

Regulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor by Tyrosine Kinase in Autonomic Major Pelvic Ganglion Neurons

Dae-Ran Kim¹, Sung Wan Ahn², Kyu Sang Park³ and In Deok Kong^{3,†}

¹Department of Basic Nursing Science, College of Nursing, Keimyung University, Daegu 705-717, Korea.

²Department of Pharmacology, College of Medicine, Yonsei University, Gangwon-Do 220-701, Korea.

³Department of Physiology, College of Medicine, Yonsei University, Gangwon-Do 220-701, Korea

It is widely known that protein tyrosine kinases (PTKs) are involved in controlling many biological processes such as cell growth, differentiation, proliferation, survival and apoptosis. An $\alpha 3\beta 4$ subunit combination acts as a major functional acetylcholine receptor (nAChRs) in male rat major pelvic ganglion (MPG) neurons, and their activation induces fast inward currents and intracellular calcium increases. Recently it has been reported that the activity of acetylcholine receptors (AChRs) in some neurons can be negatively regulated by PTKs. However, the exact mechanism of regulation of nAChRs by PTKs is poorly understood. Therefore, we examined the potential role particular in nAChR by PTK using electrophysiology and calcium imaging in male rat MPG neurons. ACh induced inward currents and $(Ca^{2+})_i$ increases in MPG neurons, concomitantly. These responses were inhibited by more than 90% in Na^+ - or Ca^{2+} - free solution. α -conotoxin AulB, a selective $\alpha 3\beta 4$ nAChR blocker, inhibited ACh-induced inward currents. Genistein (10 μM), a broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor, markedly decreased ACh-induced currents and Ca^{2+} transients, whereas 10 μM genistin, an inactive analogue, had little effect. Overall these data suggest that the activities of $\alpha 3\beta 4$ AChRs in MPG neurons are positively regulated by PTK. In conclusion, tyrosine kinase may be one of the key factors in the regulation of $\alpha 3\beta 4$ nAChRs in rat MPG neurons, which may play an important roles in the autonomic neuronal function such as synaptic transmission, autonomic reflex, and neuronal plasticity.

Key Words: Major pelvic ganglia, Nicotinic acetylcholine receptor, Protein tyrosine kinase

서 론

방광을 포함한 비뇨기계, 내부 생식기계, 하부 장 (lower bowel) 등과 같은 골반내 장기들은 자율신경계의 지배를 받으며, 여기에 분포하는 자율신경은 표적 장기 가까운 곳에 위치하는 골반 신경절에서 시냅스를 이룬 후 표적 장기로 들어간다. 따라서 골반내 장기들의 생리적 및 병리적 기전을 알기 위해서는 골반 신경절의 구조와 기능뿐만 아니라 세포 수준에서의 조절기전을 이해해야 할 필요가 있다.

골반 신경절은 일반적으로 골반 장기 가까이에 위치하고 있기 때문에 골반 신경총 (pelvic plexus)으로 불리며 (Keast, 1995), 수컷 쥐에서는 여러 자율신경세포체들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있어 이를 주골반 신경절 (major pelvic

ganglion, MPG)이라 한다 (Keast, 1995). 여기에는 교감신경과 부교감신경 세포가 함께 존재하므로 (Keast, 1999) 골반 장기들의 기능을 조절하는 신경 반사 (neural reflexes)나 자율신경계 조절에 관한 생리적 및 병태생리학적 특성 등을 연구하는데 좋은 모델로 이용되고 있다 (Keast, 1995; 1999).

대부분의 자율 신경절에서 시냅스 전달은 니코틴성 아세틸콜린 수용체에 의해 매개되며 (Skok, 2002), 골반 신경절내 신경세포간 신경전달 및 조절에 있어서도 니코틴성 아세틸콜린 수용체가 주요 역할을 한다 (Park et al., 2006). 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 5개의 서브유닛 (subunit)으로 이루어진 오합체 (pentamer) 구조의 이온통로로 (Barnard, 1992) 아세틸콜린이 니코틴성 수용체에 결합하게 되면 이온통로를 개방시켜 주로 Na^+ 와 Ca^{2+} 의 유입과 K^+ 의 유출이 일어난다 (Dani, 2001). 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 현재까지 최소한 17개의 서로 다른 서브유닛 유전자 ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ , ϵ)가 클로닝 되어 있으며 (Lukas et al., 1999; Dani, 2001), 일반적으로 중추신경계에는 대부분 $\alpha 4\beta 2$ 와 $\alpha 7$ (Charpantier et al., 1998; Nakayama, 2006) 서브유닛 조합 (combination)이, 자율

*논문 접수: 2007년 4월 27일

수정재접수: 2007년 6월 5일

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

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

신경절에는 $\alpha 3\beta 4$ (Lukas et al., 1999; Park et al., 2006)가 주요 서브유닛으로 알려져 있으나 그 이외에도 자율 신경절 종류에 따라 $\alpha 2\beta 3$ (De Biasi, 2002), $\alpha 3\alpha 5\beta 4$, $\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$ (Lukas et al., 1999) 등의 서브유닛 조합도 발견되었다.

