

바닐로이드 수용체 TRPV1의 막수송과정에서의 Rab11의 역할

엄기범¹, 이순열^{2*}

¹성균관대학교 의과대학, ²한경대학교 생명공학과, 유전공학연구소

Role of Rab11 on Membrane Trafficking of Rat Vanilloid Receptor, TRPV1

Ki Bum Um¹ and Soon-Youl Lee^{2*}

¹Medical School, Sungkyunkwan University,

²Dept. of Biotechnology, Genetic Engineering Research Institute, Hankyong National University

요 약 바닐로이드 수용체 TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)은 캡사이신, pH, 열 등의 통증 유발물질에 의해 활성화되는 비특이적 양이온 채널로서 통증발현에 핵심적인 막 단백질이다. TRPV1의 막 수송에 관한 연구가 미미한 가운데 FIP3(family of Rab11 interacting protein 3)가 TRPV1 채널과 결합하여 막수송에 관여한다고 보고되었다. FIP3는 Rab11과 결합하는 단백질인데 최근 Rab11 단백질이 여러 채널 단백질의 막수송에 직접적으로 또는 간접적으로 중요하다고 보고되었다. 그러므로 본 연구에서는 Rab11이 TRPV1의 막 수송에서의 역할을 알아보기 위하여 세포 생물학적, 생화학적으로 알아보았다. 공촛점 현미경을 통하여 확인한 결과 Rab11은 실제로 세포내에서 TRPV1과 동일한 위치에서 발현되어 있음을 확인하였다. 하지만 생화학적인 방법인 GST-pulldown을 실시하였을 때 TRPV1과 Rab11간에는 서로 직접적인 결합은 하지 않는 것으로 나타났다. 비록 직접적인 결합은 하지 않지만 Rab11이 TRPV1의 막 수송에 관여한다고 가정하고 Rab11의 TRPV1의 막수송에서의 역할을 더 자세히 알아보기 위하여 세포 내 Rab11a의 발현을 siRNA를 사용하여 Rab11a의 발현을 50%수준으로 저해한 후 TRPV1의 세포막으로의 이동을 알아본 결과 Rab11 발현 저해 시 세포막에 이동된 TRPV1이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 Rab11이 아마도 FIP3를 포함하는 방법으로 TRPV1의 막 수송에 영향을 주는 것으로 결론지을 수 있다.

Abstract Vanilloid receptor, TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) is a non-selective cation channel that responds to a variety of pain-eliciting material including capsaicin, pH, heat. Although, membrane trafficking of TRPV1 was not much known so far, TRPV1 was reported to interact with FIP3 (family of Rab11 interacting protein 3). FIP3 was identified as one of Rab11 interacting proteins that is recently reported important in membrane trafficking of several channel proteins directly or indirectly. Therefore, in this study, we examined the role of Rab11 in the membrane trafficking of TRPV1 using cell biological and biochemical techniques. Rab11 was found really colocalized with TRPV1 based on the result of confocal microscopy. However, GST-pulldown assay, one of biochemical technique, found that Rab11 did not interact with TRPV1. Although Rab11 does not interact with TRPV1 directly, we hypothesized that Rab11 is indeed involved in the membrane trafficking of TRPV1. In order to examine further the role of Rab11 in the membrane trafficking of TRPV1, the expression of TRPV1 on the membrane was examined when the expression of Rab11 was decreased down to about 50% by siRNA technique and found decreased significantly. From this result, we can conclude that Rab11 is involved in the membrane trafficking of TRPV1 in a way of including FIP3.

Key Words : TRPV1, Capsaicin channel, Rab11, Membrane trafficking, Inhibition of expression, siRNA

본 논문은 한국 학술진흥재단의 기초과학지원 (과제번호 C00053 (I00075) 연구과제로 수행되었음.

