



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
C12Q 1/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0033180
(43) 공개일자 2007년03월26일

(21) 출원번호 10-2005-0087606
(22) 출원일자 2005년09월21일
심사청구일자 2005년09월21일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 유승현
인천광역시 연수구 청학동 서해아파트 101-708
허양훈
대전 서구 탄방동 한양공작아파트 12-1205
허성권
경기 김포시 장기동 현대아파트 102-204

(74) 대리인 윤여강
양부현
이문섭

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 핵내에서 Ca^{2+} 를 동원하기 위한 크로모그라닌 B 및 이를 이용한 분비세포 제조방법

(57) 요약

본 발명은 핵내에서 Ca^{2+} 를 동원하기 위한 크로모그라닌 B 및 이를 이용한 분비세포 제조방법에 관한 것으로서, 크로모그라닌 B를 이용하여 핵내에서 Ca^{2+} 를 동원하는 방법 및 이를 이용하여 분비세포로 분화를 촉진하는 방법을 제공한다. 또한, 크로모그라닌 B의 핵내에서의 이용을 확인하여 분비세포 분화 유도제를 스크리닝하는 방법, 크로모그라닌 B를 핵내에 주입하여 분비세포로 분화를 증가시키는 방법, 줄기세포의 핵내에서 크로모그라닌 B를 주입하여 분비과립세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 또한 크로모그라닌 B를 포함하는 줄기세포 분화제, 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환 또는 호르몬 생성 결함 또는 분비결함에 관련된 질환의 치료를 위한 크로모그라닌 B를 포함하는 치료용 조성물을 제공한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환, 또는 호르몬 생성 결함 및 분비결함에 관련된 질환의 치료제 탐색하기 위하여, 임의의 물질을 세포에 주입한 후, 핵 내의 크로모그라닌 B의 양을 측정하고, 크로모그라닌 B의 양의 증가를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분비과립 신생성 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2.

크로모그라닌 B를 이용하여 핵 내로 Ca^{2+} 를 동원하는 방법.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B를 이용하는 방법은 크로모그라닌의 양을 증가시켜 핵 내로 Ca^{2+} 를 동원하는 방법.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B의 양을 증가시키는 방법은, 크로모그라닌 B 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 핵 내로 Ca^{2+} 를 동원하는 방법.

청구항 5.

제 3 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B의 양을 증가시키는 방법은, 크로모그라닌 B 유전자를 발현하는 재조합벡터 이용하는 것을 특징으로 하는 핵 내로 Ca^{2+} 를 동원하는 방법.

청구항 6.

제 3 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B의 양을 증가시키는 방법은, 크로모그라닌 B를 미세 주입하는 것을 특징으로 하는 핵내에서 Ca^{2+} 를 동원하는 방법.

청구항 7.

크로모그라닌 B를 이용하여 핵 내로 Ca^{2+} 를 동원하여 분비과립의 신생성을 증가시키는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B를 이용하는 방법은 크로모그라닌의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는 분비과립의 신생성을 증가시키는 방법.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B의 양을 증가시키는 방법은, 크로모그라닌 B 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 분비과립의 신생성을 증가시키는 방법.

청구항 10.

제 8 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B의 양을 증가시키는 방법은, 크로모그라닌 B 유전자를 발현하는 재조합벡터 이용 하는 것을 특징으로 하는 분비과립의 신생성을 증가시키는 방법.

청구항 11.

제 8 항에 있어서, 상기 크로모그라닌 B의 양을 증가시키는 방법은, 크로모그라닌 B 를 미세 주입하는 것을 특징으로 하는 분비과립의 신생성을 증가시키는 방법.

청구항 12.

제 2 항 내지 제 11 항에 따른 방법을 이용하여, 분비 세포로 분화시키는 방법.

청구항 13.

제 12 항에 있어서 상기 분비 세포가 정상세포로부터 기원되어지는 것을 특징으로 하는 분비 세포로 분화시키는 방법.

청구항 14.

제 12 항에 있어서 상기 분비 세포가 줄기세포로부터 기원되어지는 것을 특징으로 하는 분비 세포로 분화시키는 방법.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 상기 줄기세포가 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환, 호르몬 생성 결함 및 분비결함 관련 질환 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 분비세포로 분화시키는 방법.

청구항 16.

제 15 항에 있어서, 상기 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환 또는 호르몬 생성 결함 및 분비결함 관련 질환이 고혈압, 당뇨, 비만, 치매, 알츠하이머 또는 우울증인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 분비세포로 분화시키는 방법.

청구항 17.

제 14 항의 방법에 따라 제조되어진 분비세포.

청구항 18.

크로모그라닌 B를 포함하는 분비세포 분화제.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, 상기 분비세포가 정상세포(Normal Cell) 기원인 것을 특징으로 하는 분비세포 분화제.

청구항 20.

제 18 항에 있어서, 상기 분비세포가 줄기세포(Stem Cell) 기원인 것을 특징으로 하는 분비세포 분화제.

청구항 21.

크로모그라닌 B를 포함하는 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환 또는 호르몬 생성 결함 및 분비결함 관련 질환 치료제 조성물.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 상기 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환 또는 호르몬 생성 결함 및 분비결함 관련 질환이 고혈압, 당뇨, 비만, 치매, 알츠하이머 또는 우울증인 것을 특징으로 하는 치료제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

미분화한 세포가 특정세포로 분화하는 과정에는 특별한 전사인자(transcription factor)나 분화 유도인자(differentiation factor)가 중추적인 역할을 한다. 최근 들어 다양한 세포들의 분화 유도인자를 동정할 목적으로 각각의 분화한 세포들이 갖는 독특한 세포-특이적 유전자 및 단백질들에 대한 관심이 높아지고 있다.

크로모그라닌은 최근에 비신경내분비세포에서 분비과립을 유도하는 과립신생성 역할을 수행하는 것으로 보고되었다. 뿐만 아니라, 크로모그라닌은 이노시톨 1,4,5-트리스포스페이트 수용체 (IP_3R)/ Ca^{2+} 통로를 활성화시켜서, IP_3 -매개성 세포내 Ca^{2+} 방출을 조절하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.

크로모그라닌에 의한 분비과립 신생성은 크로모그라닌이 많아지게 되면 칼슘이온의 저장 및 동원 능력이 증가하고, 크로모그라닌에 의해 IP_3 수용체/이온 통로 (IP_3R /ion channel)가 이동 및 활성화되며, CGB가 핵 내에서 Ca^{2+} 동원의 열쇠 역할을 함으로써 IP_3 에 의한 핵 내 Ca^{2+} 이온이 증가하게 되고, 세포 핵 내에서 분비 관련 유전자 발현을 촉진하여 세포질에서 분비과립(호르몬, 이온, IP_3R /ion channel, 크로모그라닌 등을 지님)을 생합성하게 한다.

분비과립을 신생성을 유도하는 것은 줄기세포의 분비세포로의 분화에 적용 가능하고, 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환치료, 호르몬 등의 생성 및 분비를 증가시켜 호르몬 생성 결함 및 분비결함에 관련된 질환 치료(예: 고혈압, 당뇨, 비만 등), 정신질환(치매, 알츠하이머), 우울증 등의 질환 치료에 사용 가능하다.

분비세포의 분비과립의 주요한 두개의 단백질 크로모그라닌 A(CGA) 및 B(CGB)가 분비과립의 신생성에 주요한 역할을 할 것이라고 보고되었다(참고문헌 1-6).

CGA- 및 CGB-단편 간섭 (siRNA)를 신경내분비세포인 PC12 세포에 넣어주면 발현되는 CGA 및 CGG의 양만 감소시키는 것만이 아니라 분비과립의 숫자를 41% 및 78%로 각각 감소시켜서, CGB 발현이 분비과립의 형성에 중요하다는 것을 제시했다. (허양훈 등, Journal of Biological chemistry, Volume 278, Issue 42, 17 October 2003, Pages 40581-40589)

그라닌페밀리 단백질, 크로모그라닌 (chromogranin) 및 시크리토그라닌(secretogranin)은 신경내분비(neuroendocrine) 세포에서 풍부하게 발현이 되고, 이들 그라닌들 중에 크로모그라닌 A (CGA) 및 B (CGB)가 분비세포의 분비과립에 들어있는 주요한 두개의 단백질이다 (참고문헌 1-6). 크로모그라닌은 높은 결합성, 낮은 친화성의 Ca^{2+} 저장 단백질이고, 비록 CGB의 과립형성 효과는 CGA의 것 보다 50-60% 높지만 (참고문헌 8), 두 단백질 모두 분비 과립 형성을 유도하는 것으로 보여졌다(참고문헌 7-9).

분비과립에 크로모그라닌이 우세하게 존재함에도 불구하고, CGB는 핵에서 또한 분포하는 것으로 보여졌다 (참고문헌 8, 10). 소의 부신 크로마핀세포의 분비과립에서 CGB의 양은 $\sim 200 \mu\text{M}$ 이고, 반면에 핵 내에서는 $\sim 40-80 \mu\text{M}$ 로 추측되었다 (참고문헌 1, 10). 크로모그라닌 B는 1.5 mM 의 해리상수로 $\text{Ca}^{2+} \sim 90$ 몰/몰의 비율로 결합한다 (참고문헌 11). 이점에서, 핵 내에 상대적으로 높은 농도의 CGB가 존재한다는 것은 핵 내에서 고용량의 Ca^{2+} 저장 및 조절 시스템이 존재함을 의미한다.

비록, IP_3 -유도성 핵 Ca^{2+} 방출이 내부 핵막에 위치한 $\text{IP}_3\text{R}/\text{Ca}^{2+}$ 통로를 통하여 이루어지는 것으로 여겨지지만, $\text{IP}_3\text{R}/\text{Ca}^{2+}$ 통로는 핵질에도 존재하고, 이질염색질 및 진정염색질 부분 모두에 폭넓게 존재하고 있다 (참고문헌 16, 17). 부신의 크로마핀 세포에서, 전체 세포의 IP_3R -1 및 -2의 $\sim 15\%$ 및 전체 세포의 $\sim 25\%$ 가 핵 내에 존재하는 것으로 추정되었다 (참고문헌 17). 이들 양은 전체 세포 IP_3R 의 $\sim 15-20\%$ 을 포함하고 있는 것으로 보이는 소포체에서 존재하는 IP_3R 아이소폼의 것들과 비교할만한 양이고 (참고문헌 17), 핵 내부가 지니고 있는 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 방출 능력의 잠재적인 탁월성을 보인다.

더구나, IP_3R , CGB 및 인지질은 핵질 내에 함께 위치하고 있고, $\sim 2-3 \times 10^7$ 달톤으로 추정된 평균 크기를 가진 과립성 핵질 복합체로 존재한다 (참고문헌 18). IP_3R 및 CGB로 구성되어진 과립성 핵질 구조체의 존재의 관점에서 보면, 이들 구조가 IP_3 -민감성 핵질의 Ca^{2+} 저장고로서 작동할 것 같다. 핵질은 포스파티딜이노시톨 4,5-비스포스페이트 (PIP_2) 및 포스포리파제 C (PLC) 활성을 가지고 있는 것으로 알려졌고 (참고문헌 19-22), 두 성분은 IP_3 를 생산하는데 필수적이다. 때문에, IP_3 가 $\text{IP}_3\text{R}/\text{Ca}^{2+}$ 통로에 결합 및 통로를 개방함으로써 핵질 Ca^{2+} 을 이동시키는 것으로 보인다.

핵은 응축정도에 따라서 $20-32 \text{ mM}$ 의 Ca^{2+} 을 포함하는 염색체의 거소이다. 응축되어진 염색체는 더 높은 Ca^{2+} 농도를 포함하고, 반면에 탈 응축된 염색체는 낮은 농도의 Ca^{2+} 을 포함한다. 염색체에 $20-32 \text{ mM}$ Ca^{2+} 이 존재하는 것으로 가정하면, CGB와 같은 높은 결합성, 낮은 친화성의 Ca^{2+} 단백질이 핵 Ca^{2+} 의 조절에 능동적으로 참여하는 것이 필연적인 것으로 보인다. 더욱이, $\text{IP}_3\text{R}/\text{Ca}^{2+}$ 통로를 통한 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출이 핵 낭의 결합에 필수적인 것으로 보고되었다 (참고문헌 24).

