

수정에 의한 Mouse egg의 세포막전류 변화

홍성근 · 박춘옥 · 한재희 · 김익현* · 하대식** · 권종국***

경상대학교 의과대학 생리학교실

경상대학교 대학원 의학과*

경상남도 보건환경 연구원**

서울대학교 수의과대학 생리학교실***

(1992. 3. 10 접수)

Changes in the inward current and membrane conductance after fertilization in the mouse eggs

Seong-geun Hong, Choon-ok Park, Jae-hee Han, Ik-hyun Kim*,
Dae-sik Ha**, Jong-kuk Kwun***

Department of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University

*Department of Physiology, Graduate School, Gyeongsang National University**

*Kyongsangnam-Do, Provincial Government Institute of Health and Environment***

*Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University****

(Received March 10, 1992)

Abstract : Changes in the both inward current and conductance of membrane by the fertilization were observed using the one microelectrode voltage clamp(or switch clamp) technique. Unfertilized eggs and both 1- and 2-cell stage eggs after fertilization were donated from the superovulated mouse (ICR, more than 6 weeks old) treated with PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, Sigma) and HCG(human chorionic gonadotropin, Sigma) and naturally mated ones, respectively in this experiment. Membrane potential was held at -90mV and the voltage step was applied from -80mV to 50mV with interval of 10mV or 20mV for 300ms. Since both of amplitudes and time courses in the membrane currents were various according to the states of cells and clamping condition, results were presented by their averages \pm SEM(standard mean error)and ratios or percentages.

Inward currents began to appear in response to the step depolarization from -60mV and reached its maximum at -50mV. However, since the potential was not clamped evenly during the voltage step, current-voltage(I-V) relationship might be positively shifted 10 or 20mV. From the steady-state currents plotted in the I-V curve, outward rectification was markedly observed. Peak inward currents(i_{in}) at -50mV were $-0.62 \pm 0.23nA$ ($n=4$), $-0.52 \pm 0.25nA$ ($n=5$) and $-0.37 \pm 0.25nA$ ($n=6$), in the 1-cell stage, 2-cell stage fertilized eggs and in the unfertilized eggs, respectively. Pure inward current(difference between steady-state and peak, $i_{in, pure}$) were $-1.01 \pm 0.23nA$, $-0.69 \pm 0.43nA$ and $-0.68 \pm 0.29nA$, respectively in the 1-cell stage fertilized eggs, unfertilized eggs and 2-cell stage fertili-

*이 논문은 1990년도 교육부의 지방대학 학술진흥 연구비에 의하여 지원되었음.

zed eggs. These results suggested that the outward current in fertilized eggs of 2-cell stage was more increased than those in the unfertilized eggs. Pure inward currents in the all stages of eggs showed a similar fashion in the I-V relationship from -50mV to 50mV and reversal potential at 50mV. Time constant of inactivation(τ) in the inward current was decreased as the membrane potential was depolarized in the unfertilized and 2-cell stage eggs but in the 1-cell stage eggs τ was not likely to be affected significantly. Slope conductances were 14.2nS, 8.9nS and 7.7nS in the 1-cell, 2-cell stage fertilized eggs and the unfertilized eggs, respectively. Membranes between two cells within a zona pellucida seem to be electrical-connected in the 2-cell stage eggs from the observation made in the analysis for the electrotonic spread and decay to the current stimuli.

Both of inward current and membrane conductance were increased after fertilization in the mouse eggs. Inward current seems to be carried by the same ion or through the same channels up to the 2-cell stage and ion that carried inward current was thought to play important function after fertilization in the mouse eggs.

Key words : inward current, fertilization, mouse egg, switch clamp.

서 론

재료 및 방법

수정시 mouse egg 세포막은 cortical granule의 분비나 액성의 감소 외에도 여러가지 변화를 진행하며^{1,2} 수정시에 K^+ 전도도 증가에 기인한 fertilization potential 또는 activation potential 이라는 막전압의 변화를 보이고 있다.^{3~5} Mouse 미수정란에서 막전압고정법을 이용하여 기록한 결과들은 대부분 Ca^{2+} 통로를 통한 내향성 전류와 K^+ 에 의한 외향성 전류가 존재함을 밝히고 있다.^{6,7} 그러나 수정이라는 현상을 통하여 개체의 분화와 발전이 시작되므로 흥분성 세포막에서 전형적인 흥분성 발현에 관여하는 Na 통로의 존재여부나 발생시기, 아울러 세포막 이온전류의 변화에 관심이 주어졌으나 blastocyst 때까지 Na channel을 통한 Na 전류는 관찰되지 않았고 cell stage가 진행될수록 미수정란에서 보이던 내향성 전류가 감소되거나⁸ 수정 직후 막전압 의존성 channel을 통한 이온전류의 증가가 있었다는 상반된 결과가 보고되었다.⁹ 수정시 세포내 Ca^{2+} 농도증가가 있었다는 결과와 비교할 때^{4,10}, Mouse 미수정란과 수정후의 1-cell stage 및 2-cell stage에서 관찰되는 ion전류의 변화는 아직도 분명하지 못한 것으로 여겨진다.

