

흰쥐 교감신경세포에서 Norepinephrine 에 의한 칼슘전류 억제에 미치는 Protein Kinase C 의 역할

충북대학교 의과대학 생리학교실, Tulane 의과대학 생리학교실+

구 용숙, Keith S. Elmslie+

지금까지 각종 신경전달물질의 칼슘통로 억제 효과는 일반적으로 protein kinase 의 관여없이 G-protein mediated, membrane-delimited mechanism¹⁾으로 설명되어왔다. 그러나 최근들어 protein kinase C (PKC)의 활성화가 몇몇 신경전달물질에 의한 칼슘통로 억제효과를 야기하는 중요한 세포내 기전으로 보고되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 흰쥐 교감신경뉴론을 대상으로 하여 whole cell patch clamp technique을 사용하여 칼슘전류를 기록하고, 세포밖에 norepinephrine (NE) 과 함께 PKC agonist 인 phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu)을 투여하면서 PDBu 전 처치로 인하여 NE 에 의한 칼슘전류 억제에 어떤 변화가 초래되는 지를 분석함으로써, 신경전달물질의 칼슘전류 억제효과시 PKC의 역할을 밝히고자 하였다.

PDBu (500 nM) 처치는 칼슘전류의 크기를 증가시켰으며 이는 막전압 의존성을 보여 -10 mV ~ +10 mV 의 저분극 자극시 가장 크게 전류크기가 증가하였다. 또한 PDBu 처치는 tail current 의 deactivation을 느리게 하였다. PDBu 는 NE 에 의하여 활성화되는 pertussis toxin 예민성 G protein pathway를 통한 칼슘전류 억제를 감소시켰다. 비특이적인 protein kinase 길항제인 staurosporine (1 μ M) 을 전처치 하고 PDBu를 투여하면 PDBu의 칼슘전류 크기 증가 효과가 소실되었으며 또한 NE에 의한 칼슘전류 억제를 해제하는 PDBu 의 조절효과도 소실되었다. 이상의 결과로부터 Protein Kinase C 가 활성화되면 G protein을 경유하여 나타나는 칼슘전류 억제 효과가 소실된다고 결론지을 수 있다. Protein Kinase C 에 의하여 인산화되는 부위가 G-protein 인지 혹은 칼슘통로인 지에 관한 해답을 얻기 위하여는 추후 연구가 진행되어야 한다.

서 론

뉴론에서 칼슘통로는 많은 중요한 역할을 담당하고 있으며 특히 흥분-분비연결(excitation-secretion coupling)에서의 칼슘통로의 중요성은 잘 알려져 있다.

즉 신경말단에 도달한 활동전압은 수 ms. 이내에 신경전달물질(neurotransmitter)의 분비를 유발하는데, 그 분비량은 막전압의존성 칼슘통로(voltage dependent Ca^{2+} channel)를 통하여 유입된 Ca^{2+} 량에 의하여 결정된다. 다시 말해 칼슘통로의 활동에 영향을 주는 인자는 곧 시냅스 전달(synaptic transmission)에 지대한 영향을 미치게 된다.

많은 신경전달물질이 뉴론의 칼슘통로에 억제작용을 나타낸다는 것이 잘 알려져 있다 (norepinephrine:^{2, 4)}

; Acetylcholine:^{3,5),6)}; somatostatin:⁷⁾; prostaglandins:⁸⁾; adenosine:⁹⁾; neuropeptide Y:¹⁰⁾) 이러한 억제작용은 presynaptic inhibition - 신경전달물질이 동일한 synapse 또는 연결한 synapse에 직접 작용함으로써 더 이상의 신경전달물질이 분비되지 않도록 함 - 을 설명하는 기전으로 생각되고 있다.

한편, 대개의 신경전달물질의 시냅스후 세포(post-synaptic cell)에 대한 영향은 G-protein과 연계되어 있는 수용체와 결합함으로써 서서히 나타나게 된다. 즉 지금까지 신경전달물질의 칼슘통로 억제 효과는 신경전달물질이 시냅스후 세포막의 수용체와 결합하면 세포내 G-protein을 활성화시켜 G-protein 이 칼슘통로에 결합함으로써 칼슘통로의 활성화를 느리게 함으로써 나타나고 이때 강한 저분극자극이 인가되면 칼슘통로에 결합되어 있던 G-protein 이 떨어져 나옴으로써 칼슘통로의 활성화가 잘 열리지 않는 (reluctant) mode에서 열리기 쉬운 (willing) mode로 전환된다는 G-protein mediated, membrane-delimited

* 본 연구는 한국학술진흥재단 '96 대학교수 해외파견 연구비 지원에 의한 결과임

mechanism¹¹으로 잘 설명되어왔다. 그러나 protein kinase C (PKC)의 활성화가 몇몇 신경전달물질에 의한 칼슘 통로 억제효과를 야기하는 중요한 세포내 기전으로 보고되고 있다. 즉 chick sensory neurons 에서는 norepinephrine이 PKC를 활성화시킴으로써 칼슘통로를 억제한다고 보고되었고¹¹ 흰쥐 후근신경절 세포 (dorsal root ganglion cell line) 에서는 bradykinin에 의한 칼슘전류 억제를 PKC가 매개한다고 보고되었다¹². 반면 교감신경세포에서는 (frog sympathetic neurons:¹³, rat sympathetic neurons:¹⁴) PKC 활성화에 의해서 칼슘전류가 증가한다고 보고되었다.

