신경세포 내 칼슘조절에서 시그마 수용체의 기능적 역할

연세대학교 대학원

의 학 과

이 종 우

신경세포 내 칼슘조절에서 시그마 수용체의 기능적 역할

지도 황 금 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 8월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
이 종 우

이종우의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ **인**

심사위원 _____ **인**

심사위원 _____ **인**

연세대학교 대학원

2006년 8월 일

감사의 말씀

지난 네 학기는 새롭고 소중한 배움과 또한 만남의 기회였습니다. 의사라는 한 목표를 향하여 십 오년을 넘게 달려온 지난 날의 저는, 때때로 그 자리에 만족하던 부끄러운 모습이었기에 학위 과정이 더욱 더 소중하였는지도 모릅니다.

직장을 핑계로 나태해지려는 마음을 잡아주신 황금 교수님, 본 연구를 처음부터 열정으로 지도해주시고 다듬어 주신 정성우 교수님, 연구과정에 여러 가지 도움을 주신 박병곤 교수님과 생리학 교실원 여러분들께 감사를 드립니다.

묵묵히 저의 길을 격려해주고 항상 기도해주는 사랑하는 아내, 저를 길러주신 할머니, 어른이 된 저를 항상 걱정해 주시는 아버지, 어머니, 제게 항상 웃음을 지으시는 장인어른, 장모님, 그리고 형제들에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 여름의 시작을 알리던 6월에 아내가 예쁜 딸아이를 출산하였습니다. 제 딸이 태어난 거죠. 딸아이에게 좋은 아빠가 되기를 다시 한 번 다짐해 보며, 감사의 말씀을 맺습니다.

2006년 8월

저자씀

차 례

그림 차례 ····· iii
표 차례 ····· iv
국문 요약 ····· v
제1장 서론 ····· 1
1.1. 시그마 수용체의 분류 및 분자적 특성 ····· 1
1.2. 시그마 수용체의 발현 및 분포 ····· 5
1.3. 시그마 수용체의 기능 ····· 6
제2장 재료 및 방법 ····· 10
2.1. 실험용액 및 약물 ····· 10
2.1.1. 실험 용액 ····· 10
2.1.2. 약물 ····· 10
2.2. 단일 신경세포 분리 및 유지 ····· 11
2.3. 칼슘전류 측정 ····· 11
2.4. 세포 내 칼슘이온 농도 측정 ····· 12
2.5. 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR) ····· 13
2.4. 데이터 분석 및 통계 처리 ····· 14
제3장 결과 ····· 18
3.1. 주골반신경절 세포 내 시그마 수용체의 발현 동정 ····· 18
3.2. 시그마 수용체 리간드에 의한 주골반신경절 세포의 칼슘 전류의 조절 ····· 20
3.3. 시그마 수용체 리간드에 의한 주골반신경절 교감 세포의 칼슘 전류의 억제시 G 단백질의 관여 확인 ····· 23
3.4. 주골반신경절 교감 세포의 칼슘전류 억제를 매개하는 시그마 수용체 아형의 동정 ····· 25
3.5. 골반신경절 세포 내 칼슘농도에 미치는 시그마 수용체 리간드의 영향 ····· 29
3.6. 소포체로부터의 칼슘 유리에서 시그마 수용체의 역할 ····· 33

제4장 고찰 ····· 36
제5장 결론 ····· 44
참고 문헌 ····· 45
영문 요약 ····· 57

그 림 차 례

그림 1. 여러 종으로부터 클로닝 된 시그마 수용체 type-1의 아미노산 서열 비교 3
그림 2. 수컷 쥐 주골반신경절의 해부학적 위치 ····· 15
그림 3. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 회로 모식도 ····· 16
그림 4. CCD 이미지 장치를 이용한 세포 내 칼슘농도 측정 장치의 모식도 ····· 17
그림 5. 주골반신경절 세포에 발현된 시그마 수용체의 동정 ····· 19
그림 6. 교감 및 부교감 신경에서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘전유 억제 22
그림 7. 주골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘 전류의 억제시 G 단백질의 매개 여부 확인 ····· 24
그림 8. 골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 아형에 비특이적인 리간드에 의한 칼슘전류 억제 양상 ····· 26
그림 9. 골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 아형에 선택적인 리간드에 의한 칼슘전류 억제 양상 ····· 27
그림 10. 골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘전류 억제의 농도-반응곡선 ····· 28
그림 11. 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드에 의한 세포 내 칼슘 증가 ····· 31
그림 12. 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드에 의한 세포 내 칼슘 증가 ····· 32
그림 13. Bradykinin에 의해 유도되는 골반신경절 세포 내 칼슘 증가 ····· 34
그림 14. Bradykinin에 의해 유도되는 골반신경절 세포 내 칼슘 증가에 미치는 시그마 수용체 type-1 리간드의 영향 ····· 35
그림 15. 시그마 수용체에 의한 세포 내 칼슘 조절 모식도 ····· 43

표 차 례

표 1. 시그마 리간드의 수용체 결합 친화도 비교 ····· 4

국 문 요 약

신경세포 내 칼슘조절에서 시그마 수용체의 기능적 역할

시그마 수용체는 신경스테로이드, 항정신병제, 향정신병제 등의 약물들이 높은 친화도(affinity)로 결합하는 부위(binding site)로 신경계, 내분비계 및 면역계에 폭넓게 분포하고 있다. 시그마 수용체 type-1과 type-2의 두가지 아형이 약리학적으로 확인되었다. 중추신경계에서 시그마 수용체는 신경전달물질의 방출 조절, 학습과 기억과정 및 운동과 자세의 조절과 같은 다양한 생리학적 기능에 연관되어 있다. 또한 우울증, 정신분열증, 약물남용 등의 정신과적 질환, 기억 및 인지 장애, 향정신성 약물 복용의 후유증으로 발생하는 운동장애, 통증 등 다양한 신경계 이상을 매개한다. 그러나 현재까지 말초신경계에서 시그마 수용체의 기능이 자세하게 밝혀져 있지 않다.

본 연구의 목적은 방광, 전립선, 음경 등 다양한 비뇨생식기를 지배하고 있는 골반자율신경절 세포에서 시그마 수용체가 세포 내 칼슘 조절을 매개하는지 여부를 확인하는 것이다. 이를 위해 칼슘전류를 10 mM charge carrier를 사용하여 전세포 파열 패치클램프 방법으로 기록하였고, 세포 내 칼슘이온의 농도는 형광염료(fura-2/AM)로 부하된 골반신경절 세포의 형광이미지를 분석하여 측정하였다. 역전사 중합 연쇄반응 분석으로 골반신경절 세포에 시그마 수용체 type-1을 코딩하는 유전자의 발현을 확인하였다. 교감 및 부교감 골반신경 세포에서 시그마 수용체에 비특이적인 리간드인 haloperidol을 처치한 결과 농도 의존적으로 고전압에서 활성화되는 칼슘전류가 억제되었고, 칼슘채널의 모든 아형(L-, N, 및 R-형)을 억제하였다. 시그마 수용체 type-1에 선택적인 (+)-SKF10047의 경우 고전압에서 활성화되는 칼슘전류의 억제 정도가 haloperidol에 비해 상대적으로 미약하였다. 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 리간드에 의한 고전압에서 활성화되는 칼슘 전류의 억제는 교감신경 및 부교감신경 세포군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 골반신경절 세포에서 시그마 수용체에 의해 매개되는 칼슘 전류의 억제 정도는 Gpp(NH)p의 투석 전후에 차이를 보이지 않아 G 단백질이 매개되지

않는다는 사실을 시사하였다. 시그마 리간드에 의한 칼슘전류 억제정도를 비교해 보면 haloperidol(19±2 μM) > ifenprodil(58±4 μM) > (+)-SKF-10047(427±44 μM) > DTG(457±12 μM)의 순으로 나타났다. 따라서 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 type-2가 칼슘전류의 억제를 주로 매개한다는 사실을 알 수 있었다. 더욱이, 시그마 수용체 type-1과 type-2에 선택적인 (+)-SKF10047과 ifenprodil의 처치 시에 골반신경절 세포 내 칼슘이 일시적으로 증가하는 현상을 관찰하였고, 또한 (+)-SKF10047은 G 단백질 중 $G_{q/11}$에 연결된 bradykinin 수용체의 활성화에 의해 유도되는 소포체로부터의 칼슘 유리를 항진시켰다. 따라서 이러한 결과는 골반신경절 세포에서 시그마 수용체가 G 단백질과는 독립적인 경로를 통해 칼슘채널에 음성적(negatively)으로 연결되어 있고, 소포체로부터의 칼슘 유리에 양성적(positively)으로 연결되어 있음을 확인하였다.

Key words : 시그마 수용체, 골반신경절, 시그마 리간드, 고전압 활성 칼슘채널 칼슘유리, 소포체

신경세포 내 칼슘조절에서 시그마 수용체의 기능적 역할

<지도 황 금 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 종 우

제1장 서론

시그마 수용체는 향정신성 작용을 나타내는 약물들이 높은 친화도(affinity)로 결합하는 결합부위(binding site)로 초기에는 opioid 수용체의 아형으로 분류되었지만, 최근 일련의 약리학적 및 분자생물학적 연구를 통해 opioid 수용체와는 전혀 다른 독립적인 수용체라는 것이 확인되었다. 시그마 수용체는 우울증, 정신분열증, 약물남용 등의 정신과적 질환, 기억 및 인지 장애, 향정신성 약물 복용의 후유증으로 발생하는 운동장애, 통증 등 다양한 신경계 이상을 매개할 뿐만 아니라 암(cancer)의 진단 및 치료에도 매우 중요한 target이 되기 때문에 임상적으로 매우 중요한 연구대상이 되고 있다(Guitart 등, 2004; Aydar 등, 2004).

1.1. 시그마 수용체의 분류 및 분자적 특성

시그마 수용체는 약리학적 특성, 기능, 분자적 특성에 의해 type-1과 type-2의 두 가지 아형으로 분류된다(Hellewell 및 Bowen, 1990; Quirion 등, 1992). 시그마 수용체 type-1의 경우 pentazocine, cyclazocine, SKF10047 등의 리간드 중 (+)-이성질체(isomer)에 높은 친화도(affinity)를 보이는 반면, type-2의 경우에는 작용 약

물들의 (-)-이성질체(isomer)나 ibogaine와 높은 친화도(affinity)를 가진다(Maurice 및 Lockhart, 1997; Guitart 등, 2004). 시그마 수용체 type-1은 최근에 guinea pig 간(Hanner 등, 1996), 사람 태반 choriocarcinoma 세포(Kekuda 등, 1996), 사람 뇌(Prasad 등, 1998), 쥐 뇌(Seth 등, 1998), 및 마우스 뇌(Pan 등, 1998)에서 클로닝 되었고, 이들 종간에 93% 이상의 유사성(homology)이 있는 것으로 아미노산 서열(amino acid sequence)로부터 확인되었지만(Mei 및 Pasternak, 2001) (그림 1), 시그마 수용체 type-2는 아직까지 정확한 동정(identify)이 이루어지지 않았다. 시그마 수용체 type-1을 암호화(coding)하는 유전자는 사림의 경우 9번째 chromosome에, 마우스의 경우 4번째 chromosome에 위치하는 것이 밝혀졌으며, 7 kbp의 길이에 4개의 엑손(exon)과 3개의 인트론(intron)으로 구성되어 있음이 확인되었다. 시그마 수용체 type-1은 223개의 아미노산으로 구성되어 25 kDa의 분자량을 가지고 있고, hydropathy 분석 결과 기존의 호르몬(hormone)이나 신경전달물질(neurotransmitter) 수용체와는 다르게 2개의 transmembrane domain을 가지고 있고, 세포질(cytoplasm) 측에 10개의 아미노산으로 구성된 짧은 아미노 말단(amino terminal)과 120개의 아미노산으로 구성된 긴 카르복시 말단(carboxy terminal), 세포 외측으로 50개 아미노산으로 구성된 세포외측 고리(extracellular loop)로 구성되어 있는 것으로 보고되었다(Aydar 등, 2002; Guitart 등, 2004). 시그마 수용체 type-2의 경우 18~21 kDa의 분자량을 가지고 있지만, 현재까지 정확한 분자적 동정과 클로닝(cloning)이 이루어지지 않고 있다.

시그마 수용체 type-1과 type-2에 각각 선택적으로 결합하거나 두가지 아형에 모두 특이적인 리간드(ligand)들이 잘 알려져 있다(표 1). 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드로는 (+)-SKF10047, (+)-pentazocine, CB-64L, BD-1008, rimcazol 등이 알려져 있고, type-2에 선택적인 리간드로는 ibogaine, CB-64D, ifenprodil 등이 알려져 있다. 신경이완제로 많이 이용되고 있는 haloperidol과 DTG는 시그마 수용체 아형에 모두 선택적인 리간드로 알려져 있다.

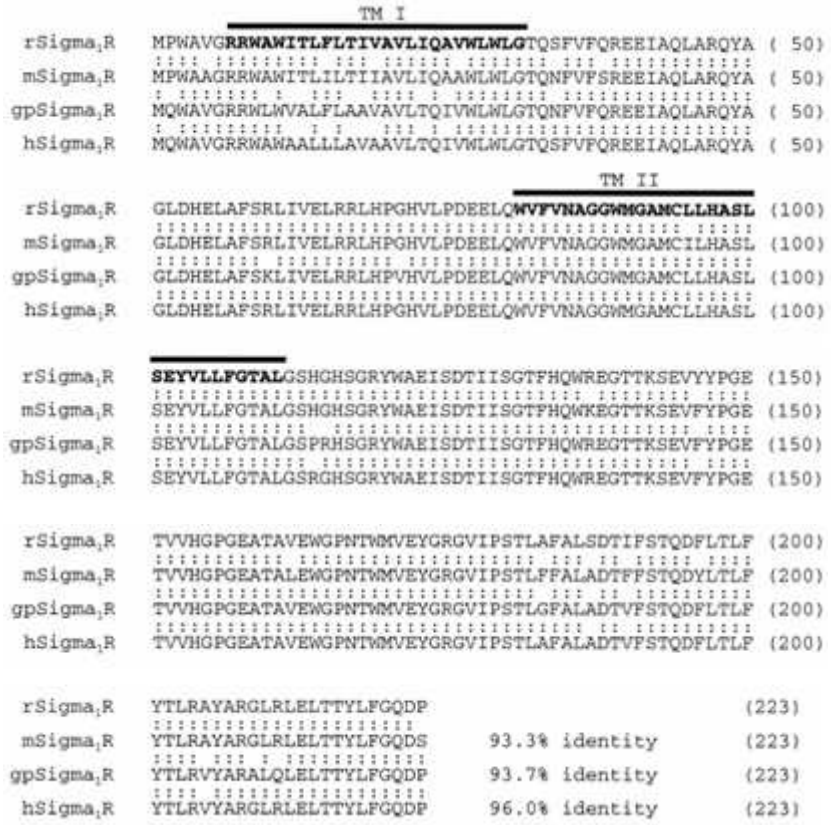

그림 1. 여러 종으로부터 클로닝 된 시그마 수용체 type-1의 아미노산 서열 비교. rSigma$_1$R: 쥐 시그마 수용체(2001), mSigma$_1$R: 마우스 시그마 수용체(1998), gpSigma$_1$R: 기니피그 시그마 수용체(1996), hSigma$_1$R: 사람 시그마 수용체(1996).

