

Modulation of Rit Activation by the Alpha Subunit of Go

Chul-Min Yang and Sung-Ho Ghil[†]

Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

Heterotrimeric GTP binding proteins, G-proteins, mediate signal transduction generated by neurotransmitters and hormones. Among G-proteins, Go proteins are the most abundant in brain and classified as a member of Gi family. Ras-like protein in all tissues (Rit), one of the small GTPases, is a member of a Ras superfamily and identified as an important regulator of neuronal differentiation and cell transformation. Recently, we have reported that Rit functioned as a candidate downstream effector for alpha subunit of Go proteins ($G\alpha$) and regulated neurite outgrowth triggered by $G\alpha$ activation. In this study, we showed that the GTPase domain of $G\alpha$ contributed to the direct interaction with Rit. We also demonstrated that $G\alpha$ could lead to an increase of Rit activity suggesting that Rit play a role as a downstream effector of $G\alpha$.

Key Words: Domain, G-protein, G-protein coupled receptor, GTPase, Rit, Ral

서 론

Heterotrimeric GTP binding protein (G-단백질)은 신경전달물질이나 호르몬에 의해서 생성되는 다양한 신호를 세포내부로 중개하는 역할을 담당하며, 3개의 소단위체 (α , β , γ)로 구성되어 있다. 신경전달물질 또는 호르몬이 G-단백질과 연결된 수용체 (G-protein coupled receptor, GPCR)와 결합하게 되면, GPCR에 결합되어 있던 G-단백질의 α 소단위체는 $\beta\gamma$ 소단위체들로부터 유리되어 활성화된 형태로 전환된다. 이때 α 소단위체에 결합되어 있던 GDP는 GTP로 치환이 이루어 진다. G-단백질이 그 활성을 마치면 α 소단위체와 $\beta\gamma$ 소단위체들은 다시 복합체를 이루고 α 소단위체의 GTP는 다시 GDP로 바뀌는 순환과정을 거치게 된다 (Coleman et al., 1994). G-단백질은 α 소단위체의 특성에 따라 Gs, Gi, Gq, G12 family로 분류되며, 본 연구의 주제가 되는 Go는 유전자 서열의 유사성에 의거하여 Gi family에 속해 있다 (Birbaumer, 1992).

Go 단백질은 뇌조직-특이적 발현 양상을 보이며, 뇌 조직에 존재하는 G-단백질 중 그 발현량이 가장 높다.

또한 뇌신경세포의 막에 존재하는 단백질 중에 약 1%를 차지하고 있을 정도로 매우 높은 발현량을 보인다 (Sternweis et al., 1984; Strathmann et al., 1990). 몇 종류의 신경세포에서 Go 단백질의 α 소단위체 ($G\alpha$)의 과발현이 신경세포의 신경돌기 (neurite)의 성장을 증가시키며, 신경분화를 유도한다고 보고되었다 (Strittmatter et al., 1994; Ghil et al., 2000; Jordan et al., 2005). 따라서 뇌신경세포의 활성화에 매우 중요한 역할을 수행하리라 기대되는 단백질이나, 아직까지 비교적 많은 연구가 진행되어 지지는 않고 있다. 그 이유는 현재까지의 연구가 $G\alpha$ 가 Gi의 α 소단위체 ($G\alpha$)와 단백질 서열상 유사 (약 78% 상동)하다는 점에 착안하여 $G\alpha$ 가 adenylyl cyclase (AC)의 활성을 조절할 것이라고만 생각했기 때문이다. 그러나 $G\alpha$ 가 결여된 생쥐는 정상생쥐와 비교하였을 때 $G\beta\gamma$ 에 의한 phospholipase C의 활성화나 AC의 활성화에는 변화가 없음이 보고된 바 있다 (Jiang et al., 1998; Mende et al., 1998). 따라서 $G\alpha$ 는 $G\alpha$ 및 $G\alpha$ 와는 달리 AC를 효과자로 사용하지 않으며, AC의 활성화는 무관하다는 것을 알 수 있다. 최근 본 연구자들은 $G\alpha$ 의 세포신호전달 체계를 분석하고자 $G\alpha$ 의 효과자를 탐색 및 발굴하는 연구를 진행하여 Ras-like protein in all tissues (Rit)이라는 단백질이 그 효과자로 역할을 할 가능성이 있음을 보고한 바 있다 (Kim et al., 2008).

