

Modulation of GABA_A Receptor by Protein Kinase C in Autonomic Major Pelvic Ganglion Neurons

Yeun Jong Choi¹, Seung-Kyu Cha¹, Dae-Ran Kim² and In Deok Kong^{1,†}

¹Department of Physiology and Institute of Lifelong Health, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Gangwon, 220-701, Korea.

²Department of Basic Nursing Science, College of Nursing, Keimyung University, Daegu, 700-712, Korea

γ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and its actions are mediated by subtypes of GABA receptors named as GABA_A, GABA_B, and GABA_C. GABA_A receptor consisting of α , β , γ and δ subunits is a heterooligomeric ligand-gated chloride channel. This study was performed to investigate regulation of GABA_A receptor by protein kinase C (PKC). Ion currents were recorded using gramicidine-perforated patch and whole cell patch clamp. mRNA encoding the subunits of PKC expressed in major pelvic ganglion (MPG) neurons was detected by using RT-PCR. The GABA-induced inward current was increased by PKC activators and decreased by PKC inhibitors, respectively. These effects were not associated with intracellular Ca²⁺ and OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol), a membrane permeable diacylglycerol (DAG) analogue. These results mean that the subfamily of PKC participating in activation of GABA_A receptor would be an atypical PKC (aPKC). Among these, ξ isoform of aPKC was detected by RT-PCR. Taking together, we suggest that excitable GABA_A receptor in sympathetic MPG neuron seemed to be regulated by aPKC, particular in ξ isoform. The regulatory roles of PKC on excitatory GABA_A receptors in sympathetic neurons of MPG may be an important factor to control the functional activity of various pelvic organs such as bowel movement, micturition and erection.

Key Words: GABA_A receptor, Protein kinase C, Major pelvic ganglia

서 론

GABA (γ -aminobutyric acid)는 포유류의 중추신경계에서 주된 억제성 신경전달물질의 하나로 널리 알려져 있으며, GABA가 수용체에 결합하여 그 작용을 나타낸다. 최근 들어 말초신경계인 주골반 신경절에도 GABA 수용체가 풍부하게 발현되어 있음이 밝혀지고 있으며 (Gill et al., 2004; Kim, 2006; Park et al., 2006) 수용체의 작용기전을 탐색하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

GABA 수용체는 몇 가지 효현제나 길항제들의 효과와 작용기전에 따라 GABA_A 수용체, GABA_B 수용체 및 GABA_C 수용체 등 3가지 아형 (subtype)이 보고되고 있다 (Barnard et al., 1998; Lu et al., 1999). 중추신경계에서 GABA

의 억제성 효과는 ionotropic 수용체인 GABA_A 수용체와 metabotropic 수용체인 GABA_B 수용체에 의해 조절되며, 특히 GABA_A 수용체가 빠른 억제성 신경전달에 있어 중요한 역할을 한다 (Michels and Moss, 2007). 즉, GABA가 GABA_A 수용체에 결합하면 음이온 채널이 개방되고 이 채널을 통해 Cl⁻이 세포내로 유입되면서 막전압을 과분극 (hyperpolarization)시키면서 억제성 효과를 나타내게 된다 (Farrant and Nusser, 2005). GABA_A 수용체는 다섯 개의 소단위 (subunit)로 구성된 오합체 구조 (pentameric structure)로 된 이온통로로, 서로 다른 7종류의 소단위 (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ 1, ϵ 1, θ 1, ρ 1-3)가 알려져 있다 (Mohler et al., 2005).

골반총 (pelvic plexus)에는 장하부 (lower bowel) 및 비뇨생식계를 비롯한 여러 골반 장기를 지배하는 자율신경이 분포하는데, 골반 자율신경절 (pelvic autonomic ganglia)은 척수와 말초 기관들 간의 구심성 (efferent) 및 원심성 (afferent) 신호들을 전달함으로써 비뇨생식계를 비롯한 골반내 장기의 기능유지에 매우 중요한 역할을 담당하

*논문 접수: 2008년 3월 31일

수정재접수: 2008년 6월 2일

†교신저자: 공인덕, (우) 220-701 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주의과대학 생리학교실

Tel: 033-741-0292, e-mail: kong@yonsei.ac.kr

고 있다. 수컷 쥐의 골반 자율신경절인 주골반 신경절 (major pelvic ganglia, MPG)은 방광, 전립선 및 음경등과 같은 비뇨생식계 기관과 일부의 장 (bowel)을 지배하며 (Keast, 1991; De Groat and Booth, 1993), 배뇨, 배변, 발기 및 사정 등과 같은 자율신경 기능을 조절한다 (Zoubek et al., 1993). 뿐만 아니라 방광출구 폐쇄나 발기 부전과 같은 병적 상태에서는 MPG의 형태적 및 기능적인 변화가 보고된 바 (Mills et al., 1992), 골반 장기의 자율신경계 조절에 관한 생리적 혹은 병태 생리적 연구에 있어서 MPG는 유용한 모델이라 할 수 있다 (Keast, 1999).

