

Actions of Group I Metabotropic Glutamate Receptor Agonist on Synaptic Transmission and Ionic Currents in Rat Medial Vestibular Nucleus Neurons

Hae In Lee and Sang-Woo Chun*

Dept. of Oral Physiology, College of Dentistry, Institute of Wonkwang Biomaterial and Implant, Wonkwang University, Iksan 570-749

(received December 03, 2009 ; revised December 17, 2009 ; accepted December 22, 2009)

Medial vestibular nucleus (MVN) neurons are involved in the reflex control of the head and eyes, and in the recovery of vestibular function after the formation of peripheral vestibular lesions. In our present study, whole cell patch clamp recordings were carried out on MVN neurons in brainstem slices from neonatal rats to investigate the actions of a group I metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist upon synaptic transmission and ionic currents. Application of the mGluR I agonist (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) increased the frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) but had no effect upon amplitude distributions. To then identify which of mGluR subtypes is responsible for the actions of DHPG in the MVN, we employed two novel subtype selective antagonists. (S)-(+)- α -amino- α -methylbenzeneacetic acid (LY367385) is a potent competitive antagonist that is selective for mGluR1, whereas 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) is a potent noncompetitive antagonist of mGluR5. Both LY367385 and MPEP antagonized the DHPG-induced increase of mIPSCs, with the former being more potent. DHPG was also found to induce an inward current, which can be enhanced under depolarized conditions. This DHPG-induced current was reduced by both LY367385 and MPEP. The DHPG-induced inward current was also suppressed by the PLC blocker U-73122, the IP₃ receptor antagonist 2-APB, and following the depletion of the intracellular Ca²⁺ pool by thapsigargin. These data suggest that the DHPG-induced inward current may be mainly regulated by the intracellular Ca²⁺ store via the PLC-IP₃ pathway. In

conclusion, mGluR I, via pre- and postsynaptic actions, may modulate the excitability of the MVN neurons.

Key words: medial vestibular nucleus neurons, patch clamp, inward current, PLC-IP₃ pathway

서 론

중추신경계에서 대사성 glutamate 수용체의 활성화는 신경 흥분의 조절, 시냅스에서 전달물질의 분비, 시냅스 가소성(plasticity)등에서 다양한 조절 작용을 가지고 있다 (Conn & Pin, 1997; Anwyl, 1999). 대사성 glutamate 수용체는 G-단백질과 연결된 수용체로 아미노산 배열 순서나 이차전달자 작용 방식에 따라 세 군으로 분류한다. 즉, I군 수용체는 phospholipase C (PLC)를 이용하며 inositoltriphosphate (IP₃) 합성을 조절하는데 mGluR1, 5가 해당되고, II군과 III군은 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate 전달계와 관련되는데 II군은 mGluR2, 3, III군은 mGluR 4, 6, 7, 8이 속한다 (Pin & Bockaert, 1995; Conn & Pin, 1997; Pin & Duvoisin, 1997).

I군 수용체는 Gq 단백질을 통하여 PLC가 phosphatidylinositol bisphosphate(PIP₂)를 diacylglycerol(DAG)와 inositol triphosphate(IP₃)로 분해하는 경로를 통하여 세포반응을 매개하는데, 만들어진 IP₃는 세포내 칼슘 저장소로부터 세포질로 칼슘을 이동시킨다(Conn & Pin, 1997; Fagni *et al*, 2000; Valenti *et al*, 2002). 최근의 연구에서 시냅스 말단에서 분비된 glutamate에 의해 대사성 수용체를 통하여 IP₃경로로 세포내 Ca²⁺의 이동이 소뇌의 Purkinje 세포와 해마의 세포에서 관찰되었으며, 이는 장기강화(long term potentiation; LTP)나 장기약화(long

*Corresponding author: Sang-Woo Chun, Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Shinyong-Dong, Iksan 570-749, Korea Tel.: 82-63-850-6932 E-mail: physiol@wonkwang.ac.kr

term depression; LTD)와 같은 시냅스 가소성과 관련이 된다(Finch & Augustine, 1998; Bortolotto *et al*, 1999; Nakamura *et al*, 2000; Bashir, 2003).

I군 수용체의 칼슘신호 전달에 대한 작용 외에 I군 수용체의 활성화는 해마의 CA1 추체세포에서 탈분극과 활동전압의 빈도 증가 등 직접적인 흥분 효과를 일으킨다(Gereau & Conn, 1995; Mannaioni *et al*, 1999). 이는 칼슘활성화 양이온 전류의 활성화 (Crepel *et al*, 1994), 후과분극(afterhyperpolarization) 전류의 억제 (Charpak *et al*, 1990), 유출전류의 억제 (Guerineau *et al*, 1994), 불활성화가 늦은 전압 의존성 포타슘 전류의 억제 (Luthi *et al*, 1996) 등에 의하는데 이러한 전류의 변화가 세포내 칼슘양의 증가와 관련되어 있다(Mannaioni *et al*, 2001; Kettunen *et al*, 2003; Morikawa *et al*, 2003; Rae & Irving, 2004). 또한 시냅스 전달에 대한 작용으로는 억제성 개체 뉴론에 작용할 경우, 세포체의 수용체를 활성화 시켜 세포 흥분성을 증가 시키거나(Llano & Marty, 1995; Poncer *et al*, 1995; Zhou & Hablitz, 1997) 축삭 말단의 수용체에 작용하여 시냅스전 축삭작용이 있음이 보고 되고 있다(Mannaioni *et al*, 1999; Park *et al*, 2003).