Rit 단백질은 1996년 Montell과 그의 동료들이 Ras-related protein which interacted with calmodulin (RIC) 유전자

*접수일: 2009년 10월 24일 / 수정일: 2009년 12월 07일
채택일: 2009년 12월 10일

[†]교신저자: 김성호, (우) 443-760 경기도 수원시 영통구 이의동, 경기대학교 생명과학과
Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646
e-mail: shghil@kgu.ac.kr

를 분석하는 과정에서 Ras-like protein in neuron (Rin)과 함께 클로닝되었으며, Rin 단백질과는 다르게 모든 조직과 전 발생과정에서 발현된다고 보고하였다 (Wes et al., 1996). Rit 단백질은 Ras 단백질과 마찬가지로 저분자 GTPase로서, guanine nucleotide에 의해 그 활성이 조절되며 단백질 서열이 Ras 단백질과 48%의 상동성을 갖기 때문에 Ras 단백질의 superfamily에 속해 있다 (Lee et al., 1996; Shao et al., 1999). 현재까지 알려진 Rit 단백질의 기능 중 하나는 신경세포의 분화를 유도한다는 것이다. Pheochromocytoma 세포에서 과발현된 Rit 단백질은 mitogen-activated protein kinase/ERK1 (MEK)-의존적으로 신경돌기의 성장을 유도하였으며 (Spencer et al., 2002), 인간 신경모세포종세포에서는 MEK-비의존적으로 신경돌기의 가지뻗기 (branching)를 유발하였다 (Hynds et al., 2003). 알려진 또 다른 기능은 Rit 단백질은 세포의 형질 전환을 유도한다는 것이다. 이것은 종양유전자로 잘 알려진 Ras 단백질의 기능과 같지만, 신호전달기작은 Ras 단백질과는 다르게 ERK, JNK, p38 MAPK, PI3K/Akt 등의 활성과는 무관하였다 (Rusyn et al., 2000). Rit 단백질이 세포의 형질전환을 유발하는 신호전달은 p38 γ 의 활성에 영향을 주거나 (Sakabe et al., 2002), cell polarity-regulating protein 6 (PAR6)의 PDZ 도메인과 결합하여 일으키는 것으로 알려졌다 (Hoshino et al., 2005).

본 연구자들은 이전보고에서 Rit 단백질은 Go α 에 특이적으로 결합하였으며, Go α 에 의한 신경분화과정에 관여하고 있다고 보고하였다. 또한 Go α 에 의한 Erk의 활성화 과정에 Rit 단백질이 관여하고 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 Go α 와 Rit 단백질의 결합이 다른 단백질의 도움 없이 직접적으로 일어나는 현상인지를 확인하고, Go α 의 어떤 도메인이 Rit 단백질과의 결합에 기여하는지를 조사하였다. 마지막으로 Go α 의 활성화에 의한 Rit 단백질의 활성 변화 양상을 조사함으로써 Rit 단백질이 실제로 Go α 의 하위신호전달 효과자로서의 기능을 수행하는가를 확인하였다.

재료 및 방법

플라스미드 제작

Glutathione-s-transferase (GST)가 N-말단에 융합된 Rit 벡터 (pGEX-5X-2-Rit)를 제작하기 위해 pcDNA3.1-Rit (Kim et al., 2008) 벡터를 주형으로 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer는 각각 5'-GTC-CCG-GGA-TGG-

ATT-CTG-3'과 5'-TAT-TTA-GGT-GAC-ACT-ATA-G-3'이었다. PCR 생성물을 pGEMT 벡터 (Promega, Madison, WI)에 클로닝한 후, 제한효소인 SmaI과 XhoI으로 절단하여 pGEX-5X-2 벡터 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)에 삽입하였다. GST-Go α 의 deletion 돌연변이 벡터는 Won 등 (2009)의 방법을 사용하여 제작하였다.

세포주 배양 및 transfection

293T와 Neuro2a 세포는 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)과 1% penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Hyclone, South Logan, UT)에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건으로 배양하였으며, 2~3일에 한번씩 HBSS (Hyclone)로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액 (Hyclone)을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 다음 계대 배양하였다 (Ghil et al., 2006). 293T 세포의 transfection은 100 mm 배양용기 당 1.5×10^6 개의 세포를 분주하여 18~24시간 배양한 후, calcium-phosphate 방법을 사용하여 실시하였다 (Ghil et al., 2006). 이 방법을 간단히 설명하면, 적당량의 발현벡터를 62 μ l의 2 M CaCl $_2$ 와 함께 혼합한 후, 동량의 2X HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na $_2$ HPO $_4$)를 혼합하였다. 이 DNA 혼합용액을 30분간 상온에 정치한 후, 세포 배양액에 첨가하여 반응시켰다. transfection한 다음 40시간 후에 세포를 인산염완충액 (10 mM Na $_2$ HPO $_4$, 2 mM KH $_2$ PO $_4$, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)로 2회 씻어준 후, 세포를 수집하여 다음 실험에 사용하였다. Neuro2a 세포의 transfection은 100 mm 배양용기 당 1.5×10^6 개의 세포를 18~24시간 배양한 후, polyethyleneimine (PEI) 방법을 사용하여 실시하였다 (Ghil et al., 2006). 이 방법을 간단히 설명하면, 적당량의 발현 벡터를 DMEM과 혼합하여 800 μ l가 되게 한 후, 20 μ g의 PEI를 첨가했다. 이 용액을 30분간 상온에서 방치한 후, 세포 배양액에 첨가하고 40시간 후에 세포를 인산염완충액로 수세하고 세포를 수집하여 다음 실험에 사용하였다.