이와 같이 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 기능과 구조에 관해서는 많은 연구들이 이루어졌으나 생리적 및 병리적 조절기전에 관해서는 여전히 밝혀지지 않는 영역이 많으며, 특히 세포내 분자수준에서의 수용체 조절기전은 최근에 이르러 활발하게 연구되고 있는 실정이다. 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 조절에는 여러 단백질들이 기능적으로 관여하며 여기에는 PKA (protein kinase A), PKC (protein kinase C), PTK (protein tyrosine kinase) 등과 같은 kinases가 알려져 있다 (Swope et al., 1995). 이 중 PTKs는 주로 신경세포에 많이 발현되어 있으면서 니코틴성 아세틸콜린 수용체를 인산화 (phosphorylation) 시켜 이온통로 (ion channels) 조절, 세포성장 (cell growth), 증식 (proliferation), 분화 (cell differentiation), 시냅스 전달 (synaptic transmission) 등과 같은 다양한 생리적 기능을 조절한다 (Charpantier et al., 2005). PTKs와 리간드-의존성 이온 채널의 관련성에 관한 최근의 연구들은 특히 tyrosine kinase가 모든 니코틴성 아세틸콜린 수용체들의 조절에 관여하며, 수용체 서브유닛의 조합에 따라 조절양상이 달라지고, kinase들의 조절양상이 변화되면 수용체의 기능이 달라져 이에 따라 다양한 질병과 증상들이 발생하게 된다고 보고하고 있다 (Ortutay et al., 2005).

이상에서 살펴본 바와 같이 nAChRs는 PTKs에 의해 광범위하게 조절되고 있으며, 종 (species), 조직 (tissues), 수용체 서브유닛의 조합 (combination) 등에 따라 kinase의 조절특성이 달라짐을 알 수 있다. 지금까지 중추신경계에서의 PTKs에 의한 homomeric $\alpha 7$, heteromeric $\alpha 4\beta 2$ 서브유닛의 조절양상에 관한 여러 보고와 말초신경에서의 $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ 서브유닛의 특성이 일부 알려져 있다. 그러나 골반내 장기들의 기능을 조절하는 골반 신경절내 신경세포에 발현된 nAChR의 서브유닛과 tyrosine kinases의 조절관련성에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 수컷 쥐의 주골반 신경절 (major pelvic ganglia, MPG) 세포에 발현되어 있는 nAChR 서브유닛 특이적 기능적 특성을 확인하고, nAChR의 조절기전 중 하나로 PTKs가 관여하는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 200~250 g 내외의 수컷 쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하였다.

2. 실험용액 및 약물

1) 실험용액

니코틴성 아세틸콜린 전류의 측정과 세포내 칼슘 이온 농도 측정에 사용된 세포외 관류액의 조성은 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glucose이며, NaOH를 첨가한 후 pH가 7.4가 되도록 적정하였다. 전기생리 실험에 사용된 전극내 용액 (internal solution)의 조성은 115 mM K^+ -aspartate, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2.5 mM tris-phosphocreatine, 5 mM MgATP, 0.1 mM Na_2GTP 이며, NaOH를 첨가하여 pH가 7.2가 되도록 적정하였다. 약물의 투여는 perfusion valve control system (VC-6 M, 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, fura-2/AM은 Molecular Probe (Eugene, OR, USA)로부터, acetylcholine, sodium orthovanadate, genistein, genistin, DNase type I, 기타 세포 배양과 관련된 모든 배지 및 약물은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. α -conotoxin AulB는 한국생명공학연구원 (KRIBB)의 한구훈 박사로부터 제공받아 사용하였다.