표 1. 시그마 리간드의 수용체 결합 친화도 비교.

Compound	K_i	
	σ_1R affinity (nM)	σ_2R affinity (nM)
CB-64D	5,304±313	60.8±7.49
CB-64L	102±17	759±22
JL-II-147	41.4±1.3	120±2
BD737	8.78±1.54	68.3±14.0
LR172	6.10±0.20	13.9±0.2
BD1008	1.24±0.21	32.5±1.5
Haloperidol	6.44±0.15	221±29
Red HAL	47.2±16.3	123±20
Ibogaine	31,696±7651	963±68
DTG	203±7	58.4±8.5
(+)-Pentazocine	16.7±0.95	6,611±1,042
(-)-Pentazocine	807±99	2324±225
(+)-SKF10047	597±139	39,740±4,328
(-)-SKF10047	50,399±801	4,1461±5,801
Dextrallorphan	125±12	8,393±1,323
CB-53D	>100,000	>77,000
BD1006	21,628±1452	>86,000
Noribogaine	6,293±287	6,166±10
Ifenprodil	2.21±0.21	5.32±0.69

K_i 값은 3회 반복된 실험의 평균±표준오차로 표시(Vilner 및 Bowen, 2000).

1.2. 시그마 수용체의 발현 및 분포

단일 세포 내 시그마 수용체 type-1의 분포는 소포체(endoplasmic reticulum; ER), 미토콘드리아(mitochondria) 막에 위치하고 있고(McLean 및 Weber 등, 1988), 수용체가 활성화되면 소포체로부터 세포막(plasmic membrane)이나 핵막(nuclear membrane)으로 이동한다고 보고되었다(MorinSuran 등, 1999; Hayashi 등, 2001). 시그마 수용체 type-2의 경우에 세포 내 수용체(intracellular receptor)로 제안되었고(Bowen, 2000), 소포체와 미토콘드리아 막에 분포하고 있는 것으로 확인되었다. 따라서 시그마 수용체가 세포내 칼슘 저장소로부터 칼슘이온의 유리에 기능적인 역할을 담당할 것이라고 보고되었다(Bowen, 2000; Guitart 등, 2004).

시그마 수용체는 type-1의 경우 *in situ* hybridization과 면역염색법(immunohistochemistry)으로 확인된 결과 중추신경계의 운동과 관련된 조직(motor area), 변연계(limbic system), 감각영역(sensory area), 내분비 조직(endocrine area)에 광범위하게 분포하고 있다고 보고되었다(McCann 등, 1994). 이들 지역으로는 전두엽(frontal cortex), 선조체(striatum), 소뇌(cerebellum), 중격핵(nucleus accumbens), 흑질(substantia nigra) 등이 있다(Bouchard 및 Ruirion, 1997). 또한 시그마 수용체 type-1은 간(Dumont 및 Lemaire, 1991; Maurice 등, 1996), 신장(Hellewell 등 1994), 심장(Jansen 등, 1992; Ela 등, 1994), 성 기관(sexual organ) (Jansen 등, 1992) 등에 발현되어 있다고 보고되었다. 시그마 수용체 type-2는 주로 자세 및 보행에 관계된 제한된 영역에만 높게 발현되어 있고(Walker 등, 1990; 1994), 말초기관에는 간 및 신장에 높게 발현되어 있다고 보고되었다(Hellewell 등, 1994). 최근에 시그마 수용체 아형 모두 다양한 조직으로부터 유도된 암세포에 정상 수준보다 수백에서 수천배 증가된 발현양상을 나타내는 것으로 확인되었다(Vilner 등, 1995).

1.3. 시그마 수용체의 기능

시그마 수용체 type-1의 경우 생리학적으로 중요한 몇가지 기능들을 수행하고 있는데, 예를 들면, 도파민(dopamine) (Booth 및 Baldessarini, 1991; Patrick 등, 1993)이나 아세틸콜린(acetylcholine) (Matsuno 등, 1995)의 합성과 분비 조절, NMDA 성 glutamate 수용체의 활성 조절(Monnet 등, 1992), NMDA에 의해 촉진되는 신경전달 물질의 방출 조절(Alvear 및 Werling, 1995; Monnet 등, 1996), 무스카린성(muscarinic) 아세틸콜린 수용체에 의한 phosphoinositide의 turnover 조절, 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 조절을 통한 세포내 칼슘 농도 조절, neuroprotective 및 항 기억상실 활성(Maurice 및 Lockhart, 1997), 코카인에 의해 유도되는 운동활성 및 독성 변화(McCracken 등, 1999), 칼슘 및 포타슘 채널의 기능 조절(Aydar 등, 2002; Zhang 및 Cuevas, 2002; Zhang 및 Cuevas, 2005)등에 관여하는 것으로 알려져 있다.

시그마 수용체 type-2의 경우 세포가 증식하는 단계에 들어가면 수용체의 수가 급격하게 증가하여 세포증식의 조절에 관여할 것이라고 보고되었고(Mach 등, 1997), 포타슘 채널(A-type, delayed-type 및 M-type)의 투과도(permeability)를 억제한다고 보고되었다(Aydar 등, 2002; Zhang 및 Cuevas, 2005). 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드(ligand)를 neuroblastoma 세포에 단시간 처치하였을 때 표면(surface)에 부착되어 있는 세포의 돌기(process)들이 사라지고, 세포가 원형(round)으로 바뀌어 표면으로부터 떨어지며 더 오래 노출되면 세포가 사멸한다고 보고되었다(Vilner 및 Bowen, 1993; Vilner 등, 1995). 이러한 세포 사멸은 neuroblastoma에서 DNA fragmentation 및 핵 응축 등으로 확인된 결과 자가사멸(apoptosis)로 확인되었고, 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드 처치에 의해서는 발생하지 않는 것으로 확인되었다(Vilner 및 Bowen, 1997; Crawford 등, 1999). 시그마 수용체 type-2의 활성에 의해 유도되는 자가사멸(apoptosis)은 기존에 알려진 p53이 포함되는 자가사멸이나 caspase 의존적인 세포사멸 경로와는 전혀 다른 경로를 통해 나타나는 것으로 보고되었다(Crawford 등, 1999).

최근의 일련의 연구에서 시그마 수용체가 세포내 칼슘이온의 농도를 조절하는 데 있어 중요한 역할을 담당한다고 보고되었다(Bowen, 2000; Guitart 등, 2004). 세포 내 칼슘은 신경전달물질의 방출(neurotransmitter release), 호르몬 분비(hormone secretion), 신경의 흥분성(excitability) 조절, 시냅스 연접의 가소성(synaptic plasticity), 근육의 수축(muscle contraction), 화학주성(chemotaxis), 유전자 발현(gene expression), 세포의 성장과 분화(growth and differentiation), 그리고 자가세포사멸(apoptosis)등 다양한 과정의 조절에 중요한 역할을 담당한다(Barridge 등, 1998). 이러한 세포 내 칼슘은 필요에 따라 특정 농도로 조절되는, 세포 내 칼슘의 항상성(homeostasis)이 유지가 되어야 하는데 어떤 원인에 의해 세포 내 칼슘이온의 과부하(overload)가 발생할 경우 세포에 독성(toxicity)을 일으켜 결국 세포 사멸(cell death)을 일으킬 수 있다. 세포 내 칼슘은 전압의존적 칼슘 채널 및 특정 리간드에 의해 열리는 이온채널(예, NMDA 또는 nicotinic 수용체)을 통한 세포 외부로부터의 칼슘이온의 유입과 세포 내 칼슘 저장소인 소포체나 미토콘드리아로부터의 칼슘 유리를 통해 증가될 수 있다. 시그마 수용체의 활성에 의해 세포 외부로부터 칼슘이온이 유입될 수 있는 다양한 이온 채널들이 조절되는 것으로 보고되었다(Soriani 등, 1999; Wilke 등, 1999; Zhang 및 Cuevas, 2002; Zhang 및 Cuevas, 2005). 최근 교감 신경군인 상경신경절(superior cervical ganglion; SCG) 세포와 부교감 신경군인 내심신경절(intracardiac ganglion) 세포에서 시그마 수용체 type-2 활성화에 의해 전압의존적 칼슘 채널이 억제된다고 보고되었고(Zhang 및 Cuevas, 2002), 해마(hippocampus)와 혈관 평활근(smooth muscle)에 발현된 전압의존적 칼슘 채널도 억제되는 것으로 보고 되었다(Church 및 Fletcher, 1995; Flaim 등, 1985). 이러한 세포 외부로부터의 칼슘 유입뿐만 아니라 세포내 칼슘 저장소로부터의 칼슘 유리도 시그마 수용체에 의해 조절된다고 보고되었다(Hayashi 및 Su, 2000; Vilner 및 Bowen, 2000; Hong 등, 2004). 쥐 neuroblastoma 세포인 NG-108 세포와 사람 neuroblastoma인 SH-SY5Y 세포에서 시그마 수용체 type-1 리간드인 (+)-pentazocine와 (+)-SKF10047, 그리고 신경스테로이드(neurosteroid)인 dehydroepiandrosterone(DHEA)과 pregnenolone이 세포내 칼슘 저장소인 소포체로부터 IP_3에 의해 매개되는 칼슘 유리를 증가시킨다고 보고

되었다(Hayashi 및 Su, 2000). 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드인 ibogaine과 CB-64D에 의해 사람 neuroblastoma SK-N-SH 세포에서 단시간 내에 소포체로부터 칼슘을 유리시켜 세포 내 칼슘을 일시적으로(transiently) 증가시키고, 장시간 처리할 경우 미토콘드리아로부터 칼슘이온을 유리시켜 장기간 지속되는(long-lasting) 칼슘 증가를 유도한다고 보고되었다(Vilner 및 Bowen, 2000).

이와 같이 세포 내 칼슘조절에 관한 많은 연구들이 있었지만, 실질적으로 중추 및 자율신경계 세포에서 시그마 수용체 아형별 활성화에 의한 세포 내 칼슘 조절에 관한 연구가 체계적으로 진행되지 못했고, 따라서 본 연구에서는 자율신경절 세포를 대상으로 시그마 수용체 활성화에 의한 세포 내 칼슘 조절에 관한 연구를 진행하였다. 자율신경절 세포는 중추신경절 세포에 비해 동질성(homogeneity)이 높고, 일차 세포(primary cell)이기 때문에 배양 세포주(culture cell line)에 비해 생리학적 또는 병태생리학적 의의를 부여할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 자율신경절 세포가 세포 내 칼슘의 조절에 있어 중요한 전압의존적 칼슘채널의 특성 및 조절에 대해 명확하게 알려져 있기 때문에 시그마 수용체 활성에 의한 칼슘 채널의 조절과 비교 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다. 자율신경인 골반신경절(major pelvic ganglion; MPG) 세포는 교감신경인 하복신경(hypogastric nerve)과 부교감신경인 골반신경(pelvic nerve)으로부터 구심성 입력을 받아 방광, 전립선 및 음경 등과 같은 비뇨생식계 기관과 일부의 장(bowel)의 신경지배를 한다(Langworthy 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993a). 기능적으로는 배뇨(micturation)나 발기(erection) 현상 등을 조절한다(Zoubek 등, 1993). MPG는 자율신경계에서 유일하게 한 개의 ganglion capsule내에 교감신경 세포와 부교감신경 세포의 두 가지 아군(subpopulation)을 함께 가지고 있다. 신경면역화학적 연구의 결과 교감신경 세포는 아드레날린성(adrenergic)이고, 부교감신경 세포는 콜린성(cholinergic)이라는 사실이 확인이 되었다(Keast 및 De Groat, 1989; Zhu 등, 1995; Keast, 1999). 한편, 교감신경 세포는 세포의 크기가 비교적 크고, 낮은 막전압에서 활성되는 T-형 칼슘채널을 가지고 있는 반면 부교감신경 세포는 세포의 크기가 작고 T-형 칼슘채널을 가지고 있지 않기 때문에 형태적으로나 전기생리학적으로 구별이 가능하다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997; Park

등, 2001). MPG 신경세포에는 주로 높은 막전압에서 활성화(high voltage-activated; HVA)되는 칼슘통로인 N-형이 우세하게 발현되며, 일부가 L-형과 nimodipine과 ω-conotocin GVIA에 민감하지 않은 non-L/non-N-형(R-형)인 것으로 확인되었다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997; Park 등, 2001; Won 등, 2006).

따라서 본 연구의 목적은 첫째, MPG 신경세포에서 시그마 수용체가 세포 내 칼슘을 조절하는지 확인하고, 둘째, 조절한다면 어떤 아형의 시그마 수용체가 관여하는지, 셋째, 시그마 수용체에 의한 조절에 어떤 분자적 기전이 작용하는지 확인하는 것이다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 실험용액 및 약물

2.1.1. 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/kg H_2O)으로 하였다. 세포 외 관류액의 조성(mM)은 140 MS, 145 TEA-OH, 10 HEPES, 15 glucose, 10 $CaCl_2$, 0.0003 tetrodotoxin(TTX) (pH 7.4, 320 mOsm/kg H_2O)으로 하여 실험하였다. 세포내 칼슘이온 측정을 위해 사용된 세포외 관류액의 조성(mM)은 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES, 10 glucose(pH 7.4, 300 mOsm/kg H_2O)으로 하였다.

2.1.2. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA)로 부터 구입하였으며, (+)-SKF10047, haloperidol, ifenprodil, DTG는 Tocris(Avonmouth, Bristol, UK)로부터 구입하였다. Gpp(NH)p와 bradykinin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, Fura-2/AM은 Molecular Probe(Eugene, OR, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Haloperidol, DTG, 및 Fura-2/AM은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 사용 농도의 1000배 이상으로 농축하여 만들었으며, 나머지 약물들은 3차 증류수를 이용하여 만들어 사용하였다. 약물은 polyethylene tube와 연결된 gas chromatography용 capillary tube 끝을 신경세포의 100 ㎛ 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포

에 가해지도록 하였다.

2.2. 단일 신경세포 분리 및 유지

실험동물로는 250 g 내외의 수컷 쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다. Pentobarbital sodium(50 mg/kg, *i.p.*)으로 쥐를 마취시킨 뒤, 즉시 개복 하여 전립선(prostate gland)의 외측에 위치한 주 골반신경절을 적출하고(그림 2), 이를 차가운(4℃) Hank's balanced salt 용액(HBSS, GibcoBRL, Carlsbad, CA, USA)으로 옮겼다. 신경절을 둘러싸는 연결조직(connective tissue)을 벗기고 예리한 칼로 조심스럽게 작은 틈새를 낸 후, 이를 0.7 mg/mL collagenase(type D), 0.1 mg/mL trypsin과 0.1 mg/mL의 DNAse(type I)가 들어있는 10 mL의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4, GibcoBRL)에서 1시간 동안 배양(35 ℃)하였다(Zhu 등, 1995; Lee 등, 2002). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 배양 플라스크를 흔들어 단일 신경세포들로 분리한 후, clinical centrifuge(International Equipment Company, MA, USA)를 이용하여 1000 rpm의 속도로 원심 분리하였다. 분리된 단일 신경세포들을 10 % fetal bovine serum, 1 % glutamine, 1 % penicilin-streptomycin이 포함된 MEM(GibcoBRL)에 재부유(resuspend)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 coating되어 있는 polystyrene culture dish(35 mm)에 plating 하였다. 분리된 단일 골반신경세포들을 37 ℃ 세포 배양기(humidified incubator; 95 % air-5 % CO_2)에서 배양하였으며, 분리한 후 24시간 이내에 실험에 사용하였다.

