J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 14, No. 3, pp.349-356, 1998

PC12 세포 신경전달물질 방출 저해제 S9940이 신경세포 돌기신장에 미치는 영향

이윤식 · 박기인*
공업기술원 생명공학공업기술연구소 세포기능연구, *전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Effect about Neurite Extension of S9940, an Inhibitor of Exocytosis in PC12 Cells

Yun-Sik Lee and Kie-In Park*

Cell Biology Laboratory, National Institute of Bioscience and Human-Techonology, Agency of Industrial Science and Techonology, 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 identified S9940, a novel microbial metabolite from Streptomyces spp., to inhibit the release of neurotransmitter from PC12 cells. S9940 is an inhibitor of trifiated norepinephrine ([^{3}H]-NE) release in high K^+ buffer solution containing ionomycin, indicating that S9940 inhibits neurotransmitter release after the influx of Ca^{2+} ions. We also examined the effect of S9940 on β-glucuronidase release from guinea pig neurophils and the effect on the neurite extension of PC12 cells and rat hippocampal neurons. As a result, S9940 inhibited β-glucuronidase release: when treated with 5 μg/ml of S9940, which prevented [^{3}H]-NE release, the inhibition of neurite extension for both PC12 cells and rat hippocampal neurons was observed.*

***Key Words** : Neuron, Exocytosis, Inhibitor, Neurophil, β-glucuronidase*

I. 서 론

신경세포의 특징은 각각의 세포가 다수의 시냅스를 형성하고, 복잡한 회로를 형성하여 세포간 커뮤니케이션이 일어나는 것이다. 신경세포의 synaptic terminal에서는 외부의 자극에 의해 축색에 전달된 활동전위가 presynatic terminal 부위에 도달하면 전위의존성의 Ca^{2+} 농도의 상승에 의해 신경전달물질을 방출하고 있다 (Klugbauer *et al.*, 1995). 이런 신경전달물질의 방출과정에는 Synaptosomal-associated proteins of 25 KDa (SNAP-25), 시냅스 전막에 있는 syntaxin과 소포막에 있는 Vesicle-associated membrane protein (VAMP) 등이 함께 결합하여 복합체를 형성하여 관여하고 있는 것으로 보고되어 있다(O'Conner *et al.*, 1993). 실제로 신경세포는 세포외부로부터의 자극에 의해 신경전달물질을 방출하는 조절성 분비(regulated secretion)는 분비과립 또는 소포체의 한계막과 분비세포막 방출부위 내면 등이 접착하여, 양막이 fusion한 결과, fusion 부위에 pore를 형성, 이 pore를 통하여 과립 또는 소포의 내용물만이 세포외로 방출되어진다.

시냅스부위에서 신경전달물질의 방출은 각각의 특이적인 수용체에 의하여 수용됨으로써 자극을 전달하는 신경계의 가소성에 필수적인 과정으로 알려져 있다. 실제로 뇌의 기능으로서 기억, 학습, 인지 등에 있어서의 세포수준의 모델이 되고 있는 장기증강 현상 long term potentiation(LTP)의 성립시에는 신경전달물질의 방출량이 증가하고 있다는 사실과 presynaptic terminal에서 신경전달물질의 방출에 관계하는 시냅신이라고 하는 단백질 등이 LTP의 성립에 관여하고 있는 사실이 보고되었다(Rosahl *et al.*, 1995; Linden 1994).

신경세포간 정보교환이 이루어지고 있는 신경전달물질의 방출과정은 극히 복잡하여, 이 방면의 독창적인 연구를 수행하기 위해서는 신규작용을 갖는 특이적인 저분자 probe의 탐색은 필수적이다. 그래서 PC12

*To whom correspondence should be addressed.

세포에서 신경전달물질의 방출에 대한 효과를 조사한 결과 PC12 세포에 incorporation된 노르에피네피린([^{3}H]-NE)의 고농도 K^+ 자극에 의한 exocytosis를 특이적으로 저해하는 물질 S9940을 방선균 대사산물로부터 얻었다. 이 물질은 FAB-MS 스펙트럼과 NMR 분석 결과 분자량 390의 신규물질로 추정되었다.

한편, ionopore인 monensin, vesicular-ATPase 저해제, concanamycin A 등의 약제는 세포 내 organelle의 활성을 저해함으로 분비를 억제하고 있는 사실로부터, S9940의 경우에도 같은 작용기작을 나타내고 있는가를 세포내 산성 organelle의 acridine orange 염색법에 의해 조사 했다.

