

쥐 교감신경 뉴론 N형 칼슘통로의 2가 양이온의존성 비활성화

충북대학교 의과대학 생리학교실

구 용 속

본 연구자를 위시한 많은 연구자에 의해 칼슘이 N형 칼슘통로의 비활성화를 촉진시킨다는 것이 보고되었다. 그러나 칼슘에 의한 비활성화 촉진 효과가 고전적인 칼슘의존성 기전에 의해 기인하는지는 아직 확실하지 않다. L형 칼슘통로의 칼슘의존성 비활성화기전을 밝히기 위하여 지금까지 사용해온 방법의 하나는 세포내, 외의 칼슘농도를 변화시켜보는 것이다. 그러므로 본 연구에서는 칼슘의존성 비활성화기전의 존재 여부를 알아보기 위하여 2가 양이온을 1가 양이온인 메틸아민(MA⁺)으로 치환하였다. 선행 연구를 통해 우리는 5초 동안의 긴 저분극 자극 시 바륨과 칼슘을 사용하여 얻은 전류에서 모두 빠른 성분($\tau \sim 150$ ms)과 느린 성분($\tau \sim 2,500$ ms)의 비활성화가 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 세포외 2가 양이온의 농도가 0이 되도록 하였을 때 빠른 비활성화가 소실된 반면 느린 비활성화에는 영향이 거의 없었다. 또한 바륨을 사용하였을 때보다 10 mV씩 과분극시킨 전압에서의 메틸암모늄 전류 데이터를 비교하여 보았을 때 느린 비활성화의 시정수가 서로 잘 일치하였으며 이 시정수는 막전압이 저분극될수록 감소하는 막전압의존성 비활성화의 특성을 보였다. 본 연구결과와 선행연구의 결과를 종합하여 볼 때 세포외 2가 양이온의 존재는 N형 칼슘통로의 빠른 비활성화가 일어나기 위하여 필수적인 조건이며 이러한 2가 양이온의존성 비활성화기전은 기존의 칼슘의존성 또는 막전압의존성 기전과 다르다는 가설을 제안한다.

중심단어: N형 칼슘통로, 칼슘의존성 비활성화, 막전압의존성 비활성화, 2가 양이온의존성 비활성화

서 론

칼슘통로 비활성화(inactivation) 기전은 막전압의존성 기전(voltage-dependent inactivation, VDI)¹⁻³⁾과 칼슘의존성 기전(Ca²⁺ dependent inactivation, CDI)^{2,4)}이 알려져 있다. 막전압의존성 비활성화기전은 막전압이 증가함에 따라 전류가 단조롭게 감소하며 채널이 최대로 활성화된 전압에서 비활성화정도가 포화되는 특징을 보인다. 칼슘의존성 비활성화 기전은 비활성화 속도 및 정도가 칼슘통로 주위의 칼슘농도에 의존적이며 특징적인 U형 비활성화(U-shaped inactivation) 곡선을 보인다.

L형 칼슘통로에서는 CDI가 주된 기전임이 보고되었다.⁴⁾ CDI 기전은 calmodulin (CaM)이 L형 칼슘통로의 C-terminal에 존재하는 'IQ' motif와 결합하는 것에 의해 이루어지

며^{5,6)} 칼슘 유입에 의해 이미 결합하고 있었던 CaM이 활성화되어 CDI가 일어난다고 설명된다.⁷⁾ 반면 비-L형 칼슘통로에서는 VDI에 의해 비활성화가 이루어진다고 알려져 왔다. 몇몇 연구를 통하여 N형 칼슘통로에서도 CDI가 존재한다고 보고되었으나⁸⁻¹⁰⁾ 전형적인 CDI와는 다른 모습이 있었다. 즉 칼슘통로 charge carrier로 칼슘대신 바륨으로 대체시에도 U형 비활성화곡선이 그대로 유지되었고 비활성화정도가 세포 속 칼슘 완충제의 농도와 무관하였다.^{11,12)} 더욱이 N형 칼슘통로가 순수하게 VDI에 의해 비활성화된다는 주장도 있다.^{13,14)}

본 연구자의 선행논문¹⁵⁾에서 N형 칼슘통로의 비활성화정도가 charge carrier로 5 mM 바륨대신 5 mM 칼슘을 사용하였을 경우에 증가함을 보였다. 그러나 이러한 비활성화증가가 과연 CDI에 의한 것인지는 규명되어지지 않았다. 또 선행논문에서 5초의 긴 저분극 자극 시 바륨과 칼슘을 써서 얻은 전류기록은 모두 2중 지수함수를 써서 빠른 성분($\tau \sim 150$ ms)과 느린 성분($\tau \sim 2,500$ ms)으로 구분할 수 있었다. 그러므로 본 논문에서는 N형 칼슘통로의 CDI 가능성을 규명하고자 1가 양이온을 사용하여 빠른 성분과 느린 성분에 미치는 영향을 알아보고자 한다. 만일 CDI 가설이 옳다면 1가 양이온 사용으로 인해 비활성화정

이 논문은 2005년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

이 논문은 2006년 6월 5일 접수하여 2006년 6월 21일 채택되었음.

책임저자 : 구용속, (361-763) 충북 청주시 흥덕구 개신동 12번지

충북대학교 의과대학 생리학교실

Tel: 043)261-2870, Fax: 043)272-1603

E-mail: ysgoo@chungbuk.ac.kr

도가 감소되어야 할 것이다.

중추신경뿐만 아니라 말초신경에서 N형 칼슘통로를 통한 칼슘의 유입은 신경전달물질의 유리를 촉발시킨다.¹⁶⁾ 아주 좁은 칼슘농도 범위에서 이와 같은 작용이 일어나므로 칼슘농도가 좁은 범위에서 유지되도록 하는 기전은 신경계에서 아주 중요한 의미가 있다. 신경전달물질에 의한 N형 칼슘통로의 억제기전은 신경전달물질의 유리를 감소시키는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ N형 칼슘통로의 작용을 조절하는 또 다른 기전으로는 비활성화기전을 생각할 수 있다. 그러므로 N형 칼슘통로의 비활성화기전을 밝히고자 하는 본 논문은 신경세포에서의 신경전달물질 유리와 관련하여 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다.