2.3. 칼슘전류 측정

전압의존적 칼슘전류는 patch clamp amplifier(Axopatch 1D, Axon Instruments, Foster city, CA, USA)를 사용하여, 전형적인 전세포 패치클램프(whole-cell patch clamp) 방법으로 기록하였다(Hamil 등, 1981; Jeong 및 Ikeda 등, 1998). 전극은

borosilicate 유리모세관(glass capillary) (외경; 1.65 mm, 내경; 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)를 사용하여 만들었다. 만들어진 전극은 microforge로 열처리하여 다듬었고, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1～3 ㏁이 되는 것을 사용하였다. 신경세포가 들어 있는 culture dish를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포외액을 중력에 의해 약 1～2 mL/min 속도로 관류되도록 하였다. 세포막의 전기용량(membrane capacitance)과 직렬 저항(series resistance)은 amplifier로 80% 이상 보정하였다. 전압생성 및 칼슘전류의 기록은 아날로그/디지털 전환기(Digidata 1200, Axon Instruments Co.)가 연결된 맥킨토시 컴퓨터에 장착된 S4(Stephen R. Ikeda 박사 제공) software를 이용하였다. 칼슘전류는 2～5 kHz로 low pass filter한 뒤, 맥킨토시 컴퓨터에 저장하였고, IGOR PRO(Wave-Metrics, Lake Oswego, OR, USA)로 분석하였다. 모든 실험은 실온 (20～22 ℃)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정장치는 그림 3에 도식적으로 나타내었다.

2.4. 세포내 칼슘이온 농도 측정

세포내 칼슘농도 측정은 형광 현미경(TE2000, Nikon, Kanagawa, Japan)과 이에 연결된 형광측정장치(Ratiomaster, Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하였다. 이 시스템에는 크게 세포에 특정 파장의 빛을 조사할 수 있는 Lambda DG-4(Sutter Instrument Inc, Novato, CA, USA), 빛을 투과시켜 세포나 CCD로 반사시키는 dichroic mirror, 형광이미지를 감지하는 CCD(Cascade, Roper Scientific, Tucson, AZ, USA)로 구성되어 있다(그림 4). 이온농도를 측정하기 위해서는 이온들과 결합하여 형광 특성을 보이는 형광 염료(fluorescence dye)를 세포내에 부하시킨 뒤 형광 현미경을 통해 방출되는 형광의 세기를 분석하였다. 본 연구에서 칼슘 이온 농도를 측정하기 위해 사용된 형광염료는 칼슘농도를 반영하는 fura-2/AM을 사용하였다. 단일 골반신경절 세포가 있

는 배양접시에 fura-2/AM을 5 μM 농도로 처치하여 37℃에서 빛이 차단된 상태로 30분간 배양하여 형광염료를 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포 외 관류액으로 3회 세척한 다음 현미경 위에 올려놓고, 약물이 포함된 관류액을 중력에 의해 1~2 mL/min의 속도로 관류시켰다. 이때 나타나는 형광세기의 변화를 분석하였는데, fura-2의 특성상 340 nm와 380 nm의 파장으로 번갈아가며 여기(excitation)시켰을 때 510 nm로 방출(emission)되는 형광의 비율(F_{340}/F_{380})을 측정하여 세포내 이온농도를 반영하였다.

2.5. 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)

골반신경절 세포 내 전체 RNA는 Guanidinium thiocynate-phenol-chloroform 방법을 이용하여 추출하였다(Chomczynski 및 Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocynate buffer로 용해시킨 다음 페놀(phenol) 및 클로로포름(chloroform)을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액을 동량의 isopropanol과 섞은 후 -70℃에서 1시간 동안 방치하여 RNA를 침전시켰다. 다시 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심분리하여 RNA 침전물(pellet)을 얻었으며, 이를 다시 75% 에탄올로 씻어낸 후 원심분리하여 RNA 샘플을 최종적으로 획득하였다.

cDNA 합성을 위해 2 μg RNA와 0.5 μg random hexamer를 먼저 70℃에서 5분간 반응시키고, 200 units의 murine leukemia virus reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA), 25 nM의 dNTP, 20 units의 RNase 저해제를 혼합하여 25 μL로 만든 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. PCR에 사용된 시그마 수용체 type-1에 특이적인 primer의 염기서열은 5′-GTCTTTTGCA CGCCTCGCTGTCTGAGTACG-3′ (sense)과 5,-ACCCTCTCTGGARGGAGGTGAGT GC-3′(anti-sense) 이었다. PCR 반응액(50 μL)에는 합성된 cDNA, 각각의 primer(10 pM), 1.25 units의 Tag polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nM의 dNTP 등을 혼합하였다. 이 혼합물을 94℃ 30초, 61℃ 45초, 그리고 72℃

1분으로 30 cycle 동안 증폭시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다. 이때 internal control로 CapDH를 PCR 증폭하였다.

2.6. 데이터 분석 및 통계 처리

모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였고 통계적인 의의는 Student t-검정(unpaired)으로 확인하였다. $p<0.05$ 인 경우 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 측정된 전류의 크기는 IGOR PRO를 이용하여 분석하였으며, 농도-반응 곡선의 IC_{50}와 Hill slope은 Prism 4.0(Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 구하였다.

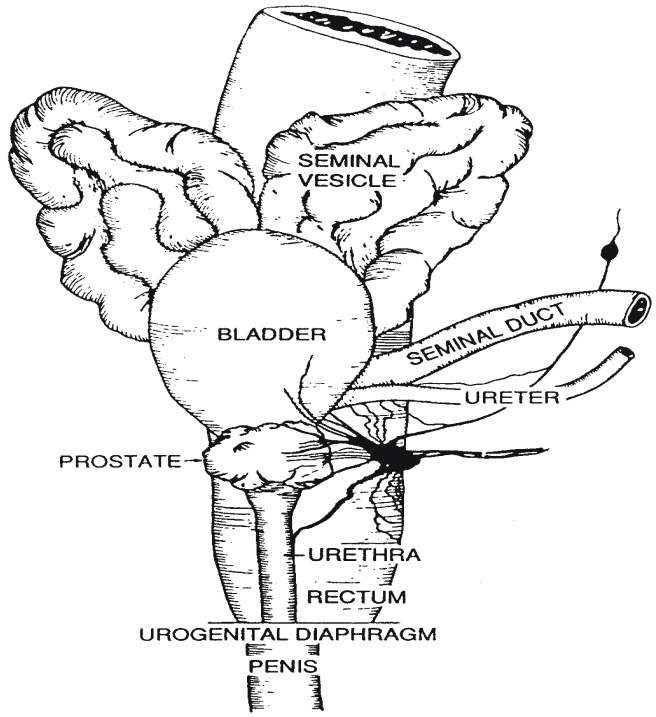

그림 2. 수컷 쥐 주골반신경절(major pelvic ganglion)의 해부학적 위치 (Langworthy OR, 1965).

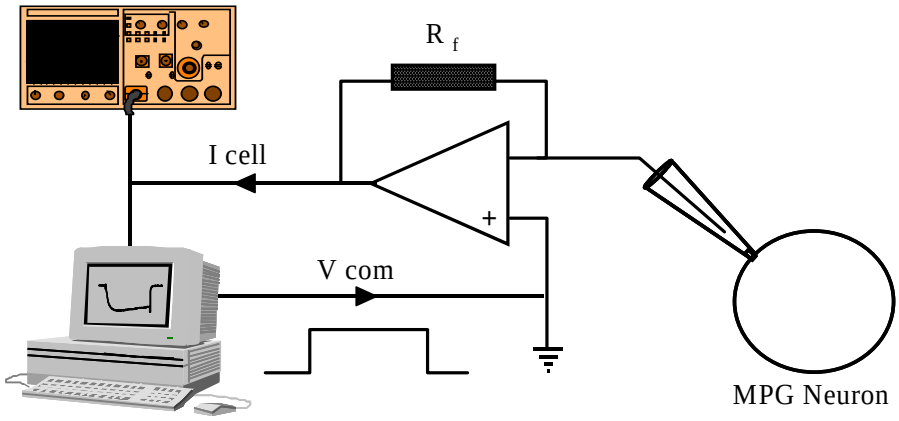

그림 3. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 회로 모식도. 패치클램프 전용 소프트웨어로(Pulse)를 이용하여 만든 전압 프로토콜로 고정하고자 하는 전압(V com)을 A/D converter(EPC-10)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 전극(patch pipet)을 통하여 전달하고, 세포막에 존재하는 이온통로의 활성 정도에 따라 변화하는 전압을 고정하기 위해 증폭기를 통해 흘려주는 전류(I cell)을 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터에 저장한다.

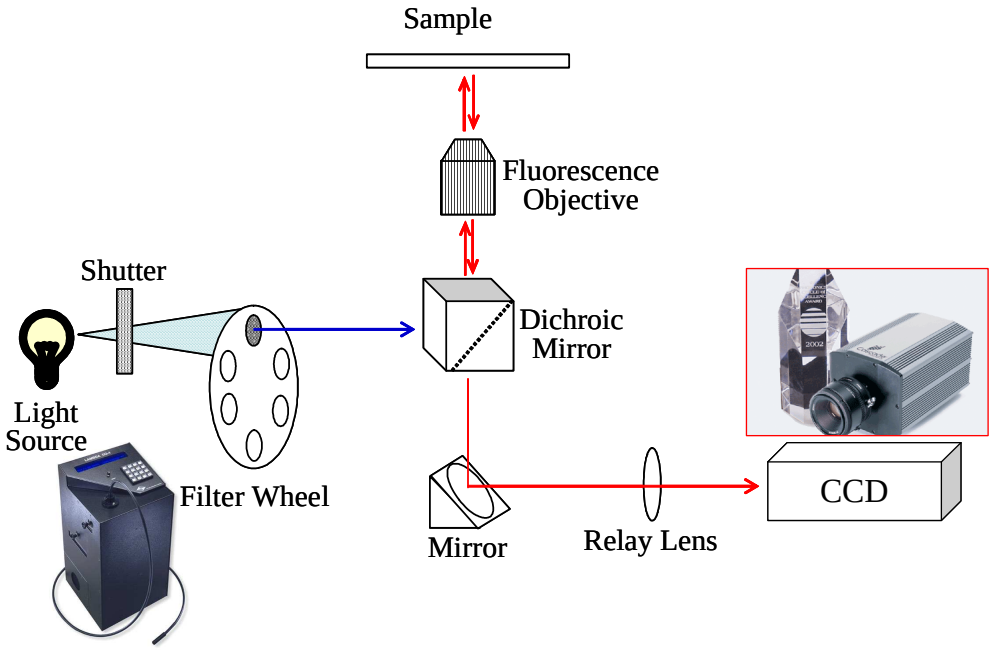

그림 4. CCD 이미지 장치를 이용한 세포 내 칼슘농도 측정 장치의 모식도. 세포에 특정 파장의 빛을 조사할 수 있는 Lambda DG-4, 빛을 투과시켜 세포나 CCD로 반사시키는 dichroic mirror, 형광이미지를 감지하는 CCD로 구성되어 있다.

제3장 결과

3.1. 주골반신경절 세포 내 시그마 수용체의 발현 동정

시그마 수용체 활성이 주골반신경절(Major Pelvic Ganglion; MPG) 세포 내 칼슘 조절에서 어떤 역할을 담당하는지 확인하기 위해, 먼저 주골반신경절 세포에 시그마 수용체가 발현되어 있는지를 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)으로 확인하였다. 실험방법에서 전술한 바와 같이 주골반신경절 세포로부터 전체 RNA를 분리한 후, sence와 anti-sence primer를 이용한 PCR로 현재까지 유일하게 클로닝된 시그마 수용체 type-1 유전자의 발현을 확인하였다. 대조군으로 시그마 수용체가 발현되어 있다고 알려진 상경신경절(Superior Cervical Ganglion; SCG) 세포를 대조군으로 하였다. 역전사 중합 연쇄반응 산물을 전기영동(1.2% agarose gel, 50 V)을 통해 확인한 결과, 대조군과 비교하여 발현 강도는 작지만 골반신경절 세포에도 시그마 수용체 type-1을 코딩하는 유전자 발현(639 bp)이 확인되었다(그림 5).

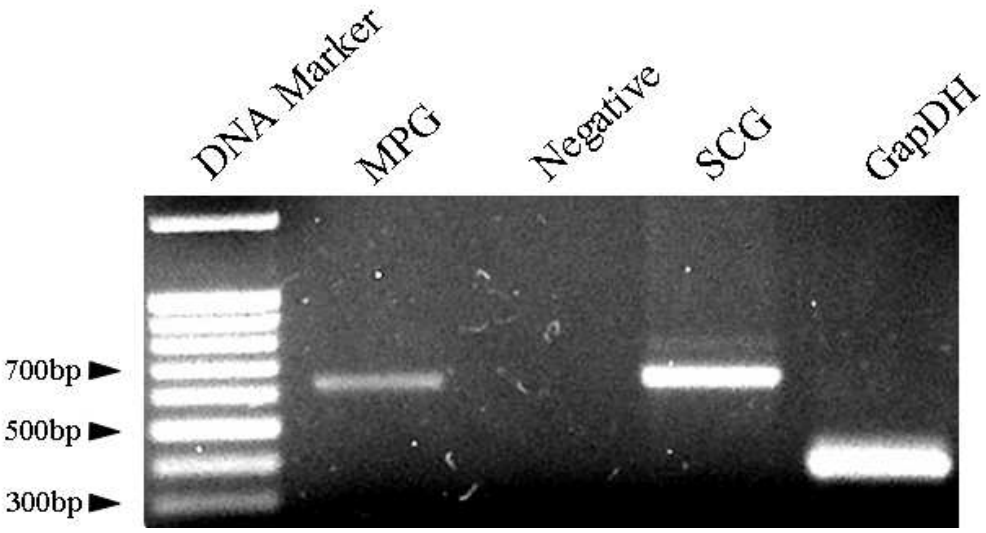

그림 5. 주골반신경절 세포에 발현된 시그마 수용체의 동정. 주골반신경절 세포에 발현된 시그마 수용체를 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)으로 확인하였다. 시그마 수용체 type-1을 위한 primer는 5′-GTCTTTTGCACGCCTCGCTGTCTGAGTACG-3′(sense)과 5,-ACCCTCTCTGGARGGAGGTGAGTGC-3′(anti-sense)으로 하였다. PCR 반응을 94℃ 30초, 61℃ 45초, 그리고 72℃ 1분 동안 30 cycle로 하였고, 대조군으로 상경신경절(SCG) 세포를 이용하였다. 전기영동은 1.2% agarose 젤에서 50 V로 40분간 전개시켰다. 유전적 오염(genomic contamination) 여부를 확인하기 위해 negative control로 revers transcriptase 효소를 넣지 않은 RT-PCR 산물을 확인하였으며, 내부 control로 GapDH를 사용하였다.

