

PC12 세포에서 신경전달물질 방출을 저해하는 물질 S9940 물질의 탐색

이운식 · 박기인*

공업기술원 생명공학공업기술연구소 세포기능연구, *전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Screening of S9940 as an Inhibitor of Neurotransmitter Release from PC12 Cells

Yun-Sik Lee and Kie-In Park*

Cell Biology Laboratory, National Institute of Bioscience and Human-Technology,
Agency of Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

*Division of Biological Science, College of Natural Science, Chonbuk
National University, Chonju 560-756, Korea

(Received July 2, 1998)

(Accepted September 1, 1998)

ABSTRACT : We established an *in vitro* experimental system using the following procedure. We first introduced tritium-labelled norepinephrine ($[^3\text{H}]\text{-NE}$) into PC12 cells. The $[^3\text{H}]\text{-NE}$ incorporated into PC12 cells were then stimulated by a high concentration (60 mM) of K^+ during 12 minutes. Then, we counted the amount of $[^3\text{H}]\text{-NE}$ release from PC12 cells with the scintillation counter. After screening fungal, *Streptomyces* or bacterial product using this experimental system, we obtained S9940 from *Streptomyces* spp. which inhibited $[^3\text{H}]\text{-NE}$ release from PC12 cells. S9940 also inhibits the release of ATP as a neurotransmitter of PC12 cells and rat cortical neurons. The inhibitory effect was seen even when the PC12 cells were treated with low K^+ buffer containing tonomyctin ($1 \mu\text{M}$) as an ionopore. This result suggests that the inhibitory action of S9940 on neurotransmitter release appeared after the influx of Ca^{2+} .

Key Words : PC12 cell, Neurotransmitter release, Exocytosis, *Streptomyces* spp., Inhibitor

I. 서 론

PC12 세포는 rat 부신수질 갈색세포종양에서 유래된 세포로서, 신경세포의 기능을 해석하기 위해서 많이 사용되고 있다. Neuro growth factor 등의 성장인자에 의한 처리로 카테콜아민류 합성효소가 유도되어 기능적으로 교감신경세포처럼 분화하는 것, 마찬가지로 튜브린이나 미소관 결합 단백질등이 유도되어 형태적으로도 긴 신경돌기와 유사한 돌기를 신장시키는 것 등이, 좋은 예이다. PC12 세포는 시냅신 등의 신경계 특이적인 분비관련 단백질을 발현하고 있어, 신경전달물질 방출의 제어기구의 해석에도 적합한 모델로 사용되어지고 있다. 이 세포의 세포막에는 전위의존성 Ca^{2+} 채널이 있어, 탈분극 자극에 따른 Ca^{2+} 의 세포내 유입에 의해 여러 세포내 인자가 활성화되어 최종적으로

시냅스같이 소포체가 세포질막과 융합하는 것에 의해 신경전달물질이 세포외로 방출(exocytosis)된다. 하지만 PC12 세포와 신경세포의 신경전달물질 방출기구는 몇 가지 차이가 있다. 신경세포로부터의 방출이 millisecond 단위의 매우 짧은 반면, PC12 세포의 경우는 분 단위의 order로서 훨씬 느린 반응이다(Cutler and Cramer 1990). 또한 exocytosis에 필요한 세포 내 Ca^{2+} 의 농도에서도, 신경세포에서는 $20 \mu\text{M}$ 인 것에 반해 PC12 세포는 $1 \mu\text{M}$ 로 고감수성이다. 이 사실들은 PC12 세포가 본래는 내분비계의 세포로서, 신경세포와는 다른 성질을 갖고 있다는 것을 시사한다. 그러나 PC12 세포는 각종의 신경계 특이적인 분비장치를 갖추고 있어 탈분극 자극에 따라 신경전달물질을 방출하는 성질을 가지고 있는 것, 신경전달물질의 재흡수 기구를 이용하여 배지에 첨가한 방사표식 신경전달물질을 incorporation 시킬수 있는 것과 cell line으로서 균질의 세포집단으로 실험이 가능한 유리한 점 등이 있어

*To whom correspondence should be addressed.

신경전달물질의 방출제어기구의 해석에 널리 이용되어지고 있다. 신경전달물질이 방출될 때의 일련 과정 중에서 현재 활발히 연구되어지고 있는 부분은 Ca^{2+} 의 유입 이후의 세포내 처리과정이다. 이미 Ca^{2+} 센서로서 작용하고 있는 것으로 밝혀진 synaptotagmin(Brose *et al.*, 1992), 저분자량 GTP 결합 단백질 rab3A(Kishida *et al.*, 1993)와 이의 조절인자 Rim(Wang *et al.*, 1997), 신경계 특이적인 v-SNARE, t-SNARE 등 다수의 인자가 발견되어 있지만, 이들의 구체적인 작용에 대해서는 밝혀지지 않은 부분이 많다.