MPG에는 GABA_A 수용체가 발현되어 있으며, 특징적으로 MPG 세포들 중 교감신경세포에 선택적으로 분포되어 있음이 밝혀졌다 (Park et al., 2006). 또한 중추신경계에서의 억제성 효과와는 반대로 MPG에서 GABA는 흥분성 작용을 나타내었으며, protein kinase A (PKA)가 GABA_A 수용체의 작용기전을 일부 조절하는 것으로 보고되었다 (Kim, 2006). GABA_A 수용체는 PKA, protein kinases C (PKC), Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II, tyrosine kinases 등과 같은 protein kinases에 의해 인산화되는 여러 조절 부위를 가지고 있으며 (Moss and Smart, 1996; Song and Messing, 2005), 특히 선행연구들을 통해 GABA_A 수용체의 조절에 PKC가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 조절기전은 중추신경계에서 조사되었으며, MPG에 발현되어 있는 GABA_A 수용체의 조절에 관한 연구는 Kim (2006)의 연구 외에는 거의 없다. 뿐만 아니라, PKC에 의한 GABA_A 수용체의 조절양상도 세포에 따라 PKC가 GABA 수용체 전류의 크기를 증가시키거나 감소시키며, 어떤 세포에서는 아무런 영향을 주지 않는 등 다양한 특징을 보여주고 있다 (Kumar, Khisti and Morrow, 2005). 따라서 본 연구는 GABA_A 수용체 조절에 PKA가 일부 관여한다는 사실에 대한 후속 연구로, MPG에 발현되어 있는 GABA_A 수용체의 조절에 또 다른 protein kinase인 PKC가 관여하는지를 규명해 보고자 하였다. 이를 통해 말초자율신경에 미치는 GABA_A 수용체의 영향에 대한 보다 유용한 기초정보를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험동물로는 오리엔트바이오 (한국)로부터 구입한 8주령 (체중 180~200 gm)의 수컷 쥐 (Sprague-Dawley rat)

를 사용하였다.

2. 실험 용액 및 약물

1) 실험 용액

전기생리 실험에 사용할 세포외 관류액의 조성 (mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)으로 하여 실험하였다. GABA 활성화 전류 측정 시 사용할 전극 내 용액의 조성 (mM)은 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 11 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 그리고 2 MgCl₂ (pH 7.2)로 하였다. 단, gramicidin-perforated patch를 위한 전극 내 용액의 조성 (mM)은 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 CaCl₂, 5 NaCl (pH 7.2)으로 하였으며, 전극 내 용액에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 높은 농도로 녹인 gramicidin (gramicidin D)을 최종 농도가 50 µg/ml가 되도록 첨가하여 사용하였다. 약물의 투여는 perfusion valve control system (VC-6M, Warner Instruments, CT, USA)을 이용하였으며, 약물이 나오는 관 끝을 신경세포의 100 µm 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2) 약 물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA)로부터 구입하였으며, GABA는 Tocris (Tocris Cookson Inc., Bristol, UK)로부터 구입하였다. Calbiochem Co. (San Diego, CA, USA)으로부터 PDBu, PMA, 4α-phorbol, GF-109203X, Calpostin C, OAG 등을 구입하였고 gramicidin, DNase type I 등과 세포배양과 관계된 모든 배지 및 약물은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3. 단일 신경세포 분리 및 유지

실험대상 쥐를 pentobarbital sodium (50 mg/kg, *i.p.*)으로 마취시킨 뒤, 개복하여 전립선의 외측에 위치한 MPG를 적출하고, 이를 4°C Hanks' balanced salt 용액에 옮겼다. 수초를 벗기고 작은 틈새를 낸 후 0.7 mg/ml collagenase (type D), 0.1 mg/ml trypsin과 0.1 mg/ml의 DNase type I이 들어있는 10 ml의 modified Earle's balanced salt 용액 (EBSS, pH 7.4)에서 1시간 동안 배양 (35°C)하였다 (Zhu et al., 1995). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들을 배양용기에 넣어 흔들어 분리한 뒤 원심 분리하였다. 분리된 신경세포들을 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 MEM에 재부유시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되

Table 1. Primer sequences for RT-PCR of atypical PKC subunit

	Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Size (bp)	GeneBank Accession #
PKC ξ	Sense	CGATGGGGTGGATGGGATCAAAA	852~874	681	NM 022507
	Antisense	GTATTCATGTCAGGGTTGTCTG	1511~1532		
PKC μ	Sense	GCTTTCTGTGATCACTGTGG	1063~1082	1341	XM 234108
	Antisense	AATCCAAACTGTCCAGAAC	2384~2403		
PKC λ	Sense	GCTTATGTTTGAGATGATGGCGG	1505~1523	197	XM 342223
	Antisense	TGACAACCCAATCGTTCCTTTG	1680~1701		

어 있는 cover glass (직경 12 mm)에 부착시켰다. 이를 37°C 세포 배양기 (humidified incubator; 95% air-5% CO₂)에서 배양하였으며, 분리한 후 24시간 이내에 실험에 사용하였다.

4. 전기생리학적 실험

MPG 세포에서 GABA 전류가 PKC에 의해 조절되는지를 규명하기 위하여 PKC 활성화제와 억제제를 사용하여 whole-cell patch clamp 방법을 활용하였다. 그리고 PKC에 의한 GABA 전류가 세포내 칼슘 의존적인지를 확인하기 위하여 세포내 환경이 유지되는 gramicidin perforated patch 방법을 사용하여 세포내 칼슘을 없앤 상태에서 전기생리학적 실험을 하였다.

전기생리학적 실험은 EPC9 혹은 EPC7 (Instrutech Co. NY, USA) patch clamp 증폭기를 사용하여 측정하였다. 측정 전극은 borosilicate glass capillary (외경; 1.65 mm, 내경; 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co.)로 제작하여 사용하였다. 전극은 Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하였으며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경 (inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 막전압 고정법 (voltage-clamping method)으로 측정 시 세포막 용량 (membrane capacitance)과 직렬저항 (series resistance)은 80% 이상 보정하였으며, 실험 시 sampling rate은 1 kHz, low-pass 필터는 2 kHz (-3dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit (v8.50) (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) 혹은 pClamp6 (Axon Instrument, USA) 소프트웨어를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온 (21~24°C)에서 시행하였다.

