

## 배양 대뇌피질 신경세포에서 glutamate에 의한 $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV의 활성변화

조 정 숙<sup>#</sup>

동국대학교 의과대학

(Received May 25, 2001; Revised June 20, 2001)

### Glutamate-induced Modulation of $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase IV in Cultured Rat Cortical Neurons

Jungsook Cho<sup>#</sup>

College of Medicine, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714

**Abstract** — The neuronal cell death induced by excess glutamate (Glu) has been implicated in many acute and chronic neurodegenerative diseases including cerebral ischemia. Glu-induced elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  plays a critical role in the excitotoxicity, partly through the activation of a variety of  $Ca^{2+}$ -dependent enzymes. In the present study, we investigated the Glu-induced modulation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMK IV), a multifunctional enzyme abundantly present in the nuclei of neurons. The exposure of cultured rat cortical neurons to 100  $\mu$ M Glu for 3 min dramatically increased CaMK IV activity up to 4.5-fold of the control-treated enzyme activity. The activation was very rapid, reaching peak at 3 min and then declined gradually. Under the same experimental conditions, time-dependent acute and delayed neuronal cell death was observed. Immunoblot analyses using specific antibodies showed that the expressions of CaMK IV and CaMKK $\alpha$  were time-dependently modulated by Glu. Taken together, these results imply that the modulation of CaMK IV activity by Glu may be involved in the cascade of events resulting in neuronal cell death in cortical cultures.

**Keywords** □ CaM kinase IV, glutamate, excitotoxic neuronal cell death, cortical neurons, phosphorylation

세포질 내에 존재하는  $Ca^{2+}$ 은 외부로부터의 신호를 내부로 전달하여 세포반응을 유발하도록 하는 중요한 2차 전달자이다.  $Ca^{2+}$ 은 calmodulin(CaM)과 결합하여  $Ca^{2+}$ /CaM-dependent protein kinases(CaMKs)를 비롯한 각종 효소를 활성화시킴으로서 세포반응을 매개한다. 이와 같은 CaMKs에는 myosin light chain kinase, phosphorylase kinase, CaMK I, II, III 및 IV 등이 알려져 있다. 이 중에서 CaMK I, II 및 IV는 뇌에 다량 분포하며 여러 종류의 단백질을 인산화시킬 수 있는 다기능성 효소로서 신경전달물질의 유리, 연결 가소성, 유전자 발현 등에 관여하는 등 중추신경계

에서의  $Ca^{2+}$  신호전달과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.<sup>1,2)</sup>

CaMK II는 지금까지의 활발한 연구를 통하여 구조적 특성, 활성화 기전 및 기능에 관한 많은 정보가 알려져 있는 반면, CaMK I과 IV에 관한 연구는 비교적 미흡한 실정이다. CaMK I과 IV는  $Ca^{2+}$ /CaM에 의해 활성화되고 synapsin을 기질로 활용한다는 점에서는 CaMK II와 유사하지만, 한개의 아단위로 구성되며  $Ca^{2+}$ /CaM 이외에도 상위 조절자인 CaMK kinase (CaMKK)에 의해 인산화되어 활성을 발현하고, 인산화된 효소는  $Ca^{2+}$ /CaM 의존성을 유지한다는 점에서 CaMK II와는 매우 상이한 특성을 가진다.<sup>3-7)</sup> CaMK I은 뇌 전반에 분포하는 세포질 효소인 반면,<sup>7)</sup> CaMK IV는 대뇌피질, 해마, 소뇌 등 특정부위에 분포하는 핵

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 054-770-2419 (팩스) 054-770-2447