본 발명자는 IP_3 -유도성 핵 Ca^{2+} 이동의 조절에서의 핵 CGB 효과를 조사하여, 핵 내에서 CGB의 존재와 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 이동의 양 사이에 밀접한 관련성이 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 임의의 물질을 세포에 주입하고, 핵 내의 크로모그라닌 B의 양을 측정하여 분비과립의 신생성을 증가시키는 물질을 탐색하는 것을 특징으로 하는 분비과립 신생성 증가제 스크리닝 방법의 제공을 목적으로 한다.

또한 크로모그라닌 B를 포함하는 분비세포 분화제 및 분비 관련 질환 치료제를 제공하고자 한다.

발명의 구성

본 발명은 칼슘동원 결핍으로 유발되는 질환, 호르몬 등의 생성 및 분비를 증가시켜 호르몬 생성 결함 및 분비결함에 관련된 질환(예 고혈압, 당뇨, 비만 등), 정신질환(치매, 알츠하이머), 우울증 등의 질환의 치료제를 탐색하기 위하여, 임의의 물질을 세포에 주입하고, 핵내의 크로모그라닌 B의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는 분비과립 신생성 치료제 스크리닝 방법을 제공 한다.

본 발명은 크로모그라닌 B를 이용하여 핵내에서 Ca^{2+} 를 동원하는 방법을 제공한다. 핵내 크로모그라닌 B를 증가시키는 방법은 크로모그라닌 B를 코딩하고 있는 유전자를 함유하는 재조합백터를 이용하여 가능하다. 또한 미세주입방법으로 직접 핵내에서 주입할 수 있다.

본 발명은 핵내에서 크로모그라닌 B의 양을 증가시켜 분비과립의 신생성을 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 증가방법은 크로모그라닌 B의 미세주입, 크로모그라닌 B 폴리펩타이드를 암호화하고 있는 유전자를 포함하는 백터를 투입하여 발현 양을 증가시키거나, 크로모그라닌 B 유전자 발현의 유도물질의 투여를 통하여 가능하다. 상기의 크로모그라닌 B 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 각종 백터, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 파지, 바이러스 등의 재조합 백터를 만드는 방법은 당 업계에 공지되어 있다.

본 발명은 핵에 발현하는 크로모그라닌 B의 특성을 이용하여 핵내에서 Ca^{2+} 를 동원함으로써 분비세포를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 분비세포는 정상세포로부터 기원되어질 수 있고, 줄기세포로부터 기원되어질 수 있다.

본 발명은 크로모그라닌 B를 포함하는 분비결함 질환 치료제를 제공한다. 상기 분비결함 질환에는 고혈압, 당뇨, 비만, 치매, 알츠하이머, 우울증이 포함된다. 상기 분비결함 치료제는 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야에 잘 알려진 서적 (예, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition)에 기재되어 있거나 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.

투여 용량은 치료 환자의 상태에 따라 다양할 수 있으며, 투여를 담당하는 사람이라면 각 환자에게 적합한 적당 용량을 결정할 수 있다. 또한, 인체 투여용의 경우, 제제는 식품의약품안전청의 기준에 부합하는 멸균성, 발열성, 일반 안전 및 순도 기준을 충족하는 것이어야 한다.

본 발명은 줄기세포를 분비세포 분화시키는 크로모그라닌 B를 포함하는 줄기세포 분화제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 다능성 줄기세포, 골수 줄기세포, 림프성 줄기세포, 기원 세포, 면역 세포 전구체와 같은 세포, 및/또는 다능성 줄기세포, 골수 줄기세포, 림프성 줄기세포, 기원 세포, 및 면역 세포 전구체에서 유래한 기타 세포의 분화에 영향을 주도록 시험관내 (in vitro)에서 투여될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시 예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

항체의 제조

폴리클로날 항-토끼 CGA 및 CGB 항체는 완전한 소의 CGA 및 재조합의 CGB에 대해서 준비되었고, 이러한 항체의 특성은 확인되었다 (참고문헌 8, 10, 25). ER마커 단백질 칼넥신 (calnexin) 및 핵마커 단백질 히스톤 H1을 위한 항체는, 각각 칼바이오펜 및 업스테이트 바이오테크놀로지로부터 구매되었다.

발현 백터의 구축

CGA와 CGB를 위한 발현 백터는 템플릿으로서 소의 cDNA를 사용하고, 중합효소연쇄반응(PCR)에 의해서 준비되었고, 클론된 유전자의 전사는 계속적으로 활성인 사이토메갈로바이러스 프로모터의 방향에 있는, pCI-네오 포유류 발현 백터 (프로메가)의 EcoRI/XbaI 사이트로 서브클론 되었다. 한편, CGA-ECFP 및 CGB-ECFP를 위한 발현 백터로는, pd2CGA-ECFP 및 pd2CGB-ECFP를 생산하기 위해서 pd2EGFP-N1 (클론텍)의 NheI/Sall으로 PCR 생산물을 서브 클로닝해 넣어서 각각 준비되었다. 전사를 위한 고리형의 플라스미드 cDNA는 퀴아젠 맥시-프리페어레이션 키트를 사용해 준비되었다.

NIH3T3 세포 배양 및 일시적 이입

모든 배양시약 및 분말화된 배지는 기브코비알엘 (GibcoBRL)로부터 구매되었다. NIH3T3 세포는 10% 우태아 혈청으로 보충해진 둘베코 변형 이글 미디어 (DMEM)에서 유지되었다. 일시적인 이입은 70-80%의 컨플루언트 배양상태에서 행해졌다. 세포는 리포펙타민-플러스 (LipofecTAMINE plus) 이입 시약 (GibcoBRL)을 사용하고, 고리형의 플라스미드 DNA로 이입 했다. 간단히 설명하면, 세포는 배양접시당 (직경으로 100 mm) 5×10^5 세포의 밀도로 도달되었고, 추가로 24 h 동안 배양되었다. 리포펙타민-플러스 (LipofecTAMINE plus) 시약 20 μ l 안에 플라스미드 DNA 4 μ g이 옵티-멤 원 (OPTI-MEM 1) 배지 750 μ l와 혼합되었고, 상온에서 15 분 동안 항온배양되었다. 그 후, 상기 혼합물은 5 ml의 옵티-멤 원 배지를 포함하고 있는 배양 플레이트에 더해졌다.

실시간 Ca^{2+} 방출 연구를 위해서, $\sim 5 \times 10^4$ NIH3T3 세포가 800 μ l의 옵티-멤 원 및 두 개의 DNA 이입 시약, 시약 1 및 2를 배양접시에 들어있는 글래스 커버슬립위에 올려졌다. 시약 1은 6 μ l의 리포펙타민 플러스 시약 및 100 μ l의 옵티-멤 원 배지를 포함하고, 반면에 시약 2는 4 μ l의 리포펙타민 플러스 시약 및 100 μ l의 옵티-멤 원 배지를 포함한다. 양쪽 모두의 시약은 상온에서 15분간 항온보관 되어지고, 2개의 시약을 섞은 후에 추가적으로 15분 항온보관 되었다. 상기 혼합물은 커버슬립위의 세포를 포함하는 배양접시에 더해지고, 이입이 37°C에서 3시간 동안 행해졌다. 이입 후에, 배지는 신선한 미리 따뜻하게 해 놓은 배지로 교체되었고, 72 시간 동안 더 항온배양 되었다. 상기 배양 조건에서, NIH3T3 세포의 70-80%가 이입되었다. pCI-네오나 pd2EGFP-N1 벡터는 빈 (empty) 벡터로써 사용되었다. CGA-EGFP 혹은 CGB-EGFP 융합 단백질의 이입은, 425-445 nm의 자극 및 460-510 nm의 방출 필터를 사용하여, cyan 형광 방출에 근거하여 각각 식별되었고, 미세주입, Ca^{2+} 측정 및 전자현미경 실험은 이입 48시간 뒤에 성공적으로 이입되어진 세포를 이용하여 행해졌다.

PC12 세포 배양 및 CGA-siRNAs 및 CGB-siRNAs의 일시적 이입 (transient transfection)

PC12 세포는 10% 우태아혈청으로 보충되어진 RPMI 1640 (Gibco BRL) 배지에서 유지되었다. 일시적인 siRNA 이입은 배양접시내 70-80%의 배양 상태에서 행해졌다. CGA-siRNA의 이중사슬의 센스 및 안티센스서열은 각각 5'-CAACAACAACACAGCAGCUdTdT-3' (서열번호 1) 및 3'-dTdTGUUGUUGUUGUGUCGUCGA'-5' (서열번호 2)이다. 그리고 CGB-siRNA의 이중사슬의 센스 및 안티센스 서열은 각각 5'-AUGCCCUAUCCAAGUCCAGdTdT-3' (서열번호 3) 및 3'-dTdTUACGGGAUAGGUUCAGGUC-5' (서열번호 4)이다. 3'말단쪽의 2'-데옥시티미딘의 2개의 뉴클레오티드는 dTdT로서 나타내었다. 세포는 사일런서티엠 (Silencer™) siRNA 이입 키트 (Ambion)을 사용하여 siRNAs를 이입시켰다. 간략하게 설명하면, 대략 $1-2 \times 10^6$ PC12 세포가 10%의 FBS로 보충된 RPMI 1640 배지에서, 콜라겐 타입 IV (BD bioscience)으로 덮혀진 배양접시 (직경 100mm) 위에 플레이트 되고, 이입 전에 48 h 동안 배양되었다. siRNA 이입의 투여용량-반응 실험을 위해서, 0.25-2 μ g의 적절한 siRNA 및 10 μ l의 siPORT 아민이 5×10^5 세포에 사용되었다. 그러나 EM연구를 위해서는, 1 μ g의 적절한 siRNA 및 10 μ l의 siPORT 아민이 5×10^5 세포에 사용되었다. 보다 많은 siRNA의 추가는, 분비 과립의 수를 한층 더 감소시키지 않았다.

실시간 Ca^{2+} 방출 연구를 위해서는, $\sim 1 \times 10^5$ PC12 세포가 10%의 FBS가 보충된 800 μ l의 RPMI 1640를 포함하는 배양 접시에서, 콜라겐·타입 IV (BDbioscience, 파울로 알토)가 도말된 글래스·커버슬립위에 플레이트 되었고 이입전에 48 h 동안 배양되었다. 이입 준비에서, 6 μ l의 siPORT 아민은 194 μ l의 OPTI-MEM I과 혼합되고, 20분간 상온에서 항온배양 되고, 뒤따라서 siPORT 아민-OPTI-MEM I 혼합물에 0.2 μ g의 siRNA를 첨가하여 20분간 상온에서 항온배양 했다. 이입 혼합물 ($\sim 200 \mu$ l)은 800 μ l의 RPMI 1640 배지의 커버슬립위에 세포를 포함하는 배양접시로 더해지고, 이입은 37 °C에서 6시간동안 행해졌다. 이입 후에, 배지는 신선한 미리-데워진 RPMI 1640 배지로 교체되었다. 이입은 사일런서 CyTM siRNA 레이블 키트를 통해 관찰되었고, 540/25 nm의 자극 및 605/55 nm의 방출 필터를 사용해 결정되어 붉은 형광을 방사하는 PC12 세포가 성공적으로 이입된 것으로 고려되었다. 우리의 siRNA 처리를 통해서, PC12 세포 거의 모두가 붉은 형광을 방사하는 것으로 보여, 실질적으로 100% 이입된 것을 의미한다.

