasympathetic intracardiac neurons (ICNs) and COS-7 cells heterologously expressing human M_1 and *C. elegans* GAR-3 muscarinic receptors (GAR-3R), respectively.

As results, the M_1 receptors (M_1R) expressed in the ICNs was functionally coupled to VDCCs to produce carbachol concentration-dependent I_{Ca} inhibition.

RT-PCR analysis revealed that the ICNs express all members of the $G_{q/11}$ family. The I_{Ca} inhibition by activation of M_1R was VI and mediated by PMT-sensitive $G_{q/11}$ proteins. When Gβγ was chelated by transducin and GRK**2**-ct co-expressed in the ICNs, the Ica inhibition was significantly reduced. In contrast, chelation of $G\alpha_{q/11}$ with RGS**2** or PLCβ-ct did affect not the magnitude of the I_{Ca} inhibition, but the inhibition mode by converting VI into VD. When BAPTA chelated $[Ca^{2+}]_i$, the speed of the VI inhibition became slower. When heterologously expressed in COS-7 cells, the GAR-3R was coupled to N-type Ca^{2+} channels composed of $\alpha_1B/\beta_3/\alpha_2\delta$ subunits to produce atropine- sensitive I_{Ca} inhibition. The I_{Ca} inhibition by activation of GAR-3R was oxoM concentration-dependent and VI. The IC_{50} values for GAR-3R and M_1R-mediated I_{Ca} inhibitions were similar in COS-7 cells. GAR-3R-mediated I_{Ca} inhibition was blocked by dialysis of GDPβS and by pre-treatment of PMT, but not CTX and PTX. When Gβγ was chelated by transducin and GRK3-ct co-expressed in COS-7 cells, the I_{Ca} inhibition was significantly reduced. Chelation of $G\alpha_{q/11}$ with RGS**2** or PLCβ-ct also reduced **50** % of the I_{Ca} inhibition. Conversion of the inhibition mode from VI into VD was confirmed by kinetic slowing in the presence of oxoM although the prepulse facilitation was not observed. In addition, the mode of GAR-3R- mediated I_{Ca} inhibition was dependent on $Ca_v\beta$ subunits.

Taken together, the VI inhibition of VDCCs requires both $G\alpha_{q/11}$ and Gβγ which are critical for the mode and magnitude of I_{Ca} inhibition, respectively. On the other hand, $[Ca^{2+}]_i$ appear to act as a supplemental factor to accelerate the action of Gβγ on the VDCCs, and the auxiliary subunits of the VDCCs, especially $Ca_v\beta$ may play an important role in regulation of the VDCCs.

Key words: voltage-dependent Ca^{2+} channels, muscarinic receptors, M_1 receptor, GAR-3, G-protein, $G\alpha_{q/11}$, Gβγ, intracardiac neuron, COS-7 cells