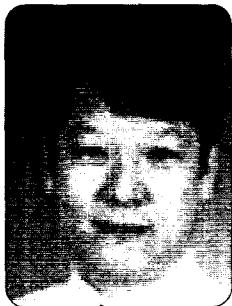


전위활성화 칼슘이온통로의 구조, 기능 및 조절



이정하

1884년	서강대학교 생명과학과 (이학사)
1986년	서강대학교 생명과학과 (이학석사)
1998년	Loyola Univ. of Chicago 생리학과 박사
1999년	Univ. of Virginia 약학과 연구원
2000-현재	서강대학교 생명과학과 조교수

■ 요약 ■

전위활성화 칼슘통로를 통한 칼슘이온의 세포 내 유입은 근육수축, 시냅스 전달, 호르몬 분비, 혈소의 활성도 및 유전자 발현을 조절한다. 이와 같이 중요한 생리적 기능을 조절하기 때문에 칼슘통로를 대상으로 한 다방면의 연구가 과거 20년간 활발히 진행되어 왔다. 칼슘통로는 $\alpha 1$, $\alpha 2-\delta$, β 로 구성되어 있으며, 이 중 $\alpha 1$ 은 칼슘통로의 일반적 특성을 나타내는 기본 구조체이며, $\alpha 2-\delta$ 와 β 는 $\alpha 1$ 을 조절하는 보조 기능을 한다. 지금까지 10개의 $\alpha 1$ subunits (L-형: $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$; non-L-형: $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1E$; T-형: $\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$), 4 종류의 β subunits, 3 종류의 $\alpha 2-\delta$ subunits가 클로닝되었으며, 이들 클론을 이용한 분자 수준에서의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 논단에서는 칼슘통로의 구조, 기능 및 조절에 대한 연구가 전기생리학적, 분자생물학적 및 약리학적 방법을 사용하여 어떻게 수행되어 왔는지 살펴보고, 최근 연구성과에 대해서도 소개하고자 한다.

■ 서론 ■

칼슘통로 (전위활성화 칼슘통로, voltage-activated Ca^{2+} channels)은 동물의 세포막에 있는 막 단백질로 전위의 탈분극 (depolarization)에 의해 열리며, 이때 열린 통로를 통하여 외부의 칼슘이온이 농도 차에 의해 세포 내로 들어온다. 칼슘통로는 신경세포, 근

육세포, 내분비 세포 같은 대부분의 흥분성 세포 (excitable cells)에 존재하며, 계통학적으로는 *Paramecium* 같은 하등 단세포 동물에서부터 포유동물 같은 고등한 다세포동물에 이르기까지 대부분의 동물에서 발견된다 (Hille, 1992). 이 통로를 통해 세포 내로 들어온 칼슘이온은 세포질 내의 칼슘이온 농도를 증가시켜 다양한 생리적 기능에 영향을 준다. 평상시 세포질의 칼슘이온 농도는 칼슘펌프들에 의해 세포 밖과 endoplasmic reticulum 내로 제거되어, 100 nM 정도의 낮은 농도로 유지되며, 반면 세포 밖은 세포질에 비해 10,000배 이상 높은 1-2 mM 정도로 유지된다. 칼슘통로는 막 전위의 탈분극 정도에 따라 활성화되는데, 열린 칼슘통로를 통하여 외부의 칼슘이온이 세포질에 들어와 조직별로 다양한 신호전달을 매개한다. 기본적으로 칼슘통로의 다양하고 독특한 기능은 각 조직에 발현되는 $\alpha 1$ 의 아형에 따라 결정된다고 하겠다. 그러므로 칼슘이온통로에 대한 최근의 연구는 칼슘채널의 구조의 다양성과 독특성을 전기생리학적 및 약리학적 특성을 바탕으로 규명함에 중점을 두고 진행되어 왔다.

■ 본론 ■

1. 칼슘통로의 일반 구조

칼슘통로의 구조 및 기능에 대한 연구는 첫째, 특히 차단제를 이용한 칼슘채널 단백질의 생화학적

정제, 둘째, 칼슘채널 유전자의 분자생물학적 클로닝, 셋째, 분리된 세포에서 직접 또는 클로닝된 칼슘채널 유전자를 다른 발현계에 발현 후 칼슘채널의 전기생리학적 및 약리학적 특성을 규명해 옴으로써 발전되어 왔다.