*교신저자 : 이순열(sylee@hknu.ac.kr)

접수일 11년 04월 21일

수정일 (1차 11년 06월 20일, 2차 11년 06월 22일)

계재확정일 11년 07월 07일

1. 서론

TRPV1은 TRP(transient receptor potential) family에 속해있는 비특이적 양이온 채널로서 고추의 매운 성분인 캡사이신(capsaicin)에 의해 활성화되어 양이온이 유입되고 막 전압을 형성하여 자극이 신경계에 전달되어 통증을 유발하는 것으로 밝혀진 막단백질이다[1-3]. 1997년 Julius에 의하여 유전자가 클로닝 되었고 Vanilloid Receptor 1 (VR1)으로 명명되었다[4]. 이 후 VR1은 TRP (transient receptor potential) family에 분류되어 TRPV1으로 새롭게 명명되었다[5]. TRPV1 채널은 캡사이신 뿐만 아니라 다른 통증을 유발하는 원인이 되는 산이나 열에 의해서도 활성화가 되는 것으로 알려져 있어 통증발현 연구에 매우 중요한 역할을 하는 채널로 알려지고 있다[6,7]. 그러므로 TRPV1 채널은 진통제를 개발하고자 하는 타겟으로 주목받고 있다[8].

TRPV1은 여러 경로를 통해 활성이 조절되는데 인산화효소 A (PKA) [9-11], 인산화효소 C (PKC) [12-15], CamKII와 Src 인산화 효소[16,17]를 포함하는 인산화와 탈인산화에 의해 활성이 조절 되는 것으로 알려졌다. 또한 인산화 외에 전사 후 조절 기작에 의해 조절된다 [18,19]. 이러한 조절과정에는 단백질-단백질 상호작용을 포함하지만, 아직까지 TRPV1과 상호작용하는 단백질은 매우 적은 수만이 알려져 있다.

막 단백질인 TRPV1의 막수송에 관해서도 알려진 것이 많지 않은 실정이다. TRPV1은 PKC의 신호에 영향을 받으며 적어도 부분적으로 SNARE를 포함하는 방법으로 세포막으로 이동됨이 보고되었다[20]. 또한 TRPV1은 FIP3(family of Rab11 interacting 단백질 3, Rab11-FIP3)이라고 하는 Rab 결합 단백질과 특이적으로 직접 결합함이 보고되었다[21]. Rab11 결합단백질인 FIP3가 TRPV1과 결합한다는 결과는 흥미로운 결과로서 최근 Rab11이 막 단백질인 채널단백질의 막수송에 관여한다는 연구결과와 연관이 있는 결과이다[22-26]. 특히 Rab11이 TRPV1의 family에 속하는 TRP channel인 TRPV5와 TRPV6과 직접적으로 상호작용하여, 막 수송에 관여하는 것으로 알려졌다[22]. Rab11을 포함하는 막수송 과정에서 FIP3은 Rab11에 결합하여 Rab11-FIPs 복합체를 이루어 여러 막 수송인자들을 모집하고 막 수송을 조절하는 역할을 하는 것으로 보인다[27-29].

그러므로 본 연구에서는 Rab11이 TRPV1에서도 TRPV5와 TRPV6처럼 직접 상호작용하여 막수송에 관여하는지, 아니면 FIP3을 포함하며 간접적으로 관여하는지를 알아보기 위하여 Rab11과 TRPV1의 세포 내의 위치를 조사 하였으며, Rab11과 TRPV1의 직접적인 상호작용

여부를 GST-pulldown 방법을 이용하여 실험하였다. 또한, Rab11의 발현이 저해 되었을 때의 TRPV1의 세포내 분포 특히 막에 발현된 TRPV1의 양을 조사하여, Rab11이 TRPV1의 막수송에 관여한다는 것을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 세포배양 및 시약

2.1.1 세포 배양과 형질주입 (transfection)

HEK293T cell의 배양에는 Dulbecco's modified Eagle's medium (10% FBS와 penicillin과 streptomycin 함유된)을 사용하였다. 형질주입은 Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 제조사의 추천 방법으로 실행하였다.