S9940이 신경전달물질방출에 대한 저해작용을 보여 신경계 세포의 특이적인 저해 여부를 조사하기위하여, 별도의 조절성분비를 하고 있는 몰모트의 neurophil에서의 β-glucuronidase의 방출에 대한 영향을 조사했다. 또 본 물질이 신경계 세포에 대한 독성여부를 검토하기 위하여, 증식 및 형태변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배지 및 세포배양

0.1% 글리코겐 생리식염수용액은 글리코겐분말 0.4 g, NaCl 3.6 g에 탈이온수 400 m*l*을 첨가하여 121°C, 20분간 완전멸균하여 사용했다. Hanks 완충액은 KCl 0.4 g, KH_2PO_4 60 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 97.7 mg, NaCl 8 g, $NaHCO_3$ 0.35 g, Na_2HPO_4 47.5 mg에 탈이온수 1 *l*를 가해 완전멸균했다. 별도로 멸균한 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$(185.5 mg/*l*) 및 0.22 μm의 pore 멸균필터로 필터멸균한 glucose(1 g/*l*)를 첨가하여, 1 N NaOH로 pH 7.4로 조정하여 세정용 완충액으로 사용했다. 초산 완충액은 탈이온수 100 m*l*에 초산 1.15 g을 첨가하여 0.2 M의 초산 stock 용액 51 m*l*당, 0.2 M의 sodium acetate 용액을 49 m*l* 첨가 후, 탈이온수로 희석하여 총 200 m*l*의 초산 완충액(pH 4.6)을 조제했다.

2. 글리신완충액

글리신 1.5 g 에 탈이온수 100 m*l*을 첨가, 0.2 M의 글리신 stock 용액을 77.2 m*l* 넣은 후 , 탈이온수를 가지고 희석하여 총 400 m*l*의 글리신 NaOH 완충액(pH 10.3)을 조제했다. 해파린 나트리움 주사액 노보해파린 1000(1000 U/m*l*)를 루디스크(덴마아크)로 부터 구입 후 희석하여 사용했다. N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenylalanine(FMLP)는 Sigma사, 4-methylumbelliferyl-β-D-gluculonide와 카제인산나트리움은 Nakara사(Japan)의 제품을 구입하여 사용했다.

3. 몰모트의 neurophil의 조제법

본 실험은 Tsujii 등의 방법을 변형했다(Tsujii *et al.*, 1992). 몰모트(Hartley, ♂, 10～12 weeks)에 생리식염수로 녹인 12% 카제인산나트리움 20 m*l*/마리를 에테르 마취하에서 주사했다. 주사후 후두부를 구타하여 실신시킨 후, 경동맥을 절단하여 방혈사시켰다. 5 u/m*l* 헤파린이 든 Hanks 완충액 20 m*l*/마리를 *ip* 주사하여 neurophil을 취한다. 1,100 rpm 5 min 4°C에서 원심분리하여, 상청을 버리고, Hanks 버퍼에 1회 세정한 후, 세포현탁용 D-MEM에 1.2×10^7 cell/m*l*로 조제하여 얼음위에 보존했다.

4. Neurophil에서의 탈과립유도

1.2×10^6 cell/m*l*의 neurophil 부유액 150 m*l*를 37°C에서 15분간 배양했다. 5 μg/m*l*의 S9940을 가해 5분 후에 FMLP에 cytochalasin B(Sigma)를 첨가한 용액 45 μ*l*를 첨가했다. 5분 후에 얼음위에서 반응을 멈추게 하여 4°C, 1,500 rpm으로 2분간 원심분리했다. 얻은 상청 100 μ*l*를 사용하여 β-glucuronidase의 활성을 측정했다.

5. β-glucuronidase 활성도 측정

상청에 0.1 M 초산완충액(pH 4.6) 300 μ*l*를 가해 37°C에서 15분간 incubating하여, 기질로서 50 μ*l*의 1 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide를 첨가했다. 15분 후에 0.1 M 글리신완충액(pH 10.3) 2 m*l*를 첨가하여 효소반응을 멈추게 했다. 형광광도계의 여기파장을 365 nm, 형광파장을 450 nm에 맞추어 유리한 4-methylumbelliferone의 형광강도를 측정했다. 별도로 neurophil 부유액을 0.2% Triton X-100로 세포를 용해하여, 원심상청액 중의 β-glucuronidase 활성을 100%의 과립방출량으로 했다.

6. 산성 organelle의 acridine orange 염색법

PC12 세포를 24 wells plate에 부착시킨 원형 cover glass(Φ13 nm : 아세톤, 에타놀 등에 씻은 후, polyethylenimine(PEI)로 코팅한 것을 사용)위에서 배양하여, S9940

또는 concanamycin A(1 μg/ml)에 의해 전처리를 1시간 행했다. 배지에 10 mM acridine orange를 1/2000양을 더해(final conc. 5 μM), 15분간 배양했다. cover glass를 회수하여, 클랩스링카액(KR : 120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.26 mM $CaCl_2$, 1.22 mM $MgSO_4$, 25 mM Hepes-NaOH pH 7.4)에 몇번 세정하여, cover glass의 세포가 붙어있지 않은 측의 수분을 잘 닦은 후 건조시켜 KR으로 슬라이드글라스상에 마운팅했다. 형광현미경에 의한 관찰은 Olympus BH-2 현미경을 사용, U큐브, 보조흡수필터 Y455, 100배의 대물렌즈에 유침상태에서 관찰했다.

