

## 평지방막에 융합된 골격근의 single ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel의 이온투과성에 대한 연구

류 판 동  
서울대학교 수의과대학  
(1992년 11월 25일 접수)

### Permeability properties of skeletal muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels reconstituted into planar lipid bilayer

Pan-dong Ryu  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University  
(Received Nov 25, 1992)

**Abstract :** Properties of unitary ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels were studied using planar lipid bilayer technique. Vesicles were prepared from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skeletal muscle. ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K(ATP)) channels were identified by their unitary conductance and sensitivity to ATP. In the symmetrical solution containing 200mM KCl, 10mM HEPES, 1mM EGTA and pH 7.2, single K(ATP) channels showed a linear current-voltage relations with slight inward rectification. Slope conductance at reversal potential was  $60.1 \pm 0.43$  pS (n=3). Micromolar ATP reversibly inhibited the channel activity when applied to the cytoplasmic side. In the range of -50 ~ +50 mV, the channel activity was not voltage-dependent, but the channel gating within a burst was more frequent at negative voltage range.

Varying the concentrations of external/internal KCl (mM) to 40/200, 200/200, 200/100 and 200/40 shifted reversal potentials to  $-30.8 \pm 2.9$  (n=3),  $-1.1 \pm 2.7$  (n=3), 10.5 and 30.6 (mV), respectively. These reversal potentials were close to the expected values by the Nernst equation, indicating nearly ideal selectivity for K<sup>+</sup> over Cl<sup>-</sup>. Under bi-ionic conditions of 200mM external test ions and 200mM internal K<sup>+</sup>, the reversal potentials for each test ion/K pair were measured. The measured reversal potentials were used for the calculation of the relative permeability of alkali cations to K<sup>+</sup> ions using the Goldman-Hodgkin-Katz equation. The permeability sequence of 5 cations relative to K<sup>+</sup> was K<sup>+</sup> (1), Rb<sup>+</sup> (0.49), Cs<sup>+</sup> (0.27), Na<sup>+</sup> (0.027) and Li<sup>+</sup> (0.021). This sequence was recognized as Eisenman's selectivity sequence IV. In addition, modelling the permeation of K<sup>+</sup> ion through ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel revealed that a 3-barrier 2-site multiple occupancy model can reasonably predict the observed current-voltage relations.

**Key words :** planar lipid bilayer, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel, frog skeletal muscle.

### 서 론

ATP-sensitive K<sup>+</sup> 통로는 1983년에 심장근에서 처음

보고된 새로운 종류의 K<sup>+</sup> 통로로 ATP에 의하여 그 활성이 억제되는 특징이 있다.<sup>1</sup> ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel은 (이하 'K(ATP)통로'라 부름) 심장근세포<sup>1,2</sup>,

\* 이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

골격근세포<sup>3,4</sup>, 평활근세포<sup>5</sup>와 췌장 베타세포<sup>6</sup> 등 여러 가지 조직의 세포막에서 그 존재가 보고되었다. 특히 췌장 베타세포에서 인슐린분비를 증가시키며<sup>7</sup>, 혈관의 평활근을 이완시키고<sup>5</sup>, 심장근세포의 활동전위의 기간을 단축시키며<sup>1,2</sup>, 산소부족시 심장의 수축력을 감소시키며<sup>8</sup>, 혈당량이 감소되거나 산소부족시의 신경세포의 반응 등, 체내의 중요한 생리적 과정에 관여하고 있는 것으로 밝혀져 이 K(ATP)통로에 대한 관심이 급증하고 있다. 아울러 이 통로의 성상, 활성도의 조절, 생리적역할 등에 대한 연구의 중요성도 높아지고 있다.

