

신경전달물질 방출 저해제 FS11052가 신경세포와 PC12 세포의 돌기신장에 미치는 영향

이윤식¹ · 김동섭*

¹한양대학교 의과대학 약리학교실, 부산대학교 생명자원과학대학 생명응용과학부

Received February 11, 2006 / Accepted March 7, 2006

Effect of FS11052, an Inhibitor of Exocytosis, on Neurite Extension in Rat Hippocampal Neurons and PC12 Cells. Yun-Sik Lee¹ and Dong-Seob Kim*. ¹Department of Pharmacology, College of Medicine & Institute of Biomedical Science, Hanyang University, 17 Heangdang-Dong, Sungdong-Ku, Seoul 133-791, South Korea, School of Applied and Life Science, College of Natural Resource and Life Sciences, Pusan National University, Gyeongnam 627-706, Korea – FS11052, a novel microbial metabolite from *Streptomyces* spp. was identified as a small molecular substance and shown inhibition activities for the release of neurotransmitter from rat hippocampal neuron and PC12 cells. FS11052 is an inhibitor of tritiated norepinephrine (³H]-NE) release in high K⁺ buffer solution containing ionomycin, indicating that FS11052 inhibits neurotransmitter release after the influx of Ca²⁺ ions. When examined the effect of FS11052 on glucuronidase release from guinea pig neutrophils, FS11052 inhibited glucuronidase release: when treated with 5 µg/ml of FS11052, which was not induced cellular cytotoxicity. The fact that the glucuronidase release in neutrophil and norepinephrine release in neuron was inhibited suggests the similarity in the locations and the mechanisms of FS11052 action targets. When treated with 5 µg/ml of FS11052, [³H]-NE release and neurite extension for both rat hippocampal neurons and PC12 cells were prevented. These observations of FS11052 functioning as an inhibitor of neurotransmitter release suggest that FS11052 has an important role in synaptic transmission in neuron.

Key words – Neuron, exocytosis, inhibitor, neurophil, glucuronidase

사람의 뇌는 100억 개가 넘는 신경세포로 복잡한 회로망을 형성하고 있고, 뇌의 각 부위를 구성하고 있는 신경세포의 종류도 glia, astrocyte와 함께 다양한 pattern을 이루고 그 기능도 다양하다. 화학적으로도 부위 특이성을 갖고 있기 때문에 신경핵을 꺼내어 연구하는 micropatch나 한 개의 신경세포채를 꺼내는 ultra micropatch법 등의 특별한 연구방법이 있다. 신경세포의 연구 특색은 화학적 분석에 초고감도가 요구되어 진다. 세포핵의 micropatch법을 위해 얻어진 뇌의 조직량은 microgram 정도지만 화학분석에는 femtomole (10⁻¹⁵)에서 attomole (10⁻¹⁸)의 관찰이 요구된다. 한 개의 신경세포의 생화학적 분석에는 attomole의 고감도가 필수이고 이외에도 고속액체, gas chromatography와 형광현미경적 관찰, 전기생화학적 검출법, radio-immunoassay나 enzyme-immunoassay 등의 면역화학적 검출방법이 있다. 이런 방법을 통해서 일반적인 뇌의 형태적 변화를 관찰 할 수 있지만, 뇌세포의 중요한 기능을 담당하는 세포간의 물질변화의 속도나 G-protein coupled 수용체의 기능, 특히 신경세포 전달물질인 acetylcholin이나 neuropeptide처럼 급속히 분해되는 물질에서는 millisecond 이내의 분석이 필요하다[4]. 이러한 이유로 전자현미경이나 공초점형광현미경을 이용한 일반적인 life science의 연구방법을 통하여 분석하지만, 특이적인

신경세포의 기능을 이해하기 위해서는 신경세포간의 커뮤니케이션을 담당하는 amine, amino acid, neuropeptide 등의 신경전달물질의 방출을 특이적으로 저해 할 수 있는 저분자 물질을 이용한 접근은 신경세포의 기능연구에 효율적 수단이 될 수 있다. 최근 rat의 hippocampus에서 흥분성 시냅스 전달을 촉진하는 diterpenoid alkaloid계의 songorine 물질이 발견되어, 이 물질이 농도 특이적으로 rat 뇌의 시냅스막에 [³H]muscimol의 특이적 결합을 억제하여 GABA (A) 수용체의 신규 non-competitive antagonist로 동정 되었다[32]. 신경세포에서는 각각의 세포가 다수의 시냅스를 형성하고, 복잡한 회로를 형성하여 세포 간 커뮤니케이션이 일어나고 있다. Fig. 1의 모식도에서 보여주는 것처럼, 신경세포의 synaptic terminal에서는 외부의 자극에 의해 축색에 전달된 활동전위가 presynaptic terminal 부위에 도달하면 전위의존성의 Ca²⁺ 농도의 상승에 의해 신경전달물질이 방출된다[11,16,29]. 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 형성된 복합체를 통하여 관여하고 있는 것으로 보고되어 있다[24]. 실제로 신경세포에서 일어나는 외부로부터의 자극에 의해 신경전달물질을 방출하는 조절성분비(regulated secretion)는 분비과립 또는 소포체의 한계막과 분비세포막 방출부위내면 등이 접촉하여, 양 막이 fusion한 결과, fusion 부위에 pore를 형성, 이 pore를 통

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5356, Fax : +82-55-350-5359

E-mail : kds@pusan.ac.kr

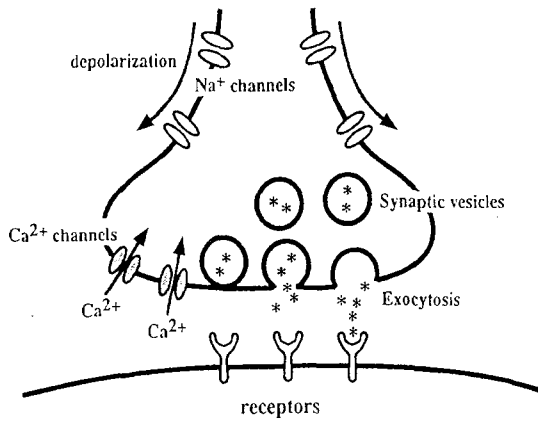


Fig. 1. Scheme of neurotransmitter release from nerve terminals in hippocampal neuron.