이에 본 실험은 막전압고정법을 이용하여 미수정란과 자연교미를 통하여 얻은 수정란인 1-cell stage와 2-cell stage egg에서 막전류를 측정, 비교하여 수정에 의한 ion전류의 변화와 세포막의 특성에 대하여 알아보고자 시행하였다.

과배란 유도 및 난 분리 : 실험동물은 ICR 계통 mouse로서 암컷은 6~8 주령, 체중 20~25g인 것을, 수컷은 10~12 주령, 체중 25~30g인 것을 사용하였다*. 미수정란과 1-세포기 및 2-세포기의 수정란을 얻기 위하여 암컷 6마리를 동시투약 단위로 하여 PMSG와 hCG를 이용, 과배란을 유도하고 이들중 2마리는 미수정란 채취용으로 사용하고 4마리는 교미시켜 1-세포기와 2-세포기 채취용으로 사용하였다. 과배란은 PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, Sigma)5 IU를 복강내 주사하고 48~52 시간후에 hCG(human chorionic gonadotropin, Sigma) 5 IU를 동일한 경로로 주사하여 유도하였다. 미수정란의 채취는 hCG 투여 14~18 시간 후에 자궁난관 접합부와 난소 사이에 있는 난관을 적출하여 100 IU의 hyaluronidase(Type 1-S, Sigma)용액으로 cumulus cell을 제거하여 이용하였고, 수정란은 과배란을 유도한 성숙한 자성 mouse와 음성 mouse를 1 : 1 비율로 합사시켜 자연교미를 유도하고 다음날 아침, 질전을 확인한 경우 수정 1일로 하였다. 1-세포기 난은 hCG투여후 18~24 시간에 미수정란 채취방법과 동일하게 회수하였고, 2-세포기 난은 수정 2일째(hCG 투여 후 36~48 시간)에 30 gauge needle을 난관 복강구로 삽입하고 난관을 관류하여 회수하였다.

수정란인 1-세포기와 2-세포기의 감별은 1-세포기의 경우, 도립현미경(CK-2, Olympus)상에서 자동 전핵과 2차 극체가 선명하게 보이며 투명대와 세포질 상태가 양호한 것만을 선택하여 이용하였다. 2-세포기는 2개의

할구세포가 있으며 각 분할세포마다 한 개의 핵이 분명하게 보이고, 2차 극체가 존재하며 투명대와 세포질 상태가 선명한 것을 사용하였다.

세포막 전류의 기록 및 실험 진행: 막전압조정법을 이용한 세포막 전류의 측정에는 막전압조정용 amplifier (Axodamp-2A, Axon Instrument)를 사용, 단일전극을 이용한 막전압조정법(single-electrode voltage clamping method)를 이용하였다. 단일전극 막전압조정법은 2개의 전극을 이용하여 egg 내로 삽입시켰을 때의 egg membrane 손상정도가 증가할 수 있으며 빠르게 나타나는 Na 전류성분이 관찰되지 않는다고 알려져 있으므로 sampling rate에 따르는 제약과 다소 noise가 증가되는 단점에도 불구하고 이용하였다.

미수정란부터 2-세포기까지 관찰되는 세포막 전류와 성상을 비교하기 위하여 같은 표준실험용액에서 실험을 진행하였다. 분리된 egg는 실험용기 내로 옮겨 10분간 회복시킨 후 전극을 삽입하고 막전류를 관찰하였다. 세포막전압의 고정은 막전압조정용 amplifier와 stimulator(S-95, Medical Systems)를 이용하였고, sample rate는 10~15KHz 사이를 유지하였다. 3M KCl로 채운 15~20MΩ사이의 유리미세 전극과 기준전극으로는 3M KCl-Ag/AgCl agar bridge를 실험에 이용하였다. 막전압을 -90mV로 유지한 상태에서 10~20mV 간격의 저분극 또는 과분극 commanding potential(300 ms duration)을 가하여 나타나는 세포막 전류를 관찰하였다. 세포막 전류 측정중 막성상의 변화에 기인한 trace oscillation 발생을 피하기 위하여 capacitance 조정을 여유있게 하였다. 한번의 실험과정을 거친 egg는 형태적으로 완전하여도 다시 사용하지 않았으며 모든 과정은 신선한 egg cell의 결과를 얻기 위하여 채란후 6시간 이내에서 실시하였다. 실험결과와 기록과 실험 과정에 대한 설명을 PCM(PCM-2, Medical Systems)를 통하여 VCR tape에 동시에 기록하였으며 oscilloscope

(R5113, Tektronix), digital oscilloscope (CS-8010, Kenwood), pen recorder (Universal oscillograph 50-8655, Harvard)등으로 관찰하면서 진행하였다.