7. Rat hippocampal neuron 및 배지

본 실험에서 사용한 모든 세포는 D-MEM 배지로서 37°C, 10% CO_2 탄산가스 incubator 내에 습기를 공급한 상태에서 배양했다. 임신 18일의 rat을 단두하여, 전신을 70% ethanol로 세정 후 복부로부터 배를 자궁과 함께 추출했다. 배를 자궁으로부터 분리하여, 두피 두 개를 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 5 ml에 현탁하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 끝에 tip을 끼운 피펫으로 피펫팅함으로써 세포를 분산시켜, 0.002% DNase I(Sigma)를 첨가 후 10분간 더 반응시켰다. 5% HS를 포함한 D-MEM을 첨가하여 다시 한번 피펫팅한 후 autoclave 해둔 lens paper로 여과하여 세포를 분산시킨후 1000 rpm에서 5분간 원심분리를 2회 반복하여 세포를 세정했다. 세포수를 카운터한 후, primary culture용 배지에 현탁하여 24-wells plate(Nunc Co.)에 접종하여 배양했다.

III. 결 과

1. 몰모트 neurophil의 탈과립에 대한 작용

neurophil은 cytochalasin B의 존재하에서의 캐미칼 메디에이터의 일종인 FMLP에 의한 자극에 따라 분비과립에 축적된 β-glucuronidase를 exocytosis에 의해 방출한다. 상청에 방출된 β-glucuronidase를 측정함으로써 neurophil의 탈과립에 대한 S9940 물질의 작용을 검토했다. FMLP은 1 μM와 cytochalasin B는 10 μM의 농도로 처리했을 때, 좋은 유도반응을 나타냈다(Fig. 1). S9940은 고농도 K^+ 이온에 의한 탈분극자극에 의해 방출되는 신경전달물질로서 노르에피네피린과 ATP의 exocytosis를 저해한(Data 생략) 것처럼, neurophil의 FMLP와 cytochalasin B의 자극에 의한 탈과립에 대한 검토 결과에서 β-glucuronidase의 exocytosis에 대해서도 저해작용을 나타냈다(Table 1).

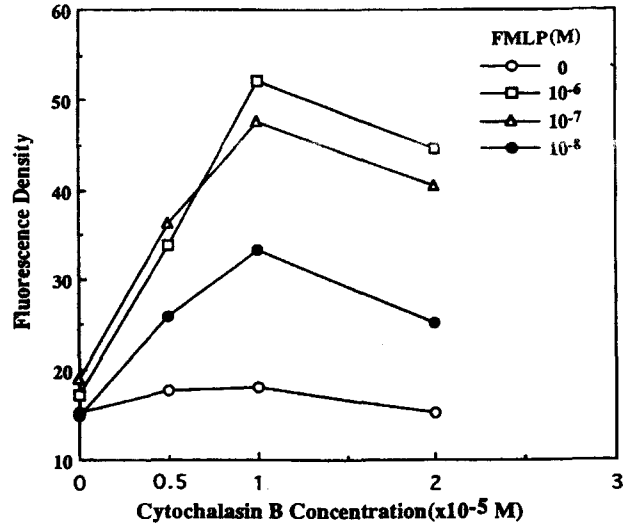

Fig. 1. Effect of cytochalasin B and FMLP on granule enzyme in neurophil from guinea pig. β-glucuronidase from neurophil was assayed as described in Materials and Methods. Cells were washed and treated with 0~20 μM cytochalasin B and 0 (open circle), 1 (square), 0.1 (triangle), 0.01 (closed circle) μM FMLP for the concentration indicated. Released β-glucuronidase levels were assayed by enzyme-substrate reaction.

Table 1. Effect of S9940 on β-glucuronidase release in Neurophils

Sample	β-glucuronidase
Control	100
S9940	1.2

(% of controls)

*Effect of S9940 on β-glucuronidase release in neurophils from guinea pig was assayed as described in materials and methods. After incubation of neurophil supernatant for 15 minutes at 37°C, 5 μg/ml of S9940 was treated. Control means the amount of release of β-glucuronidase treated with 10 μM cytochalasin β and 1 μM FMLP. The values are average of three times of experiment.