하여 과립 또는 소포의 내용물만이 세포외로 방출되어 진다. 시냅스부위에서 신경전달물질의 방출은 각각의 특이적인 수용체에 의하여 수용됨으로써 자극을 전달하는 신경계의 가소성에 필수적인 과정으로 알려져 있다. 실제로 뇌의 기능으로서 기억, 학습, 인지 등에 있어서는 세포 수준의 모델이 되고 있는 장기증강 현상(long term potentiation, LTP)의 성립 시에는 신경전달 물질의 방출량이 증가하고 있다는 사실과 pre-synaptic terminal에서 신경전달물질의 방출에 관계하는 시냅신이라는 단백질 등이 LTP의 성립에 관여하고 있는 사실이 보고되었다[15,26]. 신경세포 간 정보교환이 이루어지고 있는 신경전달물질의 방출과정은 극히 복잡하여, 이 방면의 독창적인 연구를 수행하기 위해서는 신규작용을 갖는 특이적인 저분자 probe의 탐색은 필수적이다. 그래서 PC12세포에서 신경전달물질의 방출에 대한 효과를 조사한 결과 PC12 세포에 incorporation된 노르에피네프린($[^3\text{H}]\text{-NE}$)의 고농도 K^+ 자극에 의한 exocytosis를 특이적으로 저해하는 물질 FS11052를 방선균 대사산물로부터 얻었고, 이 저분자물질, FS11052가 신경전달물질 방출에 대한 저해작용과 신경돌기 신장에 미치는 영향을 해석하였다.

재료 및 방법

배지 및 세포배양

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Rockville, MD, USA)는 분말 DMEM (high glucose)를 증류수에 녹여 3.7 g의 탄산수소나트륨 및 항생제로 50 U/ml 페니실린(Meiji Co., Tokyo, Japan)과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신(Meiji Co., Tokyo, Japan)을 넣어 1 N HCl로 pH 7.3에 조정 한 후, 0.22 μm pore 멸균필터를 이용하여 멸균했다. 혈청은 소 태아혈청(fetal calf serum, FCS; Japan Bio-Test) 및 말혈청(horse serum, HS; Gibco)을 사용, 세포 계대배양용 배지로서는 5% FCS와 5% HS를 가하여 사용했다. 신경세포 초

대배양용 배지로서는 DMEM에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린(Sigma, St. Louis, MO, USA), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 트랜스페린(Sigma), 1 mM 피루빈산나트륨(Sigma), 5% HS를 첨가하여 실험에 사용했다.

본 실험에 사용한 모든 세포는 37 $^{\circ}\text{C}$, 10% CO_2 의 탄산가스 인큐베이터 내에 습기를 공급한 상태에서 배양하였다.

글리신 완충액

글리신 1.5 g 에 탈이온수 100 ml을 첨가, 0.2 M의 글리신 stock 용액을 7.22 ml 넣은 후, 탈이온수로 희석하여 총 400 ml의 글리신 NaOH 완충액(pH 10.3)을 조제했다. 헤파린나트륨 주사액 Novo-heparin 1000 (1000 U/ml)를 Nordisk 사(Denmark)로부터 구입 후 희석하여 사용했다. N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-phenylalanine (FMLP)는 Sigma사, 4-methylumbelliferyl-D-glucuronide와 카제인산나트륨은 Nakara사(Tokyo, Japan)의 제품을 구입하여 사용했다. 0.1% 글리코젠 생리식염수용액은 글리코겐분말 0.4 g, NaCl 3.6 g 에 탈이온수 400 ml를 첨가하여 121 $^{\circ}\text{C}$, 20분간 완전 멸균하여 사용했다. Hanks 완충액은 KCl 0.4 g, KH_2PO_4 50 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 97.7 mg, NaCl 8 g, NaHCO_3 0.35 g, Na_2HPO_4 47.5 mg에 탈이온수 1 l를 가해 완전 멸균했다. 별도로 멸균한 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (185.5 mg/l) 및 0.22 μm 의 pore 멸균필터로 필터 멸균한 glucose (1 g/l)를 첨가하여, 1 N NaOH로 pH 7.4로 조정하여 세정용 완충액으로 사용했다. 초산 완충액은 탈이온수 100 ml에 초산 1.15 g을 첨가하여 0.3 M의 초산 stock 용액 51 ml 당, 0.2 M의 sodium acetate 용액을 49 ml 첨가 후, 탈이온수로 희석하여 총 200 ml의 초산완충액(pH 4.6)을 조제했다.

몰모트의 neurophil 조제법

본 실험은 Tsujii 등의 방법을 변형하여 행했다[28]. 몰모트(Hartley, 10~12 weeks)에 생리식염수로 녹인 12% 카제인산나트륨 20 ml/마리를 에테르 마취 하에서 주사했다. 주사 후 후두부를 구타하여 실신시킨 후, 경동맥을 전달하여 방혈사시켰다. 5 U/ml 헤파린이 든 Hanks 완충액 20 ml/마리를 ip 주사하여 neurophil을 취한다. 1,100 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하여 상청을 버리고, Hanks 버퍼에 1회 세정한 후, 세포현탁용 D-MEM에 1.2×10^7 cells/ml로 조제하여 얼음 위에 보존했다.

Neurophil에서의 탈과립 유도

1.2×10^6 cell/ml의 neurophil 부유액 150 ml를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 배양했다. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 FS11052을 가해 5분 후에 FMLP에 cytochalasin B (Sigma)를 첨가한 용액 45 μl 를 첨가했다. 5분 후에 얼음 위에서 반응을 멈추게 하여 4 $^{\circ}\text{C}$, 1,500 rpm으로 2분간 원심분리했다. 얻은 상청 100 μl 를 사용하여 glucuronidase의 활성을 측정했다.