실험에 사용된 용액은 Table 1과 같이 조성하였다.

세포막 전류의 분석을 위한 기준설정 및 명칭: 막전압을 -90mV로 유지하여 일정수준의 저분극 자극 pulse를 주어 나타난 막전류의 분석을 위하여 Fig 1과 같이 분류하여 모든 경우에 동일하게 적용하였다. 유지전압을 나타내는 일정한 막전류를 기준으로 최대내향성전류의 크기를 i_{in} , 자극 pulse 종료직전에 일정하게 항정상태로 유지되는 steady-state current(i_{∞})로부터 최대 내향성전류와의 차이를 순수한 내향성 막전류(pure inward current, $i_{in, pure}$)로 계산하였다. 항정상태의 전류는 막전류의 기록시 저분극 pulse에 수반되는 leak 전류로 여겨지기 때문이다. 저분극 자극 개시점으로부터 최대내향성전류를 나타낼 때까지의 시간을 T_1 으로 분류하고 최대내향성전류가 나타난 시간으로부터 i_{∞} 의 63%에 도달할 때 즉, $(i_{\infty} - i_{in}) \cdot (1 - e^{-1})$ 까지의 경과시간을 T_2 로 정하여 내향성전류의 비활성화과정을 살피는 지표로 이용하였다.

고정전압이 균일하게 유지되지 못한 결점때문에(Fig. 1, 삽입된 그림의 upper trace 참조) 기록되는 막전류의 전류·전압관계는 10~20mV의 편차가 생길 수 있으며

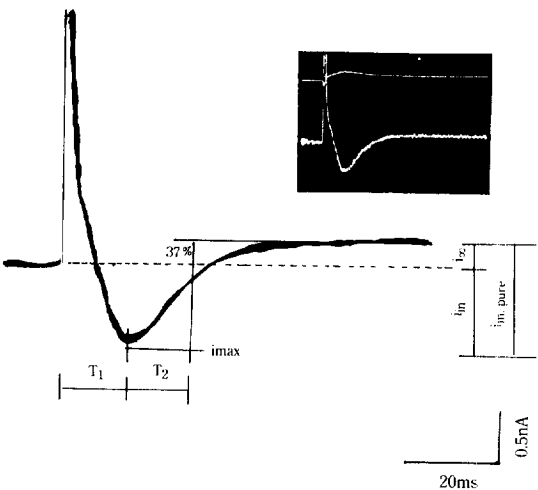


Fig 1. Determination and designations of parameters for the analysis of membrane current. Dotted line represented the current level relevant to the holding potential of -90mV. Time constant of inactivation(T_2) indicated the time lapse from the peak of inward current to 63% ($1 - e^{-1}$) of steady-state (i_{∞}). The inset shows the inward current generated by the step depolarization in 1-cell stage egg.

Table 1. Composition of the experimental solution

Reagent	Concentration (per Liter)
NaCl	140mM
KCl	6.0mM
CaCl ₂	4.0mM
MgCl ₂	1.2mM
Glucose	1.0g/L
HEPES	10.0mM
Polyvinylpyrrolidone	2.0mg/ml
BSA(bovine serum albumin)	2.0mg/ml

The pH was adjusted to 7.3~7.4 by adding NaOH at 37°C.

세포의 상태나 막전압 고정상태에 따라 기록되는 전류의 크기나 시간경과에 편차가 관찰되었기 때문에 대부분의 결과는 평균값과 standard mean error(SEM)로 표시하였다.

결 과

미수정란과 1-세포기, 2-세포기 수정란의 내향성전류(i_{in}) 변화 : 미수정란에서 관찰되는 내향성전류의 세포막전류와 막전압 사이의 관계와 수정후 1-세포기와 2-세포기에서 기록한 내향성전류를 막전압상에 도시하였다(Fig 2). 최대내향전류(i_{in})의 크기는 1-세포기 $-0.70 \pm 0.15 \text{ nA}$ (mean \pm SEM, $n=4$), 2-세포기의 $-0.52 \pm$