2.2 GST-pulldown 분석

TRPV1 발현벡터 pcDNA3-myc-his-TRPV1 벡터를 HEK293T 세포에 형질주입하였다. 36시간 형질주입한 세포를 RIPA buffer (1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.5% NP-40)로 분쇄하여 cell lysate를 얻었다. 융합 단백질 GST-Rab11과 GST-FIP3은 각각의 cDNA를 클로닝 하여 pGEX-5X-3(Amersham, Buckinghamshare, UK) 벡터에 서브클로닝하고 발현하여 GST 융합 단백질을 획득하고 Emarson 등의 방법을 이용하여 GST-pulldown 분석을 실시하였다[30]. GST-pulldown 하여 얻어진 시료는 western blot을 실시하여 ECL과정을 통하여 밴드를 확인하였다.

2.3 siRNA 형질도입

Rab11의 저해를 위해 Dharmacon의 siGENOME™ Rab11a의 siRNA를 사용하였다(표 1). 위의 형질도입과

[표 1] Rab11a siRNA 서열
[Table 1] Rab11a siRNA sequence

	sense sequence	antisense sequence
# 1	guagggccuauuugguuuuu	paaaccaauaggcaccuacuu
# 2	gcaacaagugguuccuuuu	pauaggaaccacauuguugcuu
# 3	caagagcgauaucgagcuuu	puagcucgauaucgcucuuguu
# 6	ggaguagaguugcaacaauu	puuguugcaaacucuacuccuu

동일하게 HEK293T 세포 내에 Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 이용하여 제조사가 추천하는 방법대로 6 well plate의 한 well당 400 nM의 siRNA를 처리하였으며, siRNA처리 이후 75시간을 배양하여 Rab11a의 knock down을 유도하였다.

2.4 realtime-PCR

siRNA가 도입된 HEK293T 세포를 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였고, 추출한 5 µg의 RNA를 SuperScript™ First-Strand Synthesis System For RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 제조사가 추천하는 방법대로 reverse transcript-PCR을 수행하여 total cDNA를 얻어냈다. 이후 얻어낸 cDNA의 10 ng를 최소량으로 하여 realtime PCR을 수행하였다. Rab11a의 realtime PCR에 사용된 primer의 제작은 Genescript (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>)를 이용하여 표 2 와 같이 설계하였고, 이중 667~762 부위를 주형으로 하는 primer를 realtime PCR에 사용하였다. PCR은 SYBR green PCR master mix (Applied biosystems, Warrington, UK)를 사용하였으며, 50℃에서 2분간 1회, 95℃에서 10 분간 1회, 이 후 40 회(95℃에서 15초, 58℃에서 1분) PCR을 수행하였고, ABI relative quantitative manager version 1.2 (Applied Biosystems, California, USA)프로그램을 이용하여 발현정도를 측정하였다.

[표 2] 실시간 PCR 프라이머

[Table 2] Realtime PCR primer

	sequence	position	length	Tm
Primer 1	AAATGTCAGACAGACGCGAA	667	20	59.4
	ACTGCACCTTTGGCTTGTTT	762	20	59.8
Primer 2	TGGAAAGCAAGAGCACCAT	241	19	59.9
	GCTGTGTCCCATATCTGTGC	331	20	59.1
Primer 3	GGGCCATAAGTTAAACAGTGC	1443	21	58.6
	CTGATCATTGCCAACAGAGG	1533	20	59.2

2.5 막에 존재하는 TRPV1 의 탐지

TRPV1이 stable하게 형질주입된 HEK293T 세포에 Rab11a siRNA를 형질주입하여 75시간 동안 배양한 세포를 2000 rpm 1분 원심 분리하여 cell을 ice cold 1 X PBS에 3회 세척한다. 약 25 X 10⁶ cell/ml의 농도가 되도록 1X PBS에 세포를 재부유 한 뒤 sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE, Rockford, USA)을 2 mM처리하여 실온에서 30