효소로 알려져 있다.<sup>8)</sup> CaMK I은 시험관 내에서 다양한 peptide를 인산화시킬 수 있으나,<sup>9)</sup> 내인성 기질로는 synapsin I 정도가 알려져 있다.<sup>10)</sup> 또한, CaMK I은 PC12 세포에서 KCl과 Ca<sup>2+</sup>-ionophore에 의해 인산화되고 효소 활성이 증가하며,<sup>11)</sup> CaMK I을 활성화시키는 CaMKK는 같은 세포에서 cAMP-dependent protein kinase에 의해 인산화되어 활성이 억제됨이 최근에 보고된 바 있다.<sup>12)</sup> 한편, CaMK IV는 CaMKK<sub>α</sub>에 의해 Thr196이 인산화되어 활성을 띄며,<sup>6)</sup> cAMP-response element binding(CREB) 단백질을 인산화시켜 신경활성에 따른 유전자 발현에 관여할 것으로 믿고 있다.<sup>13)</sup> 이와 같이 비교적 최근에 와서야 CaMK I 및 IV의 기능적 역할을 규명하기 위한 연구가 배양세포를 중심으로 이루어지고 있다.<sup>11,13)</sup>

Glutamate(Glu)는 포유동물의 뇌에서 흥분성 신호를 전달하는 대표적 신경전달물질로서, 여러 가지 아형으로 존재하는 수용체에 작용하여 연결가소성을 비롯한 다양한 신호전달을 매개한다. 대표적인 예로 Glu는 N-methyl-D-aspartic acid(NMDA) 수용체를 활성화시켜 세포 내로 Ca<sup>2+</sup>을 유입시키고, 그 결과로 활성화되는 CaMK II는 long-term potentiation을 유도한다는 사실은 널리 알려져 있다.<sup>1)</sup> 한편, Glu는 뇌졸중이나 간질과 같은 병적인 상황에서 다량으로 유리되어 Glu 수용체를 과다 활성화시킴으로서 세포 내로 과량의 Ca<sup>2+</sup>을 유입시키고, 결과적으로 신경세포에 치명적인 신경세포 독성을 유발한다.<sup>14,15)</sup> 이와 같은 상황에서는 calpain을 비롯한 여러 종류의 Ca<sup>2+</sup>-의존성 효소들이 활성화되어 단백질, 지질, 핵산 등을 손상시킴으로서 세포사를 초래하게 된다.<sup>15)</sup>

본 연구에서는 뇌허혈 및 간질에서와 같이 Glu를 과다 유리하여 흥분성 신경세포 독성이 나타나는 조건에서 CaMK IV가 어떻게 조절되는가를 연구하기 위하여 흰쥐의 대뇌피질 신경세포를 배양하여 다양한 농도의 Glu로 처리하였을 때 CaMK IV의 활성과 신경세포의 손상정도를 측정하였으며, CaMK IV와 그 상위조절자인 CaMKK<sub>α</sub>의 변화를 측정하였다. CaMK IV의 효소 활성은 glycogen synthase의 인산화 부위를 구성하고 있는 아미노산 잔기로 합성된 syntide-2를 기질로 사용하여 측정하였고,<sup>5)</sup> 신경세포 손상은 배양액 중으로 유리되는 LDH 활성으로,<sup>16)</sup> CaMKK<sub>α</sub>의 변화는 immunoblotting으로 연구하였다. 이와 같은 연구는 뇌허혈과 유사한 상황에서 CaMK IV의 기능적 역할과 신

호전달체계에 관한 이해를 도울 것으로 생각된다.

## 실험방법

### 시약

임신된 흰쥐(Sprague-Dawley)는 대한실험동물에서 구입하였고, minimum essential media(MEM with Earle's salts, without L-glutamine and sodium bicarbonate), fetal bovine serum(FBS), horse serum(HS)은 Gibco BRL에서, poly-L-lysine, laminin, 포도당, L-glutamine, L-Glu, glycine, cytosine arabinoside 및 lactate dehydrogenase(LDH) 정량 키트(Sigma 500C), syntide-2, anti-CaMK IV 항체, anti-CaMKK<sub>α</sub> 항체는 Sigma Chemical Company에서 구입하였다. MK-801은 Tocris Cookson에서 구입하였고, [<sup>32</sup>P]ATP는 DupontNEN에서, CaM과 okadaic acid는 Boehringer Mannheim에서, Protein A-Sepharose CL-4B는 Pharmacia Biotech Inc.에서 구입하였다. 세포 배양용기는 Falcon에서 구입하여 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급품을 사용하였다.