K(ATP)통로는 그 성질에 따라 5종으로 구분이 되고 있는데 그중 type 1은 심장근, 골격근, 췌장, 혈관평활근 등에 존재하며 150mM KCl 대칭용액에서 단일통로의 conductance가 50~80 pS이며, ATP ( $\mu\text{M}$ )에 의하여 억제된다.<sup>9</sup>

K(ATP)통로의  $\text{K}^+$ 에 대한 투과도(permeability)는  $\text{K}^+$ 의 농도가 증가할 때 conductance의 증가율은  $\text{K}^+$  농도의 증가율보다 느리며 최종적으로는 포화(saturation) 현상을 보이며, 그 활성은 막전압에 비의존적인 것으로 알려지고 있다.<sup>10</sup> 한편 K(ATP)통로의 알칼리금속이온에 대한 선택성은 췌장과 골격근의 K(ATP)통로에서 Na과 Rb에 대한  $\text{K}^+$ 의 상대적인 투과도가 보고되어 있으나<sup>3,11</sup>, 알칼리금속류를 모두 포함하는 상대투과도에 대한 연구는 시도된 바가 없다. 본 연구에서는 개구리 골격근의 단일 K(ATP)통로를 평지방막에 융합시키고 5종의 알칼리금속이온에 대한 선택성 및 상대적인 투과성을 중심으로 K(ATP)통로의 성상에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

**막소포의 제조** : 이온통로 단백질을 포함하는 골격근의 막소포는 Guo 등<sup>12</sup>의 방법에 준하여 개구리의 골격근으로부터 만들었으며 과정은 다음과 같다.

충격으로 개구리(200~300g)를 기절시키고 대뇌 및 척수를 파괴시킨 다음 뒷다리 근육을 적출한다. 근육조직(100g)을 가위로 세절한후 300ml의 0.3M sucrose 완충액(10mM HEPES-KOH, 0.2mM EDTA, 3mM  $\text{NaNO}_3$ , pH 7.2)과 섞어 믹서(waring blender)에서 최대속도로 30초씩 두번 균질화시킨다. 시료를 2500g에서 10분간 원심하여 얻은 상층액에 KCl을 가하여 0.6M이 되게 하고 저온실에서 30분간 휘저으며 보관한다. 이 시료를 110,000에서 45분간 초원심하여 침전시키고, 침전물을 30~100ml의 완충액에 섞어 풀고, 미토콘드리아를 제거하기 위하여 이를 다시 5,000g에서 10분간 원심하여 상층액을 취한다. 이 액을 0.6M sucrose 완충액 위

에 추가하여 85,000g에서 12~15시간동안 원심하고, 0.3/0.6M층 사이에 생기는 분획을 취한다. 이 시료를 완충액으로 2배 희석하고 110,000g에서 1시간동안 초원심하여 얻은 침전물을 0.3M sucrose 완충액에 섞어 풀어 최종 단백질 함량이 5~10mg/ml 되도록 한다.<sup>13</sup>

이 시료를 소량씩 분주하여 액체질소에서 냉동시킨 다음 사용할 때까지 -70°C에서 보관한다.

**평지방막의 형성 및 K(ATP)통로 단백질의 융합** : 평지방막은 Montal과 Mueller<sup>14</sup>의 방법에 준하여 만들었다. 인지질 용액은 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylethanolamine (POPE)과 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine(POPC)을 8 : 2 혹은 7 : 3으로 섞어 decane에 녹인 것으로 전체 지방함량은 25mg/ml이다. 소량(< 2 $\mu\text{l}$ )의 인지질용액을 폴리스티렌 재질의 칸막이에 있는 200 $\mu\text{m}$  크기의 구멍에 유리막대로 칠하여 막을 형성한다. 칸막이의 양쪽은 cis와 trans(ground)칸으로 구분하며 용액의 양은 각각 0.6과 1.2ml이다.