3.2. 시그마 수용체 리간드에 의한 주골반신경절 세포의 칼슘 전류의 조절

주골반신경절은 낮은 막전압(-50～-20 mV)에서 활성화(low voltage-activated)되는 T-형 칼슘전류가 나타나는 교감신경(sympathetic) 세포군과 그렇지 않은 부교감신경(parasympathetic) 세포군으로 크게 나눌 수 있었다. Zhu 등(1995)의 보고에 의하면 MPG 신경절에서 이러한 T-형 전류를 나타내는 세포는 대부분 tyrosine hydroxylase에 대한 면역-조직학적 염색에서 양성을 보이는 교감 신경세포인 반면, T-형 전류가 없는 세포는 부교감 신경세포들이라 하였다. 주골반신경절 세포에 발현되어 있는 고전압에서 활성화(high voltage-activated)되는 칼슘채널은 N-형, L-형, 그리고 R-형 등이 보고되었고(Won 등, 2006), -30 mV의 막전압에서 활성화되기 시작하여 +10 mV의 막전압에서 전류가 최대치를 나타낸다고 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 주골반신경절 세포의 막전압을 -80 mV로 고정한 후 +10 mV로 탈분극 자극을 주어 칼슘 전류를 유발하였고, 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘 전류의 조절이 막전압 의존적인지를 확인하기 위해 +10 mV의 강한 자극 사이에 +80 mV의 강한 탈분극 자극을 주는 double-pulse protocol을 사용하였다. 시그마 수용체의 활성이 주골반신경절의 칼슘전류에 미치는 영향을 확인하기 위해 시그마 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드(ligand)를 처치하여 칼슘전류 크기의 변화를 조사하였고, 교감 신경군과 부교감 신경군 사이에 칼슘전류 조절 정도의 차이가 있는지를 확인하였다. Double-pulse protocol에 의해 유발된 칼슘전류에 시그마 수용체 아형중 type-1에 선택적인 (+)-SKF10047과 각 아형(type-1, 2)에 모두 선택적인 haloperidol을 처치하였을 때 칼슘 전류의 억제 정도를 그림 6에 도시하였다. (+)-SKF10047(10 μM)에 의한 칼슘전류의 억제정도는 교감(3.8±2.1%, n=3)과 부교감 신경군(5.4±0.7%, n=3)에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 교감 신경군과 부교감 신경군에서 유발된 칼슘전류의 억제는 (+)-SKF10047의 처치 농도 증가시에도 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 시그마 수용체 type-1과 type-2 모두에 특이적인 haloperidol(10 μM)에 의한 칼슘전류의 억제정도도

(+)-SKF10047의 효과와 같이 교감(32.8±11.8%, n=3)과 부교감(37.3±1.6%, n=3) 신경군에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이러한 억제 효과는 haloperidol의 처치 농도가 30 μM로 증가함에 따라 증가하였고, 교감(69±13%, n=3)과 부교감(70±3%, n=3) 신경군 사이에 억제효과는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로부터 시그마 수용체에 특이적인 리간드를 처치하여 시그마 수용체를 활성화시켰을 때, 골반신경절 세포에서 유발된 칼슘 전류의 억제는 교감 신경군과 부교감 신경군에서 동일하게 나타남을 알 수 있었다.

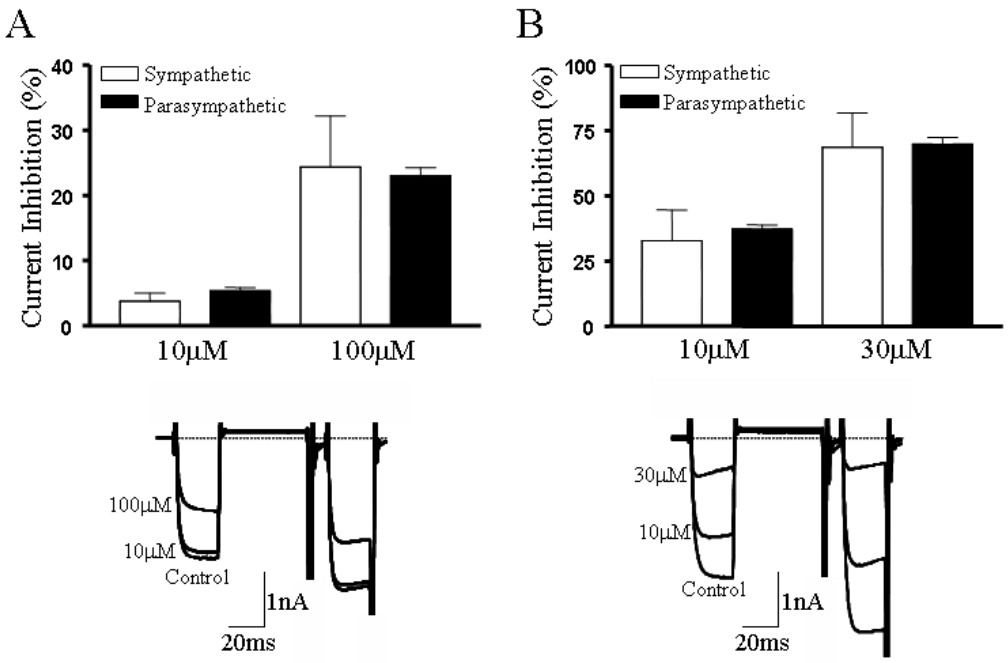

그림 6. 교감 및 부교감 신경에서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘전류 억제. 칼슘전류는 double-pulse protocol에 의해 유발되었고, 칼슘 전류의 억제는 +10 mV의 탈분극 자극을 준 후 10ms 지점에서 측정하였다. A. 시그마 수용체 type-1에 특이적인 (+)-SKF10047을 처치하였을 때 칼슘전류의 억제 효과. B. 시그마 수용체 아형에 비특이적인 haloperidol을 처치하였을 때 교감 신경군과 부교감 신경군으로부터 유발된 칼슘 전류의 억제 효과. 모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였고, 실험례수(n=)는 3임.

3.3. 시그마 수용체 리간드에 의한 주골반신경절 교감세포의 칼슘 전류의 억제시 G 단백질의 관여 확인

일반적으로 신경전달 물질 수용체 활성에 의한 칼슘 전류의 억제는 G 단백질에 의해 매개된다고 알려져 있다(Hille, 2001). 따라서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘 전류의 억제에 G 단백질이 매개되는지 확인하였다. 일반적으로 G 단백질이 이온전류의 억제에 매개하는지를 확인하는 방법으로 G 단백질은 알파(G_α)와 베타 감마($G_{\beta\gamma}$)의 heterotrimer로 이루어져 있는데 G_α subunit에 GTP의 결합을 경쟁적으로 억제하여 결과적으로 G 단백질을 매개로 하는 이온전류의 억제를 차단한다고 알려진 가수분해되지 않는 (non-hydrolysis) GDP(guanosine diphosphate) 유도체인 GDP-βS를 이용하거나, 수용체의 활성화 없이 지속적으로 G 단백질을 활성화시키는 GTPγS나 Gpp(NH)p를 이용하는 것이다. 후자의 경우 G 단백질을 모두 활성화 시킨 상태에서 어떤 효현제(agonist)를 가하였을 때 칼슘전류의 억제가 사라진다면 그 억제는 G 단백질을 매개하는 것이고, 억제가 그대로 나타난다면 G 단백질을 매개하지 않는다는 것을 확인할 수 있다(Holz 등, 1986; Ikeda, 1991; Jeong 및 Wurster, 1997). 본 실험에서는 Gpp(NH)p을 전처치하여 G 단백질을 모두 활성화시킨 후 type-1 시그마 수용체에 특이적인 (+)-SKF10047과 각 아형에 모두 작용하는 haloperidol을 처리하여 억제 효과의 변화를 확인하였다. (+)-SKF10047(100 μM)을 처치하였을 때 나타나는 칼슘전류의 억제 효과가 Gpp(NH)p를 투석(dialysis)시키기 전(24±14%, n=3)과 후(20±4%, n=3)에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 7). Haloperidol(10 μM)을 처치하였을 때 나타나는 칼슘전류의 억제 효과 역시 Gpp(NH)p를 투석(dialysis)시키기 전(33±12%, n=3)과 후(32±5%, n=3)에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 효과는 haloperidol 처치 농도에 관계없이 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 시그마 수용체 활성에 의한 골반신경절 세포에서의 칼슘전류 억제는 G 단백질이 매개하지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다.

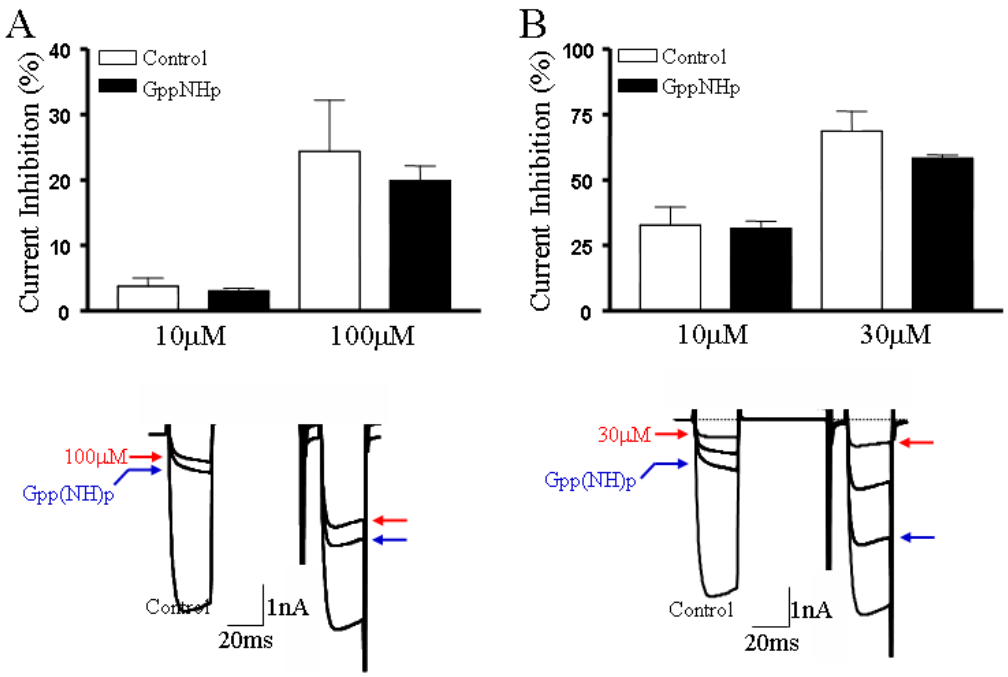

그림 7. 주골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘 전류의 억제시 G 단백질의 매개 여부 확인. 시그마 수용체 type-1에 선택적인 (+)-SKF10047의 칼슘전류 억제(A)와 시그마 수용체 아형에 비특이적인 haloperidol에 의한 칼슘전류 억제(B). Gpp(NH)p는 패치 전극(patch pipet)내에 첨가하여 세포내로 5분간 투석시켰다.

3.4. 주골반신경절 교감 세포의 칼슘전류 억제를 매개하는 시그마 수용체 아형의 동정

현재까지 시그마 수용체 type-2의 클로닝이 이루어지지 않아 골반신경절 세포에서 확인할 수 없었다. 따라서 시그마 수용체 아형중 어떤 아형이 주로 칼슘 전류를 억제하는 시그마 수용체 아형에 선택적인 리간드를 이용한 약리학적 방법으로 시그마 수용체 type-1과 type-2 중 어떤 아형이 주로 칼슘채널의 억제 작용을 매개하는지 확인하였다. 먼저 시그마 수용체 type-1이나 type-2에 모두 특이적인 DTG와 haloperidol에 의해 골반신경절 세포로부터 측정된 칼슘전류가 어떤 양상으로 억제되는지 확인하였다. 골반신경절 세포의 막전압을 -80 mV로 고정한 상태에서 +10 mV로 탈분극(depolarization) 자극을 주었을 때 유발되는 칼슘전류에 DTG(10, 30 , 100, 300, 1000, 및 3000 μM)와 haloperidol(1, 3, 10, 30, 100, 및 300 μM)에 의한 농도의존적 억제 양상을 조사하였다. DTG와 haloperidol의 처치농도와 억제 관계를 Hill 공식($I_{Ca}=I_{max}(1+IC_{50}/[X])^{-1}$)을 이용하여 fitting 하였을 때 나타나는 농도-반응곡선에서 골반신경절로부터 유도된 칼슘전류의 50%를 억제하는 농도(IC_{50})가 각각 427±44 μM(n=3)과 19±2 μM(n=3)로 나타났고, Hill slope은 각가 1.16±0.15와 1.11±0.11로 확인되었다(그림 8, 그림 10). 그림 9에 나타난 바와 같이, 시그마 수용체 type-1과 type-2에 모두 작용하는 리간드인 (+)-SKF10047과 ifenprodil을 각각 처치하였을 때 나타나는 칼슘전류의 억제 정도를 Hill 공식으로 fitting하여 IC_{50}를 확인한 결과 각각 457±12 μM(n=3)과 58±4 μM(n=3)이었고, Hill slope은 각각 1.18±0.04와 1.42±0.09이었었다(그림 10). 이상의 결과로부터 골반신경절 세포내 칼슘전류에 미치는 시그마 수용체에 선택적인 리간드의 억제 효력(inhibitory potency)이 haloperidol > ifenprodil > DTG > (+)-SKF10047의 순서로 나타남을 알 수 있었다. 이 결과를 종합해 보면 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드에 의한 억제보다는 type-2에 선택적인 리간드에 의한 억제 효과가 더 큰 것을 알 수 있고, 따라서 시그마 수용체에 의한 칼슘전류 억제는 type-2 아형에 의해 주로 매개된다는 사실을 확인할 수 있다.

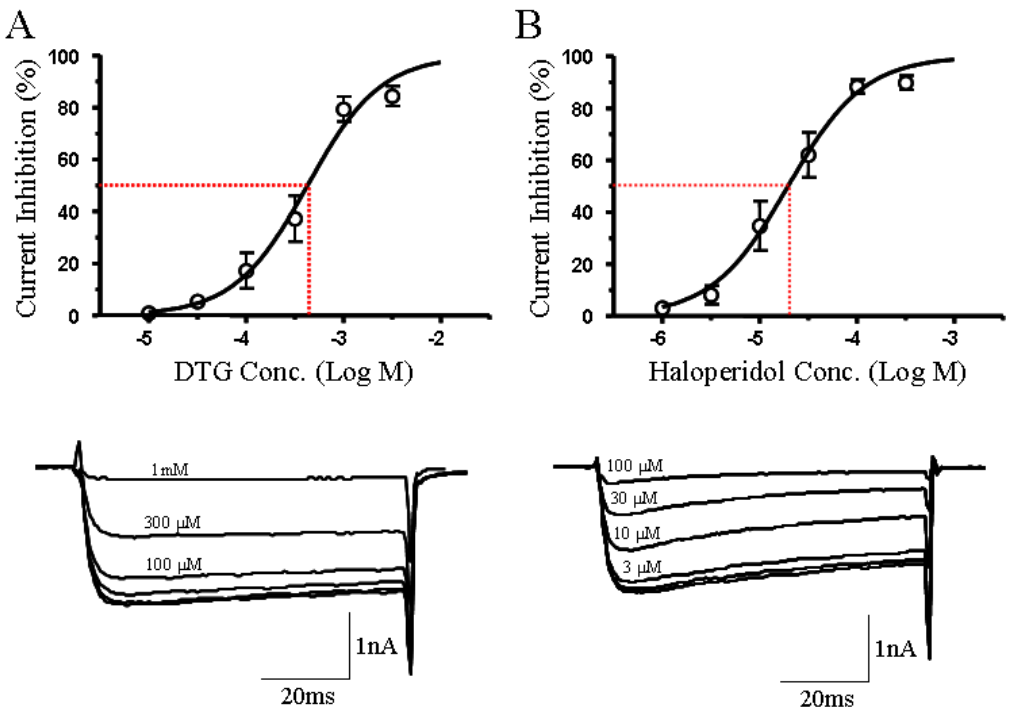

그림 8. 골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 아형에 비특이적인 리간드에 의한 칼슘전류 억제 양상. 시그마 수용체 아형에 비특이적인 DTG(A)와 haloperidol(B)에 의한 농도반응곡선. 아래 trace는 DTG와 haloperidol의 농도에 따른 칼슘전류의 억제 양상. 칼슘 전류는 세포를 -80 mV로 고정한 상태에서 200 ms 동안 +10 mV의 탈분극 자극을 주어 유발하였다. 각 데이터 점을 연결하는 곡선은 Hill 공식($I_{Ca}=I_{max}(1+IC_{50}/[X])^{-1}$)을 이용하여 fitting 하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였다.