전정 신경핵에는 I군 수용체 중 대사성 glutamate 수용체 (mGluR) 1과 5, II군 수용체인 mGluR2와 3, III군 수용체인 mGluR7이 존재함이 확인되었다 (Shigemoto *et al*, 1992; Kinney *et al*, 1993; Darlington & Smith, 1995; Neki *et al*, 1996; Vidal *et al*, 1999; Horii *et al*, 2001). mGluR1, 2 효현제인 1-aminocyclopentane -trans-1,3-dicarboxylic acid (ACPD) 적용시 내측 전정핵 뉴론의 흥분발사율이 증가하거나 감소하였으며 (Darlington & Smith, 1995), 전정구심신경자극에 의해 유발되는 흥분성 시냅스후 전압을 감소시켰다(Kinney *et al*, 1994). 또한, 최근에 Grassi 등(2002)은 II군과 III군 수용체에 의해 LTP의 유발이 억제되는 반면 mGluR1에 의해서는 촉진됨을 보고하였고 Park 등(2003)은 mGluR1, 2 효현제인 ACPD와 mGluR2, 3 효현제인 (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV)가 억제성 시냅스의 축삭말단에서 신경전달물질 분비를 시냅스전 억제 작용으로 감소시킴을 보고하였다.

내측전정핵 세포에서 I군 대사성 glutamate 수용체의 역할에 대한 이전 연구에서 I군 수용체의 효현제인 DHPG를 처리하였을때 막전압의 탈분극과 자발적 활동전압의 빈도 증가가 관찰되었고 이러한 흥분성의 변화가 K⁺ 유출전류의 차단에 의한 내향성 전류와 칼슘활성화 포타슘 전류의 억제를 통하여 발생하였음이 보고되었다 (Chun *et al*, 2004). 그러나 DHPG에 의한 탈분극이 어떠한 세포내 전달과정이 관여하여 발생하는지는 밝혀지지 않았으므로 이 연구에서는 내측전정핵에서 DHPG의 내향성 전류의 발생과 세포내 칼슘와의 의존성, 세포내 칼슘 농도 변화를 일으키는 경로 등을 patch clamp 방법을 이용하

여 규명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

뇌절편 제작

생후 10-17일의 Sprague-Dawley 흰쥐를 암수 구별 없이 사용하였으며 이 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회에서 승인을 얻었다 (WKU09-076). 흰쥐를 ether로 깊게 마취한 후 단두하여 소뇌와 뇌간부위를 적출하고 0-4°C의 저 Na⁺ 농도의 절단용액에 넣어 보관한 후 꺼내어 순간접착제 (cyanoacrylate adhesive)를 이용하여 뇌조직을 고정시켰다. 95% O₂-5% CO₂를 공급하면서 조직절편기 (Vibroslicer, Campden 752M, 영국)를 이용하여 내측 전정신경핵 부위를 200 μm 두께로 관상면 절단하여 뇌절편을 만들었다. 뇌절편은 32°C의 인공 뇌척수액 용액에 1시간 정도 보관하여 정상상태로 회복시켰고, 이후에는 실온에서 실험을 시행하였다. 기록은 뇌절편을 현미경 (BX50WI, Olympus, 일본) 위의 기록용기 (1 ml)에 옮긴 후 치실로 만든 그물로 움직이지 않도록 고정된 후 시행하였고, 실험기간동안 계속해서 95% O₂-5% CO₂가 포함된 용액을 관류펌프 (Minipuls 3, Gilson, 프랑스)를 이용하여 관류시켰다 (2-3 ml/min). 세포의 정확한 구분을 위하여 현미경에 differential interference contrast (DIC) 장치를 부착했고, 40배의 water immersion 대물렌즈로 세포를 확인하였다.

실험용액

뇌절편 제작에 사용했던 절단용액의 조성(mM)은 252 Sucrose, 2.5 KCl, 0.1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucose, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄등으로 구성되었으며, 이온전류 기록 및 세포내 칼슘량의 변화를 확인하기 위한 인공 뇌척수액은 124 NaCl, 5 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.4 CaCl₂, 10 glucose, 24 NaHCO₃이었고, 95% O₂-5% CO₂를 공급하여 pH를 7.4로 유지하였다. 자발적 억제성 시냅스후 전류 기록시 세포외용액에는 흥분성 시냅스 전류를 억제시키기 위하여 AMPA 수용체 차단제인 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) 20 μM과 (±)2-amino-5-phosphono-pentanoic acid (AP5) 20 μM을 포함시켰으며, 미세 시냅스후 전류 기록시에는 TTX 0.5 μM을 추가 하였다. 세포내용액은 140 KCl, 1 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 10 HEPES, 3 MgATP, 0.3 NaGTP를 사용하고, pH는 7.3으로 하였다. 실험에 사용한 AP5, DNQX, thapsigargin, BAPTA 등은 Sigma사 (미국)에서 구입하였고, (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), (S)-(+)-α-amino-a-methylbenzeneacetic acid (LY367385), 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), U-73122, tetrodotoxin (TTX), nimodifine, 2-APB (2-aminoethoxydiphenylbolate), dantrolene sodium

은 Tocris사 (영국)에서 구입하여 사용하였다. AP5, DHPG, U-73122, LY367385, nimodifine 등은 물에 녹여 사용하였으며, thapsigargin, MPEP, 2-APB, dantrolene sodium 등은 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 먼저 녹인 후 최종 농도로 실험직전에 희석하여 사용하였다. 세포에 대한 실험용액의 적용은 중력을 이용한 관류장치 (BPS-4SG, Ala Scientific Instruments, 미국)를 이용하여 기록용기내 용액을 교환하였다.

전기생리학적 기록방법

미세 유리전극 제조기(PP-830, Narishige, 일본)와 microforge (MF-830, Narishige, 일본)를 이용하여 외경 1.5 mm의 연결 유리미세관 (WPI, 미국)을 저항이 5-8 MΩ 이 되도록 기록전극을 제작하였다. 세포에 전극을 접근시키는 과정은 보다 분명한 영상을 관찰하기 위하여 흑백 CCD 카메라 (Panasonic, 일본)를 이용한 videomicroscopy 하에서 시행하였다. 전극에 양압을 주면서 세포에 접근하여 내측 전정핵뉴론 세포막이 약간의 변형을 보일 때 음압을 가하여 giga ohm seal을 이루었다. 전압 고정에 의한 전류측정에는 Axopatch 200B 증폭기 (Axon, 미국)를 사용하였고, 이 증폭기는 Digidata 1200B (Axon, 미국) AD변환기를 통하여 컴퓨터에 연결하였으며, pCLAMP software (Version 8.0, Axon, 미국)를 사용하여 실험수행의 명령과 연결된 전기신호의 저장 및 분석에 이용하였다. Series resistance는 보통 3-8 MΩ 정도였으며, 전류보정은 시행하지 않았고 발생된 전류는 low pass 8-pole Bessel filter로 2 kHz로 여과하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다.