2. 세포내 산성 organelle의 acridine orange 염색

vesicular-ATPase 저해제가 세포내 단백질의 막 수송을 저해하는 것, 특히 바피로마이신 A1이 프로락틴의 분비를 trans-golgi 이후의 과정에서 저해하고 있는 것이 알려져 있다(Moriyama *et al.*, 1992). 방선균 대사산물로부터 탐색하여 얻어진 S9940 물질에 이와 같은 작용기작을 통하여 [^{3}H]-NE 및 ATP, neurophil에서 FLMP와 cytochalasin B의 자극에 의한 β-glucuronidase의 분

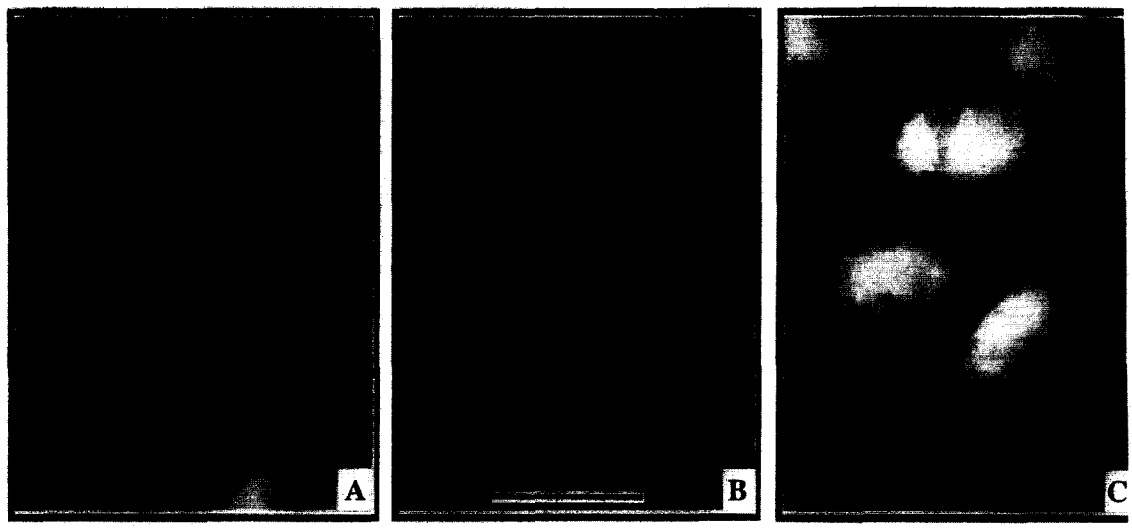

Fig. 2. Comparision of the organelle acidification of S9940 and concanamycin A in PC12 cells. PC12-B3 cells were incubated on PEI coated cover glass and stained with 5 μM of acridine orange as a final concentration following above mentioned materials and methods. Cells were incubated with medium only (A), medium containing with 5 μg/m*l* S9940 (C) and medium containing with 1 μg/m*l* concanamycin A (B) for 1 hour, then took a photograph was taken with 200 magnification. Bar is 25 μm.

비에 관해서 저해하고 있는가를 세포내 산성 organelle의 acridine orange 염색에 의해서 검토했다. PC12 세포를 S9940, 또는 organelle 산성화 저해제를 처리한 대조군으로서 concanamycin A(1 μg/m*l*)로 1시간 전처리하여, acridine orange에 의한 염색 후 형광현미경으로 관찰했다. 대조군에서는 세포 내 orange색의 소과립이 많이 보여졌다(Fig. 2). Acridine orange는 산성화한 organelle에 축적하여 형광을 띠기 때문에, 이들 과립이 리소조옴등이라고 생각되어진다. Concanamycin A의 처리시에는 예상했던 것처럼 이들 orange색의 세포내 과립이 소실되어, 산성화의 저해가 일어나고 있는 것이 확인되었다(Fig. 2C). 그러나 5 μg/m*l*의 S9940을 처리한 경우에 있어서는 concanamycin A와 같은 산성화 저해제를 처리한 경우에서 보이는 과립의 소실은 관찰되지 않았으며 아무것도 처리하지 않은 대조군과 같은 결과를 나타내었다(Fig. 2A, B).

3. PC12 세포 및 초대배양 해마신경세포의 형태에 대한 작용

신경전달물질 방출에 관여하고 있는 신경계특이단백질 synapsin과 SNAP-25가, 신경세포의 돌기신장에도 관여하고 있는 것이 밝혀졌다(Muroi *et al.*, 1993; O'Conner *et al.*, 1993). 그래서 본 실험에서 신경전달물질의 방출과정에 저해반응을 나타내고 있는 S9940 물질이 PC12 세포 및 rat의 초대배양 해마신경세포의 형태에 대하여 어떤 작용을 가지고 있는가를 검토했다. PC12 세포는 nerve growth factor(NGF)를 첨가함에 따라 신경세포처럼 긴 돌기의 신장을 유도했다(Fig. 3).