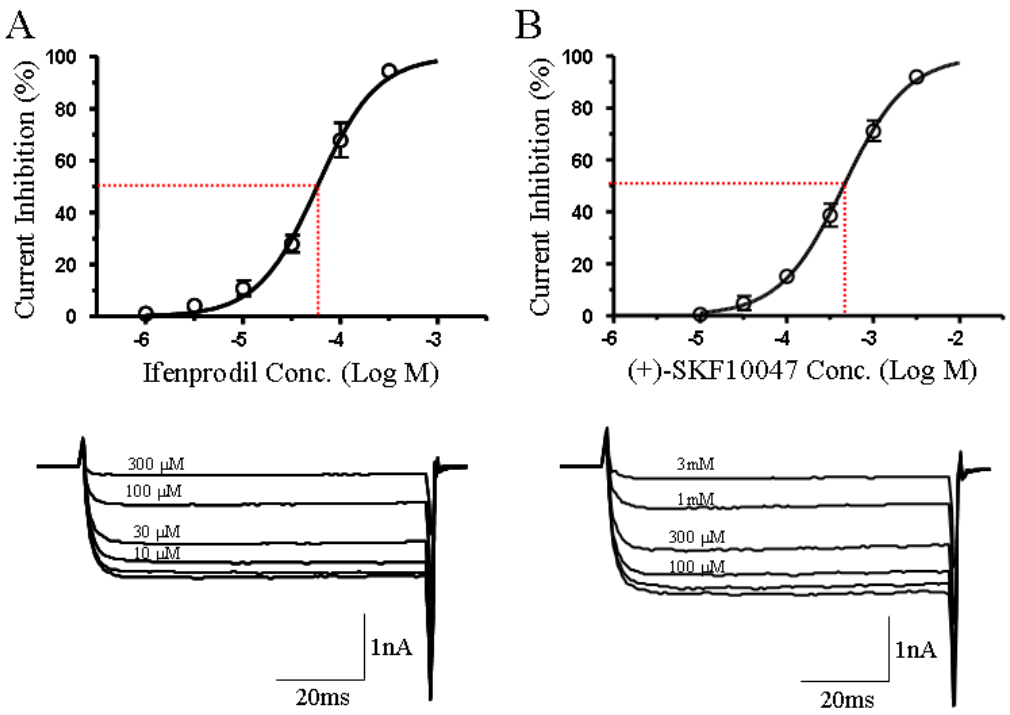

그림 9. 골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 아형에 선택적인 리간드에 의한 칼슘전류 억제 양상. 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드인 ifenprodil(A)과 type-1에 선택적인 (+)-SKF10047(B)에 의한 농도반응곡선. 아래 trace는 ifenprodil과 (+)-SKF10047의 농도에 따른 칼슘전류의 억제 양상. 칼슘 전류는 세포를 -80 mV로 고정한 상태에서 200 ms 동안 +10 mV의 탈분극 자극을 주어 유발하였다. 각 데이터 점을 연결하는 곡선은 Hill 공식($I_{Ca}=I_{max}(1+IC_{50}/[X])^{-1}$)을 이용하여 fitting 하였다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였다.

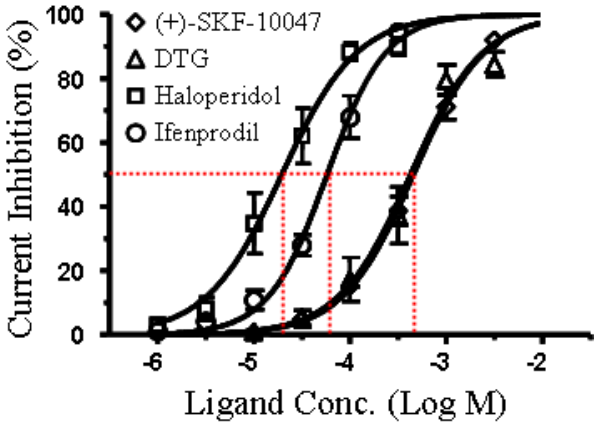

그림 10. 골반신경절 교감 세포에서 시그마 수용체 리간드에 의한 칼슘전류 억제의 농도-반응곡선. 시그마 수용체 리간드인 (+)-SKF10047(◇), DTG(△), haloperidol(□), ifenprodil(○)에 의한 농도 반응곡선 요약. 각 데이터 점을 연결하는 곡선은 Hill 공식($I_{Ca}=I_{max}(1+IC_{50}/[X])^{-1}$)을 이용하여 fitting 하였다. (+)-SKF10047, DTG, haloperidol, ifenprodil의 칼슘전류를 50% 만큼 억제하는 농도(IC_{50})는 각각 457±12, 427±44, 19±2, 58±4 μM(n=3) 이었다. 모든 값들은 평균±표준오차로 표시하였다.

3.5. 골반신경절 세포 내 칼슘농도에 미치는 시그마 수용체 리간드의 영향

전술한 바와 같이 세포 내 칼슘은 신경전달물질의 방출(neurotransmitter release), 호르몬 분비(hormone secretion), 신경의 흥분성(excitability), 시냅스 연접의 가소성(synaptic plasticity), 근육의 수축(muscle contraction), 화학주성(chemotaxis), 유전자 발현, 세포의 성장과 분화(growth and differentiation), 그리고 자가사멸(apoptosis)등 다양한 과정의 조절에 중요한 역할을 담당한다(Berridge 등, 1998). 이와 같이 중요한 역할을 담당하는 세포 내 칼슘은 세포 외부로부터 전기화학적 농도차(electrochemical gradient)에 의한 칼슘통로를 통한 유입과 세포 내 칼슘 저장소로부터 유리되는 칼슘에 의해 끊임없이 변화될 수 있다.

이전 보고에 의하면 SK-N-SH neuroblastoma에서 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드를 처치하였을 때 세포 내 칼슘이 일시적(transiently)으로 증가하고, 이러한 칼슘은 세포 외부로부터 유입된 것이 아닌 세포 내 칼슘 저장소로부터 유리된 것으로 확인되었다(Vilner 및 Bowen, 2000). 따라서 본 연구에서도 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 리간드를 처치하여 세포 내 칼슘의 직접적인 변화가 있는지를 확인하였다. Fura-2/AM(5 μM)으로 37℃에서 30분간 부하시킨(loading) 골반신경절 세포를 340 nm와 380 nm로 번갈아가며 여기(excitation)시켰을 때, 510 nm로 방출(emission)되는 빛의 비율(ratio, F_{340}/F_{380})을 측정하였다. 그림 11에 나타낸 바와 같이 시그마 수용체 type-1에 선택적인 (+)-SKF10047(10 μM)을 처치하였을 때 골반신경절 세포로부터 측정되는 F_{340}/F_{380}이 일시적(transiently)으로 빠르게 증가(0.23±0.04, n=3)되는 현상을 관찰할 수 있었다. (+)-SKF10047에 의해 유도되는 일시적인 세포내 칼슘증가와 마찬가지로 시그마 수용체 type-2에 선택적인 ifenprodil 1 μM과 10 μM을 처치하였을 때 F_{340}/F_{380}이 각각 0.32±0.04(n=3)과 0.62±0.08(n=3)만큼 증가되는 것으로 확인되었다(그림 12). 시그마 수용체 리간드를 처치하였을 때 나타나는 세포 내 칼슘의 증가는 type-1에 선택적인 (+)-SKF10047을 처치하였을 때 보다 type-2에 선택적인 ifenprodil을 처치하였을 때 더 크게 나

타났다. 시그마 수용체 리간드를 처치하였을 때 세포내 칼슘증가는 전체 세포들 중 세포용량(cell capacitance)이 작은 세포에서 주로 나타났다.

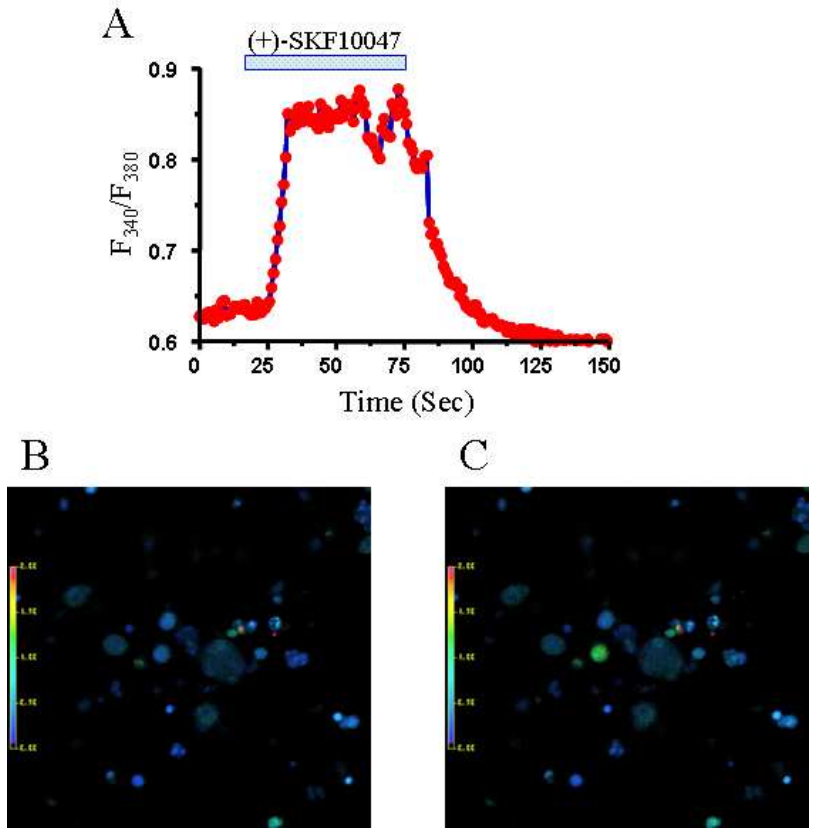

그림 11. 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드에 의한 세포 내 칼슘 증가. 골반신경절 세포를 fura-2/AM으로 37℃에서 30분간 부하(loading)시킨 후, F_{340}/F_{380} 비율을 1 Hz의 속도로 연속하여 측정(A), (+)-SKF10047을 처치하기 전(B)과 후(C)의 세포내 칼슘 농도 변화 사진.

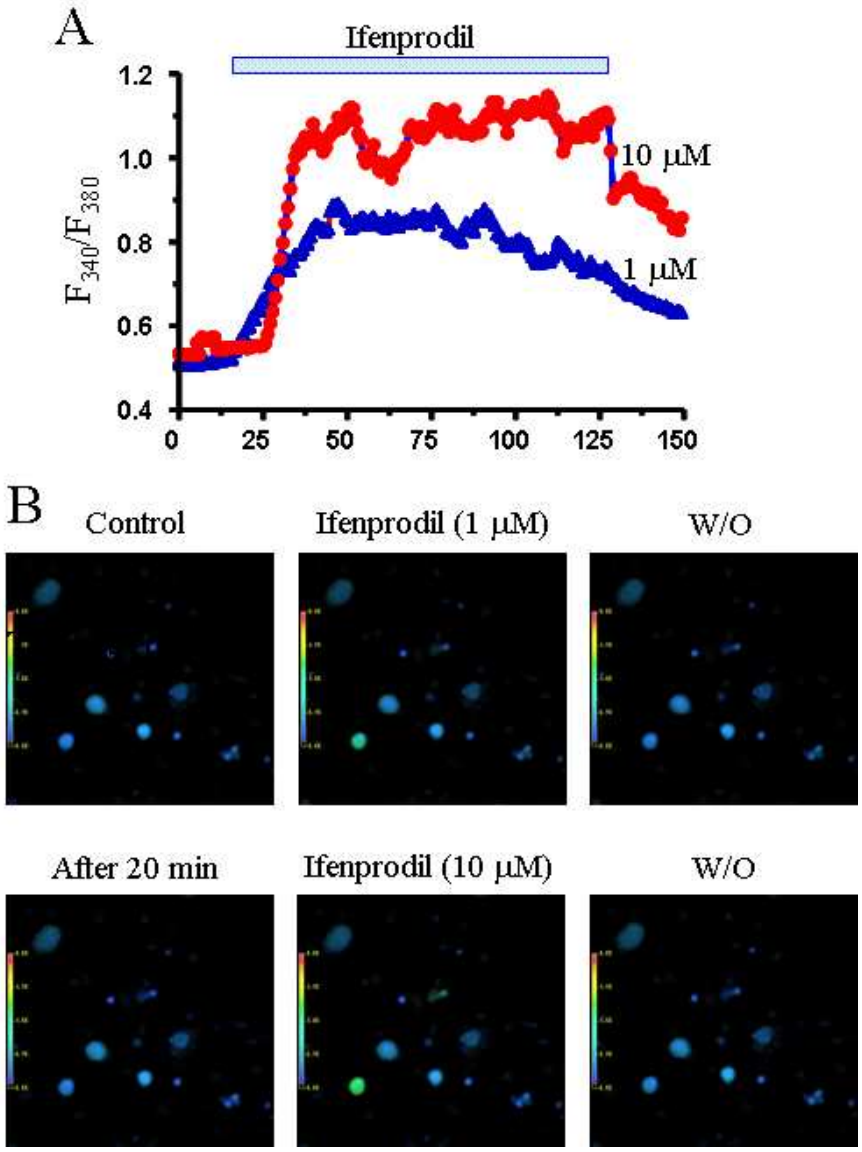

그림 12. 골반신경절 세포에서 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드에 의한 세포 내 칼슘 증가. 골반신경절 세포를 fura-2/AM으로 37℃에서 30분간 부하(loading)시킨 후, F_{340}/F_{380} 비율을 1 Hz의 속도로 연속하여 측정(A), ifenprodil을 처치하기 전과 후의 세포내 칼슘 농도 변화 사진(B).