공초점 현미경을 이용한 핵 및 세포질 Ca^{2+} 신호의 관측

형광 Ca^{2+} 지시자로 항온배양되기 전에, 글래스 커버슬립 위에서 자란 $\sim 5 \times 10^4$ NIH3T3 세포 또는 $\sim 1 \times 10^5$ PC12 세포는 30분 동안 OPTI-MEM 1 배지에서 안정화되었다. 이후 세포는 OPTI-MEM I안에서 40분 동안 37°C, 5% CO₂에서 세

포 영속 형광 Ca^{2+} 지시자인 플루-4/AM ($4\mu\text{M}$)로 처리되고, 그 후 OPTI-MEM I 으로 세 번 씻은 후에, 상온에서 30 분간 같은 배지를 이용하여서 안정화되었다. 플루-4로 항온보관된 세포를 포함하고 있는 커버슬립이 도립 현미경 (IX71, 올림푸스)의 스테이지위로 커스텀-메이드 퍼퓨전 챔버로 올려졌다. NIH3T3와 PC12의 세포의 핵 및 세포질의 Ca^{2+} 신호의 이미지는 공초점 60x, 1.4 NA 대물렌즈를 가진 퍼킨 엘머 울트라뷰 LCI 공초점 이미지 시스템을 이용하여 핵 내의 중앙 근처에서 기록되었다. CGA-ECFP 혹은 CGB-ECFP로 이입된 NIH3T3 세포의 경우에는, ECFP 형광을 방사하는 세포만이 Ca^{2+} 측정을 위해서 선택되었다. 칼슘 신호의 공초점 형광 이미지를 관측하기 위해서, 플루-4는 아르곤 레이저 및 488/10nm 여기 필터 (Chroma Technology Corp. VT. U.S.A.)를 이용하여 488 nm에서 여기되었고, 방출 형광 신호는 HQ525/50 nm 밴드 패스 필터 (Chroma)를 통해 모아졌다. 이미지는 IP_3 생산 아고니스트인 ATP의 처리 후 매 200-400 ms 마다 또는 10 nM IP_3 미세주입 후 매 100 ms 마다 얻어졌고, 울트라뷰 LCI 이미징 슈트 소프트웨어 5.0 (Perkin-Elmer, 보스턴, MA)의 관심영역 (Region-of-Interest; ROI)기능을 이용하여 분석되어졌다. 미세주입된 세포의 세포질 및 핵에서 Ca^{2+} 의 방출은 세포의 핵의 중간영역을 가로지르는 광학 Z-축 절단면으로부터 100X 대물렌즈 (NA = 1.35)로 울트라뷰 LCI 공초점 이미징 시스템을 이용하여 측정되었다. 이들 실험에서, 핵 및 세포질 모두에서 플루-4 형광물질로 일정하게 로딩된 세포만이 사용되었다.

IP_3 의 미세주입

미세주입은 P-2000 마이크로 피펫트 Puller (Sutter Instrument, Novato, CA)를 사용하여, 석영 유리 (외부의 직경, 1.0 mm; 내부의 직경, 0.7 mm, Sutter Instrument)로부터 뽑아진 피펫 (~100 nm의 내부의 직경)를 사용하여 에펜도르프 시스템 (Injectman NI2 5181, Femtojet 5247; Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, 독일)으로 행해졌다. 미세 주입될 IP_3 는 완충용액 (20 mM HEPES, pH 7.2, 110 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM KH_2PO_4 , 10 mM NaCl)안에 그들의 최종농도가 되도록 희석하였고, 미세주입 피펫으로 채우기 전에 0.2 μm 필터로 여과되었다. 미세주입은 다음의 기구 세팅에서 45°의 피펫 각도로 에펜도르프 시스템의 반자동 모드를 사용해 하였다: 사출 압력 80 hPa, 보상 압력 60 hPa, 주입 시간 0.5초 및 피펫의 속도 2000 $\mu\text{m}/\text{초}$. 피펫으로 Femtotips II (~500 nm 내경)을 이용한 상기 조건에서, 주입 부피는 Jurkat T 임파구의 경우에 세포 부피의 1-1.5%인 것으로 미리 측정되었다. 때문에, Jurkat T 임파구와 PC12 세포 사이의 크기가 비슷하고, PC12 세포보다 평균 직경이 3배 큰 NIH3T3 세포의 크기면에서, 우리의 주입 부피는 PC12 세포 부피의 ~15 또는 NIH3T3세포부피의 0.05%부피보다 적은 것으로 예상된다. 핵과 세포질로의 선택적인 미세주입은 6'-디아미디노-2-페닐인돌(6'-diamidino-2-phenylindole; DAPI) 및 ER-Tracker™ 블루 화이트 DPX (Molecular Probes, Eugene, OR) 각각으로 확인되었다. IP_3 유도성 Ca^{2+} 방출은 10 nM IP_3 의 미세주입에 의하여 유도 및 개시되었고, 형광 Ca^{2+} 이미지의 변화는 100 ms 마다 얻어졌다.

시간의 함수로의 Ca^{2+} 방출 측정

세포의 형광 Ca^{2+} 신호 (F)는 핵 (Nu), 핵막 (NE) 및 세포질 (Cy)에서 각각 정해진 관심영역에 대하여 측정되었다. 각 영역의 ROI의 기저수준 형광은 IP_3 주입 전 100 프레임의 평균 플루-4 형광 강도로서 계산되었다. Ca^{2+} 신호의 시작은 F-Fo 값이 Fmax-Fo 값의 5%를 최초로 넘은 때로 결정하였다.

세포내 단백질의 추출 및 이뮤노블랏 분석

대조군 및 siCGA 또는 siCGB-처리 PC12세포로부터 세포 분해물을 얻기 위하여, 대략 $4-6 \times 10^6$ 세포가 차가운 PBS에서 두 번 세척되었고, RIPA 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1%의 NP-40, 1 mM 페닐메틸설포닐 플로라이드 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아포프로티닌/류펩틴 혼합물)에서 분해되었다. 그 이후 상기 추출액은 얼음위에서 20 분간 항온보관 되었고, 세포 분해물은 4℃에서 10분간 22,000 x g로 원심분리 하여 제거되었다. 세포질 및 핵 추출액을 얻기 위하여, 세포는 완충용액 A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM 페닐메틸설포닐 플로라이드 및 0.5% NP-40)에 의해서 분해되었다. 분해물은 이후 얼음위에서 30분간 항온배양 되었고, 세포질 상등액과 핵 침전물로 분리하기 위하여 4℃에서 4분간 2,000 x g로 원심분리 되어 침전되었다. 상등액은 세포질 단백질로서 사용되었다. 그러나 핵 침전물은 완충용액 A로 네 번 세척되고, 4℃에서 분해 완충용액 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% glycerol 및 50 mM dithiothreitol)에서 분해되고 초음파로 파쇄처리되었다. 이어서 얼

음위에서 20분간 항온보관한 후, 핵 찌꺼기는 4℃에서 30분간 21,000 x g에서 원심분리되어 제거되었고, 상등액은 핵 단백질로서 사용되었다. 상기 단백질들은 (각각 20 μ g 또는 40 μ g)은 SDS-PAGE에 의해서 용해되고 ECL 검출 시스템 (Amersham Life Science) 및 적절한 항체를 이용하여 이뮤노블랏에 의해 분석되었다.

면역금 (immunogold) 전자 현미경

배양접시위에서 자란 세포들은 2% 글루타르알데하이드, 2% 파라포름알데하이드, 및 3.5% 슈크로오스를 포함하는 PBS에서 4℃에서 1시간동안 고정되었다. 그러나 면역금표지하려는 세포는 0.1% 글루타르알데하이드를 포함하는 상기과 같은 용액에서 고정되었다. 상기 세포들은 세포 스크래퍼에 의해 배양접시로부터 긁어졌고, 4℃에서 2분동안 2,000 x g에서 원심분리하여 펠렛화되었다. 상기 세포 펠렛은 따뜻한 아가 (PBS안에 1%)에 재현탁되었고 원심분리에 의해 재펠렛화되었다. PBS에서 3번 세척한 후에, 아가가 첨가된 세포 펠렛은 모두 PBS에서, 2시간동안 얼음위에서 1% 오스뮴 테트록사이드로 후고정되었고, 세 번 세척되고, 0.5% 우라닐 아세테이트로 염색되었다. 상기 세포 펠렛은 에탄올 시리즈로 탈수후에 Epon 812 혼합액에 중합되었다. 초박편은 Formvar/탄소 박막을 입힌 니켈 그리드위에서 모아졌고, 30분간 신선하게 준비된 3% 소듐 메타페리오테이트의 방울위에 띄워졌다. 면역금표지 공정은 Spector 등 및 제조자의 추천된 프로토콜 (British Biocell International, U.K.)에서 변형되었다. 에칭과 세척 후에, 상기 그리드는 용액 A (4% 정장의 염소 혈청, 1% BSA, 0.1% 트윈 20, 0.1% 소듐 아자이드를 포함하는 인산 생리 식염수, pH 8.2)의 항-토끼 CGA 또는 CGB 50 μ l 방울위에서 가습되어진 챔버에서 상온에서 2시간동안 항온보관 되었다. 상기 그리드는 용액 A에 희석되어진 10nm 금이 부착된 염소 항-토끼 IgG 로 반응되었다. CGA 및 CGB 면역금표지의 특이성을 조절하기 위하여 1) 일차 항체를 제외하고, 및 2) 일차 항체를 미리 면역된 혈청으로 대체하는 대조실험을 하였다. PBS 및 탈이온화된 물에서 세척된 후에, 상기 그리드는 우라닐 아세테이트 (7분) 및 시트르산 납 (2분)으로 염색되었고, 칼자이스 EM912 전자현미경으로 관찰되었다.

<실시 예 1> NIH3T3 세포에서의 IP₃-유도성 Ca²⁺ 이동

NIH3T3 세포의 세포질 및 핵 내에서 IP₃-유도된 Ca²⁺ 이동에 대한 크로모그라닌 (chromogranin) 발현의 효과를 보기 위하여, 비신경내분비 (nonneuroendocrine)성의, 본래 CGA 또는 CGB를 발현하지 않는 NIH3T3 세포가 CGA-CFP 또는 CGB-CFP로 이입되었고, 그 결과 CGA 및 CGB의 발현이 확인되었다. CGA-CFP 또는 CGB-CFP가 성공적으로 이입된 NIH3T3 세포의 [Ca²⁺]_i (세포내 칼슘) 측정을 위하여 CFP 형광을 내는 세포들만 [Ca²⁺]_i (세포내 칼슘) 측정을 위하여 선택되었다.

IP₃-생성 아고니스트인 ATP의 처리

대조군 세포 및 크로모그라닌-발현 NIH3T3 세포의 세포질 및 핵 내에서의 IP₃-유도성 Ca²⁺ 방출 양상은 IP₃-생성 아고니스트인 ATP를 처리한 후에 공초점 현미경을 이용하여 측정되었다. 도 1 (A)는 Ca²⁺ 파동의 점차적인 소멸이 뒤따르는, 정상인 NIH3T3 세포의 세포질 및 핵 내 양쪽에서 IP₃에 의해 유도된 세포내 파동형 Ca²⁺ 방출 양상을 보인다. Ca²⁺ 방출의 정도를 측정하기 위하여, 최초의 Ca²⁺ 피크 (가장 높은 Ca²⁺ 방출)에서의 형광 Ca²⁺ 신호가 휴지 (resting) 수준의 것과 비교 표현되었다. 이것은 휴지의 수준에 대하여 초기의 핵 및 세포질 Ca²⁺ 농도에서 각각 대략 4배 (4.0 $\pm$ 0.7, n=3, t-테스트에 의해 p<0.001) 및 2.4배 (2.4 $\pm$ 0.4, n=13, p<0.001) 증가로 나타났다 (도 1(E)참조). 대조 세포에서 보인 수준과 비슷하게, CFP만 (빈 벡터)으로 이입된 NIH3T3 세포에 대해 같은 농도ATP를 처리한 경우에서도 핵 및 세포질 모두에서 파동형 Ca²⁺ 방출이 유도되었다 (도 1(B)). 이것은 대조세포와 빈 벡터로 이입된 세포 사이에 실질적으로 차이가 없는 것을 나타내는 결과로, 휴지의 수준의 핵 및 세포질 Ca²⁺ 농도와 비교하여 각각 대략 3.9배 (3.9 $\pm$ 0.8, n=13, t-테스트에 의해 p<0.001) 및 2.4배 (2.4 $\pm$ 0.5, n=13, p<0.001) 증가한 것으로 나타났다 (도 1(E)참조).