3. 단일 신경세포 분리 및 유지

수컷 쥐 (200~250 g)를 pentobarbital sodium (50 mg/kg, *i.p.*)으로 마취시킨 뒤, 즉시 개복하여 전립선의 외측에 위치한 MPG를 적출하고, 이를 차가운 (4°C) Hank's balanced salt 용액으로 옮겼다. 수초를 벗기고 작은 틈새를 낸 후, 이를 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. 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 신경세포들을 배양용기에 넣어 흔들어서 분리한 후, clinical centrifuge (International Equipment Company, MA, USA)를 이용하여 1,000 rpm의 속도로 원심분리 하였다. 분리된 신경세포들을 10% fetal bovine serum, 1% glutamate, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 MEM에 재부유 (resuspend)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 코팅되어 있는 cover glass (직경 12 mm)에 plating 하였다. 이를 37°C 세포 배양기 (humidified incubator; 95% air-5% CO_2)에서 배양하였으며, 분리한 후 12 시간 이내에 실험에 사용하였다.

4. 전기생리학 실험

전기생리 실험은 EPC9 혹은 EPC7 (Instrutech Co., NY,

USA) 패치 클램프 증폭기 (patch clamp amplifier)를 사용하여 전형적인 전세포 패치 클램프 (whole-cell patch clamp) 방법으로 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. 만들어진 전극은 Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅을 하고 microforge로 열처리하여 다듬었으며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 2~3 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경 (inverted microscope, Nikon) 위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 세포막 전류는 막전압 고정법 (voltage-clamp method)을 사용하여 측정하였다. 막전압 고정법 기록을 위해서 세포막의 용량 (capacitance)과 직렬저항 (series resistance)은 80% 이상 보정하였으며, 실험시 sampling rate은 1 kHz, low-pass 필터는 2 kHz (-3dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit (v 8.50) (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) 혹은 pClamp6 (Axon Instrument, USA) 소프트웨어를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온 (22~24 $^{\circ}$ C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류측정 장치는 Fig. 3에 도식적으로 나타내었다.

5. 세포내 칼슘 이온 농도 측정

세포내 칼슘 이온 농도를 측정하기 위하여 형광측정 장치 (ratio fluorescence system)를 이용하였다. 세포내 칼슘 농도 측정은 형광 현미경 (Olympus, Japan)과 이에 연결된 형광측정 장치 (Ratio Fluorescence system; Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하였다. 이 시스템에는

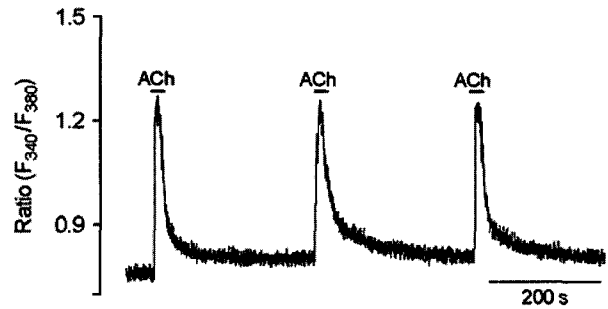


Fig. 1. ACh-induced calcium rise and its repetition upon consecutive applications of ACh in MPG neurons. 10 μ M ACh was applied for 5 sec as indicated by thick bars at 3 min intervals. $n=6$. $[Ca^{2+}]_i$ changes were expressed as intensity ratio of emission light excited at 340 and 380 nm (F_{340}/F_{380}). Data are presented as means \pm SEM.