GST-pulldown 분석 및 Rit 단백질의 활성 측정

BL21 박테리아 세포주에 GST와 GST-Go α , GST-Go α deletion 돌연변이 단백질, GST-RalGDS-RBD를 발현하는 유전자를 형질전환시켜 배양하였다 (Ghil et al., 2006). 단백질의 과발현을 유도하기 위해 배양된 세포주에 0.5 mM IPTG를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 추가 배양한 후, 세포를 수집하였다. 세포를 PBTX 용액 (1% Triton

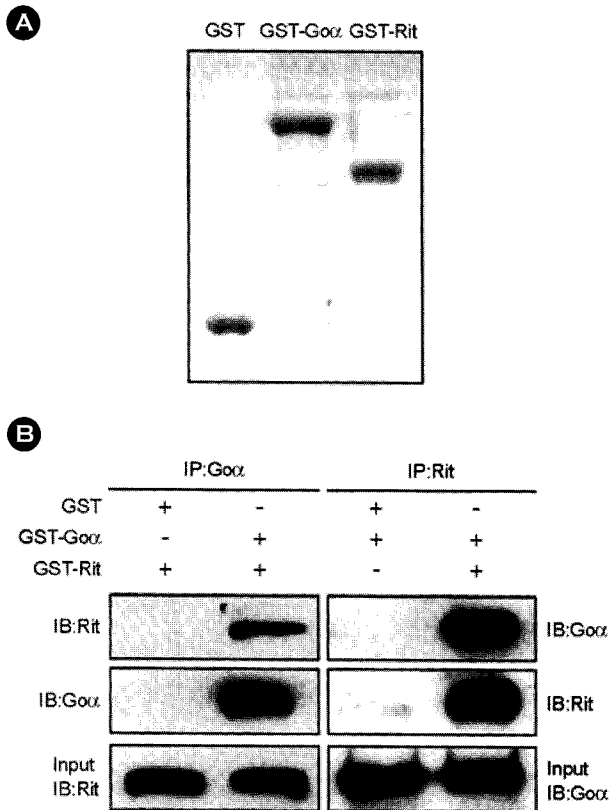


Fig. 1. Goα interacts directly with Rit. **(A)** The expression levels of purified GST fusion protein (GST, GST-Goα and GST-Rit) were represented. **(B)** Each of GST fusion protein (0.5 μg) was mixed, as indicated, and the mixtures were subjected to co-immunoprecipitation assay. Input loaded with 10% of purified protein used for immunoprecipitation.

X-100과 단백질분해효소 억제제가 첨가된 인산염완충액)으로 부유시킨 후, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄한 세포를 원심분리 (12,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상층액을 glutathione sepharose 4B beads (Amersham Biosciences)와 4°C에서 2시간 30분 반응시킨 다음 PBTX 용액으로 3회 수세하였다. Beads를 293T 또는 Neuro2a 세포에 제시된 플라스미드를 과발현시키거나 제시된 화학물질을 처리한 세포추출액과 37°C에서 1시간 반응시키고 PBTX 용액으로 5회 수세하였다. 수세 후, 침전된 beads에 SDS loading dye를 첨가하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동된 단백질을 poly-vinyl difluoride membrane에 옮긴 후 hemagglutinin (HA) 항체 (Roche, Mannheim, Germany)를 사용해 immunoblot을 실시하였다.

