

Regulator of G-protein Signaling (RGS) 단백질과 아편 신호 전달

¹연세대학교 의과대학 재활의학교실, ²Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, ³연세대학교 의과대학 마취통증의학교실 및 마취통증의학연구소

김경선^{1,2} · Pamela Pierce Palmer² · 김기준^{2,3}

= Abstract =

RGS Proteins and Opioid Signaling

Kyung Seon Kim^{1,2}, Pamela Pierce Palmer², and Ki Jun Kim^{2,3}

¹Department of Rehabilitation, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, ²Department of Anesthesia and Perioperative Care, University of California, San Francisco, CA 94143, USA, ³Department of Anesthesiology and Pain Medicine, and Anesthesia and Pain Research Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The regulators of the G protein signaling (RGS) proteins are responsible for the rapid acceleration of the GTPase-activity intrinsic to the heterotrimeric G protein alpha subunits. As GTPase-activating proteins (GAP), the RGS proteins negatively regulate the G-protein signals. Recently, the RGS proteins are known to be one of the important regulators of opioid signal transduction and the development of tolerance. The aim of this study was to review the recent discovery and understanding of the role of RGS proteins in opioid signaling and the development of tolerance. This information will be useful for medical personnel, particularly those involved in anesthesia and pain medicine, by helping them improve the effective use of opioids and develop new drugs that can prevent opioid tolerance. (Korean J Pain 2006; 19: 8-16)

Key Words: opioid, regulators of G protein signaling (RGS) protein, tolerance.

서 론

아편계 약물들은 다른 부수적인 효과와 함께 강력한 진통 작용을 갖고 있다. 이런 아편계 약물의 반복적인 사용은 진통 효과에 대한 내성(tolerance)을 보이며, 약물에 대한 육체적 의존성(physical dependence)을 나타나게 한다.

수 십 년 동안 아편계 약물 분야의 연구에 다양한 발전이 있었다. 그 동안의 연구 결과, 내인성 아편계 펩타이드,¹⁾ 다양한 아편계 약물 수용체²⁾ 및 아편계 약물 유사 수용체³⁾ 등이 밝혀졌으며, 아편계 약물의 작용 및 내성에 대한 분자생물학적 기전의 연구에도 상당한 진전이 있었다.⁴⁾

아편계 약물은 G 단백질 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR)의 일종인, 고유의 수용체(μ , δ , κ)를 통한 신호 전달 기전을 통해 그 작용을 나타낸다. 신경 세포에서 수용체가 자극되면, G 단백질 결합체가 활성화되어 G α -GTP와 G $\beta\gamma$ 결합체로 나누어진다. G α -GTP는 adenylyl cyclase의 작용을 억제하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 형성을 저하

시킨다. G $\beta\gamma$ 결합체는 G protein-activated inwardly rectifying potassium channel (GIRK)을 활성화시키고, voltage-dependent calcium channel (VDCC)을 억제시켜, 접합전 과분극(presynaptic hyperpolarization)을 초래하며, 흥분성 통증 전달 물질 유리를 억제하여 결과적으로 통증 억제 작용을 나타낸다(Fig. 1).⁵⁾

아편 내성의 기전은 더욱 복잡한데, 정리하면 다음과 같다.⁶⁻⁸⁾ 첫째, 아편수용체의 탈감작화(desensitization); 세포막의 아편 수용체 숫자의 감소(down-regulation), 아편 수용체의 내재화(internalization), 아편 수용체와 G 단백질의 짝풀림(uncoupling). 둘째, cAMP 회로의 상향조정(upregulation); adenylyl cyclase의 초감작(supersensitization), 흥분성 G 단백질(Gs)과 아편 수용체와의 짝지움(coupling). 셋째, 여러 가지 protein kinase들의 활성 변화; cAMP-dependent protein kinase (PKA), protein kinase C (PKC), Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases (CaMK), G protein-coupled receptor kinases (GPRK), mitogen-activated protein kinases (MAPK). 넷째, 아편 수용체와 다른 흥분성 수용체와의 상호 작용; NMDA receptor.

아편계 약물의 작용과 내성에 대한 분자생물학적인 기전

접수일: 2006년 3월 15일, 승인일: 2006년 5월 8일

책임저자: 김기준, (120-752) 서울시 서대문구 신촌동 134번지, 연세대학교 의과대학 마취통증의학교실

Tel: 02-2227-3841, Fax: 02-312-7185, E-mail: kkj6063@yumc.yonsei.ac.kr

Received March 15, 2006, Accepted May 8, 2006

Correspondence to: Ki Jun Kim, Department of Anesthesia and Pain Research Institute, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong,

Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. Tel: +82-2-2227-3841, Fax: +82-2-312-7185, E-mail: kkj6063@yumc.yonsei.ac.kr

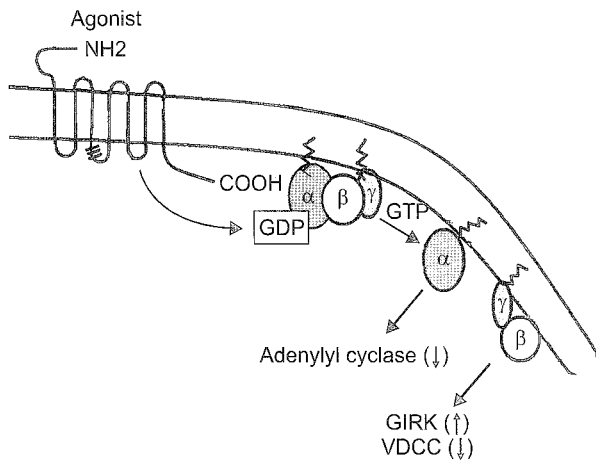


Fig. 1. (A) schematic figure of opioid receptor signaling. Opioid receptors, one of the G protein-coupled receptor (GPCR) types are proteins with seven membrane-spanning regions and are intimately associated at the plasma membrane with hetero-trimetric $G\alpha\beta\gamma$ complex. Agonist binding to opioid receptor induces conformational changes of the receptor which in turn activates G protein. $G\alpha$ subunit, which is a guanosine-5'-diphosphate (GDP)-bound inactive state changes to a guanosine-5'-triphosphate (GTP)-bound active state, and dissociates from $G\beta\gamma$ subunits. Activated $G\alpha$ subunit decreases the activity of adenylyl cyclase, which in turn decreases cyclic-adenosine monophosphate (c-AMP). Dissociated $G\beta\gamma$ subunits activate G protein-coupled inwardly rectifying K^+ (GIRK) channel and inhibit voltage-dependent calcium channel (VDCC). Activation of GIRK channels induces membrane hyperpolarization of the neurons via efflux of K^+ ions and ultimately reduces neural excitability. Because presynaptic calcium ion influx is essential for neurotransmitter release, inhibition of VDCC would inhibit neural transmission of pain.