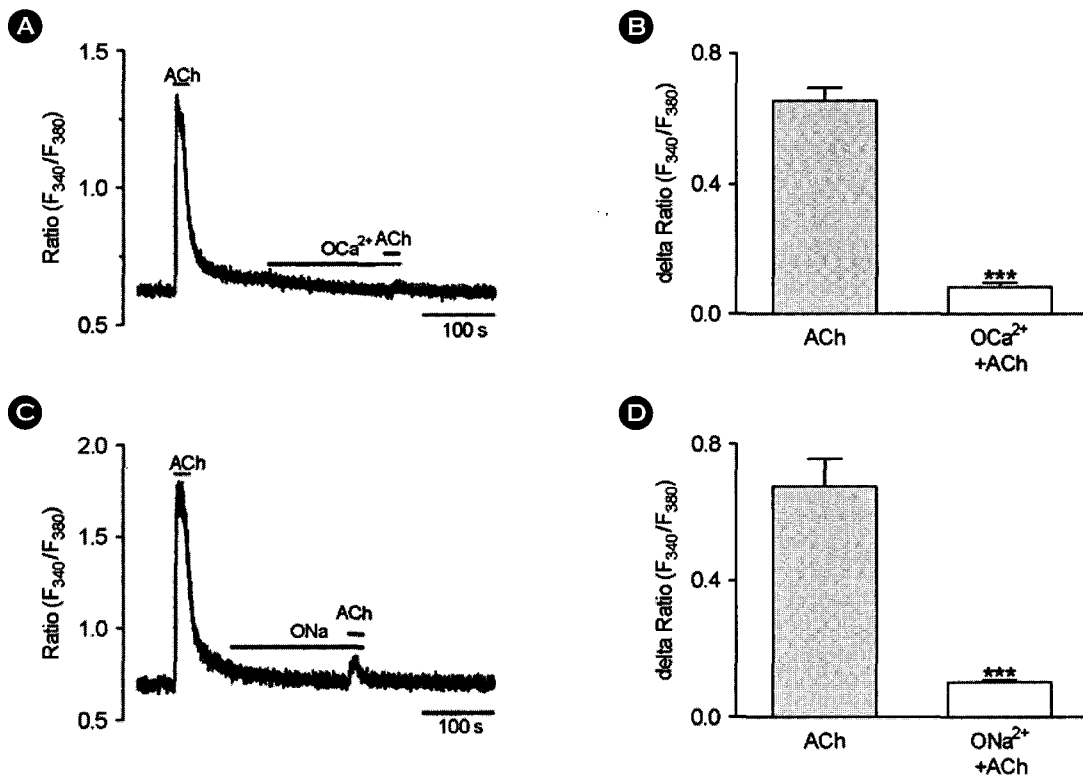


Fig. 2. Effects of extracellular Ca^{2+} & Na^{+} on ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in MPG neurons. 10 μ M ACh increased intracellular free calcium ion level, which response was completely abolished in the absence of extracellular Ca^{2+} concentration (A), and also almost suppressed by extracellular Na^{+} removal (B). *** $P<.001$

형광염료가 부하된 세포를 여기 (excitation) 시키기 위한 arc lamp housing과 작은 크기의 형광 신호를 증폭시킬 수 있는 photomultiplier 튜브 (PMT tube), 그리고 특정 파장의 빛을 통과시킬 수 있는 필터로 구성되어 있다. 형광의 신호들의 측정 및 분석은 FeliX 소프트웨어 (Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 통해서 실시하였다.

이온 농도를 측정하기 위해서는 이온들과 결합하여 형광 특성을 보이는 형광염료 (fluorescence dye)를 세포내에 부하시킨 뒤 형광 현미경을 통해 방출되는 형광의 세기를 분석하여야 한다. 칼슘 이온 농도를 측정하기 위해서 사용한 형광염료는 칼슘의 농도를 반영하는 fura-2/AM을 사용하였다. 실험 방법은 주골반 신경절 세포가 있는 배양접시에 fura-2/AM를 5 μM 농도로 처치하여 실온에서 빛이 차단된 상태로 30~60분간 두어 세포내로 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포의 관류액으로 2회 세척한 다음 현미경위에 올려놓고, 약물이 포함된 관류액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 이때 나타나는 형광세기의 변화를 기록 및 분석하였는

데, fura-2의 형광특성상 340 nm와 380 nm의 빛으로 번갈아가며 여기 (excitation)시켰을 때 510 nm로 방출 (emission)되는 형광강도의 비율 (F_{340}/F_{380})이 세포내 이온 농도를 반영하게 된다.

결 과

1. 주골반 신경절 세포에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 기능적 특성

주골반 신경절 세포에 fura-2/AM (5 μM)을 부하한 후 형광측정 장치 (ratio fluorescence system)를 이용하여 세포내 칼슘 농도를 측정하였을 때 10 μM 아세틸콜린에 의해 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 일시적 증가가 관찰되었으며, 3분 간격으로 반복 측정시에도 세포내 칼슘 이온 농도의 유의한 변화 없이 재현되었다 (Fig. 1). 아세틸콜린에 의해 증가한 세포내 칼슘 이온 농도는 세포외 용액에서 Ca^{2+} 을 제거한 상태 (Fig. 2A and B, $P<.001$) 및 Na^+ 을 제거한 상태 (Fig. 2C and D, $P<.001$)에서는