Glucuronidase 활성도 측정

상청에 0.1 M 초산완충액(pH 4.6) 300 μ l를 가해 37°C에서 15분간 배양하여, 기질로서 50 μ l의 1 mM 4-methylumbelliferyl-D-glucuronide를 첨가했다. 15분 후에 0.1 M 클리신완충액(pH 10.3) 20 μ l를 첨가하여 효소반응을 멈추게 했다. 형광광도계의 여기파장을 365 nm, 형광파장을 450 nm에 맞추어 유리한 4-methylumbelliferone의 fluorescence density를 측정했다. 별도로 neurophil 부유액을 0.2% Triton X-100로 세포를 용해하여, 원심상청액 중의 glucuronidase 활성을 100%의 과립 방출량으로 했다.

산성 organelle의 acridine orange 염색 및 세포독성

PC12 세포를 24 well plate에 부착시킨 원형 cover glass (13 nm : 아세톤, 에탄올 등에 씻은 후, polyethylenimine (PEI)로 코팅한 것을 사용) 위에서 배양하여, FS11052 또는 concanamycin A (1 μ l/ml)에 의해 전처리를 1시간 행했다. 배지에 10 mM acridine orange를 1/2000 양을 더해(final conc. 5 μ M), 15분간 배양했다. Cover glass를 회수하여, 클램프링카액(KR : 120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄, 25 mM Hepes-NaOH pH 7.4)에 몇 번 세정하여, cover glass의 세포가 붙어있지 않은 측의 수분을 잘 닦은 후 건조시켜 KR으로 슬라이드글라스 상에 마운팅했다. 형광현미경에 의한 관찰은 Olympus BH-2 현미경을 사용, U 큐브, 보조흡수필터 Y455, 100배의 대물렌즈에 유침 상태에서 관찰했다. 세포증식 assay는 PC12 B3 세포를 콜라겐코팅한 96-well plate에 2x10⁴ cells/well의 농도로 접종하였다. 배양 24시간 후 FS11052를 0.1, 1, 10 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 처리 48시간 후에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay를 Mosmann의 방법에 따라 행했다[21].

Rat hippocampal neuron 배지 및 배양

본 실험에서 사용한 모든 세포는 DMEM 배지에서 37°C, 10% CO₂ 탄산가스 incubator 내에 습기를 공급한 상태에서 배양했다. 임신 18일의 rat을 단두하여, 전신을 70% ethanol로 세정 후 복부로부터 태아를 자궁과 함께 추출했다. 태아를 자궁으로부터 분리하여, 두피 두 개를 해부하여 선단이 완곡한 완충액 속에 넣어 해부현미경하에서 메스로 좌우의 대뇌반구를 잘라냈다. 핀셋으로 수막을 떼어 피질부분을 예리한 핀셋으로 잘라내어 메스로 잘게 잘라서 10 mg/ml의 파파인(Worthington, Lakewood, NJ, USA)을 함유한 파파인 희석액 5 ml에 현탁하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 끝에 tip을 끼운 피펫으로 피펫팅 함으로써 세포를 분산시켜, 0.002% DNase I (Sigma)를 첨가 후 10분간 더 반응시켰다. 5% HS를 포함한 DMEM을 첨가하여 다시 한번 피펫팅 한 후 autoclave 해둔 lens paper로 여과하여 세포를 분산 시킨

후 1000 rpm에서 5분간 원심분리를 2회 반복하여 세포를 세정했다. 세포 수를 카운트 한 후, primary culture용 배지에 현탁하여 24-well plate (Nunc Co., LA Abcoude, Netherlands)에 접종하여 배양했다.

결 과

몰모트 neurophil의 탈과립에 대한 작용

Neurophil은 cytochalasin B의 존재 하에서의 케미칼메디에이터의 일종인 FMLP에 의한 자극에 따라 분비과립에 축적된 glucuronidase를 exocytosis에 의해 방출한다. 상청에 방출된 glucuronidase를 측정함으로써 neurophil의 탈과립에 대한 FS11052 물질의 작용을 검토했다. FMLP은 1 μ M와 cytochalasin B는 10 μ M의 농도로 처리했을 때, 좋은 유도반응을 나타냈다(Fig. 2). FS11052는 고농도 K⁺ 이온에 의한 탈분극자극에 의해 방출되는 신경전달물질로서 노르에피네프린과 ATP의 exocytosis를 저해반응을 나타냈으며(in press), neurophil의 FMLP와 cytochalasin B의 자극에 의한 탈과립에 대한 검토 결과에서도 glucuronidase의 exocytosis에 대해

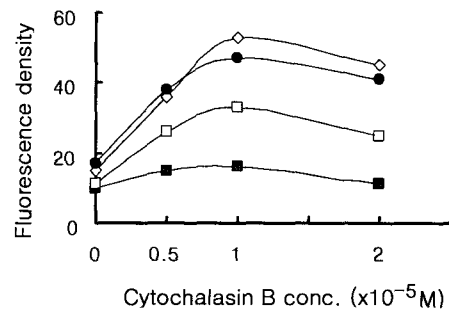


Fig. 2. Effect of cytochalasin B and FMLP on granule enzyme in neurophil from guinea pig. Glucuronidase was assayed as described in materials and methods. Cells were washed and treated with 0~20 μ M cytochalasin B and 0 (closed square), 1 (diamond), 0.1 (closed circle), 0.01 (open square) μ M FMLP for the concentration indicated. Released glucuronidase levels were assayed by enzyme-subtraction relation.

Table 1. Effect of FS11052 on glucuronidase release in neurophils

| Sample | Glucuronidsae |
|---------|---------------|
| Control | 100 |
| FS11052 | 20.8 |

*Effect of FS11052 on 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 μ g/ml of FS11052 was treated. Control means the amount of release of glucuronidase by 10 μ M cytochalasin and 1 μ M FMLP. The values are average of three independent experiments.