Co-immunoprecipitation 분석

GST, GST-Goα, GST-Rit 융합단백질을 BL21 박테리아 세포주에 발현시킨 후, 일반적인 방법에 의해 순수 분

리하였다 (Ghil et al., 2006). 각각의 순수 분리된 단백질 (0.5 μg)을 0.1 % bovine serum albumin을 포함하는 PBTX 용액에 혼합한 후, 20 μl의 Protein A-Sepharose CL-4B beads (10% slurry; Amersham Biosciences) 첨가하여 pre-clearing을 실시하였다. 제시된 항체 1 μg을 혼합하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후, 50 μl의 beads를 첨가하여 상온에서 2시간 추가 반응시켰다. Beads를 PBTX 용액을 이용하여 5회 수세한 후, 침전된 beads에 SDS loading dye를 첨가하여 SDS-PAGE와 transfer를 실시하고, Goα (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 또는 Rit (Chmicon international, Temecula, CA)항체를 사용하여 immunoblot을 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구의 이전보고에서 Goα는 Rit 단백질과의 상호작용을 통해 Erk의 활성을 조절하였으며, 이는 신경세포의 분화에 영향을 미쳤다 (Kim et al., 2008). 본 연구에서는 Goα와 Rit 단백질의 상호작용이 직접적인지 아니면 다른 단백질이 이들의 상호작용에 관여하는지를 확인하기 위해, GST와 GST-Goα, GST-Rit 융합단백질들을 각각 박테리아 세포에 발현시켜 단백질을 순수 분리하였다 (Fig. 1A). 각각의 분리된 단백질을 혼합한 후 Goα 및 HA 항체를 이용하여 co-immunoprecipitation 실험을 수행한 결과, Goα와 Rit 단백질들은 서로 직접적으로 상호작용함을 확인하였다 (Fig. 1B).

Heterotrimeric G-단백질의 α-소단위체는 일반적으로 세 개의 도메인 (N-말단 도메인, α-helical 도메인, GTPase 도메인)으로 구성되어 있다 (Won et al., 2009). 이 도메인들은 두 개의 linker 도메인 (L1과 L2)들에 의해 서로 연결되어 있다 (Fig. 2A). Goα의 어떤 도메인이 Rit 단백질과의 상호작용에 기여하는지를 확인하기 위해서 Goα의 도메인들을 일부 제거시킨 후 N-말단에 GST epitope을 tagging 시킨 벡터를 제작하였다 (Fig. 2A). 이 벡터들을 박테리아에 발현시켜 얻은 추출액과 HA-Rit 벡터를 293T 세포에 발현시켜 얻은 추출액을 이용하여 GST-pulldown 분석을 실시하였다. 그 결과 Goα의 GTPase 도메인이 결여된 단백질 [GST-GoαΔG (lane 5)와 GST-GoαΔHL2G (lane 6)]은 HA-Rit과 결합하지 않는 반면 GTPase 도메인을 포함하고 있는 단백질 [GST-Goα (lane 2), GST-GoαΔN (lane 3)와 GST-GoαΔNH (lane 4)]은 정상적으로 HA-Rit과 결합하였다 (Fig. 2B). 이와 같은 결과를 통해서 Goα

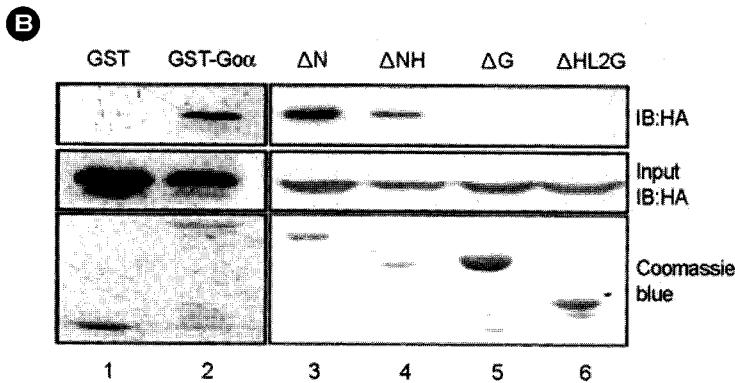
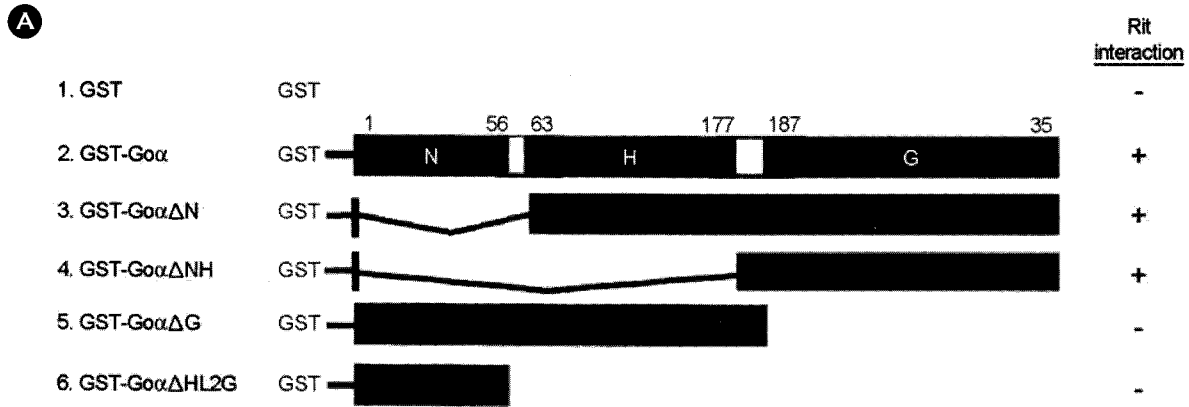