현재 신경전달물질 방출 과정에 kinase, phosphatase (Huter 1995)와 특이적 단백질로서 복합체를 형성하는 syntaxin, synaptogmin, neurexin(α -latrotoxin receptor), Ca^{2+} Channel(O'Conner *et al.*, 1993; Petrenko *et al.*, 1990), vacuolar-type, H^+ -ATPase(Moriyama and Futai 1990), G단백질 중의 rab family(Kikucui *et al.*, 1988)와 fusion pore 단백질 등의 관여가 알려져 있다.

한편 고등동물 등과 같이 유전학적 수법이 곤란한 재료를 사용하는 경우, 선택적인 저해제나 신경계 특이적인 독소의 이용은 대단히 중요한 접근 방법이다. 이제까지 수많은 channel blocker, receptor agonist, antagonist가 발견되어, 이들을 이용한 전기생리학적인 해석으로부터 시냅스 전달기구에 관한 기초적인 지식이 얻어졌다(Takahashi *et al.*, 1982). 그러나 보다 상세한 신경전달물질 방출의 분자기구의 해석에 관해서는 유효한 저분자 저해제가 발견되지 않고 있으며, 또한 그런 저해 물질을 적극적으로 천연물질로부터 탐색하는 시도도 없는 것이 사실이다.

본 연구의 목적은 신경전달물질의 방출, 특히 Ca^{2+} 의 세포내 유입 이후의 복잡하고 잘 알려지지 않은 과정을 특이적으로 저해하는 저분자 생리활성물질을 탐색하여, 이의 작용메카니즘을 통하여 신경전달물질의 방출기구를 밝히고자 방사선균으로부터 분자량 390으로 추정되는 신규활성물질 S9940을 탐색하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배지

Dulbecco's 수정 Eagle 배지(D-MEM)는 Gibco사로부터 구입한 분말 D-MEM(high glucose)를 증류수에 녹여 3.7 g의 탄산수소나트륨 및 항생제로 50 U/ml 페니실린(Meiji Co.)과 100 μ g/ml 스트렙토마이신(Meiji Co.)을 넣어 1 N HCl로 pH 7.3에 조정후, 0.22 μ m pore 멸균필터를 이용하여 멸균했다. 혈청은 소 태아혈

청(Fetal Calf Serum; Japan Bio-Test) 및 말 혈청(Horse Serum; Gibco)을 사용, 세포계대배양용 배지로서는 5% FCS와 5% HS를 가하여 사용했다. 신경세포 초대배양용 배지로서는 D-MEM 5 μ g/ml 인슐린(Sigma), 5 μ g/ml 트랜스페린(Sigma), 1 mM 피루빈산 나트륨(Sigma), 5% HS를 첨가하여 실험에 사용했다.

2. 완충액

Phosphate-Buffered Saline(PBS)은 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g을 1 l의 증류수에 녹여 121°C에서 20분간 멸균 하였다. 고농도 또는 저농도 K^+ 완충액은 15 mM의 Hepes(Dojindo)와 1.2 mM KH_2PO_4 를 증류수에 녹인 후, 고농도의 K^+ 완충액은 85 mM NaCl과 60 mM KCl을 첨가했으며 저농도의 K^+ 완충액은 140 mM NaCl과 4.7 mM KCl을 각각 첨가해 각각 넣어 2 M의 Tris로 pH 7.3으로 조정하여 121°C에서 20분간 멸균했다. 여기에 멸균한 2.5 mM $CaCl_2$ 및 0.22 μ m pore의 멸균필터로 멸균한 11 M glucose를 실험에 사용했다.

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

3. 세포배양

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

4. 대뇌피질신경세포의 초대배양

임신 18일의 rat을 단두하여, 전신을 70% ethanol로 세정 후 복부로부터 배를 자궁과 함께 추출했다. 배를 자궁으로부터 분리하여, 두피 두개를 해부하여 선단이 완곡한 핀셋으로 뇌를 집어내어, 얼음위에서 4°C를 유지한 완충액속에 넣어 해부현미경하에서 메스로 좌우의 대뇌반구를 잘라냈다. 핀셋으로 수막을 떼어 피질부분을 예리한 핀셋으로 잘라내어 메스로 잘게 잘라서 10 mg/ml의 파파인(Worthington)을 함유한 파파인 희석액 5ml에 현탁하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 또한 피펫으로 세포를 분산시켜, 40 μ g/ml DNase I(Sigma)를 첨가 후 10분간 더 반응시켰다. 5% HS를 포함한 D-MEM을 첨가하여 다시 한번 피펫한 후 멸균