그러나 크로모그라닌-발현 NIH3T3 세포의 핵 및 세포질의 Ca²⁺ 방출 성질은 매우 달랐다 (도 1 (C) 및 (D)). IP₃를 처리한 결과, 휴지 수준의 초기 핵 및 세포질 Ca²⁺ 농도에서 각각 대략 5.8배 (5.8 $\pm$ 1.3, n=13, t-테스트에 의해 p<0.001) 및 3.5배 (3.5 $\pm$ 0.8, n=13, p<0.001) 증가를 유도하여 (도 1(E) 참조), 대조세포 또는 빈 벡터로 이입된 세포보다 CGA-발현 NIH3T3 세포에서 상당한 정도로 많은 양의 Ca²⁺ 이 방출되었다 (도 1(C) 참조). 이 결과는 대략 45% 많은 핵 Ca²⁺ 및 46% 많은 세포질 Ca²⁺ 이 대조세포에서보다 CGA-이입되어진 세포에서 방출되어진 것을 의미한다.

한편, CGB-발현 NIH3T3 세포에서는 IP_3 자극에 의해 핵 및 세포질 모두에서 세포내 과동형 Ca^{2+} 방출이 상당히 높은 수준으로 유도되었다 (도 1(D) 참조). CGB-발현 세포내에서, IP_3 는 휴지 수준의 초기 핵 및 세포질 Ca^{2+} 농도에서 각각 대략 7.2배 (7.2 ± 1.2 , $n=13$, t-테스트에 의해 $p<0.001$) 및 3.8배 (3.8 ± 0.7 , $n=13$, $p<0.001$) 증가를 유도하였다 (도 1(E) 참조). CGB-발현 세포에서 방출되어진 Ca^{2+} 의 양은 ~ 80% 많은 핵 Ca^{2+} 및 58% 많은 세포질 Ca^{2+} 이 대조세포에서보다 많이 방출되어진 것을 의미하고, 심지어 CGA-발현 세포의 대응 지역 (핵 및 세포질)보다도 24% 및 8% 많은 결과이다. 특별하게, CGA-발현 세포에서의 45% 및 CGB-발현 세포에서의 80%에 이르기까지 핵 내의 Ca^{2+} 증가 정도는 46%에서 58% 수준까지 증가하는 세포질 내 Ca^{2+} 증가보다 상당히 더 크다.

IP₃의 미세주입

핵 내에서의 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출에 대한 핵 CGB의 효과는 IP_3 의 미세주입에 의해서 NIH3T3 세포의 핵 내에서도 보였다 (도 2 참조). 도 2 (A)에서 보여지듯이, CGB-발현 NIH3T3 세포의 핵내에서 10 nM IP_3 의 주입에 의해 나타난 결과들은 핵 내에서 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 이동에 대한 CGB 발현의 효과를 분명하게 보이며, CGA-발현 또는 대조 세포의 것에 비교하여 상당히 많은 양의 핵 내 Ca^{2+} 의 방출을 유도했다. CGB-발현 NIH3T3 세포의 핵 내에서 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 의 이동의 양은 CGA-발현 또는 대조세포의 것보다 ~3배 높았다 (도 2 (A) 및 (B) 참조). 그러나 CGA-발현 NIH3T3 세포의 핵내에서 10 nM IP_3 의 주입에 의해 나타난 결과들은 CGA 발현이 핵 내에서 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 이동에 영향을 주지 않는 것을 보이며, 대조세포에서 방출되는 것과 비슷한 양의 핵 내 Ca^{2+} 의 방출을 유도했다 (도 2(A) 및 (B) 참조).

그러나, 세포질에 10 nM IP_3 를 미세주입한 경우에는 전혀 다른 Ca^{2+} 방출 양상을 유도했다 (도 2 (C) 및 (D)). 핵 내로 IP_3 를 주입한 경우와 다르게, CGA-발현 NIH3T3 세포의 세포질로 IP_3 를 주입한 경우, 대조군 세포의 것에 비교하여 CGB-발현 세포의 경우는 세포질에서 3배 이상의 Ca^{2+} 을 방출하는 반면에, 세포질에서의 IP_3 -의존성 Ca^{2+} 방출은 2배 이상 유도되었다 (도 2(C) 및 (D)). 새롭게 형성된 NIH3T3 세포의 분비과립에서 CGA 및 CGB 모두가 발현되는 것을 보면 (도 8 참조), 이들 결과는 세포질 내에서의 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 이동의 조절에 크로모그라닌 A 및 B가 효과적으로 영향을 미침을 보여준다.

IP_3 의 미세주입이 핵 및 세포질로부터 Ca^{2+} 방출을 분명하게 구별할 수 있는 것을 보이기 위해, 형광 Ca^{2+} 신호의 변화가 핵 내 (도 3) 및 세포질 (도 4)로 IP_3 주입 후에 시간의 함수로 보여졌다. 도 3(A)는 핵으로 10 nM IP_3 의 미세주입에 의한 NIH3T3 세포의 Ca^{2+} 방출의 공간 주기적 변화를 보인다. 형광 Ca^{2+} 신호는 처음에 핵 내에서 보이다가, 핵막 및 세포의 나머지부분으로 나중에 전파되어진다 (도 3(A)). Ca^{2+} 방출의 시간적 차이는, 핵 내에서 초기의 Ca^{2+} 이 유리되고, 핵막 및 세포질에서의 유리가 뒤따르는 것을 보여주는 3(b) 및 (C)에 확장된 스케일로 보여졌다.

한편, NIH3T3 세포의 세포질로 IP_3 를 주입한 경우는 처음에 세포질에서 Ca^{2+} 이 분비되어지고 나중에 핵으로 전파되어지는 양상의 IP_3 -의존성 Ca^{2+} 방출을 유도하였다 (도 4(A)). 확장된 스케일로 공간 주기적 변화를 관찰한 결과 CGB-발현 NIH3T3 세포의 세포질로의 IP_3 의 주입은 처음에 세포질내에서의 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 이동을 유도하고, 이어서 세포막 및 핵에서의 Ca^{2+} 이동이 뒤 따른다 (도 4(B) 및 (C)).

PC12 세포에서 IP_3 -유도성 핵 및 세포질 Ca^{2+} 이동

신경내분비의 PC12 세포에서의 IP_3 -유도성 핵 및 세포질 Ca^{2+} 이동에 대한 크로모그라닌 발현의 효과를 보기 위하여, 내재적으로 CGA 및 CGB를 발현하고 있는 PC12 세포의 CGA 또는 CGB의 발현을 억제하기 위하여 siCGA- 또는 siCGB-RNA를 처리하였다(도 5 참조). siCGA- 또는 siCGB-RNA 처리 PC12 세포에서 크로모그라닌의 억제 정도를 결정하기 위

하여, siRNA-처리된 세포 전체, 세포질, 및 핵 부분의 단백질을 추출액이 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 분리되어지고, 발현되어진 CGA 및 CGB의 양은 이뮤노블랏 분석에 의해 가시화되었다 (도 5참조). 세포질 및 핵단백질의 분리는 세포질 마커인, 칼넥신 (calnexin), 핵단백질 마커인 히스톤 H1을 위한 항체를 이용하여 이뮤노블랏 분석에 의해 확인되었다. 도 5에서 보이듯이, CGB는 세포질 및 핵 내 양쪽에서 발현이 되는 반면에, CGA는 세포질에서만 발현이 되었다. 대조군 및 siCGA-처리 PC12 세포를 비교한 결과 siCGA-처리 세포의 세포질에서 CGA의 발현은 대조군의 ~60% 수준으로 감소되었다. 이와 비슷하게, siCGB-처리 PC12세포에서 CGB 발현은 세포질 및 핵 내 모두에서 대조군에 비해 ~60% 감소하였다. PC12 세포로 siCGA- 및 siCGB-RNA 도입이 세포내에서 각각 CGA 및 CGB의 발현을 감소시키는 것을 보았기 때문에, IP₃-유도성 핵 및 세포질 Ca²⁺ 이동에 대한 크로모그라닌 발현 감소의 효과는 siRNA-처리 PC12세포에서 측정되었다.

IP₃-생산 아고니스트 ATP 처리

도 6에서 보이듯이, PC12 세포의 핵 및 세포질의 Ca²⁺ 농도는 모두 빠르고 급격하게 증가가 유도된 후 방출되어진 Ca²⁺의 느린 제거가 뒤따랐다. 도 1에서 보여진 NIH3T3 세포와 다르게, IP₃-유도성 Ca²⁺ 과동형 방출은 PC12 세포에서 관찰되지 않았다. ATP 처리에 의해 생성된 IP₃는 대략적으로 휴지수준에 비하여 핵 및 세포질의 Ca²⁺ 농도를 각각 7.7 배 (7.7 ± 1.0, n=12, P<0.001) 및 4.8배 (4.8 ± 0.9, n=12, p<0.001) 증가시켰다 (도 6E참조). 대략적으로 휴지수준에 비하여 핵 및 세포질의 Ca²⁺ 농도는 각각 7.8 배 (7.8 ± 0.6, n=12, P<0.001) 및 5.0배 (5.0 ± 1.0, n=12, p<0.001) 증가하여서 대조군 세포에서의 경우와 유사하였다. siRNA 처리를 받았지만 크로모그라닌 siRNA 처리를 받지 않은 (빈 벡터로 처리) PC12 세포에 같은 농도의 ATP를 처리하면 세포내에서 핵 및 세포질 내 Ca²⁺ 농도 모두의 빠르고 급격한 증가를 유도하였다 (도 6(E)). 대조군과 빈 벡터 siRNA-처리 세포사이에는 핵 및 세포질의 Ca²⁺ 이동 수준에 거의 차이가 없었다.

그러나, 만약 siCGA-RNA 또는 siCGB-RNA중 어느 하나가 처리되어진 PC12 세포가 대조군 세포와 동일 자극에 의해 처리되어지면, 방출되어진 세포내 Ca²⁺의 양은 급격하게 감소된다 (도 6 (C) 및 (D)). 만약 siCGA-RNA가 같은 농도의 ATP로 자극되어지면, 방출된 세포질 Ca²⁺은 ~4.0배 (4.0 ± 0.7, n=20, p<0.001) 증가하는 반면에 휴지 수준에 대하여 방출된 핵 Ca²⁺는 ~6.4배 (6.4 ± 1.2, n=20, p,0.001) 증가하였다 (도 6(C) 참조). 이것은 대조 세포와 비교하여서 핵 및 세포질에서의 Ca²⁺ 방출이 각각 17% 및 16% 감소한 것에 해당한다.

IP₃-유도성 세포내 Ca²⁺ 방출에 대한 CGA 발현 감소의 효과와 비슷하게, PC12 세포에서 CGB 발현의 억제제는 이들 세포에서 IP₃-유도성 핵 및 세포질 Ca²⁺ 방출의 현저한 감소를 가져왔다 (도 6(D) 참조). siCGB-RNA로 처리되어진 PC12 세포에서, IP₃는 대조의 세포의 것에 비교하여서 핵 및 세포질내 Ca²⁺ 방출이 각각 53% 및 29% 감소한 것을 보이며, 휴지 수준에 대하여, 핵 및 세포질내 Ca²⁺ 증가는 각각 3.6배 (3.6 ± 0.8, n=20, p<0.001) 및 3.4배 (3.4 ± 0.8, n=20, p<0.001)의 증가를 유도하였다 (도 6(E)). 특별하게, CGA-억제 세포에서의 17% 감소로부터 CGB-억제 세포의 53% 감소까지 핵 Ca²⁺ 감소의 정도는 16%에서 29% 수준으로 감소하는, 상응하는 세포질 Ca²⁺ 방출 양상보다 상당히 컸다.