재료 및 방법

1. 세포분리 방법(Cell isolation procedure)

Ehrlich와 Elmslie¹⁸⁾의 방법을 개선하여 시행하였다. 체중 200 gm 내외의 수컷 쥐(sprague dawley rat)를 마취하여 희생시킨 후 양쪽 경동맥 분지부위(carotid bifurcation)에서 상경동맥신경절(superior cervical ganglion)을 분리하였다. 신경절을 몇 조각으로 자른 후 37°C에서 1시간 동안 효소 용액 내에서 진탕처리하였다. 10% fetal calf serum을 첨가하여 효소 작용이 더 이상 진행되지 못하도록 중지시켰다. 세포부유액을 배양접시에 분주한 후 실험할 때까지 4°C 냉장고에 보관하였다.

2. 전기생리학적 기록(Electrophysiological recording)

Whole cell configuration patch clamp technique을 사용하여 칼슘전류를 기록하였다. Corning 7740 유리(I.D. 0.9 mm, O.D. 1.5 mm, Garner Glass Co)를 사용하여 puller P-97 (Sutter Instrument Co., USA)로 저항이 1~2 MΩ이 되는 전극을 제작하였으며 평균 직렬저항(series resistance, R_s)은 $3.52 \pm 1.13 \text{ M}\Omega$ ($\pm \text{S.D.}$, $n=70$)이었다. 직렬저항의 보정은 80% 이상 해주었다. 막전류의 기록을 위하여 전압자극(voltage steps)은 pClamp software (Axon Instruments, USA)로 필요한 자극 protocol을 만든 후 세포에 인가하였다. 이때 기록된 전류 데이터는 EPC-7 (List Electronics, Germany)의 4 pole low pass Bessel filter를 거쳐 12 bit A/D converter (Labmaster, Warner Instrument Corp, USA)로 digitization 후 PC에 저장하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

3. 용액조성(Solutions)

사용한 용액의 조성은 다음과 같다. 표준 세포외 용액 (단위 mM): 140 TEA-Cl, 11 HEPES, 5 glucose, 1 MgCl_2 , 5 BaCl_2 or CaCl_2 . 세포내 용액 (단위 mM): 120 NMG-Cl, 10 TEA-Cl, 14 Creatine- PO_4 , 6 MgCl_2 , 10 NMG-HEPES, 5 Tris-ATP, 11 NMG₂-EGTA, 2 $\text{Li}_3\text{GDP-}\beta\text{-S}$. 순수한 비활성화 효과만을 관찰하기 위하여 G 단백질에 의한 경로를 차단하고자 $\text{Li}_3\text{GDP-}\beta\text{-S}$ 를 사용하였다.

일가양이온이 N형 전류에 미치는 영향을 보고자하는 실험에서 사용한 세포외 용액은 다음과 같다. (단위 mM): 150 methylamine chloride (MA-Cl), 10 NMG-HEPES, 15 glucose and 10 NMG₂-EGTA. Cs^+ 이나 Na^+ 대신 MA^+ 를 사용한 이유는 MA^+ 가 칼슘채널 투과도가 우수하여 오로지 칼슘채널을 통한 전류만을 분리할 수 있기 때문이다.¹⁹⁾ 세포

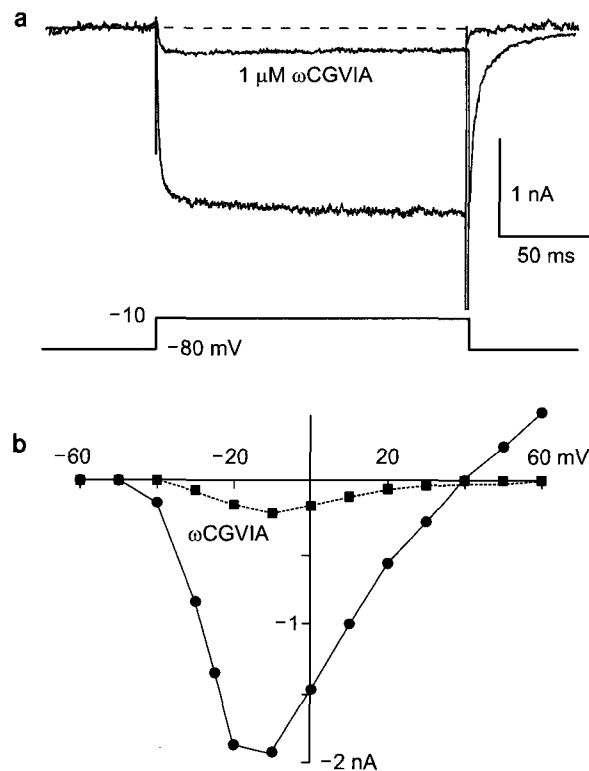


Fig. 1. N-channels generate the majority of current carried by MA^+ . (a) Calcium currents were recorded using MA^+ as the permeant ion before and after $1 \mu\text{M}$ ωCGVIA application. The voltage step duration was 150 ms. Note the slowly deactivating current at -80 mV that is lost after block by ωCGVIA . (b) The MA^+ current-voltage (I-V) relationship measured from peak current at each indicated voltage recorded before and after $1 \mu\text{M}$ ωCGVIA . Same cell as in panel A.

외 용액과 세포내 용액의 오스몰농도는 각각 300 mOsm 과 290 mOsm로 맞추어 사용하였다.

4. Data 분석(Data analysis)

PC로부터 전류 데이터를 재생한 후 Igorpro software (WaveMetrics, USA)를 사용하여 분석하였고 curve fitting을 위하여 Marquardt-Levenberg algorithm을 사용하여 전류기록을 가장 잘 반영하는 이중지수함수($Y=A_{offset} + A_s \exp(-t/\tau_s) + A_f \exp(-t/\tau_f)$)를 도출하였다; A_{offset} : offset amplitude, A_s : 느린 지수함수의 amplitude, A_f : 빠른 지수함수의 amplitude, τ_s : 느린 지수함수의 시정수, τ_f : 빠른 지수함수의 시정수.

비활성화를 정량화하기 위하여 최고전류(peak current, I_{Peak})를 5초 저분극 후의 전류(end current, I_{End})로 나눈 후 $1-(I_{End}/I_{Peak})$ 로 표시하였다. 데이터는 mean \pm SD로 표시하였으며 통계적 유의성을 알아보기 위하여 Student t-test를 사용하였다.