칼슘채널의 구조를 이해할 수 있도록 해준 실마리는 근육에 있는 칼슘채널이 고혈압 치료제인 dihydropyridines (DHP)에 민감하게 붙는 수용기라는 것이 밝혀짐으로써 시작되었다. 이 사실을 바탕으로 DHP를 표지 (marker)로 사용하여 근육세포의 t-tubule로부터 DHP 수용기를 정제할 수 있게 되었다. 분리/정제된 단백질은 α_1 , $\alpha_2-\delta$ (환원제에 의해 α_2 와 δ 로 분리됨), β 및 γ 로 나누어지며, 그 중 α_1 에 DHP가 붙는다는 것이 밝혀졌다 (Tanabe et al., 1988). 그 결과 지금까지 알려진 칼슘채널의 구조는 칼슘채널의 전기생리학적 및 약리학적 기본 특성을 결정하는 α_1 구조체와 이의 기능을 보조하는 β , $\alpha_2-\delta$ 등으로 구성되어 있다 (그림 1, reviewed by

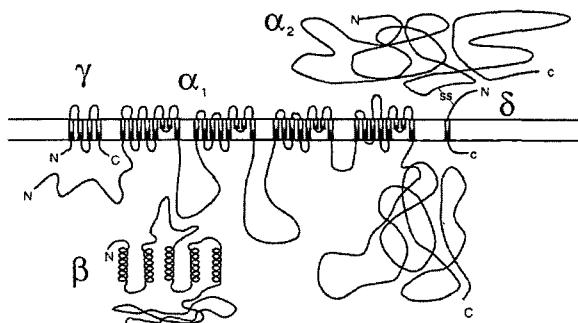


그림 1. 전위활성화 칼슘통로의 구조 (Perez-Reyes and Schneider, 1994). 전위활성화 칼슘통로는 α_1 , β , $\alpha_2-\delta$ 및 γ 로 구성되어 있다. α_1 은 소수성의 막단백질로 4개의 domain으로 구성되어 있으며, 각 domain은 6개의 막통과부위(membrane spanning segments)와 pore 부위로 구성되어 있다. β 는 세포질 방향에서 α_1 의 domain I과 II를 연결하는 루프에 작용하며, α_2 는 세포막 바깥쪽에 위치하며 α_1 에 영향을 주는 것으로 보인다. 그러나 T-형 칼슘통로 α_1 에 β , $\alpha_2-\delta$ 또는 γ 가 작용하는지는 밝혀지지 않았다.

Perez-Reyes and Schneider, 1993). α_1 구조체는 250 KDa 정도되는 소수성의 막 단백질로 전위의 변화를 감지하는 부위 (voltage sensor)와 칼슘이온을 선택적으로 통과시키는 통로 (pore)를 형성하는 부위, 고혈압 치료제로 사용되는 dihydropyridine, verapamil, diltiazem 계열의 약물이 작용하는 부위를 포함하고 있다. 최근의 연구에 따르면 칼슘채널이 칼슘을 선택적으로 통과시키는 것은 4개의 pore 부위에 있는 glutamic acid가 결정적 작용함이 밝혀졌다 (Yang et al., 1993; Ellinor et al., 1995). 즉 α_1 단백질은 전위의 변화를 인지하는 부위, 칼슘을 통과

시키는 부위, 약물이 결합하는 부위를 가지고 있는 기능적 칼슘채널의 최소단위라 할 수 있다. 반면 보조 구조체인 β 와 $\alpha_2-\delta$ 구조체는 α_1 에 대하여 chaperone과 같은 기능을 하며 α_1 구조체의 안정화, 발현의 증가, 약물에 대한 민감도 증가를 일으킨다. 또한 β 는 α_1 구조체의 Domain I과 II 사이를 연결하는 세포질 방향 루프에 붙어서 칼슘채널의 전위 변화에 따른 활성화 및 비활성화 과정의 속도를 변형하는 것으로 밝혀졌다 (Pragnell et al., 1994; De Waard et al., 1994).

칼슘채널을 구성하는 정제된 단백질들의 아미노 또는 카르복실 말단의 아미노산 서열 결정은 그 서열에 상응하는 염기서열의 정보를 제공하였고, 합성한 oligonucleotides를 probes로 사용하여 cDNA library를 screening하여 α_1S , $\alpha_2-\delta$, β , γ 의 cDNA를 클로닝하여, 이들의 구조가 유전자 수준에서 밝혀졌으며, 또한 칼슘채널의 다양성에 대해서 이해할 수 있는 계기를 마련하게 되었다 (Tanabe et al., 1988; Ellis et al., 1988; Ruth et al., 1989; Reviewed by Perez-Reyes and Schneider, 1994).