3.6. 소포체로부터의 칼슘 유리에서 시그마 수용체의 역할

G 단백질중 $G_{q/11}$에 연결된 수용체가 활성화 되었을 때 G_{α}와 $G_{\beta\gamma}$ 서브유닛이 해리되고, 이때 활성화된 G_{α} 서브유닛에 의해 세포막(plasma membrane)에 존재하는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP_2)가 diacylglycerol(DAG)와 inositol 1,4,5-triphosphate(IP_3)로 분해되고, 이때 생성된 DAG는 protein kinase C(PKC)를 활성화시키고, IP_3는 소포체 막에 존재하는 IP_3 수용체를 활성화시켜 소포체로부터 세포질로 칼슘이온을 유리시킨다. 소포체 막에 존재하는 IP_3 수용체는 ankyrin이라는 구조 단백질 및 시그마 수용체 type-1과 동일 위치에 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. IP_3에 의해 IP_3 수용체가 활성화 되면 소포체로부터 칼슘이 유리되는데 ankyrin이 존재하면 칼슘의 유리가 크지 않지만, ankyrin이 시그마 수용체 활성에 의해 IP_3 수용체로부터 해리되면 소포체로부터의 칼슘 유리가 크게 증가한다고 보고되었다(Hayashi 및 Su, 2001). 따라서 본 연구에서도 골반신경절 세포의 소포체로부터 IP_3 수용체 활성에 의한 소포체로부터의 칼슘 유리가 시그마 수용체의 활성에 의해 증가하는지를 확인하였다. G 단백질중 $G_{q/11}$ 단백질에 연결된 수용체중 골반신경절 세포에서 직접적인 칼슘 증가를 나타내는 수용체로 bradykinin 수용체가 알려져 있다. 그림 13에 나타난 바와 같이, fura-2/AM으로 부하시킨 골반신경절 세포에 bradykinin(100 nM)을 처치하였을 때 세포내 칼슘이 증가되는 것(0.32±0.08, n=5)을 확인하였고, 20분 간격으로 반복적인 투여를 하더라도 칼슘증가의 폭이 변화되지 않는 것(0.29±0.06, n=5)으로 확인되었다. Fura-2/AM으로 부하시킨 골반신경절 세포에 bradykinin(100 nM)을 단독으로 처리하였을 때보다 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드인 (+)-SKF10047(1 μM)을 전처치하였을 때 세포 내 칼슘이 더 크게 증가되는 것으로 확인되었다. 이러한 칼슘증가는 모든 골반신경절 세포에서 관찰되지 않았고, 세포 용량(cell capacitance)이 작은 세포에서 주로 나타났다.

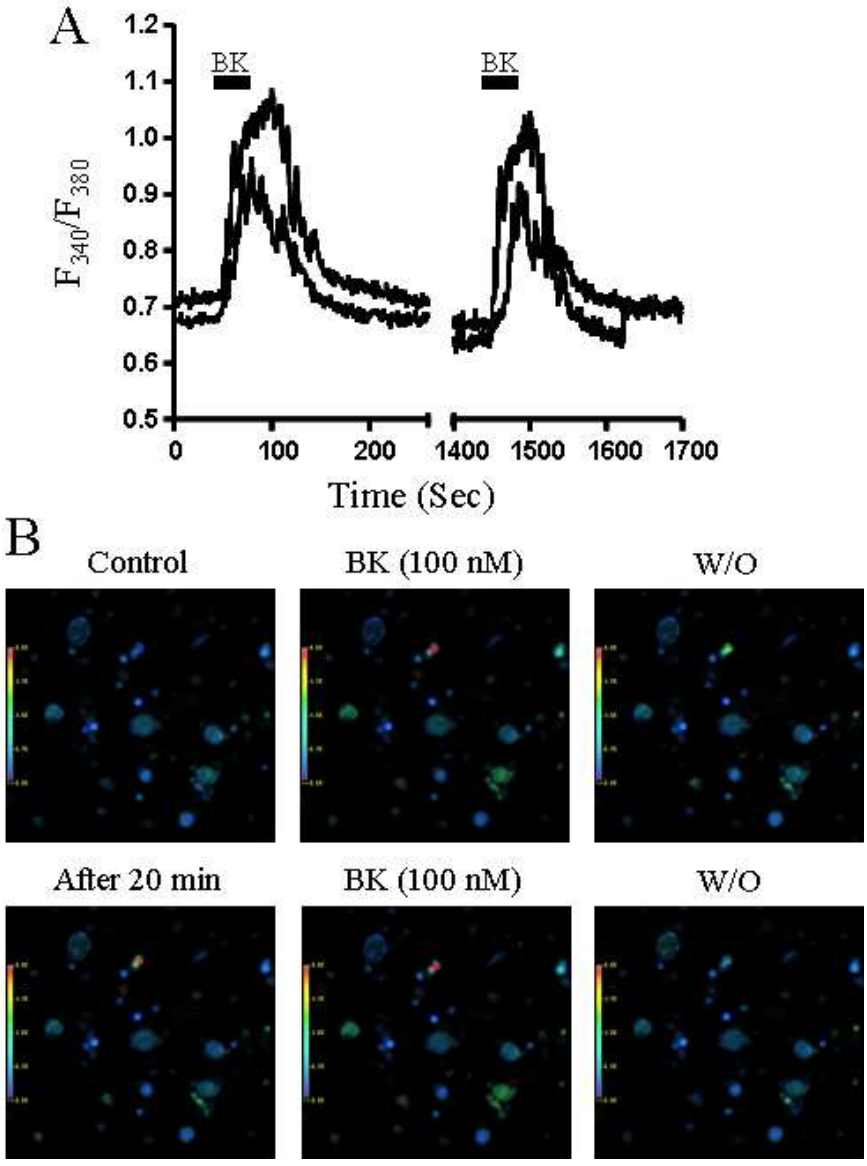

그림 14. Bradykinin에 의해 유도되는 골반신경절 세포 내 칼슘 증가. 골반신경절 세포를 fura-2/AM(5 μM)으로 37℃에서 30분간 부하(loading)시킨 후, F_{340}/F_{380} 비율을 1 Hz의 속도로 연속하여 측정(A). Bradykinin을 20분의 간격을 두고 반복하여 처치하여 bradykinin에 의해 유도되는 칼슘 증가의 변화 확인.

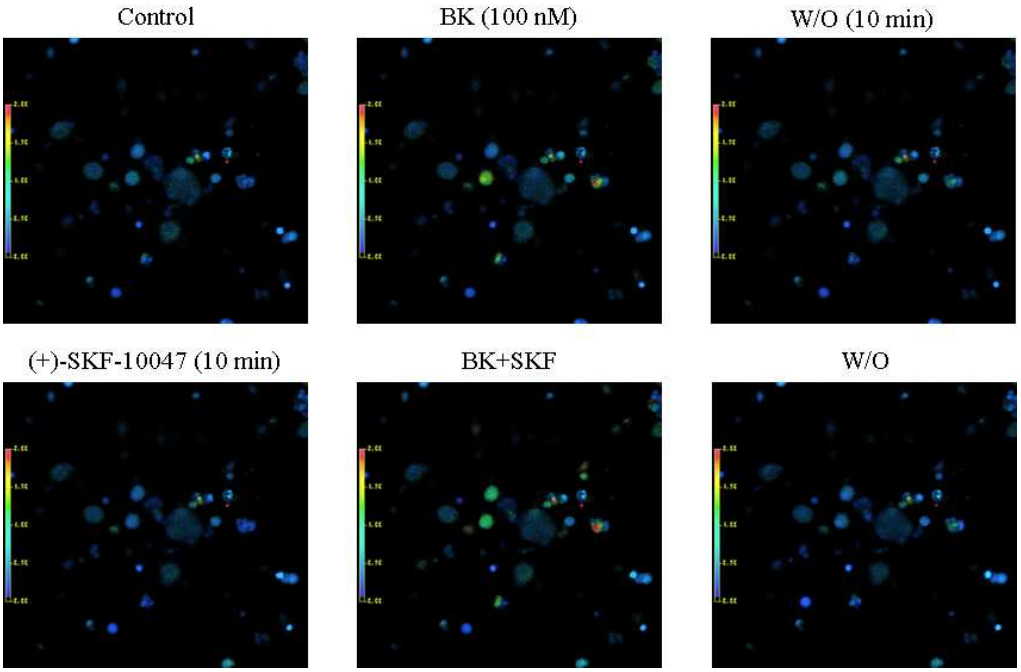

그림 15. Bradykinin에 의해 유도되는 골반신경절 세포 내 칼슘증가에 미치는 시그마 수용체 type-1 리간드의 영향. 골반신경절 세포를 fura-2/AM(5 μM)으로 37℃에서 30분간 부하(loading)시킨 후, F_{340}/F_{380} 비율을 1 Hz의 속도로 연속하여 측정. Bradykinin 투여 후 20분간 관류액으로 씻어주고, 10분간 (+)-SKF10047(1 μM)을 전처치한 후 나타나는 bradykinin에 의한 세포 내 칼슘 증가의 변화 확인.

제4장 고찰

시그마 수용체는 opioid나 phencyclidine 수용체와는 다른 특성을 가진 수용체로 분류되었고, 우울증(mood disorder), 기억(amnesic) 및 인지 장애(cognitive disorder), 약물남용(drug abuse) 등의 정신과적 질환, 지속적인 운동장애(tardive dyskinesia), 통증 등 다양한 신경계 이상을 매개한다. 또한 암세포의 경우 정상세포 상태에서의 발현보다도 수백에서 수천 배까지 발현이 증가되어 있는 것으로 보고되었고(John 등, 1995; Moody 등, 2000; Vilner 등, 1995), 따라서 시그마 수용체에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드를 이용한 암의 진단 및 치료에도 이용될 수 있기 때문에 임상적으로도 매우 중요한 연구 대상이 되고 있다(Guitart 등, 2004; Aydar 등, 2004).

시그마 수용체 type-1은 중추신경계에서 운동기능(motor function)을 담당하는 지역, 변연계(limbic system), 감각영역(sensory area), 내분비 영역(endocrine area) 등에 집중적으로 발현(expression)되어 있고, type-2는 특히 자세(posture)와 보행(movement)에 관여하는 지역에 집중적으로 발현되어 있다고 보고되었다(McCann 등, 1994). 말초 기관의 경우 시그마 수용체가 간, 신장, 성 기관 등에 발현되어 있다고 보고되었고(Dumont 및 Lemaire, 1991; Jansen 등, 1992; Hellewell 등, 1994; Maurice 등 1996). 본 연구에서 연구 대상이기도 한 자율신경계의 경우 상경신경절(superior cervical ganglion)이나 내심신경절(intracardiac ganglion) 세포에 높은 수준으로 발현되어 있음이 보고되었다(Zhang 및 Cuevas, 2002). 이러한 자율신경절에 발현된 시그마 수용체는 전압의존적 칼슘 채널과 포타슘 채널의 활성을 조절한다고 보고되었다(Zhang 및 Cuevas, 2002; 2005). 자율신경인 골반신경절(major pelvic ganglion; MPG) 세포는 교감신경인 하복신경(hypogastric nerve)과 부교감신경인 골반신경(pelvic nerve)으로부터 구심성 입력을 받아 방광, 전립선 및 음경 등과 같은 비뇨생식계 기관과 일부의 장(bowel)의 신경지배를 하고(Langworthy 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993a), 기능적으로는 배뇨(micturation)나 발기(erection) 현상 등을 조절한다(Zoubek 등, 1993). 본 연구에서

시그마 수용체가 상경신경절이나 내심신경절에 비해 상대적으로 발현량이 적지만 골반신경절 세포에 시그마 수용체가 발현되어 있음을 역전사 중합 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 확인하였다.

세포내 칼슘 이온은 전술한 바와 같이 신경전달물질의 방출, 호르몬 분비, 신경의 흥분성(excitability) 조절, 근육의 수축(muscle contraction), 유전자 발현(gene expression), 세포의 성장과 분화(growth and differentiation), 자가세포사멸(apoptosis)등 생리적 항상성(physiological homeostasis) 조절에 중요한 역할을 담당한다(Barridge 등, 1998). 이러한 세포 내 칼슘 이온은 필요성에 따라 농도 증가와 감소가 빈번하게 발생하지만 정확하게 조절이 이루어진다. 세포 내 칼슘 농도의 증가는 세포 밖으로부터 칼슘 이온이 칼슘 채널이나 리간드에 의해 열리는 채널을 통해 유입되거나 세포내 칼슘 저장소로부터 유출되는 경로에 의해 발생한다. 최근 보고에 의하면 시그마 수용체가 세포 내 칼슘 농도를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다는 사실이 밝혀졌다(Guitart 등, 2004; Bowen, 2000). 예를 들면 시그마 수용체 활성이 해마 추체세포(hippocampal pyramidal neuron)에서 고전압에서 활성화(high voltage-activated; HVA)되는 칼슘 채널을 통한 칼슘 유입을 억제한다고 보고되었다(Church 및 Fletcher, 1995). 한편, 시그마 수용체에 의한 HVA 칼슘 채널의 억제를 통한 세포내 칼슘 조절이 쥐 일차 피질신경세포(primary cortical neuron)에서의 신경방어(neuroprotection)를 매개한다고 보고된 바 있다(Klette 등, 1995). 이와 같은 중추신경계 세포 내 칼슘 조절뿐만 아니라, 자율신경계 세포의 경우에도 시그마 수용체의 활성이 세포 내 칼슘 농도의 조절에 중요한 역할을 담당한다고 보고되었다. 최근 교감 신경군인 상경신경절 세포에서 시그마 수용체 type-2에 선택적인 리간드를 처치하였을 때 전압의존적 칼슘 채널이 억제된다고 보고되었고, 부교감 신경군인 내심신경절 세포에 발현된 전압의존적 칼슘 채널 역시 type-2에 선택적인 리간드에 의해 억제된다고 보고되었다(Zhang 및 Cuevas, 2002). 시그마 수용체 type-1을 개구리 알에 이종발현(heterologously expression)한 후 type-1에 선택적인 리간드를 처치하였을 때 리간드에 의한 직접적인 억제(direct inhibition)가 아닌 수용체를 매개(receptor-mediated)로 하여 A-type 포타슘($K_v1.4$)과 delayed-rectifying 포타슘 채널($K_v1.5$)을 통한 전류를 억제한다고 보고되

었다(Aydar 등, 2002). 또한 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드를 처치하엿을 때 내심신경절 세포에 발현된 delayed rectifying 포타슘 채널과 M-type 포타슘 채널을 억제하여 궁극적으로 안정막전압(resting membrane potential; RMP)의 변화 없이 활동전위(action potential)의 발생 빈도(frequency)를 감소시킨다고 보고되었다(Zhang 및 Cuevas, 2005). 본 연구에서도 시그마 수용체 리간드를 처치하여 확인한 결과 리간드에 의한 HVA 칼슘 채널의 활성의 억제 정도가 haloperidol > ifenprodil > DTG > (+)-SKF10047 순으로 나타났기 때문에, 상경신경절과 내심신경절 세포에서 보고된 바와 같이 시그마 수용체 type-2에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