은 기본적으로 아편 수용체 자극의 결과로 생기는 GPCR을 통한 신호 전달 체계와 밀접한 관련이 있다. 최근에 GPCR 신호를 조절하는 일련의 조절 단백질들이 발견되었는데, 이들은 regulators of G protein signaling (RGS) 단백질이라 하며, 아편계 약물의 작용과 내성 발현에 중요한 역할을 한다. 이에 저자들은 RGS 단백질의 종류 및 구조, 아편 수용체 신호 전달 과정에서의 역할 등에 대하여 문헌 고찰과 함께 조망해보고자 한다.

GPCR을 통한 신호 전달 체계의 개요

현재까지 약 100 가지 이상의 GPCR이 알려져 있는데, 대표적으로 acetylcholine-muscarinic (M1, M2, M3, M4, M5), glutamate (mGluR1-7), GABA_B, serotonin (5-HT₁, 2), dopamine (D1, D_{2a}, D_{2b}, D3, D4, D5), norepinephrine (α 1, α 2, β 1, β 2, β 3), opioid (μ , δ , κ), cannabinoid, thyroid release hormone 등의 호르몬 수용체 등이 있다.

GPCR은 7개의 transmembrane 고리로 구성되어 있으며, hetero-trimetric $G\alpha\beta\gamma$ 단백질 결합체와 밀접하게 결합되어 있다. GPCR에 효현체가 결합되면, $G\alpha$ 단백질이 활성화

되고 $G\alpha$ 단백질에 결합되어 있는 guanosine-5'-diphosphate (GDP)가 인산화되어 guanosine-5'-triphosphate (GTP)로 바뀐다. 이와 동시에 $G\alpha$ -GTP와 $G\beta\gamma$ 결합체로 해리가 되고, 이들이 여러 가지 작용들을 일으키게 된다.⁹⁾

G 단백질은 α , β , γ 세 가지 소단위(subunit)로 구성되어 있으며(hetero-trimetric complex), 적어도 16가지의 α , 5가지의 β , 12가지의 γ 소단위들이 알려져 있다. $G\alpha$ 단백질은 크게 G_s , G_i , G_q , G_{12} 등의 4가지 아군(subtype)으로 나뉜다. 이러한 서로 다른 G 단백질 아군들은 adenylyl cyclase, phospholipase, 여러 가지 효소 및 이온 통로 등에서 서로 다른 작용을 나타낸다.¹⁰⁾

활성화되었던 $G\alpha$ -GTP는 내재하고 있는 GTPase에 의해 가수분해(hydrolysis) 되면서 다시 $G\alpha\beta\gamma$ 결합체로 돌아간다. RGS 단백질은 이 과정을 10배 이상 빠르게 하는 GTPase activating protein (GAP) 역할을 한다.⁹⁾

RGS 단백질의 구조와 종류

RGS 단백질은 효모뿐만 아니라 사람에 이르기까지 많은 종류의 동물에서 발견되었는데, 사람에서만 30종류 이상의 RGS 및 RGS 유사 단백질이 알려져 있다. RGS 단백질 군(family)에 속하는 모든 단백질은 특징적으로 RGS domain이라 불리는 120 여 개의 아미노산 core 지역을 가지고 있는데, 이는 GAP 역할에 반드시 필요한 요소이다.¹¹⁾ RGS 단백질 군은 RGS domain과 이와 동반되는 다른 아미노산들의 배열 및 공통되는 domain 등을 기초로 몇 개의 아군으로 나눌 수 있다(Fig. 2).¹²⁾

A/RZ 아군에는 대표적으로 RGSZ1 (RGS20), RGSZ2 (RGS17), GAIP (G protein alpha subunit interacting protein, RGS19) 등이 있으며, 210에서 239개 정도의 아미노산을 가지고 있다. 특징적으로 N 말단 쪽에 cysteine string을 가지는데, 이것은 membrane targeting을 도와주는 역할을 한다.¹³⁾

B/R4 아군에는 RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS5, RGS8, RGS13, RGS16, RGS18 등이 있으며, 대부분 20에서 24 KD 정도의 분자량을 가지나, RGS3는 61 KD의 큰 분자량을 가진다.¹⁴⁾ 특징적으로 N 말단 쪽에 amphipathic helix를 가지고 있는데, 이는 membrane anchoring에 중요한 역할을 한다.

C/R7 아군에는 RGS6, RGS7, RGS9-1, RGS9-2, RGS11 등이 있는데, RGS9-2의 분자량은 77 KD이며, 나머지는 50 KD 정도이다. 특징적으로 $G\beta\gamma$ 단백질과 결합하는 G-protein gamma like domain (GGL)과 membrane 부착과 관련이 있는 disheveled Egl-10 pleckstrin (DEP) domain 그리고 R7 homology (R7H) domain을 가지고 있다.¹⁵⁾

D/R12 아군에는 RGS10, RGS12, RGS14 등이 있다. RGS10은 173개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로, 기능적으로는 B/R4 아군과 비슷하다. RGS12는 95 KD의 단백질로 rab binding domain (RBD)과 C 말단의 GoLoco domain, N 말단의