해둔 lens paper로 여과하여 세포를 분산시킨 후 1000 rpm에서 5분간 원심을 2회 반복하여 세포를 세정하였다. 세포수를 센 후, 초대배양용 배지에 현탁하여 24 well plate(Nunc Co.)에 접종하여 배양했다. PC12 세포 배양 PC12의 subtype PC12-B3, PC12-h, PC 12-22a 세포(rat 부신수질 갈색세포종 유래)는 콜라겐 coated 플레이트에, D-MEM에 5% FCS, 5% HS를 첨가한 배지로 유지했다. 계대배양은 배지를 suction 후 PBS를 5 ml 넣어 2분 후 피펫팅하여 세포를 dish벽으로부터 분리하여 1000 rpm에서 5분간 원심하여 세포를 모은 후 PBS를 suction 후, 새로운 배지를 넣어 피펫팅함으로써 세포 pellet을 분산하여 새로운 dish에 접종했다. Neuro 2A(mouse 신경아세포종), C6(rat gria 세포종)은 D-MEM에 5% FCS를 첨가한 배지에 유지했다. 계대배양은 3일에 한 번씩 PBS로 세포를 세정한 후, 5분간 원심하여 세포를 모아 PBS를 suction 후 새로운 배지를 넣어 피펫팅에 의해 세포를 분리하여 일정량을 새로운 dish에 접종하여 배양했다.

5. Assay buffer

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

6. 세포배양 플레이트의 코팅

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

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

7. 실험계의 설립

PC12 세포의 플레이트에서 배지를 suction 후 노르에피네프린 assay buffer([³H]-NE 1.5 μ Ci/ml)를 5 ml 첨가 후 탄산가스 인큐베이터 내에서 90분간 incorporation

시켰다. 완충액을 제거 후 PBS를 넣어 피펫팅에 의해 세포를 플레이트 벽으로부터 분리하여, 1000 rpm에서 5분간 원심하여 세포를 모은 후 또 한 번 PBS에서 세포를 세정하여, 세포수를 헤마사이토메타로 측정 한 후 5% HS와 5% FCS를 첨가한 새로운 배지에 분산하여, PEI로 코팅한 96well 타이타 플레이트에 3×10⁵ cell/cm²의 농도로 접종했다. 25분간 배양하여 세포를 플레이트벽에 접촉시킨 후, 배지를 제거 후 고농도의 K⁺ 완충액(각종 약재 또는 5%(v/v)의 스크리닝 샘플을 포함)과 컨트롤로서 저농도 K⁺ 완충액을 100 μ l/well 넣었다. 12분간 탄산가스인큐베이터내에서 배양한 후 상등액을 회수하여 0.7~0.9 cm²로 자른 두께 3 mm의 크로마토그래피 종이에 흡수시켜서, 건조후 액체 scintillation 카운타로 방사능을 측정함으로써 [³H]-NE의 방출을 저해하는 물질을 검색하였다.

8. ATP assay

PEI 코팅한 24 well-plate에 세포를 5×10⁵ cell/well의 농도로 37°C, 10% CO₂의 인큐베이터안에 5시간 배양했다. 그 후 저농도 K⁺ 완충액으로 1회 세정하였다. 샘플은 고농도 K⁺ 완충액에 5%(v/v) 농도로 희석하여 12분간 처리 후, 상청을 회수하여 바로 측정하거나 또는 동결보존하였다가 해동 후 즉시 측정하였다. 측정시는 kit 내의 25 mM Hepes완충액(pH 7.75)에 20배 희석하여, 이 샘플 200 μ l에 발광시약액 100 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후, cell을 루미노메타로 발광량을 측정했다.

9. Antibiotics의 작용

각종의 약제에 대한 검토는 저농도의 K⁺ 완충액중에 15분간 처리한 후, 같은 농도의 약제를 포함하는 고농도의 K⁺ 완충액에 12분간 자극하여 상등액을 회수했다. 그 후 세포가 플레이트에 접촉되어 있는가를 현미경 관찰하여 확인했다. 모든 약제는 동물세포에 대하여 통상 사용하는 농도인 10배의 고농도로부터 순차적으로 희석하여, 넓은 농도폭에서 검토했다.

10. 미생물 대사산물의 탐색

곰팡이, 박테리아, 방선균 등의 균주는 제약회사로부터 분주받아 실험에 사용했다. 미생물균체를 80% 아세톤으로 추출한 샘플은 본 실험계에서는 고농도의 K⁺ 완충액에 5%(v/v)의 농도를 고농도로하여 3배씩 순차적으로 희석하여 탐색계에 사용했다.

11. 기기분석

HPLC 분석은 waters pump와 UV-detector SSC-5200 (Senshu Scientifics Co.), column은 Senshu PAK column ODS-H-4251(φ 10×250 mm)와 CAPCELL PAK column C18(φ 2.5×250 mm, shiseido)을 사용했다. ¹H-NMR은 Jeol JNM GX-400 FT NMR spectrometer로 측정주파수 400 MHz, 내부기준물질로는 TMS(tetra-methylsilane)을 사용하여 측정했다.