5. 역전사 중합 연쇄반응 (RT-PCR)

GABA 전류의 조절에 관여하는 PKC의 아형을 확인하기 위하여 역전사 중합 연쇄반응을 측정하였다. 구체적인 방법으로는 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용하여 MPG 신경세포들로부터 total RNA를 분리하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987). 먼저 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 용해시킨 다음 페놀 (phenol) 및 클로로포름 (chloroform)을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 세워두었다. 이를 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심 분리하여 상청액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상청액은 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70°C에서 1시간 이상 세워 두어 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000 xg로 20분간 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA sample을 얻었다.

cDNA의 합성을 위해 2 μ g RNA와 0.5 μ g random hexamer를 먼저 70°C에서 5분간 반응시키고, 200 units의 murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 25 nmoles의 dNTP, 20 units의 RNase inhibitor (Promega) 등을 혼합하여 (25 μ l) 37°C에서 1시간 반응시켰다. PCR은 atypical PKC isoform에 대한 primer를 이용하여 이루어졌으며, 이들의 염기서열은 Table 1에 요약하였다. PCR 반응액 (50 μ l)에는 합성된 cDNA, 각각의 primer (10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP 등을 혼합하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle 동안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

6. 자료 분석

모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었고, 통계적 검정은 분산분석 (ANOVA)을 사용하였으며, 유의성이 있을 경우 Turkey 방법을 사용하여 각 군 간의 차이를 사후

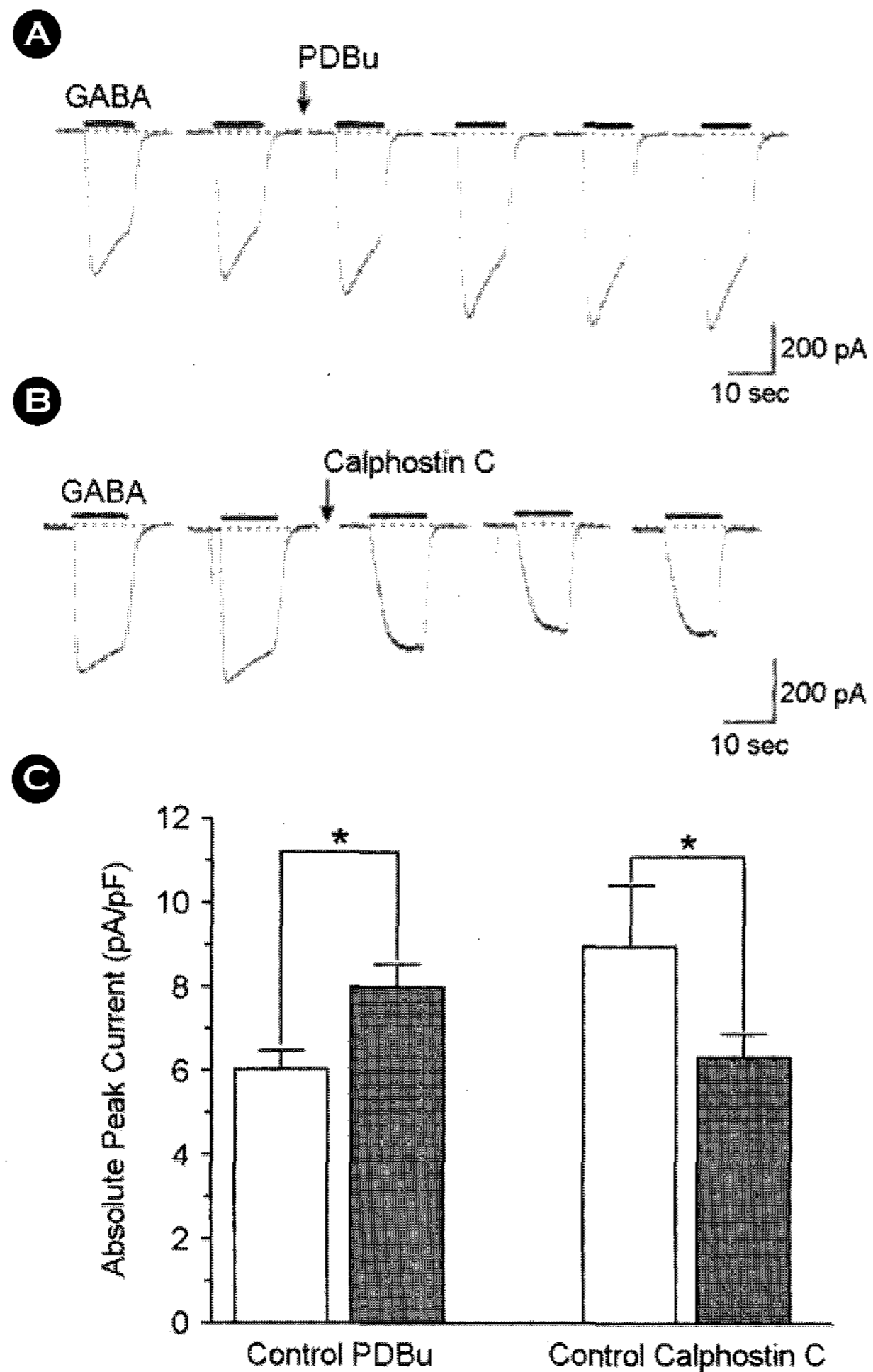


Fig. 1. Modulation of GABA_A receptor by protein kinase C under gramicidin perforated patch. **A.** Effects of PDBu (100 nM), a PKC activator, on GABA-induced currents. **B.** Effects of Calphostin C (2 μM), a PKC inhibitor, on GABA-induced inward currents. **C.** summary of the results A and B. Holding potential was held at -80 mV under the voltage clamp mode. Data are expressed in peak current density (pA/pF) and presented as means ± SEM (n=6) (*, *P*<0.05).