분 반응시킨다. 이후 10 mM glycine이 첨가된 PBS로 세포를 세척한 뒤 1 X IP buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40, 50 mM sodium fluoride, 30 mM sodium pyrophosphate, protease inhibitor tablet)로 세포를 용해하여 막에 고정된 streptavidin (PIERCE, Rockford, USA)으로 biotin-표지 세포 표면 단백질을 분리해 내어 western blot을 실시하였다. TRPV1의 C-terminal 세포질 꼬리부위를 재조합하여 만든 재조합 단백질을 이용하여 토끼에서 제작한 토끼 항혈청 항체 anti-CVR1을 1:500의 비율로 1차 항체 처리를 한 뒤에 anti-rabbit HRP (Amersham, Buckinghamshare, UK) 항체를 1:1000의 비율로 2차 항체 처리를 한 뒤 ECL과정을 통하여 TRPV1의 밴드를 확인하였다.

2.6 면역 형광 현미경 방법

각각의 발현 벡터 pEGFP-TRPV1과 pcDNA-myc-his-Rab11을 poly-L lysin 처리한 cover slip에 배양한 HEK293T 세포에 cotransfection하여 24시간동안 발현시켰다. 이후 cell을 1 X PBS (pH 8.0)로 세척 한 뒤 4% formaldehyde로 고정하였다. 0.2% Triton X-100을 처리한 세포에 5% BSA (in 1 X PBS)로 blocking한 세포를 면역 형광 방법으로 염색하였다. 1차 항체는 anti-c-myc 항체를 1:300의 비율로 사용하였고, 2차 항체는 Cy3-conjugated goat anti-mouse (Zymed, California, USA)를 사용하였다.

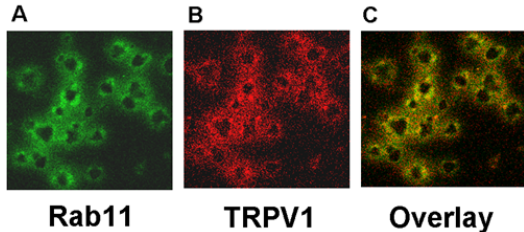
3. 결과

3.1 TRPV1과 Rab11의 colocalization의 확인

Rab11은 세포막에 존재하면서 TRPV5와 TRPV6과 상호작용하면서 막수송에 직접적으로 영향을 주는 것[22]처럼 다른 막 단백질의 수송에도 영향을 줄 수 있다는 가능성을 보여준다. 그러므로 Rab11이 TRPV1과도 직접적으로 결합하여 막수송에 관여하는지를 알아보기 위하여 세포 내의 TRPV1과 Rab11의 분포를 공초점 현미경을 이용한 면역화학법을 실시하여 알아보았다[그림 1].

그림 1A에서 보듯이 Rab11은 세포의 세포막부위를 중심으로 분포되어 있으며 TRPV1의 경우에도 Rab11과 세포내에서 거의 유사한 분포, 즉 세포막 부위에 분포하는 것을 확인하였다. 그림 1C는 Rab11과 TRPV1이 세포 내에서 colocalization하고 있음을 보여 준다. 이러한 실험

결과는 Rab11이 세포막에 분포하면서 직접적이든 간접적이든 세포막 단백질과 매우 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다.



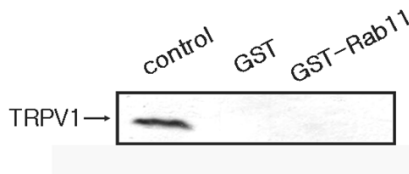
[그림 1] HEK293T 세포에 존재하는 TRPV1 과 Rab11의 Colocalization.

[Fig. 1] Colocalization of TRPV1 and Rab11 in HEK293T cell.

A, Rab11 (녹색); B, TRPV1(적색); C, Rab11 (녹색)과 TRPV1 (적색)이 colocalize하여 노란색을 보인다.