그러므로 본 연구에서는 흰쥐 교감신경뉴론을 대상으로 하여 whole cell patch clamp technique을 사용하여 칼슘전류를 기록하고, 세포밖에 norepinephrine (NE) 과 함께 PKC agonist 인 phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu)을 투여하면서 PDBu 전 처치로 인하여 NE 에 의한 칼슘전류 억제에 어떤 변화가 초래되는 지를 분석함으로써, 신경전달물질의 칼슘전류 억제효과시 PKC의 역할을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포분리 방법

흰쥐 superior cervical ganglion 으로부터 단일 세포의 분리는 Ikeda 등¹⁵의 방법을 개선하여 시행하고자 한다.

체중 150-350 gm 되는 흰쥐 (Sprague Dawley rat) 를 ether로 마취한 후 guillotine 으로 희생시킨 후 머리부분을 얼음으로 차게 한 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 옮긴다. 양쪽 경동맥 분지부위 (carotid bifurcation)에서 ganglion를 분리해낸 후 결체조직으로 된 capsule을 제거한다. ganglion을 몇 조각으로 자른 후 Earle's balanced salt solution (EBSS)에 옮긴다. EBSS 에는 0.5 mg/ml trypsin (1X crystallized, Worthington Biochemicals, Freehold, NJ), 1 mg/ml collagenase D (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 0.1 mg/ml DNAase type I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 3.6 g/l glucose, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.22 % NaHCO₃

(pH 7.4)가 함유되어 있다. ganglion fragment를 함유한 enzyme solution을 5 % CO₂, 95 % O₂ 함유 공기하에서 34 °C 에서 1 시간 진탕처리한다. 진탕처리 후 단일 세포를 ganglion fragment 로부터 떨어뜨리기 위해 힘있게 흔들어준다. 세포부유액을 HBSS 용액 (10 % fetal calf serum (GIBCO, Grand Island, NY), 8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES (pH 7.4) 함유)에 옮긴 후 500 x g 에서 5 분간 원심분리한다. pellet을 위의 HBSS 용액에서 재부유시킨 후 culture dish 에 분주한 후 4 °C 냉장고에 사용할 때까지 보관한다.

2. 전기생리학적 기록(Electrophysiological recording)

단일세포에서 whole cell configuration patch clamp technique을 사용하여 칼슘전류를 기록한다. 전극은 Garner 7740 유리 (I.D. 0.9 mm, O.D. 1.5 mm, Garner Glass Co. Claremont, CA)를 사용하여 micropipette puller P-97 (Sutter Instrument Co., San Rafael, CA)로 저항이 1-2 M Ω 이 되도록 제작한다. 막전류 (membrane current)의 기록을 위하여 Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA)의 4 pole low pass Bessel filter를 사용하며 12 bit A/D converter (GW Instruments Inc., Cambridge, MA)로 digitization한다. digitization rate 는 filter frequency의 최소 5 배가 되도록 한다.

3. 용액 및 사용약물 (Solutions and Drugs)

칼슘전류의 기록을 위하여 세포를 세포외용액 (단위 mM) (TEA-Cl 140, HEPES 11, glucose 5, MgCl₂ 1, BaCl₂ or CaCl₂ 5)으로 채운다. electrode는 다음과 같은 조성의 세포내용액 (단위 mM) (NMG-Cl 120, TEA-Cl 10, Creatine-PO₄ 14, MgCl₂ 6, NMG-HEPES 10, Tris-ATP 5, NMG₂-EGTA 11, Li₂GTP 0.3)으로 채운다.

세포외용액으로 희석하여 Norepinephrine (RBI, Natrick, MA) (이후 NE으로 약칭)의 최종농도가 10 μ M 이 되도록 사용하였다. Phorbol-12, 13-Dibutyrate (PDBu) 는 dimethyl sulfoxide (DMSO) 에 녹여 1 mM 의 stock solution을 만든 후 세포의

용액에 희석하여 최종농도가 500 nM이 되도록하여 사용하였다. staurosporine (LC Laboratories, Woburn, MA) 은 DMSO 에 녹여 1 mM stock solution을 만든 후 최종농도가 1 μ M 이 되도록 세포외용액과 세포내용액에 희석하여 사용하였다.

4. Data 습득 및 분석(data acquisition and analysis)

전압자극 (voltage steps)은 S3 software (Guthrie Research Institute 의 Dr. Stephen Ikeda 가 제작하였음)로 발생시키고 전압자극에 따른 전류 data 는 Macintosh II computer에 저장한다. Igorpro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR)를 사용하여 전류의 크기를 측정하고 전류기록을 fitting하기 위하여 방정식 (Marquardt-Levenberg algorithm)을 사용한다. graph는 Igorpro로 부터 Canvas로 전송하여 마지막 가공을 하였다. 통계분석을 위하여 Student t-test를 사용하였다.

5. Leak Subtraction

linear leakage current를 보정하기 위하여 전압의존성 전류 (voltage activated current)에 전압자극의 1/4 크기인 과분극자극 (hyperpolarizing pulse)을 인가하였다 (P/4). 그러나 facilitation을 관찰하기 위한 protocol 에서는 non-leak subtracted current records를 얻었다. 그 이유는 P/4 leak subtraction 시 몇몇 세포에서는 서서히 활성화되는 내향성전류 (slowly activating inward current)가 leak subtracted records에 추가되는 것이 관찰되었기 때문이다.