III. 결 과

1. PC12 세포의 노르에피네프린 방출

PC12 세포에 [³H]-NE를 incorporation시킨 후, 저농도 K⁺ 버퍼로 세정 후 고농도 K⁺ 버퍼의 처리에 의한 탈분극 자극을 주어 상등액 중에 방출되는 [³H]-NE를 측정했다. PC12 세포에는 다수의 아주가 알려져 있다. 그래서 본 실험에서는 PC12의 아주인 PC12-h, PC12-22a와 PC12-B3 세포로부터 방출되는 [³H]-NE의 양을 비교했다. 그 결과 PC12-B3에서 [³H]-NE의 방출량이 제일 많았으며(Fig. 1) 또한 ATP의 방출에서도 PC12-B3에서 방출량이 제일 많은 것으로 나타나(Fig. 4) 이후 실험에서는 모두 PC12-B3을 실험에 사용했다. [³H]-NE의 방출은 고농도 K⁺ 버퍼의 자극에 의한 탈분극 후 30분에 거의 최고치에 도달했다(Fig. 2). 1%의

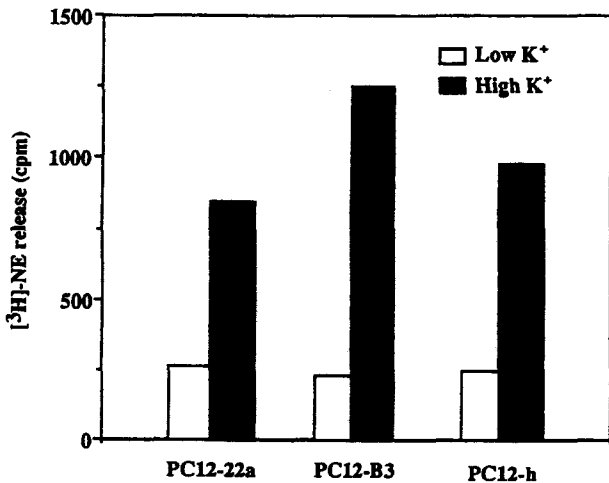


Fig. 1. Comparison of [³H]-NE release in PC12 cells treated with potassium. PC12-22a, PC12-B3 and PC12-h cells were pretreated with [³H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with low concentration (4.7 mM, open bar) or high concentration (60 mM, closed bar) of potassium. [³H]-NE was quantified in Materials and Method.

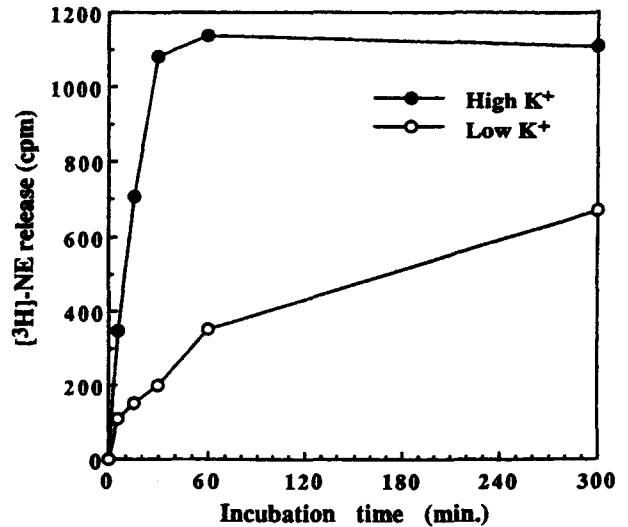


Fig. 2. Time course of release of [³H]-NE in PC12-B3 cells. Release levels were estimated in PC12-B3 cells pretreated with [³H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with low (open circle) potassium buffer for the time intervals indicated. After 30 minutes incubation, the release of [³H]-NE was reached plateau by stimulation with high concentration of potassium (closed circle).

Triton -100으로 세포를 용해하여, incorporation된 전량을 측정된 결과 고농도 K⁺ 자극에 의한 방출량은 전량의 약 20% 정도였다.