일반적으로 신경전달물질에 의한 칼슘전류의 억제는 G protein의 네 가지 아군들 (G_s, $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, 그리고 G_{12})들 중 백일해 독소(pertussis toxin; PTX)에 민감한 $G_{i/o}$이나 PTX에 민감하지 않은 $G_{q/11}$에 의해 주로 매개된다고 알려져 있다(Ikeda 등, 1999; Hille, 1992; Jeong 등, 1999). PTX-민감성 $G_{i/o}$에 의해 일어나는 칼슘전류의 전압의존적 억제 현상은 $G_{\alpha\beta\gamma}$와 $G_{\beta\gamma}$ subunit 중에서 $G_{\beta\gamma}$가 다른 신호전달물질(second messenger)을 통하지 않고 직접 칼슘통로에 가서 결합하는 막에 국한된(membrane delimited) 경로로 일어난다고 알려져 있다(Ikeda, 1996; Herlitze 등, 1996; Ikeda 및 Dunlap, 1999). PTX에 민감하지 않은 $G_{q/11}$에 연결된 신경전달물질 수용체가 활성화되면 G_α와 $G_{\beta\gamma}$가 해리되고, G_α가 phospholipase C(PLC)를 활성화시키면 G 단백질은 막에 풍부하게 존재하는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP_2)가 diacylglycerol(DAG)와 inositol 1,4,5-triphosphate(IP_3)로 분해된다. 이때 생성된 IP_3는 소포체 막에 존재하는 IP_3 수용체를 활성화시켜 소포체로부터 세포질로 칼슘이온을 유리시키고, DAG는 protein kinase C(PKC)를 활성화시키고, PKC에 의해 전압의존적 칼슘 채널을 포함한 세포막 단백질의 인산화(phosphorylarion)가 일어나게 된다. 시그마 수용체를 통한 세포내 신호전달 경로(signal transduction pathway)는 아직까지 정확하게 밝혀져 있지 않았고, 따라서 시그마 수용체의 신호전달에 G 단백질이 관여하는지 또는 관여하지 않는지 논쟁거리가 되고 있다. G 단백질이 이온전류의 억제에 매개하는지를 확인하는 방법에는 여러 가지가 있는데 첫째, 가수분해되지 않는 GDP-βS를 사용하여 G 단백질의

GDP-GTP 교환(exchange)을 억제하여 G 단백질을 비활성화 시켰을 때 효현제에 대한 반응을 관찰하거나, 둘째, 수용체의 활성을 by-pass하고 G_{α} 서브유닛을 GTPγS를 사용하여 비가역적으로 활성화시킨 후 효현제에 대한 반응을 관찰하는 것이다(Holz 등, 1986; Ikeda, 1991; Jeong 및 Wurster, 1997). 초기의 방사선 동위원소로 표지된 리간드를 이용하여 시그마 수용체와 결합 효율을 비교한 결과 GTP나 Gpp(NH)p에 의해 그 효율이 변화된다고 보고되었다(Beart 등, 1989; Connick 등, 1992). 최근에는 마우스 전두엽 피질에 위치한 연접 막에서 시그마 수용체에 의해 G 단백질의 활성이 증가한다는 보고가 있었고(Tokuyama 등, 1997; 1999), 시그마 수용체에 [3H](+)-3-PPP의 결합이 백일해 독소(pertussis toxin; PTX)와 콜레라 독소(cholera toxin; CTX)의 전처치에 의해 억제된다는 보고도 있었다(Ytzhak 등, 1989; Basile 등, 1992). 더욱이 해마 CA3 세포에서 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드에 의한 NMDA에 의해 유도되는 세포의 활성화(activation)의 억제가 PTX와 CTX의 전처치에 의해 억제된다고 보고되었고(Monnet 등, 1994; Soriani 등, 1999), 심근세포(cardiac myocytes)에서 BD737과 같은 시그마 수용체 type-1 리간드에 의해 세포내 IP3의 농도가 증가된다고 보고되었다(Novakova 등, 1998). 이러한 결과들은 적어도 G 단백질이 시그마 수용체 type-1의 활성에 의해 유도되는 효과의 조절을 어느정도 매개한다고 할 수 있다. 한편, 이러한 몇몇 실험적 증거에도 불구하고, 많은 연구자들은 G 단백질이 시그마 수용체의 신호전달 경로에 포함되지 않는다고 보고하였다. 예를 들면 시그마 수용체 type-1 리간드인 pentazocine에 의한 해마 세포에서의 NMDA에 대한 반응 조절에서 PTX의 전처치는 아무런 변화를 주지 못했다(Monnet 등, 1994). 최근에는 상경신경절과 내심신경절 세포에서 시그마 수용체 리간드에 의한 전압의존적 칼슘 채널의 억제시 GDP-βS의 전처치를 하더라도 억제 정도의 변화를 주지 못했다(Zhang 및 Cuevas, 2002). 본 연구에서도 골반신경절 세포에서의 전기생리학적 실험을 통해 확인한 결과, Gpp(NH)p의 투석 전이나 후에 (+)-SKF10047과 haloperidol에 의한 전압의존적 칼슘 채널의 억제가 차이를 보이지 않았다(그림 7). 시그마 수용체의 세포내 신호전달에 G 단백질의 관여 여부는 더 많은 검증을 거쳐야 확인이 될 것으로 생각한다.

최근의 일련의 연구들은 세포 외부로부터의 칼슘 이온의 유입뿐 아니라 세포 내 칼슘 저장소로부터의 칼슘 유리에도 시그마 수용체가 관여한다고 보고하였다(Hayashi 등, 2000; Vilner 및 Bowen, 2000; Hong 등, 2004). 예를들면 쥐 neuroblastoma NG-108 세포에서 시그마 수용체 type-1 리간드인 (+)-pentazocine이 G단백질 중 $G_{q/11}$에 연결된 bradykinin 수용체의 활성화에 의해 유도되는 세포 내 칼슘 증가를 항진시킨다고 보고하였다(Hayashi 및 Su, 2001; Hong 등, 2004). 소포체에 존재하는 IP_3 수용체, 구조 단백질인 ankyrin, 그리고 시그마 수용체 type-1이 하나의 복합체(complex)를 이루고 있는데 ankyrin이 두가지 수용체를 연결한 형태로 되어 있다(그림 15). 활성화되지 않은 시그마 수용체 type-1은 IP_3 수용체를 기본적으로 억제하고 있기 때문에 IP_3가 IP_3 수용체에 결합하더라도 소포체로부터의 칼슘 유리가 크지 않지만, 시그마 수용체가 활성화되면 ankyrin과 시그마 수용체가 IP_3 수용체로부터 해리되고, 이때 IP_3가 IP_3 수용체에 결합하면 더 많은 칼슘이 유리될 수 있다(Hayashi 및 Su, 2001). 본 연구에서 확인한 결과, 시그마 수용체 type-1에 선택적인 리간드인 (+)-SKF10047의 전처치에 의해 시그마 수용체 type-1의 활성화되면 $G_{q/11}$에 연결된 수용체인 bradykinin 수용체의 활성화의 결과 생성된 IP_3에 의한 세포 내 칼슘 유리가 항진되는 것으로 확인되었다. 소포체에 존재하는 IP_3 수용체를 통한 칼슘 유리의 항진 이외에도, SK-N-SH neuroblastoma 세포에서 시그마 수용체 리간드인 CB-64D, BD737, haloperidol의 단시간 처치에 의해 세포 내 칼슘이 빠르고, 순간적으로 증가된다고 보고되었고, 장시간 처리시에는 느리지만 오랫동안 유지되는 칼슘 증가가 보고되었다(Vilner 및 Bowen, 2000). 시그마 리간드의 단시간 처리에 의한 세포 내 칼슘의 빠르고 순간적인 증가는 thapsigargin의 처시시 사라지는 것으로 보아 직접적인 소포체로부터의 칼슘 유리이고, 장시간 처치시에 나타나는 지속적인 칼슘 증가는 thapsigargin의 처치시에도 여전히 나타나는 결과로 보아 또 다른 칼슘 저장소인 미토콘드리아(mitochondria)로부터 유리된 칼슘이라고 보고되었다(Vilner 및 Bowen, 2000). 본 연구에서 확인한 결과, 시그마 리간드인 (+)-SKF10047과 ifenprodil의 처치시에 순간적이고 빠른 세포 내 칼슘 농도의 증가를 관찰 할 수 있었다. 이러한 직접적인 칼슘 증가가 시그마 리간드가 직접 세포막을 투과하여

소포체에 존재하는 시그마 수용체에 결합한 후 효과를 나타내는지 아니면 세포막에 존재하는 시그마 수용체에 결합 후 특정 신호 전달 경로를 거쳐 소포체에 존재하는 시그마 수용체를 활성화시키는지에 대한 논란이 있다. 최근 신경스테로이드(neurosteroid)가 시그마 수용체의 세포 내 신호전달 물질이라는 주장이 제기되었다(Monnet 등, 1995; Hong 등, 2004). 신경스테로이드의 일종인 DHEA가 NMDA에 의해 유도되는 norepinephrine(NE)의 유리를 항진시키고, 이러한 효과는 신경스테로이드 억제제인 progestrone에 의해 억제된다고 보고되었다(Monnet 등, 1995). 또한 SH-SY5Y 세포에서 시그마 수용체 type-1 리간드인 (+)-pentazocine에 의한 bradykinin에 의해 유도되는 세포 내 칼슘 저장소인 소포체로부터의 칼슘 유리의 항진이 신경스테로이드 억제제인 progestrone에 의해 억제된다는 보고도 있었다(Hong 등, 2004). 이러한 증거들은 신경스테로이드인 DHEA나 pregnenolone 등이 시그마 수용체의 세포내 신호전달을 위한 물질일 것이라고 생각되어 지지만, 아직까지 실질적인 검증이 남아있다. 시그마 수용체 리간드가 직접 세포막을 투과하여 세포 내 칼슘 저장소인 소포체에 존재하는 수용체에 결합하기 위해서는 가장 큰 장벽인 세포막을 투과하여야 한다(Vilner 등, 2000). 일반적으로 생리적 pH에서는 90% 이상의 시그마 수용체 리간드가 양성자를 얻은 형태(protonated form)로 존재하며, pH가 8.2로 증가하였을 때 deprotonated form으로 전환되어 소수성(hydrophobic)으로 바뀌어 쉽게 소수성인 막을 투과하게 된다. 따라서 시그마 수용체 리간드가 직접 세포막을 투과하여 소포체에 존재하는 시그마 수용체에 결합한다고 주장하는 연구자들은 시그마 리간드 중 deprotonated form으로 전화되는 특정 종류의 리간드 존재하거나 더 지용성인 리간드가 존재할 것이라고 주장한다(Bowen, 2000; Vilner 등, 2000). 이러한 부분에 대한 연구는 앞으로도 추가로 진행되어야 할 것이라 사료된다.

그림 15에 나타난 모식도와 같이, 시그마 수용체가 활성화 되면 세포 내 신호전달 경로중 하나인 G 단백질을 경유하거나 또는 세포 내 신경스테로이드와 같은 신호전달물질을 통해 세포막에 존재하는 전압의존적 칼슘채널과 포타슘 채널을 억제하는 방향으로 작용할 것이라 생각된다. 또한 시그마 수용체 리간드가 직접 세포막을 투과하여 세포 내 칼슘 저장소인 소포체에 존재하는 시그마 수용체를

활성화시켜 소포체로부터의 칼슘 유리를 증가시키거나 세포막에 존재하는 시그마 수용체에 결합한 후 활성화된 시그마 수용체에 연결된 세포 내 신호전달물질을 통해 소포체의 시그마 수용체가 활성화 되어 소포체로부터의 칼슘 유리를 증가시킬 것이라 생각된다.

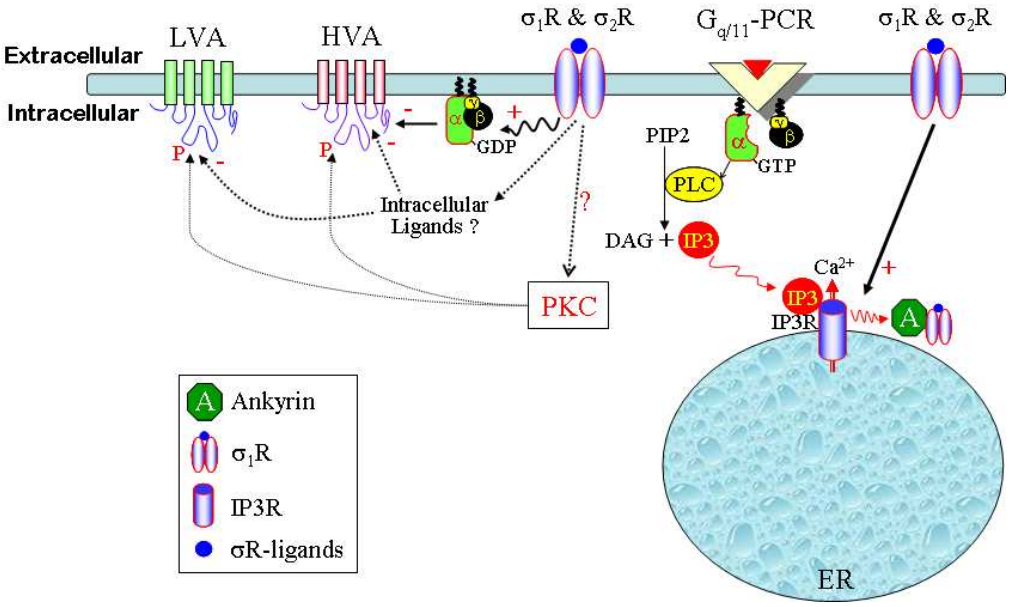

그림 15. 시그마 수용체에 의한 세포 내 칼슘 조절 모식도. Ankyrin: 소포체에 존재하는 구조 단백질, σ1R: 시그마 수용체 type-1, IP_3R: IP_3 수용체, σR-ligands: 시그마 수용체 리간드. (-): 억제(inhibition), (+): 항진(potentiation).

제5장 결론

본 연구에서는 골반신경절 세포에 시그마 수용체가 발현되어 있는지, 발현되었다면 시그마 수용체의 활성이 세포 내 칼슘 농도를 조절하는지 관찰하고, 조절한다면 어떤 아형의 시그마 수용체가 관여하는지를 확인하고, 세포 내 칼슘 조절의 분자적 기전을 규명하고자 하였다. 본 연구 결과, 상경신경절에 비해 상대적으로 적게 발현되어 있지만, 골반신경절 세포에 시그마 수용체 type-1이 발현되어 있는 것으로 확인되었다. 또한 시그마 수용체 type-2의 경우 세포 내 신호전달경로중 하나인 G 단백질을 경유하지 않고, 세포막에 존재하는 전압의존적 칼슘채널과 음성적으로(negatively) 연결되어 있음이 확인되었다. 또한 시그마 수용체 type-1과 type-2 모두 활성화시에 세포 내 칼슘 저장소로부터 일시적으로 빠른 칼슘 유리를 일으키는 것으로 확인되었고, 시그마 수용체 type-1의 경우 $G_{q/11}$에 연결된 brdykinin 수용체의 활성을 통해 생성된 IP_3에 의한 소포체로부터의 칼슘유리를 항진시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 종합해 보면, 시그마 수용체의 활성이 세포 외부로부터의 칼슘 유입은 억제하고, 세포 내 칼슘 저장소로부터의 칼슘 유리는 항진시키는 것으로 보아 세포 내부와 외부로부터의 칼슘의 이동성 조절을 통해 세포 내 칼슘 이온의 농도를 역동적으로 조절한다고 판단되며, 이러한 조절이 골반신경절 세포의 칼슘 이온에 의하여 나타나는 다양한 생리학적 작용들을 조절할 수 있을 것이라 사료된다.

참고 문헌

Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, and Jackson MB. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* 2002, 34:399-410.

Basile AS, Paul I, Mirchevich A, Kuijpers G, and de Costa B. Modulation of (+)-[3H]pentazocine binding to guinea pig cerebellum by divalent ions. *Mol Pharmacol* 1992, 42:882-889.