검정하였다. 두 군 간의 차이 혹은 약물 처치 전후의 차이에 대한 검정은 각각 독립적 t-검정 (unpaired t-test)과 짝비교 t-검정 (paired t-test)으로 확인하였다. *P*<0.05일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다. 측정된 전류 크기는 Pulse/Pulsefit 소프트웨어 (Heka Elektronik)를 이용하여 계산하였다.

결 과

MPG 세포에서 GABA 전류가 PKC에 의해 조절되는지를 PKC 활성화제 및 억제제를 사용하여 확인한 결과, gramicidin perforated patch 하에서 PKC 활성화제인 PDBu

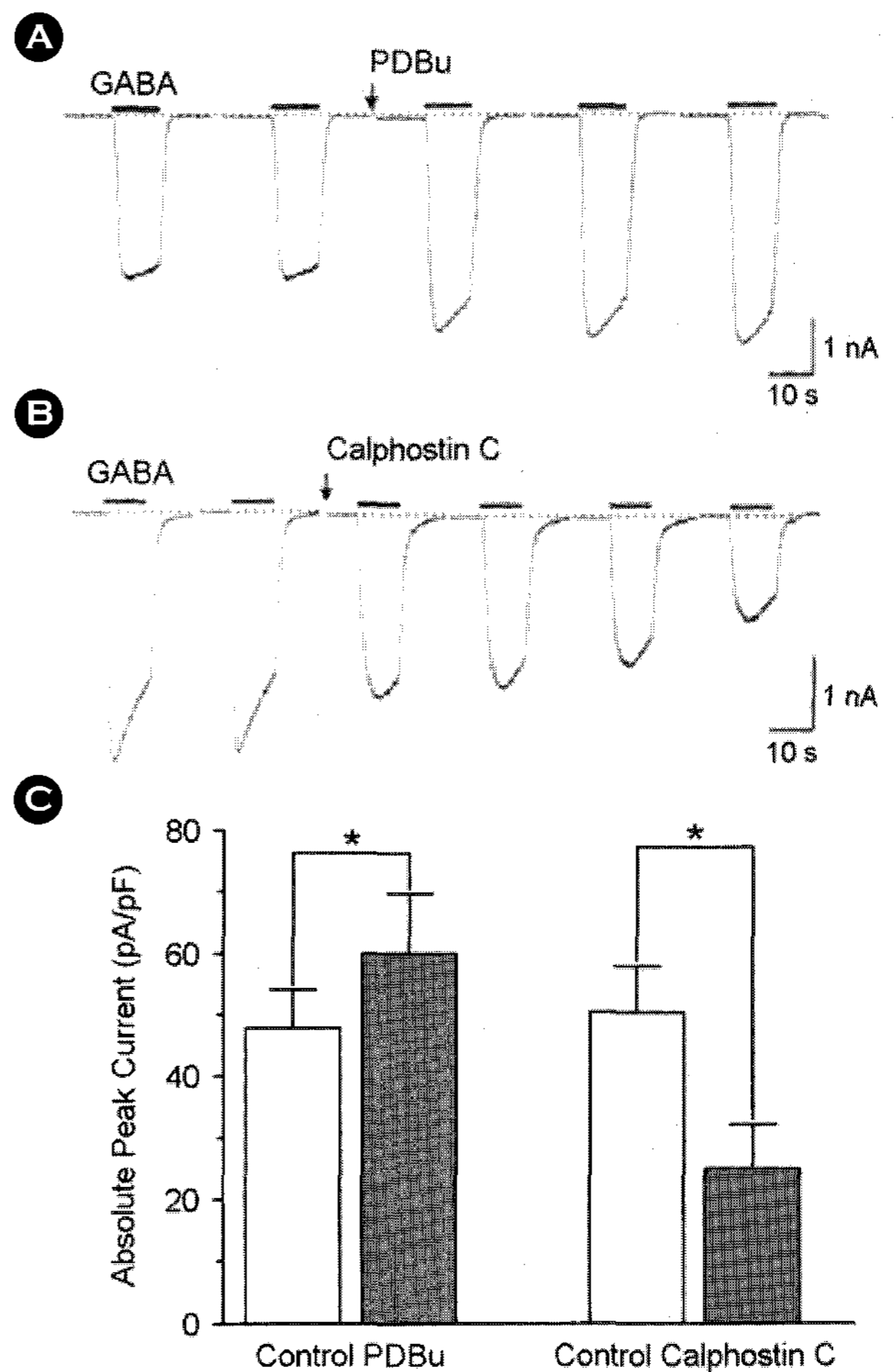


Fig. 2. Modulation of GABA_A receptor by protein kinase C under whole-cell patch with high concentration of EGTA. **A.** Effects of PDBu (100 nM), a PKC activator, on GABA-induced currents. **B.** Effects of Calphostin C (2 μM), a PKC inhibitor, on GABA-induced inward currents. **C.** summary of the results A and B. Holding potential was held at -80 mV under the voltage clamp mode. Data are expressed in peak current density (pA/pF) and presented as means ± SEM (n=6), (*, *P*<0.05).