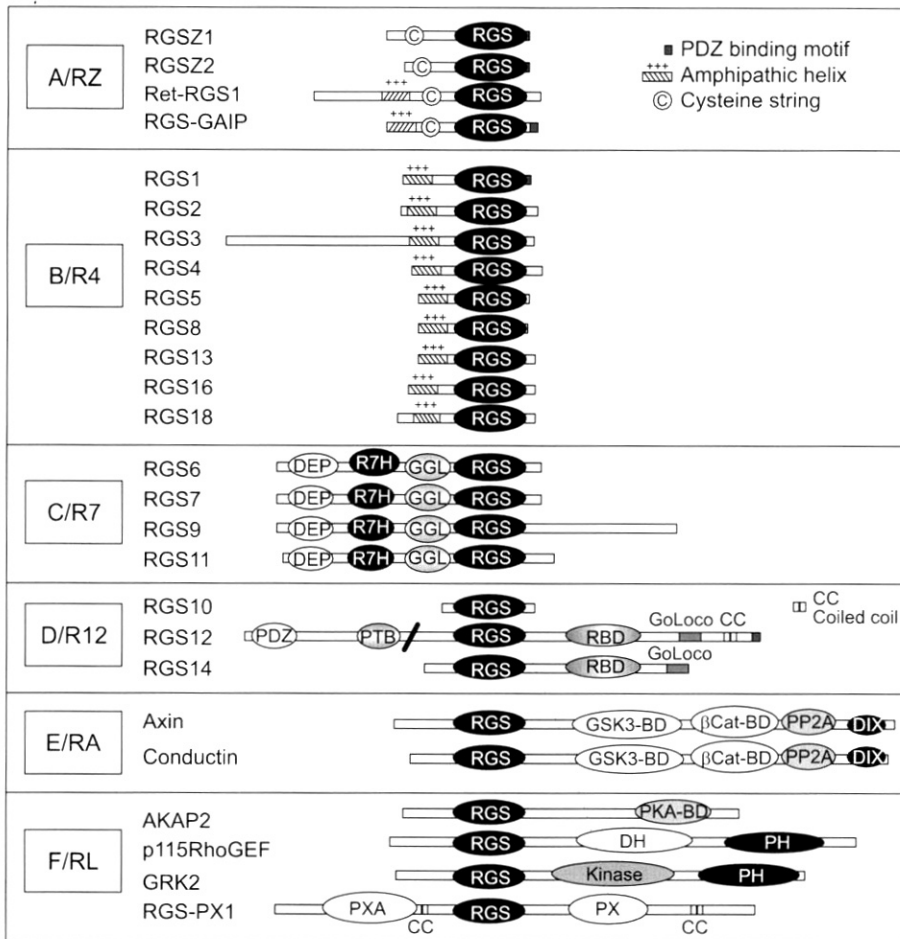


Fig. 2. Structures and classification of mammalian RGS (regulators of G protein signaling) proteins. RGS proteins are classified into subfamilies based on alignment of RGS domain amino acid sequences. Proteins are oriented with their N terminal on the left and their C terminal on the right. β Cat-BD: β catenin binding domain, DEP: disheveled Egl-10 pleckstrin domain, DH: dbl homology domain, DIX: dimerization domain, GGL: G-protein gamma like domain, GSK3-BD: Glycogen synthetase kinase 3 β -binding domain, Kinase: Ser/Thr kinase catalytic domain, PDZ: PSD-95 (a mammalian postsynaptic density protein), Dlg (Drosophila disc-large protein), ZO-1 (a mammalian tight junction protein), PH: pleckstrin homology domain, PKA-BD: protein kinase A binding domain, PP2A: protein phosphatase 2A, PTB: phosphotyrosine-binding domain, PX: Phox homology domain, PXA: Phox-associated domain, R7H: R7 homology domain, RBD: rab binding domain, RGS: regulators of G protein signaling. Modified with permission from John R. Hepler (reference 12).

phosphotyrosine-binding (PTB) domain 및 PDZ (PSD-95 [a mammalian postsynaptic density protein], Dlg [Drosophila disc-large protein], ZO-1 [a mammalian tight junction protein]) domain을 가지고 있다. RGS14는 짧은 N 말단과, RBD와 GoLoco domain을 가진 비교적 긴 C 말단을 가지고 있다. GoLoco domain은 GDP-bound *Gai/o*에 결합하여, GDP 해리와 $G\beta\gamma$ 와의 재결합을 방해한다.¹²⁾

그 외, Axin, Conductin 등의 E/RA 아군, AKAP2, p115Rho GEF, GRK2, RGS-PX1 등의 F/RL 아군 등이 있다.

RGS 단백질의 역할

RGS 단백질은 기본적으로 G 단백질을 매개로 하는 신호 전달 체계에서 신호를 turnoff하는 GAP 역할을 한다(Fig. 3).⁹⁾ 그 밖에도 $G\alpha$ 단백질에 대한 직접적인 길항 작용,¹⁶⁾ $G\beta5$ 와 결합,¹⁷⁾ scaffold Wnt signaling 단백질로서의 기능,¹⁸⁾ PKA와 GPRK 효과 증대, 수용체-G 단백질의 짝지움의 증가 등의¹⁹⁾ 기능에 대해서도 알려져 있다. 대부분의 RGS 단백질들은 신호 전달 과정을 차단하는 방해 조절자(negative regulator)

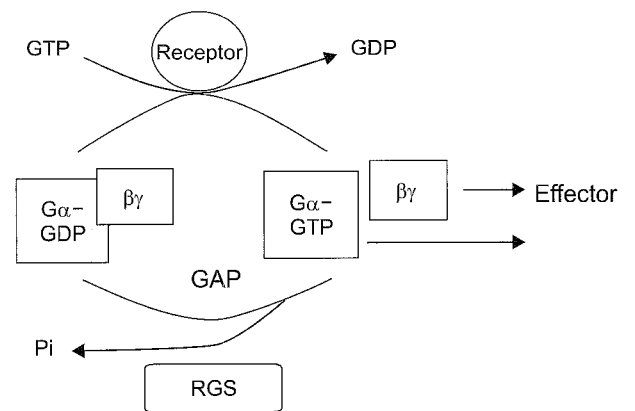


Fig. 3. Regulators of G protein signaling (RGS) proteins act as GTPase-activating proteins (GAP). Agonist binding to a receptor promotes guanine nucleotide exchange. $G\alpha$ releases guanosine-5'-diphosphate (GDP), binds guanosine-5'-triphosphate (GTP), and dissociates from $G\beta\gamma$. Dissociated subunits activate target proteins (effectors). When GTP is hydrolyzed, subunits reassociate. RGS proteins bind to $G\alpha$, stimulate GTP hydrolysis, and thereby reverse G protein activation.