IP₃의 미세주입

핵내에서 IP₃-유도성 Ca²⁺ 방출에 대한 핵 CGB의 효과는 IP₃의 미세주입에 의하여 PC12 세포의 핵 내에서 보여졌다 (도 7 참조). 도 7 (A)에서 보여주듯이, siCGA-처리 PC12 세포의 핵내에서 10nM IP₃를 미세주입 한 결과, 내부의 CGA 발현의 억제는 핵 내에서 IP₃-의존적 Ca²⁺ 이동에 영향을 주지 않는 것을 보이며, 대조 세포에서 방출된 것처럼 비슷한 양의 핵 Ca²⁺ 방출을 유도하였다. 그러나, siCGB-처리 PC12 세포의 핵으로의 10nM IP₃의 주입은, 핵내에서 IP₃-의존적 Ca²⁺ 이동에 대한 CGB 발현의 억제효과를 분명하게 보이며, siCGA-처리된 또는 대조 세포의 것에 비교하여서 상당히 적은 양의 핵 Ca²⁺ 방출을 유도하였다 (도 7(A)). siCGB 처리 PC12 세포의 핵 내에서 IP₃-의존적 Ca²⁺ 이동의 양은 siCGA-처리 또는 대조 세포의 것과 비교하여서 ~55% 감소하였다 (도 7(B)참조).

그러나 세포질로 10nM IP_3 의 주입은 전혀 다른 Ca^{2+} 방출 양상을 유도한다 (도 7(C) 및 (D)). 핵 내로 주입한 것과 다르게, siCGA-처리 PC12 세포의 세포질로 IP_3 를 주입한 경우 대조세포의 것과 비교하여 세포질에서 $\sim 50\%$ 의 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 방출이 감소하였다 (도 7(C) 및 (D)). 비슷하게, siCGB-처리 PC12세포의 세포질로의 IP_3 의 주입은 대조세포의 것에 비교하여서 세포질에서 $\sim 75\%$ 의 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 방출 감소를 가져왔다 (도 7 (C) 및 (D)). PC12 세포에서 CGA 및 CGB 모두의 내재적 발현 면에서 보면, 이들 결과는 세포질에서 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 이동의 조절에 관한 크로모그라닌 A 및 B의 효과를 보여준다. 그럼에도 불구하고, 핵 내에서 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 방출에 대한 CGA 및 CGB의 효과는 매우 달랐다 (도 7 (A) 및 (B)); CGB만이 핵내에서 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 이동의 조절에 효과적이었다.

CGA 및 CGB 의 면역 금 전자현미경 관찰

크로모그라닌-발현 NIH3T3 세포 및 PC12 세포의 세포내 소기관에서 크로모그라닌의 분포 및 상대적인 밀도를 결정하기 위하여, CGA- 또는 CGB-표지 면역금 전자 현미경법이 이용되었다. 도 8은 크로모그라닌을 발현하는 NIH3T3 세포의 CGA (도 8(A)) 및 CGB (도8 (B))의 분포를 보여준다. CGA 및 CGB가 비신경내분비 세포에서 분비과립의 신생성 (de novo)을 유도하므로, CGA-발현 NIH3T3 세포는 분비과립을 가지고 있다 (도 8). CGA-표지 면역금 분자는 NIH3T3 세포의 분비과립 및 소포체(ER)에 분포하였으나, 미토콘드리아 또는 핵 내에는 존재하지 않았다. 이것은 CGA-발현 NIH3T3 세포에서 형성된 분비과립은 비신경분비 세포의 분비 과립의 경우에서처럼, CGA를 또한 포함하고 있다는 것을 보인다. 그러나 전에 보고된 것과 마찬가지로 핵 내에서 어떤 CGA도 관찰되지 않았다.

[표 1] CGA- 및 CGB-이입된 NIH3T3 세포에서 CGA- 및 CGB-레이블된 금입자분포

	CGA		CGB	
	금입자의 수 ^a /관측지역(μm^2)	금입자 / μm^2	금입자수 ^b /관측지역(μm^2)	금입자 / μm^2
분비 과립	342/5.85	58.5	334/6.29	53.1
핵	7/15.82	0.4	123/26.10	17.4
소포체	69/11.76	5.9	67/13.10	5.1
미토콘드리아	3/2.61	1.1	4/2.42	1.7

^a 5개의 다른 조직으로부터의 10개의 이미지가 이용되었다

^b 4개의 다른 조직으로부터의 10개의 이미지가 이용되었다.

표 1에서 보여주듯이, 핵내에서는 $0.4/\mu\text{m}^2$ 인 반면에, 분비과립 및 ER에서 CGA-표지 금 입자의 수는 각각 $58.5/\mu\text{m}^2$ 및 $5.9/\mu\text{m}^2$ 이었다.

미토콘드리아에서의 CGA-표지 금 입자의 수는, 비 특이적 수준을 나타내는 수인 $1.1/\mu\text{m}^2$ 이므로, 핵 내에서 발견되는 금 입자의 수는 핵 내에 CGA가 존재하지않음을 보여주는 것을 의미하는 비 특이적 수준 미만이었다. 따라서, 비 특이적 수준을 고려하더라도, 분비과립에서 58.5 CGA 금입자/ μm^2 는 ER에서 5.9 CGA 금입자/ μm^2 보다 10배 높다.

반면에, CGB는 분비과립 및 소포체에 일반적으로 존재할 뿐 만 아니라 핵 내에도 존재하는 것으로 알려졌다. 실제로, CGB-표지 면역 금 입자는 분비과립 및 소포체 뿐 만 아니라 CGB-발현 NIH3T3 세포의 핵에 존재하는 것이 보여졌다 (도 8(B)). CGB-표지 금 입자의 수는 핵에서는 $17.4/\mu\text{m}^2$ 인 반면에, 분비과립 및 소포체 에서는 각각 $53.1/\mu\text{m}^2$ 및 $5.1/\mu\text{m}^2$ 이었다. 미토콘드리아에서 CGB-표지 금 입자는 $1.7/\mu\text{m}^2$ 인 점에 비추어보면, 핵 내에서의 CGB-표지 금입자 수준인 $17.4/\mu\text{m}^2$ 는 분비과립에서 보인 CGB 농도의 ~30%을 나타내고, 이는 핵 내에 CGB가 존재함을 보여준다. CGA와 비슷하게, 분비과립의 CGB-표지 금입자는 $53.1/\mu\text{m}^2$ 로 소포체의 CGB-표지 금입자 수준인 $5.1/\mu\text{m}^2$ 보다 ~10배 높다.

PC12 세포에서 내재의 크로모그라닌 A 및 B의 분포 및 상대적인 밀도는 면역 금 전자 현미경법을 이용하여 측정되었다 (도 9 참조). CGA- 및 CGB-표지 금 입자는 분비과립 및 ER에서 발견되었다 (도 8(A) 및 (B)). 반면에 핵 내에서는 CGB-표지 금 입자만이 발견되었다 (도 8(B)). 이것은 핵 내에 CGB가 존재하는 것을 보인다. 대조 PC12 세포의 분비과립에서 CGA-표지 면역금 입자의 수는, siCGA-처리 세포의 것은 $78.6/\mu\text{m}^2$ 인 반면에, $91.1/\mu\text{m}^2$ 이었다 (표 2참조). 이것은 siCGA-처리 세포의 분비 과립에 존재하는 CGA의 양에서 13.7% 감소한 것을 보인다. siCGA-처리 PC12 세포에서 분비과립의 숫자의 실질적인 감소 (41% 감소)에도 불구하고, 보통 및 siCGA-처리 PC12 세포의 분비과립에 존재하는 CGA의 양의 차이는 크지 않아 보였다. 이것은 CGA의 분비과립형성의 역할로 인해 어떤 정도의 양의 CGA가 분비과립이 형성되기 전에 필요하기 때문일 것이다. 전에 보고되었 듯이, CGA는 핵 내에는 없는 것으로 보였고 (도 9(A)), 핵 내에서 매우 적은 수의 CGA-표지 금 입자는 비 특이적으로 여겨진다.

[표2] PC12 세포에서 CGA-레이블된 금입자의 분포

	정상 PC12		CGA-siRNA-이입 PC12	
	금입자의 수 ^a /관측지역(μm^2)	금입자 / μm^2	금입자수 ^b /관측지역(μm^2)	금입자 / μm^2
분비 과립	51/0.56	91.1	11/0.14	78.6
핵	5/5.75	0.9	3/3.59	0.8
미토콘드리아	0/0.90	0.0	0/0.86	0.0

^a 17개의 이미지가 이용되었다

^b 10개의 이미지가 이용되었다.

[표3] P12 세포에서 CGB-레이블된 금입자의 분포

	정상 PC12		CGB-siRNA-이입 PC12	
	금입자의 수 ^a /관측지역(μm^2)	금입자 / μm^2	금입자수 ^b /관측지역(μm^2)	금입자 / μm^2
분비 과립	75/0.78	96.2	9/0.11	81.8
핵	164/10.76	15.2	29/4.04	7.2
미토콘드리아	0/0.76	0.0	0/0.83	0.0

^a 18개의 이미지가 이용되었다

^b 10개의 이미지가 이용되었다.

마찬가지로, 대조 PC12 세포의 분비과립에서 CGB-표지 면역금 입자의 수는, siCGB-처리 세포의 것이 $81.8/\mu\text{m}^2$ 인 반면에, $96.2/\mu\text{m}^2$ 이었다 (표 3). 이것은 siCGB-처리 세포의 분비과립에 존재하는 CGB의 수에서 15% 감소한 것을 보인다. siCGB-처리는 PC12 세포에서 분비과립의 수를 ~78% 감소시킨다. 그럼에도 불구하고, 보통 세포의 것에 비교하여 siCGB-처리된 PC 12 세포의 분비과립에서 CGB가 15%만 적었다. si-CGA-처리된 세포와 비슷하게, 발현이 siRNA에 의해 억제되어지든지 또는 분비과립이 트랜스-골지 네트워크에서 형성되어지기 전에 일정한 양의 CGB의 최소한의 필요가 있을 것이다. 그러나 핵 내에서 발현되어지지 않는 CGA와는 달리, CGB는 핵 내에서 발현이 되었다 (도 9(B)). 핵 내에서 CGB-표지 금입자의 수는 대조 PC12 세포에서 $15.2/\mu\text{m}^2$ 이나, siCGB-처리 세포에서는 $7.2/\mu\text{m}^2$ 로 감소하였다. 이것은 siCGB 처리의 결과로 47% 감소된 것을 나타낸다.

발명의 효과

최근, 분비과립 Ca^{2+} 저장 단백질인 크로모그라닌 B (CGB)는, 이노시톨 1, 4, 5-트리스포스페이트 수용기 (IP_3R)/ Ca^{2+} 채널 및 인지질로 구성되는 복합체 구조로 핵질 안에 있는 것으로 보였다. 게다가 소의 부신의 크로마핀 세포의 핵 안에 있는 IP_3Rs 의 양은, 소포체의 것에 필적하는 것으로 나타났다. 따라서 발명자는 신경 내분비계의 PC12 세포 및 비신경내분비계의 NIH3T3 세포 양쪽 모두를 사용하여, 핵안의 IP_3 의존성 Ca^{2+} 이동에 대한 핵 CGB의 잠재적인 기여도를 연구하였다. 내재적으로 크로모그라닌을 포함하지 않는 NIH3T3 세포에서의 크로모그라닌 A (CGA) 발현은 핵 내에서 IP_3 유도성 Ca^{2+} 방출을 45% 증가시켰고, 반면에 같은 세포에서 CGB의 발현은 핵 내에서 IP_3 유도성 Ca^{2+} 방출을 80% 증가시켰다. CGB를 발현하는 NIH3T3 세포로의 IP_3 의 미세주입은 IP_3 의존성 핵의 Ca^{2+} 이동을 ~3배 증가시켰다. 반면에 CGA를 발현하는 세포에서는, 대조 세포의 수준과 동일하게 남아있었다. 대조적으로, siRNA 처리에 의한 PC12 세포의 CGA 발현의 억제는, 핵 내에서 IP_3 유도성 Ca^{2+} 방출을 17% 감소시켰다. 반면에 CGB 발현의 억제는, 핵 내에서 IP_3 유도성 Ca^{2+} 방출을 53% 감소시켰다. siCGB로 처리된 PC12 세포의 핵 안으로의 IP_3 미세주입은, IP_3 의존성 핵의 Ca^{2+} 이동을 ~75% 감소시켰다. 그러나 siCGA로 처리된 세포에서는 대조 세포의 것과 같은 정도로 남아 있었다. 핵 내에 CGB가 있는 것을 감안하면, 이들 결과는 핵 내에서 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출에 핵 CGB가 매우 중요하게 기여함을 보인다.