[³H]-NE 방출은 탈분극자극 후 버퍼 중에 포함된 세포외로부터의 Ca²⁺ 유입에 의존하였다(Fig. 3). 고농도

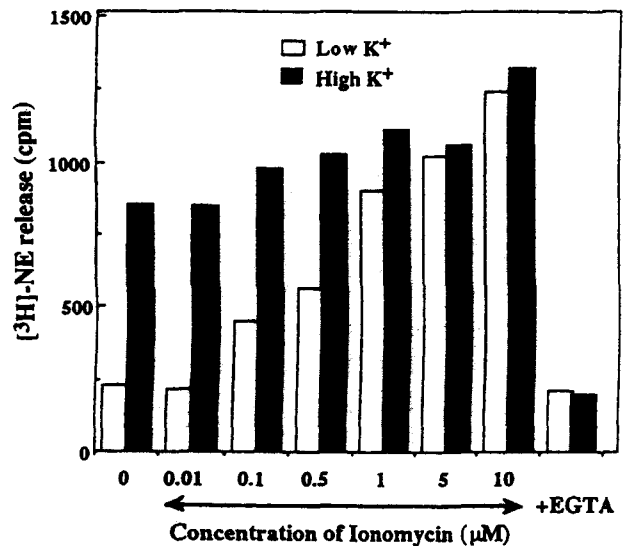


Fig. 3. Effect of calcium ion on the release of [³H]-NE from PC12-B3 cells. Release levels were estimated in PC12-B3 cells pretreated with [³H]-NE for 2 hours. Cells were washed and resuspended in culture medium. After incubation for 15 minutes, cells were then washed and treated with low (open bar) and high concentration (closed bar) of potassium in the presence of various concentration of ionomycin (0~10 μM) or EGTA (5 μM).

K⁺ 완충액처리시 Ca²⁺의 chealator인 EGTA를 첨가했을 때는 [³H]-NE 방출은 억제되었다. 이 경우 [³H]-NE의 낮은 level의 수치를 보이는 것은 완전히 incorporation이 되지 않은 [³H]-NE가 세척되지 않은 상태로 세포외에 잔류한 것이라고 생각되어진다. [³H]-NE의 방출은 탈분극 자극을 주지 않아도 Ca²⁺ ionopore인 ionomycin의 첨가에 의한 전위의존성의 Ca²⁺ 채널이 활성화되어 Ca²⁺의 세포 내 유입 후 exocytosis되는 신경전달물질방출의 일련의 과정을 재현하고 있음을 시사했다.

2. ATP 방출

PC12 세포는 시냅스와 유사한 소포중에 고농도의 ATP를 신경전달물질로서 축적하고 있어 [³H]-NE와 같이 탈분극자극에 의해 세포외에 방출한다. 그래서 ATP의 방출에 관해서도 실험하였다. ATP 정량에 사용된 루시페라제의 반응계는 세포의 자극에 쓰인 고농도 K⁺ 완충액 중에 포함된 K⁺, Ca²⁺에 의해 저해되는 것이 알려져 있다. 표준 ATP 샘플을 고농도 K⁺ 완충액에 희석하였을 때, 루시페라제의 반응이 현저히 저해되었다. 그래서 이들 이온의 영향을 제거하기 위하여 측정 전에 샘플을 20배로 희석하여 사용하였으며, 그 결과 이들에 의한 효소저해영향을 배제할 수가 있었다(Data 생략). 세포를 자극하여 회수한 상등액 샘플에서 ATP의 방출량을 측정하였다. 사용된 세포는 모두 5×10⁵ cells/well의 농도로 counting하여 실험에 사용하였다. PC12 세포의 subtype간 고농도 K⁺ 자극에 의해

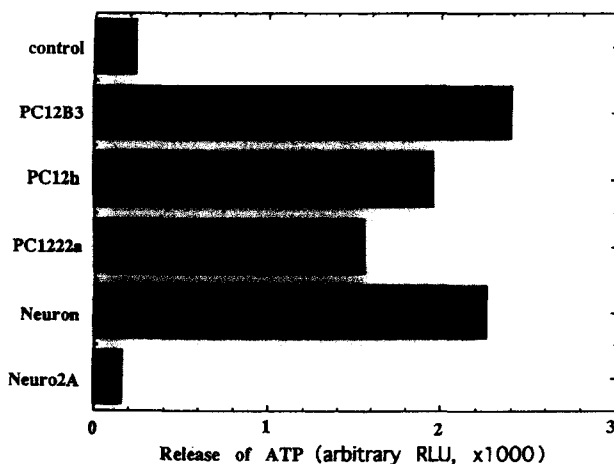


Fig. 4. Effect of the potassium ion on the release of ATP. The effect of the potassium ion on the release of ATP in various subtypes of PC12 cell lines, rat cortical neuron and Neuro 2A. Release of ATP was estimated by luciferase reaction assay as described in Materials and Methods. Control was treated with a low concentration K⁺ buffer. RUL-represent a relative light unit of luciferase.

exocytosis되는 신경전달물질로서 ATP의 방출량을 비교한 결과, [³H]-NE의 방출과 유사하게 PC12-B3에서 다량의 ATP 방출을 보였다(Fig. 4). 한편 동일수의 rat의 대뇌피질신경세포에서도 신경전달물질로서 ATP를 고농도의 K⁺ 자극에 의해 방출했다. 그 방출량에 있어서는 PC12세포 중에서도 가장 많은 방출량을 보인 PC12-B3과 유사한 양이 방출되었다. 그러나 마우스의 신경아세포종양 유래의 Neuro 2A에서는 실험결과 ATP의 방출은 보이지 않았다(Fig. 4).