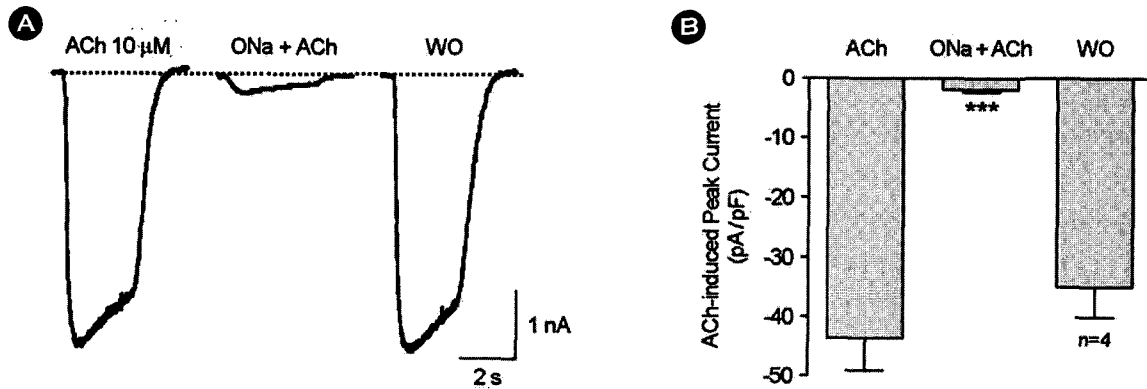


Fig. 3. Effect of extracellular Na^+ on ACh-induced inward currents. ACh-induced inward currents were almost completely blocked by Na^+ -free perfusion solution under the voltage clamp at -80 mV holding potential. Data are expressed in peak current density (pA/pF) and presented as means \pm SEM. n=the number of cells, nA=nanoampere, *** $P<.001$.

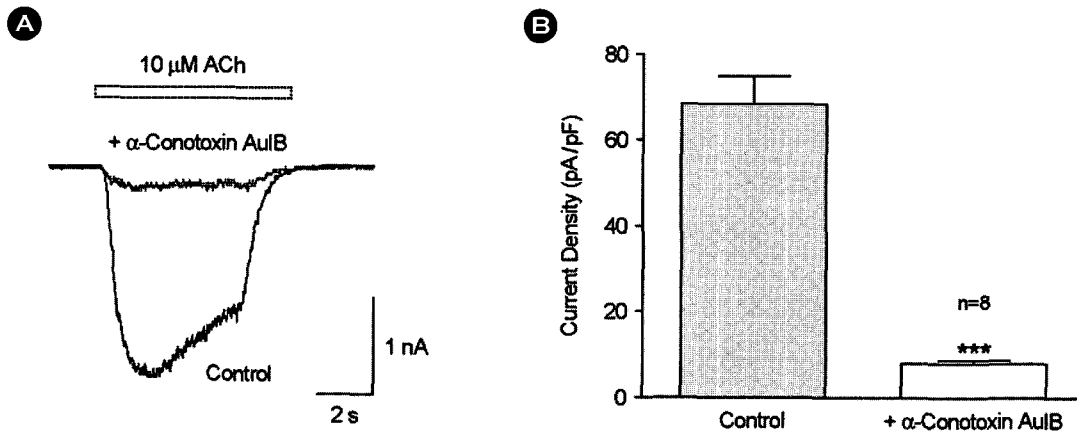


Fig. 4. Effect of α -Conotoxin AulB on ACh-induced peak current in MPG neurons. ACh-induced inward current was greatly attenuated after pretreatment with 10 μM α -Conotoxin AulB, a new novel selective antagonist for $\alpha 3\beta 4$ nAChR, *** $P<.001$.

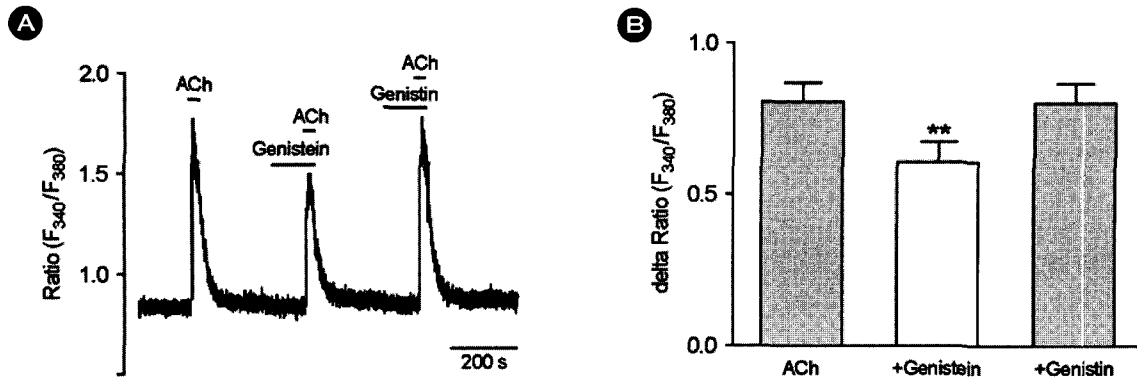


Fig. 5. Differential effect of genistein on ACh-induced calcium increments in MPG neurons. Genistein (10 μ M), a broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor, markedly decreased ACh-induced calcium transients, whereas 10 μ M genistein, an inactive analogue, had little effect. ** $P < .01$

별다른 증가를 나타내지 못하였다.