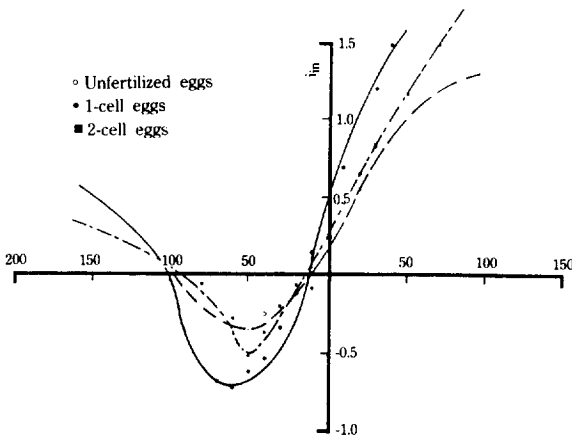


Fig 2. Peak inward current against membrane potential. Each value of current on the voltage axis was mean obtained from the each cell stage. All currents were reached maximum around -50 mV and reversed at -15 mV .

0.25 nA ($n=5$) 그리고 미수정란에서 $-0.37 \pm 0.25 \text{ nA}$ ($n=6$) 순이었다. Fig 2에서 표시한 점은 해당 막전압에서 나타나는 최대내향성전류(i_{in})의 평균값만을 도시한 것으로 미수정란과 2-세포기의 최대내향성전류 -50 mV 에서 최대값을 보였으나 1-세포기는 -60 mV 에서 나타났다. 그러나 이런 결과는 1-세포기에서 편차가 심한 일부 결과를 제외하면 동일하게 -50 mV 에서 최대값을 보였다. 역전전압(reversal potential)은 -15 mV 전후로 모든 경우에서 동일하게 관찰되었다. 내향성전류의 크기는 1-세포기, 2-세포기, 미수정란의 순서로 기록되었으며 이는 Yamashita⁹의 결과와 유사하였다.

수정전후의 순수한 내향성전류($i_{in, \text{pure}}$)비교 : Fig 2에서 관찰되는 막전류 크기 순서는 항정상태에서 관찰되는 막전류와의 차이($i_{in, \text{pure}}$)를 계산하여 막전압

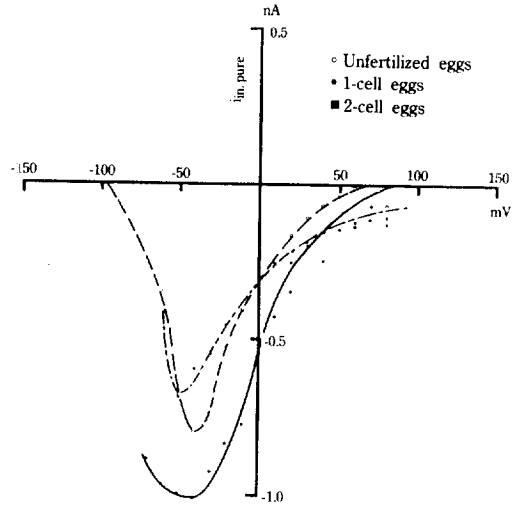


Fig 3. Current-voltage relationship of the pure inward current. Open circles indicate the pure inward currents in unfertilized eggs, closed circles in 1-cell stage eggs and squares in 2-cell stage eggs.

상에 도시한 결과, Fig 3과 같이 1-세포기 $-1.01 \pm 0.23 \text{ nA}$, 미수정란 $-0.81 \pm 0.48 \text{ nA}$, 2-세포기 $-0.68 \pm 0.29 \text{ nA}$ 의 순으로 바뀌어 나타났으며 동일한 막전압인 -50 mV 근처에서 모두 최대 $i_{in, \text{pure}}$ 값을 얻었다. 이같은 결과는 2-세포기의 내향성전류가 미수정란보다 크게 나타난 Fig 2의 경우와 차이를 보이는 것으로 2-세포기에서 미수정란보다 항정상태 전류, i_{oc} 가 작게 유지되고 있음을 관찰하였다.

순수한 내향성전류, $i_{in, \text{pure}}$ 의 특성을 비교하기 위하여 최대전류치(-50 mV 에서 측정되는 막전류 크기, maximum of $i_{in, \text{pure}}$)에 대하여 임의의 막전압에서 기록한 순수한 내향성전류의 크기를 비율, ($i_{in, \text{pure}}/\text{max. } i_{in, \text{pure}}$)로 도시하였다. 순수한 내향성전류는 -50 mV 부터 $+50 \text{ mV}$ 사이에서 유사한 기울기로 감소하며 50 mV 에서 전류의 방향이 바뀌고 있음을 보여주었다(Fig 4)

수정전후의 항정상태 전류비교 : 항정상태 전류, i_{oc} 를 Fig 5와같이 막전압에 대하여 도시한 결과 거의 직선적으로 나타날 것이라는 예상과는 달리 미수정란에서는 -30 mV , 1-세포기와 2-세포기에서는 -50 mV , -40 mV 부근에서 기울기가 각각 변하였다(Table 2).