### 흰쥐 대뇌피질 신경세포의 일차배양

대뇌피질 신경세포의 배양은 Cho 등<sup>17)</sup>의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 즉, 16~18일 된 흰쥐 태자에서 대뇌피질 부분을 분리한 후 해부현미경을 이용하여 뇌막을 제거한 다음, 25 mM 포도당, 5% FBS, 5% HS, 2 mM L-glutamine을 함유한 MEM에서 알코올 램프로 pore size를 조절한 파스테르 피펫을 이용하여 단일세포로 분리하였다. 분리된 세포를 poly-L-lysine과 laminin으로 피막을 입힌 60 mm 배양용기에 9~10×10<sup>7</sup>의 밀도로 이식하여 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 배양하다가 3일째에 5 μM cytosine arabinoside로 처리하여 비신경세포의 성장을 억제시키고 배양 8~10일에 실험에 사용하였다. 세포손상 정도를 측정하기 위해서는 24-well plate에 well당 4~5×10<sup>5</sup>의 밀도로 이식하여 배양하다가 7~9 일째에 10 μM cytosine arabinoside로 48~72시간 동안 처리한 후 배양 12~14일에 실험에 사용하였다.

### Glu에 의한 흥분성 세포독성 유발 및 유발된 세포 손상 측정

배양한 대뇌피질 신경세포를 Earle's balanced salt

solution(EBSS)으로 3회 세척하고  $Mg^{2+}$ -free EBSS를 넣고 30분간 37°C 배양기에 방치한 다음, 특정 농도의 Glu와 10  $\mu$ M glycine을 함유하는  $Mg^{2+}$ -free EBSS로 정해진 시간동안 처리한 후 다시 EBSS로 3회 세척하고 25 mM 포도당 및 2 mM L-glutamine을 함유한 MEM으로 배양액을 교환하여 배양기에서 95% 공기/5%  $CO_2$ 를 유지하면서 배양하였다. 세포의 손상 정도는 Glu 처리직후, 처리 2시간 후 및 24시간 후에 일정량의 배양액을 취하여 배양액 중에 유리된 LDH를 측정하거나 위상차 현미경을 이용하여 형태학적으로 평가하였다.

#### 면역침전

배양한 신경세포를 상기 기술한 방법으로 특정 농도의 Glu와 10  $\mu$ M glycine을 함유하는  $Mg^{2+}$ -free EBSS로 정해진 시간동안 처리한 다음 IP buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 25 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 60 kallikrein inactivating units of aprotinin/ml, 100 nM okadaic acid, 1 mM sodium orthovanadate, 10  $\mu$ M leupeptin)를 넣고 초음파분쇄기로 분쇄하여 수확한 후 50  $\mu$ l protein A-Sepharose를 가하여 4°C에서 1시간동안 반응시키고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 단백질 정량 키트(Bio-Rad)를 이용하여 단백질을 정량한 후 각 실험조건 별로 동일량의 단백질을 anti-CaMK IV 항체와 1 시간동안 반응시키고, 다시 25  $\mu$ l protein A-Sepharose를 가하여 1시간동안 더 반응시킨 다음, 원심분리하여 침전물을 취하였다. IP buffer로 3회 세척하고 50 mM Tris-HCl로 2회 세척한 후 바로 syntide-2 kinase 활성을 측정하였다. 배양세포의 처리 이후의 전 과정은 모두 4°C에서 수행하였다.

#### Syntide-2 kinase 활성측정

상기 기술한 방법에 따라 면역침전한 CaMK IV의 활성은 syntide-2를 기질로 하여 수행하였다.<sup>6)</sup> 즉, 면역침전물을 50 mM Tris, pH 7.6, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mg bovine serum albumin/ml, 1 mM  $CaCl_2$ , 1  $\mu$ M CaM, 10 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP(~100 cpm/pmol), and 50  $\mu$ M syntide-2를 함유하는 총 76  $\mu$ l의 용액에서 30°C에서 반응시키고 2.5 분과 5분 후 각각 20  $\mu$ l를 취하여 Whatman P81에

점적하였다. P81은 75 mM 인산용액으로 3회 세척한 후 건조시켜 liquid scintillation cocktail을 넣고 syntide-2에 유입된  $^{32}P$ 의 방사선량을 측정하였다.