실험자료의 분석

억제성 시냅스후 전류의 분석은 Mini Analysis program (version 6.0, Synaptosoft, 미국)을 이용하였고 막전류의 분석은 Clampfit (Version 8.0, Axon, 미국)을 이용하였다. 대조군과 처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는지의 여부는 paired 혹은 non-paired t-test를 이용하였고, $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계자료의 값은 평균값 ± 표준오차(mean ± S.E.M.)로 표시하였다.

결 과

억제성 미세시냅스후 전류 (miniature postsynaptic current)에 대한 효과

내측전정핵의 시냅스 전달에는 non-NMDA, NMDA 수용체를 통한 흥분성 시냅스 전류보다는 GABA 수용체를 통한 억제성 시냅스 전류가 신경흥분성 조절에 더 우세하게 작용하고 있다고 보고 된 바 있어(Chun *et al*, 2003)

이 연구에서는 억제성 미세시냅스후 전류에 대한 DHPG의 효과를 확인하였다. 억제성 시냅스후 전류를 기록하기 위하여 세포외 용액에 AMPA 수용체 길항제인 DNQX 20 μM과 NMDA 수용체 길항제인 AP5 20 μM을 추가하여 흥분성 시냅스후 전류를 차단하였으며 유지전압을 -70 mV 혹은 -50 mV로 고정하여 시냅스후 전류를 기록하였다.

TTX 0.5 μM을 처리하여 신경흥분 전달을 차단한 후 미세시냅스후 전류에 대한 DHPG의 효과를 확인하였다. DHPG 처리 후 빈도는 2.5 ± 0.4 Hz에서 3.9 ± 0.5 Hz로 유의하게 증가하였으며($P < 0.05$), 크기는 22.7 ± 4.2 pA에서 28.5 ± 4.6 pA로 증가하였으나 유의하지 않았다($n = 7$) (Fig. 1).

DHPG의 작용이 mGluR1 혹은 mGluR5에 선택적으로 일어나는지 확인하고자 mGluR1과 mGluR5에 길항작용을 가지는 LY367385와 MPEP를 DHPG와 함께 투여하

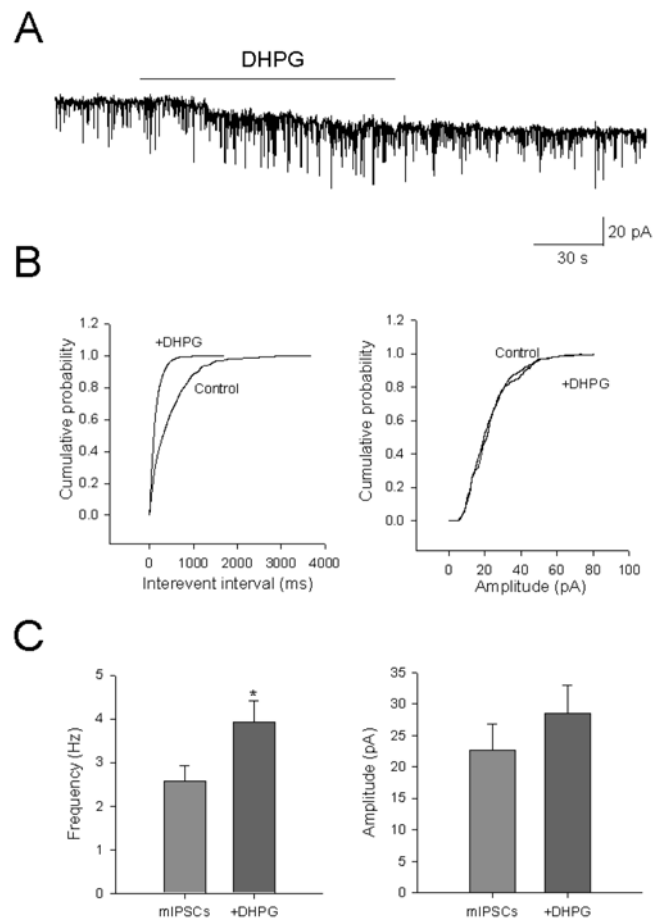


Fig. 1. Effects of DHPG on miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs). A; Current traces of mIPSCs show the effects of DHPG on the synaptic activity of a MVN neuron. B; Cumulative fraction plot of mIPSCs interevent interval and amplitude. Application of DHPG increased the frequency of mIPSCs but the amplitude was not changed. C; DHPG significantly increased the average mIPSCs frequency.