2. 칼슘채널의 다양성: subunit의 종류 및 특징

근육에 있는 α_1S 가 DHP를 이용한 고전적 단백질 정제 방법에 의해 클로닝된 이래, α_1S 의 cDNA를 probes로 사용하여 cDNA library를 low-stringency 상태에서 screening하거나 혹은 degenerate primers를 이용한 PCR을 통하여 α_1C , α_1D , α_1A , α_1B , α_1E 가 클로닝 되었다 (Reviewed by Perez-Reyes and Schneider, 1994). 최근에는 신경세포 및 심근세포에서 pacemaker 역할을 하며, 부신피질에서 코티졸과 알도스테론을 분비함에 있어서 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 T-형 칼슘통로의 cDNA들이 cDNA library로부터 클로닝 되었다. T-형 통로의 클로닝은 Genbank에 있는 정보들을 분석하는 과정에서 그 실마리가 얻어져 클로닝되었다는 점에서 다른 칼슘통로들의 클로닝 과정과 다르다. 첫 T-형 칼슘통로, α_1G 의 클로닝 후 α_1H 및 α_1I 라는 T-형 통로의 cDNA가 클로닝되어, T-형 칼슘통로에 최소한 세 개의 아형이 존재함이 밝혀졌다 (Perez-Reyes et al., 1998; Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999). 또 야맹증 연관된 유전자를 추적하는 과정에서 눈의 retina에서만 발현되는 α_1F 가 클로닝되어 (Bech-Hansen, 1998) 지금 까지 10가지의 칼슘채널 α_1 아형들이 클로닝되었다. 이렇게 많은 아형들에 밝혀짐에 따라 이들의 명명법이 변형되었으며, 각 아형에 따라 지금까지 밝혀진 전기생리학적, 약리학적 특징들은 표 1에 나타나 있다 (Ertel et al., 2000).

Name	Former Name	Threshold & Expression	Antagonists
Cav1.1	$\alpha 1S$ (L-type)	HVA, skeletal muscle	DHP, diltiazem, verapamil
Cav1.2	$\alpha 1C$ (L-type)	HVA, heart, lung, vessel, brain	DHP, diltiazem, verapamil
Cav1.3	$\alpha 1D$ (L-type)	MVA, brain, pancreas	DHP
Cav1.4	$\alpha 1F$ (L-type)	? , retina	? (not expressed yet)
Cav2.1	$\alpha 1A$ (P/Q-type)	HVA, brain, kidney	ω -agatoxin IVA
Cav2.2	$\alpha 1B$ (N-type)	HVA, brain, peripheral neuron	ω -conotoxin GVIA
Cav2.3	$\alpha 1E$ (R-type)	MVA, brain	SNX482
Cav3.1	$\alpha 1G$ (T-type)	LVA, brain, kidney	mibepradil, kurtoxin
Cav3.2	$\alpha 1H$ (T-type)	LVA, brain, peripheral neuron	mibepradil, kurtoxin
Cav3.3	$\alpha 1I$ (T-type)	LVA, brain	mibepradil

β subunit은 근육의 DHP 수용체의 분리/정제 과정에서 $\alpha 1$ 과 함께 정제된 단백질로, 단백질의 일부 아미노산 서열 결정, 상응하는 염기서열의 합성, 이것을 probes로 사용한 cDNA library 등의 과정을 거쳐 최초로 클로닝되었다. 근육의 β subunit을 $\beta 1$ 이라고 하며, $\beta 1$ 의 정보를 이용해 제작한 degenerate primers를 사용하여 RT-PCR과 그 산물을 이용한 cDNA library screening으로부터 $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ 가 클로닝되었다. 이들 중 $\beta 1$ 은 골격근에, $\beta 2$ 는 심장과 혈관계에, $\beta 3$ 와 $\beta 4$ 는 신경에 주로 발현하는 것으로 밝혀졌다 (Ruth et al., 1989; Perez-Reyes et al., 1992; Castellano et al., 1993a,b). β 의 기능은 β 를 $\alpha 1$ 과 함께 발현시킬 때 잘 나타나는데, $\alpha 1$ 이 막에 도달할 수 있도록 촉진할 뿐만 아니라, $\alpha 1$ 의 구조적으로 안정화시킨다. 즉, $\alpha 1$ 에 비하여 $\alpha 1\beta$ 복합체는 전위변화에 반응하여 더욱 큰 전류를 형성할 뿐만 아니라, 반응하는 전위가 낮으며 (역치의 감소), 그 결과 전위-전압 관계에서는 negative shifting의 특징을 나타낸다. 이 때 형성된 칼슘통로를 통해 측정된 전류의 활성화 및 비활성화 kinetics는 함께 발현시킨 β subunit의 아형과 splicing variants에 따라 더욱 다양하게 나타난다. 또한 β subunit에 의한 세포막 상의 $\alpha 1$ 구조체 수 증가 및 안정된 구조화는 약리학적으로 약물의 수용체인 칼슘채널의 B_{max} 를 증가시키며, K_d 를 감소시킨다 (Wei et al., 1994).