#### Immunoblotting

배양한 신경세포를 상기 기술한 방법으로 특정 농도의 Glu와 10  $\mu$ M glycine을 함유하는  $Mg^{2+}$ -free EBSS로 정해진 시간동안 처리한 다음 IP buffer를 가하고 초음파분쇄기로 분쇄하여 원심분리한 상층액을 10% SDS-PAGE로 분리하였다. Nitrocellulose에 전기 이동시킨 후 anti-CaMK IV 항체 또는 anti-CaMKK $_{\alpha}$  항체를 이용하여 Matsushita and Nairn의 방법<sup>12)</sup>과 같이 enhanced chemiluminescence 키트로 밴드를 확인하였다.

#### Data 분석

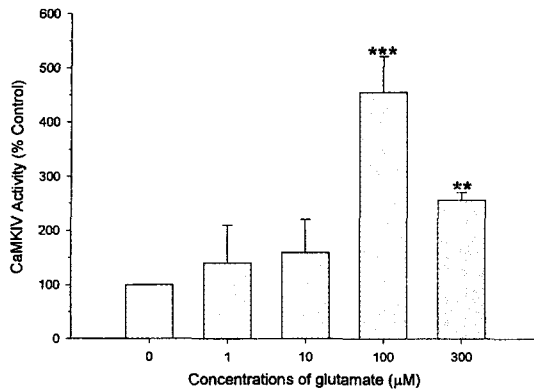
실험결과는 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 얻은 data를 평균하여 나타내었으며, 통계적 유의성은 Student's t-test로 검정하였다.

#### 실험결과 및 고찰

뇌졸중이나 간질과 같은 뇌질환에서는 과다 유리된 Glu에 의해 유발되는 흥분성 신경세포 독성에 따른 지연성 세포사가 나타난다. Glu에 의한 흥분성 신경세포 손상과정에는 세포 내로 과다 유입된  $Ca^{2+}$ 이 결정적 역할을 하며, 이 과정에서 각종  $Ca^{2+}$ -의존성 효소들이 활성화된다.<sup>14,15)</sup> 본 연구에서는 Glu에 의한 신경손상 과정에 있어서 CaMK IV의 기능 및 관련 신호전달 체계에 관한 이해를 돕기 위하여 배양한 흰쥐의 대뇌피질 신경세포를 다양한 농도의 Glu로 처리했을 때 CaMK IV의 활성 변화와 같은 조건에서 유발되는 신경세포의 손상 정도를 측정하였다.

#### 처리농도별 CaMK IV의 활성변화

배양한 대뇌피질 신경세포를 10  $\mu$ M glycine 존재 하에서 1, 10, 100, 300  $\mu$ M의 Glu로 3분간 처리한 후 anti-CaMK IV 항체로 면역침전한 다음 syntide-2 kinase 활성을 측정하였다. Fig. 1에서 알 수 있는 바와 같이 syntide-2 kinase 활성은 100  $\mu$ M Glu로 처리한 경우에서 가장 현저하게 증가하였다. 즉, CaMK IV의 활성은 대조군과 비교해 볼 때 약 4.5배 증가하