전세포 패치 클램프에서 막전압을 -80 mV로 고정된 후 아세틸콜린 (10 μ M)을 5초간 투여하였을 때 빠르게 유발되는 내향성 전류가 나타났으나, 세포의 용액에서 Na⁺을 제거한 상태에서는 90% 이상 전류의 크기가 감소하였으며 (Fig. 3A), 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Fig. 3B, $P < .001$).

아세틸콜린에 의해 유발된 내향성 전류는 선택적 $\alpha 3\beta 4$ 니코틴성 아세틸콜린 서브유닛 봉쇄제인 α -conotoxin AulB 10 μ M으로 3분간 전치치 하였을 때 그 크기가 80% 이상 감소하였으며 (Fig. 4A) 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Fig. 4B, $P < .001$).

2. 니코틴성 아세틸콜린 수용체에 미치는 tyrosine kinase의 영향

Tyrosine 인산화는 전사 후 주요 단백질 구조변경 기전으로 세포내 다양한 생리적 과정을 조절하며 특히, 신경조직에 광범위하게 발현되어 신경기능 및 조절에 직접 및 간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있는데, 골반 신경절 세포에서의 조절특성에 관해서는 거의 알려지지 않고 있다. 이에 tyrosine kinase가 쥐의 주골반 신경절 세포에 발현되어 있는 $\alpha 3\beta 4$ nAChR 서브유닛에 영향을 미칠 것이라는 가설을 세워 실험을 진행하였다.

형광측정 장치를 이용한 세포내 칼슘 이온 농도를 측정 한 결과, 10 μ M 아세틸콜린에 의한 [Ca²⁺]_i의 일시적 증가는 tyrosine kinase 억제제인 genistein (10 μ M)을 3분 동안 전치치 한 조건에서는 현저하게 감소하였으나 genistein의 비활성형 유사체 (inactive analog)인 genistin (10 μ M) 투여시에는 감소하지 않는 것으로 나타났으며 (Fig. 5A), 통계적으로도 Genistein에 의한 세포내 칼슘 이온 농도의 감소는 유의하게 나타났다 (Fig. 5B, $P < .01$).

고 찰

니코틴성 아세틸콜린 수용체의 기능적 및 약물학적 특성은 일차적으로 수용체의 서브유닛 조합에 따라 차이가 있으나 (Meyer et al., 2001), 서브유닛 조합이 같더라도 종 (species) 간, 그리고 발현되어 있는 조직 (tissues)이나 세포 (cells)에 따라서도 아세틸콜린 수용체의 기능적 특성이 달라지는 것을 볼 수 있다 (Lukas et al., 1999; Dani, 2001).

쥐의 주골반 자율 신경절 세포에 아세틸콜린 투여시 유발되는 전류의 크기는 10 μ M α -conotoxin AulB 전치치에 의해 현저하게 감소하였다. 또한 선행연구에서 역전사 연쇄 증합반응 결과 주골반 신경절 세포에는 다량의 $\alpha 3$ 서브유닛 mRNA 이외에도 $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ 가 발현되어 있는 것으로 나타난 (Park et al., 2006) 결과를 종합해 볼 때, 수컷 쥐의 주골반 신경절 세포에는 주로 heteromeric $\alpha 3\beta 4$ 니코틴성 아세틸콜린 수용체가 기능적으로 활성화되어 있음을 알 수 있었다.

한편, 아세틸콜린 투여시 세포내로 유입되는 내향성 전류는 세포외액의 Na⁺을 제거한 상태에서 전류의 크기가 90% 이상 감소하였으며 (Fig. 3), 세포외액의 Na⁺과 Ca²⁺을 각각 제거한 상태에서 세포내 칼슘 이온의 증가가 미미한 것으로 나타났다 (Fig. 2). 이러한 기전에 관하여 선행연구에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체가 활성화 되면 세포내로 유입된 Na⁺에 의해 Na⁺-Ca²⁺ exchanger가 작동하여 세포내로 칼슘 이온이 유입될 가능성을 언급한 경우도 있지만 (Zhang et al., 1999) 세포외액의 Na⁺을 모두 K⁺으로 치환한 경우에도 아세틸콜린에 의한 칼슘 이온 농도의 증가에는 큰 차이가 없는 것으로 (Park, 2003) 밝혀졌다. 또한 주골반 신경절 세포에 발현된 니코틴성 아세틸콜린 수용체를 통해 직접 칼슘이 유입되어 세포막을 흥분시키는 것으로 보고하고 있으나 (Park et al., 2006), 본 연구를 통해 확인한 바에 의하면 쥐