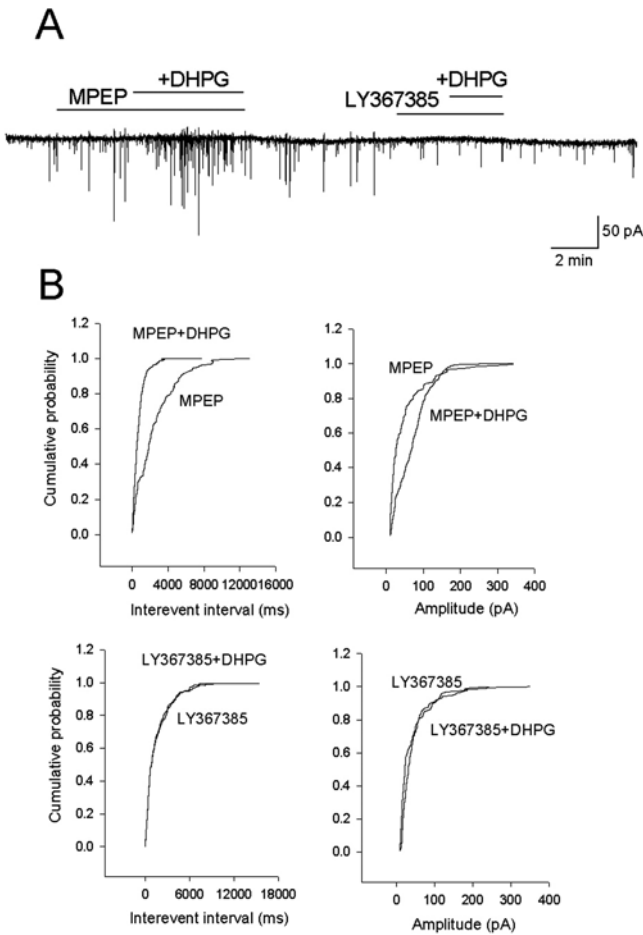


Fig. 2. Effects of MPEP and LY367385 on DHPG-induced increase in the frequency of mIPSCs. A; Current traces of mIPSCs at a holding potential of -70 mV. DHPG-induced increase in mIPSCs was remained by DHPG pre-cubation with MPEP, but decreased prominently by DHPG pre-cubation with LY367385. B; Cumulative fraction plot of mIPSCs interevent interval and amplitude induced by DHPG in the presence of MPEP or LY367385.

였다. 각각의 길항제가 포함된 용액에서 DHPG를 투여한 결과 MPEP 전처리 군에서는 유의한 빈도의 증가가 관찰되었으나($p < 0.05$) ($n = 5$) LY 367385 전처리 군에서는 빈도의 증가가 유의하지 않았으며($n = 5$), 크기에서는 두 군에서 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 2, 3). 따라서 DHPG에 의한 시냅스 전류의 빈도 증가에는 mGluR1이 주로 작용하는 것으로 사료된다.

내향성 전류의 발생

DHPG의 시냅스후 뉴론에 대한 효과를 알아보기 위하여 억제성 미세 시냅스후 전류를 기록하기 위한 용액(DNQX, AP5, TTX 포함)에서 DHPG에 의한 전류의 변화를 기록하였다. 유지전압을 -50 mV로 고정하여 DHPG를 처리하였을 때 약물처리 후 30초 - 2분 후부터 내향성 전류가 발생하였다(Fig. 1, 4). 전류의 크기는 61.0 ± 5.3 pA

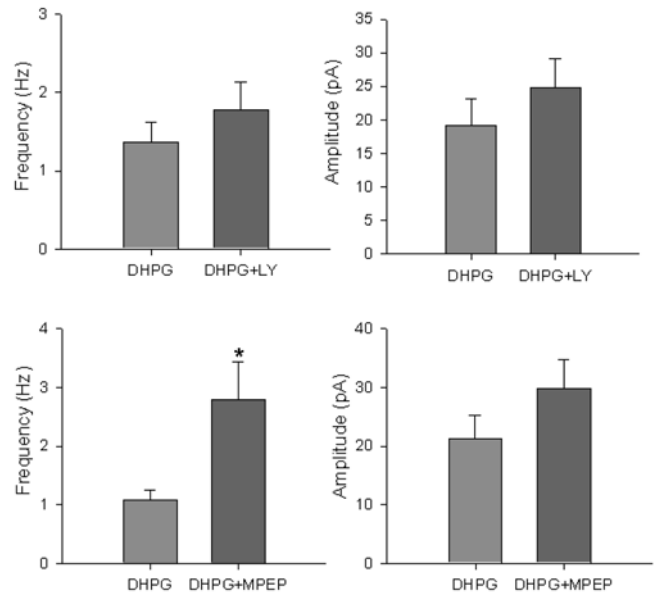


Fig. 3. Bar graph showing the changes in the frequency and amplitude of mIPSCs induced by DHPG in the presence of LY367385 or MPEP. Note that significant increase of mIPSCs frequency by application of DHPG with MPEP.

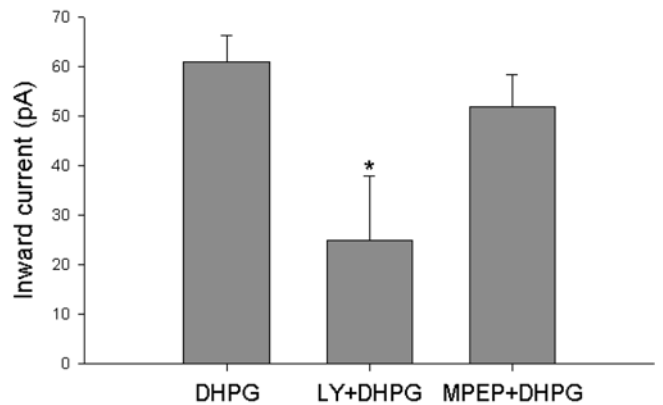


Fig. 4. DHPG-induced inward current is mainly mediated by mGluR₁. Bar graph showing the DHPG induced inward current in the presence of LY367385 or MPEP.

이였으며 ($n = 11$), 약물이 포함되지 않은 용액으로 재관류시 서서히 원상태로 회복되었다. 유지전압을 -70 mV로 고정하였을때 DHPG에 의해 발생한 내향성전류는 28.5 ± 3.4 pA의 ($n = 7$) 크기로 유의하게 감소하여 ($p < 0.05$) 막전압이 탈분극 됨에 따라 전류의 크기가 증가함을 확인하였다. DHPG에 의한 내향성 전류가 어느 수용체를 통하는가를 알아보기 위하여 LY367385와 MPEP를 전처리한 후 DHPG를 투여하였다. DHPG와 mGluR5의 억제제인 MPEP가 포함된 용액으로 관류시 52.0 ± 6.5 pA의 내향성전류를 기록하였다($n = 10$). 그러나 DHPG와 mGluR1의 억제제인 LY367385가 포함된 용액으로 관류시에는 대조군에 비해 유의하게 감소하여($p < 0.05$), DHPG에 의한 내향성전류는 mGluR1을 통하여 발생함을 확인하였다(Fig. 4).