역할을 하지만, 일부는 신호 전달을 촉진시키는 역할도 한다. 또한 특정한 RGS 단백질은 특정한 GPCR 및 특정한 G 단백질과 선택적인 관계를 가지며, 따라서 RGS 단백질의 종류 및 그 아군(subtype)에 따라 다른 효과를 나타내게 된다. 이러한 효과는 특정한 세포 및 조직에 따라서도 선택적이다.²⁰⁾

아편계 약물의 작용과 내성 기전에 중요한 조절자로서의 RGS 단백질

최근까지의 연구 결과들을 분석해보면, A/RZ, B/R4, C/R7 아군의 RGS 단백질들이 아편 수용체 신호 전달과 밀접한 관련이 있다. 이들은 G 단백질을 비활성화시켜 아편 수용체 신호를 차단할 뿐만 아니라, 어떤 RGS 단백질은 아편 수용체의 탈감작(desensitization), internalization, 재순환(recycling) 및 퇴행(degradation)에도 영향을 미친다.

A/RZ 아군

NG-108 cells을 이용한 실험에서, Hepler 등은¹⁶⁾ GAIP는 GAP 활성을 증가시키고, 또한 Gq α 에 의한 phospholipase C β (PLC β) 활성을 억제함을 보고하였다. 이는 GAIP가 GAP 기능뿐만 아니라, G α 단백질에 대한 직접적인 길항 작용이 있음을 보여준다. GAIP는 여러 가지 기전으로 아편 수용체의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 즉, Gi α 단백질의 GTPase 활성을 증가시킬 뿐만 아니라, 아편 수용체의 내재화와 clathrin-coated vesicle을 통한 재순환을 증가시킨다.²¹⁾ 아편 수용체의 내재화와 재순환은 아편 신호전달의 조절 및 내성 발현에 또 다른 중요한 요소임으로,⁴⁾ GAIP는

아편 신호 조절에 매우 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다. Antisense ODN (oligodeoxynucleotides)을 이용하여 GAIP와 RGSZ1의 발현을 억제시킨 실험에서, μ 수용체에 대한 효현제의 효과는 증대되었으나, δ 수용체에 대한 효현제의 효과에는 변화가 없었다.²²⁾ 동일한 방법으로 RGSZ2의 발현을 억제시킨 경우에도, μ 수용체에 대한 효현제의 효과는 증대되었으나, δ 수용체에 대한 효현제의 효과에는 변화가 없었다. 또한 면역침전(immunoprecipitation) 실험에서, 마우스의 수도관 주위 회백질(periaqueductal gray matter, PAG)에 RGSZ1 및 RGSZ2가 μ 수용체와 같이 동시에 발현되는(co-precipitation) 것을 보면,²³⁾ RGSZ1과 RGSZ2는 μ 수용체와 연관된 아편 신호 전달에 매우 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. RGSZ1과 RGSZ2는 G α GTP 결합체를 선택적으로 비활성화시켰으며, 이들의 발현을 억제시킨 경우, 처음 주사한 모르핀의 진통 효과가 증가되었으나, 급속 내성의 발현도 증가되었다.²⁴⁾ 마우스의 PAG막을 이용한 면역침전 실험에 의하면, μ 수용체는 특정 RGS 단백질(RGS4, RGS9-2, RGS14, RGSZ1, RGSZ2)과 특정 G 단백질(Gi/o/z/q)과 동시에 발현되는데, 모르핀 투여 24시간 이후에 RGSZ1과 RGSZ2의 발현이 현저히 증가되는 것을 볼 수 있다.²⁵⁾ 이는 μ 수용체가 RGSZ1 및 RGSZ2와 매우 선택적이며, 역동적인 결합 관계가 있음을 보여준다(Table 1).

B/R4 아군

마우스의 μ 수용체를 표현시킨 *Xenopus laevis* dermal melanophore를 이용한 실험에서,²⁶⁾ 과발현된(over-expression) RGS2는 모르핀으로 야기되는 pigment 결집을 감소시켰으며, 모르핀 농도-반응 곡선을 우측으로 편향시켰다. Hepler 등은¹⁶⁾ δ 수용체가 많은 NG-108 세포들을 이용한 실험에서, δ 수용체

Table 1. Summary of the Role of RGS A/RZ Subfamily in Opioid Signaling

RGS	Experimental model and methods	Results	Ref
GAIP	NG-108 cell (DORs predominant), measure GAP and PLC β activities etc.	Increase GAP and block PLC β activation by guanosine 5'-(3-O-thio) triphosphate Gq α .	16
GAIP	Human embryonic kidney 293 cells, immunofluorescence labeling & deconvolution analysis	Accelerates GTPase activity of Gi α , facilitates DOR internalization and recycle via clathrin-coated vesicles.	21
GAIP, RGSZ1	Mice, antisense ODN, ISH	Blocking GAIP or RGSZ1 increases effect of morphine and DAMAGO.	22
RGSZ1, RGSZ2	Mice, antisense ODN, ISH	Blocking RGSZ2 increases agonist effect of morphine and DAMAGO. RGSZ1 & Z2 co-precipitates with μ -opioid receptors in PAG.	23
RGSZ1, RGSZ2	Mice, antisense ODN, ISH	RGSZ1 and Z2 selectively deactivate G α GTP subunits, their knock-down facilitate the development of acute morphine tolerance.	24
RGSZ1, RGSZ2	Mice, PAG membrane, ISH	Association of RGSZ1 or Z2 with mu receptor increase 24 h after the administration of morphine.	25

DAMAGO: [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-oI⁵]-enkephalin, DOR: delta-opioid receptor, ISH: *in situ* hybridization, ODN: oligodeoxynucleotides, PAG: periaqueductal gray matter, PLC: phospholipase C.