지방은 Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL, USA) 제품으로 chloroform에 녹여 질소로 충전된 밀폐병에 들어있는 것을 이용하였다. 형성된 지방 이중막의 크기는 막의 capacitance를 측정하여 확인하였으며 보통 100~200pF의 막을 통로의 융합에 이용하였다. 지방 이중막은 완충액속에서 형성하는데 그 조성은 다음과 같다. 10mM HEPES-NMDG(N-methyl d-glucamine), 1mM EGTA(pH 7.2). 일단 지방 이중막이 형성되면 완충액의 KCl 농도는 3M KCl 용액 8-80  $\mu\text{l}$ 을 교환하여 40~200mM이 되게 하였다. 다음 막소포액(1~5 $\mu\text{l}$ )은 KCl의 농도가 높은 쪽에 넣고, 0 mV에서 작은 막대자석(2~3min)을 이용하여 용액을 계속 저으면서  $\text{K}^+$ 통로가 융합될 때까지 기다린다. 통로의 융합은 오실로스코프 상에서 단일이온 통로의 활성이 나타나는 것을 보며 확인하였으며 융합되기까지 걸리는 시간은 수분에서 수시간까지 다양했다. 융합이 확인되었을 때 즉시 자석으로 짓는 것을 중지하고 통로의 활성을 기록하거나 필요시 양쪽칸의 KCl이나 다른 양이온의 농도를 조절하였다. 이온통로의 방향성은 이온통로의 전류와 전압의 관계와 ATP에 대한 반응성에 기초하여 결정하였으며 대부분 막소포를 넣는 쪽이 안쪽(세포질 쪽)이었다. 실험실의 기온은 23~24°C이었다. 전압과 전류의 부호는 생리학의 일반적인 규칙대로 따랐으며 외향성전류는 윗쪽으로 표기하였다.

**전기적인 기록** : 전류는 일정한 전압하에서 BC525-A bilayer amplifier(Warner Inst. Co Hamden, CT)를 이용하여 기록하였으며 amplifier headstage는 Cl로 입력된 은선(Ag/AgCl)을 통하여 0.5M KCl 용액이 담긴 두개

의 소형시험관(0.6ml)에 연결하였고, 이 시험관의 용액은 U자 모양의 agar bridge(0.2M KCl ; 2% agar, 1mM EDTA)를 통하여 지방막의 양쪽 용액에 연결되었다. 전극의 비대칭성과 junction potential에서 오는 오차는 매번 실험시작전에 막의 양쪽에 동일한 용액을 넣고 측정하여 보정하였다. 이온의 농도차에서 오는 liquid junction potential은 바깥쪽에 LiCl 200mM, 안쪽에 KCl 200mM인 경우 20mV까지 달했다. 이렇게 이온의 농도차에서 오는 junction potential은 기록이 끝난후 다시 보정을 하였다.

**자료의 변환저장 및 분석** : 일정한 전압하에서 기록된 단일이온통로의 전류는 입력장치인 Pulse Code Modulator(PCM-2, medical systems, USA)를 통하여 VCR tape에 저장한후 필요시 재생하여 분석에 이용하였다. 동시에 전류와 전압은 pen recorder(Gould, SP2008)를 통하여 종이에도 기록하였다. Tape에 저장된 자료는 8-pole Bessel filter를 통하여 100~500Hz(-3 db corner frequency)로 재생시켜 디지털 시그널로 컴퓨터에 입력되었고(2 KHz), 후에 전류의 크기와 통로의 여닫이 기간의 측정 및 그림의 제작에 이용하였다. 단일이온통로 전류의 크기는 열린상태와 닫힌상태가 확실한 예에서 분석용 프로그램(Fetchan, pClamp Version 5.5.1)을 이용하여 측정하였다. 통로의 활성도는 (NP<sub>o</sub>)활성을 갖는 단일이온통로의 수(N)와 하나의 단일통로가 열려 있을 확률의 평균값(P<sub>o</sub>)를 곱한 값으로 표현하였으며 보통 1분여의 기록으로부터 구하였다. 역전전압(reversal potential)은 역전전압을 중심으로 각각 3개의 전압과 전류의 측정치를 linear regression하여 얻어지는 X절편의 값으로부터 구하였으며 이때의 기울기로부터 slope conductance 값을 구하였다. 이러한 분석은 PC(AT286)와 분석용 프로그램인 pClamp, 데이터 변환장치인 Labmaster DMA(125KHz), 그리고 laser printer를 이용하여 수행되었다.