$\alpha 2-\delta$ 는 disulfide 결합에 의해 연결되어 있어서 정제된 칼슘채널에 DTT이나 mercaptoethanol 같은 환원제를 처리하면 $\alpha 2$ 와 δ 로 나누어진다. 항체 실험에 의하면 $\alpha 2$ 는 세포막의 바깥쪽에 위치하며 막단백질인 δ 에 연결되어 고정되어 있다. $\alpha 2-\delta$ 를 $\alpha 1$ 과 공동 발현시키면 $\alpha 1$ 만 발현시켰을 때에 비하여 측정되는 전류의 크기가 5-10 배 정도 향상된다. 하지만 β subunit에 의해 보였던, 전압에 대한 활성도가 변화하지는 않는다. 약물에 의한 binding assays에서는 $\alpha 2-\delta$ 이 칼슘통로의 B_{max} 를 증가시키며, 약물에

대한 binding affinity도 항상 시킴이 밝혀졌다 (Wei et al., 1994; Shistik et al., 1994). 흥미롭게도 $\alpha 2-\delta$ 과 β 를 $\alpha 1$ 과 공동 발현시키면 발현의 정도나 약물에 대한 affinity 증가에 있어서 상승효과가 있다.

최초의 $\alpha 2-\delta$ 는 골격근의 DHP 수용체를 분리하는 과정에서 정제, 클로닝되었으며, 최근에 2개의 새로운 아형이 BLAST 프로그램을 사용한 Genbank search 및 연속된 cDNA library screening으로부터 클로닝되어 최소한 3 종류의 $\alpha 2-\delta$ 가 있으며, 이들이 간질 치료제인 gabapentin의 작용 부위라는 것이 밝혀졌다 (Ellis et al., 1988; Gurnett et al., 1996; Klugbauer et al., 1999; Marais et al., 2001).

(1) L-형 칼슘채널 ($\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$)

L-형 칼슘채널은 전기생리학적으로 그 전류가 오래 유지되는 (long-lasting) 특징을 가지고 있으며, 약리학적으로는 고혈압 치료제들인 dihydropyridine, verapamil, diltiazem 계열의 약물에 민감하게 차단되는 특징을 가지고 있다. 반대로 S(-)-BayK8644와 FPL과 같은 약물에 의해서는 전류의 크기가 증가되는 특징을 가지고 있다. 아미노산 서열의 유사성 비교해보면, 이 L-형 채널에는 다음과 같이 4종류의 아형이 있다: $\alpha 1S$ (Cav1.1), $\alpha 1C$ (Cav1.2), $\alpha 1D$ (Cav1.3), $\alpha 1F$ (Cav1.4),

$\alpha 1S$ 는 동물의 골격근에 발현하며, 신경을 통한 자극 전달 시 t-tubule을 통해 전파된 전위의 탈분극에 반응하여 활성화되며, 활성화된 칼슘채널은 sarcoplasmic reticulum에 있는 ryanodine 수용기와 직접 연관되어, ryanodine 수용체의 구조변형 및 활성화를 일으킨다. 그 결과 세포 내의 칼슘 저장소인 sarcoplasmic reticulum으로부터 칼슘방출을 일으켜 세포질의 칼슘농도를 증가, troponic C, troponinc I, troponin T, tropomyosin의 일련의 연속된 구조 변형을 일으키며, 결과적으로 근수축 단백질인 actin과 myosin의 수축작용을 유도한다. Ringer는 100여 년 전에 골격근의 수축은 세포 외부에 칼슘이 없어도 한 동안 유지될 수 있음을 보였는데, 이와 같은 실험들과 연관하여 볼 때, 골격근의 칼슘채널은 칼슘이온을 통과시키는 기능보다는 전기신호를 인지해 ryanodine 수용체에 전달해 세포 내부의 sarcoplasmic reticulum에 저장되어 있는 칼슘이 ryanodine receptor를 통해 방출될 수 있도록 그 기능이 진화과정에서 변형되었다고 생각된다. 이와 같은 변형된 칼슘채널의 기능은 동물이 먹이를 잡을 때 혹은 위기로부터 도망갈 때 tetanus 같이 평상시보다 더 큰 힘을 낼 수 있도록 하는 장점을 가지고 있다 (Hille, 1992; Bers 1993).