Fig. 2. The GTPase domain of Goα contributes to Rit interactions. **(A)** A schematic diagram of the structures of GST fusion proteins. N, N-terminus; L1, linker 1; L2, linker 2; H, helical domain; G, GTPase domain. **(B)** 293T cell extracts expressing 10 μg of plasmid encoding HA-Rit were incubated with GST fusion proteins and immunoblotted against HA. Input was loaded with 10% of 293T cell extracts used for the GST pull-down assays. Coomassie blue staining was used to show GST fusion protein levels.

의 GTPase 도메인이 Rit 단백질과의 결합에 기여한다는 것을 알 수 있었다. 본 연구자의 이전연구에서 Goα의 GTPase 도메인은 cAMP-dependent protein kinase 및 promyelocytic leukemia zinc finger protein과의 상호작용에 필수적인 부위임을 보고한 바 있다 (Ghil et al., 2006; Won et al., 2009). 따라서 Goα의 GTPase 도메인은 G-단백질의 고유한 특성인 GTPase의 기능을 수행함과 동시에 관련된 단백질들과의 상호작용에 관여하는 부위임을 알 수 있다.

본 연구자의 이전연구에서 Goα의 하위신호전달 효과자로서 Rit 단백질이 관여할 가능성을 제시하였으며, 신경세포의 분화과정에서 이들의 신호전달경로가 핵심적인 역할을 수행함을 보고하였다 (Kim et al., 2008). 실제로 Goα의 활성화에 의해 Rit 단백질의 활성이 증가하는가를 확인하기 위해 Rit 단백질의 활성을 직접 측정할 수 있는 방법이 필요하였다. Shao 등 (1999)이 보고한 결과에 의하면 Rit 단백질은 세포 내에서 저분자 GTPase로서의 기능을 수행한다고 언급하면서 그 이유로 이들의 생화학적 특성 즉, GTP와 결합하는 능력을 가지며 GTPase 활성을 보이는 단백질이라 것을 보고하였다. 특히 GTPase 중 가장 잘 알려진 Ras 단백질과의 특성을 비교하기 위

해 수행한 yeast-two hybrid 실험에서 Rit 단백질의 활성화 돌연변이 단백질이 Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-Ras/Rap binding domain (RalGDS-RBD)와 높은 친화도를 보인다고 보고하였다. RalGDS는 Ras 단백질의 결합 파트너로 알려져 있으며 (Hofer et al., 1994), Ras 단백질과 Rap1의 하위신호전달 효과자로서 작용하며 이들이 활성화 상태에 있을 때, 즉 GTP가 결합되었을 때 RalGDS의 RBD 도메인에 결합하는 특성을 보이기 때문에 이들의 활성을 측정하는 도구로 사용되고 있다 (Bivona et al., 2004; Ferro et al., 2008). 본 연구에서는 이러한 보고들을 바탕으로 RalGDS가 Rit 단백질의 하위신호전달자로 작용할 가능성을 염두에 두고 RalGDS-RBD를 Rit 단백질의 활성을 측정하는 도구로 사용가능한지 여부를 조사하기 위해, HA-Rap1 또는 HA-Rit을 293T 세포에 발현시켜 얻은 추출액과 GST-RalGDS-RBD를 박테리아에 발현시켜 얻은 추출액을 이용하여 GST-pulldown 분석을 수행하였다. 293T의 추출액은 GST-pulldown 분석을 수행하기에 앞서 GDP 또는 GTPγS를 전처리하여 Rap1 또는 Rit 단백질을 각각 불활성화 또는 활성화 시켰다. Rit 단백질은 GTPγS가 전처리되었을 경우 RalGDS-RBD와 매우 높은 친화도를 보였다 (Fig. 3A). 이미 알려진 것