결 과

1. N형 전류의 분리(N-current isolation by ω -conotoxin GVIA)

MA^+ 을 charge carrier로 사용 시 기록되는 대부분의 전류

가 N형 칼슘전류임을 확인하기 위하여 N형 칼슘통로만을 선택적으로 억제하는 ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx)($1 \mu M$)을 처리하였다. 그리고 ω -CgTx 처리 전, 후의 전류기록을 비교하여 보았다(Fig. 1).

ω -CgTx 처리 시 MA^+ -전류가 $79.4 \pm 17.8\%$ (n=5) 억제되었다. 이는 본 연구자가 5 mM Ba^{2+} 을 사용하면서 ω -CgTx의 억제효과를 보았을 때의 결과($61 \pm 12\%$, n=6)와 일치할 뿐만 아니라 다른 연구자의 결과와도 잘 부합함으로^{20,21)} MA^+ -전류의 대부분은 N형 칼슘전류임을 확인할 수 있었다.

2. 1가 양이온(MA^+)이 비활성화에 미치는 효과(Effects of monovalent cation permeation on Inactivation)

1) 전류-전압 곡선

Charge carrier로 5 mM Ba^{2+} 을 사용 시는 최대전류가 -10 mV에서 관찰되었으나(Fig. 2a) MA^+ 를 사용 시는 최대전류가 -20 mV에서 관찰되었다(Fig. 2b). 또한 MA^+ 사용 시는 전류가 느리게 활성화(slow activation)되었고, 느린 탈활성화(deactivation)를 보였다.

2) 빠른 비활성화 성분의 소실 및 비활성화정도의 감소
 최대 MA^+ -전류가 관찰되는 전압은 최대 Ba^{2+} -전류가

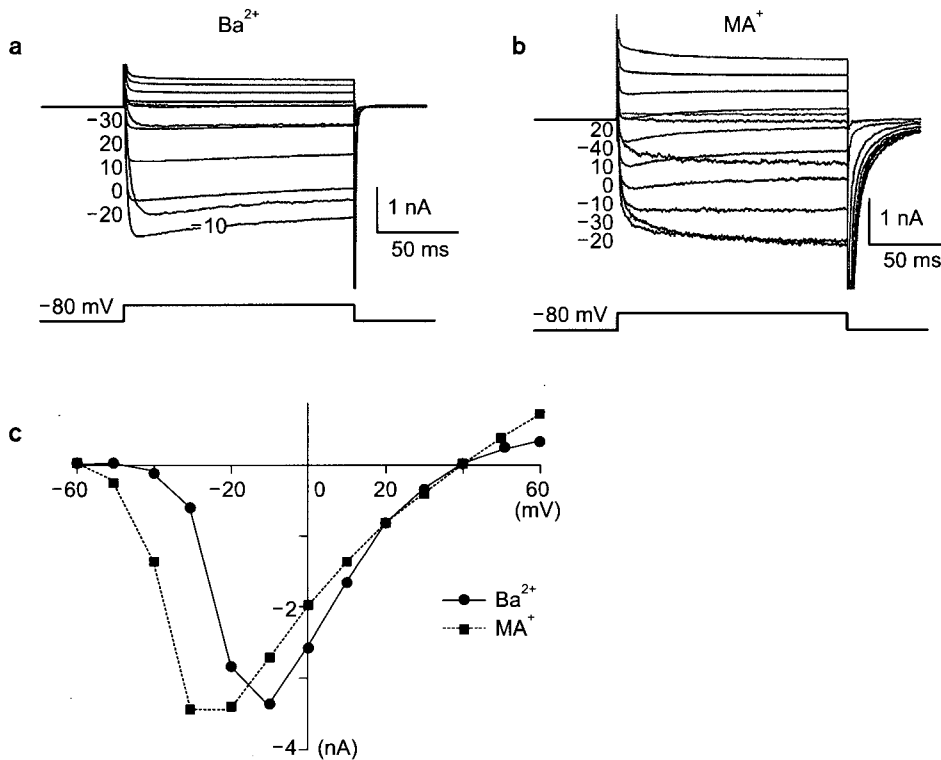


Fig. 2. Current-voltage relationship of N-current. (a) Calcium currents were recorded using 5 mM Ba^{2+} as the permeant ion. 150 ms depolarizing pulses of variable amplitude (from -60 mV to 60 mV) were given from a holding potential of -80 mV. The number next to the current trace shows the voltage at which the current was recorded. (b) Calcium currents were recorded using methylamine (MA^+) as the permeant ion. Same 150 ms voltage protocol was used as in A. The number next to the current trace shows the voltage at which the current was recorded. (c) The I-V relationship measured from peak currents recorded in either 5 mM Ba^{2+} or MA^+ .

관찰되는 전압보다 10 mV 과분극된 전압이다(Fig. 2c). 따라서 MA⁺-전류의 비활성화를 보기 위하여 인가하는 전압을 Ba²⁺에 비해 10 mV 과분극된 전압을 사용하였다. 즉 Ba²⁺-전류는 -10 mV, MA⁺-전류는 -20 mV로 5초 동안 저분극시키면서 비활성화 정도를 비교하였다. Ba²⁺-전류를 curve fitting 시 빠른 지수함수와 느린 지수함수의 합으로 잘 그려진 반면($\tau=201.7\pm 85.5$ ms, 2.9 ± 0.3 s), MA⁺-전류는 빠른 성분은 없어지고 느린 성분만을 가지는 단일 지수함수로($\tau=3.4\pm 1.1$ s, $n=5$) 잘 그려졌다. 그리고 Ba²⁺-전류와 MA⁺-전류의 느린 성분은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.34$)(Fig. 3a).