3. Antibiotics의 작용

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

미소관 중합저해제인 nocodazole, vinblastine, phosphatase 저해제인 okadaic acid, calyculin A, kinase 저해제인 staurosporine, wortmanin, 단백질 합성저해제인 cycloheximide, 단백질의 세포 내 수송저해제인 brefeldin A, concanamycin A, 호흡저해제인 antimycin A, oligomycin 등을 처리한 결과 현저한 저해활성은 보이지 않았다(Fig. 5). 그러나 protein kinase C의 활성화 물질인 포볼에스테르(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)는 [³H]-NE의 방출을 약간 촉진했다. 또한 Ca²⁺ 채널의 antagonist인 nifedipine과 RNA 합성 저해제인 actinomycin D를 처리한 경우는 저해작용이 보였다. 한편 1가 양이온 ionopore인 moensin은 강한 저해작용을 보인 것처럼 보이나 이것은 저농도 K⁺ 완충액에서 이미 incorporation된 [³H]-NE의 대부분이 유리되어졌기 때문이다.

4. 미생물 대사산물의 탐색

곰팡이 3600주, 방사선균 2200주, 박테리아 500주의 배양 추출액에 대하여 1차 검색을 행하여, [³H]-NE 방

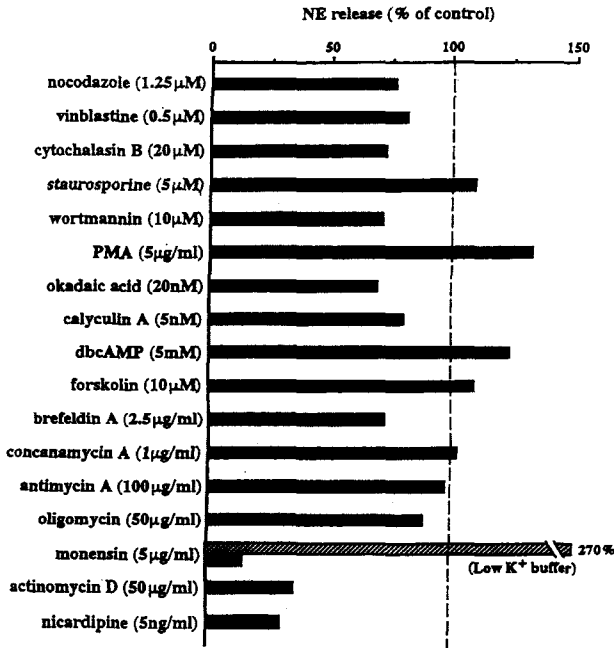


Fig. 5. Effects of antibiotics on the release of [³H]-NE from PC12-B3 cells. After 15 minutes incubation with each antibiotic, the 96-wells cell plate was sampled for counting and inspected with a microscope at 100 magnification.

출을 저해하는 후보의 샘플을 선택했다. 이들 물질 중에는 Ca²⁺ 채널에 작용하여, 세포 내 Ca²⁺의 유입을 막음으로서 [³H]-NE 방출을 저해하는 물질도 포함되어 있다고 생각되었다. 그래서 2차 검색계로서 ionomycin 존재하에서의 활성을 조사함으로써, Ca²⁺의 세포 내 유입 이후의 과정을 저해하는 물질의 선택을 행했다. 이 결과, ionomycin 존재하에서도 [³H]-NE 방출을 현저히 저해했고 또한, 신경전달물질의 일종인 ATP의 방출도 저해하는 S9940을 방사선균으로부터 screening하였다 (Table 1).

정제는 콜벤에 배양한 13 l의 배양액을 세라이트에 여과하여, 활성물질의 균체로부터 80% 아세톤으로 추출했다. 아세톤을 제거하여 활성물질을 포함하는 0.9 g의 물질을 얻었다. 이것을 헥산-메탄올 용매계의

Table 1. Effects of S9940 on Exocytosis of [³H]-NE and ATP

Samples	³ H]-NE release		ATP release
	+Ionomycin	-Ionomycin (1 μM)	
Control	100	125	100
S9940	3.8	5.2	54

(% of controls)

*Effects of S9940 on exocytosis of [³H]-NE and ATP as a neurotransmitter were assayed as described in materials and methods. 100 and 125 percent of controls mean the amount of release of [³H]-NE and ATP treated with high K⁺ buffer and low K⁺ buffer containing 1 μM ionomycin, respectively. The values are average of triple.