효현제인 [Leu]enkephalin으로 야기된 cAMP 합성을 RGS4가 억제시킨다는 사실을 처음으로 보고했다. 또한 RGS4는 GAP 활성을 증가시키고, 또한 Gq α 에 의한 PLC β 활성을 억제함을 밝혀냈으며 그들은 RGS4가 GAP 기능뿐만 아니라, G α 단백질에 대한 직접적인 길항 작용이 있다고 주장했다. RGS4는 δ 수용체뿐만 아니라 μ 및 κ 수용체와도 연관이 있다. μ 수용체를 발현시킨 human embryonic kidney 293 세포를 이용한 실험에서, 과발현된 RGS4는 모르핀 또는 DAMAGO로 유도된 adenylyl cyclase 활성 억제를 의의있게 감소시켰다.²⁷⁾ RGS4는 GIRK를 비활성화시켜, μ 수용체 매개 신호 전달을 차단한다는 보고가 있으며,²⁸⁾ Ulens 등은²⁹⁾ Xenopus oocytes에 RGS4와 GIRK1/GIRK2를 동시 발현시키면, basal K⁺ current가 감소되고, κ 수용체 효현제인 U69593에 의해 유도된 GIRK 통로 활성의 비활성화를 증가시킴을 보고했다. Nakagawa 등은³⁰⁾ μ 또는 κ 수용체가 발현된 PC12 세포들에 이들 수용체에 대한 효현제(모르핀, U69593)를 투여한 결과, RGS4 mRNA가 증가되며(upregulation), 길항제를 투여 시에 이런 현상이 차단되는 것을 보고했다. 이것은 RGS4가 아편 수용체의 탈감작과 밀접한 관계가 있음을 의미한다. 쥐의 뇌를 이용한 *in situ* hybridization histochemistry 실험에서, 모르핀을 1회 복강 내로 주사(10 mg/kg)한 경우에는, locus coeruleus (LC)와 reticulotegmental pontine nucleus (RtTg)에서 RGS4

mRNA가 감소하였고, nucleus accumbens (NAc)에서는 증가하였다. 2주 동안 모르핀을 주사한 경우에는, CGD와 LC에서 RGS4 mRNA가 증가하였고, RtTg와 red nucleus에서는 감소하였다.³¹⁾ 그러나 마우스 전뇌를 이용한 Narita 등의³²⁾ 실험에서는 limbic forebrain의 RGS4는 변화가 없었다. 이는 아편 내성이 뇌의 특정 영역에서의 RGS 단백질의 변화와 관계가 있음을 시사한다.

Gold 등은³³⁾ 모르핀 장기 투여에 따른 쥐의 LC에서의 RGS 단백질 변화 및 조절에 대하여 다양한 연구를 시행하였다. 5일 동안 지속적으로 모르핀을 피하 주사(모르핀 pellet 75 mg)한 경우, RGS2 mRNA와 RGS4 mRNA의 변화는 없었다. 그러나, 아편 길항제인 naltrexone (100 mg/kg)을 주사하여, 모르핀 금단(withdrawal)을 일으킨 6시간 후에는 RGS2 mRNA와 RGS4 mRNA가 2-3배 증가하였다. 반면에 RGS4 단백질은 다른 양상을 나타냈는데, 모르핀 지속 주사 후, RGS4 단백질은 2배 증가하였으며, 금단 6시간 후에는 대조군 치료 감소하였다. 한편, 정상 RGS4 단백질을 LC 세포에 주입하였는데, 모르핀에 대한 전기생리학적인 반응이 현저히 감소하였다. 따라서, RGS4가 LC에서의 아편 신호 전달 및 내성 발현에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

Garzón 등은³⁴⁾ ODN을 이용하여 다양한 종류의 RGS 단백질 knockout 마우스를 만든 후, 특정 RGS 단백질이 결핍되

Table 2. Summary of the Role of RGS B/R4 Subfamily in Opioid Signaling

RGS	Experimental model and methods	Results	Ref
RGS2	Xenopus laevis dermal melanophore cell line stably expressing mouse MORs	Overexpression of RGS2 reduces morphine induced pigment aggregation and produces a rightward shift in the morphine concentration-response curve.	26
RGS4	NG-108 cell (DORs predominant), Measure GAP, PLC β activities etc.	Increase GAP and block activation of PLC β by guanosine 5'-(3-O-thio) triphosphate Gq α .	16
RGS4	Human embryonic kidney 293 cells stably expressing MORs	Overexpression of RGS4 attenuates morphine and DAMAGO-induced inhibition of adenylyl cyclase.	27
RGS4	Xenopus oocyte, Reconstitution of MOR and GIRK	Accelerates GIRK deactivation.	28
RGS4	Xenopus oocyte, co-expression of RGS4 and GIRK1/GIRK2	Reduces basal K ⁺ current, accelerates deactivation of GIRK activated by KOR agonist.	29
RGS4	PC12 cells (MOR or KOR) Northern blotting	MOR or KOR agonists up-regulate RGS4mRNA transcription.	30
RGS4	Rat brain, ISH	Acute and chronic morphine differentially modulate RGS4 mRNA transcription.	31
RGS4	Mouse brain, ISH, Western blotting	Lack of change in RGS4 level in the limbic forebrain obtained from morphine-sensitized mice.	32
RGS2, RGS4	Rat brain slices, Western blotting ISH, electrophysiological recording	Morphine withdrawal increases RGS2-, RGS4-mRNA transcriptions, Intracellular application of wild type RGS4 into LC neurons diminish electrophysiological response to morphine.	33
RGS2, RGS3, RGS4, RGS16	Mice, antisense ODN	Impairment of RGS4 and RGS16 increases in the amplitude and duration of opioid-evoked antinociception, whereas knock down of RGS2 an RGS3 diminishes these parameters.	34
RGS8	Yeast, Voltage clamp	Acute desensitization of GIRK can be observed in the presence of RGS8.	35

DAMAGO: [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]-enkephalin, DOR: delta-opioid receptor, GIRK: G protein-activated inwardly rectifying potassium channel, ISH: *in situ* hybridization, KOR: κ opioid receptor, LC: locus coeruleus, MOR: μ opioid receptor, ODN: oligodeoxynucleotides, PLC: phospholipase C.