재료 및 방법에서 기술한 대로 5초 동안 저분극 자극을

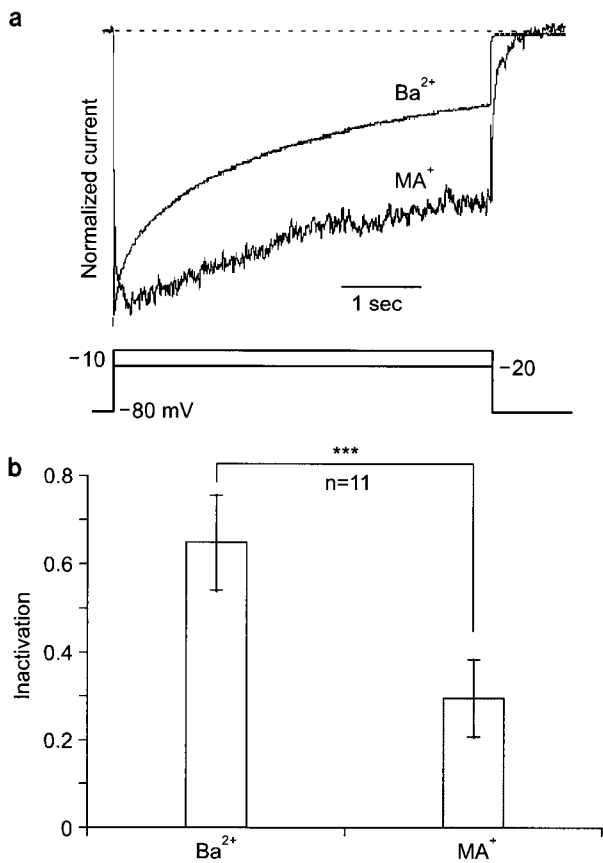


Fig. 3. Fast N-channel inactivation is absent during monovalent cation permeation. (a) Calcium currents were normalized to the peak to compare the time course of inactivation during permeation by 5 mM, Ba²⁺ and 150 mM MA⁺. 5-sec depolarizing pulses were applied to voltages generating peak current (indicated on voltage protocol). (b) Inactivation was calculated as $1-(I_{End}/I_{Peak})$ and was compared in the same cells when either Ba²⁺ or MA⁺ permeated the channels (***: $p<0.001$). I_{End} was measured at the end of the 5 sec voltage step.

인가하고 비활성화 정도는 $1-(I_{End}/I_{Peak})$ 로 비교하였다. 5 mM Ba²⁺에서는 $64\pm 11\%$ ($n=11$)의 비활성화 정도를 보인 반면 MA⁺로 치환 시는 비활성화 정도가 $29\pm 9\%$ ($n=11$)로 감소하였으며 이는 통계적으로 유의하였다($p<0.001$)(Fig. 3b).

3. 느린 비활성화 시정수 비교(Comparison of slow inactivation τ in MA⁺ and Ba²⁺)

본 실험에서 비활성화를 비교하기 위하여 MA⁺에서는 Ba²⁺에 비해 10 mV 과분극된 전압을 사용하였다. 그 타당성을 검증하기 위하여 4가지 전압값에서 Ba²⁺과 MA⁺의 느린 비활성화 시정수를 비교하였다. 그 결과 Ba²⁺에 비해 10 mV 과분극된 전압에서의 MA⁺-전류데이터를 사용하는 경우에 느린 비활성화 시정수가 서로 잘 일치하였다. 그러므로 MA⁺에서는 Ba²⁺에 비해 10 mV 과분극된 전압을 사용하는 타당성이 검증되었다. 또한 MA⁺, Ba²⁺ 모두에서 막전압이 저분극될수록 느린 비활성화 시정수가 감소하는 전형적인 VDI 기전과 부합되는 소견을 보였다(Fig. 4).

4. U형 비활성화(U-shape inactivation)

MA⁺-전류에서 빠른 비활성화 성분이 없어지는 것을 확인한 후 prepulse-postpulse protocol을 사용하여 각 전압별로 비활성화를 관찰하였다. Ba²⁺-전류에서는 최대전류를 보이는 전압에서 비활성화가 최대가 되는 반면 과분극 또는 최대저분극 전압에서 비활성화가 감소하는 전형적인 U형 비활성화를 보였다. 반면 MA⁺-전류에서는 postpulse-전류가 prepulse-전류보다 크게 나타나는 facilitation 현상으로

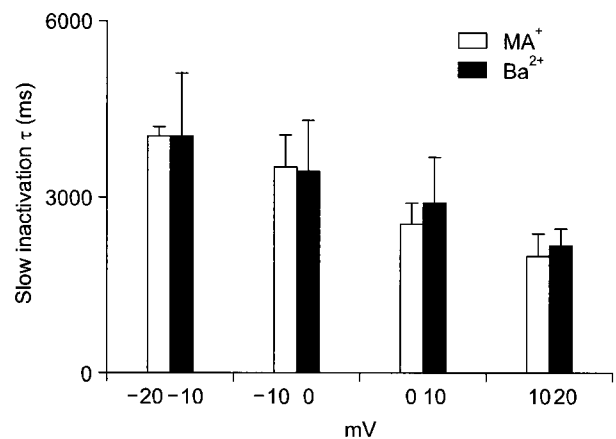


Fig. 4. Comparison of slow inactivation τ in MA⁺ and Ba²⁺. The voltage-dependence of slow inactivation is not affected by MA⁺. Slow inactivation τ from exponential fitting is shown in Ba²⁺ and MA⁺. The MA⁺ data is 10 mV hyperpolarized to that in Ba²⁺ to account for surface charge effects.