고혈압 치료제들은 심장 및 혈관에 주로 발현되는 $\alpha 1C$ (Cav1.2)에 주로 작용하여 $\alpha 1C$ 통로를 통해 세포 내부로 들어오는 칼슘의 양을 감소시킴으로써 상대적으로 심근과 평활근의 수축 정도를 줄여, 혈압의 상승을 방지한다. 첫 $\alpha 1C$ (Cav1.2)는 $\alpha 1S$ 의 cDNA를 probe로 사용하여 low stringency에서 심장의 cDNA library를 screening함으로써 클로닝되었다 (Mikami et al., 1989). 심장에 있는 칼슘채널의 정제는 t-tubule에 있는 칼슘채널의 밀도에 비해 매우 낮아 연구에 어려움이 있었지만, 생화학적 방법에 의한 정제된 심장의 칼슘채널의 구조는 $\alpha 1C$, $\beta 2$ 및 $\alpha 2-\delta$ 로 구성되어 있음이 밝혀졌다 (Chang and Hosey 1988; Hell et al., 1993). 신경전달 물질과 호르몬에 의한 심장의 박동 조절은 심장세포의 막에 있는 β -adrenergic 수용체가 활성화되었을 때는 칼슘채널이 인산화에 의해 활성화되어 심장 박동의 빈도와 세기를 증가시키며 (Gao et al., 1997), vagus nerve가 자극되어 신경세포로부터 acetylcholine이 방출되었을 경우에는 GIRK라는 K^+ channel이 활성화되어 심장 박동의 횟수와 세기가 줄어든다. β -adrenergic 수용체의 활성화는 연속적으로 Gs 단백질의 활성화, adenylyl cyclase의 활성화, protein kinase A의 활성화를 일으킨다. 활성화된 kinase A는 칼슘통로와 sarcoplasmic reticulum 내로 칼슘을 능동수송하는 칼슘펌프를 인산화하여 더 강하고 빠른 수축/이완 현상을 일으킨다 (Bers 1993).

$\alpha 1D$ (Cav1.3)는 사람, 생쥐, 쥐, 햄스터 등에서 클로닝되었으며 아미노산 서열상 L-형 칼슘통로로 분류되었다. $\alpha 1C$ 가 심장과 혈관에 주로 발현하는 반면, $\alpha 1D$ 는 신경조직, 호르몬 분비기관에 주로 발현하며, 심장에도 부분적으로 발현하는 것이 밝혀졌다. 하지만 $\alpha 1D$ 클론은 발현계에 적절히 발현되지 않아서 그 특징이 제대로 규명되지 않다가, 최근에 와서야 HEK293 세포와 Xenopus oocytes에 발현되어 그 전기생리학적 및 약리학적 특징이 밝혀졌다. 흥미롭게도 $\alpha 1D$ 는 $\alpha 1C$ 에 비하여 15 mV 정도 낮은 역치를 가지고 있으며, 약리학적으로는 $\alpha 1C$ 에 비하여 DHP 계열의 약물에 덜 민감하게 반응하는 특징을 가지고 있다 (Koschak et al., 2001; Xu and Lipscombe, 2001).

L-형 칼슘통로 중 가장 최근에 클로닝된 $\alpha 1F$ 는 눈의 retina에만 발현되는 것으로 알려져 있으며 아미노산 서열상 L-형 칼슘통로에 가깝다. $\alpha 1F$ 의 클론ning은 인간의 암맹증과 연관된다는 사실로부터 염색체상의 상대적 위치를 알아낸 후 chromosome walking을 통하여 이루어졌다. 클로닝된 $\alpha 1F$ cDNA는 아직까지 다른 발현계에 적절

히 발현되지 못해 전기생리학적 및 약리학적 특징에 대해서는 알려진 바가 없다 (Bech-Hansen et al., 1998).