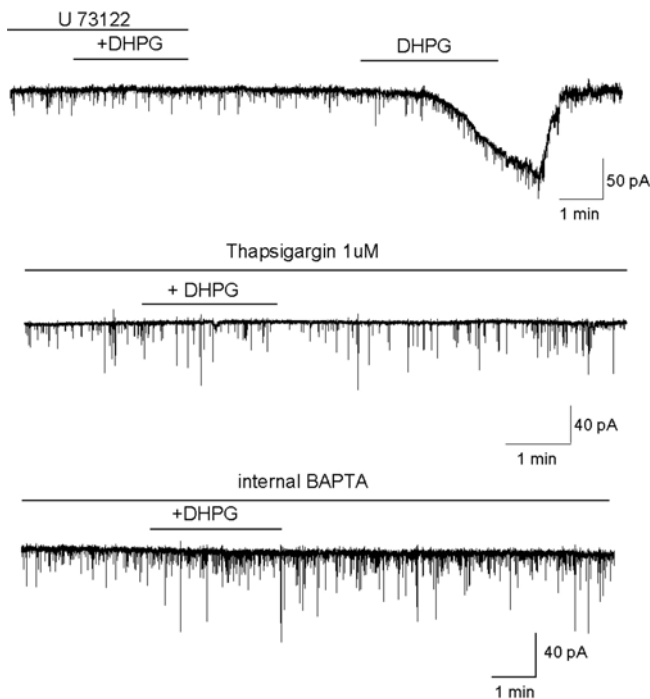


Fig. 5. Inhibition of DHPG-induced inward current requires PLC activation and Ca^{2+} release from internal stores. DHPG-induced inward current was blocked with the PLC blocker U-73122, intracellular calcium chelator BAPTA. Effect of DHPG was blocked when the internal Ca^{2+} stores were depleted with thapsigargin.

내향성 전류의 칼슘의존성

DHPG에 의해서 발생된 내향성 전류가 세포내 칼슘의 변화와 관련 되는지를 알아보고 어느 세포내 신호전달 경로를 통하는지를 확인하고자 PLC 차단제 U-73122, 세포내 칼슘 chelator BAPTA, 세포내 칼슘저장소의 칼슘을 고갈시키는 작용이 있는 thapsigargin, 칼슘저장소의 IP_3 수용체 차단제 2-APB, 칼슘저장소의 ryanodine 수용체 차단제 dantrolene sodium 등을 전처리 후 DHPG의 투여 효과를 확인 하였다.

U-73122 1 μ M을 DHPG 적용 2-3분전에 전처리 한 후 DHPG를 투여 하였을 때 9개의 세포에서는 내향성 전류가 발생 되지 않았고 두개의 세포에서 10-20 pA의 작은 전류가 기록되어 PLC 경로를 통한 세포내 칼슘의 증가가 내향성 전류의 발생에 중요하게 작용한 것으로 추측된다. PLC의 활성화는 IP_3 를 생성하여 세포내 칼슘 저장소로부터 세포질로 칼슘 방출을 매개한다. 이 실험에서 세포내액의 칼슘을 제거시키기 위하여 세포내 용액에 칼슘 chelator인 BAPTA 10 mM을 사용하였다. BAPTA가 포함된 전극으로 기록시 DHPG에 의한 내향성 전류는 4.2 ± 3.4 pA로 현저하게 감소하였다($P < 0.05$). 또한 BAPTA가 포함된 전극을 이용하여 막전압의 변화를 기록했을 때에도 DHPG에 의한 탈분극을 유발하지 못하였다($n = 3$).

Thapsigargin은 세포내 칼슘저장소로 Ca^{2+} 을 reuptake 하는 과정을 차단함으로써 칼슘저장소내의 칼슘을 고갈

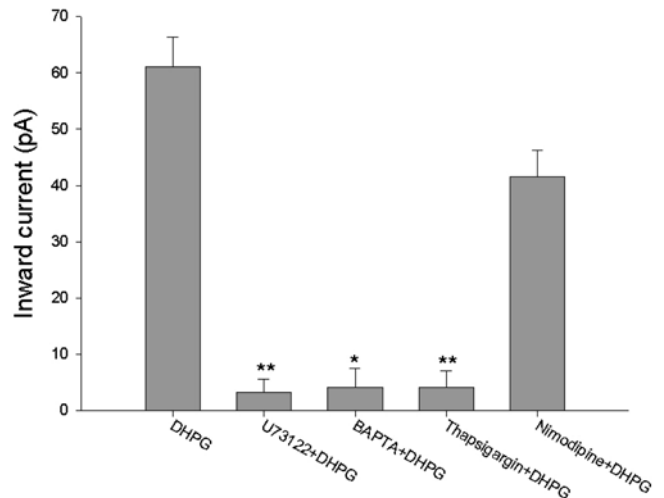


Fig. 6. Mean inward current amplitude induced by DHPG in control and in neurons pretreated with U-73122, BAPTA, thapsigargin and nimodipine. *denotes significant difference from the control by independent *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

시킨다. Thapsigargin 1 μ M을 45분 이상 전처리하고 DHPG를 투여하였을 때 8개의 세포에서는 내향성 전류가 완전히 차단되었고 2개의 세포에서 20 pA 정도의 작은 전류가 발생하였다(Fig. 5).

L형 칼슘통로가 대사성 글루탐산염 수용체를 통한 칼슘의 이동에 관여한다고 보고 되어 있어 (Kettunen *et al*, 2002) L형 칼슘통로 차단제인 nimodipine 10 μ M을 전처리 후 DHPG를 투여 하였다. 기록된 10개의 세포 모두에서 내향성 전류를 확인하였는데 크기는 41.5 ± 4.7 pA로 DHPG 단독 투여에 비하여 유의한 감소를 보이지 않았다(Fig. 6).

세포내 저장소에서 칼슘을 방출 시키는 데는 IP_3 수용체와 ryanodine 수용체가 관여한다. IP_3 수용체 차단제인 2-APB 20 μ M을 전처리 후 DHPG를 투여하였을 때 4개의 세포 중 1개의 세포에서 15 pA의 내향성 전류를 기록하였다. Ryanodine 수용체 차단제인 dantrolene sodium 10 μ M을 전처리 후 DHPG를 처리하였을 때는 55 ± 6.1 pA의 내향성 전류가 기록 되었다($n = 4$) (Fig. 7).