**K<sup>+</sup> 통과시의 energy profile에 대한 예측** : K<sup>+</sup>이온이 통로를 통과할 때는 단순히 밋밋한 구멍을 통과하는 것이 아니라 K<sup>+</sup>의 통로와의 결합과 아울러 K<sup>+</sup>이온들간의 상호작용 등을 생각할 수 있다. 본 연구에서는 선인들이<sup>15</sup> 이용한 3-barrier 2-site(3B2S) channel model을 이용하여 통로의 전류를 계산해내는 원리를 적용하여 측정된 전류로부터 energy profile을 구하였다. 따라서 이용된 model은 3 barrier 2 site model이고 동시에 두K<sup>+</sup>이온이 통로에 머물 수 있으며 이들간의 전기적인 반발 등이 고려된 model이다.

조정이 가능한 여러가지 값들은 Fig 6A에 있는 energy diagram에 요약되어 있다. 이온과 결합하고 있지 않

은 통로의 energy는 0 mV에서 세개의 봉우리(G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>)와 두개의 골짜기(U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>)를 갖으며 아래 첨자들은 통로안쪽으로 부터의 위치를 순서대로 표시한 것이다. 봉우리와 골짜기의 위치는 D<sub>1</sub>부터 D<sub>6</sub>까지 통로안과 밖의 전압차(electric field)를 느끼는 정도를 분수로 표시한 것으로 Fig 6A에서는 D<sub>1</sub>부터 D<sub>6</sub>으로 표시되어 있다. 따라서 D<sub>1</sub> + D<sub>2</sub> + D<sub>3</sub> + D<sub>4</sub> + D<sub>5</sub> + D<sub>6</sub> = 1 이어야 한다. 또한 이온간의 작용을 반영하는 것으로 interaction energy(A)가 있는데 이는 두번째로 결합하는 이온이 결합부위 옆의 봉우리와 골짜기의 energy에 미치는 영향을 보정하기 위한 것이다. 보정을 위하여 실제로는 A/d값을 옆의 봉우리와 골짜기의 energy값에 더해주며 여기서 d는 이온결합부위와 옆의 봉우리와 골짜기 사이의 거리이다.

실제로 K(ATP)통로의 K<sup>+</sup>이온이 통과할 때의 energy profile은 Fig 7에서 처럼 각각의 전압과 K<sup>+</sup>이온농도에서 측정된 전류의 크기를 입력하고, 전류-전압의 관계를 3B2S channel model을 이용하여 non-linear curve fitting하여 얻었다. 이때 이용된 프로그램은 Alvarez 등<sup>16</sup>에 의하여 개발된 것이다. Reference energy state는 55.5M용액을 기준으로 하였으며 1M 용액을 기준으로 하여 얻어진 값과 비교할 때는 4.0 RT units을 본 실험에서 얻어진 값에 더해줘야 한다. 본 실험에서 이온의 농도는 널리 이용되는 Goldman-Hodgkin-Katz식의<sup>17</sup> 경우에서 처럼, 역전전압으로부터 투과도(permeability)를 구할때나 3B2S modelling에서는 이온의 농도 대신 활성도(activity)<sup>18</sup>를 이용하였다.

## 결 과

**ATP-sensitive K<sup>+</sup> 통로의 확인** : 평지방막에 융합되는 개구리골격근 막세포의 이온통로로는 수종의 K<sup>+</sup>통로와 Cl<sup>-</sup>통로가 있었다.<sup>19</sup> 여기서는 그 중 통로 양쪽의 200mM KCl 용액하에서 conductance가 60.1 ± 0.43(n=3) pS이며, K<sup>+</sup> 이온에 대한 선택성이 높고, 통로안쪽의 ATP에 의하여 억압이 되는 K<sup>+</sup>통로에 대하여 기술이 된다.