50 ng/m*l*의 NGF를 처리한 PC12 세포에 S9940 물질을 이 세포에서 [^{3}H]-NE의 방출을 저해한 5 μg/m*l*의 농도로 처리하여 2일 동안 배양한 결과, PC12 세포의 돌기 신장에 대하여 현저한 저해작용을 나타냈다(Fig. 4). 또 rat의 대뇌피질신경세포에서 신경전달물질로서 ATP의 exocytosis에 대해서 저해반응을 보인 S9940 5 μg/m*l*을 해마신경세포에 처리 2일 후의 세포변화를 관찰한 결과, 신경돌기의 신장을 억제했다(Fig. 5).

IV. 고 찰

시냅스에는 H^+-ATPase가 존재하고 있어서, 신경전달물질의 시냅스소포에의 농축과정에는 소포내의 산성화가 관여하고 있는 것은 잘 알려진 사실이다. 최근, 이 H^+-ATPase의 성질이 밝혀져, 전달물질수송의 에너지 증여에 관해서도 알게 되었다. 액포형의 ATPase는 크로마핀과립과 효모의 액포에서 발견된 이래, 많은 세포내 막계 organelle에 발현되고 있는 것이 밝혀졌다(Moriyama and Futai 1990). 한편 글루탐산, ATP, 도파민과 노르에피네피린 등의 monoamine류의 수송계가 동정되었다. 이들의 수송활성은 온도의존성이며, 기질농도를 높이면 incorporation은 증가하지만 정해진 한계치에 도달하면 그 이상은 증가하지 않는다. 또한 기질을 수십배에 농축할 수 있는 것으로 수송단백질에 의한 능동수송이라고 사료된다. 수송활성은 ATP에 의