(2) Non-L-형 칼슘통로 ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1E$)

Non-L-형 칼슘통로는 근육세포에서 측정되는 L-형 칼슘채널과 달리 전위고정법에 의해 측정된 전류가 오래 유지되지 않는 특징을 보이며, 약리학적으로는 고혈압 치료제들인 dihydropyridine, verapamil, diltiazem 계열의 약물에 차단되지 않으며, 주로 신경세포에 존재하는 것으로 알려졌다. 여기에 포함되는 칼슘통로는 최초로 클로닝된 $\alpha 1S$ 를 probe로 사용하여 뇌 cDNA library를 screening하거나 또는 degenerate primer를 이용한 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)에 의해 발견되어, 지금까지 세 종류의 $\alpha 1$ subunits ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1E$)가 클로닝되었으며, 이들의 cDNA들은 다른 발현계에서 전기생리학적 및 약리학적 특성이 규명되었다. 전기생리학적 및 약리학적 특징을 기준으로, $\alpha 1A$ 는 분리된 신경세포에서 발견되는 P/Q-형 칼슘통로를 형성하며, $\alpha 1B$ 는 뇌에 가장 많이 발현되는 칼슘통로로 N-형 칼슘통로를 형성하며, $\alpha 1E$ 는 대부분의 약물에 의해 차단되지 않는 R-형 칼슘통로로 알려졌다 (Reviewed by Perez-Reyes and Schneider, 1994). 이들 칼슘통로를 민감하게 차단하는 약물로는, P/Q-형 칼슘통로의 특이차단제인 ω -Agatoxin IVA, N-형 칼슘통로의 특이차단제인 ω -Conotoxin GVIA가 있으며, 최근에는 $\alpha 1E$ 전류를 민감하게 차단하는 SNX482라는 약물이 발견되었다. Non-L-형 칼슘통로들은 주로 신경세포와 호르몬 분비기관에 발현하며, 대표적 기능은 시냅스 전달 및 호르몬 분비에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 그 외에도 다양한 효소와 유전자의 활성에 관여한다. Na^+ 통로의 연속적 활성화에 의해 축색돌기를 통해 전파되어온 활동전위가 presynapse의 말단에 도달하면, 그곳에 있는 non-L-형 칼슘통로들을 활성화시킨다. 외부의 칼슘이온이 열린 칼슘통로를 통해 세포 내부로 들어와 신경전달물질을 담고 있는 소낭들을 세포막과 결합시키는 과정을 거쳐 신경전달물질의 세포외분비를 일어나며, 이 물질이 시냅스 간극을 확산에 의해 퍼져 postsynaptic 세포막에 도달하여 그곳의 수용기에 작용함으로써 화학적 시냅스 전달이 이루어지게 된다. 호르몬 분비기관은 신경세포와 시냅스를 형성하고 있으며 신경을 통하여 뇌로부터 신호가 전달되면, 호르몬 분비 세포에 있는 칼슘통로가 활성화되어 세포 내 칼슘이 증가하고 이것이 신호매체로 작용하여 호르

본을 분비한다.

Non-L-형 칼슘통로는 다양한 신경전달물질에 의해 조절되는데, 대부분 G-protein의 활성화를 통해 이루어짐이 밝혀졌다. 초창기의 주장과는 반대로 G-protein의 활성화 시 $G\alpha$ 에서 분리된 $G\beta\gamma$ 가 칼슘통로의 $\alpha 1$ subunit에 불음으로 인해 칼슘전류의 활성화 키네틱스가 느려지며, 이러한 down-regulation은 과도한 과분극을 가하면 $G\beta\gamma$ 가 non-L-형 칼슘통로에서 떨어져 원래 모양의 칼슘전류로 돌아갈 수 있음이 밝혀졌다 (Ikeda, 1996; Herlitze, 1996). 칼슘통로의 β subunit은 칼슘통로 $\alpha 1$ subunit의 Domain I과 II 사이 루프에 붙어서 작용하는 것이 밝혀졌는데, $G\beta\gamma$ 도 Domain I과 II 사이의 비슷한 부위에 작용해 두 요소가 상호 경쟁적 관계를 갖으며 조절한다고 생각된다 (Berrow et al., 1995; De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997). 그 후 $G\beta\gamma$ 가 단순히 I-II 루프에만 작용하는 것이 아니라 아미노 말단과 카르복실 말단에도 작용함이 밝혀졌다 (Qin et al., 1997; Page et al., 1998). 그 외에도 시냅스 전달에 관련된 주요 물질 중 syntaxin에 의해 non-L-형 칼슘통로가 조절됨이 밝혀졌다 (Bezprozvanny et al., 1995).