3.2 GST pulldown assay

Rab11과 TRPV1은 결합을 생화학적으로 알아보기 위해 GST-pulldown 분석을 실시하였다[그림 2]. 그림 2에서 보는 바와 같이 TRPV1은 FIP3와는 상호작용하지만 Rab11과는 단백질 간에 서로 직접적인 결합을 이루지 않는 것으로 나타났다. FIPs 단백질이 C-terminus에 위치한 Rab11-결합 도메인(RBD)을 이용하여 Rab11과 직접적인 상호작용을 하는 것[22]과는 대조적으로, TRPV1에는 이와 비슷한 도메인이 존재하지 않는 것으로 보인다. TRPV1과 Rab11은 서로 colocalization 하면서도 서로 직접적인 결합을 하지 않는 것은 Rab11이 TRPV1의 기능에 연관성이 없거나, 혹은 직접적인 단백질-단백질 상호작용이 아닌 간접적인 매개체 등을 통하여 TRPV1의 막수송에 영향을 미칠 것으로 생각된다.



[그림 2] TRPV1/GST-Rab11 GST pulldown 분석.

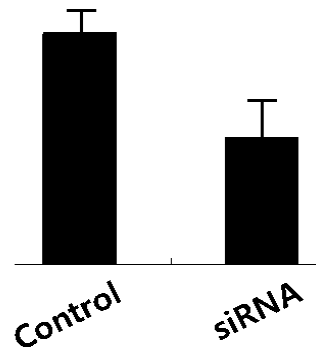
[Fig. 2] TRPV1/GST-Rab11 GST pulldown analysis.

lane 1, positive control. GST-FIP3 발현 cell lysate; lane 2, GST 발현 cell lysate; lane 3, GST-Rab11 발현 cell lysate.

3.3 Rab11 발현이 저해된 세포에서의 TRPV1의 막 발현 조사

GST-pull down 분석에서 Rab11이 TRPV1과 직접적으로 결합하지는 않지만 Rab11이 TRPV1의 막 수송에 관여하는지를 알아보기 위하여 Rab11a의 발현을 저해 하였을 때 TRPV1의 세포막으로의 수송을 알아보았다.

우선, Rab11a의 발현을 저해시키기 위해 TRPV1이 stable하게 발현되고 있는 HEK293T cell에 Rab11a siRNA를 형질도입하여 발현저해를 유도하였다. Rab11a의 발현 정도는 realtime PCR을 실시하여 확인하였다[그림 3]. 실험 결과 Rab11a의 siRNA는 Rab11의 발현을 control에 비하여 약 50%정도로 저해 하는 것으로 나타났다.



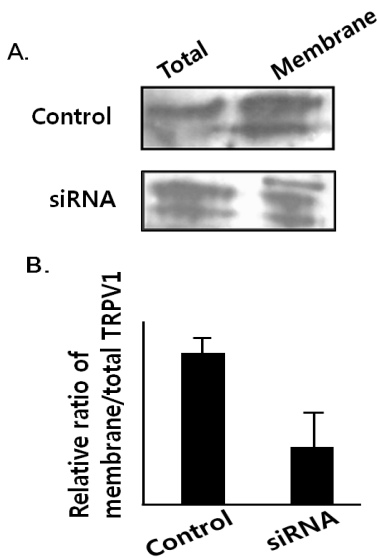
[그림 3] siRNA에 의한 Rab11a 발현의 저해.

[Fig. 3] Inhibition of expression of Rab11a by siRNA.

siRNA를 처리하지 않은 sample (control) 과 siRNA로 처리한 경우 (siRNA)의 발현 정도 (n=3, p<0.05).