6. Facilitation

본 연구에서는 facilitation을 신경전달물질에 의한 칼슘전류 억제를 보는 척도로 사용하였다. facilitation은 큰 저분극 자극에 의해 N형 칼슘통로의 억제가 풀리기 때문에 생기는 현상이며 이는 triple pulse

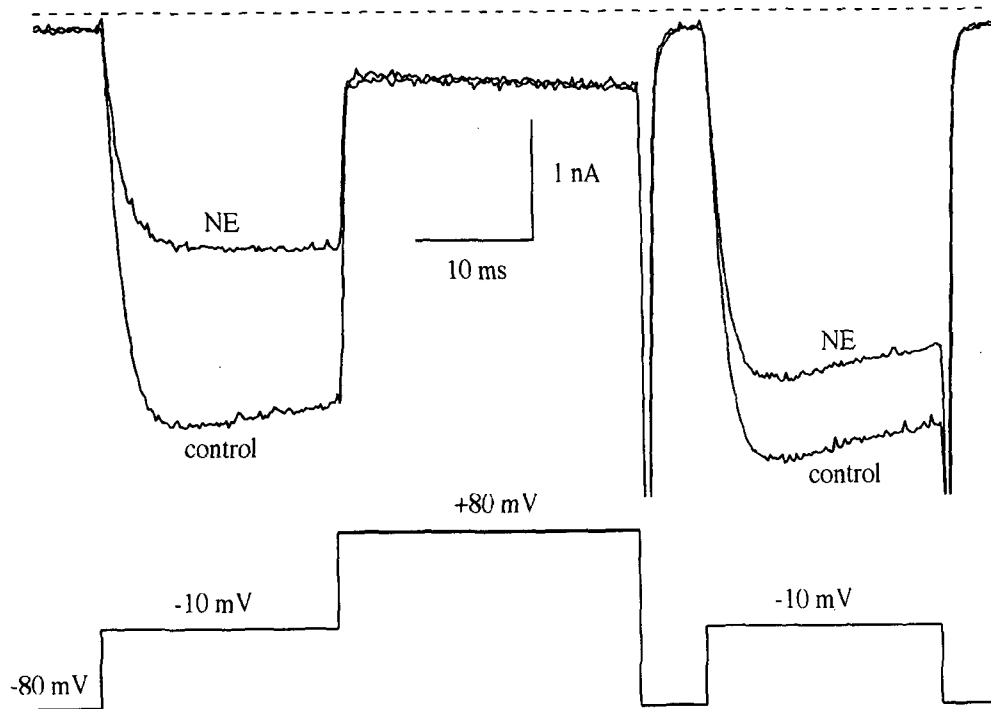


Fig. 1. Voltage dependent inhibition of Ca^{2+} current by NE

Calcium current traces (top) shown are superimposed before (control) and after application of 10 μ M NE (NE) following the voltage protocol (bottom). The dashed line shows zero current level. All current traces are leakage unsubtracted.