Beart PM, O'Shea RD, and Manallack DT. Regulation of sigmareceptors: high- and low-affinity agonist states GTP shifts and up-regulation by rimcazole and 13-Di(2-tolyl) guanidine. *J Neurochem* 1989, 53:779-788.

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 alpha-1D, Ca_v 1.3 voltage-dependent calcium currents. *J Neurophysiol.* 2001, 85(2):816-827.

Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998, 21(1):13-26.

Bouchard P, Maurice T, St-Pierre S, Privat A, and Quirion R. Neuropeptide Y and the calcitonin gene-related peptide attenuate learningimpairments induced by MK-801 via a sigma receptor-related mechanism. *EurJ Neurosci* 1997, 9:2142-2152.

Booth RG, and Baldessarini RJ. (+)-6,7-Benzomorphan sigma ligands stimulate dopamine synthesis in rat corpus striatum tissue. *Brain Res* 1991, 557:349–52.

Bowen WD. Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials. *Pharm Acta Helv* 2000, 74:211-218.

Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987, 162:156-159.

Church J, and Fletcher EJ. Blockade by sigma site ligands of high voltage-activated Ca^{2+} channels in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurons. *Br J Pharmacol* 1995, 116:2801-2810.

Connick JH, Hanlon G, Roberts J, France L, Fox PK, and Nicholson CD. Multiple sigma binding sites in guinea-pig and rat brain membranes: G-protein interactions. *Br J Pharmacol* 1992, 107:726-731.

Crawford KW, Vilner BJ, and Bowen WD. Sigma-2 receptor activation induces apoptosis in breast, prostate, and neuroblastoma cell lines. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1999, 40:1104.

Dail WG, Evan AP, and Eason HR. The major ganglion in the pelvic plexus of the male rat: a histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1975, 159: 49-62.

DeGroat WC, and Booth AM. Neural control of penile erection. In: *Nervous control of the urogenital system*, edited by Maggi CA, London, Harwood Academic 1993, 467-524.

Dumont M, and Lemaire S. Interaction of 1,3-di(2-[5-3H]tolyl) guanidine with σ-2 binding sites in rat heart membrane preparations. *Eur J Pharmacol* 1991, 209:245-248.

Ela C, Barg J, Vogel Z, Hasin Y, and Eliam Y. Sigma receptor ligands modulate contractility Ca^{2+} influx and beating rate in cultured cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 269:1300-1309.

Guitart X, Codony X, and Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psycopharm* 2004, 174:301-319.

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

Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, and Glossmann H. Purification molecular cloning and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci* 1996, 93:8072-8077.

Hayashi T, and Su T-P. Regulating ankyrin dynamics: roles of sigma-1 receptors. Proc Natl Acad Sci 2001, 98:491-496.

Hayashi T, Maurice T, and Su TP. Ca^{2+} signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca^{2+} concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 293:788-798.

Hellewell SB, and Bowen WD. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC_{12}) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that in guinea pig brain. *Brain Res* 1990, 527:244-253.

Hellewell SB, Bruce A, Feinstein G, Orringer J, Williams W, and Bowen WD. Rat liver and kidney contain high densities of sigma-1 and sigma-2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sect* 1994, 268:9-18.

Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, and Catterall WA. Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1996, 380(6571): 258-262.

Hille B. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 1992, 9(2): 187-195.

Hille B. Voltage-gated Ca^{2+} channels. In: *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates. 3rd. 2001, 95-128.

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

Hong W, Nuwayhid SJ, and Werling LL. Modulation of bradykinin-induced calcium changes in SH-SY5Y cells by neurosteroids and sigma receptor ligands via a shared mechanism. *Synapse* 2004, 54:102-110.

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 βγ 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* 1999, 33:131-51.

Jansen KL, Elliot M, and Leslie RA. Sigma receptors in rat brain and testes show similar reductions in response to chronic haloperidol. *Eur J Pharmacol* 1992, 214:281-283.

Jeong SW, Ikeda SR. G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. *Neuron* 1998, 21(5):1201-1212.

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* 1999, 76(1):68-74.

Jeong SW, and Wurster RD. Muscarinic receptor activation modulates calcium channels in rat intracardiac neurons via a PTX- and voltage-sensitive pathway. *J Neurophysiol* 1997, 78:1476-1490.

John CS, Bowen WD, Varma VM, McAfee JG, and Moody TW. Sigma receptors are expressed in human non-small cell lung carcinoma. *Life Sci* 1995, 56:2385–2392.

Keast JR. Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res* 1991, 266:405-415.

Keast JR, and de Groat WC. Immunohistochemical characterization of pelvic neurons which project to the bladder, colon, or penis in rats. *J Comp Neurol* 1989, 288:387-400.

Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol* 1999, 193:1-69.

Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Leibach FH, and Ganapathy V. Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 229:553-558.

Klette KL, DeCoster MA, Moreton JE, and Tortella FC. Role of calcium in sigma-mediated neuroprotection in rat primary cortical neurons. *Brain Res* 1995, 704:31-41.

Langworthy OR. Innervation of the pelvic organs of the rat. *Investig Urol* 1965, 2:491-511.

Lee JH, Kim EG, Park BG, Kim KH, Cha SK, Kong ID, Lee JW, and Jeong SW. Identification of T-type α1H Ca^{2+} channels ($Ca_v3.2$) in major pelvic ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2002, 87:2844-2850.

Mach RH, Smith CR, Al-Nabulsi I, Whirrett BR, Childers SR, and Wheeler KT. Sigma-2 receptors as potential biomarkers of proliferation in breast cancer. *Cancer Res* 1997, 57:156–161.

Maurice T, and Lockhart BP. Neuroprotective and anti-amnesic potentials of sigma receptor ligands. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1997, 21:69-102.

Maurice T, Roman FJ, and Privat A. Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF 10,047 binding to sigma1 receptors in the mouse forebrain. *J Neurosci Res* 1996, 46:734-743.

Matsuno K, Senda T, Kobayashi T, and Mita S. Involvement of sigma receptor in q -*N*-allylnormetazocine-stimulated hippocampal CA1 cholinergic functions in rats. *Brain Res* 1995, 690:200-206.

McCann DJ, Weissman AD, and Su TP. Sigma-1 and sigma-2 sites in rat brain: comparison of regional ontogenic and subcellular patterns. *Synapse* 1994, 17:182-189.

McCraken KA, Bowen WD, and Matsumoto RR. Novel σ receptor ligands attenuate the locomotor stimulatory effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* 1999, 365:35-38.

McLean S, and Weber E. Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain. *Neuroscience* 1988, 25:259-269.

Mei J, and Pasternak GW. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor. Biochem Pharmacol 2001, 62:349-355.

Monnet FP, Debonnel G, De Montigny C. In vivo electrophysiological evidence for a selective modulation of *N*-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation in rat CA3 dorsal hippocampus by sigma by sigma ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 1992, 261:123-30.

Monnet FP, Debonnel G, Bergeron R, Gronier B, and de Montigny C. The effects of sigma ligands and of neuropeptide Y on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation of CA3 dorsal hippocampus neurones are differentially affected by pertussis toxin. *Br J Pharmacol* 1994, 112:709-715.

Monnet FP, Mahe V, Robel P, and Baulieu EE. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate [^{3}H]-norepinephrine release evoked by *N*-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 1995, 92, 3774–778.

Monnet FP, de Costa BR, and Bowen WD. Differentiation of sigma ligand-activated receptor subtypes that modulate NMDA-evoked [^{3}H]-noradrenaline release in rat hippocampal slices. Br J Pharmacol 1996, 119:65-72.

Moody TW, Leyton J, and John C. Sigma ligands inhibit the growth of small cell lung cancer cells. Life Sci 2000, 66:1979-1986.

Morin-Surun MP, Collin T, Denavit-Saubié M, Baulieu E-E, and Monnet FP. Intracellular σ1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc Natl Acad Sci* 1999, 96:8196-8199.

Novakova M, Ela C, Bowen WD, Hasin Y, and Eilam Y. Highly selective sigma receptor ligands elevate inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 1998, 353:315-327.

Pan YX, Mei JF, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, and Pasternak GW. Cloning and characterization of a σ1 receptor. *J Neurochem* 1998, 70:2279-2285.

Park KS, Jeong SW, Cha SK, Lee BS, Kong ID, Ikeda SR, and Lee JW. Modulation of N-type Ca^{2+} currents by A_1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 299(2):501-508.

Patrick SL, Walker JM, Perkel JM, Lockwood M, Patrick RL. Increases in rat striatal extracellular dopamine and vacuous chewing produced by two sigma ligands. *Eur J Pharmacol* 1993, 231, 243-249.

Prasad PD, Li HW, Fei YJ, Ganapathy ME, Fujita T, Plumley LH, Yang-Feng TL, Leibach FH, and Ganapathy V. Exon-intron structure analysis of promoter region and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J Neurochem* 1998, 70:443-451.

Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su T-P, Tam SW, and Taylor DP. A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 1992, 13:85-86.

Ryan-Moro J, Chien CC, Standifer KM, and Pasternak GW. Sigma binding in a human neuroblastoma cell line. *Neurochem Res* 1996, 21:1309-1314.

Seth P, Fei YJ, Huang W, Leibach FH, and Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *J Neurochem* 1998, 70:922-931.

Soriani O, Foll FL, Roman F, Monnet FP, Vaudry H, and Cazin L. A-current down-modulated by sigma receptor in frog pituitary melanotrope cells through a G protein-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 289:321-328.

Tokuyama S, Hirata K, Ide A, and Ueda H. Sigma ligands stimulate GTPase activity in mouse prefrontal membranes-evidence for the existence of metabotropic sigma receptor. *Neurosci Lett* 1997, 233:141-144.

Tokuyama S, Hirata K, Yoshida A, Maruo J, Matsuno K, Mita S, and Ueda H. Selective coupling of mouse brain metabotropic sigma (σ) receptor with recombinant G_{i1}. *Neurosci Lett* 1999, 268:85-88.

Vilner BJ, and Bowen WD. Sigma receptor-active neuroleptics are cytotoxic to C6 glioma cells in culture. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sect* 1993, 244:199-201.

Vilner BJ, and Bowen WD. Sigma-2 receptor agonists induce apoptosis in rat cerebellar granule cells and human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Society for Neuroscience Abstracts* 1997, 905.6.

Vilner BJ, and Bowen WD. Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors. Release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 292:900-911.

Vilner BJ, John CS, and Bowen WD. Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. Cancer Res 1995, 55:408-413.

Vilner BJ, de Costa BR, and Bowen WD. Cytotoxic effects of sigma ligands: sigma receptor-mediated alterations in cellular morphology and viability. *J Neurosci* 1995, 15:117-134.

Vilner BJ, Williams W, Coop A, and Bowen WD. Iboga alkaloids and other sigma ligands modulate calcium and induce cytotoxicity by acting on intracellular sigma-2 receptors. Proceedings of the 61st Annual Scientific Meeting, National Institute on Drug Abuse Research Monograph. US Government Printing Office, Washington, DC, 2000.

Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, De Costa B, and Rice KC. Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol Rev* 1990, 42:355-402.

Walker JM, Martin WJ, Hohmann AG, Hemstreet MK, Roth JS, Leitner ML, Weiser SD, Patrick SL, Patrick RL, and Matsumoto RR. *Role of sigma receptors in brain mechanisms of movement*. In: Itzhak Y (ed) Sigma receptors. Academic Press, San Diego, 1994, 205-224.

Wilke RA, Mehta RP, Lupardus PJ, Chen Y, Ruoho AE, and Jackson MB. Sigma receptor photolabeling and sigma receptor-mediated modulation of potassium channels in tumor cells. *J Biol Chem* 1999, 274:18387-18392.

Won YJ, Whang K, Kong ID, Park KS, Lee JW, and Jeong SW. Expression profiles of high voltage-activated calcium channels in sympathetic and parasympathetic pelvic ganglion neurons innervating the urogenital system. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 317(3):1064-1071.

Ytzhak Y. Multiple affinity binding states of the sigma receptor: effect of GTP-binding protein-modifying agents. *Mol Pharmacol* 1989, 36:512-517.

Zhang H, and Cuevas J. Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. J Neurophysiol 2002, 87:2867-2879.

Zhang H, and Cuevas J. Sigma receptor activation blocks potassium channels and depresses neuroexcitability in rat intracardiac neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 313(3):1387-1396.

Zhu JH, and Yakel JR. Modulation of Ca^{2+} currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 1997, 78(2):780-789.

Zoubek J, Somogyi GT, and De Groat WC. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra, and vas deferens. *Am J Physiol* 1993, 265(3):537-543.

ABSTRACT

Functional Roles of Sigma Receptors in Regulation of Intracellular Calcium within Neuronal Cells

Lee, Jong Woo

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Whang Kum)

Sigma receptors are high affinity binding sites for a wide variety of ligands including neurosteroids, antipsychotics, and psychomimetic drugs, and are widely distributed in the nervous, endocrine, and immune systems. Two subclasses of the sigma receptor called sigma-1 and sigma-2 have been pharmacologically identified. In the central nervous system, sigma receptors have been implicated in a number of physiological functions such as regulation of neurotransmitter release, learning and memory processes, and regulation of movement and posture. In addition, sigma receptors have been also implicated in central disorders including mood disorders, amnesic and cognitive deficits, effects produced by drugs of abuse, tardive dyskinesia, and analgesia. To date, however, the functional roles of sigma receptors are unclear in the peripheral nervous system.

The purpose of the present study was to investigate whether the sigma receptors are involved in intracellular Ca^{2+} regulation in the autonomic major pelvic ganglion(MPG) neurons innervating various urogenital organs including the urinary bladder, the prostate, and the penis. In this regard, Ca^{2+} currents were measured using 10 mM Ca^{2+} as a charge carrier under whole

cell-ruptured configuration of the patch-clamp technique. Intracellular Ca^{2+} level($[Ca^{2+}]_i$) was also monitored with ratiometric fluorescence measurement in MPG neurons loaded with fura-2/AM(5 mM) at 37℃ for 30 min. Basically, RT-PCR analysis revealed that the MPG neurons contain transcripts encoding type-1 sigma receptor. Bath application of haloperidol, a non-selective sigma ligand, dose-dependently inhibited high voltage-activated(HVA) Ca^{2+}currents in the sympathetic and parasympathetic MPG neurons. Haloperidol inhibited all HVA Ca^{2+} channel isoforms(L-, N-, & R-types) expressed in the MPG neurons. (+)-SKF-10047, a type-1 sigma receptor ligand, exerted small effects on HVA Ca^{2+} currents. The potency order of different sigma ligands was as follows: haloperidol(19±2 μM) > ifenprodil(58±4 μM) > (+)-SKF-10047(427±44 μM) > DTG(457±12 μM). The haloperidol and (+)-SKF10047-induced HVA-Ca^{2+} current inhibition was prevented by dialysis of Gpp(NH)p. Application of sigma ligands such as (+)-SKF-10047 and ifenprodil transiently increased $[Ca^{2+}]_i$ in the MPG neurons. Furthermore, application of (+)-SKF-10047 potentiated bradykinin-induced Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum(ER) in the MPG neurons. Taken together, these data suggest that sigma receptors(predominantly, type-2) are negatively coupled to Ca^{2+} channels via G-protein-independent pathways and positively coupled to the Ca^{2+} release from ER in MPG neurons.

Key words : sigma receptor, major pelvic ganglion, sigma ligand, Ca^{2+} release high voltage-activated Ca^{2+} channels, endoplasmic reticulum