Rab11a의 발현이 전체의 약 50%가량 저해된 환경에서 TRPV1의 세포내 분포 특히 막에 위치하는 양을 알아보았다. TRPV1은 여전히 세포의 막에서 발현되지만 그 양이 전체 세포에서 발현되는 양에 비하여 매우 낮게 (약 40% 수준으로) 발현되는 것을 확인할 수 있었다[그림 4]. 이는 Rab11a의 발현 저해는 TRPV1의 막 수송을 저해한다는 것으로 TRPV1의 막으로의 수송에 Rab11이 필요하다는 것을 의미한다.

결론적으로 본 연구에서 Rab11은 TRPV1과 세포내 분포가 유사하여 colocalize하지만 서로 직접적인 결합은 하는 것 같지 않다. Rab11의 발현을 저해하면 TRPV1의 막수송이 저해된다는 결과로부터 Rab11은 TRPV1의 막수송에 관여하는 것으로 결론지을 수 있다.



[그림 4] 막에서의 TRPV1의 발현.
[Fig. 4] TRPV1 expression on the membrane.

A, 전체 cell lysate 에서의 TRPV1 의 양 (lane 1)과 막 에 존재하는 TRPV1양 (lane 2). siRNA 처리하지 않은 경우 (control, 윗줄)와 처리한 경우 (siRNA 아랫줄). B, 대조군과 siRNA 처리 후 세포 전체의 TRPV1의 양과 막에 발현된 TRPV1의 양을 상대적 비율로 표시한 그래프(n=3, p<0.05).

4. 고찰

TRPV1의 막수송에 대하여는 잘 알려진 바가 없는 가운데 같은 TRP family에 속하는 TRPV5와 TRPV6의 경우에는 Rab11이 직접적으로 결합하여 막 수송에 관여한다는 것이 발표되었다[22]. TRPC 채널의 경우에는 Rab11과 Rab9가 관여하는 것이 보고되었는데 특히 Rab11의 역할이 중요하여 Rab11의 과다발현은 TRPC의 막에서의 발현을 증대시켰다[23]. 또한 ENaC 채널의 경우도 채널의 세포내 분포가 Rab11의 영향을 받는 것으로 보고되었다[24]. 그 외 CFTR, Kv1.5 등의 채널도 세포내 수송에 Rab11이 관여한다고 보고되었다[25,26].

그러므로 본 연구에서는 TRPV1의 막 수송과정에서 Rab11이 관여한다고 가정하고 이를 확인하고자 세포생물학적으로 또한 생화학적으로 알아보았다. 실험결과 TRPV1은 TRPV5나 TRPV6처럼 Rab11과 직접적으로 결합은 하지 않았다. 하지만 TRPV1은 Rab11과 colocalize 하고 있으며 나아가 Rab11a의 발현을 저해하면 TRPV1의 막 수송이 저해가 되는 것을 볼 때 TRPV1의 막 수송에도 중요한 조절 작용을 하는 것을 확인하였다.

그러면 왜 TRPV1이 TRPV5나 TRPV6과 같이 Rab11과 직접적으로 결합하지 않는가? 이는 아마도 다른 물질이 중간에 매개 역할을 하는 것으로 보이는데 그것이 Rab11과 complex를 이루는 FIP3이 아닌가 생각된다. TRPV1은 FIP3과 직접적으로 결합하며 FIP3은 TRPV1의 막 수송에 관여한다고 보고되었다[21]. 그러므로 Rab11이 TRPV1과 직접적으로 결합하지는 않지만 FIP3과 결합하여 TRPV1의 막수송에 관여하는 것으로 보인다. 그러므로 본 실험에서 보여주듯이 Rab11의 발현 양이 줄어들면 Rab11-FIP3 complex의 양이 줄게 되어 TRPV1의 막 수송에 지장을 준 것으로 보인다. 이는 최근의 결정구조학으로 밝힌 연구 결과가 그 뒷받침을 하고 있다. Rab11은 FIP와 RBD (Rab11-binding domain) 도메인을 통하여 FIP가 이량체가 되도록 도우며 이량체인 Rab11과 결합하여 이형 사량체를 형성하며 막 수송에 관여한다고 보고하며 Rab11 뿐 아니라 막 수송에 FIP3이 중요함을 언급하고 있다[31]. 또한, Rab11의 발현을 저해하는 siRNA에 의해 Rab11의 발현이 저해됨에 따라 세포질분열 과정에서 FIP3이 세포질에서 막으로의 이동이 저해됨을 볼 수 있었다[27], 즉, Rab11은 FIP3과 Rab11-FIP3 복합체를 이루며 세포막으로 표적 단백질의 이동을 조절하는 역할을 한다고 볼 수 있다[27-29].