크로모그라닌에 의한 분비과립 신생성은 크로모그라닌이 많아지게 되면 칼슘이온의 저장 및 동원 능력이 증가하고, 크로모그라닌에 의해 IP_3 수용체/이온 통로($\text{IP}_3\text{R}/\text{ion channel}$)가 이동 및 활성화되며, CGB가 핵 내에서 칼슘 동원의 열쇠 역할을 함으로서 IP_3 에 의한 핵 내 Ca^{2+} 이온이 증가하게 되고, 세포 핵 내에서 분비 관련 유전자 발현을 촉진하여 세포질에서 분비과립 (호르몬, 이온, $\text{IP}_3\text{R}/\text{ion channel}$, 크로모그라닌 등을 지님)을 생합성하게 한다.

분비과립을 신생성을 유도하는 것은 줄기세포의 분비세포로의 분화에 적용 가능하고, 칼슘 동원 결핍으로 유발되는 질환 치료, 호르몬 등의 생성 및 분비를 증가시켜 호르몬 생성 결함 및 분비결함에 관련된 질환 치료 (예 고혈압, 당뇨, 비만 등), 정신질환 (치매, 알츠하이머), 우울증 등의 질환 치료에 사용 가능하다.

<참고문헌>

1. Winkler, H., and Fischer-Colbrie, R. (1992) *Neuroscience* 49, 497-528
2. Huttner, W. B., Gerdes, H. H., and Rosa, P. (1990) *Trends. Biochem. Sci.* 16, 27-30
3. Iacangelo, A. L., and Eiden, L. E. (1995) *Regul. Pept.* 58, 65-88
4. Helle, K. B. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* 482, 3-20

5. Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* 482, 21-38
6. Taupenot, L., Harper, K. L., and O'Connor D. T. (2003) *N. Engl. J. Med.* 348, 1134-1149
7. Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E., and Loh, Y. P. (2001) *Cell* 106, 499-509
8. Huh, Y. H., Jeon, S. H., and Yoo, S. H. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 40581-40589
9. Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J., and Spiess, M. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 20242-20249
10. Yoo, S. H., You, S. H., Kang, M. K., Huh, Y. H., Lee, C. S., and Shim, C. S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 16011-16021
11. Yoo, S. H., Oh, Y. S., Kang, M. K., Huh, Y. H., So, S. H., Park, H. S., and Park, H. Y. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 45806-45812
12. Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., and Petersen, O. H. (1995) *Cell* 80, 439-444
13. Leite, M. F., Thrower, E. C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A. M., Ehrlich, B. E., and Nathanson, M. H. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2975-2980
14. Stehno-Bittel, L., Perez-Terzic, C., and Clapham, D. E. (1995) *Science* 270, 1835-1838
15. Humbert, J. P., Matter, N., Artault, J. C., Koppler, P. and Malviya, A. N. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 478-485
16. Huh, Y. H., and Yoo, S. H. (2003) *FEBS Lett.* 555, 411-418
17. Huh, Y. H., Yoo, J. A., Bahk, S. J., and Yoo, S. H. (2005) *FEBS Lett.* 579, 2597-2603
18. Yoo, S. H., Nam, S. W., Huh, S. K., Park, S. Y., and Huh, Y. H. (2005) *Biochemistry* 44, 9246-9254
19. Divecha, N., Banfic, H., and Irvine, R. F. (1991) *Cell* 74, 405-407
20. Divecha, N., Rhee, S. G., Letcher, A., and Irvine, R. F. (1993) *Biochem. J.* 289, 617-620
21. D'Santos, C. S., Clarke, J. J., and Divecha, N. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 201-232
22. Irvine, R. F. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 349-360
23. Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K., and Levi-Setti, R. (2001) *J. Cell Biol.* 155, 899-910
24. Sullivan, K. M. C., Busa, W. B., and Wilson, K. L. (1993) *Cell* 73, 1411-1422
25. Park, H. Y., So, S. H., Lee, W. B., You, S. H., Kang, M. K., and Yoo, S. H. (2002) *Biochemistry* 41, 1259-1266
26. Guse, A. H., Berg, I., da Silva, C. P., Potter, B. V., and Mayr, G. W. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 8546-8550
27. Murphy, S. M., Pilowsky, P. M., and Llewellyn-Smith, I. J. (1998) *J. Histochem. Cytochem.* 46, 1261-1268
28. Spector, D. L., Fu, X. D., and Maniatis, T. (1991) *EMBO J.* 10, 3467-3481
29. Huh, Y. H., Jeon, S. H., Yoo, J. A., Park, S. Y., and Yoo, S. H. (2005) *Biochemistry* 44, 6122-6132

30. Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K., and Jeon, C. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12553-12559
31. Yoo, S. H., and Jeon, C. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 15067-15073
32. Thrower, E. C., Park, H. Y., So, S. H., Yoo, S. H., and Ehrlich, B. E. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 15801-15806
33. Thrower, E. C., Choe, C. U., So, S. H., Jeon, S. H., Ehrlich, B. E., and Yoo, S. H. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 49699-49706
34. Choe, C. U., Harrison, K. D., Grant, W., and Ehrlich, B. E. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 35551-35556
35. Jacob, S. N., Choe, C. U., Uhlen, P., DeGray, B., Yeckel, M. F., and Ehrlich, B. E. (2005) *J. Neurosci.* 25, 2853-2864

도면의 간단한 설명

도 1 은 NIH3T3 세포의 세포질 및 핵내에서 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 이동을 보인다.

(A) 보통 (normal); (B) 빈 벡터로 처리; (C) CGA-CFP로 이입; (D) CGB-CFP로 이입, 10 μ M ATP로 자극된 후에 측정되었다. 트레이스는 세포질 (Cy) 및 핵 (Nu)내에서 파동형 형광 신호를 보인다. 휴지 수준에 대해 가장 높은 형광 증가의 비율 (평균 $\pm$ 표준편차)이 막대그래프 (E)로 표현되었다. 보여진 트레이스는 10-13 번 반복한 비슷한 결과의 대표적인 것을 보인다.

도 2는 NIH3T3 세포의 핵 및 세포질내에 IP_3 의 미세주입 및 Ca^{2+} 이동을 보인다.

(A) 대조군 (보통), CGA-이입된 (CGA/ECFP) 및 CGB-이입된 (CGB/ECFP) NIH3T3 세포의 핵 내로 10nM IP_3 를 미세주입 후 핵 내에서의 Ca^{2+} 방출 양상을 측정하였다. 형광 Ca^{2+} 신호의 증가 (평균 $\pm$ 표준편차)가 막대그래프 (B)로 표현되었다.

(C) 대조군(보통), CGA-이입된 (CGA/ECFP) 및 CGB-이입된 (CGB/ECFP) NIH3T3 세포의 세포질내에서의 Ca^{2+} 방출 양상은, 세포의 핵내에서 10nM IP_3 를 미세주입한 후에 측정되었다. 형광 Ca^{2+} 신호의 증가 (평균 $\pm$ 표준편차)가 막대그래프 (D)로 표현되었다.

트레이스는 핵 (A) 및 세포질 (C)내에서 6-7 번 반복한 형광 신호의 대표적인 양상을 보인다.

도 3은 NIH3T3 세포의 핵 내로의 IP_3 의 미세주입 및 Ca^{2+} 이미지화를 보인다.

A) 10 nM IP_3 가 아래로 향하는 화살표 (15.2와 15.3s 사이)에 의해 표시되어진 시간에서 NIH3T3 세포의 핵내에서 (미세주입의 정확한 위치는 경계 지어진 핵 내의 화살표로 표시됨) 미세주입 되었다. Ca^{2+} 방출 결과에 관한 이미지는 시간의 함수로 모조 색으로 나타내었다. 초기의 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 방출 양상은 비록 나중에 세포질로 전파되어지기는 하지만, 핵으로 제한되어 있다. B 및 C) IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출의 주기 변화(temporal resolution)는 핵 내에 IP_3 가 주입되어진 NIH3T3 세포의 핵(Nu)에서 Ca^{2+} 이 처음 유리되어지고, 핵막 (NE) 및 세포질 (Cy)이 뒤따른다. (B)에서 보인 박스는 확장된 스케일로 (C)에서 다시 그려졌다. Ca^{2+} 신호가 얻어지는 세포 내의 부분은 정상의 이미지에 경계 표시했다. 보여진 결과들은 핵내에서 IP_3 가 미세주입되어진 세포들에서 나타나는 전형적인 것들이다.

도 4는 NIH3T3 세포의 세포질내로의 IP_3 의 미세주입 및 Ca^{2+} 이미지화를 보인다.

A) 10 nM IP_3 가 아래로 향하는 화살표 (14.7와 14.8s 사이)에 의해 표시되어진 시간에서 NIH3T3의 세포질내로 (미세주입의 정확한 위치는 경계 지어진 핵 밖에 화살표로 표시됨) 미세주입 되었다. 결과의 Ca^{2+} 방출 이미지는 시간의 함수로 모조 색으로 나타내었다. 초기의 IP_3 -의존적 Ca^{2+} 방출은 비록 나중에 핵으로 전과되어지기는 하나 세포질로 제한되어 있다. **B 및 C)** IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출의 주기 변화(temporal resolution)는 핵내에 IP_3 가 주입되어진 NIH3T3 세포의 세포질 (Cy)에서 Ca^{2+} 이 처음 유리되어지고, 핵막 (NE) 및 핵 (Nu)이 뒤따른다. **(B)**에서 보인 박스는 확장된 스케일로 **(C)**에서 다시 그려졌다. Ca^{2+} 신호가 얻어지는 세포 내의 부분은 정상에 이미지에 경계 표시했다. 보여진 결과들은 세포질내로 IP_3 가 미세주입되어진 세포의 전형적인 것들이다.

도 5는 siRNA-처리된 PC12세포에서 크로모그라닌 발현의 억제를 보인다.

A) PC12 세포로부터 추출되어진 단백질이 10% SDS-젤 ($10\mu g$ /레인)에서 분리되어지고, CGA (B) 및 CGB (CD) 항체로 항체의 특이성을 확인하기 위하여 이뮤노블랏 되었다.

B) 보통의 세포에서 전체 세포 (T), 세포질 (C), 핵 (N) 및 siCGA 또는 siCGB-RNA로 처리되어진 세포로부터의 단백질이 10% SDS-젤 (μg /레인)에서 분리되어졌다. 같은 단백질들이 세포질 마커 칼넥신, 핵 마커 히스톤 H1, 및 액틴 ($20-40\mu g$ /레인)과 함께 CGA (**C**) 및 CGB (**D**) 항체로 이뮤노블랏되었다.

도 6은 PC12세포의 핵 및 세포질에서 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 이동을 보인다.

PC12 세포, 보통세포 (**A**), 빈 siRNA-처리 (**B**), siCGA 처리 (**C**) 및 siCGB 처리 (**D**)의 핵 및 세포질에서 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출 양상은 $20\mu M$ ATP로 자극 후에 측정되었다. 트레이스는 핵 (Nu) 및 세포질 (Cy)에서의 형광 신호를 보여주며, 10-13번 반복된 비슷한 결과의 대표적인 것이다. 휴지 수준에 대한 가장 높은 형광 증가의 비 (평균± 표준편차)가 막대그래프 (**E**)로 표현되었다. 대조구 및 siRNA-처리 세포의 핵내에서의 형광의 증가는 통계학적으로 비교되었다 (페어드-t-테스트) P 값이 표시되었다.