있을 때의 아편계약물의 진통 효과를 비교하였다. RGS4 및 RGS16이 결핍되었을 경우, 모르핀 및 β -endorphin의 진통 효과가 증가하였고, RGS2 및 RGS3가 결핍되었을 경우, 도리어 감소되었다. 위에서 전술한 RGS2에 대한 Potenza 등의²⁶⁾ 연구와 비교해 보면, 상반된 결과를 보여주지만, 실험 동물 및 방법 등이 다르기 때문에 RGS2에 대해서는 보다 많은 추가 연구가 필요할 것이다. RGS8은 GIRK의 turn-on과 turn-off를 촉진시키며, GIRK의 급성 탈감작을 일으키는 것으로 알려져 있다(Table 2).²⁵⁾

C/R7 아군

포유류 중추신경계에서, RGS C/R7 아군들은 핵 내에서도 일부 발견되지만, 주로 세포막에서 발견된다.^{9,36-39)} 이 아군의 단백질들은 다른 아군의 단백질들과는 다르게, 조직 내에서 항상 $G\beta 5$ 단백질과 같이 동시에 발견되는데, 이 $G\beta 5$ 단백질은 GGL domain과 결합하고, 이러한 결합은 GAP 작용에 필수적이다.^{17,40)}

RGS9-2 단백질은, 주로 망막에 분포하여 시신경 신호 전달에 관여하는 RGS9-1 단백질보다 C 말단에 191개의 아미노산이 더 많다. RGS9-2 단백질은 줄무늬체(striatum) 및 후결절(olfactory tubercle), 척수 회백질 및 후근 신경절(dorsal root ganglia, DRG) 등에 많이 분포되어 있으며, 이러한 발현 양상은 쥐의 나이에 따라 변하는 것으로 알려져 있다.⁴¹⁾ Garzón 등은³⁴⁾ 마우스의 줄무늬체뿐만 아니라, 대뇌 피질, PAG 등에서도 RGS9-2 mRNA를 발견하였다. 또한 RGS9-2 knockout 마우스에서 모르핀 및 β -endorphin의 진통 효과가 증가하였고, 모르핀 1회 주사 후에 급성 내성이 생기지 않음을 밝혀내었다.

Zachariou 등의⁴²⁾ 실험에서 보다 구체적인 사실들이 발견되었다. 첫째, RGS9-2 단백질이 Garzón 등이³⁴⁾ 언급한 부위뿐만 아니라, NAc 및 아편 신호와 관련된 척수 회백질의 표층에도 분포하고 있다. 둘째, 일회 피하 모르핀 주사(15 mg/kg, 급성 모르핀 주사) 2시간 후에, RGS9-2가 NAc와 척수에 50%까지 증가하였으나, 4일 간 주사(만성 모르핀 주사) 후에는 도리어 50% 정도 감소하였다. 셋째, RGS9-2 knockout 마우스는 급성 및 만성 모르핀 주사에 따른 행동 반응의 증가, 내성 발현의 지연 및 모르핀 진통 작용의 증가, 모르핀에 대한 육체적 의존성과 회피 반응의 증가 등을 보였다. 이러한 사실들은 RGS9-2 단백질이 아편 신호 전달에 강력한 negative 조절자 역할을 하며, 모르핀 투여에 따른 RGS9-2 단백질 발현의 변화는 행동 및 신경 가소성(plasticity)에 중요한 요소임을 의미한다.

한편, Sánchez-Blázquez 등은⁴⁰⁾ GGL domain에 결합하는 $G\beta 5$ 단백질에 대하여 중요한 연구를 하였다. $G\beta 5$ 단백질은 중추 신경계의 시상(thalamus), 시상하부(hypothalamus), PAG, striatum, 간뇌(pons) 및 연수(medulla), 대뇌피질 및 척수 등에 분포한

다. Antisense ODN으로 RGS9-2 또는 $G\beta 5$ 단백질 발현을 억제한 경우, μ 아편 수용체 효현제인 모르핀이나 DAMAGO의 진통 작용을 증가시켰으며, 급성 내성은 생기지 않았다. 반면, $G\beta 5$ 단백질 발현을 억제한 경우, 만성 내성의 발현은 촉진되었다. 또 이어진 연구에서,²⁴⁾ RGS9-2 단백질은 모르핀에 대한 급성 내성을 일으키는 중요한 요소이며, 이것은 RGS9-2 단백질이 수용체에 대한 $G\beta 5$ 단백질의 이용도(availability)를 감소시키기 때문에 나타남을 밝혀내었다. 이는 RGS9-2 단백질이 수용체 후(post-receptor) 반응을 감소시킴으로써, μ 아편 수용체의 탈감작화를 초래한다는 의미로 볼 수 있다. Garzón 등은²⁵⁾ 마우스의 PAG 막을 이용한 면역침전 실험에서, RGS9-2 단백질과 μ 수용체의 결합이 모르핀 투여 24시간 후에 30-40% 감소되는 것을 보여줌으로써, 모르핀이 μ 수용체와 RGS9-2 단백질의 선택적인 결합을 변화시킨다고 하였다. Garzón 등의⁴³⁾ 또 다른 in vivo 연구에서는, 모르핀 투여 3시간 후에 μ 아편 수용체와 $G\alpha$ 단백질의 동시 발현이 50% 감소하며, RGS9-2 단백질과 $G\alpha$ 단백질의 결합은 증가함이 밝혀졌다. 또한 모르핀 투여 24시간 후에는, $G\alpha$ 단백질이 RGS9-2와 떨어져서 μ 아편 수용체와 재결합하였다. RGS9-2 knockout 마우스에서는, $G\alpha$ 단백질과 μ 아편 수용체와의 결합을 변화시키는 모르핀의 작용이 억제되었고, 내성이 생기지 않았다. 따라서, 모르핀 투여 후에 생기는 내성은 모르핀에 의해 활성화된 $G\alpha$ 단백질이 RGS9-2 단백질에 의해 그 상태로 안정화되어 유지되기 때문에 생긴다고 볼 수 있다.

마우스 hippocampal neuroblastoma 세포(μ 아편 수용체를 발현시킴)를 이용한 실험에서, antisense ODN을 이용하여 RGS9-2를 차단하면, cAMP 활성 감소 등의 모르핀 효과가 사라졌다.⁴⁴⁾

그의 RGS6, RGS7, RGS11 단백질들도 아편 신호 전달과 관계가 있음이 밝혀졌다. 1회 모르핀 주사(ED₈₀ analgesicdose, i.c.v.) 시 대조군 마우스에서는 급성 내성이 발현되었으나, RGS6, RGS7, RGS9-2, RGS11 knockout 마우스에서는 내성이 생기지 않았다.⁴⁵⁾ Immunoblotting 실험에서, 뇌실 내 모르핀 일회 주사(10 nmol) 2시간 후에, RGS7mRNA는 striatum에서 증가하였으나, RGS11mRNA는 대뇌피질에서 감소하였다. RGS9-2 mRNA는 striatum과 시상에서는 증가하였으나, 대뇌피질에서는 감소하였다. $G\beta 5$ mRNA는 변화가 없었다. 지속적인 모르핀 투여 2일 후에는 RGS7-, RGS9-2-, RGS11-, $G\beta 5$ mRNA 등이 실험한 조직 대부분에서(striatum, 시상, PAG, 대뇌피질) 증가하였다. 특히, RGS9-2 mRNA는 시상에서는 500% 이상, PAG에서는 200% 이상 증가하였다(Table 3).⁴⁶⁾

최근의 논문에서 Garzón 등은⁴⁷⁾ RGS Rz 및 R4 아군은 GAP 의존적으로, RGS R7 아군은 GAP 비의존적 기전으로 μ 아편 수용체의 활성을 조절한다고 주장하였다.