서도 대조군에 비해 현저한 저해반응을 나타냈다(Table 1). 이 neurophil과 신경세포에서의 exocytosis를 저해하는 결과로부터 FS11052의 작용이 세포독성에 의한 가능성을 확인했다. 0.4% trypan blue와 세포의 형태학적 관찰을 통하여 검토한 결과, 처리농도 5 µg/ml에서는 세포수나 세포의 형태학적인 변화는 검출되지 않았다(data not shown). PC12 세포를 가지고 FS11052 물질이 세포독성과 세포증식에 미치는 영향을 cell vitality를 나타내는 MTT reduction activity와 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 처리한 0.1, 1, 10 µg/ml의 농도에서는 유의한 세포독성과 세포의 형태적인 변화를 보이지 않았다(Fig. 3).

세포내 산성 organelle의 acridine organ 염색

Vesicular-ATPase 저해제가 세포내 단백질의 막 수송을 저해하는 것, 특히 바피로마이신 A1이 프로락틴의 분비를 trans-golgi 이후의 과정에서 저해하고 있는 것이 알려져 있다 [20]. 방선균 대사산물로부터 탐색하여 얻어진 FS11052가 이와 동일한 작용기작을 통하여 신경세포에서 [3H]-NE 및 ATP, neurophil에서 FLMP와 cytochalasin B의 자극에 의한 glucuronidase의 조절성분비를 저해하고 있는가를 세포내 산성화 organelle을 acridine orange 염색 방법에 의해서 검토했다(Fig. 4). PC12 세포를 FS11052, 또는 organelle 산성화 저해제를 처리한 대조군으로서 concanamycin A (1 µg/ml)로 1시간 전처리하여, acridine orange에 의한 염색 후 형광 현미경으로 관찰했다. 대조군에서는 세포 내 orange색의 소과립이 많이 보였다(panel A). Acridine orange는 산성화한

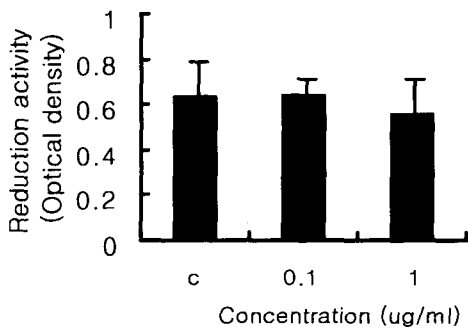


Fig. 4. Effect of FS11052 on cellular viability. MTT assay was analyzed with Xenometrix MTT assay kit following instructions. PC12-B3 cells (2x10⁴ cells/well) were cultured in collagen coated 96 well plate. After 1 day incubation, the cells were treated with various concentration, 0, 0.1, 1, and 10 µg/ml of FS11052. Results are presented as means±S.E. of two independent experiments, which performed in triplicate. The results can be read on a multiwell scanning spectrophotometer (96 well titration reader) with OD₅₄₀ nm. Asterick (*) indicates results with no significantly different at the p> 0.05 probability levels as compared to the values obtained from the no treated control.

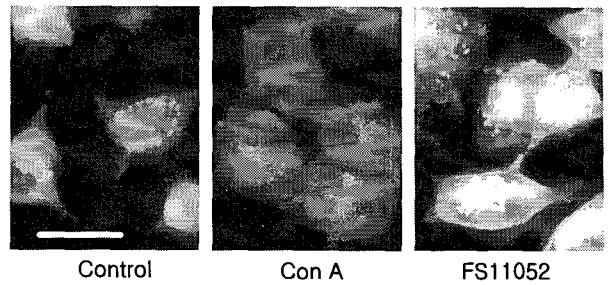


Fig. 3. Comparison of organelle acidification of FS11052 and concanamycin A in PC12 cells. PC12-B3 cells were incubated on PEI coated cover glass and stained with 5 µM of acridine orange as a final concentration following materials and methods. Cells were incubated with medium only (A), medium containing 5 µg/ml FS11052 (C) and medium containing 1 µg/ml concanamycin A (B) for 2 hour, then took a photograph with 200x magnification. Bar is 25 µm.

organelle에 축적하여 형광을 띠기 때문에, 이들 과립이 리소조솜 등이라고 생각되어 진다. Concanamycin A의 처리 시에는 예상했던 것처럼 이들 orange색의 세포내 과립이 소실되어, 산성화의 저해가 일어나고 있는 것이 확인되었다 (panel B). 그러나 5 µg/ml의 FS11052를 처리한 경우에 있어서는 concanamycin A와 같은 산성화 저해제를 처리한 경우에서 보이는 과립의 소실은 관찰되지 않았으며 아무것도 처리하지 않은 대조군과 유사한 결과를 나타냈다(panel C). 사진 상의 약간의 색깔의 변화는 검경 후에 사진을 찍기까지의 시간경과에 의한 것이다.

PC12 세포 및 primary hippocampal neuron의 형태에 대한 작용

신경전달물질 방출에 관여하고 있는 신경계특이단백질 SNAP-25와 synapsin이 신경세포의 돌기신장에도 관여하고 있는 것이 밝혀졌다[2,22,23]. 그래서 본 실험에서 신경전달물질의 방출과정에 저해반응을 나타내고 있는 FS11052 물질이 PC12 세포(Fig. 5) 및 rat의 primary hippocampal neuron (Fig. 6)의 형태에 대하여 어떤 작용을 가지고 있는가를 검토했다. PC12 세포는 50 ng/ml의 nerve growth factor (NGF)를 첨가함에 따라 신경세포처럼 긴 돌기의 신장을 유도했다 (Fig. 5B). 50 ng/ml의 NGF를 처리한 PC12 세포에 FS11052 물질을 이 세포에서 [3H]-NE의 방출을 저해한 5 µg/ml의 농도로 처리하여 2일 동안 배양한 결과, PC12 세포의 NGF에 의해서 유도되는 돌기 신장에 대하여 현저한 저해작용을 나타냈다(Fig. 5C). 또 rat의 primary hippocampal neuron은 primary culture medium에서 배양 일수, day 0의 대조군 (Fig. 6A), 배양 1일째(Fig. 6B)와 배양 3일째(Fig. 6C)의 시간경과 따라 신경돌기의 신장을 보였다. 이 primary hippocampal neuron에서의 FS11052 물질의 역할을 알아보기 위