도 7은 PC12 세포의 핵 및 세포질에서 IP_3 의 미세주입과 Ca^{2+} 이동을 보인다.

A) 대조구 (보통), siCGA-처리 (siCGA) 및 siCGB-처리 (siCGB) PC12 세포의 핵에서의 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출이 세포의 핵으로 10 nM의 미세주입 후에 측정되었다.

B) 형광 Ca^{2+} 신호 (평균± 표준편차)의 증가가 막대그래프로 표현되었다.

C) 대조구 (보통), siCGA-처리 (siCGA) 및 siCGB-처리 (siCGB) PC12 세포의 세포질에서의 IP_3 -유도성 Ca^{2+} 방출이 세포의 세포질로 10 nM IP_3 의 미세주입 후에 측정되었다.

D) 형광 Ca^{2+} 신호 (평균± 표준편차)의 증가가 막대그래프로 표현되었다.

트레이스는 6-9번 반복되어진 핵 (**A**) 및 세포질 (**C**)에서의 대표적인 형광 신호를 보인다.

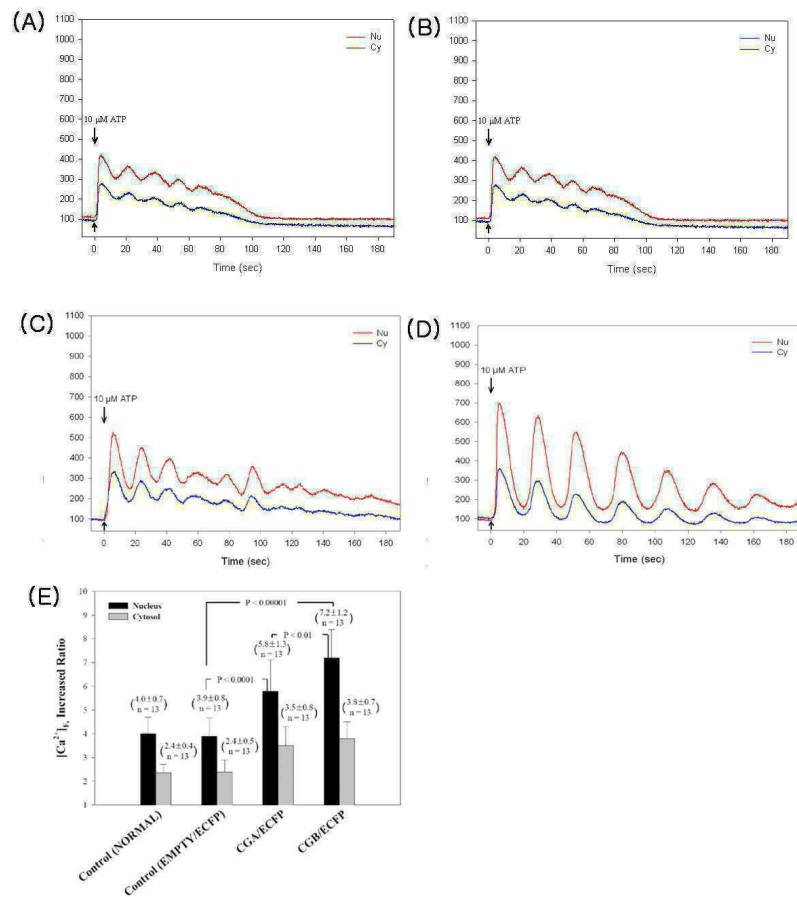
도 8은 크로모그라닌으로 이입된 NIH3T3 세포에서 크로모그라닌의 분포를 보이는 면역금 (immunogold) 전자현미경 사진이다. CGA가 이입되어진 비신경내분비성 NIH3T3 세포는 분리된 CGA 또는 CGB 친화성 항체로 CGA (**A**)에 대해 면역표지되었고, CGB로 이입되어진 것은 CGB (**B**)에 대해 면역표지되었다. CGA- 또는 CGB-표지 금 입자는 소포체 (er) 및 분비과립 (SG)에 분포하였고, 미토콘드리아 (M)에는 없었다. 그러나 CGB-표지 금 입자(화살표로 표시되어짐)는 소포체 (er) 및 분비과립 (SG)뿐만 아니라 핵내 (Nu)에서도 분포되어 있었다. 막대 = 200nm.

도 9는 PC12 세포에서 크로모그라닌의 분포를 보여주는 면역금 전자 현미경 사진을 보인다.

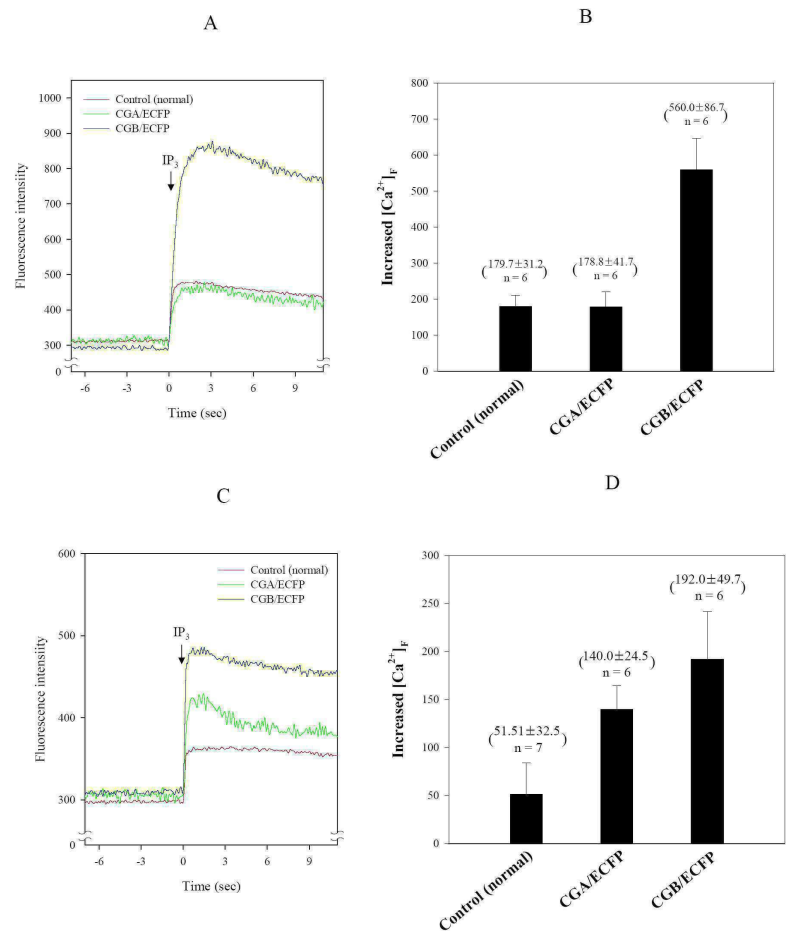
신경내분비 PC12 세포는 내재적인 크로모그라닌을 가진다. 보통 PC12 세포에서 CGA-표지 (A) 및 CGB-표지 (B) 금 입자 (직경 15nm) 표지를 보인다. CGA- 또는 CGB-표지 금 입자는 소포체 (er) 및 분비과립 (SG)에 편재되어 있었으나, 미토콘드리아 (M)에는 없었다. 그러나 CGB-표지 금 입자 (화살표로 표시)는 핵 (Nu)에서도 분포되어 있었다. 막대 = 200nm.