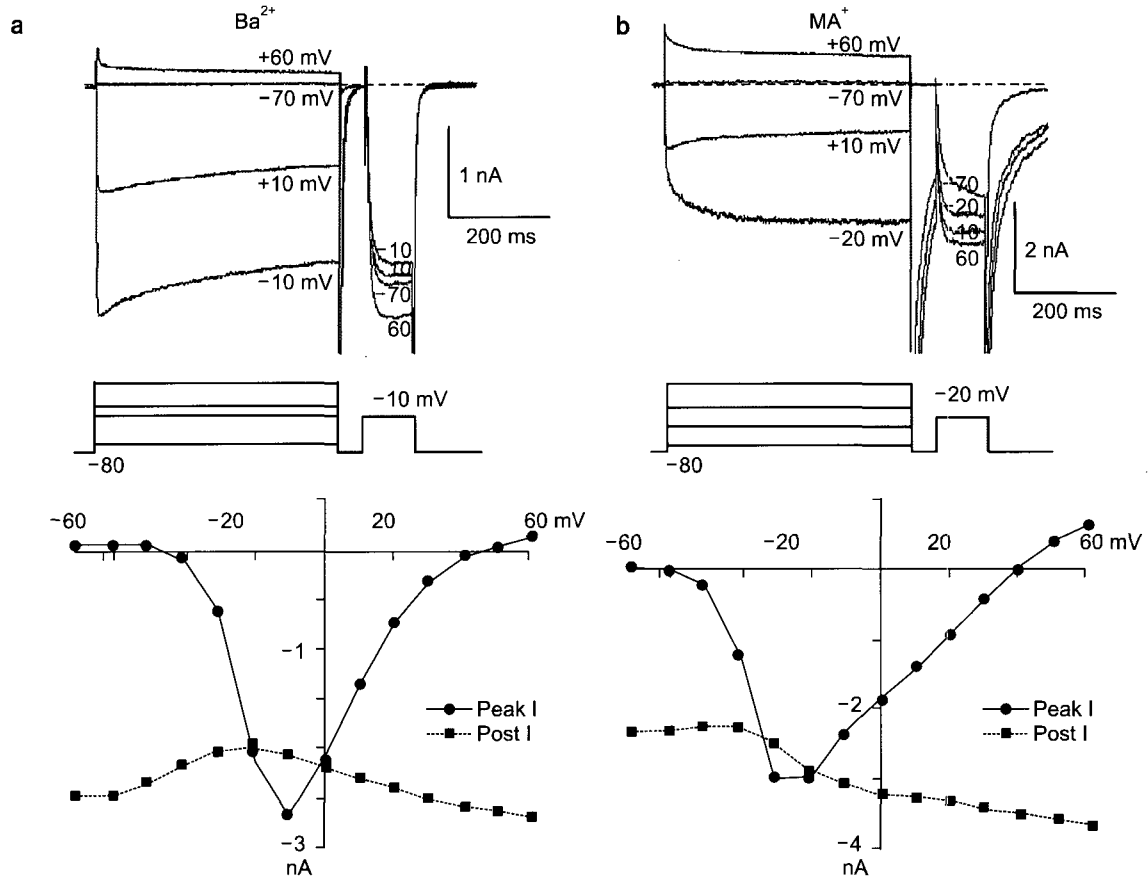


Fig. 5. Activation and deactivation is slower with MA^{+} than with Ba^{2+} . 500 ms depolarizing pulses of variable amplitude were given from a holding potential of -80 mV to induce inactivation. This prepulse step followed by a second pulse (postpulse) to the voltage giving maximal inward current (-10 mV in Ba^{2+} and -20 mV in MA^{+}) to assay inactivation. Data are shown for a single cell exposed to either Ba^{2+} (a) or MA^{+} (b). The prepulse voltage is indicated next to its corresponding current. Current-voltage (I-V) curves are shown with currents measured at the peak current during prepulse (●) and postpulse (■). The data points are averages of two protocols with prepulse voltages given in ascending and descending order. This was done to compensate for slow changes in current amplitude (e.g. rundown) during these long protocols. With Ba^{2+} , the I-V curve shows U-type inactivation but with MA^{+} , postpulse current shows facilitation.

인하여 U형 비활성화 여부가 확실히 구분되지 않았다 (Fig. 5).

고 찰

Cox와 Dunlap⁸⁾은 병아리 감각신경(chick sensory neuron)에서 1가 양이온을 charge carrier로 사용 시 빠른 비활성화 성분이 소실됨을 보였고 그들은 이 결과를 N형 칼슘통로 비활성화기전으로서 CDI를 주장하는 근거로 사용하였다. 쥐 교감신경 뉴론을 사용한 본 실험에서도 MA^{+} 를 charge carrier로 사용 시 빠른 비활성화 성분이 소실됨이 확인되었다. 1가 양이온 투과 시 비활성화정도가 감소하는 현상

은 CDI로 설명할 수도 있으나 세포밖 칼슘이 빠른 비활성화에 필요하다는 본 논문의 가설과도 잘 부합된다. MA^{+} 사용 시 느린 비활성화 성분은 변화가 없었다는 것을 첫째, 느린 비활성화 시정수가 약 40 mV 범위에 걸쳐서 변화가 없었으며, 둘째, 느린 비활성화정도에 변화가 없었다는 사실로부터 확인할 수 있었다.

Cox와 Dunlap⁸⁾은 또한 비활성화-전압 곡선의 U자 모양이 1가 양이온 투과 시는 소실됨을 보였는데 이는 CDI와 부합되는 현상임과 동시에 우리의 2가 양이온 투과성 비활성화 가설과도 잘 일치한다. 우리는 prepulse-postpulse protocol을 사용하여 1가 양이온 투과 시에도 U형 VDI 기전이 존재하는지 알아보려고 하였다. 그러나 U형 비활성

화는 관찰하지 못하고 postpulse-전류의 facilitation만을 관찰할 수 있었다. Cox와 Dunlap⁸⁾의 실험결과에서도 우리 연구에서처럼 1가 양이온 투과 시 N형 통로의 탈활성화가 느려진다는 것이 관찰되었다. 아마도 이러한 느린 탈활성화로 인해 facilitation이 나타났을 가능성을 생각할 수 있다. 즉 postpulse가 인가된 후에도 느린 탈활성화현상으로 인해 많은 수의 N형 통로가 아직도 닫히지 못하고 열린 채로 유지되었기 때문에 facilitation 현상이 보인 것이 아닌가 추측된다. 그 기전이야 무엇이건간에 칼슘전류의 facilitation 현상으로 인해 MA⁺ 투과 시 빠른 비활성화 성분이 과연 VDI 기전에 의해 매개되는지 알아보기가 어려웠다. 그러므로 추후 MA⁺ 투과 시 -80 mV의 고정전압(holding potential)이 아니라 좀 더 과분극된 고정전압을 사용하여 탈활성화를 가속화시킨 후 U형 비활성화가 계속 관찰되는지 여부를 보는 실험을 실시해야 할 것이다.