Table 3. Summary of the Role of RGS C/R7 Subfamily in Opioid Signaling

RGS	Experimental model and methods	Results	Ref
RGS9-2	Rats, Immunohistochemistry	RGS9-2 is enriched in striatum, olfactory tubercle, spinal cord, and dorsal root ganglia. RGS9 is differentially expressed with age.	41
RGS9-2	Mice, antisense ODN	Impairment of RGS9-2 increases opioid-evoked antinociception. RGS9-2 knockout do not exhibit tachyphylaxis after a single dose of the morphine.	34
RGS9-2	Mice, Immunohistochemistry, <i>in situ</i> hybridization RGS9 knockout mice	Acute morphine increases expression of RGS9-2 in NAc and spinal cord, whereas chronic exposure decreases RGS9-2 level. Mice lacking RGS9 show enhanced behavioral responses to acute and chronic morphine.	42
RGS9-2	Mice, antisense ODN	Knockout of RGS9-2 and G β 5 enhance antinociception promoted by morphine and DAMAGO. Single morphine injection does not promote tolerance in RGS9-2 and G β 5 knockout animals.	40
RGS9-2	Mice, antisense ODN	Inhibiting RGS9-2, which bind to G α oGTP and G α iGTP but only weakly deactivates them, preserves the effects of consecutive morphine doses and abolishes the generation of acute tolerance.	24
RGS9-2	Mice, PAG membrane	The association of RGS9-2 with MORs diminishes by 30–40% 24 h after administration of morphine	25
RGS9-2	Mice, PAG membrane	The <i>in vivo</i> knockout of RGS9-2 expression prevents morphine from altering the association between MORs and G-proteins, and tolerance does not develop.	43
RGS9-2	HN9.10 cells (mouse hippocampal neuroblastoma cell line)	Knockout of RGS9 inhibits chronic morphine effects on upregulation of Adenylyl cyclase and on abolishing DAMAGO-induced GTP γ S high affinity binding.	44
RGS6, RGS7, RGS9-2 RGS11	Mice, antisense ODN	A single morphine injection does not promote tolerance in RGS6, RGS7, RGS9-2, or RGS11 knockout mice.	45
RGS6, RGS7, RGS9-2 RGS11	Mice, RT-PCR, Immunoblotting	Acute and chronic morphine tolerance differentially regulate the expression of R7 subfamily RGSs in different brain regions.	46

DAMAGO: {D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]-enkephalin, DOR: delta-opioid receptor, MOR: μ opioid receptor, ODN: oligodeoxynucleotides, NAc: nucleus accumbens.

D/R12 아군

RGS12, RGS14 knockout 마우스 실험에서 모르핀 및 β -endorphin 진통 효과의 정도와 기간이 증가하였다는 보고가 있으나,³⁴⁾ 이 아군과 모르핀 신호 전달 및 내성에 관한 연구는 거의 없다.

RGS 단백질 연구에 대한 전망

지금까지 GPCR 및 그 신호전달 경로 그리고 중간 조절자 등에 대한 많은 연구들이 있어왔다. 또한, 역사적으로 보면, GPCR 및 G 단백질을 통한 신호 전달 경로에서의 인위적인 조절이나 약물 개발의 목표는 주로 수용체 자체에 관한 것이었고, 그 외 부수적으로 수용체 후 이차 전달자나 말단 효과 차단 등에 초점을 맞추어 왔다.⁴⁸⁾

RGS 단백질에 대한 지금까지의 연구 결과들을 종합하여 보면, RGS 단백질이 GPCR을 통한 아편 신호 전달 및 내성 발현에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 이미 RGS 단백질 관련 약물 개발이 제안되었으며,⁴⁹⁾ RGS 단백질

에 대한 연구를 아편계 약물 효과의 극대화 및 내성 억제 를 위한 약물 개발에 응용할 수 있다. 예를 들어, 아편 수용체와 밀접하게 관련이 있는 특정 RGS 단백질에 대한 억제제(inhibitor)를 개발하여, 이를 아편계 약물과 동시에 투여 하면, 진통 효과는 증대되고, 내성의 발현은 억제시킬 수 있을 것이다. 또한 특정 RGS 단백질 발현을 차단하는 효과가 있는 anti-sense ODN 또는 RNA inhibitor (RNAi)를 개발하여, 통증의 유전자 치료 (gene therapy)에 사용할 수도 있을 것이다.

감사의 글

그림(Fig. 2)의 사용을 허락한 John R Hepler 교수님과 좋은 그림들을 그려준 김종학 군과 김미진 양에게 감사 드립니다.

참고 문헌

1. Beaumont A, Hughes J: Biology of opioid peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1979; 19: 245-67.
2. Goldstein A, Naidu A: Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Mol Pharmacol* 1989;