의 주골반 신경절 세포에 발현되어 있는 $\alpha 3\beta 4$ 아세틸콜린 수용체를 통해서 주로 세포막 Na^+ 이 세포내로 유입되고, 이로 인해 막전압 의존성 Ca^{2+} 채널이 열리면서 세포막 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되는 것으로 설명할 수 있겠다. 쥐의 주골반 신경절 세포에서 탈분극에 의한 세포내 칼슘 이온의 유입기전은 $\alpha 3\beta 4\alpha 3$ 서브유닛으로 이루어진 부신의 크롬친화성 세포에 발현된 니코틴성 아세틸콜린 수용체를 통한 유입기전과 유사한 것으로 나타났으나 $\alpha 7$ 수용체를 통한 세포내 칼슘증가는 세포의 칼슘이 직접 유입되는 것과는 차이를 보였다. 니코틴성 아세틸콜린 서브유닛 중 Ca^{2+} 의 투과도가 있는 서브유닛은 $\alpha 3$ (Rogers and Dani, 1995), $\alpha 5$ (Gerzanich et al., 1998), $\alpha 7$ (Peng et al., 1994) 등이 알려져 있는데 수컷 쥐의 주골반 신경절 세포에 발현되어 있는 $\alpha 7$ 서브유닛은 기능적으로 활성화되어 있지 않으므로 (Park et al., 2006) 니코틴성 아세틸콜린 수용체를 통한 세포내 Ca^{2+} 의 유입은 주로 $\alpha 3$ 서브유닛의 활성화로 인한 것으로 사료되며, 일부 $\alpha 5$ 서브유닛이 세포내 칼슘 이온 농도의 증가에 관여하리라 추측해 볼 수 있다.

이온 채널은 단백질 인산화와 탈인산화를 포함하는 세포내 다양한 신호전달 경로에 의해 조절되는데, 단백질 인산화는 채널의 활성도와 전기생리학적 특성을 변화시킨다 (Davis et al., 2001). 최근 들어 단백질 kinase의 유전자가 전체 단백질 유전자의 2%를 차지할 정도로 그 비중이 높고 총 단백질 kinase의 20%가 tyrosine kinase라는 사실이 알려지면서 (Manning et al., 2002) 세포내 다양한 조절기전에 tyrosine kinase가 관여하고 있음이 새롭게 보고되고 있다. 게다가 tyrosine kinase는 동일한 과 (family)라 할지라도 발현되어 있는 조직에 따라 다른 작용을 나타내는 특성 때문에 흥미롭게 연구되고 있는 분야이기도 하다.

Tyrosine kinase는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 기능조절에도 밀접하게 관여하고 있음이 잘 알려져 있다. 그러나 지금까지 보고된 대부분의 연구가 주로 중추신경세포에서의 작용기전에 관한 내용으로, 자율신경절 세포에서 tyrosine kinase의 니코틴성 아세틸콜린 수용체 조절기전에 관해서는 알려진 바가 적다. 본 연구에서는 수컷 쥐의 주골반 신경절 세포에 발현되어 있는 $\alpha 3\beta 4$ 니코틴성 아세틸콜린 수용체가 기능적으로 활성화되어 있음을 확인한 후 tyrosine kinase가 $\alpha 3\beta 4$ 서브유닛 수용체 기능조절에 관여하는지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 먼저 광범위 tyrosine kinase 억제제인 genistein (10 μM)을 전처치 하였을 때 아세틸콜린에 의해 유발된 내향성 전류와 세포내 칼슘 이온 농도가 유사한 크기로 감소하는 것으로 나타났다.