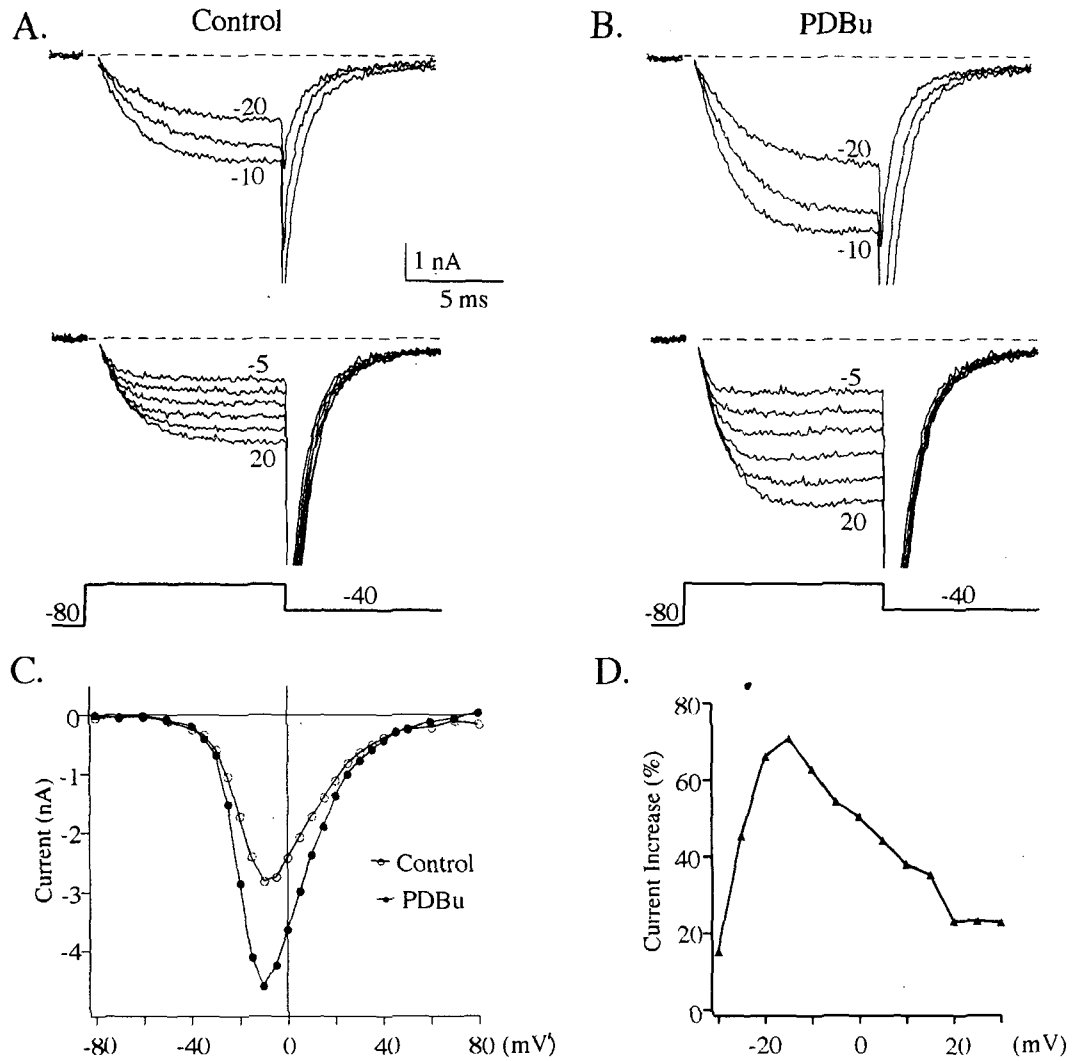


Fig. 2. Voltage dependent enhancement of Ca^{2+} current by phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu).

A. Ca^{2+} currents were evoked by 10 ms pulses from a holding potential of -80 mV to various test potentials in the external solution containing 5 mM Ba^{2+} . Current traces recorded under the control conditions after depolarizations to potentials between -20 and -10 mV (top) and between -5 and 20 mV (bottom) at a 5 mV increment are superimposed to each other. B. Superimposed current traces recorded 13 min after PDBu (500 nM) application with the same voltage protocol as in A; A and B share the same calibration bars. C. Current-voltage relationship of Ca^{2+} currents before (\circ) and after (\bullet) PDBu application. The current amplitudes were determined isochronally as the mean of $9.3 - 9.9$ ms after each test pulse and plotted as a function of test potentials. D. Voltage dependent enhancement of current amplitudes by PDBu. Ca^{2+} current amplitudes before and after application of PDBu were normalized to the amplitudes under the control condition.

protocol 을 사용하여 facilitating step ($+80$ mV) 을 주기전과 준 후의 칼슘전류 비율로 측정한다. 큰 저분극 자극 에 의하여 칼슘통로 억제의 대부분이 풀리기 때문에 postpulse current ($+80$ mV step 인가

후 가해진 test pulse에서의 칼슘전류) 대 prepulse current ($+80$ mV 인가 전 test pulse에서의 칼슘전류)의 비율은 억제 정도에 비례한다.

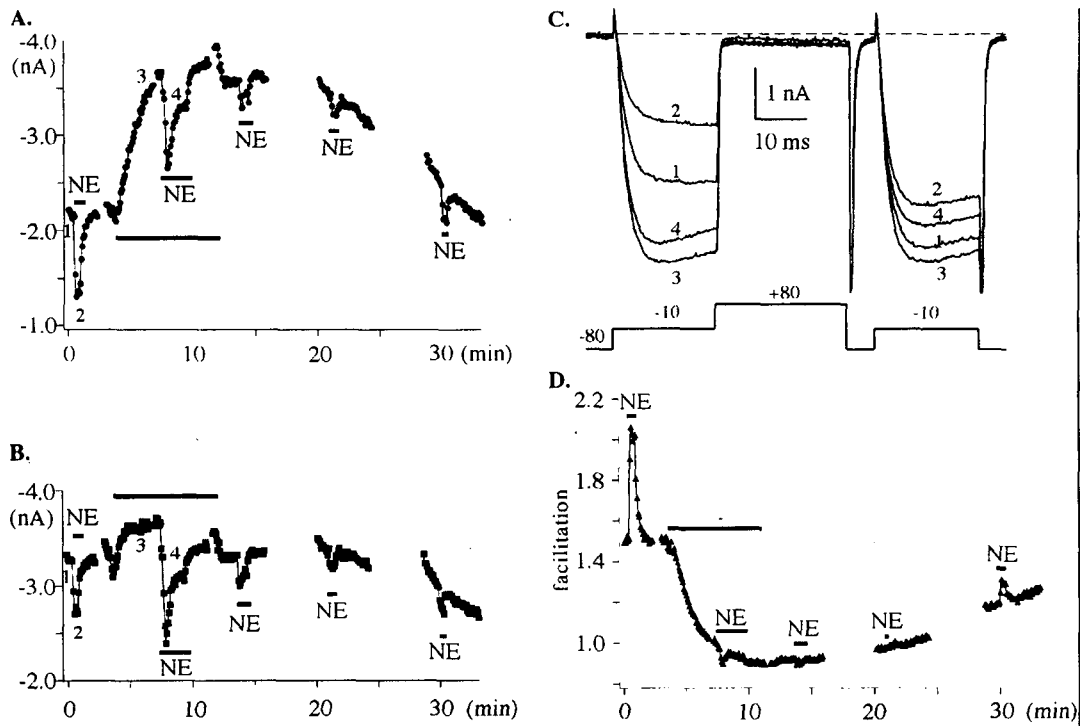


Fig. 3. PDBu effect on NE-induced inhibition of Ca²⁺ current

A. Time course of Ca²⁺ current amplitudes during the prepulse using the protocol of C (bottom) delivered every 5 sec. The peak amplitudes of Ca²⁺ currents were determined isochronally 7.5 ms after the step pulse to -10 mV from holding potential of -80 mV. B. Time course of Ca²⁺ current amplitudes during the postpulse using the protocol of C (bottom) delivered every 5 sec. C. Superimposed current traces selected at the times indicated in A and B. Before (label 1) and after (label 2) NE (10 μM) application, after PDBu (500 nM) (label 3) and both of PDBu and NE application (label 4). The dashed line shows zero current level. D. Time course of facilitation amplitudes calculated by the ratio of A and B. Note the marked decrease in facilitation amplitude with PDBu. Bars in A, B, and D: times when 10 μM norepinephrine(NE), 500 nM phorbol-12,13-dibutyrate(PDBu) were added.