고 찰

최근 1군 대사성 glutamate 수용체인 mGluR1과 5가 서로 다른 세포 반응을 매개함이 알려졌다. 하시상핵 (subthalamic nucleus)은 mGluR1과 5를 모두 가지고 있으나 DHPG에 의한 탈분극에는 mGluR5 만이 작용한다고 하고(Awad *et al*, 2000), 흑질(substantia nigra)의 GABA성 뉴론은 두 가지 수용체를 모두 가지고 있으나 mGluR1에 의하여 탈분극이 유발된다고 보고 되었으며(Marino *et al*, 1999), 해마의 CA1 세포에서는 mGluR1에 의해서는 세

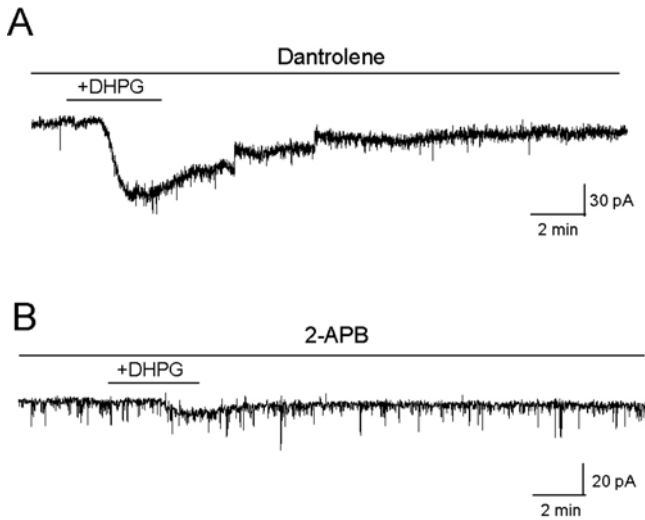


Fig. 7. Effects of dantrolene sodium or 2-APB. DHPG-induced current was markedly blocked in the presence of 2-APB.

포내 칼슘 농도의 변화를 유발하였고 mGluR5에 의해서는 칼슘활성화 포타슘 전류(I_{AHP})의 억제, NMDA 수용체 전류의 증가를 일으켰으며(Mannaioni *et al.*, 2001), 이러한 서로 다른 효과는 동물의 종에 따라 또는 세포의 종류에 따라 차이를 보인다. 내측 전정핵에서도 mGluR1, 5 수용체가 모두 존재하나 그 작용은 서로 상이하다고 보고된 바 있다(Grassi *et al.*, 2002). 즉, mGluR1 수용체를 통하여 고빈도 자극에 의해 유발되는 LTP를 증가시켰으나 mGluR5 수용체를 통하여는 억제된다고 하였다. 따라서 이 연구는 내측 전정핵에서 I군 대사성 glutamate 수용체 작용물질인 DHPG의 효과가 어느 수용체를 통하여 일어나는가를 확인하였다.

DHPG의 처리에 의하여 미세 시냅스후 전류가 증가하였다(Fig. 1). 이는 DHPG가 축삭말단에 존재하는 수용체에 작용하여 GABA의 quantal release를 증가시켰을 것으로 생각된다. DHPG가 미세 시냅스후 전류의 빈도를 증가시키는 효과는 축삭말단에 존재하는 mGluR1의 활성화에 의해서 PLC를 활성화시키고 이는 IP_3 경로에 의해 세포내 칼슘량을 증가시켜 축삭말단에서 GABA 분비를 촉진한다고 알려져 있다(Stefani, 1994; Kawabata *et al.*, 1996). DHPG에 의하여 미세 시냅스후 전위의 크기 증가는 유의하지 않았으나 일부의 세포에서 관찰되었다(Fig. 2, 3).

유지전압을 -50 mV로 고정하여 DHPG를 처리 하였을 때 내향성 전류가 발생하였다. 이는 내측전정핵 뉴런에서는 안정막 전위상태에서도 I군 glutamate 수용체 활성화 내향성 전류를 발생시키고 이에 따라 막전위의 탈분극과 자발활성의 증가를 유발 할 수 있음을 의미한다. 막전압을 -70 mV로 고정 시켰을 때 K^+ 이온의 기전력(driving force) 감소로 내향성 전류는 더 작게 발생되었다. 이전의 연구에서 DHPG가 전압의존성 통로를 통한 전류는

변화시키지 않았고 DHPG에 의한 전류의 역전전압이 K^+ 의 평형전압이며 세포내 용액을 Cs^+ 으로 교체하였을 때는 내향성전류가 발생하지 않아 DHPG는 K^+ 유출전류를 감소시킴에 의해서 발생하였을 것으로 추측하였다.(Chun *et al.*, 2004). 다른 세포에서도 탈분극에 따라 내향성 전류의 증가가 관찰되었는데(Luthi *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 2000; Kettunen *et al.*, 2003), 내향성 전류의 발생원인은 이 연구에서와 같이 K^+ 유출 전류의 감소(Awad *et al.*, 2000; Mannaioni *et al.*, 2001) 외에도 Na^+/Ca^{2+} 교환기전의 활성화(Lee & Boden, 1997; Hirono *et al.*, 1998)이나 비선택성 양이온 전류의 활성화(Crepel *et al.*, 1994; Chuang *et al.*, 2000; Mannaioni, *et al.*, 2001; Ireland & Abraham, 2002) 등이 알려져 있다.

내측전정핵 뉴런에서 DHPG에 의한 내향성 전류는 주로 mGluR1을 통하여 발생하였는데 유사한 결과가 척수 뉴런(Kettunen *et al.*, 2003), 흑질의 억제성 개체뉴런(Marino *et al.*, 1999) 등에서 보고되었으나 하시상핵 뉴런에서는 반대로 mGluR5에 의해서 내향성 전류가 발생됨이 보고 되었으며(Awad *et al.*, 2000) 이러한 차이는 세포의 종류와 동물의 종 혹은 성장 정도에 따라 다르게 나타난다고 알려져 있다(Mannaioni *et al.*, 2001; Ireland & Abraham, 2002; Kettunen *et al.*, 2003).