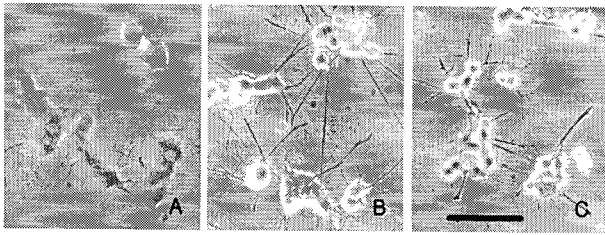


Fig. 5. Effect of FS11052 on the neurite extension of PC12. PC12-B3 cells (2×10^4 cells/well) were incubated on collagen-coated 24 well plate with DMEM containing 5% HS and 5% FCS. After 2 days of incubation, the cells were incubated with fresh meium for 3 days in the absence and the presence of 50 ng/ml of NGF and 50 ng/ml of NGF plus 5 µg/ml FS11052. Photographs (x100) show control (no treated, A and 50 ng/ml of NGF, B) and the treatment of 50 ng/ml of NGF and 5 µg/ml FS11052 (C). Bar is 50 µm.

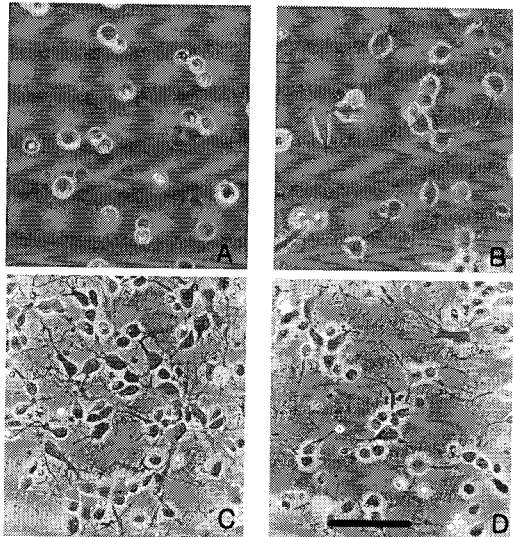


Fig. 6. Neurite extension of primary rat hippocampal neurons. The hippocampal neuron primary culture was described in material and methods. The cells were incubated on PEI coated 24 well plates for 24 hours incubation, then treated with primary culture medium in the absence and presence of 5 µg/ml of FS11052 for 3 days. Photographs (x100) were taken after incubation days and show control (A, no treated incubation day 0; B, no treated incubation day 1 and C, no treated incubation days 3) and FS11052 treated incubation day 3 (D). Bar is 50 µm.

Table 2. Effect of FS11052 on neutrite number and length

| Cells | Rat hippocampal neurons (neurite numbers) | | PC12 cells (neurite length, nm/200) |
|-------------|--|-----------|---|
| | Day 1 | Day 2 | Day 2 |
| Culture day | | | |
| Control | 3.57±0.21 | 4.37±0.19 | 36.67±0.51 |
| FS11052 | 2.61±0.39 | 3.27±0.26 | 18.86±0.49 |

해 신경전달물질로서 ATP의 exocytosis에 대해서 저해반응을 보인 FS11052 물질을 배양 1일째에 처리하였다. Primary hippocampal neuron에 FS11052 물질 5 µg/ml을 2일 동안 처리 배양 3일째(Fig. 6C)의 대조군과 비교하여 세포변화를 관찰한 결과, 신경돌기의 신장을 현저하게 억제하는 결과를 보였다(Fig. 6D, Table 2).

고 찰

미생물의 대사산물로부터 얻은 FS11052는 PC12세포와 rat primary hippocampal neuron에서 조절성분비에 의해서 방출되는 신경전달물질을 효과적으로 저해하는 결과를 얻었다. Ionopore인 monensin, vesicular-ATPase 저해제, concanamycin A 등의 약제는 세포내 organelle의 활성을 저해함으로 분비를 억제하고 있는 사실로부터, FS11052의 경우에도 같은 작용기작을 나타내고 있는가를 세포내 산성 organelle의 acridine orange 염색법에 의해 조사했다. 또한 이 물질이 보이는 신경전달물질의 저해가 신경계 세포의 특이적인 저해 인지를 조사하기 위하여, 별도의 조절성분비를 하고 있는 볼모트의 neurophil에서 glucuronidase의 방출에 대한 영향을 조사했다. 또 본 물질이 신경계 세포에 대한 독성 여부를 검토하기 위하여, 증식 및 형태변화에 미치는 영향을 관찰하였다. 시냅스에는 H⁺-ATPase가 존재하고 있어서, 신경전달물질의 시냅스소포에의 농축과정에는 소포내의 organelle의 산성화가 관여하고 있는 것은 잘 알려진 사실이다. 최근 이 H⁺-ATPase의 성질이 밝혀져 전달물질수송의 에너지 증여에 관해서도 알게 되었다. 액포형의 ATPase는 크로마틴 과립과 효모의 액포에서 발견된 이래 많은 세포내 막계 organelle에 발현되고 있는 것이 밝혀졌다[14,19]. 한편 글루탐산, ATP, 도파민과 노르에피네프린 등의 monoamine류의 수송계가 동정되었다. 이들의 수송활성은 온도의존성이며, 기질농도를 높이면 incorporation은 증가하지 않는다. 또한 기질을 수십 배에 농축할 수 있는 것으로 수송단백질에 의한 능동수송이라고 사료된다. 수송활성은 ATP의존성이며, proton conductor에 감수성을 나타낸다. 즉 신경전달물질은 소포내의 H⁺와의 antiport에 의해 내부에 incorporation 되어진다[12,18]. 최근의 Hrs-2가 ATPase로서 SNAP-25에 결합, Ca²⁺ 농도와 ATP의 분해에 의존하여 소포수송을 조절하고 있다고 보고되었다[3,5]. 한편 바피로마이신 등의 V-ATPase 저해제가 세포내 단백질의 막수송을 저해하고 있는 것이 알려졌다[20]. Henomatsu등은 바피로마이신 A1이 프로락틴 분비를 저해하는 것과, 저해부위가 trans-golgi로부터 분비과립이 형성되어 분비의 후기과정에 있다는 것을 보고하였다[8]. 이것은 FS11052가 바피로마이신과 같이 V-ATPase 저해작용을 갖고, 동일하게 V-ATPase 저해작용을 같은 concanamycin A가 G 단백질의 세포내 수송을 끝지 이전에 정