(100 nM)에 의해서 시간이 지날수록 GABA 전류가 증가하였으며 (33.0±9.4%; n=5, Fig. 1A, C, *P*<0.05), PKC 억제제인 Calphostin C (2 μM)에 의해서는 26.7±7.1% 억제되었다 (Fig. 1B, C, *P*<0.05). 세포내 칼슘을 제거하기 위해 높은 농도의 EGTA가 포함된 전극 내 용액을 사용하여 whole-cell ruptured patch를 만들어 PKC 활성화제 및 억제제 효과를 관찰하였다. 세포내 칼슘을 제거한 상태에서도 동일하게 PKC 활성화제인 PDBu에 의해서는 GABA 전류가 증가 (24.3±4.4%, *P*<0.05)되었으며, 억제제인 Calphostin C에 의해서는 억제되었다 (45.0±11.3%; *P*<0.05; Fig. 2). Fig. 3은 다른 종류의 PKC 활성화제 및 억제제에 의한 GABA 전류 활성도를 보여준다. GABA 전류는 PKC

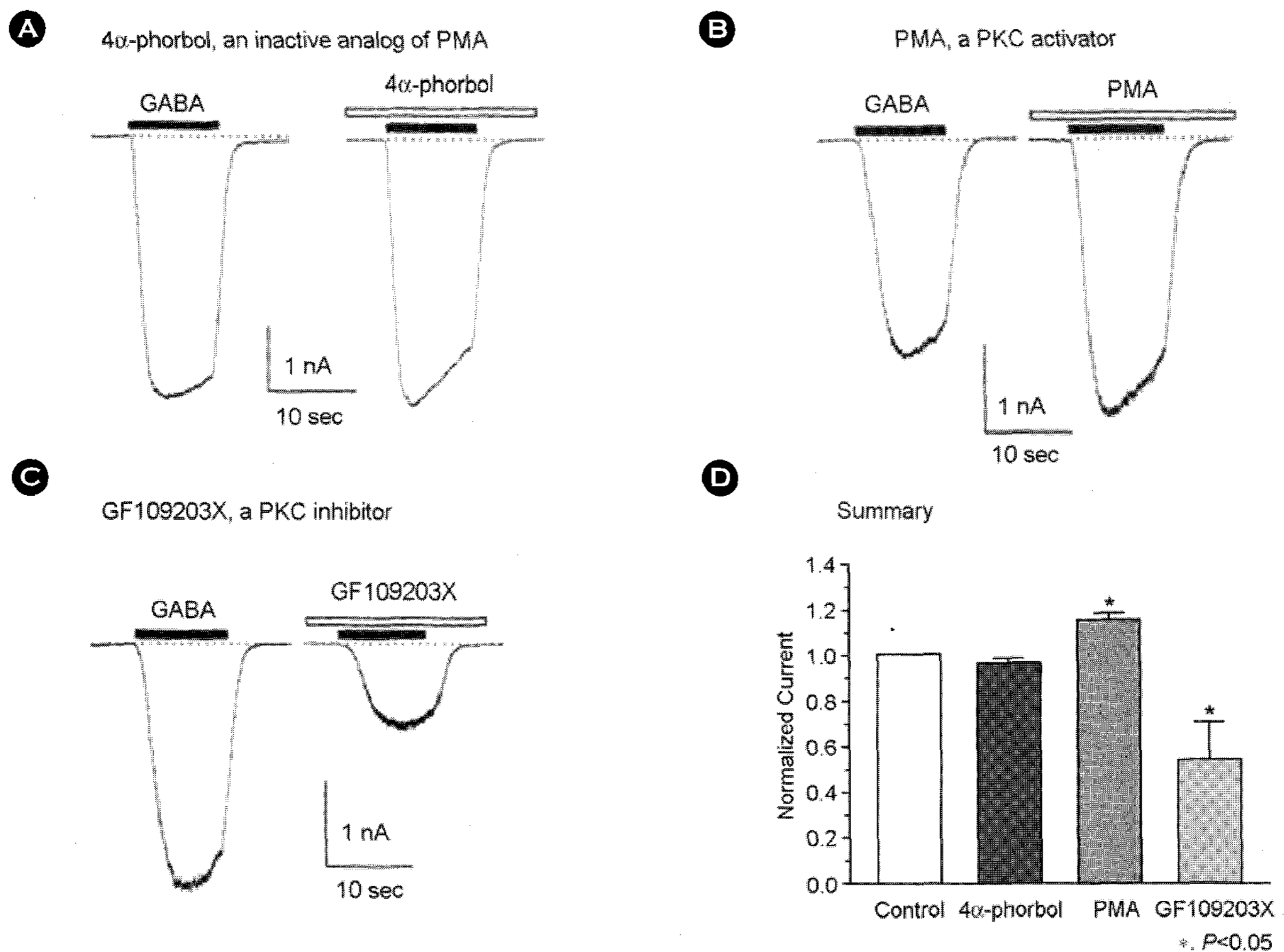


Fig. 3. Effects of PKC activator and inhibitor on GABA_A receptors. **A.** Effects of 4 α -phorbol (500 nM), an inactive analogue of PMA, on GABA-induced currents. **B.** Effects of PMA (500 nM), a PKC activator, on GABA-induced currents. **C.** Effects of GF109203X (500 nM), a PKC inhibitor, on GABA-induced inward currents. **D.** summary of the results A, B, and C. Holding potential was held at -80 mV under the voltage clamp mode. Data are expressed in peak current density (pA/pF) and presented as means \pm SEM (n=6) (*, $P < 0.05$).