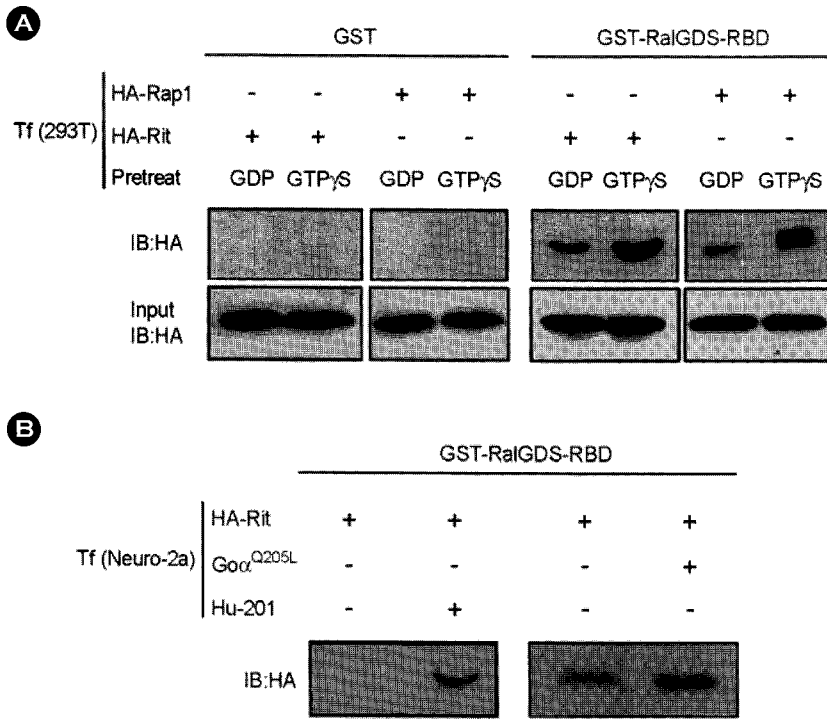


Fig. 3. Activation of Go α leads an increases of Rit activity. **(A)** 293T cell extracts expressing 10 μ g of plasmid encoding HA-Rit or HA-Rap1 were incubated for 20 min with 200 μ M GDP or 100 μ M GTP γ S. Mixtures were incubated with GST-RalGDS-RBD and immunoblotted against HA. Input was loaded with 10% of Neuro2a cell extracts used for the GST pull-down assays. **(B)** Neuro2a cells extracts either expressing 10 μ g of plasmid encoding activated Go α (Go α^{Q205L}) or treated with 5 μ M Hu-210 for 30 min were incubated with GST-RalGDS-RBD and immunoblotted against HA.

과 같이 Rap1 역시 GTP γ S가 전처리되었을 때 RalGDS-RBD와의 높은 결합력을 보였다. GST 자체는 어떠한 경우도 Rap1 및 Rit 단백질과는 결합하지 않았다. 따라서 RalGDS는 앞선 보고와 마찬가지로 Rit 단백질의 하위신호전달자로 존재할 가능성이 있으며, RalGDS-RBD는 Rit 단백질의 활성을 측정할 수 있는 도구로 사용가능하다는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 Go α 의 활성화에 의해 Rit 단백질이 실제로 활성화 되는지를 확인하기 위해 Neuro2a 세포에서 Go α 의 활성화를 다음 두 가지 방식으로 유도하였다. 첫 번째는 Go α 의 활성화 돌연변이가 단백질을 HA-Rit과 함께 발현시켰으며, 두 번째는 Neuro2a 세포에 내재적으로 발현되어 있는 Go α 를 활성화시키기 위해 HA-Rit이 발현된 세포에 Go가 연결된 GPCR의 일종인 카나비노이드 수용체의 agonist (Hu-210)를 처리하였다. 이 두 조건의 세포의 추출액을 수거하여 GST-RalGDS-RBD가 발현된 박테리아 세포의 추출액과 함께 GST-pulldown 분석을 수행하였다. 그 결과 Go α 의 활성화 형태의 돌연변이가 발현된 경우와 Hu-210을 처리한 경우가 그렇지 않은 경우 보다 Rit 단백질의 활성이 증가한다는 것을 확인하였다 (Fig. 3B). 이와 같은 결과는 Go α 의 활성화에 의해서 실제로 Rit 단백질의 활성이 증가함을 시사한다.