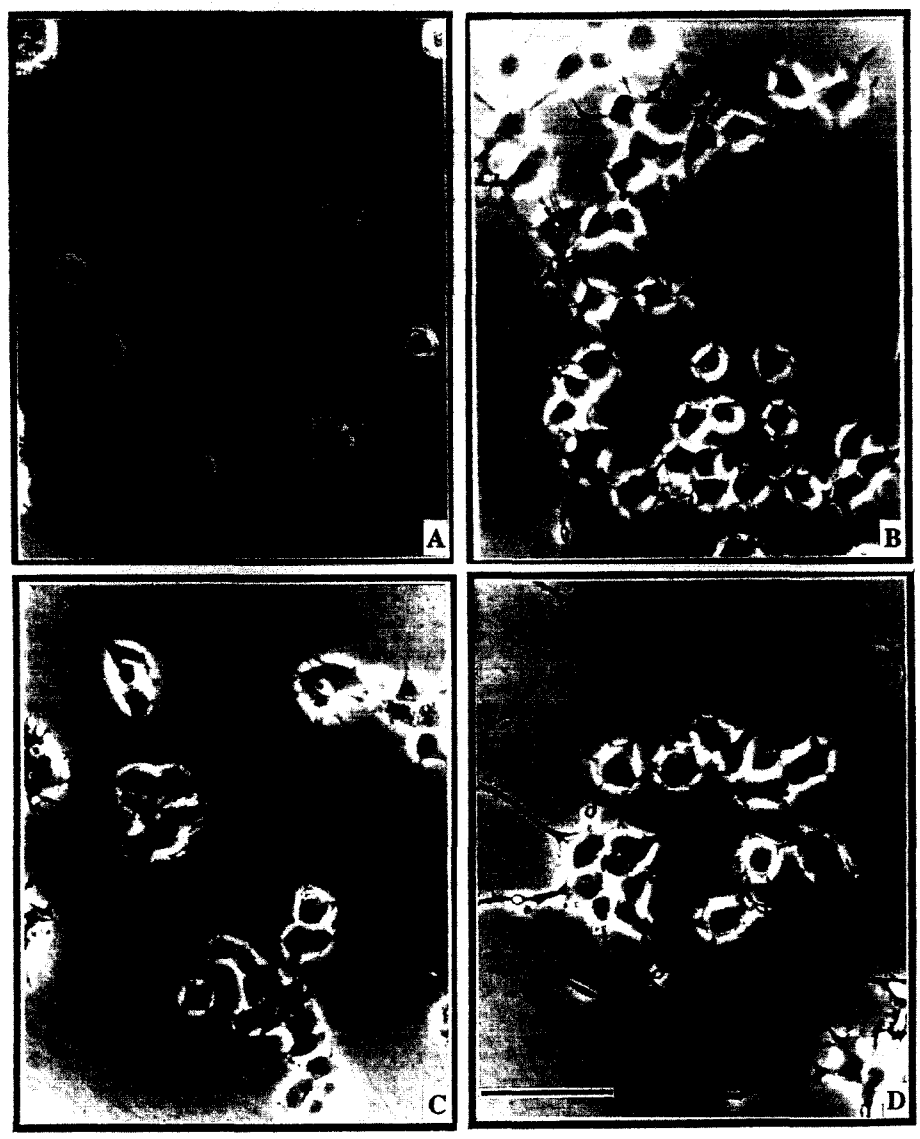

Fig. 3. Neurite extension of PC12-B3 cells by treatment of NGF. The cells were incubated on collagen coated 24-wells plate with D-MEM containing 5% HS and 5% FCS. Photographes (×100) show control (A), 1 day treatment (B) and 2 days treatment (C) of 50 ng/ml NGF. Bar is 50 μm.

존하고 있어, proton conductor에 감수성을 나타낸다. 즉 신경전달물질은 소포내의 H^+와의 antiport에 의해 내부에 incorporation되어진다(Moriyama and Futai 1990). 최근의 Hrs-2가 ATPase로서 SNAP-25에 결합, Ca^{2+} 농도와 ATP의 분해에 의존하여 소포수송을 조절하고 있다고 보고되었다(Bean *et al.*, 1992).

한편 바피로마이신 등의 V-ATPase 저해제가 세포내 단백질의 막수송을 저해하고 있는 것이 알려졌다(Moriyama *et al.*, 1992). Henomatsu(1993)는 바피로마이신 A1이 프로락틴 분비를 저해하는 것과, 저해부위가 trans-golgi로부터 분비과립이 형성되어 분비의 후기 과정에 있다는 것을 보고하였다. 이것은 S9940이 바피로마이신과 같이 V-ATPase 저해작용을 갖고, 동일하게 V-ATPase 저해작용을 갖는 concanamycin A가 G 단백질의 세포내 수송을 골지 이전에 정지시킨다는 것을 보고하고 있다(Muroi *et al.*, 1993).

본 실험계에서 S9940 물질이 V-ATPase의 저해에 의해 신경전달물질이 소포에 농축되는 것을 억제한 결과, 방출량을 감소시켜서 exocytosis를 저해한다고 볼 수 있는 가능성은 매우 낮다. Acridine orange에 의한 염색결과에서 보여지듯이, S9940 물질은 V-ATPase 저해 활성은 갖고 있지 않으므로 S9940의 신경전달물질 방출 저해 작용은 별도의 메카니즘을 통한 것으로 사료되어 진다.

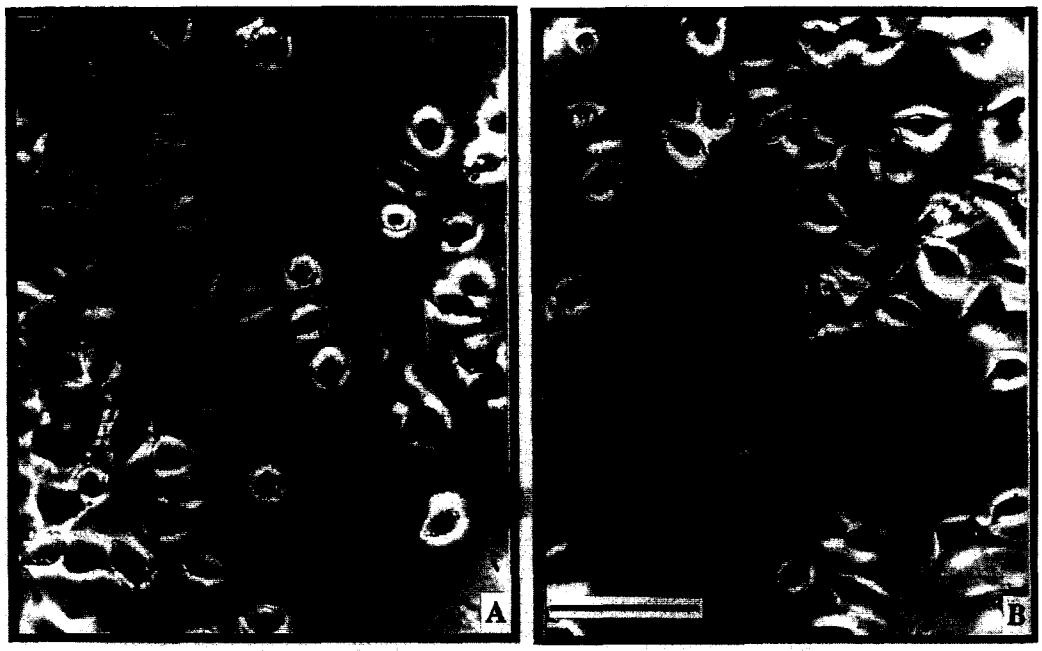

Fig. 4. Effect of S9940 on the neurite extension of PC12 cells. PC12-B3 cells were incubated on collagen coated 24-wells plate with D-MEM containing 5% HS and 5% FCS. After 2 days incubation, the cells were further cultured with above medium containing 50 ng/m*l* NFG in precence of 5 μg/m*l* S9940 or not for 2 days. Photographes (×100) show control (A) and the treatment of 5 μg/m*l* S9940 (B). Bar is 50 μm.