결 과

NE에 의한 막전압의존성 칼슘전류 억제 (Voltage dependent inhibition of Ca²⁺ current by NE)

칼슘전류는 -10 mV step pulse (prepulse) 인가 시에는 NE (10 μM)에 의하여 크게 억제되었으며 control 에 비해 느린 활성화를 보였다. 반면 +80 mV 의 강한 저분극 자극 후 인가된 -10 mV pulse (postpulse)에 의해서는 NE 에 의한 억제가 부분적으로 풀려 postpulse current 는 control 에 비하여 약간 감소하였으며 정상적인 활성화를 보였다 (Fig. 1). 이와같은 triple pulse를 사용하여 실험방법에서

설명한 것과 같이 facilitation 정도를 알아낼 수 있었다. Fig. 1 에 제시한 세포에서의 facilitation 은 1.66 이었다.

PDBu 에 의한 막전압 의존성 칼슘전류 증가 (Voltage dependent enhancement of Ca²⁺ current by PDBu)

5 mM Ba²⁺을 charge carrier로 하여 -80 mV부터 80 mV 까지의 자극을 -80 mV 의 holding potential 에 10 ms 동안 인가하여 칼슘전류를 기록하였다. Fig. 2A, 2B 는 각각 Protein Kinase C agonist로 알려진 PDBu 처치 (500 nM) 전 (Control) 과 PDBu 를 처치한 후 5 mV 간격으로 -20 mV로부터