항정상태를 나타내는 점들은 해당 막전압에 대한 평균값들이며 이 점들을 이용하여 나타난 회귀직선의 기울기는 Ohm의 법칙에 따라 slope conductance에 해당한다고 할 때 과분극에서 관찰되는 slope conductance

Table 2. Change of slope conductance from unfertilized eggs to 1-cell and 2-cell stage eggs

Stage of egg	Equation of regression line	r	g_m	P'
Unfertilized	$Y_1=0.0029x+0.261$	0.997	2.9nS	-31mV
	$Y_2=0.0079x+0.418$	0.996	7.7nS	
1-Cell	$Y_1=0.0075x+0.652$	0.995	7.6nS	-51mV
	$Y_2=0.014x+0.988$	0.992	14.2nS	
2-Cell	$Y_1=0.0047x+0.418$	0.995	4.7nS	-41mV
	$Y_2=0.0088x+0.602$	0.964	8.9nS	

1. r : determination coefficient, g_m : membrane slope conductance
2. P' indicates the membrane potentials responsible for cross point of two regression lines in each stage.
3. The relation of steady-state currents against membrane potentials was divided into two different slopes on P'.

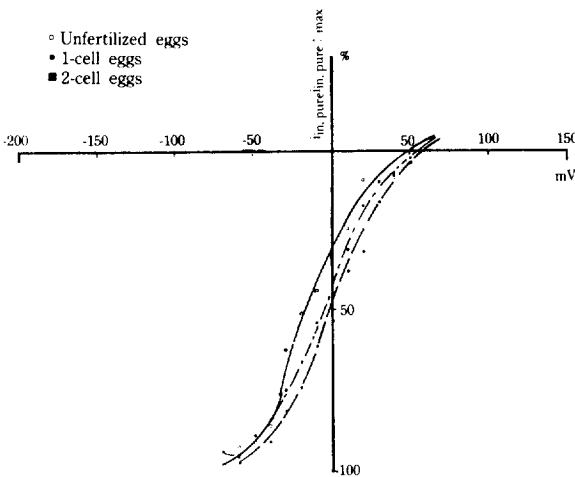


Fig 4. Current-voltage relationship plotted by the ratio of pure inward current to their maximum (obtained from each cell group). This shows a similar slope and reversal potential of 50mV from the unfertilized eggs to 2-cell stage fertilized eggs.

는 최대내향전류가 관찰되는 막전압 부위에서 급격히 증가하여 -50mV 이상의 막전압대에서 막전도도는 1-세포기, 2-세포기, 미수정란의 순서로 각각 14.2nS, 8.9nS 및 7.7nS이었다. 따라서 수정에 의해 막전도도가 증가하였으며 모든 egg stage에서 막전압이 저분극됨에 따라 outward rectification 현상을 관찰할 수 있었다.

수정직후의 내향성전류 inactivation의 변화: 저분극 pulse 개시후 최대내향전류에 이르는 time to peak (T_1)는 세포상태는 물론 막고정상태에 따라 큰 차이를 보여 수정전후의 세포기별로 유의한 차이를 얻지 못하였다. Fig 6은 T_2 의 변화를 각 세포기별로 나타낸 결과이다. 미수정란의 경우 막전압이 증가할수록 inactivation time은 감소하였으나 수정직후의 1-세포기는 막전압의 변화와 무관하게 거의 일정하게 유지되었다.

2-세포기 수정란의 분할세포간의 연결상태: 수정후

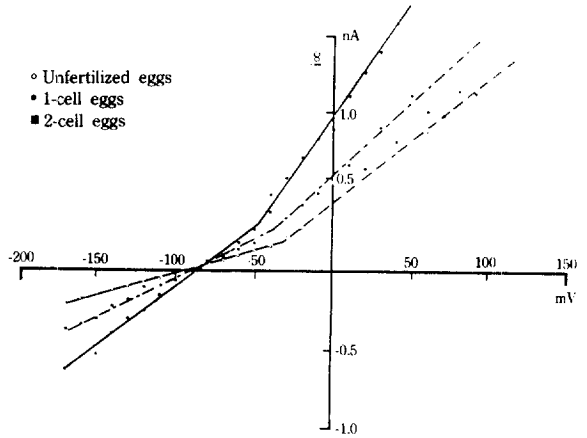


Fig 5. Changes of slope conductance in the different stage of eggs before and after fertilization. All of circles and squares is the values averaged of steady-state currents. Slope of the lines were changed significantly between -50mV and -30mV.