지시킨다는 가능성을 시사하고 있다[4,22]. 본 실험계에서 FS11052 물질이 V-ATPase의 저해에 의해 신경전달물질의 소포에 농축되는 것을 억제한 결과, 방출량을 감소시켜서 exocytosis를 저해한다고 볼 수 있는 가능성은 매우 낮다. Acridine orange에 의한 염색결과와 같이, FS11052 물질은 V-ATPase 저해 활성은 갖고 있지 않으므로 FS11052의 신경전달물질 방출 저해 작용은 별도의 메커니즘을 통한 것으로 사료되어 진다. 신경전달물질의 방출에 관여하고 있는 신경계 특이 단백질 synaptophysin, syntaxin과 synapsin 등이 exocytosis를 조절하고 있다고 보고되었다[1,17]. 이 시냅스 기능에는 영양인자인 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)의 역할이 시냅스를 구성하는 단백질에 중요하며, 각각의 시냅스 구성단백질의 구체적인 기능에 관련하여, synapsin은 vesicle pool formation과 신경전달물질의 방출, synaptophysin은 synaptic vesicles의 생성과 budding, 그리고 syntaxin은 vesicle docking과 fusion에 중요한 역할을 한다는 보고도 있다[30]. 또한 protein kinase C activator인 PMA를 처리함으로써 신경전달물질의 방출이 촉진된다는 보고도 있다[31]. 이것은 PKC에 의한 인산화부위를 갖고 있는 synapsin이 활성화되어, 시냅스소포와 actin의 cross-linking을 조절함에 의해 신경전달물질의 방출을 조절하고 있다고 생각되어 진다. 반면, 신경세포와 axon에서 PMA에 의한 PKC의 활성을 증가시켜도 신경전달물질의 조절에는 변화가 없으며, 상대적으로 PKA의 활성감소가 신경전달물질의 방출량을 적게하여 시냅스의 기능을 저하시키는 결과를 보였다. 이 결과로부터, 시냅스의 활성화에는 PKA의 기능이 신경전달물질의 방출과 유지에 중요하다고 보는 견해도 보고되었다[13]. PC12세포에서 Phorbol PMA가 plasma membrane 주위의 분비과립의 재분포를 유도하였으며, 이 재분포는 PKC저해제인 bisindolylmaleimide I (BIS)를 처리함으로써 볼 수 없었다. 또 PMA의 비활성 analogue인 4 alpha-PMA는 분비과립의 재분포를 유도하지 아니하였다. PMA는 또한 신경전달물질의 방출에 필요한 탈분극을 강화했고 SNAP-25의 Ser187에 인산화를 유도했다. 이 결과로부터 PMA는 PC12 세포에서 PKC의존성과 비의존성 기구에 의하여 SNAP-25의 인산화와 분비과립들을 plasma membrane 주위의 재분포를 유도하여 신경전달물질의 방출을 증강하였다[27]. 한편 synapsin과 SNAP-25 등이 신경세포의 돌기신장에도 관여하고 있다고 보고 되었다[6,9,25,32]. SNAP-25 등이 시냅스 전막뿐만 아니라 축삭막상에도 전반적으로 다량 존재하는 것으로부터 별도의 기능을 갖고 있다고 예상되어 진다. 또한, *In vivo* 및 *in vitro*의 antisense 법을 통하여 해석한 결과 신경돌기의 신장에도 중요한 역할을 하고있음이 증명되었다. 이들 보고로부터 CAM kinase II, PKC에 의한 인산화부위를 갖고 있는 신경계특이단백질, synapsin 등이 시냅스 소포와 actin cytoskeleton의 cross-linking을 조절함으로

써 신경전달물질의 방출을 조절하고 있으며, 또한 시냅스소포가 시냅스 전막과 융합하는 프로세스가 신경돌기의 신장 과정에도 관여하고 있을 가능성을 시사하고 있어 흥미롭다. 그래서 FS11052 물질이 신경계 세포의 증식 및 형태에 미치는 작용을 검토했다. 먼저 세포독성과 세포증식에 관해서는 astroglia 유래의 세포종양인 C6 세포와 마우스의 신경아세포종양인 Neuro 2A를 0.4% trypan blue cell vitality assay와 면밀한 현미경적 관찰의 결과, 이 세포들의 세포사를 유도하지는 않았다. PC12세포에서의 영향을 검토하기 위하여 MTT assay로 조사한 결과, 이 FS11052물질이 PC12세포들의 형태 및 증식에 관해서도 처리농도에서는 심각한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 그러나 FS11052는 고농도 K^+ 이온에 의한 탈분극 자극에 의해 방출되는 신경전달물질로서 노르에피네프린과 ATP, neurophil의 FMLP와 cytochalasin B의 자극에 의한 탈과립이 방출되는 exocytosis를 저해했다. 이 결과로부터 신경전달물질과 glucuronidase의 exocytosis에 대해 현저한 저해를 보이는 이 물질의 작용 target이 neutrophil과 신경세포에서 유사한 기구로 해석되어, 비단세포에서 보이는 histamine의 exocytosis의 결과와 이에 대한 FS11052의 영향에 대한 구체적인 연구가 필요하다. FS11052 물질을 처리하여 신경세포의 돌기신장 형태를 관찰한 결과, 분화를 유도하는 적정농도인 50 ng/ml의 NGF 존재하에서의 PC12 세포의 돌기신장에 대하여서는 억제작용을 나타냈다. 또 rat의 대뇌 해마 세포에 대하여 특징적인 형태의 돌기를 내고 있어, FS11052 물질의 첨가에 의해 통상의 긴 축삭돌기는 억제되고 짧은 침상의 돌기가 세포체로부터 돌출되어 있었으며, growth cone를 갖고 있지 않은 뉴런이 많이 관찰되었다. 시냅스전달에 관여하는 신경계 특이단백질 중 syntaxin의 경우에 있어서도 이의 antisense RNA를 처리한 결과로부터 신경돌기신장의 과정에 대해서, 또 신경섬유의 발아 및 신경섬유의 성장에도 작용하고 있음이 밝혀졌다. 이런 결과의 해석에 관해서는 여러 가설이 있으나, vesicle fusion에 의한 막계에 관여하고 있는 여러 인자의 보충이 돌기신장에 필수적일 것이라고 사료된다. 또한, 이 시냅스의 기능과 신경물질의 조절성 분비과정에는 epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and NGF 등의 영양인자가 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase와 phosphatidylinositol 3-kinase의 활성화를 통하여 기능하고 있다는 분자 생화학적인 연구보고도 되어 있다[10].