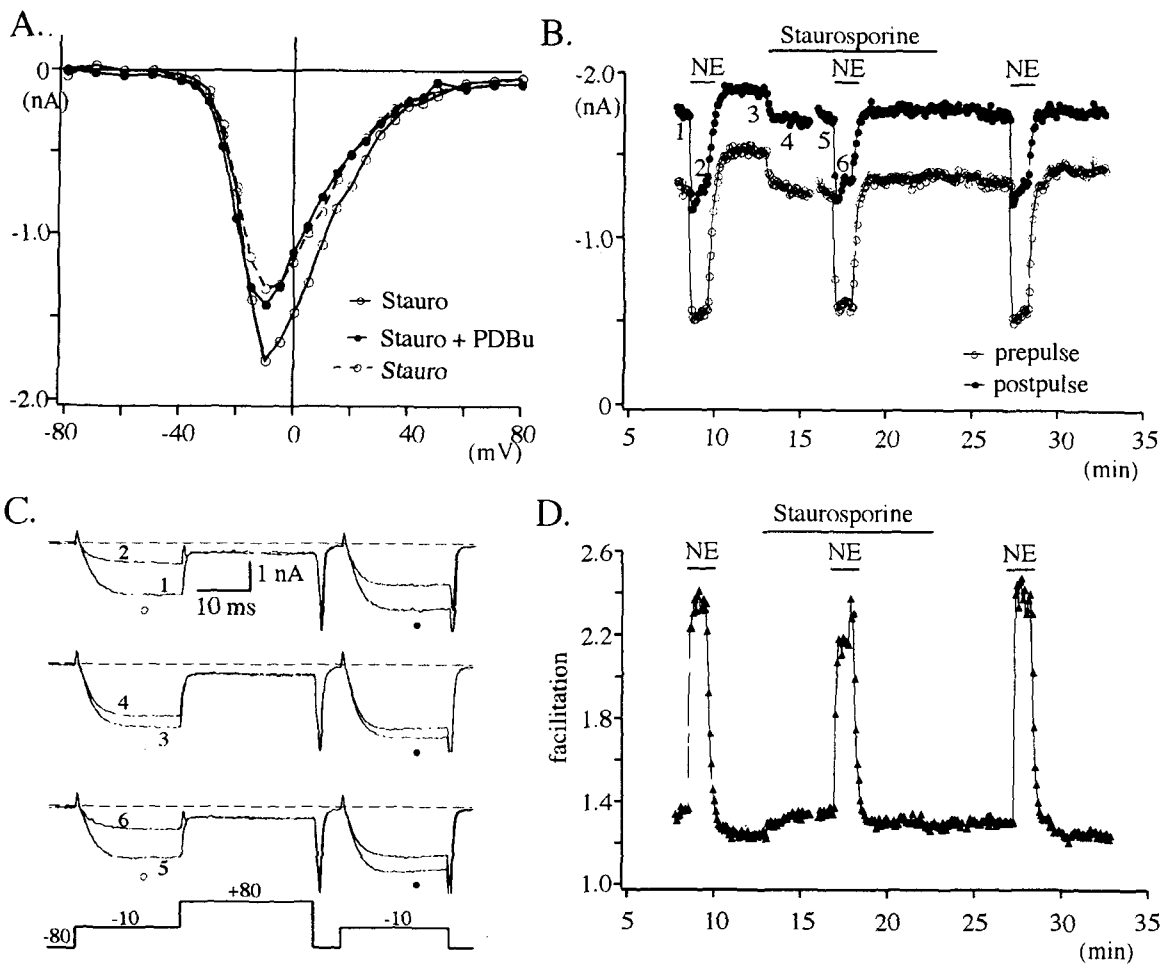


Fig. 4. Staurosporine inhibits PDBu effect on Ca^{2+} channel current

A. Current-voltage relationship of Ca^{2+} currents before (○) and after (●) PDBu (500 nM) application and after PDBu wash out (○, dashed line) in the presence of staurosporine (1 μ M) both in bath and internal solution. The current amplitudes were determined isochronally as the mean of 9.3 - 9.9 ms after each test pulse and plotted as a function of test potentials. B. Time course of Ca^{2+} current amplitudes (○: prepulse current; ●: postpulse current) using the protocol of C (bottom) delivered every 5 sec. The peak amplitudes of Ca^{2+} currents were determined isochronally 7.5 ms after the step pulse to -10 mV from holding potential of -80 mV. C. Superimposed current traces selected at the times indicated in B. Before (label 1) and after (label 2) NE (10 μ M) application, before (label 3) and after (label 4) staurosporine (1 μ M) application and before (label 5) and after (label 6) NE application in the presence of staurosporine. The dashed line shows zero current level. D. Time course of facilitation amplitudes calculated by the ratio of prepulse current (○) and postpulse current (●) in B. Bars in B and D: times when 10 μ M norepinephrine(NE), 1 μ M staurosporine were added.

-10 mV 까지 (top trace), -5 mV 로부터 20 mV 까지의 자극을 인가하며 기록한 칼슘전류 기록을 보여주고 있다.

Fig. 2C 에서는 PDBu 처치전과 후의 전류-전압 관계 (current-voltage relationship)를 보여주고 있다.

PDBu 처치로 유발되는 칼슘전류 크기 변화는 막전압 의존적 (voltage dependent)으로 증가하였으며 또한 PDBu 처치로 인하여 tail current decay는 느려졌다. 각 전압에서의 칼슘전류 증가율을 비교해 본 결과 -10 mV ~ 10 mV 사이에서 가장 큰 증가를

보였다 (n=4, Fig. 2D). 그러므로 이후 실험에서는 test pulse를 -10 mV 로 사용하였다. PDBu 효과는 투여 후 10 분 정도 지나야 steady state에 도달하였으며 사용 후 30 - 60 분 정도까지도 그 효과가 남아있었다.

NE 에 의하여 유도된 칼슘전류 억제에 PDBu 가 미치는 영향
(PDBu Effect on NE-induced Inhibition of Ca²⁺ current)

대표적인 실험결과를 Fig. 3 에 제시하였다. PDBu 처치로 인하여 prepulse current 는 control 에 비하여 급격한 증가를 보인 반면 (Fig. 3A, 3C trace 1(control) 과 trace 3(PDBu 투여 후)) postpulse current 는 상대적으로 적은 증가 (Fig. 3B, 3C trace 1(control) 과 trace 3(PDBu 투여 후)) 를 보인 바, 이러한 증가의 차이로 말미암아 basal facilitation amplitude (NE 처치하기전의 facilitation amplitude) 가 1.0 이하로 감소되는 현상이 유발되었다 (Fig. 3D). PDBu 처치후 basal facilitation amplitude 가 원래 수준으로 회복되는 데는 최소한 20 분 정도의 wash out 시간이 소요되는 것으로 관찰된 바 PDBu를 반복 처치할 경우 PDBu 효과로부터 완전히 회복될 때까지 충분히 wash out 해준 후 재처치하는 주의를 기울였다. PDBu 의 NE-induced facilitation에 미치는 효과를 통계처리한 결과 NE 단독 처치 시 facilitation amplitude 는 1.83 ± 0.21 (n=8) 인 반면 PDBu 와 NE 을 함께 처치시는 1.22 ± 0.26 (n=8) 로서 통계적으로 유의한 감소를 보였다 (p<0.001, paired t-test).

Staurosporine 에 의한 PDBu 효과 억제
(Staurosporine inhibits PDBu effect on Ca²⁺ channel current)

비특이적 Protein Kinase 억제제인 staurosporine 1 μM을 세포외용액과 세포내 용액에 전처치한 후 PDBu (500 nM)가 칼슘전류에 미치는 효과를 관찰하였다. PDBu 처치후 칼슘전류는 약간 감소하였다 (Fig. 4A, ○: PDBu 처치 전, ●는 PDBu 처치 후). 그러나 그 감소 정도는 -5 mV에서 20 mV 에 걸

쳐 약 21 ~ 27 % 의 감소를 보여 막전압에 비의존적이었다.

또한 세포내 용액에 GTPγS (300 uM)를 투여하여 NE 에 의한 칼슘전류 억제효과가 충분히 나타나도록 한 상태에서 NE 에 의한 칼슘전류 억제효과를 관찰하였을 때 staurosporine 투여전과 후에 별다른 차이가 없었다 (Fig. 4B, 4D). 단지 주목할 점은 staurosporine 투여로 인하여 칼슘전류가 억제되었다 (Fig. 4C trace 3 과 trace 4 비교).