(3) T-형 칼슘통로 ($\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$)

T-형 칼슘통로는 전위고정법에 의해 전류 측정 시 휴지전위 근처에서 활성화되며, 전류가 빠른 속도로 활성화 되었다가 곧바로 비활성화 (fast inactivation)되어 transient한 모양을 나타낸다. 또한 single channel conductance가 다른 칼슘통로에 비하여 작은 (tiny) 특징을 가지고 있어서, 이 특징들을 나타내는 단어의 첫째 알파벳을 따서 T-형 칼슘통로라고 명명되었다. T-형 칼슘통로는 다른 칼슘통로에 비하여 활성화되는 역치가 매우 낮아 심장의 동결절과 신경세포들에서 자발적 활동전위를 일으키는 pacemaker 역할을 하며, 따라서 심방의 수축에 관여하며, 평활근의 수축, 부신피질에서 cortisol, aldosterone의 분비, 신경의 흥분성 (thalamic low-threshold Ca^{2+} spike, rebound burst firing, oscillations, and resonance), 조직의 발달 등에 관여하는 것으로 알려지고 있다 (Huguenard, 1996).

T-형 칼슘통로에 대한 분자수준에서의 정체와 다양성은 본인이 박사과정과 연구원으로 연구했던 Edward Perez-Reyes의 실험실에서 세 종류의 T-형 칼슘통로의 cDNA를 클로닝하고, 발현시키는데 성공함으로써 밝혀지게 되었다 (Perez-Reyes et al., 1998; Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999). 이 세 클론을 $\alpha 1G$ (Cav3.1), $\alpha 1H$ (Cav3.2), $\alpha 1I$ (Cav3.3)라고 명명하-

였고, 발현 후 측정된 전류들은 알려진 바와 같은 T-형 칼슘통로의 특징을 보였다. $\alpha 1G$ 와 $\alpha 1H$ 는 휴지전위 근처의 낮은 전위에서 활성화, 빠른 활성화 및 비활성화 키네틱스, 느린 deactivation, 작은 single channel conductance 등의 특징들을 나타냈지만 $\alpha 1I$ 는 $\alpha 1G$ 와 $\alpha 1H$ 에 비하여 매우 느린 활성화/비활성화 키네틱스를 보였다.

일반적 전위활성화 칼슘이온 통로의 구조는 생화학적 및 전기 생리학적 실험을 통해 $\alpha 1$, $\alpha 2-\delta$, β 로 구성되어 있음이 밝혀졌지만, T-형 칼슘통로의 보조 subunit에 대해서는 아직 알려진 바가 거의 없으며, 앞으로 연구가 수행되어야 할 것이다.

T-형 칼슘통로에 대한 연구는 특이차단제의 부족으로 많은 어려움이 있었다. 니켈을 T-형 채널의 차단제로 사용하여 많은 연구가 진행되어 왔지만, 심장의 동결절에 있는 T-형 전류는 니켈에 비교적 민감하게 차단되었지만, 뇌의 여러 부위에서 측정되는 T-형 전류는 니켈에 민감하지 않은 것으로 보고되어, T-형 채널 연구에 있어 니켈의 차단 민감성과 사용의 적절성 여부에 대한 논란이 되어 왔다. 이와 같은 문제점은 클로닝된 $\alpha 1G$, $\alpha 1H$, $\alpha 1I$ 를 발현시킨 후 니켈에 의한 차단성을 연구해 봄으로써 해결되었는데, 세 종류의 T-형 칼슘통로 중, $\alpha 1H$ 만 니켈에 민감하게 차단된다는 것이 밝혀졌다 (Lee et al., 1999). 또한 Roche Co.에서 개발된 mibepradil과 전갈에서 분리된 kurtoxin이라는 물질은 T-형 칼슘통로를 민감하게 차단하는 것으로 알려져 앞으로 T-형 칼슘통로에 대한 약리학적 연구에 큰 발전을 가져올 것으로 전망된다 (Chuang et al., 1999; Martin et al., 2000).