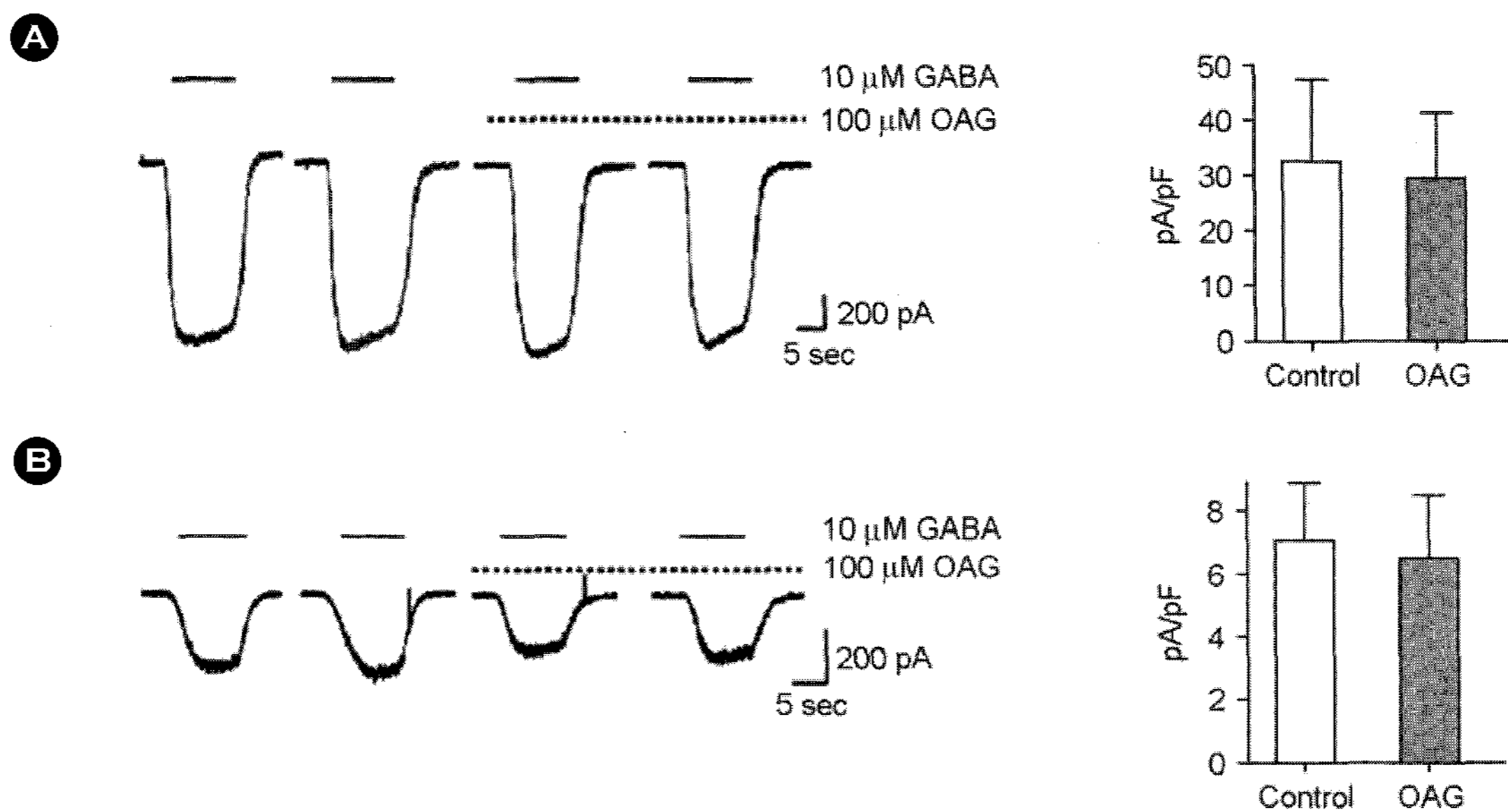


Fig. 4. Effects of atypical PKC activator on GABA_A receptors. Effects of OAG (100 μ M), a membrane permeable diacylglycerol (DAG) analogue on GABA-induced currents under whole-cell patch (**A**) and gramicidin perforated patch (**B**).

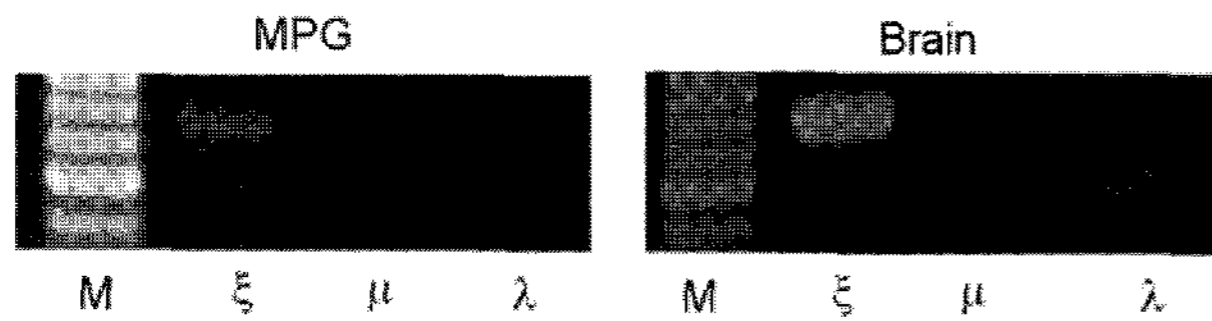


Fig. 5. RT-PCR analysis of mRNAs encoding the subunits of aPKC expressed in MPG neurons. Total RNA isolated from MPG neurons was reverse transcribed and amplified by PCR with specific primers to the subunits of aPKC. The resultant PCR product was visualized on agarose gel containing ethidium bromide. As a control, whole brain of rat was also amplified. Estimated product size for a subunit is shown in parenthesis. M, DNA size marker.