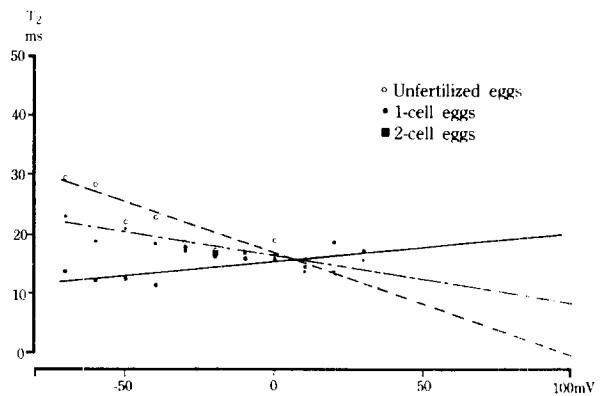


Fig 6. Changes of time constant of deactivation (T_2) against the membrane potential. In 1-cell stage, T_2 was not significantly changed on the entire range of membrane potential.

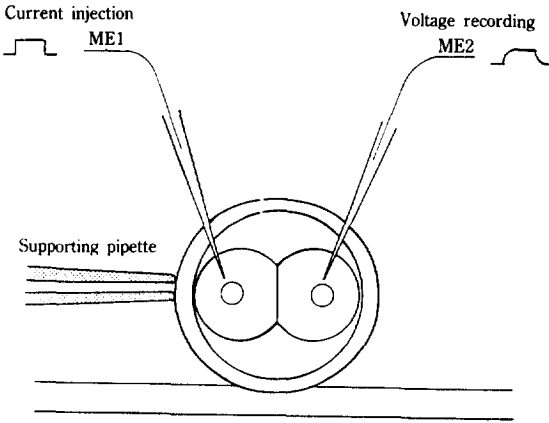


Fig 7. Modified diagram applied for the observation of the membrane connection between blastomeres in 2-cell stage eggs. One microelectrode (ME 1) was inserted for injection of current stimuli and the other (ME 2) for the recording of electrotonic potential.

2일에 얻어지는 2-세포기의 수정란은 2개의 분할세포로 구성되어 있고 독립된 형태와 세포막을 유지하면서 투명대내에 서로 인접하여 있다. 인접된 두 세포간의 세포막 연결상태가 일정한 거리를 두고 독립되어 있는지 심장세포와 같이 gap junction으로 연결되어 흥분파의 전도가 용이하게 이루어 지는지 알아보기 위하여 Fig 7과 같이 세포마다 미세전극을 삽입하고 한쪽의 미세전극을 통하여 전류자극을 흘려주어 자극에 반응하는 인접세포의 electrotonic potential을 측정하였다. 전류자극은 세포막의 전도도의 변화를 일으키지 않는 범위인 0.2nA 크기와 0.4nA 크기의 두 종류로 자극하였다(Fig 8 A, lower trace). Fig 8 A와 같이 기준세포에 삽입되어 있는 전극(ME 1)을 통하여 전류자극을 가하여 인접세포 막전압의 변화를 관찰한 결과 자극시간과 거의 일치하여 나타났다.

Fig 8 A의 상단 그림은 전류자극용 전극이 삽입되어 있는 세포자체에서 전류자극에 대하여 반응한 electrotonic potential인데 이는 본 실험에 이용한 막고정용 amplifier가 보유하고 있는 switch clamping 기법을 사용했기 때문에 얻어진 결과이다. Fig 8 B의 그림은 A와 반대로 인접세포에 동일한 전류크기로 자극하여 반응한 기준세포의 막전압 변화이다. 전류자극에 대하여 나타나는 electrotonic potential이 거의 동일한 자극에 대하여 유사한 막전압의 변화로 보아 2-세포기 분할 세포간의 연결은 흥분파의 전도가 용이한 electrical connection을 유지한다고 볼 수 있다.

고 찰

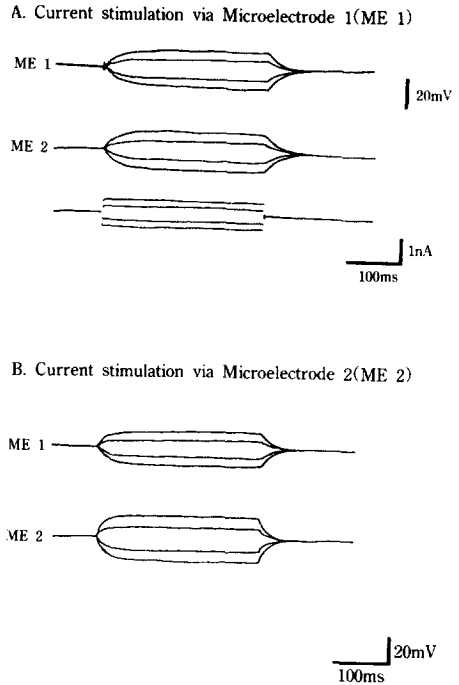


Fig 8. Recording of electrotonic potentials spread from the adjacent cell stimulated. A, current was injected to the microelectrode 1 (ME 1) as shown in the upper traces and membrane potential was recorded simultaneously through the microelectrode 2 (ME 2) in the middle traces. Lower traces represented the protocol of current stimulation. B, current was stimulated through ME 2 and recorded from the ME 1 in a same cell in A. Onset of electrotonic potential in two blastomeres was observed at the same time.