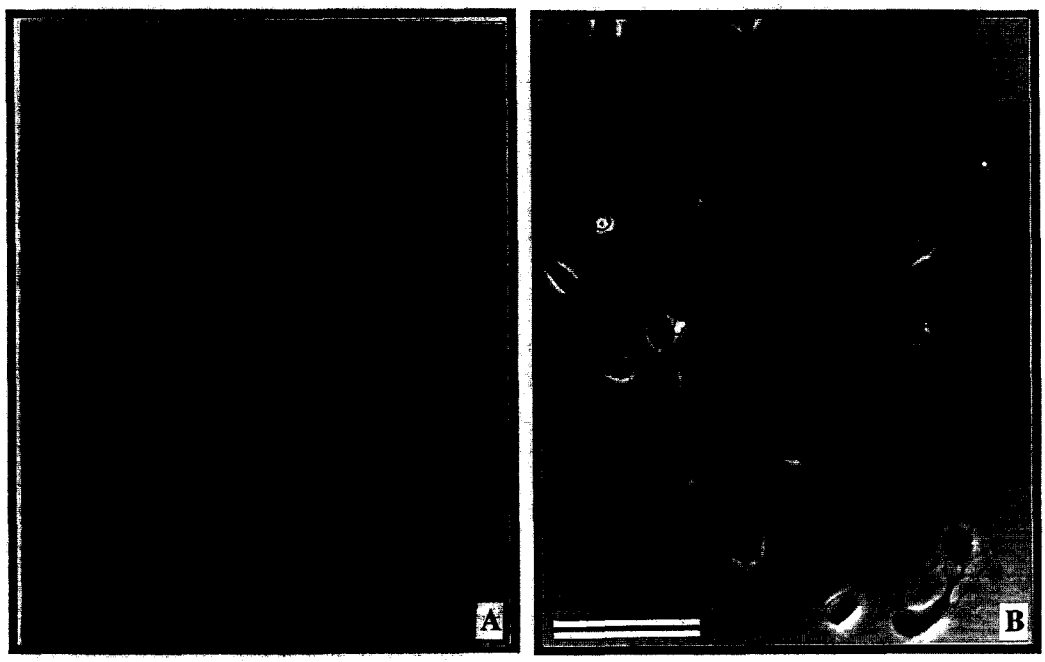

Fig. 5. Effect of S9940 on morphology of rat hippocampal neuron. Rat hippocampal neuron was incubated on PEI coated 24-wells plate with primary culture medium. After 2 days incubation, the hippocampal neuron was further cultured with above medium in presence of 5 μg/m*l* S 9940 or not. Photographes (×100) show control (A) and the treatment of 5 μg/m*l* S9940 (B). Bar is 50 μm.

신경전달물질의 방출에 관여하고 있는 신경계특이 단백질 synaptophysin과 synapsin 등이 exocytosis를 조절하고 있다고 보고 되었다(Alder *et al.*, 1992). 또한 protein kinase C activator인 PMA를 처리함으로써 신경전달물질의 방출이 촉진된다는 보고도 있다(Vitale *et al.*, 1995). 이것은 PKC에 의한 인산화부위를 갖고 있는 synapsin이 활성화되어, 시냅스소포와 actin의 cross-linking을 조절함에 의해 신경전달물질의 방출을 조절하고 있다고 생각되어진다.