고 찰

NE 에 의한 G-protein 매개성 칼슘전류 억제
(G-protein mediated Ca²⁺ current inhibition by NE)

본 연구에서 NE (10 uM)은 -10 mV 에서는 칼슘전류를 크게 억제하는 반면 +80 mV 의 강한 저분극 후 인가한 -10 mV 의 자극에 의하여는 칼슘전류에 대한 억제성이 감소하는 막전압의존성을 확인하였다 (Fig. 1). 이는 membrane delimited mechanism¹⁾으로 잘 설명되는 특성이다. 이때 G-protein 의 관여는 세포내 용액에 nonhydrolyzable GTP analogue 인 GTPγS (300 uM)를 투여하여 G-protein을 활성화한 경우는 NE에 의한 칼슘전류 억제가 잘 나타나는 반면 세포내 용액에 nonhydrolyzable GDP analogue 인 GDPβS (2 mM)을 투여하여 G-protein을 비활성화한 경우는 NE에 의한 칼슘전류 억제가 소실되는 것으로 확인하였다 (data not shown). 또한 이때 관여하는 G-protein 의 종류를 알아보기 위하여 pertussis toxin을 16 시간 동안 전처치하였을 때 NE 의 칼슘전류 억제효과가 소실되는 것으로 보아 pertussis toxin sensitive G-protein임을 확인하였다(data not shown). 이는 다른 연구자들에 의하여 보고^{2) 4)}된 결과와 잘 부합한다.

PDBu 의 막전압의존성 효과
(Voltage dependent effects of PDBu)

본 실험결과를 통하여 PDBu 에 의한 PKC의 활성화는 칼슘전류를 증가시키고 (Fig. 2) 신경전달물질 (NE)에 의하여 유도되는 칼슘전류 억제를 해제한다

(Fig. 3)는 것을 확인하였다. 이는 Schwartz¹⁴⁾가 어린 쥐에서, 그리고 Zhu 등¹⁶⁾이 성숙한 쥐에서 확인한 결과와 잘 부합한다. 또한 PDBu 의 농도와 칼슘전류 크기 증가와의 관계 (dose response curve)를 알아보기 위하여 0.5 nM (n=3), 5 nM (n=5), 50 nM (n=5), 500 nM (n=8), 1 μ M (n=3) 을 비교해 본 결과 500 nM PDBu에서 최대 증가효과를 보였으므로 500 nM PDBu를 사용하여 실험을 계속하였다. 본 연구에서는 PDBu 에 의하여 tail current decay가 둔화되는 것이 관찰되었으나 (Fig. 2) tail current 에 미치는 PDBu 효과를 체계적으로 분석하지는 않았다. PDBu의 칼슘통로 deactivation에 미치는 효과를 알아보기로 추후 tail current time constant 분석 및 PDBu 효과의 voltage dependency 를 알아보기로 한다.

PKC 에 의한 칼슘전류 긴장성억제의 해제 (Relief of tonic inhibition of Ca²⁺ current by PKC)

Swartz (1993)¹⁴⁾는 PKC activator 인 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)에 의하여 칼슘전류 크기가 증가하는 것은 PKC 에 의하여 tonic current inhibition 으로부터 벗어나기 때문이라고 하였으며 그 증거로 칼슘전류의 증가와 facilitation 정도가 잘 일치하는 것을 들었다. 이는 PKC activator 로서 PDBu를 사용한 본 연구결과와도 잘 일치하는 소견으로서 PDBu에 의하여 칼슘전류가 증가되었을 뿐만 아니라 tonic inhibition의 척도인 facilitation은 감소하는 것을 관찰하였다.

비특이적 Protein Kinase 억제제인 staurosporine 을 전처리한 후 PDBu 가 칼슘전류에 미치는 효과를 관찰하였을 때 PDBu 처치 후 칼슘전류는 약간 감소하였다 (Fig. 4A, ○: PDBu 처치 전, ●는 PDBu 처치 후). 그러나 그 감소 정도는 -5 mV에서 20 mV 에 걸쳐 두루 약 20 % 의 감소를 보여 막전압에 비의존적임을 알 수 있었다. 또한 PDBu를 씻어준 후 (Fig. 4A, ○ with dashed line) 에도 약간의 칼슘전류의 크기 감소가 관찰되는 것으로 보아 PDBu 처치 후 칼슘전류의 감소는 whole cell patch clamp technique 의 문제점으로 지적되고 있는 칼슘전류 run-down 현상으로 인한 artifact 의 가능성을 시사하고 있다 (Fig. 3C, 3D). 이것이 과연 artifact인 지

여부는 perforated patch clamp technique을 사용하여 본 실험을 반복함으로써 알아보려 한다.

또한 NE에 의한 칼슘전류 억제효과를 관찰하였을 때 staurosporine 투여전과 후에 별 다른 차이가 없었다 (Fig. 4B, 4D). 이는 PKC 억제에 의한 효과라고 설명할 수 있으나 staurosporine 이 비특이적 protein kinase 길항제인 까닭에 PKC 이외에도 다른 protein kinase가 모두 억제되어 나타난 결과로도 해석할 수 있다.