■ 결 론 ■

$\alpha 1$, β , $\alpha 2-\delta$ 로 구성된 전위활성화 칼슘통로는 여러 subunit들의 (10개의 $\alpha 1$, 4개의 β , 3개의 $\alpha 2-\delta$) 조합에 의해 다양한 구조를 가지고 있다. 여기에 최근에 와서야 그 기능이 알려지기 시작한 4개의 γ (Kang et al., 2001)까지 포함시킨다면, 칼슘통로의 다양성은 더욱 증가할 것이다. 이렇게 다양한 구조와 더불어 칼슘통로의 생리적 기능은 근육 수축, 시냅스 전달, 호르몬 분비, 효소 활성도 조절, 유전자 발현 조절을 포함해, 동물체 내의 다양한 생리 현상에 직간접적으로 관여한다고 해도 과언이 아닐 것이다. 더군다나 최근 들어 칼슘통로를 구성하는 유전자의 knockout 및 신경, 근육, 시각에 관련된 다양한 유전병이 칼슘통로의 돌연변이에 의해 발생함이 밝

혀지고 있어 칼슘통로의 구조 및 기능에 대한 연구의 중요성은 더욱 부각되고 있는 추세이다 (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999; Jun et al., 1999). 따라서 우리 나라에서도 칼슘통로에 대한 집중적인 연구가 요망되며, 차후 칼슘통로 차단제의 개발은 고혈압 치료제, 간질 치료제 등의 신약개발로 이어질 수 있다. 그러므로 이 분야의 연구에 집중적이고 장기적인 투자가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

■참고문헌■

- Bech-Hansen NT et al. (1998) X-linked congenital stationary night blindness (CSNB) is a recessive non-progressive retinal disorder characterized by night blindness, decreased visual acuity, myopia, nystagmus and strabismus. *Nature Genetics* 19:264-7.
- Berrow NS, Campbell V, Fitzgerald EM, Brickley K, Dolphin AC. (1995) Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J. Physiol.* 482:481-91.
- Bers DM.. (1993) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 1st ed. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW. (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378:623-6.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Tsien RW. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13:505-6.
- Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, Zamponi GW. (2001) Interaction of SNX482 with Domains III and IV Inhibits Activation Gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) Calcium Channels. *Biophys. J.* 81:79-88.
- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E. (1993a) Cloning and expression of a third calcium channel beta subunit. *J Biol Chem.* 268(5):3450-5.
- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E. (1993b) Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem.* 268(17):12359-66.
- Chang FC and Hosey M. (1988) Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J. Biol. Chem.* 263:18929-37.
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ. (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* 1:668-74.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. (1994) Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 3:495-503.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP. (1997) Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385:446-50. Ellinor PT, Yang J, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. (1995) Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron* 15:1121-32.
- Ellis SB, et al. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channels. *Science* 241:1661-64.
- Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM. (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* 19:185-96.
- Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. (1996) Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 6:431-40.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258-62.
- Hille B. (1992) Ionic Channels of Excitable Membranes. 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. Huguenard JR. (1996) Low threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58:329-48.
- Ikeda SR. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255-8.

- Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS. (1999) Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:15245-50.
- Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts VA, Frankel WN, Mori Y, Campbell KP. (2001) Biochemical and biophysical evidence for $\gamma 2$ subunit association with neuronal voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 276:32917-24.
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F. (1999) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci.* 19:684-91.
- Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, Striessnig J. (2001) Alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. *J. Biol. Chem.* 276:22100-6.
- Lehmann-Horn F and Jurkat-Rott K. (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79:1317-72.
- Marais E, Klugbauer N, Hofmann F. (2001) Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol* 59:1243-8.
- Martin RL, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E, Hanck DA. (2000) Mibepradil block of cloned T-type calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295:302-8.
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 355:230-3.
- Page KM, Canti C, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC. (1998) Identification of the amino terminus of neuronal Ca²⁺ channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation. *J. Neurosci.* 18:4815-24.
- Perez-Reyes E, Schneider T. (1994) Calcium channels: structure, function and classification. *Drug Dev. Res.* 33:295-318.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. (1994) Calcium channel beta-
- subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368:67-70.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L. (1997) Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8866-71.
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F. (1988) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245: 18914-9.
- Safa P, Boulter J, Hales TG. (2001) Functional properties of CaV1.3 L-type Ca²⁺ channel splice variants expressed by rat brain and endocrine GH3 cells. *J. Biol. Chem.* In Press.
- Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M, Dascal N. (1995) Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in Xenopus oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J. Physiol.* 489:55-62.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-8
- Wei X, Pan S, Lang W, Kim H, Schneider T, Perez-Reyes E, Birnbaumer L. (1995) Molecular determinants of cardiac Ca²⁺ channel pharmacology. Subunit requirement for the high affinity and allosteric regulation of DHP binding. *J. Biol. Chem.* 270:27106-11.
- Xu W and Lipscombe D. (2001) Neuronal CaV1.31 L-Type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J. Neurosci.* 21:5944-51.
- Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. (1993) Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channel. *Nature* 366:158-61
- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 385:442-6.