본 실험은 수정에 의한 세포막전류변화, 세포막성상의 변화를 관찰하기 위하여 각 세포기별로 비교하였다.

Mouse egg cell의 막전압은 switch clamping 기법으로 고정하였다. 그러나 막전압은 저분극 자극에 대하여 commanding potential (V_c)보다 10~20mV 큰 일과성 저분극이 나타난후 V_c 를 유지하였다. 일과성 저분극의 시간경과는 기록되는 막전류의 것과 거의 일치하였다. 그러므로 V_c 가 정확하게 유지되었을 때 본 실험의 결과보다 10~20mV의 변화가 존재하는 전류-전압 관계를 얻을 수 있을 것으로 보이며 whole cell recording 기법으로 얻은 전류-전압관계와 일치할 것⁶으로 생각된다. 이와같이 가정하면 본 실험에서 기록된 내향전류는 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 전류에 의한 것으로 추측된다.

미수정란을 기준으로 수정란인 1-세포기와 2-세포

기의 세포막전류변화의 특징은 수정전후인 1-세포기에서 ① 내향성 전류크기가 크게 증가하며 ② slope conductance도 증가하였다가 24시간후에 관찰한 2-세포기에서 다시 감소한다는 점이다. 2-세포기의 특징은 순수한 내향전류인 $i_{in, pure}$ 가 미수정란보다 감소하였고, slope conductance는 1-세포기와 미수정란의 평균치 근처로 유지되고 있음을 알 수 있다(Fig 3, 5 & Table 2). 수정후 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 egg가 sperm과 만날 때부터 시작되는 것으로 알려져 있다. Hamster egg의 경우, 막전압의 기록과 Ca^{2+} -sensitive 전극을 이용한 기록한 결과에 의하면 주기적으로 세포내 Ca^{2+} 농도의 oscillation이 관찰되며 동시에 나타나는 과분극(fertilization potential)과 안정막전압의 증가는 세포내 EGTA 주입에 의하여 사라지므로 세포내 Ca^{2+} 의 농도증가에 기인한 K^+ 전도도의 증가에 의한 것이라고 밝히고 있다.^{8,11} 수정시 관찰되는 순간적인 Ca^{2+} 변화는 정자가 난자와 접촉한 부위부터 국소적으로 증가하기 시작하여 10초 전후로 모든 세포질내로 확산된 후 15초 전후로 다시 감소하는 양상을 보이고 있다.¹⁰ 이러한 주기적인 세포내 Ca^{2+} 의 증가는 sperm-egg 상호작용에 의하여 수정에 의해 활성화된 GTP binding protein이 세포내 Inositol 1,4,5-triphosphate($InsP_3$)분비를 촉진시켜 세포내 Ca 저장고로부터 Ca 유리와 세포의 Ca^{2+} 투과도를 증대시키는 것으로 추측하고 있다.⁴

Mouss egg에 대한 관찰결과로는 수정직후 세포내 Ca-channel을 통한 내향성전류가 증가하였으나,⁹ mouse 수정란이 분화될수록 내향성 Ca^{2+} 전류는 감소하여 8-세포기 이후에 거의 소실되므로 Ca^{2+} 의 기능은 수정후 개시되는 초기 세포분열과정에 깊이 관여하는 것으로 생각되었다.⁸ 본 실험에 사용된 1-세포기는 수정후 적어도 12시간이 경과한 것으로 이때에도 수정란이나 2-세포기보다 큰 내향성전류를 보이고 있으므로 Ca^{2+} 의 기능은 수정직후부터 2-세포기 이전의 체세포 분열과정에 깊이 개재하는 것으로 사료된다.

항정상태 전류와 막전압 사이의 관계에서 미수정란과 1-세포기, 2-세포기에서 모두 outward rectification을 보이고 있으며 1-세포기의 slope conductance가 미수정란이나 2-세포기보다 큰 것은 Ca^{2+} 과 Ca^{2+} 에 의한 K^+ 전도도 증가에 기인하는 것으로 사료된다. Fig 4에서 보여주는 바와 같이 전류·전압관계에 나타난 순수한 내향전류($i_{in, pure}$)의 비율로 도시하였을 때 최대값(-50mV)과 역전전압 그리고 기울기가 거의 유사하게 나타난 결과는 동일한 이온통로를 통하여

같은 계통의 ion 이동을 의미한다고 볼 수 있다. Inactivation 시간은 미수정란과 2세포기에서 막전압이 증가함에 따라 감소하는 점으로 미루어볼 때 막전압 의존성을 보이는 channel을 유지하고 있으며 channel의 inactivation 과정도 역시 막전압에 영향받고 있음을 시사한다(Fig 6).