활성제인 PMA의 비활성 형태인 4 α -phorbol에 의해서는 효과가 없었으며 (Fig. 3A, D), PKC 활성제인 PMA에 의해서는 GABA 전류가 증가하였다 (Fig. 3B, D, $P < 0.05$). 또 다른 PKC 억제제인 GF109203X에 의해서는 GABA 전류가 억제되었다 (Fig. 3C, D, $P < 0.05$). 이는 MPG 신경세포에서 GABA 전류는 PKC 제제에 의해 증가 혹은 억제되는 것으로 보아 평상 시 PKC가 어느 정도 활성화되어 있으며, 칼슘 비의존적인 PKC에 의해 활성화됨을 알 수 있었다. GABA_A 수용체의 조절에 관여하는 칼슘 비의존적인 PKC의 아형을 확인하기 위해 conventional, novel PKC의 활성제인 diacylglycerol (DAG)의 세포투과형 유도체인 OAG를 사용하였다. OAG에 의해 GABA 전류의 크기가 OAG를 처리하기 전과 비교하여 커지지 않았으며 이는 whole-cell ruptured patch와 gramicidin perforated patch 모두에서 동일하게 나타났다 (Fig. 4).

칼슘 비의존적인 PKC 중 DAG에 의해 활성화되지 않는 atypical PKC (aPKC)의 아형의 발현을 확인하기 위해 역전사 연쇄 증합반응을 수행한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 주골반 신경절에서는 ξ 가 발현되는 것을 확인하였다.

고 찰

MPG 신경세포에서 GABA의 EC₅₀ 값은 7.3 μ M이었으므로 본 연구에서는 10 μ M의 GABA를 주어 내향성 전류를 유발시켜 실험을 진행하였다. GABA_A 수용체는 5-HT₃, glycine, 니코틴성 acetylcholine (ACh) 수용체들과 마찬가지로 5개의 소단위로 이루어진 오합체 (pentamer) 구조의 이온통로로, MPG에 발현되어 있는 GABA_A 수용체의 소단위는 α , β , γ 로 구성되어 있다. GABA는 중추신경계의 대표적인 억제성 신경전달물질로 알려져 있으나, 신경의 발달단계나 신경의 분포 위치, 혹은 신경의 유형에 따

라 흥분성 혹은 억제성 효과를 나타낼 수도 있는 것으로 알려져 있다 (Ganguly et al., 2001). 자율신경계에서는 세포의 탈분극을 유발하며, 이러한 탈분극은 GABA_A 수용체 차단제에 의해 소실됨이 보고되었다 (Adams and Brown, 1975; de Groat and Booth, 1993; Gill et al., 2004).

GABA_A 수용체의 소단위들은 PKC, PKA, Ca²⁺-Calmodulin-dependent kinase, 및 tyrosine kinase 등과 같은 protein kinase에 의해 인산화 되는 아미노산을 포함하고 있어 (Moss and Smart, 1996; Song and Messing, 2005), 다양하고 복잡한 기전으로 조절되고 있음을 알 수 있다. 선행연구를 통해 MPG에 발현되어 있는 GABA_A 수용체는 adenylyl cyclase(AC)-cyclic AMP-PKA 경로에 의해 일부의 기능이 조절되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 전술한 바와 같이, GABA_A 수용체는 다양한 protein kinases에 의해 인산화 되는 조절 부위를 가지고 있으며, 특히 PKC가 GABA_A 수용체와 GABA 및 기타 조절자 (regulators)의 결합을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 (Song and Messing, 2005) 본 연구에서 이를 탐색해 보았다. 그 결과, PKC는 GABA_A 수용체를 활성화시키는데 관여하고 있음을 알 수 있었다. 선행연구에서 PKC는 GABA_A 수용체 기능을 활성화시키거나 (Lin et al., 1994; Poibeau et al., 1999) 억제시키며 (Kittler et al., 2000; Herring et al., 2005), 일부 연구에서는 아무런 영향을 미치지 않는다는 보고도 있다 (Ghansah and Weiss, 2001; Lee et al., 2003). 이와 같이 GABA_A 수용체에 작용하는 PKC의 기전은 신경세포의 종류에 따라 다양하게 나타날 뿐만 아니라 대부분의 연구가 중추신경계 세포에서 이루어져 말초 자율신경절에서의 GABA 수용체에 대한 이해가 여전히 부족한 실정이다. 본 연구를 통해, 위장관계 및 비뇨생식기계에 신경분포를 하고 있으면서 다양한 기능에 관여하고 있는 MPG에 발현되어 있는 GABA_A 수용체 조절에 PKA 뿐만 아니라 PKC도 일부 관여하고 있음을 알 수 있었다. 또한 PKC도 PKA와 동일하게 MPG의 GABA_A 수용체를 활성화시키는 것으로 측정되어, 일반적으로 PKA와 PKC가 GABA 수용체 기능을 억제시킨다는 선행연구의 결과 (Sigel, 1995; Moss and Smart, 1996)와 다르게 나타나, 추후 이러한 차이점의 양상과 기전, 의의, 및 PKA와 PKC의 crosstalk 여부 등을 심층적으로 연구해 볼 필요가 있다.

PKC는 phospholipid-dependent serine-threonine kinase의 한 종류로 세포내 신호전달에 중요한 역할을 담당한다. 아홉 종류의 PKC 아형들이 알려져 있으며, 크게 세 그