따라서 FS11052 물질의 작용에 관해서는, Fig. 7에서 보여주는 것처럼 여러 자극에 의하여 탈분극된 synaptic membrane이 Ca^{2+} 이온을 유입 후 활성화되어 신경전달물질의 방출에 중요한 역할을 하고 있는 synaptotagmin, syntaxin, synapsin, SNAP25 등의 synaptosome을 구성하는 단백질에 직접 혹은 이와 밀접한 관련을 갖고 있는 인자와 간접적으로

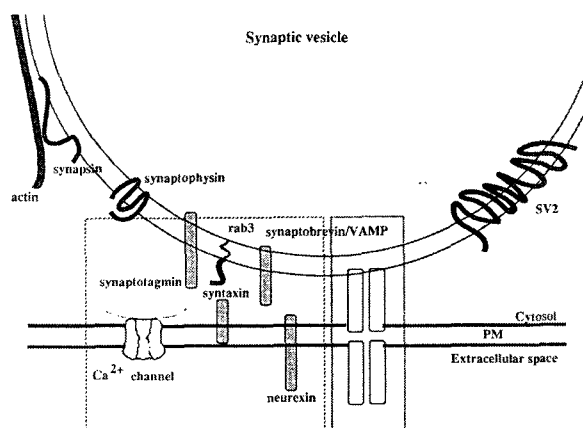


Fig. 7. Expectation of role of FS11052 on neurotransmitter release from nerve terminals in PC 12 cell and rat hippocampal neuron.

작용, 또는 이 과정에 관여하고 있는 kinase나 phosphatase에 작용하여 신경전달물질의 방출을 제어하며, growth cone의 전향, 보수와 신경세포의 가소성을 조절하는 물질로 사료되어 이후의 생리적인 연구를 통한 작용기구에 대한 해석이 기대된다[7,10].

요약

신경세포 간 정보교환이 이루어지고 있는 신경전달물질의 방출과정은 극히 복잡하여, 이 방면의 독창적인 연구를 수행하기 위해서는 신규작용을 갖는 특이적인 저분자 probe의 탐색은 필수적이다. PC12세포에 tritium-label된 nor-epinephrine (^3H -NE)을 incorporation시킨 후에 60 mM의 고농도의 K^+ 의 자극에 의해서 탈분극 후에 방출되는 ^3H -NE의 양을 scintillation countering하여 생리활성 물질을 탐색하기 위한 *in vitro*의 실험체를 세웠다. 이 탐색제를 이용하여 곰팡이, 방선균과 박테리아의 대사산물 1만 1000여 샘플을 탐색한 결과, PC12세포에서 고농도의 K^+ 의 자극에 의해서 탈분극 후에 유도되는 ^3H -NE의 방출을 효과적으로 저해하는 FS11052를 방선균 유래의 대사산물로부터 얻었다. FS11052는 또한 PC12세포와 rat cortical neurons에서 동일한 고농도의 K^+ 의 자극에 의한 탈분극 후에 유도되는 신경전달 물질로서 ATP의 방출에도 유의한 저해효과를 나타냈으며, 이 저해 효과는 ionopore로 알려진 ionomycin (1 μM)을 포함하는 저농도의 K^+ 의 버퍼를 처리하였을 때에도 보여졌다. 이들 결과로부터 FS11052의 신경전달 물질의 방출에 대한 저해작용은 세포내 Ca^{2+} 유입 이후의 반응으로 추정하며 이 작용기구에 대한 해석을 하기위하여, 신경세포의 돌기신장 형태에 대한 영향을 관찰한 결과, 분화를 유도하는 적정농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 NGF 존재 하에서의 PC12 세포의 돌기신장에 대하여서는 억제작용을 나타냈다. 또 rat의 대뇌 해마

세포에 대하여 특징적인 형태의 돌기를 내고 있어, FS11052 물질의 첨가에 의해 통상의 긴 축색돌기는 억제되고 짧은 침상의 돌기가 세포체로부터 돌출되어 있었으며, growth cone를 갖고 있지 않은 뉴우런이 많이 관찰되었다. FS11052 물질의 작용에 관해서는, 탈분극된 synaptic membrane이 Ca^{2+} 이온을 유입 후 활성화되어 신경전달물질을 방출에 중요한 역할을 하고 있는 synaptotagmin, syntaxin, synapsin, SNAP25 등의 synaptosome을 구성하는 단백질에 직접 혹은 이와 밀접한 관련을 갖고 있는 인자와 간접적으로 작용하며, 신경전달물질의 방출을 억제하여 growth cone의 전향과 신경세포의 가소성을 조절하는 물질로 사료되어, 이 물질이 Ca^{2+} 이온을 유입 후 일어나는 exocytosis와 신경계의 기능연구를 위해 사용되어질 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Alder, J., Z. P. Xie, F. Valtorta, P. Greengard and M. M. Poo. 1992. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9, 759-768.
2. Andres-Mateos E., J. Renart, J. Cruces, L. M. Solis-Garrido, R. Sernates, A. M. de Lucas-Cerrillo, M. Aldea, A. G. Garcia and C. Montiel. 2005. Dynamic association of the Ca^{2+} channel alpha1A subunit and SNAP-25 in round or neurite-emitting chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2187-2198.
3. Bean, A. J., R. Seifert, Y. A. Chen, R. Sacks and R. H. Scheler. 1997. Hrs-2 is an ATPase implicated in calcium-regulated secretion. *Nature* 385, 826-829.
4. Bernard V., M. Decossas, I. Liste and B. Bloch. 2006. Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors in vivo. *Trends Neurosci.* (in press)
5. Ferracci G., R. Miquelis, S. Kozaki, M. Seagar and C. Leveque. 2005. Synaptic vesicle chips to assay botulinum neurotoxins. *Biochem. J.* 391, 659-666.
6. Ferreira, A., K. S. Kosik, P. Greengard and H. Q. Han. 1994. Aberrant neurites and synaptic vesicle protein deficiency synapsin II depleted neurons. *Science* 264, 977-979.
7. Grishin A. A., P. Benquet and U. Gerber. 2005. Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca^{2+} -dependent activation of tyrosine phosphatase. *Neuropharmacol.* 49, 328-337.
8. Henomatsu, N., T. Yoshimori, A. Yamamoto, Y. Moriyama and Y. Tashiro. 1993. Inhibition of intracellular transport of newly synthesized prolactin by bafilomycin A1 in a pituitary tumor cell line, GH3 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 127-139.
9. Hirling H., P. Steiner, C. Chaperon, R. Marsault, R. Regazzi and S. Catsicas. 2000. Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1913-1923.