결 론

수정에 의한 세포막전류와 세포막성상의 변화여부를 미수정란과 수정후 1-세포기와 2-세포기를 대상으로 관찰하였다. 모든 실험은 -90mV의 유지전압으로 부터 10~20mV 간격으로 과분극 또는 저분극자극으로 얻은 막전류를 기록하였으며 각 세포기에서 얻은 결과의 평균값을 이용하여 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 내향성전류의 크기는 1-세포기 (-0.70±0.15nA, n=4 at -60mV), 2-세포기(-0.52±0.25nA, n=5 at -50mV), 미수정란(-0.37±0.25nA, n=6 at -50mV)의 순서로 나타났으며 순수한 내향성전류의 크기는 모두 -50mV에서 1-세포기(-1.01±0.23nA), 미수정란 (-0.81±0.48nA), 2-세포기(-0.68±0.29nA)의 차례로 2-세포기의 항정상태의 외향성 전류가 감소함을 보여주었다.
 2. 미수정란 및 1-세포기, 2-세포기의 모든 단계에서 세포막은 outward rectification을 나타내었다. Slope conductance는 1-세포기 (14.2nS)에서 가장 크게 관찰되었고, 2-세포기 8.9nS, 미수정란 7.7nS의 순서로 나타났다.
 3. 미수정란 및 1-세포기, 2-세포기에서 보이는 순수한 내향성전류는 -50mV부터 50mV 사이에서 유사한 기울기를 보였으며 50mV 부근에서 전류의 방향이 반전되었다.
 4. 미수정란과 2-세포기에서 내향성전류의 비활성화시간은 막전압에 따라 감소한 반면 1-세포기의 비활성화시간은 막전압에 거의 영향을 받지 않은 듯이 보였다.
 5. 수정란인 2-세포기의 할구세포 각각에 전극을 삽입하고 전류자극에 의한 인접 할구세포의 electrotonic potential 반응을 관찰한 결과 두 인접세포 사이의 관계는 전기적인 연결을 보였다.
- 이상의 결과로 보아 mouse egg의 세포막은 outward rectification을 보이며 수정에 의하여 내향성전류의 증가, 막전도도의 증가가 이루어졌음을 알 수 있었다. 내향성전류는 미수정란부터 2-세포기까지 동일한 channel을 통하여 동일한 ion의 이동을 통하여 이루어지며

이 ion은 수정후 세포의 분화과정에 깊이 관여하는 것으로 추측된다.

*본 실험에 이용된 실험동물은 (주) 유한양행 중앙연구소에서 지원받았음.

참 고 문 헌

1. Fukuda K, Chang MC. The time of cortical granule breakdown and sperm penetration in mouse and hamster eggs inseminated *in vitro*. *Biol Reprod* 1978 ; 19 : 216~226.
2. Johnson M, Edidin M. Lateral diffusion in plasma membrane of mouse egg is restricted after fertilization. *Nature* 1978 ; 272 : 448~450.
3. Igusa Y, Miyazaki S. Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium-sensitive electrodes. *J Physiol* 1986 ; 377 : 193~205.
4. Miyazaki S. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 1988 ; 106 : 345~353.
5. Miyazaki S, Igusa Y. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarization. *Nature* 1981 ; 290 : 702~704.
6. Peres A. The calcium of the mouse egg measured in physiological calcium and temperature conditions. *J Physiol* 1987 ; 391 : 573~588.
7. Yoshida S, Plant S, MacNiven AI, et al. Single Ca-activated K channels in excised membrane patches of hamster oocytes. *Pflügers Archiv* 1990 ; 415 : 516~518.
8. Mitani S. The reduction of calcium current associated with early differentiation of the murine embryo. *J Physiol* 1985 ; 363 : 71~86.
9. Yamashita N. Enhancement of ionic currents through voltage-gated channels in the mouse oocyte after fertilization. *J Physiol* 1982 ; 329 : 263~280.
10. Miyazaki S, Hashimoto N, Yashimoto Y, et al. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev Biol* 1986 ; 118 : 259~267.
11. Miyazaki S, Igusa Y. Ca mediated activation of a K current at fertilization of golden hamster eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 931~935.
12. Miyazaki S, Igusa Y. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarization. *Nature* 1981 ; 290 : 702~704.