그러나 아직 PKC 이외에 신경전달물질에 의한 칼슘전류 억제기전을 조절한다고 알려진 다른 protein kinase 가 없는 상황이므로 Fig. 4B, 4D의 결과를 주로 PKC 억제에 의한 효과라고 설명해도 무방하리라고 생각된다. 추후 staurosporine 전처리 상태에서 PDBu를 투여하면서 NE에 의한 칼슘전류 억제가 어떻게 변화하는 지 알아보는 실험을 수행함으로써 G-protein 에 의하여 매개되는 tonic inhibition의 완화제로서의 PKC의 역할을 다시 한번 검증해 보려고 한다. staurosporine 투여로 인하여 칼슘전류가 억제되는 것은 쉽게 설명되지 않는 현상으로서 (Fig. 4C trace 3 과 trace 4 비교) 다른 세포에서는 이러한 현상이 관찰되지 않는 것으로 보아 일종의 artifact로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 PKC의 활성화는 G-protein 에 의하여 매개되는 칼슘전류 억제기전을 해제한다는 것을 확인하였다. 추후 PKC에 의하여 인산화되는 부위가 과연 G-protein인 지 칼슘통로인지를 알아보는 연구가 수행되어야 한다.

참고문헌

1. B. Hille: G-protein-coupled mechanisms and nervous signaling: *Neuron*, 9, 187-195 (1992)
2. D. Lipscombe, S. Kongsamut, and R.W.Tsien: α -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium channel gating: *Nature*, 340, 639-642 (1988)
3. M.R. Plummer, A. Rittenhouse, M. Kanevsky, and P. Hess: Neurotransmitter modulation of calcium channels in rat sympathetic neurons:

- J. Neurosci.*, 11, 2339-2348 (1991)
4. G.G. Schofield: Norepinephrine inhibits a Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons via a G-protein: *Eur. J. Pharmacol.*, 207, 195-207 (1991)
 5. E. Wanke, A. Ferroni, A. Malgaroli, A. Ambrosini, T. Pozzan, and J. Meldolesi: Activation of muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4313-4317 (1987)
 6. D.J. Beech, L. Bernheim, A. Mathie. and B. Hille: Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 652-656 (1991)
 7. S.R Ikeda, G.G. Schofield: Somatostatin blocks a calcium current in rat sympathetic ganglion neurones: *J. Physiol.*, 409, 221-240 (1989)
 8. S.R Ikeda: Prostaglandin modulation of Ca^{2+} channels in rat sympathetic neurons is mediated by guanine nucleotide binding proteins: *J. Physiol.*, 458, 339-359 (1992)
 9. Y. Zhu, and S.R. Ikeda: Adenosine modulates voltage-gated Ca^{2+} channels in adult rat sympathetic neurons: *J. Neurophysiol.*, 70, 610-620 (1993)
 10. S. Foucart, D. Bleakman, V.P. Bindokas, and R.J. Miller: Neuropeptide-Y and pancreatic polypeptide reduce calcium currents in acutely dissociated neurons from adult rat superior cervical ganglia: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, 903-909 (1993)
 11. S.G. Rane, M.P. Walsh, J.R McDonald, and K. Dunlap: Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current: *Neuron*, 3, 239-245 (1989)
 12. LM Boland, A.C. Allen, and R. Dingledine: Inhibition by bradykinin of voltage-activated barium current in a rat dorsal root ganglion cell line: role of protein kinase C: *J. Neurosci.*, 11, 1140-1149 (1991)
 13. J. Yang, and R.W. Tsien: Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons: *Neuron*, 10, 127-136 (1993)
 14. K.J. Swartz: Modulation of Ca^{2+} channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G-protein-mediated inhibition: *Neuron*, 11, 305-320 (1993)
 15. S.R Ikeda, G.G. Schofield, and F.F. Weight: Na^+ and Ca^{2+} currents of acutely isolated adult rat nodose ganglion cells: *J. Neurophysiol.*, 55(3), 527-539 (1986)
 16. Y. Zhu, and S.R. Ikeda: Modulation of Ca^{2+} -channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons: *J. Neurophysiol.*, 72(4), 1549-1560 (1994)

Role of Protein Kinase C on Norepinephrine Induced Inhibition of Calcium Current in Rat Sympathetic Neurons

Yong Sook Goo*, Keith S. Elmslie+

**Department of Physiology, College of Medicine*

Chungbuk National University, Cheongju, 361-763 Korea

+Department of Physiology, Tulane University Medical School

New Orleans, LA 70112

The signal transduction pathway for most neurotransmitter induced inhibition of Ca^{2+} channels in sympathetic neurons involves a G-protein mediated, membrane-delimited mechanism without the participation of any known protein kinase. However, activation of protein kinase C (PKC) has been proposed as one of the intracellular mechanisms mediating some neurotransmitter induced Ca^{2+} channel inhibition. In the present study, we investigated the effects of phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu) on Ca^{2+} channel currents of acutely dispersed neurons from adult rat superior cervical ganglion (SCG) neurons using whole cell variant of the patch clamp technique. PDBu (500 nM), the activator of PKC, increased Ca^{2+} channel currents and retarded the deactivation of tail currents. The effects of PDBu were voltage dependent and the maximal increase in the current amplitudes was observed between -10 to 10 mV (n=4). PDBu attenuated Ca^{2+} current inhibition induced by norepinephrine (NE), which modulates Ca^{2+} channels via a pertussis toxin (PTX)-sensitive pathway. Inhibition of PDBu by staurosporine (1 μ M) blocked the effects of PDBu on current amplitudes and NE-induced G-protein mediated inhibition of Ca^{2+} currents. Further experiment should be done to know if G-protein or Ca^{2+} channel itself is the target of PKC phosphorylation.