10. Itakura M., S. Yamamori, R. Kuwahara, M. Sekiguchi and M. Takahashi. 2005. Two distinct regulatory mechanisms of neurotransmitter release by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Neurochem.* **94**, 502-509.
11. Klugbauer, N., L. Lacinova, V. Flockerzi and F. Hofmann. 1995. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. *EMBO* **14**, 1084-1090.
12. Li G., Q. Yang, E. A. Alexander and J. H. Schwartz. 2005. Syntaxin 1A has a specific binding site in the H3 domain that is critical for targeting of H⁺-ATPase to apical membrane of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, 665-672.
13. Li M. X., M. Jia, L. X. Yang, V. Dunlap and P. G. Nelson. 2002. Pre- and postsynaptic mechanisms in Hebbian activity-dependent synapse modification. *J. Neurobiol.* **52**, 241-250.
14. Nicoletta J. A., J. J. Ross, G. Li, Q. Cheng, J. Schwartz, E. A. Alexander and J. H. Schwartz. 2004. Munc-18-2 regulates exocytosis of H⁺-ATPase in rat inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 1366-1374.
15. Linden, D.J. 1994. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* **12**, 457-472.
16. Matos M. F., K. Mukherjee, X. Chen, J. Rizo and T. C. Sudhof. 2003. Evidence for SNARE zippering during Ca²⁺-triggered exocytosis in PC12 cells. *Neuropharmacol.* **45**, 777-786.
17. Montecucco C., G. Schiavo and S. Pantano. 2005. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem. Sci.* **30**, 367-372.
18. Moriyama, Y. and M. Futai. 1990. H⁺-ATPase, a Primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 443-448.
19. Moriyama Y. and M. Futai. 1990. Presence of 5-hydroxytryptamine (serotonin) transport coupled with vacuolar-type H⁺-ATPase in neurosecretory granules from bovine posterior pituitary. *J. Biol. Chem.* **265**, 1965-1969.
20. Moriyama Y., M. Maeda and M. Futai. 1992. The role of V-ATPase in neuronal and endocrine system. *J. Exp. Biol.* **172**, 171-178.
21. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
22. Muroi, M., N. Shiragami, K. Nagao, M. Yamasaki and A. Takatsuki. 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**, 139-149.
23. Murrey H. E., C. I. Gama, S. A. Kalovidouris, W. I. Luo, E. M. Driggers, B. Porton and L. C. Hsieh-Wilson. 2006. Protein fucosylation regulates synapsin Ia/lb expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 21-26.
24. O'Conner, V. M., O. Shamotienko, E. Grishin and H. Bet. 1993. On the structure of the 'synapto-secretosome'-Evidence for a rereixin/synaptotagmin/syntaxin/Ca²⁺ channel complex. *FEBS* **326**, 255-260.
25. Osen-Sand, A., M. Catsicas, J. K. Staples, K. A. Jones, G. I. Ayala, J. Knowles, G. Grenningloh and S. Catsicas. 1993. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature* **364**, 445-448.
26. Rosahl, T. W., D. Spillane, M. Missler, J. Herz, D. K. Selig, J. R. Wolff, R. E. Hanner, R. C. Malenka and T. C. Sudhof. 1995. Essential function of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* **375**, 488-493.
27. Shoji-Kasai Y., M. Itakura, M. Kataoka, S. Yamamori and M. Takahashi. 2002. Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* **15**(8), 1390-1394.
28. Tsujii, E., Y. Tsurumi, S. Miyata, Fujie, A. Kawakami, M. Okamoto and M. Okuhara. 1992. WF 11605, an antagonist of leukotriene B₄ produced by a fungus, producing strain, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiotics* **45**, 698-703.
29. Tuz K. and H. Pasantes-Morales. 2005. Hyposmolarity evokes norepinephrine efflux from synaptosomes by a depolarization- and Ca²⁺-dependent exocytotic mechanism. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 1636-1642.
30. Vaynman S. S., Z. Ying, D. Yin and F. Gomez-Pinilla. 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.* (in press)
31. Vitale, M. L., E. P. Steward and J. M. Trifaro. 1995. Chromaffin cell corticalactin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353-363.
32. Zhao X. Y., Y. Wang, Y. Li, X. Q. Chen, H. H. Yang, J. M. Yue and G. Y. Hu. 2003. Songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus *Aconitum*, is a novel GABA (A) receptor antagonist in rat brain. *Neurosci. Lett.* **337**, 33-36.
33. Zhou Q., J. Xiao and Y. Liu. 2000. Participation of syntaxin 1A in membrane trafficking involving neurite elongation and membrane expansion. *J. Neurosci. Res.* **61**, 321-328.