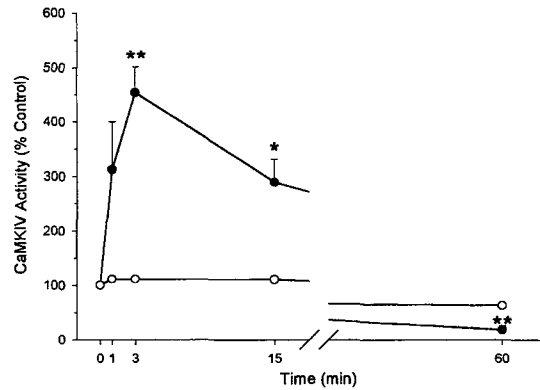


**Fig. 1** – Concentration-dependent activation of CaMK IV induced by glutamate. Cultures at 8-10 days after plating were treated for 3 min with 0, 1, 10, 100, 300 μM Glu in the presence of 10 μM glycine, and CaMK IV was immunoprecipitated as described in the Materials and Methods. The activity of CaMK IV was measured using syntide-2 as a substrate. Each bar represents the mean ± S.D. of the data from 3 separate experiments performed in duplicates. (\*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001)

였으며, 이러한 CaMK IV의 활성 증가는 300 μM Glu로 처리할 경우에도 상당 수준 유지되어 대조군보다 약 2.6배 증가하였다. CaMK IV의 활성이 증가한 것으로 나타난 경우(100 및 300 μM Glu로 3분간 처리) 위상차 현미경 관찰로는 세포에서 큰 변화를 감지할 수 없었다. 한편, 1 μM과 10 μM Glu로 처리한 경우에는 약간 활성이 증가한 것으로 보이지만 통계적 유의성은 없었다.

#### 처리시간별 CaMK IV의 활성변화

다음으로, Fig. 1에서 CaMK IV의 활성을 가장 현저하게 증가시킨 100 μM의 Glu로 배양 신경세포를 다양한 시간동안 처리하였을 때 CaMK IV의 활성변화를 측정하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 1분 동안 처리한 경우에서의 CaMK IV의 활성은 처리하지 않은 경우보다 약 3배 증가하였으나 통계적 유의성은 없었고, 3분 동안 처리한 경우에 Fig. 1에서 살펴본 바와 같이 활성증가가 가장 현저하였다. 같은 조건에서 15분간 처리한 경우 CaMK IV의 활성은 통계적으로 유의성있게 약 3배정도 증가하였다. 세포를 60분간 처리한 경우에는 CaMK IV의 활성이 현저히 감소하여 대조군의 18%에 해당하는 활성만이 관찰되었다.

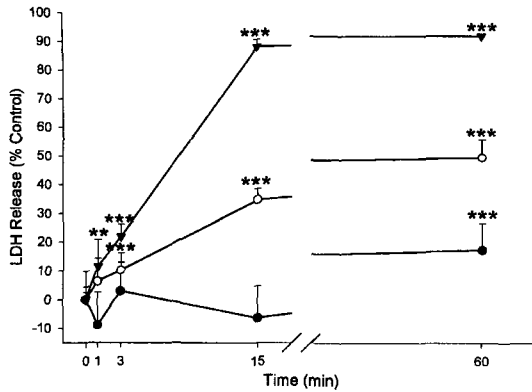


**Fig. 2** – Time-course of Glu-induced activity changes in CaMK IV. Cortical neurons at 8-10 days after plating were treated with 100 μM Glu and 10 μM glycine in the presence (○) or absence (●) of 20 μM MK-801 for the indicated periods of time, and the activities of CaMK IV were determined as described in Fig. 1. Each bar represents the mean ± S.D. of the data from 3 separate experiments performed in duplicates. (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001)

이와 같이 Glu에 의해 변화하는 CaMK IV의 활성은 MK-801(20 μM) 존재 하에서 초기(15분 이내)에는 대조군과 유사한 수준으로 유지되다가 60분 동안 처리한 경우 활성이 다소 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이 연구결과는 신경세포를 100 μM Glu로 60분간 처리했을 때 발생한 현저한 CaMK IV의 활성감소가 MK-801에 의해 부분적으로나마 회복될 수 있음을 의미한다. Glu에 의해 유발되는 신경독성은 MK-801에 의해 부분적으로 억제됨은 이미 잘 알려진 사실이다.<sup>14,18)</sup> 이와 같은 발견은 Glu에 의한 CaMK IV의 활성조절이 신경세포손상을 초래하는 일련의 신호전달체계에 관여함을 시사한다고 할 수 있다.