Go α 는 신경분화에 있어 핵심적인 역할을 수행한다는 많은 보고들이 존재한다. 예를 들면 PC12 세포에 GTPase

활성이 결여되어 G $\beta\gamma$ 와 결합하지 않는 Go α 의 돌연변이 벡터를 발현시켰을 경우, 신경돌기의 평균적인 길이의 증감 없이 신경돌기들의 숫자가 증가하였다 (Strittmatter et al., 1994). 같은 세포에서 신경돌기의 형성은 신경영양인자 (neurotrophic factor)보다 NCAM (neural cell adhesion molecule)과 N-cadherin에 의해 더 빨리 유도되는데 이 현상은 Gi/Go의 활성 억제제인 백일해독소에 의해서 억제되었다 (Doherty et al., 1991). Go α 가 결여된 생쥐는 동물행동학적으로 운동, 후각능력, 시각의 형성, 성적 행동 유발 등에 상당한 저하를 보였다 (Jiang et al., 1998; Tanaka et al., 1999; Luo et al., 2002). Go α 의 활성화된 형태의 돌연변이가 발현은 신경모세포종인 F11 세포에서 신경분화를 촉진시켰다 (Ghil et al., 2000). 최근 보고에 의하면 카나비노이드에 의한 Neuro2a 신경분화과정에 Go α 가 관여하고 있다고 언급하고 있다 (He et al., 2005; Jordan et al., 2005). 신경분화와 관련된 Go α 의 하위신호전달자로는 최근 본 연구팀에 의해 제안된 Rit 단백질을 포함하여 Rap1 GTPase activating protein 1 (Rap1GAP)과 G-protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GRIN1) 등이 보고되어 있다 (He et al., 2006). GRIN1의 신호는 cdc42 등의 다양한 단백질의 활성을 통해 액틴의 중합화를 유도함으로써 신경분화를 촉진한다고 보고되어 있다. 또한 Go α 는 Rap1GAP과의 상호작용을 통해 Rap1GAP의 활성을 저해함으로써 Rap1의 활성을 증가시키며 이는 Ral 단백

질을 경유하여 전사조절인자인 STAT3의 인산화를 촉진시켜 신경분화를 유도한다고 제안되었다. 본 연구를 통해서 $G\alpha$ 의 활성화가 Rit 단백질을 경유하여 RalGDS의 활성을 유도할 가능성이 있기 때문에 앞서 제안된 Ral 단백질을 경유한 STAT3 활성화의 신호전달경로를 공유할 가능성이 있다. 또한 본 연구의 이전연구에서 $G\alpha$ 는 Rit 단백질을 경유하여 Erk를 활성화 시켰다 (Kim et al., 2008). 따라서 Rit 단백질의 하위신호전달 경로에 Erk로 이어지는 경로가 존재할 가능성이 크며, Rit 단백질은 STAT3 및 Erk의 신호전달경로의 crosstalk을 통해서 신경분화를 유도시킬 수 있을 것이다.

카나비노이드는 대마의 핵심성분으로 최근 다양한 생리 및 약리학적 효과가 보고되고 있다. 예를 들면, 체내에서 자연적으로 분비되는 카나비노이드인 내인성카나비노이드는 통증자극시 조직내 발현이 급격히 증가하며 (Labar et al., 2007), 카나비노이드의 agonist의 투여는 신경병증성 및 염증성 통증을 완화시켰다 (Beltramo et al., 2006; Liu and Walker, 2006; Sanson et al., 2006). 내인성카나비노이드는 *in vitro*에서 pheochromocytoma, neuroblastoma, 전립선암, 혈액암 및 갑상선암세포의 성장억제와 세포사멸을 유도하였다 (Sarker et al., 2000; Velasco et al., 2004; Sarfaraz et al., 2005). 또한 카나비노이드 수용체가 결여된 생쥐는 신경전구세포의 증식, self-renewal, neurosphere의 형성이 현저히 저하되었고, 신경발생과정의 오류에 따른 심각한 신경학적 결함을 보였다 (Jiang et al., 2005). 본 연구는 이러한 카나비노이드가 보이는 다양한 생리 및 약리학적 효과 가운데 신경분화와 관련된 신호전달기전을 분자적 수준에서 이해할 수 있게 해주는 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 $G\alpha$ 와 Rit 단백질의 결합이 다른 단백질의 도움 없이 직접적이라는 것을 규명하였으며, $G\alpha$ 의 GTPase 도메인이 Rit 단백질과의 상호작용에 기여하는 것을 확인하였다. 또한 $G\alpha$ 의 활성화가 Rit 단백질의 활성을 실제로 증가시킴을 확인하였으며, 이 신호는 Rit 단백질을 경유하여 Erk를 활성화 시키는 것 이외에도 RalGDS를 활성화시킬 가능성을 제시하였다. 이러한 결과는 신경분화과정에서 GPCR, $G\alpha$ 및 Rit 단백질의 역할을 설명할 수 있는 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2008학년도 경기대학교 학술연구비 (일반연구과제) 지원에 의하여 수행되었음.