세포내에서 칼슘이 이동하는 주요한 경로로는 일반적으로 PLC- IP_3 경로이다. Ligand가 세포막에 존재하는 G 단백질과 연결된 수용체와 결합하면 Gq/11 단백질이 활성화되고 활성화된 G 단백질은 PLC β 를 활성화시키고 활성화된 PLC β 는 PIP_2 를 가수분해한다. PIP_2 는 가수분해되어 IP_3 와 diacylglycerol (DAG)를 생성하는데 IP_3 는 세포내 칼슘저장고인 내형질세망 (endoplasmic reticulum)의 막에 존재하는 IP_3 수용체에 결합하여 세포내로 칼슘을 분비시킨다.

그러나 이러한 세포내 칼슘의 분비 후 밖으로부터 칼슘이 유입되는데 이를 일으키는 이온통로를 이전부터 store-operated Ca^{2+} channel (SOCC) 혹은 transient receptor potential channel (TRPC)로 명명하였고 최근 많이 연구가 되어지고 있다. 이 SOCC를 통해 들어온 칼슘은 여러 효현제(agonist)들에 의한 칼슘 반응을 조절할 뿐만 아니라 세포내 저장고에 칼슘을 공급하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Parekh & Penner, 1997). 실험적으로 연구자들이 TRP 통로를 구별하는 방법은 세포내 칼슘 저장고를 고갈하였을 때 활성화되는 것을 기준으로 하는데, 즉 thapsigargin이나 cyclopiazonic acid (CPA)를 사용하여 전류가 활성화되거나 혹은 세포내 칼슘이 증가하면 SOCC가 존재한다고 하였다. 이 연구에서도 thapsigargin을 45분 이상 전저치하여 세포내 칼슘저장고를 고갈시킨 후 DHPG를 처리하였을 때 2개의 세포에서 20 pA의 작은 내향성 전류가 기록되었는데 이러한 변화가 SOCC를 통한 세포내로의 칼슘의 유입에 의해 발생했을 가능성을

배제할 수 없다.

Cyclic ADP-ribose (cADPR)은 포유류에서 보고된 또 다른 칼슘 방출 전달자이다(Petersen & Cancela, 1999). cADPR의 칼슘이동에 대한 작용은 신경계에서 ryanodine 수용체를 통하여 칼슘에 의해 유발되는 칼슘 방출을 강화하고, 시냅스 전 말단에서 신경전달물질의 분비를 증가시키는 역할이 보고되었다(Empson & Galione, 1997; Mothet *et al*, 1998; Brailoiu & Miyamoto, 2000). 또한 최근 중뇌의 도파민 뉴런에서 대사성 glutamate 수용체에 의한 칼슘의 이동이 IP₃경로와 함께 이 cADPR경로도 같이 관여하고 있음이 확인 되었다(Morikawa *et al*, 2003). 이 실험에서 I군 대사성 수용체의 활성화에 의한 세포내 칼슘의 증가는 주로 PLC를 이용한 IP₃ 수용체를 통하여 발생하였다고 생각되나 PLC 차단제인 U-73122를 사용하였을 때 일부세포에서 약한 내향성 전류의 발생이 보이고(Fig. 5), 2-APB의 처리에 의해 세포내 칼슘저장소의 IP₃ 수용체를 차단하여도 내향성 전류가 발생됨은(Fig. 7) cADPR 경로를 통한 ryanodine 수용체가 작용했을 가능성을 배제할 수 없으며 이는 차후의 연구에서 확인하고자 한다.

이상의 연구 결과를 종합하면 I군 대사성 glutamate 수용체의 활성화는 PLC를 활성화 시켜 세포내 칼슘저장소의 IP₃ 수용체를 통하여 세포내 칼슘 농도의 증가를 일으키고 이는 K⁺ 유출전류를 억제하여 내향성 전류를 발생시킨 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었음.

참 고 문 헌

Awad H, Hubert GW, Smith Y, Levey AI, Conn PJ. Activation of metabotropic glutamate receptors 5 has direct excitatory effects and potentiates NMDA receptor current in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci*. 2000;20:7871-79.

Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors : electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev*. 1999;29:83-120.

Bashir ZI. On long-term depression induced by activation of G-protein coupled receptors. *Neurosci Res*. 2003;45:363-67.

Bevan MD, Wilson CJ. Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci*. 1999;19:7617-28.

Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Collingridge GL. Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9:299-304.

Brailoiu E, Miyamoto MD. Inositol trisphosphate and cyclic adenosine diphosphate-ribose increase quantal transmitter release at frog motor nerve terminals: possible involvement of smooth endoplasmic reticulum. *Neurosci*. 2000;95:927-31.

Chapak S, Gahwiler BH, Do KQ, Knopfel T. Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino acid transmitters. *Nature*. 1990;347:765-67.

Chuang SC, Bianchi R, Wong RK. Group I mGluR activation turns on a voltage-gated inward current in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol*. 2000;83:2844-53.

Chun SW, Choi JH, Kim MS, Park BR. Characterization of spontaneous synaptic transmission in rat medial vestibular nucleus. *Neuroreport*. 2003;14:1485-88.

Chun SW, Choi JH, Kim SH, Lee MY, Park BR. Distinct roles of metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in rat medial vestibular nucleus neurons. *Kor J Physiol Pharmacol*. 2004; 8:s69.

Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmac Toxicol*. 1997;37: 205-37.

Crepel V, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Hammond C. Glutamate metabotropic receptors increase a Ca²⁺-activated nonspecific cationic current in CA1 hippocampal neurones. *Br J Pharmacol*. 1994;116:1859-69.

Darlington CL, Smith PF. Metabotropic glutamate receptors in the guinea pig medial vestibular nucleus *in vitro*. *Neuroreport*. 1995;6:1799-1802.

Empson RM, Galione A. Cyclic ADP-ribose enhances coupling between voltage-gated Ca²⁺ entry and intracellular Ca²⁺ release. *J Biol Chem*. 1997;272:20967-70.

Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends in Neurosci*. 2000;23:80-88.

Finch EA, Augustine GJ. Local calcium signalling by inositol-1,4,5-triphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature*. 1998;396:753-56.

Gereau RW, Conn PJ. Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J Neurophysiol*. 1995;74:122-29.

Grassi S, Frodaroli A, Pettorossi VE. Different metabotropic glutamate receptors play opposite roles in synaptic plasticity of the rat medial vestibular nuclei. *J Physiol*. 2002;543:795-806.

Guerineau NC, Gahwiler BH, Gerber U. Reduction of resting K⁺ current by metabotropic glutamate and muscarinic receptors in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J Physiol*. 1994;474:27-33.

Hirono M, Konishi S, Yoshioka T. Phospholipase C-independent group I metabotropic glutamate receptor-mediated inward current in mouse Purkinje cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251:753-58.

Horii A, Smith PF, Darlington CL. Quantitative changes in gene expression of glutamate receptor subunit/subtype in the vestibular nucleus, inferior olive and flocculus before and following unilateral labyrinthectomy in the rat: real-time quantitative PCR method. *Experimental Brain Res*. 2001;139:188-200.

- Ireland DR, Abraham WC. Group I mGluRs increase excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons by a PLC-independent mechanism. *J Neurophysiol.* 2002;88:107-16.
- Kawabata S, Tsutsumi R, Kohara A, Yamaguchi T, Nakanishi S, Okada M. Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 1996;383:89-92.
- Kettunen P, Hess D, El Manira A. mGluR1, but not mGluR5, mediates depolarization of spinal cord neurons by blocking a leak current. *J Neurophysiol.* 2003;90:2341-48.
- Kinney GA, Peterson BW, Slater NT. The synaptic activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors in the rat medial vestibular nucleus. *J Neurophysiol.* 1994;72:1588-95.
- Lee K, Bonden PR. Characterization of the inward current induced by metabotropic glutamate receptor stimulation in rat ventromedial hypothalamic neurones. *J Physiol.* 1997;504:649-63.
- Llano I, Marty A. Presynaptic metabotropic glutamatergic regulation of inhibitory synapses in rat cerebellar slices. *J Physiol.* 1995;486:163-176.
- Luthi A, Gähwiler BH, Gerber U. A slowly inactivating potassium current in CA3 pyramidal cells of rat hippocampus in vitro. *J Neurosci.* 1996;16:586-94.
- Luthi A, Gähwiler BH, Gerber U. 1S, 3R-ACPD induces a region of negative slope conductance in the steady-state current voltage relationship of hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol.* 1997;77:221-228.
- Morikawa H, Khodakhah K, Williams JT. Two intracellular pathways mediate metabotropic glutamate receptor-induced Ca^{2+} mobilization in dopamine neurons. *J Neurosci.* 2003;23:149-57.
- Marino MJ, Bradley S, Wittmann M, Conn PJ. Direct excitation of GABAergic projection neurons of the rat substantia nigra pars reticulata by activation of the mGluR1 metabotropic glutamate receptor. *Soc Neurosci Abstr.* 1999;14:4433-45.
- Mannaioni G, Attucci S, Missanelli A, Pellicciari R, Corradetti R, Moroni F. Biochemical and electrophysiological studies on (S)-(+)-2-(3'-carboxybicyclo[1.1.1]pentyl)-glycine (CBPG), a novel mGlu5 receptor agonist endowed with mGlu1 receptor antagonist activity. *Neuropharmacol.* 1999;38:917-26.
- Mothet JP, Fossier P, Meunier FM, Stinnakre J, Tauc L, Baux G. Cyclic ADP-ribose and calcium-induced calcium release regulate neurotransmitter release at a cholinergic synapse of *Aplysia*. *J Physiol.* 1998;507:405-14.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci.* 2001;21:5925-34.
- Nakamura T, Nakamura K, Lasser-Ross N, Barbara JG, Sandler VM, Ross WN. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)-mediated Ca^{2+} release evoked by metabotropic agonists and backpropagating action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2000;20:8365-76.
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Pre- and postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci Lett.* 1996;202:197-200.
- Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 1997;77:901-30.
- Park HY, Kim YS, Jo KH, Chun SW, Park BR. Roles of metabotropic glutamate receptors in inhibitory synaptic transmission in rat medial vestibular nucleus neurons. *J Korean Neurol Assoc.* 2003;21:273-82.
- Petersen OH, Cancela JM. New Ca^{2+} -releasing messengers: are they important in the nervous system? *Trends Neurosci.* 1999;22:488-95.
- Pin JP, Bockaert J. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 1995;5:342-49.
- Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* 1997;34:1-26.
- Poncer JC, Shinozaki H, Miles R. Dual modulation of synaptic inhibition by distinct metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Physiol.* 1995;485:121-34.
- Rae MG, Irving AJ. Both mGluR1 and mGluR5 mediate Ca^{2+} release and inward currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacol.* 2004;46:1057-69.
- Shigemoto R, Shigetada N, Mizuno M. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in the adult and developing rat. *J Comp Neurol.* 1992;322:121-35.
- Smith PF, Curthoys IS. Mechanisms of recovery following unilateral labyrinthectomy: a review. *Brain Res Rev.* 1989;14:155-80.
- Stefani A, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G, Calabresi P. Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits calcium currents and GABA-mediated synaptic potentials in striatal neurons. *J Neurosci.* 1994;14:6734-43.
- Valenti O, Conn PJ, Marino MJ. Distinct physiological roles of the Gq-coupled metabotropic glutamate receptors coexpressed in the same neuronal populations. *J Cell Physiol.* 2002;191:125-37.
- Vidal PP, Vibert N, Serafin M, Babalian A, Mühlethaler M, de Waele C. Intrinsic physiological and pharmacological properties of central vestibular neurons. *Adv Otolaryngol.* 1999;55:26-81.
- Zhou FM, Hablitz JJ. Metabotropic glutamate receptor enhancement of spontaneous IPSCs in neocortical interneuron. *J Neurophysiol.* 1997;78:2287-95.