한편 synapsin과 SNAP-25 등이 신경세포의 돌기신

장에도 관여하고 있다고 보고 되었다(Ferreia *et al.*, 1992; Osen-Sand *et al.*, 1993). SNAP-25 등이 시냅스 전막뿐만아니라 축색막상에 전반적으로 다량 존재하는것으로부터 별도의 기능을 갖고 있다고 예상되어진다. 또한, *In vivo* 및 *in vitro*의 antisense 법을 통하여 해석한 결과 신경돌기의 신장에도 중요한 역할을 갖고 있음이 증명되었다. 이들 보고로부터 CAM kinase II, PKC에 의한 인산화부위를 갖고 있는 신경계특이단백질, synapsin 등이 시냅스소포와 actin cytoskeleton의 cross-linking을 조절함으로써 신경전달물질의 방출을 조절하고 있으며, 또한 시냅스소포가 시냅스 전막과 융합하는 이 프로세스가 신경돌기의 신장과정에도 관여하고 있을 가능성을 시사하고 있어 흥미롭다. 그래서 S 9940 물질이 신경계 세포의 증식 및 형태에 미치는 작용을 검토했다. 먼저 세포독성을 astroglia 유래의 세포종양인 C6 세포와 마우스의 신경아세포종양인 Neuro 2A를 가지고 조사해 본 결과, 이 세포들의 형태 및 증식에는 영향을 미치지 않았다(data 생략). S9940 물질을 처리하여 신경세포의 돌기신장 형태를 관찰한 결과, 분화를 유도하는 적정농도인 50 μg/*ml*의 NGF 존재하에서의 PC12 세포의 돌기신장에 대하여서는 억제작용을 나타냈다. 또 rat의 대뇌 해마세포에 대하여 특징적인 형태의 돌기를 내고있어, S9940 물질의 첨가에 의해 통상의 긴 축색돌기는 억제되고 얇은 침상의 돌기가 세포체로부터 돌출되어 있었으며, growth cone를 갖고있지 않은 뉴우런이 많이 관찰되었다.

시냅스전달에 관여하는 신경계 특이단백질 중 syntaxin의 경우에 있어서도 이의 antisense RNA를 처리한 결과로부터 신경돌기신장의 과정에 대해서, 또 신경섬유의 발아 및 신경섬유의 성장 스텝에도 작용하고 있음이 밝혀졌다. 이런 결과의 해석에 관해서는 여러 가설이 있으나, vesicle fusion에 의한 막계의 인자의 보충이 돌기신장에 필수적일 것이라고 사료된다. 따라서 S9940 물질은 syntaxin, synapsin, SNAP25 등의 단백질이 직접 혹은 이와 밀접한 관련을 갖고있는 인자와 간접적으로 작용하여 신경전달물질의 방출을 제어하며, growth cone의 전향, 보수와 신경세포의 가소성을 조절는 물질로 사료되어 이후의 생리적인 연구를 통한 작용기구에 대한 해석이 기대된다.

참고문헌

Alder, J., Xie, Z.-P., Valtorta, F., Greengard, P. and Poo. M.-M. (1992): Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron*, **9**, 759.

Bean, A.J., Seifert, R., Chen, Y.A., Sacks, R. and Scheller, R.H. (1997): Hrs-2 is an ATPase implicated in calcium-regulated secretion. *Nature*, **385**, 826.

Ferreia, A., Kenneth, S., Kosik, Greengard, P., Han. H.Q. (1994): Aberrant neurites and synaptic vesicle protein deficiency synapsin II depleted neurons. *Science*, **264**, 977.

Henomatsu, N., Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y. and Tashiro, Y. (1993): Inhibition of intracellula transport of newly synthesized prolactin by bafilomycin A1 in a pituitary tumor cell line, GH3 cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **62**, 127.

Klugbauer, B., Lubica, L., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1995): Structure and functional expression of a new member of the tetrodoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO.*, **14**, 1084.

Linden, D.J. (1994): Long-term synaptic depression in the mannalian brain. *Neuron*, **12**, 457.

Moriyama, Y. and Futai, M. (1990): H^+-ATPase, a Primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 443.

Moriyama, Y. and Futai, M. (1990): Presence of 5-hydroxytrypamine(serotonin) transport coupled with Vacuolar-type H^+-ATPase in neurosecretory granules from bovine posterior pituitary. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9165.

Moriyama, Y., Meada, M. and Futai, M. (1992): The role of V-ATPase in nuronal and endocrine systems. *J. Exp. Biol.*, **172**, 171.

Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. and Takatsuki, A. (1993): Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of V-ATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the golgi apparatus. *Cell Struc. Func.*, **18**, 139.

O'Conner, V.M., Shamotienko, O., Grishin, E. and Bet2, H. (1993): On the Structure of the 'synapto-secretosome'-Evidence for a rerexin/synaptotagmin/syntaxin/Ca^{2+} channel complex. *FEBS* **326**, 255.

Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K. A., Ayala, G.1, Knowles, J., Grenningloh, G. and Catsicas, S. (1993): Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, **364**, 445.

Rosahl, T.W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D.K., Wolff, J.R., Hanner, R.E., Malenka, R.C. and Sudhof, T.C. (1995): Essential function of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation.

Nature, **375**, 488.

Tsujii, E., Tsurumi, Y., Miyata, S., Fujie, Kawakami, A., Okamoto, M. and Okuhara, M. (1992): WF 11605, an antigonist of leukotriene B4 produced by a fungus. Producing strain, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiotics*, **45**, 698.

Vitale, M.L., Seward, E.P. and Trifaro, J.M. (1995): Chromaffin cell corticalactin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, **14**, 353.