REFERENCES

- Beltramo M, Bernardini N, Bertorelli R, Campanella M, Nicolussi E, Fredduzzi S, Reggiani A. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2006. 23: 1530-1538.
- Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 1992. 71: 1069-1072.
- Bivona TG, Wiener HH, Ahearn IM, Silletti J, Chiu VK, Philips MR. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *J Cell Biol*. 2004. 164: 461-470.
- Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 1994. 265: 1405-1412.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS. Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca^{2+} channels. *Cell* 1991. 67: 21-33.
- Ferro E, Magrini D, Guazzi P, Fischer TH, Pistolesi S, Pogni R, White GC, Trabalzini L. G-protein binding features and regulation of the RalGDS family member, RGL2. *Biochem J*. 2008. 415: 145-154.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem*. 2000. 74: 151-158.
- Ghil S, Choi JM, Kim SS, Lee YD, Liao Y, Birnbaumer L, Suh-Kim H. Compartmentalization of protein kinase A signaling by the heterotrimeric G protein Go. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103: 19158-19163.
- He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA, et al. The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem*. 2005. 280: 33426-33434.
- He JC, Neves SR, Jordan JD, Iyengar R. Role of the Go/i signaling network in the regulation of neurite outgrowth. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006. 84: 687-694.
- Hofer F, Fields S, Schneider C, Martin GS. Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91: 11089-11093.
- Hoshino M, Yoshimori T, Nakamura S. Small GTPase proteins Rin and Rit Bind to PAR6 GTP-dependently and regulate cell

- transformation. *J Biol Chem.* 2005. 280: 22868-22874.
- Hynds DL, Spencer ML, Andres DA, Snow DM. Rit promotes MEK-independent neurite branching in human neuroblastoma cells. *J Cell Sci.* 2003. 116: 1925-1935.
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95: 3269-3274.
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest.* 2005. 115: 3104-3116.
- Jordan JD, He JC, Eungdamrong NJ, Gomes I, Ali W, Nguyen T, Bivona TG, Philips MR, Devi LA, Iyengar R. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAP2. *J Biol Chem.* 2005. 280: 11413-11421.
- Kim SH, Kim S, Ghil SH. Rit contributes to neurite outgrowth triggered by the alpha subunit of Go. *Neuroreport* 2008. 19: 521-525.
- Labar G, Michaux C. Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem Biodivers.* 2007. 4: 1882-1902.
- Lee CH, Della NG, Chew CE, Zack DJ. Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins. *J Neurosci.* 1996. 16: 6784-6794.
- Liu C, Walker JM. Effects of a cannabinoid agonist on spinal nociceptive neurons in a rodent model of neuropathic pain. *J Neurophysiol.* 2006. 96: 2984-2994.
- Luo AH, Cannon EH, Wekesa KS, Lyman RF, Vandenberg JG, Anholt RR. Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res.* 2002. 941: 62-71.
- Mende U, Zagrovic B, Cohen A, Li Y, Valenzuela D, Fishman MC, Neer EJ. Effect of deletion of the major brain G-protein alpha subunit (alpha(o)) on coordination of G-protein subunits and on adenylyl cyclase activity. *J Neurosci Res.* 1998. 54: 263-272.
- Rusyn EV, Reynolds ER, Shao H, Grana TM, Chan TO, Andres DA, Cox AD. Rit, a non-lipid-modified Ras-related protein, transforms NIH3T3 cells without activating the ERK, JNK, p38 MAPK or PI3K/Akt pathways. *Oncogene* 2000. 19: 4685-4694.
- Sakabe K, Teramoto H, Zohar M, Behbahani B, Miyazaki H, Chikumi H, Gutkind JS. Potent transforming activity of the small GTP-binding protein Rit in NIH 3T3 cells: evidence for a role of a p38gamma-dependent signaling pathway. *FEBS Lett.* 2002. 511: 15-20.
- Sanson M, Bueno L, Fioramonti J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2006. 18: 949-956.
- Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* 2005. 65: 1635-1641.
- Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett.* 2000. 472: 39-44.
- Shao H, Kadono-Okuda K, Finlin BS, Andres DA. Biochemical characterization of the Ras-related GTPases Rit and Rin. *Arch Biochem Biophys.* 1999. 371: 207-219.
- Spencer ML, Shao H, Andres DA. Induction of neurite extension and survival in pheochromocytoma cells by the Rit GTPase. *J Biol Chem.* 2002. 277: 20160-20168.
- Sternweis PC, Robishaw JD. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem.* 1984. 259: 13806-13813.
- Strathmann M, Wilkie TM, Simon MI. Alternative splicing produces transcripts encoding two forms of the alpha subunit of GTP-binding protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87: 6477-6481.
- Strathmann M, Simon MI. G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87: 9113-9117.
- Strittmatter SM, Fishman MC, Zhu XP. Activated mutants of the alpha subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *J Neurosci.* 1994. 14: 2327-2338.
- Tanaka M, Treloar H, Kalb RG, Greer CA, Strittmatter SM. G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96: 14106-14111.
- Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Guzmán M. Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology* 2004. 47: 315-323.
- Wes PD, Yu M, Montell C. RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *EMBO J.* 1996. 15: 5839-5848
- Won JH, Ghil SH. The GTPase domain of Galphao contributes to the functional interaction of Galphao with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2009. 14: 46-56.