MA⁺ 투과 시 느린 탈활성화 외에도 느린 활성화가 관찰되었다. 전류-전압 곡선은 MA⁺로 치환 시, 2가 양이온

이 존재(5 mM Ba²⁺) 할 때에 비하여 왼쪽으로 이동되므로 느린 탈활성화는 어느 정도 예상되는 현상이나 느린 활성화는 전혀 예상되지 않은 현상이다. 느린 활성화는 노아드레날린 같은 신경전달물질에 의한 막전압의존성 N형 전류 억제(voltage dependent inhibition of N-current)에서 주로 관찰²²⁾ 되는 현상이다. 본 실험에서는 2 mM GDP-βS를 세포내 용액에 사용하여 G-protein을 매개로 하여 일어나는 전압의존성 N형 전류 억제기전을 막았으므로 이러한 기전에 의해 느린 활성화가 일어난 것은 아니라고 생각한다. 2가 양이온 소실 시 N형 통로 활성화가 왜 느리게 진행되는가에 관해서는 추후 연구가 진행되어야 할 것이다.

1. 2가 양이온 의존성 빠른 비활성화의 제안(Hypothesized mechanism for divalent cation dependent fast inactivation)

본 연구를 통하여 칼슘이 빠른 비활성화 성분에 기여하는 것은 사실이나 분명한 것은 전형적인 CDI 기전을 통하

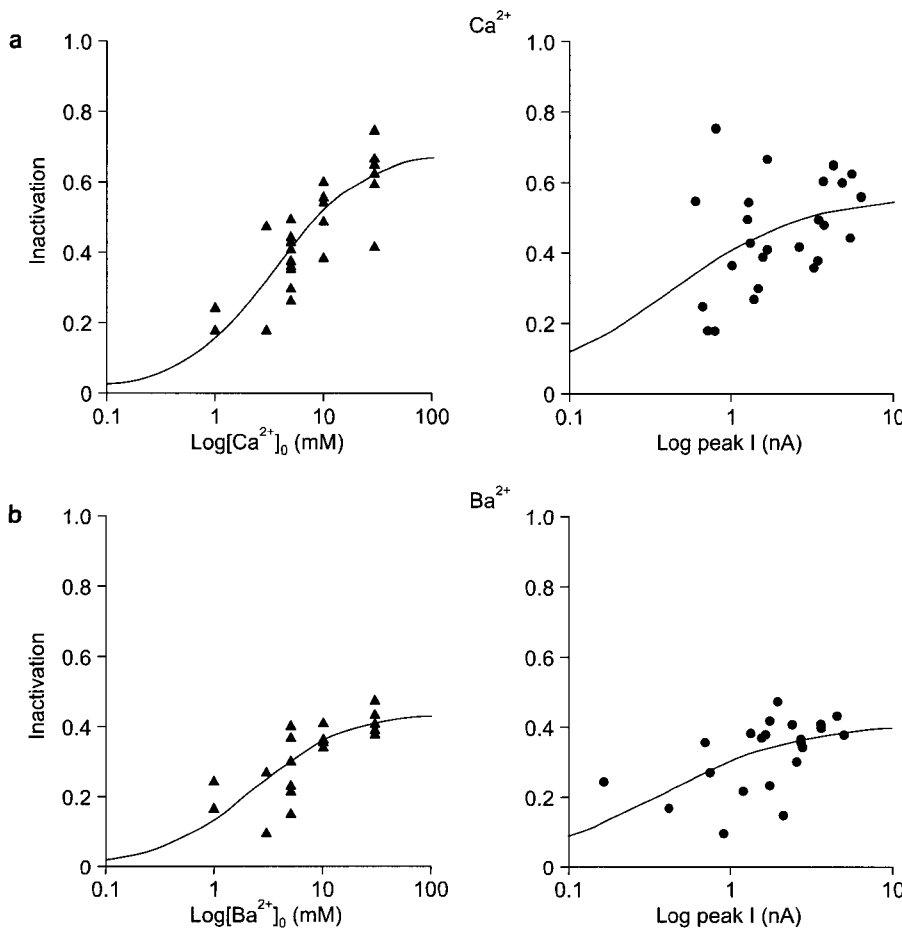


Fig. 6. The increase of inactivation is better correlated with external Ca²⁺ concentration than peak current increase. Inactivation was measured using the 500 ms prepulse-50 ms postpulse protocol described in fig. 5. (a) A plot of inactivation vs. external Ca²⁺ concentration (left). The smooth line is a fit to a single site-binding isotherm with a maximal inactivation of 0.69 and an IC₅₀ of 3.6 mM. A plot of inactivation vs. peak current amplitude (right). The smooth line is a fit to a single site-binding isotherm with a maximal inactivation of 0.56 and an IC₅₀ of 0.39 mM (n=21). (b) A plot of inactivation vs. external Ba²⁺ concentration (left). The smooth line is a fit to a single site-binding isotherm with maximal inactivation of 0.44 and IC₅₀ of 2.3 mM. A plot of inactivation vs. peak current amplitude (right). The smooth line is a fit to a single site-binding isotherm with a maximal inactivation of 0.41 and an IC₅₀ of 0.36 mM (n= 22).

여 일어나지는 않는다는 것을 확인하였다. N형 통로의 빠른 비활성화는 Patil 등¹²⁾이 제안한 preferential intermediate closed state model인 U형 비활성화 모델로 잘 설명된다. 칼슘이 N형 통로 비활성화를 증가시키는 본 실험결과를 설명하기 위하여 우리는 2곳의 칼슘 결합부위를 가정하였다. 세포밖 칼슘농도가 증가함에 따라 비활성화가 증가하는

좋은 상관관계를 보이나 칼슘전류의 크기와 비활성화는 상관관계가 미미하였으므로 비활성화를 위하여 칼슘투과가 선행될 필요는 없는 것으로 간주된다(Fig. 6). 그러므로 결합부위는 세포외 용액에 노출되어 있어야 한다. 그리고 바로 이런 특징이 CDI와 본 가설을 구별해주는 중요한 차이점이다. 첫 번째 결합부위(site 1)는 2가 양이온이 결합되