립으로 구분된다. 첫 번째는 'conventional' PKC (cPKC; α , β , 및 γ)로 칼슘, phosphatidylserine (PS) 및 diacylglycerol (DAG)에 의해 활성화된다. 두 번째 그룹은 'novel' PKC (nPKC; δ , ϵ , η , 및 θ)로 PS 및 DAG에 의해 활성화 되나 칼슘에 의해서는 활성화 되지 않는다. 마지막 그룹은 'atypical' PKC (aPKC; ζ 및 λ)이다. 이들은 칼슘 및 DAG에 반응하지 않으며, 다른 지방 전령물질 (lipid messenger)에 의해 활성화된다. 본 연구에서 MPG의 GABA_A 수용체 조절에 관여하는 PKC 아형을 확인하기 위해 세포내 환경을 그대로 유지시킨 채 실시하는 gramicidin perforated patch나 (Fig. 1) 높은 농도의 EGTA를 사용하여 칼슘을 제거한 상태에서 whole-cell patch로 전기생리학적 실험을 실시한 결과에서 (Fig. 2) 동일한 결과를 얻었다. 즉, EGTA를 사용하여 칼슘을 제거하였을 경우에도 PKC에 의한 조절이 남아있는 것으로 보아 MPG에서 GABA_A 수용체는 칼슘 비민감성 PKC 아형에 의해 조절될 것으로 사료된다. 특별히 DAG의 세포투과형 유도체인 OAG에 의한 GABA 전류의 증감이 나타나지 않음으로 (Fig. 4), GABA 전류에 관여하는 PKC는 atypical PKC일 것으로 판단된다. 본 실험에서 시행한 전기생리학적 결과에 이어 RT-PCR 결과 (Fig. 5)를 종합해 볼 때 GABA_A 이온 통로의 조절에 관여하는 PKC는 atypical PKC- ζ 가 주로 작용할 것으로 추측된다. 향후 siRNA 등 최신 기법을 활용하여 specific PKC type 확인실험을 진행함과 아울러, aPKC의 작용이 본 실험의 대상인 신경세포의 기능과 운명에 어떤 영향을 받을 수 있는 지 추후 연구된다면, 이는 보다 의미있는 결과가 될 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 통해 쥐의 골반 신경절의 교감신경 세포에서 흥분성 GABA_A 수용체는 비정형 PKC에 의해 강력히 활성화되며, 이와 같은 효과는 교감신경 말단에서의 noradrenaline의 분비를 조절하여 장 (bowel) 운동, 배뇨 및 발기 등과 같은 최종 복강장기의 활성도를 조절하는 주요 인자가 될 수 있으리라 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 과학재단 지역대학 우수과학자 지원 사업 (과제번호: R05-2003-000-11448-0)의 지원으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

Adams PR, Brown DA. Actions of *r*-aminobutyric acid on

sympathetic ganglion cells. *J Physiol.* 1975. 250: 85-120.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* 1998. 50: 291-313.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987. 162: 156-159.

De Groat WC, Booth AM. Neural control of penile erection, in *Nervous Control of the Urogenital System* (Maggi CA ed.). 1993. pp. 467-524. Harwood Academic Publishers, London, UK.

Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005. 6: 215-229.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 2001. 105: 521-532.

Ghansah E, Weiss DS. Modulation of GABA(A) receptors by benzodiazepines and barbiturates in autonomous of PKC activation. *Neuropharmacology* 2001. 40: 327-333.

Gill S, Cha S, Kim D, Jang S, Jang Y, Kong ID. Neuronal excitatory action of GABA on the pelvic ganglia. *J Korean Neurosur Soc.* 2004. 36: 145-149.

Herring D, Huang R, Singh M, Dillon GH, Leidenheimer NJ. PKC modulation of GABA_A receptor endocytosis and function is inhibited by mutation of a dileucine motif within the receptor beta 2 subunit. *Neuropharmacology* 2005. 48: 181-194.

Keast JR. Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res.* 1991. 266: 405-415.

Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol.* 1999. 193: 1-69.

Kim D. Regulation of GABA_A receptor by protein kinase A in sympathetic neurons of major pelvic ganglia. *J Exp Biomed Sci.* 2006. 12: 64-71.

Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ. Constitutive endocytosis of GABA_A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates in-

- hibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2000. 20: 7972-7977.
- Kumar S, Khisti RT, Morrow AL. Regulation of native GABA_A receptors by PKC and protein phosphatase activity. *Psychopharmacol*. 2005. 183: 241-247.
- Lee JJ, Hahm ET, Min BI, Han SH, Cho JJ, Cho YW. Roles of protein kinase A and C in the opioid potentiation of the GABA_A response in rat periaqueductal gray neuron. *Neuropharmacology* 2003. 44: 573-583.
- Lin Y-F, Browning MD, Dudek EM, Macdonald RL. Protein kinase C enhances recombinant bovine $\alpha 1\beta 1$ gamma2L GABA_A receptor whole-cell currents expressed in L929 fibroblasts. *Neuron* 1994. 13: 1421-1431.
- Lu J, Karadshah M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol*. 1999. 39: 558-569.
- Michels G, Moss SJ. GABA_A receptors: properties and trafficking. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007. 42: 3-14.
- Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod*. 1992. 46: 342-348.
- Mohler H, Fritschy JM, Vogt K, Crestani F, Rudolph U. Pathophysiology and pharmacology of GABA(A) receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2005. 169: 225-247.
- Moss SJ, Smart TG. Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol*. 1996. 39: 1-52.
- Park JC, Song DY, Lee JS, Kong ID, Jeong S, Lee BH, Kang HS, Cho BP. Expression of GABA_A receptor $\beta 2/3$ subunits in the rat major pelvic ganglion. *Neurosci Lett*. 2006. 403: 35-39.
- Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, Mody I. Modulation of synaptic GABA_A receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1999. 19: 674-683.
- Sigel E. Functional modulation of ligand-gated GABA_A and NMDA receptor channels by phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res*. 1995. 15: 325-332.
- Song M, Messing RO. Protein kinase C regulation of GABA_A receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2005. 62: 119-127.
- Zoubek J, Somogyi GT, De Groat WC. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra, and vas deferens. *Am J Physiol*. 1993. 265: R537-43.
- Zhu Y, Zboran EL, Ikeda SR. Phenotype-specific expression of T-type calcium channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *J Physiol*. 1995. 489: 363-375.
-