#### 처리시간별 신경세포의 손상

이번에는 CaMK IV의 활성변화와 신경세포손상과의 관련성을 연구하기 위하여 CaMK IV의 활성변화를 일으킨 실험조건에서의 신경세포 손상정도를 측정하였다. Glu에 의한 신경세포의 손상은 Fig. 2에서와 같은 농도로 1, 3, 15, 60분간 처리하였을 때 처리 직후, 처리한 지 2시간 및 24시간 경과 후의 신경세포 손상정도를 배양액 중의 LDH 활성으로 측정하였다. LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며, 배양액 중으로 유리된 LDH 활성이 클수록 세포손상이 많다는



**Fig. 3** – Acute and delayed excitotoxic neuronal cell death induced by Glu. Cortical cultures at 12-14 days after plating were treated with 100 μM Glu and 10 μM glycine for the indicated periods of time, and LDH assays were performed in the supernatants of culture media right after the treatment (●), and 2 h (○) and 24 h (▼) after the treatment, as described in the Materials and Methods. Experiments were performed twice in quadruplicates. Each point represents the mean ± SEM. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

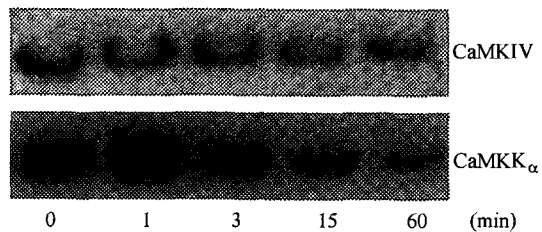
것을 의미한다. Glu로 1분, 3분, 15분 동안 처리한 직후에는 배양액에서 LDH 활성이 거의 감지되지 않았으나, 60분 동안 처리한 경우 약 17%의 LDH가 유리된 것으로 나타나 그 동안에 급성 세포손상이 진행되었음을 알 수 있다(Fig. 3). 세포를 처리한 지 2시간 경과 후에 세포손상 정도를 측정 한 결과, 3분, 15분, 60분 동안 처리한 경우에서 각각 통계적으로 유의한 10.2, 34.8, 49.3%의 세포독성이 발현되었다. 다음으로 동일 조건에서 지연성 세포독성의 변화 패턴을 알아보기 위하여 세포를 Glu로 처리하고 24시간 경과 후의 세포손상을 측정하였다. 이 경우에는 1분간 처리한 경우에도 통계적 유의성이 있는 11.4%의 세포독성을 발현하였으며, 3분, 15분, 60분에서 각각 21.9, 88.1, 91.7%의 독성이 나타났다. 한편, 위상차 현미경을 이용하여 신경세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과, 1분 및 3분간 처리한 경우에는 변화를 관찰할 수 없었고, 15분 이상 처리한 경우에서 세포 팽창과 세포막 손상이 관찰되었다(data not shown). Fig. 3에서 알 수 있었듯이 100 μM의 Glu로 1분 및 3분 동안만 처리해도 통계적 유의성이 있는 지연성 세포손상이 발생한다는 점과, CaMK IV의 활성 증가가 형태학적인 손

상발현 이전에 일어난다는 점은 신경세포의 손상과정에 CaMK IV가 관여함을 시사하는 또 하나의 근거라고 할 수 있다.