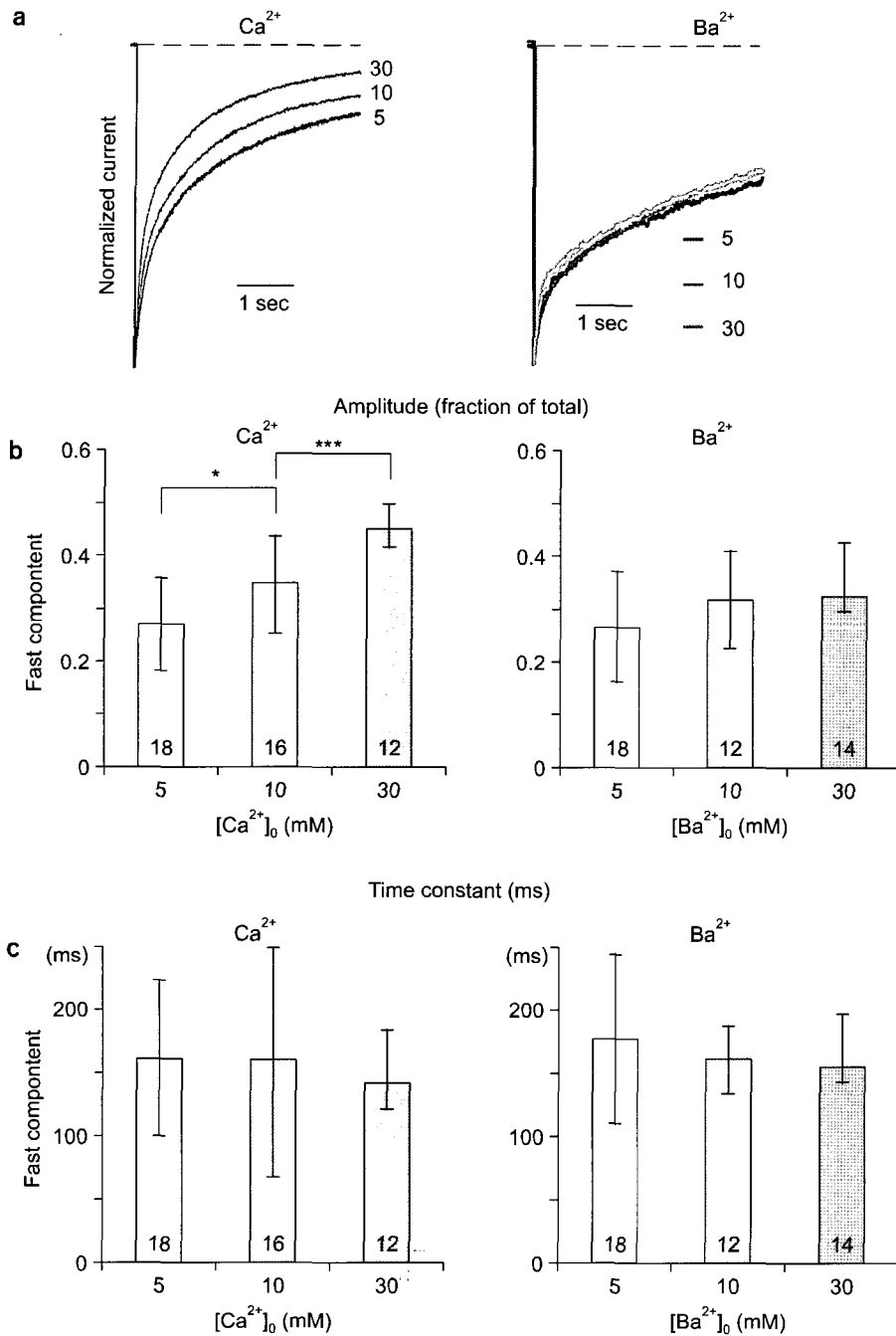


Fig. 7. Effects of changing external divalent cation concentration on inactivation of Ca²⁺ channel. (a) Calcium channel currents were recorded in 5 mM, 10 mM and 30 mM Ca²⁺ (left) and Ba²⁺ (right). Different cells were used for Ca²⁺ and Ba²⁺. 5-sec depolarizing pulses were given from a holding potential of -80 mV to the potentials that generated peak current. Current traces were normalized to the peak current. (b, c) The parameters of fast and slow components of inactivation were obtained from double exponential fits to currents generated during 5-sec voltage steps. Only the amplitude (b) and the τ (c) of fast component of inactivation were shown. Amplitude and τ of fast components of inactivation were compared for different concentrations of Ca²⁺ (left) and Ba²⁺ (right). Kruskal-Wallis test was used to test significant differences (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). The number of cells tested is indicated in the bar graph in panels (b, c).

어야 U형 비활성화가 일어난다. Site 1은 칼슘과 바륨 모두 결합할 수 있는 것으로 보이는데 그 이유는 칼슘, 바륨 모두에서 빠른 비활성화 성분이 관찰되는 반면 1가 양이온 투과 시는 빠른 비활성화 성분이 소실되기 때문이다. 두 번째 결합부위(site 2)는 칼슘에 대해서만 선택성을 보이는 것으로 간주된다. 그 이유는 5 mM 사용 시에는 칼슘, 바륨 모두에서 비활성화 특징이 유사하나 5 mM 이상의 칼슘을 사용할 때에는 칼슘농도 의존적으로 비활성화가 증가하였기 때문이다(Fig. 7).

Selectivity filter에는 칼슘과 바륨이 모두 결합할 수 있기 때문에 site 1의 후보로는 selectivity filter를 생각할 수 있다.²³⁻²⁵⁾ 최근에 칼슘의 결합부위는 N형 통로의 세포밖 면에 위치하는 domain III, S5-H5임이 알려졌다.²⁶⁾ 이 부위는 바로 EF-hand motif와 일치하는 부위이다. 이 site에 돌연변이를 일으킨 결과 N형 통로 투과도가 변화했다는 사실은 이 site가 칼슘의 결합부위라는 증거로 여겨진다. EF-hand motif를 가지는 단백질은 칼슘에 비하여 아주 낮은 바륨 친화도(affinity)를 가질 것으로 예측되며 이러한 특징은 site 2의 중요한 성질 중의 하나이다.²⁷⁾

순수한 전기생리학적 실험만으로는 이러한 결합부위에 대한 정확한 정보를 얻기는 어렵다. 결국 전기생리학과 분자생물학이 접목된 연구기법을 사용하여야 2가 양이온의 결합부위에 관한 해답이 명확해질 것이다.