- 36: 265-72.
3. Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, et al: Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 1994; 347: 284-8.
 4. Kieffer BL, Evans CJ: Opioid tolerance-In search of the holy grail. *Cell* 2002; 108: 587-90.
 5. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, Niki H: Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci Res* 2002; 44: 121-31.
 6. Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE: Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* 1998; 19: 1603-30.
 7. Borgland SL: Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 147-54.
 8. Liu J, Anand KJS: Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001; 38: 1-19.
 9. Burchett SA: In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling. *J Neurochem* 2003; 87: 551-9.
 10. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N: Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252: 802-8.
 11. Popov S, Yu K, Kozasa T, Wilkie TM: The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7216-20.
 12. Hollinger S, Hepler JR: Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 527-59.
 13. De Vries L, Elenko E, Hubler L, Jones TL, Faquhar MG: GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G α i subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15203-08.
 14. Sierra DA, Gilbert DJ, Householder D, Grishin NV, Yu K, Ukidwe P, et al: Evolution of the regulators of G-protein signaling multigene family in mouse and human. *Genomics* 2002; 79: 177-85.
 15. Xie GX, Palmer PP: RGS proteins: new players in the field of opioid signaling and tolerance mechanisms. *Anesth Analg* 2005; 100: 1034-42.
 16. Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T: RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq α and block activation of phospholipase C β by r-thio-GTP-Gq α . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 428-32.
 17. Snow BE, Krumins AM, Brothers GM, Lee SF, Wall MA, Chung S, et al: A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13307-12.
 18. Kikuchi A: Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 255-65.
 19. Zhong H, Neubig RR: Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 837-45.
 20. Ross EM, Wilkie TM: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 795-827.
 21. Elenko E, Fischer T, Niesman I, Harding T, McQuistan T, Von Zastrow M, et al: Spatial regulation of Gi protein signaling in clathrin-coated membrane microdomains containing GAIP. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 11-20.
 22. Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, López-Fando A, García-España A, Sánchez-Blázquez P: RGSZ1 and GAIP regulate μ - but not δ -opioid receptors in mouse CNS: role in tachyphylaxis and acute tolerance. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1091-104.
 23. Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Lopez-Fando A, Sánchez-Blázquez P: The RGSZ2 protein exists in a complex with μ -opioid receptors and regulates the desensitizing capacity of Gz proteins. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 1632-48.
 24. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Montero C, Garzón J: RGS-Rz and RGS9-2 proteins control mu-opioid receptor desensitization in CNS: the role of activated G α z subunits. *Neuropharmacology* 2005; 48: 134-50.
 25. Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P: Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology* 2005; 48: 853-68.
 26. Potenza MN, Gold SJ, Roby-Shemkowitz A, Lerner MR, Nestler EJ: Effects of regulators of G protein-signaling proteins on the functional response of the μ -opioid receptor in a melanophore-based assay. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 482-91.
 27. Garnier M, Zaratin PF, Ficalora G, Valente M, Fontanella L, Rhee MH, et al: Up-regulation of regulator of G protein signaling 4 expression in a model of neuropathic pain and insensitivity to morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 1299-306.
 28. Ippolito DL, Temkin PA, Rogalski SL, Chavkin C: N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Gi. *J Biol Chem* 2002; 277: 32692-6.
 29. Ulens C, Daenens P, Tytgat J: Changes in GIRK1/GIRK2 deactivation kinetics and basal activity in the presence and absence of RGS4. *Life Sci* 2000; 67: 2305-17.
 30. Nakagawa T, Minami M, Satoh M: Up-regulation of RGS4 mRNA by opioid receptor agonists in PC12 cells expressing cloned μ - or κ -opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 433: 29-36.
 31. Bishop GB, Cullinan WE, Curran E, Gutstein HB: Abused drugs modulate RGS4 mRNA levels in rat brain: comparison between acute drug treatment and a drug challenge after chronic treatment. *Neurobiol Dis* 2002; 10: 334-43.
 32. Narita M, Mizuo K, Shibasaki M, Narita M, Suzuki T: Up-regulation of the Gq/11 α protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience* 2002; 111: 127-32.
 33. Gold SJ, Han MH, Herman AE, Ni YG, Pudiak CM, Aghajanian GK, et al: Regulation of RGS proteins by chronic morphine in rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 971-80.
 34. Garzón J, Rodríguez-Díaz M, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P: RGS9 proteins facilitate acute tolerance to mu-opioid effects. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 801-11.
 35. Saitoh O, Masuho I, Terakawa I, Nomoto S, Asano T, Kubo Y: Regulator of G protein signaling 8 (RGS8) requires its NH2 terminus for subcellular localization and acute desensitization of G protein-gated K $^{+}$ channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 5052-8.
 36. Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ: Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* 1997; 17: 8024-37.
 37. Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG: RGS9: A regulator of G-protein signaling with specific expression in rat and mouse striatum. *J Neurosci Res* 1998; 52: 118-24.

38. Zhang JH, Barr VA, Mo Y, Rojkova AM, Liu S, Simonds WF: Nuclear localization of G protein $\beta 5$ and regulator of G protein signaling 7 in neurons and brain. *J Biol Chem* 2001; 276: 10284-9.
 39. Krumins AM, Barker SA, Huang C, Sunahara RK, Yu K, Wilkie TM, et al: Differentially regulated expression of endogenous RGS4 and RGS7. *J Biol Chem* 2004; 279: 2593-9.
 40. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Díaz M, López-Fando A, Rodríguez-Muñoz M, Garzón J: The GBeta5 subunit that associates with the R7 subfamily of RGS proteins regulates mu-opioid effects. *Neuropharmacology* 2003; 45: 82-95.
 41. Kim KJ, Moriyama K, Han KR, Sharma M, Han X, Xie GX, et al: Differential expression of the regulator of G protein signaling RGS9 protein in nociceptive pathways of different age rats. *Dev Brain Res* 2005; 160: 28-39.
 42. Zachariou V, Georgescu D, Sanchez N, Rahman Z, DiLeone R, Berton O, et al: Essential role for RGS9 in opiate action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13656-61.
 43. Garzón J, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P: Activation of mu-opioid receptors transfers control of G α subunits to the regulator of G-protein signaling RGS9-2. Role in receptor desensitization. *J Biol Chem* 2005; 280: 8951-60.
 44. Xu H, Wang X, Wang J, Rothman RB: Opioid peptide receptor studies. 17. attenuation of chronic morphine effects after antisense oligodeoxynucleotide knock-down of RGS9 protein in cells expressing the cloned mu opioid receptor. *Synapse* 2004; 52: 209-17.
 45. Garzón J, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P: The R7 subfamily of RGS proteins assists tachyphylaxis and acute tolerance at mu-opioid receptors. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1983-90.
 46. López-Fando A, Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Garzón J: Expression of neural RGS-R7 and G $\beta 5$ proteins in response to acute and chronic morphine. *Neuropsychopharmacology* 2005; 48: 134-50.
 47. Garzón J, Rodríguez-Muñoz M, Torre-Madrid E, Sánchez-Blázquez P: Effector antagonism by the regulators of G protein signaling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS. *Psychopharmacology* 2005; 180: 1-11.
 48. Chasse SA, Dohlman HG: RGS proteins: G protein-coupled receptors meet their match. *Assay Drug Dev Technol* 2003; 1: 357-64.
 49. Neubig RR, Siderovski DP: Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 187-97.
-