도면

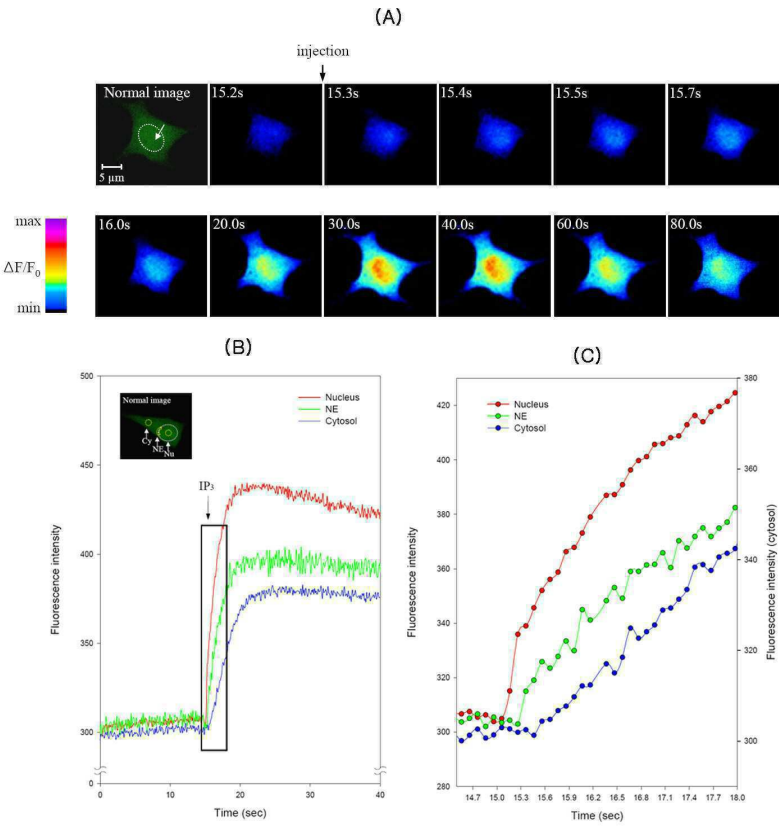
도면1



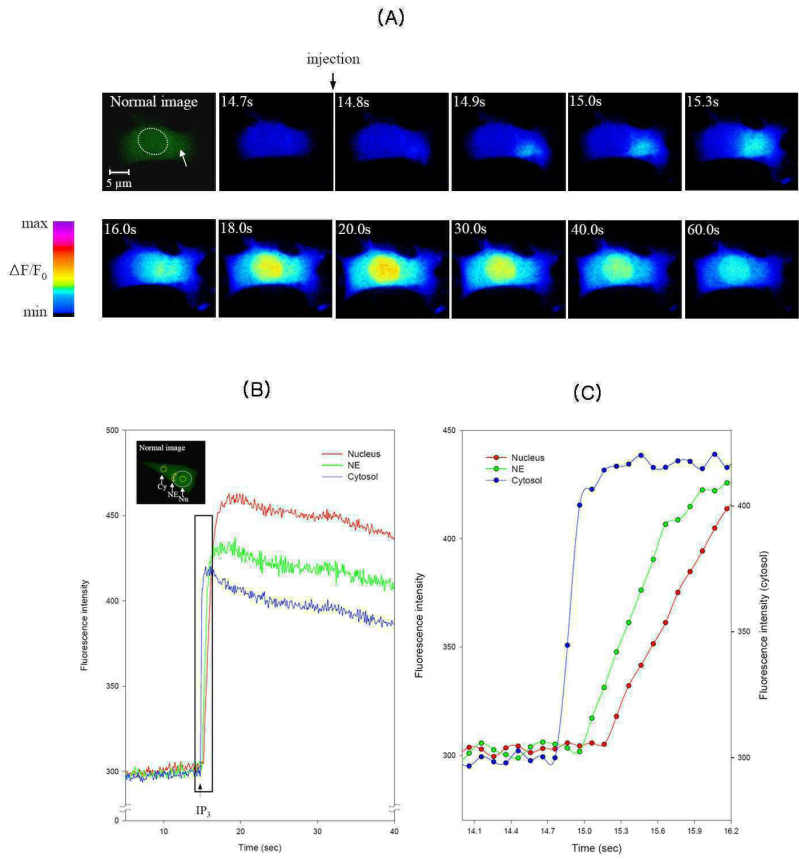
도면2



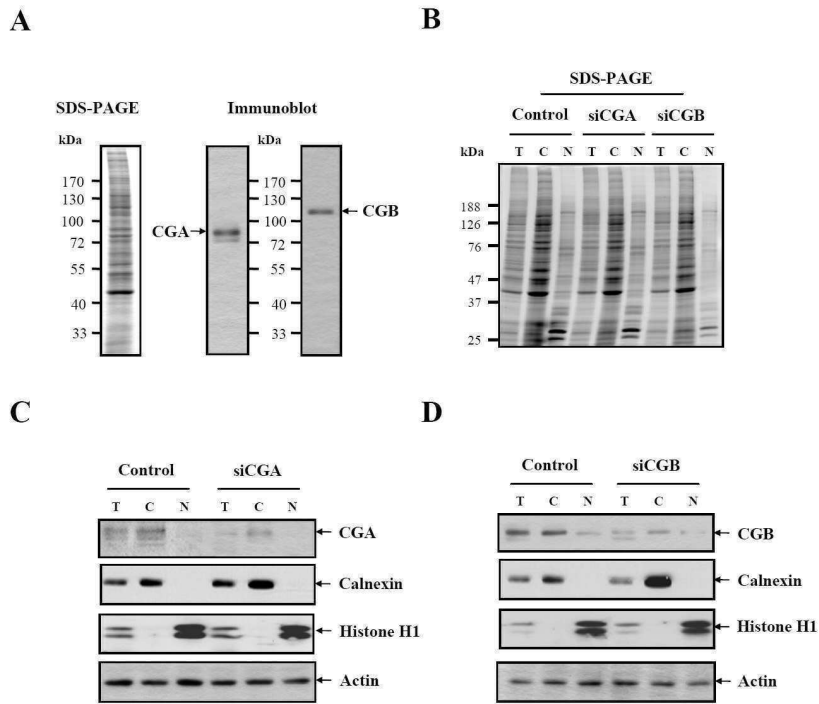
도면3



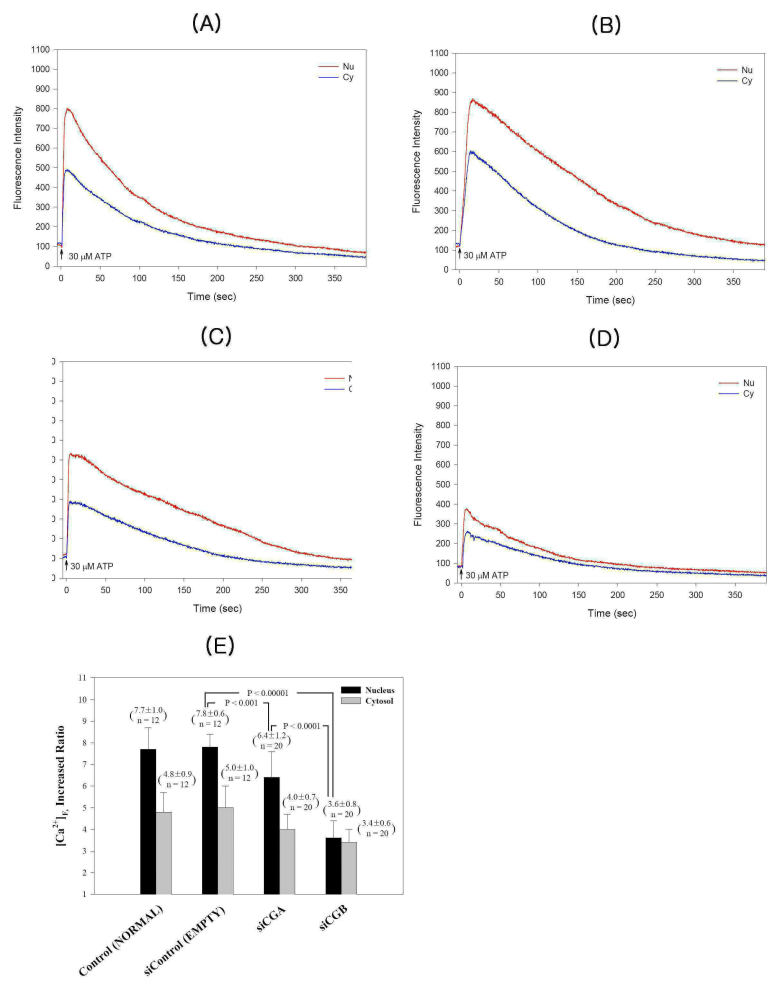
도면4



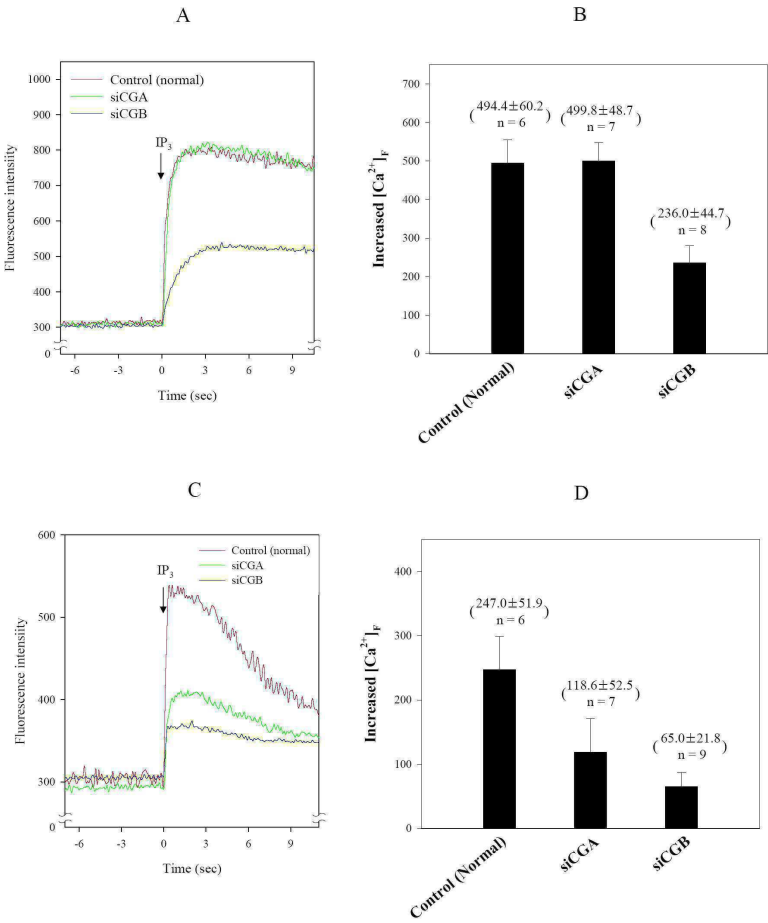
도면5



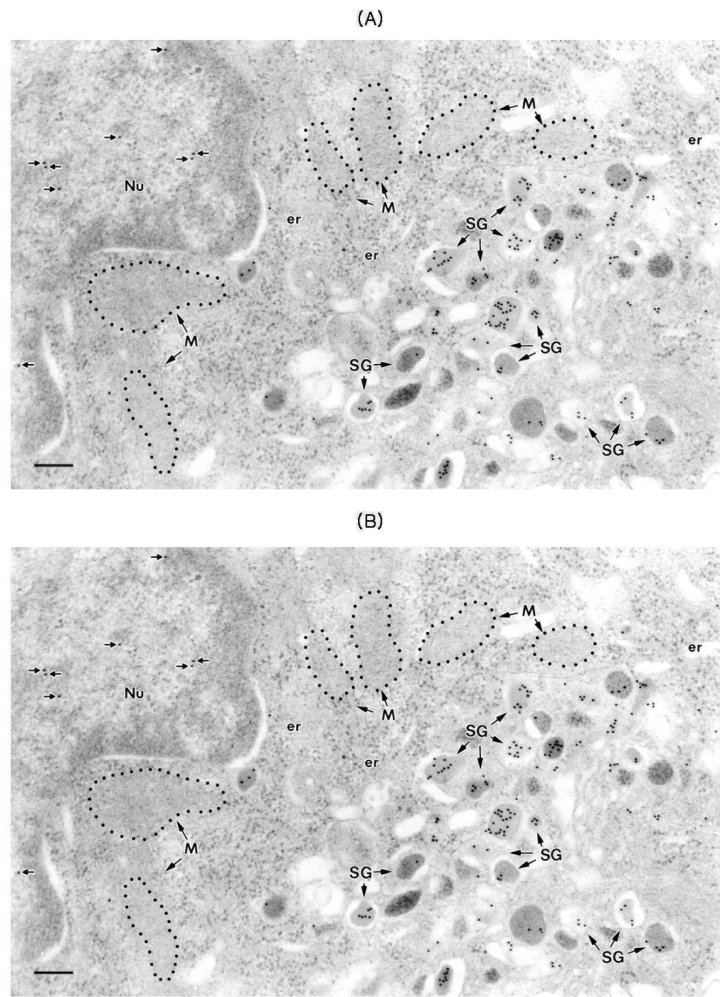
도면6



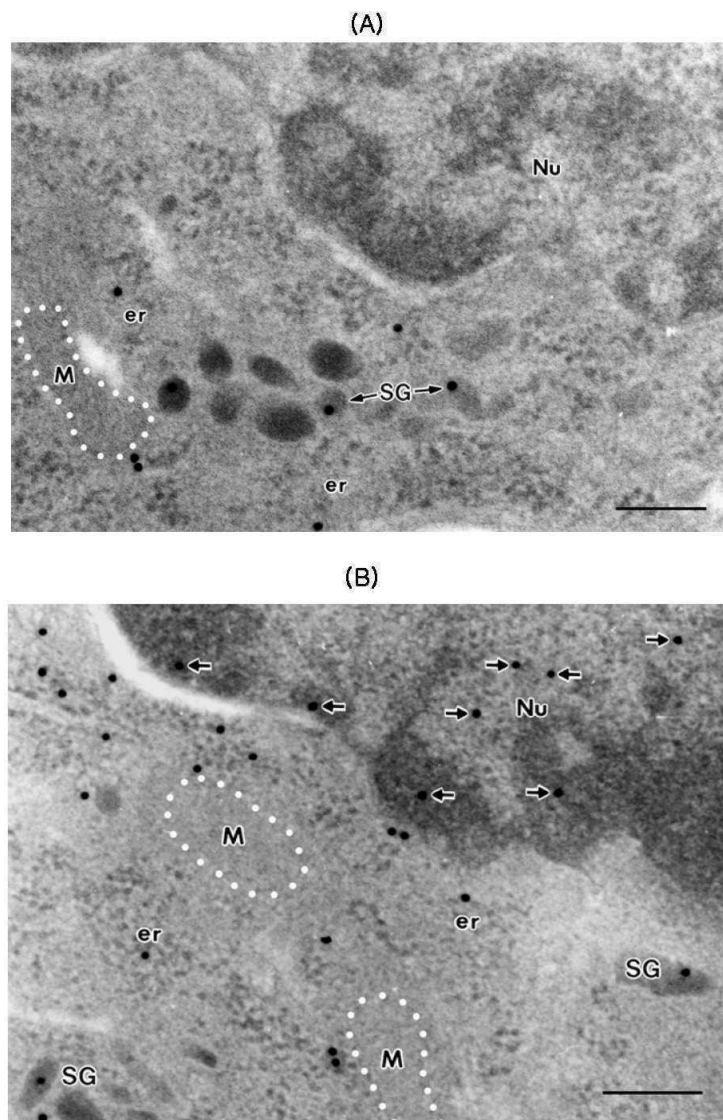
도면7



도면8



도면9



서열목록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> Chromogranin B for Mobilization of Ca^{2+} Into Nucleus and The Method of Preparation of Secretary Cell By Using It

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CGA siRNA sense strand

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n is deoxythymidine

<400> 1
 caacaacaac acagcagcun n 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CGA siRNA antisense strand

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> n is deoxythymidine

<400> 2
 nnguuguugu ugugucgucg a 21

<210> 3
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CGB siRNA sense strand

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n is deoxythymidine

<400> 3
 augcccuauc caaguccagn n 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CGB siRNA antisense strand

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> n is deoxythymidine

<400> 4

nnuacgggau agguucaggu c

21