본 연구결과를 다시 요약하면 N형 통로의 빠른 비활성화를 위하여 세포외 용액에 2가 양이온이 필요하며 이러한 2가 양이온 의존성 기전은 기존에 알려진 CDI나 VDI와 완전히 다른 기전임을 제안한다.

참 고 문 헌

1. Fox AP: Voltage-dependent inactivation of a calcium channel. Proc Natl Acad Sci USA 78:953-956 (1981)
2. Gutnick MJ, Lux HD, Swandulla D, Zucker H: Voltage-dependent and calcium-dependent inactivation of calcium channel current in identified snail neurons. J Physiol (London) 412:197-220 (1989)
3. Giannattasio B, Jones SW, Scarpa A: Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line: calcium dependent and voltage dependent inactivation. J Gen Physiol 98: 987-1003 (1991)
4. Yue DT, Backx PH, Imredy JP: Ca-sensitive inactivation in the gating of single Ca²⁺ channels. Science 250:1735-1738 (1991)
5. Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT: Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. Neuron 22:549-558 (1999)
6. Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H: Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. Nature 399:159-162 (1999)
7. Erickson MG, Alseikhan BA, Peterson BZ, Yue DT: Pre-association of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells. Neuron 31:973-85 (2001)
8. Cox DH, Dunlap K: Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. J Gen Physiol 104:311-336 (1994)
9. Morad M, Davies NW, Kaplan JH, Lux HD: Inactivation and block of calcium channels by photo-released Ca²⁺ in dorsal root ganglion neurons. Science 241:842-844 (1988)
10. Schroeder JE, Fischbach PS, Mamo M, McCleskey EW: Two components of high-threshold Ca²⁺ current inactivate by different mechanisms. Neuron 5:445-452 (1990)
11. Jones SW, Marks TN: Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. II. Inactivation. J Gen Physiol 94:169-182 (1989)
12. Patil PG, Brody DL, Yue DT: Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. Neuron 20:1027-1038 (1998)
13. Jones LP, DeMaria CD, Yue DT: N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. Biophys J 76:2530-2552 (1999)
14. Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA, Yue DT: Unified mechanisms of Ca²⁺ regulation across the Ca²⁺ channel family. Neuron 39:951-960 (2003)
15. Goo YS, Elmslie KS: Role of Ca²⁺ in inactivation of N-type calcium current in rat sympathetic neurons. Korean J Med Phys 14:54-67 (2003)
16. Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, et al: Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. Physiol Rev 79: 1019-1088 (1999)
17. Koh DS, Hille B: Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry. Proc Natl Acad Sci USA 94:1506-1511 (1997)
18. Ehrlich I, Elmslie KS: Neurotransmitters acting via different G proteins inhibit N-type calcium current by an identical mechanism in rat sympathetic neurons. J Neurophysiol 74:2251-2257 (1995)
19. Liang H, Elmslie KS: Rapid and reversible block of n-type calcium channels (CaV 2.2) by omega-conotoxin GVIA in the absence of divalent cations. J Neurosci 22:8884-8890 (2002)
20. Zhu Y, Ikeda SR: Adenosine modulates voltage-gated Ca²⁺ channels in adult rat sympathetic neurons. J Neurophysiol 70: 610-620 (1993)
21. Zhu Y, Ikeda SR: VIP inhibits N-type Ca²⁺ channels of sympathetic neurons via a pertussis toxin-insensitive but cholera toxin-sensitive pathway. Neuron 13:657-669 (1994)
22. Elmslie KS, Zhou W, Jones SW: LHRH and GTP-gam-

- ma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 5:75-80 (1990)
23. **Almers W, McCleskey EW**: Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. *J Physiol* 353:585-608 (1984)
24. **Hess P, Tsien RW**: Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309:453-456 (1984)
25. **Carbone E, Lux HD, Carabelli V, Aicardi G, Zucker H**: Ca^{2+} and Na^{+} permeability of high-threshold Ca^{2+} channels and their voltage-dependent block by Mg^{2+} ions in chick sensory neurones. *J Physiol* 504:1-15 (1997)
26. **Feng ZP, Hamid J, Doering C, et al**: Amino acid residues outside of the pore region contribute to N-type calcium channel permeation. *J Biol Chem* 276:5726-5730 (2001)
27. **Gu C, Cooper DM**: $\text{Ca}(2+)$, $\text{Sr}(2+)$, and $\text{Ba}(2+)$ identify distinct regulatory sites on adenylyl cyclase (AC) types VI and VIII and consolidate the apposition of capacitative cation entry channels and $\text{Ca}(2+)$ -sensitive ACs. *J Biol Chem* 275:6980-6986 (2000)

Divalent Cation-dependent Inactivation of N-type Calcium Channel in Rat Sympathetic Neurons

Yongsook Goo

Department of Physiology, Chungbuk National University School of Medicine, Cheongju, Korea

Experiments from several groups including ours have demonstrated that Ca^{2+} can enhance the inactivation of N-type calcium channels. However, it is not clear if this effect can be ascribed to a "classic" Ca^{2+} -dependent inactivation (CDI) mechanism. One method that has been used to demonstrate CDI of L-type calcium channels is to alter the intracellular and extracellular concentration of Ca^{2+} . In this paper we replaced the external divalent cation to monovalent ion (MA^{+}) to test CDI. In the previous paper, we could separate fast ($\tau \sim 150$ ms) and slow ($\tau \sim 2,500$ ms) components of inactivation in both Ba^{2+} and Ca^{2+} using 5-sec voltage step. Lowering the external divalent cation concentration to zero abolished fast inactivation with relatively little effect on slow inactivation. Slow inactivation τ correspond very well with provided the MA^{+} data is shifted 10 mV hyperpolarized and slow inactivation τ decreases with depolarization voltage in both MA^{+} and Ba^{2+} , which consistent with a classical voltage dependent inactivation (VDI) mechanism. These results combined with those of our previous paper lead us to hypothesize that external divalent cations are required to produce fast N-channel inactivation and this divalent cation-dependent inactivation is a different mechanism from classic CDI or VDI.

Key Words: N-type calcium channel, Ca^{2+} -dependent inactivation, voltage-dependent inactivation, divalent cation-dependent inactivation