그러므로 본 연구 결과와 같이 TRPV1과 Rab11은 서로 colocalize 되지만 직접적으로 결합은 하지 않고 Rab11의 발현을 저해하면 TRPV1의 막에서의 발현양이 줄어드는 것은 막수송에 큰 역할을 하는 Rab11이 FIP3과 복합체를 이루어 TRPV1의 막수송에 영향을 주기 때문인 것으로 보인다.

References

- [1] Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, 389, pp. 816-824, 1997.
- [2] Hwang S. W., Cho H., Kwak J., Lee S. Y., Kang C. J., Jung J., Cho S., Min K. H., Suh Y. G., Kim D., Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, pp. 6155-6160, 2000.
- [3] Oh U., Hwang S. W., Kim D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 16, pp. 1659-1667, 1996.
- [4] Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M.,

- Rosen T. A., Levine J. D., Julius D. "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature*, 389, pp. 816-824, 1997.
- [5] Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V., Bindels R. J., Bruford E. A., Caterina M. J., Clapham D. E., Harteneck C., Heller S., Julius D., Kojima I., Mori Y., Penner R., Prawitt D., Scharenberg A. M., Schultz G., Shimizu N., Zhu M. X. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell*, 9, pp. 229-231, 2002.
- [6] Caterina M. J., Leffler A., Malmberg A. B., Martin W. J., Trafton J., Petersen-Zeit K. R., Koltzenburg M., Basbaum A. I., Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, pp. 5464-5478, 2000.
- [7] Davis J. B., Gray J., Gunthorpe M. J., Hatcher J. P., Davey P. T., Overend P., Harries M. H., Latcham J., Clapham C., Atkinson K., Hughes S. A., Rance K., Grau E., Harper A. J., Pugh P. L., Rogers D. C., Bingham S., Randall A., Sheardown S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405, pp. 6783-6794, 2000.
- [8] Palazzo E., Luongo L., de Novellis V., Berrino L., Rossi F., Maione S. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain*, 6, 66, 2010.
- [9] Vlachova V., Teisinger J., Susankova K., Lyfenko A., Etrich R., Vyklicky L. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci*, 23, pp. 1340-1350, 2003.
- [10] Rathee P. K., Distler C., Obreja O., Neuhuber W., Wang G. K., Wang S. Y., Nau C., Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J. Neurosci*, 22, pp. 4740-4745, 2002.
- [11] De Petrocellis L., Harrison S., Bisogno T., Tognetto M., Brandi I., Smith G. D., Creminon C., Davis J. B., Geppetti P., Di Marzo V. The vanilloid receptor (VR1) mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem*, 77, pp. 1660-1663, 2001.
- [12] Bhave, G., Hu, H.-J., Kathi S., Glauner, Zhu, W., Wang, H., D. J. Brasier, Gerry S. Oxford, and Robert W., Gereau IV. protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, pp. 12480-12485, 2003.
- [13] Premkumar L. S., Qi Z. H., Van Buren J., Raisinghani M. Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J. Neurophysiol.* 91, pp. 1442-1449, 2004.
- [14] Tominaga M., Wada M., Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, pp. 6951-6956, 2001.
- [15] Varga A., Bolcskei K., Szoke E., Almasi R., Czeh G., Szolcsanyi J., Petho G. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience*, 140, pp. 645-657, 2006.
- [16] Jung J., Shin J. S., Lee S. Y., Hwang S. W., Koo J., Cho H., Oh U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol Chem.*, 279, pp. 7048-7054, 2004.
- [17] Jin X., Morsy N., Winston J., Pasricha P. J., Garrett K., Akbarali H. I. Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, pp. C558-C563, 2004.
- [18] Lee S. Y., Hong Y., Oh U. Decreased pain sensitivity of capsaicin-treated rats results from decreased VR1 expression. *Arch Pharm Res.*, 27, pp. 1154-1160, 2004.
- [19] Ji R. R., Samad T. A., Jin S. X., Schmoll R., Woolf C. J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36, pp. 57-68, 2002.
- [20] Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Garcia-Sanz N., Ferrer-Montiel A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.*, 279, pp. 25665-25672, 2004.
- [21] Lee S.Y. Identification of a protein that interacts with the vanilloid receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, pp. 1445-1451, 2005.
- [22] Stan F. J., van de Graaf, Qing Chang, Arjen R. Mensenkamp, Joost G. J., Hoenderop, and Rene J. M., Bindels. Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 26, pp. 303-312, 2006.
- [23] Cayouette S., Bousquet S. M., Francoeur N., Dupre E., Monet M., Gagnon H., Guedri Y. B., Lavoie C., Boulay G. Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803,