선행연구에서 보고된 니코틴성 아세틸콜린에 대한 tyrosine kinase의 조절기전으로 homomeric $\alpha 7$ 수용체는 tyrosine kinase 억제제에 의해 아세틸콜린 반응이 증가하고 tyrosine pho-

sphatase 억제제에 의해 감소하였는데 이러한 반응은 *Xenopus oocytes*, SH-SY5Y 신경아세포종 세포, 해마의 중간뉴런 (Charpantier et al., 2005) 등에서 동일하게 나타났다. 이와 같이 중추신경계에서 $\alpha 7$ 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 tyrosine kinase에 의해 음성적 (negative)으로 조절되고 있는 반면, 부신의 크롬친화성 세포 (Tachikawa et al., 2001)와 본 연구에서의 주골반 신경절 세포와 같이 말초 자율신경절 세포에 발현된 $\alpha 3\beta 4$ 니코틴성 아세틸콜린 수용체에서는 양성적 (positive) 기전으로 이루어지고 있는 것으로 나타나 tyrosine kinase가 발현되어 있는 조직에 따라 그 작용기전이 상이함을 알 수 있었다. 즉 tyrosine kinase는 뇌를 포함한 중추신경계에서는 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 활성도를 감소시키나 이와 반대로 주골반 신경절 세포나 부신의 크롬친화성 신경세포와 같은 말초신경세포에서는 수용체 활성도를 증가시키는 기전으로 작용함을 확인하였다.

본 연구의 결과는 지금까지 알려진 중추신경계에서의 tyrosine 조절기전과는 상반되는 것으로 조직특성에 따른 tyrosine kinase의 다양한 조절특성을 증명한 것이라 할 수 있겠다. 또한 주골반 자율 신경절에 발현된 니코틴성 수용체의 조절기전 일부를 새롭게 밝힌 것으로 이러한 결과는 추후 골반내 장기의 생리적 및 병리적 기전을 이해하고 나아가 치료기법의 개발이나 약물의 개발에 필요한 기초지식으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구를 위해 α -conotoxin AuIB를 제공해주신 한국생명공학 연구원의 한규훈 박사님께 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- Barnard E. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biol Sci.* 1992. 17: 368-374.
- Charpantier E, Barneoud P, Moser P, Besnard F, Sgard F. Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport* 1998. 9: 3097-3101.
- Charpantier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D, Fuhrer. $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J Neurosci.* 2005. 25: 9836-9849.
- Dani JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 2001. 49: 166-174.
- Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui P, Hill MA, Wilson AE. Regulation of ion channels by protein tyrosine

- phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001. 281: H1835-H1862.
- De Biasi, M. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems. *J Neurobiol.* 2002. 53: 568-579.
- Gerzanich V, Wang F, Kuryatov A, Lindstrom J. alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca⁺⁺ permeability and Ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998. 286: 311-320.
- Keast JR. Pelvic ganglia. In: *Autonomic Ganglia*, edited by McLachlan EM, Harwood Academic Publishers, London, 1995. 445-479.
- Keast JR. Unusual autonomic ganglia connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol.* 1999. 193: 1-69.
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novere N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 1999. 51: 397-401.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002. 298: 1912-1934.
- Meyer EL, Xiao Y, Kellar KJ. Agonist regulation of rat alpha 3 beta 4 nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol.* 2001. 60: 568-576.
- Nakayama H, Shimoke K, Isosaki M, Satoh H, Yoshizumi M, Ikeuchi T. Subtypes of neuronal nicotinic acetylcholine receptors involved in nicotine-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in PC12h cells. *Neurosci Lett.* 2006. 392: 101-104.
- Ortutay C, Valiaho J, Stenberg K, Vihinen M. KinMutBase: a registry of disease-causing mutations in protein kinase domains. *Hum Mutat.* 2005. 25: 435-442.
- Park J. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors in male rat major pelvic ganglion neurons. 2003. Ph.D. dissertation, Department of physiology, Graduate School, Yonsei University.
- Park KS, Cha SK, Kim MJ, Kim DR, Jeong SW, Lee JW, Kong ID. An $\alpha 3\beta 4$ subunit combination acts as a major functional nicotinic acetylcholine receptor in male rat pelvic ganglion neurons. *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 2006. 452: 775-783.
- Peng X, Katz M, Gerzanich V, Anand R, Lindstrom J. Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.* 1994. 45: 546-554.
- Rogers M, Dani J. Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophys J.* 1995. 68: 501-506.
- Skok VI. Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. *Auton Neurosci.* 2002. 97: 1-11.
- Swope SL, Qu Z, Haganir RL. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases. *Ann NY Acad Sci.* 1995. 10: 197-214.
- Tachikawa E, Mizuma K, Kudo K, Kashimoto T, Yamato S, Ohta S. Characterization of the functional subunit combination of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett.* 2001. 312: 161-164.
- Zhang X, Xiao, Abdrakhmanova G, Wang W, Cleemann L, Kellar KJ, Morad M. Activation and Ca²⁺ permeation of stably transfected alpha3/beta4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 1999. 55: 970-981.