뇌허혈을 유발한 동물 및 Glu로 처리한 배양 신경 세포에서 CaMK II의 활성변화에 관한 연구는 그동안 비교적 활발하게 이루어져 왔다. 이와 같은 실험 조건에서 CaMK II의 활성은 빠른 속도로 현저하게 감소됨이 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있으며,<sup>19-21)</sup> 이는 CaMK II의 비정상적이거나 비가역적인 그리고 과도한 인산화에 따른 활성의 변화로 짐작된다.<sup>22)</sup> 그러나, 뇌허혈에 따른 CaMK II의 활성변화가 허혈성 세포사의 한 과정인지, 허혈에 대하여 신경세포 보호기전을 촉발시키는 과정에서 관찰되는 현상인지는 현재로서는 불분명하다.<sup>22)</sup> 마찬가지로, Glu에 의한 CaMK IV의 활성변화가 세포사를 유도하는 과정인지 또는 보호기전을 촉발시키는 과정인지는 분명하지 않다. CaMK IV는 CREB 단백질을 인산화시켜 유전자의 전사를 조절하는 것으로 알려져 있는데,<sup>13)</sup> 향후 Glu에 의해 활성화된 CaMK IV에 의한 CREB의 인산화에 따른 유전자의 변화를 연구한다면 CaMK IV의 중추신경계에서의 기능 이해에 큰 도움이 될 것이다.

**처리시간별 CaMK IV 및 CaMKK<sub>α</sub>의 변화**

끝으로 동일한 조건의 Glu로 1, 3, 15, 60분간 세포를 처리하여 얻은 균질액으로부터 CaMK IV와 CaMKK<sub>α</sub>를 인지하는 항체를 이용하여 각 단백질을 immunoblotting으로 조사하였다. Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 CaMK IV는 대조군에서도 상당량 발현



**Fig. 4** – Immunoblots of CaMK IV and CaMKK<sub>α</sub>. Cortical neurons at 8-10 days after plating were treated with 100 μM Glu and 10 μM glycine for the indicated periods of time, and the cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted as described in the Materials and Methods with the specific antibodies.

되었으며, 1분 및 3분간 처리한 경우에는 대조군과 거의 유사하거나 약간 증가한 것으로 나타났다. 15분 및 60분간 처리한 경우 CaMK IV는 점진적으로 감소하였다. 대조군의 CaMK IV 밴드가 다른 실험군의 밴드보다 약간 아래에 위치하는 이유는 현재로서는 알 수 없다. 이것이 CaMK II의 경우<sup>22)</sup>에서와 마찬가지로 CaMK IV의 인산화 여부나 인산화 위치 및 정도의 차이 때문인지는 더 연구를 해 봐야 할 것이다. 한편, CaMK IV를 인산화시키고 활성화시키는 것으로 알려진 CaMKK $\alpha$ <sup>5,6)</sup>의 경우에는 대조군에서도 상당한 양이 감지되었으며, 1분간 처리한 경우 이보다 더 증가하였고 3분부터 감소하기 시작하여 60분에서는 현저히 감소하는 결과를 얻었다. CaMKK $\alpha$ 가 CaMK IV의 활성이 최대로 증가하는 3분간 처리보다 앞선 1분간의 처리에 의해 최대로 증가하였다는 사실은 CaMKK $\alpha$ 가 CaMK IV의 상위 조절자<sup>5,6)</sup>라는 사실과 부합하는 연구결과라 할 수 있다. 이와 같이 매우 짧은 시간 내에 CaMKK $\alpha$ 가 현저하게 변화하는 기전은 단백질 발현상의 변화라기보다는 인산화와 같은 전사후 변환<sup>11)</sup> 또는 세포내 이동<sup>21)</sup> 등에 의한 변화로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 Ca<sup>2+</sup>의 과도한 증가에 의해 신경세포 손상을 수반하는 병적인 상황에서 CaMK IV의 기능을 연구하기 위하여 배양한 대뇌피질 신경세포를 다양한 농도의 Glu로 다양한 시간동안 처리하였을 때 나타나는 CaMK IV의 활성변화와 신경세포손상을 연구하였다. 그 결과, CaMK IV의 활성은 Glu에 의해 농도별, 처리시간별로 변화하며, 이와 같은 변화는 Glu에 의해 유발되는 신경세포손상을 차단하는 약물인 MK-801<sup>14,18)</sup>에 의해 억제됨을 관찰하였다. 본 연구결과는 CaMK IV가 뇌허혈 또는 과량 유리된 Glu에 의한 신경세포 손상과정에 관여함을 시사하는 최초의 연구결과이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단의 선도연구자지원사업 (KRF-99-041-F00126)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 본 연구의 수행에 있어서 기술적인 도움과 조언을 준 버팔로 뉴욕주립대학교의