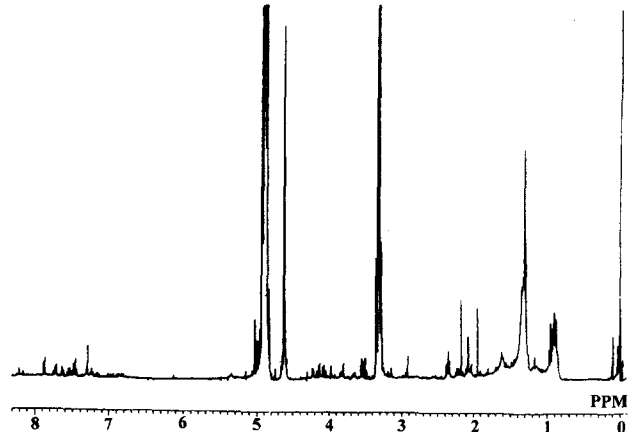


Fig. 6. ¹H-NMR spectrum of S9940 in CD₃OD. The spectrum was analysed to the condition described in Materials and Methods.

silicagel column chromatography를 이용하여 초산에틸의 active fraction을 evaporation한 결과 160 mg을 얻었다. 이 78 mg 전량을 클로로포름-메탄올 용매계의 sephadex LH20 gel column chromatography를 하여 활성 프랙션 40과 41번의 4 mg의 활성물질을 얻었다.

FAB-MS spectrum으로부터 (N+H)⁺ : m/z 391(M+Na)⁺ : m/z 413(M+K)⁺ : m/z 429가 측정되어 분자량 390의 물질로 추정되었다. 중메탄올(CD₃CD) 중에서 측정된 ¹H-NMR spectrum에는 많은 수소의 피크가 보여져, 이 분자량에 대한 재검토의 필요성을 시사하고 있다(Fig. 6).

III. 고 찰

PC12 세포를 [³H]-NE를 포함하는 노르에피네프린 assay버퍼에서 90분 동안 incubation한 후, 고농도의 K⁺에 의한 탈분극자극을 주어 상등액중에 방출되는 [³H]-NE의 양을 측정했다. [³H]-NE의 방출은 탈분극 자극 후, 세포외의 Ca²⁺에 의존하고 있는 것과 Ca²⁺ ionopore인 ionomycin에 의해서도 고농도의 K⁺ 자극과 거의 동일하게 일어나고 있는 것으로부터 이 고농도의 K⁺ 자극에 의해 방출되는 [³H]-NE는 exocytosis에 의한 것이라고 판단했다.

본 실험계에 각종의 antibiotics의 작용을 검토한 결과, 미소관중합 저해제, 단백질의 세포내 수송 저해제, 호흡저해제 등에는 현저한 작용이 보이지 않았다. 그러나 protein kinase C의 활성화제로 알려진 PMA는 [³H]-NE의 방출을 약간 촉진했다. 이는 표층의 actin 섬유는 시냅스 소포와 세포질막의 접촉을 막는 barrier로 되어 있는 것이 알려져 있어 PMA에 의한 이 actin 섬유가 탈 중합하여 release-ready 소포의 양이 증가하는

것이 보고되어 있다(Kikuchi *et al.*, 1988). PKC의 target로서는 미오신 light chain, MARCKS 등이 예상되어 있어, 본 실험에서 보인 촉진작용도 PMA의 이런 작용에 의한 것이라고 사료된다.

Actinomycin D의 처리에서 보인 저해작용은 actinomycin D가 RNA 합성저해작용의 외에도 NK2 수용체의 antagonist로서의 작용도 알려져 있지만(Delay-Goyet and Lundberg 1991), 본 실험계가 exocytosis를 재현하고 있으며, 또한 기존의 antibiotics 중에는 actinomycin D 이외에는 이 과정을 특이적으로 저해하는 물질은 없는 것을 기준으로 하여 [³H]-NE 방출을 지표로 한 1차 검색한 결과 S9940을 신경전달물질 방출을 특이적으로 저해하는 후보로서 선택했다. S9940은 ionomycin 존재하에서도 저해 반응을 보여 Ca²⁺ 유입 이후의 세포내 processing을 저해하고 있다고 생각된다. 지금까지 신경전달물질 방출에 관련된 Ca²⁺ sensitive factor로서는 synaptotagmin, rab family, synaptophysin 이 알려져 있다(Shirataki *et al.*, 1993; Shoji-Kasai *et al.*, 1992). Synaptotagmin과 rab family은 PKC의 Ca²⁺ 결합영역인 C2 domain과 homology가 있는 영역을 각각 2개씩 가지고 있어, 이 부분에서 Ca²⁺이 결합한다고 추정된다(Bommert *et al.*, 1993; Shirataki *et al.*, 1993). Synaptotagmin은 Ca²⁺ 채널과 결합하고 있어, 막융합에 관련된 NSF-SNAP-SNARE 복합체의 형성을 저해하는 것으로 막융합과정을 negative하게 제어하고 있다고 생각되어진다(Popov and Poo 1993). 한편 이들 Ca²⁺ sensitive factor 이외에도 신경전달물질의 방출에 필요한 인자로서는 syntaxin, SNAP-25, synaptobrevin 등의 SNAREs가 알려져 있다(Brennwald *et al.*, 1994). 이들이 필수적으로 역할하고 있음은 botulinum toxin, 파상풍신경독이 이들을 특이적으로 분해하고 있는 것으로부터 알 수 있다(Schiavo *et al.*, 1992). 한편 α -latrotoxin 등의 독소가 신경세포에서 신경전달물질이 spontaneous release 뿐만아니라 자극에 따른 exocytosis에 강력한 촉진반응을 나타내는 결과가 보고 되어 신경세포의 분비장치외에 특이적으로 작용하는 독소와의 상관관계에 대한 해명이 주목된다(Liu and Mislser 1998). 이러한 일련의 결과로부터 S9940이 어떠한 작용으로 [³H]-NE의 방출을 억제하고 있는가는 불분명하지만, 세포질막에 있는 분비장치에 관련된 process를 저해하는 저분자 물질로 사료된다.