- pp. 805-812, Epub 2010.
- [24] Karpushev A. V., Levchenko V., Pavlov T. S., Lam V. Y., Vinnakota K. C., Vandewalle A., Wakatsuki T., Staruschenko A. Regulation of ENaC expression at the cell surface by Rab11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, pp. 521-525, Epub 2008.
- [25] Zadeh A. D., Xu H., Loewen M. E., Noble G. P., Steele D. F., Fedida D. Internalized Kv1.5 traffics via Rab-dependent pathways. *J. Physiol.* 586, pp. 4793-4813. Epub 2008 Erratum in: *J. Physiol.* 587, p. 505, 2009.
- [26] Bilan F., Nacfer M., Fresquet F., Norez C., Melin P., Martin-Berge A., Costa de Beauregard M. A., Becq F., Kitzis A., Thoreau V. Endosomal SNARE proteins regulate CFTR activity and trafficking in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 314, pp. 2199-2211, Epub 2008.
- [27] Wilson G. M., Fielding A. B., Simon G. C., Yu X., Andrews P. D., Hames R. S., et al. The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis, *Mol. Biol. Cell.*, 16, pp. 849-860, 2005.
- [28] Fielding A. B., Schontech E., Matheson J., Wilson G., Yu X., Hickson G. R., et al. Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *EMBO J.*, 24, pp. 3389-3399, 2005,
- [29] Sudharshan Eathirak, Ashwini Mishra, Prekeris, David G. Lambright. Structural Basis for Rab11-mediated Recruitment of FIP3 to Recycling Endosomes. *J. Mol. Biol.*, 364, pp. 121-135, 2006.
- [30] Einarson M. E. Detection of protein-protein interactions using the GST fusion protein pull-down technique, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (eds. Sambrook, J. & Russell, D. W.), pp. 10.55-18.59, 2001.
- [31] Horgan C. P., McCaffrey M. W. The dynamic Rab11-FIPs. *Biochem. Soc. Trans.*, 37, pp. 1032-1036, 2009.

엄 기 범(Ki Bum Um)

[준회원]



- 2008년 2월 : 한경대학교 생물정보통신전문대학원 (이학석사)
- 2008년 3월 ~ 현재 : 성균관대학교 의과대학

<관심분야>
생명공학, 신경과학

이 순 열(Soon-Youl Lee)

[정회원]



- 1995년 8월 : University of California, Davis 미생물학과 (이학박사)
- 2003년 1월 ~ 현재 : 한경대학교 생명공학과 교수

<관심분야>
생명공학, 미생물학, 신경과학