교의 Dr. A.M. Edelman께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Hanson, P. I. and Schulman, H. : Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 559 (1992).
- 2) Braun, A. P. and Schulman, H. : The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 417 (1995).
- 3) Lee, J. C. and Edelman, A. M. : A protein activator of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase Ia. *J. Biol. Chem.* **269**, 2158 (1994).
- 4) Lee, J. C. and Edelman, A. M. : Activation of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase Ia is due to direct phosphorylation by its activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 631 (1995).
- 5) Tokumitsu, H., Brickey, D. A., Gold, J., Hidaka, H., Sikela, J. and Soderling, T. R. : Activation mechanisms for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM kinase IV kinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 28640 (1994).
- 6) Selbert, M. A., Anderson, K. A., Huang, Q. H., Goldstein, E. G., Means, A. R. and Edelman, A. M. : Phosphorylation and Activation of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase IV by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase Ia kinase. Phosphorylation of threonine 196 is essential for activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 17616 (1995).
- 7) DeRemer, M. F., Saeli, R. J. and Edelman, A. M. : Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinases Ia and Ib from rat brain. I. Identification, purification, and structural comparisons. *J. Biol. Chem.* **267**, 15520 (1992).
- 8) Ohmstede, C.-A., Jensen, K. F., and Sahyoun, N. E. : Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells: Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **264**, 5866 (1989).
- 9) Lee, J. C., Kwon, Y. G., Lawrence, D. S. and Edelman, A. M. : A requirement of Hydrophobic and basic amino acid residues for substrate recognition by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent protein kinase Ia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6413 (1994).
- 10) Picciotto, M. R., Nastiuk, K. L. and Nairn, A. C. :

- Structure, regulation, and function of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Adv. Pharmacol.* **36**, 251 (1996).
- 11) Aletta, J. M., Selbert, M. A., Nairn, A. C. and Edelman, A. M. : Activation of a Calcium-calmodulin-dependent protein kinase I cascade in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 20930 (1996).
  - 12) Matsushita, M. and Nairn, A. C. : Inhibition of the  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 10086 (1999).
  - 13) Cesare, D. D., Fimia, G. M., and Sassone-Corsi, P. : Signalling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trend. Biol. Sci.* **24**, 281 (1999).
  - 14) Choi, D. W. : Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261 (1992).
  - 15) Sauer, D. and Fagg, G. E. : Excitatory amino acids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders. In Excitatory amino acid receptors. Krogsgaard-Larsen, P. and Hansen, J. J. eds, Ellis Horwood, London. 13 (1992).
  - 16) Cho, J., Joo, N. E., Kong, J. Y., Jeong, D. Y., Lee, K. D. and Kang, B. S. : Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei* rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 31 (2000).
  - 17) Cho, J., Kong, J. Y., Jeong, D. Y., Lee, K. D., Lee, D. U. and Kang, B. S. : NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from the rhizomes of *Acorus graminei*. *Life Sci.* **68**, 1567 (2001).
  - 18) Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. A. and Kriegstein, A. R. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357 (1987).
  - 19) Morioka, M., Fukunaga, K., Nagahiro, S., Kurino, M., Ushio, Y. and Miyamoto, E. : Glutamate-induced loss of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II activity in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **64**, 2132 (1995).
  - 20) Churn, S. B., Limbrick, D., Sombati, S. and DeLorenzo, R. : Excitotoxic activation of the NMDA receptor results in inhibition of  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II activity in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **15**, 3200 (1995).
  - 21) Aronowski, J. and Grotta, J. C. :  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in postsynaptic densities after reversible cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **709**, 103 (1996).
  - 22) Domanska-Janik, K. : Protein serine/threonine kinases (PKA, PKC, and CaMKII) involved in ischemic brain pathology. *Acta Neurobiol. Exp.* **56**, 579 (1996).