참고문헌

Aldir, J., Xie, Z.-P., Valtorta, F., Greenfard, P. and

- Poo, M.-M. (1992): Antibodies to synaptophysin enter with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron*, **9**, 759.
- Bommert, K., Charlton, M.P., DeBello, W.M., Chin, G., J. Betz, H. and Augustine, G.J. (1993): Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* **363**, 163.
- Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keranen, S., Bankaitis, V. and Novick, P. (1994): Sec9 is sSNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**, 245.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C. and Jahn, R. (1992): Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**, L 1021.
- Cutler, D.F. and Cramer, L.P. (1990): Sorting during transport to the surface of PC12 cells: Divergence of synaptic vesicle and secretory granule proteins. *J. Cell Biol* **110**, 721.
- Daikoku, S. and Hisano, S. (1991): Neurotransmitter synthesis, storing and secretion. *Seitainokagaku (Jap.)* **42**, 260.
- Delay-Goyet, P. and Lundberg, J.M. (1991): actinomycin is a competitive neurokinin-2 receptor antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1342.
- Huter, T. (1995): Protein kinase and phosphatases The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225.
- Kikuchi, A., Yamashita, T., Kawata, M., Yamamoto, K., Ikeda, K., Tanimoto, T. and Takai Y. (1988): Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 24,000 from bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.* **263**, 2897.
- Kishida, S., Shirataki, H., Sasaki, T., Kato, M., Kaibuchi, K. and Takai, Y. (1993): Rab3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of rabphilin-3A, a putative rat3A target protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 22259.
- Moriyama, Y. and Futai, M. (1990): H⁺-ATPase, a Primary pump for accumulation of neurotransmitter, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem. Biophys. Commun.* **173**, 443.
- Liu, J. and Mislser, S. (1998): α -Latrotoxin alters spontaneous and depolarization-evoked quantal release from rat adrenal chromaffin cells: evidence for multiple modes of *Neurosci* **18**, 6113-6125.
- O'Connor, V.M., Shamotienko, O., Grishin, E. and Betz, H. (1993): On the structure of the 'synptosecretosome'-Evidence for a neuexin/synaptotagmin/syntaxin/Ca²⁺ channel complex.

- FEBS* **326**, 255.
- Petrenko, A.G., Perin, M.S., Davletov, B.A., Ushkaryov, Y.A., Geppert, M. and Sudhof, T.C. (1990): Binding of synaptotagmin to the α -latrotoxin receptor implicates both in synaptic vesicle exocytosis. *Nature* **353**, 65.
- Popov, S.V. and Poo, M. (1993): Synaptotagmin: a calcium-sensitive inhibitor of exocytosis? *Cell* **73**, 1247.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de L., DasGupta, B., R. and Montecucco, C. (1992): Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Yamaguchi, T., Wada, K., Horiuchi, H. and Takai, Y. (1993): Two functionally different domains of rabphilin-3A, rab 3A p25/smg p25A-binding and phospholipid and Ca^{2+} -binding domains. *J. Biol. Chem.* **268**, 27164.
- Shoji-Kasai, Y., Yoshida, A., Sato, K., Hoshino, T., Ogura, A., Kondo, S., Fujimori, Y., Kuwahara, R., Kato, R. and Takahashi, M. (1992): Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells. *Science* **256**, 1820.
- Takahashi, M., Yasumoto, T. and Ohizumi, Y. (1982): Maitotoxin, a Ca^{2+} channel activator candidate. *J. Biol. Chem.* **257**, 7287.
- Vitale, M.L., Seward, E.P. and Trifaro, J.-M. (1995): Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. and Sudhof, T.C. (1997): RIM is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* **388**, 593.