Fig 1은 평지방막에 융합된 단일 ATP-sensitive K<sup>+</sup>(K(ATP))통로에서 기록되는 전류를 보여주고 있다. 통로의 활성도는 닫혀있다가 돌발적으로 열리는 burst 현상이 많았고 이런 burst는 길게는 1분까지 지속되며, 닫혀있는 기간은 수분까지 다양하게 나타났다. 통로의 활성도는 ±50mV 구간에서 전압과의 두드러진 연관성을 보이지 않았다. 그러나 burst동안의 여닫이는 음전압에서 더욱 잦았다. 이는 burst중의 mean open time이 양전압에서 더 길었다는 쥐골격근에서의 보고와도 일치

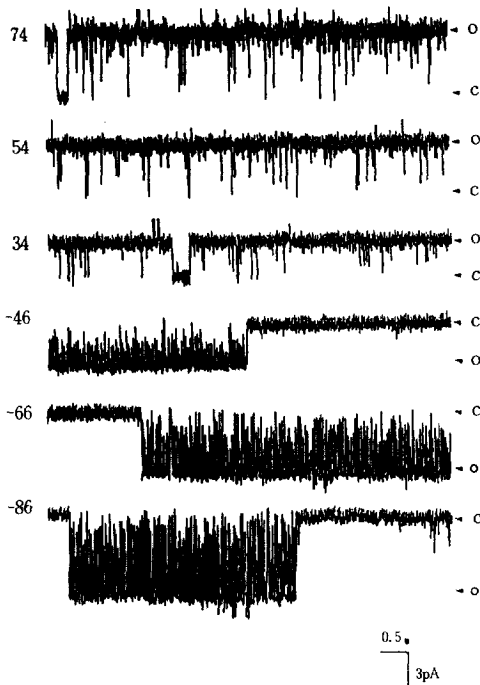


Fig 1. Current records of a single K(ATP) channel from bullfrog skeletal muscle incorporated into a POPE/POPC lipid bilayer. Open and closed states are indicated by the letter "o and c", respectively and outward currents are plotted upward. The solution on both sides of the bilayer was 200mM KCl, 10mM, HEPES-NMDG, 1mM EGTA, pH 7.2. The current records are filtered at 100 Hz (8-pole Bessel filter, -3 db corner frequency) and digitized at 2 KHz.

한다.<sup>20</sup>

Fig 2는 K(ATP)통로의 전류와 전압과의 관계를 나타내는 그래프로서 약간의 내향성 휘어짐이 나타나고 있다. 통로양쪽에 동일한 완충액을 사용하였고, 용액에는 200mM KCl, 10mM HEPES-NMDG, 1mM EGTA (pH 7.2)가 포함되어 있다. Slope conductance는 음전압 (-60 ~ -30mV) 구간에서는 71.3pS, 양전압 (40 ~ 80mV) 구간에서는 51.7pS이었다. K(ATP)통로의 한가지 특징은 그 활성이 시간이 지남에 따라 급격히 감소하는 "rundown"현상이다.<sup>21</sup> 본 연구에서도 이러한 현상을 관찰할 수 있었으며 활성의 지속시간은 개개의 통로별로 매우 다양하였다(자료는 제시하지 않음). 이와같이 통로의 활성이 안정되지 않았기 때문에 통로의 여단이에 대한 구체적인 kinetic analysis는 하지 않았다.

ATP-sensitive K<sup>+</sup>통로는 그 이름에서 나타나는 바처럼 ATP에 의하여 그 활성이 억제되어야 한다. Fig 3A는 ATP 300 μM(disodium salt)을 통로 양쪽에 적용하

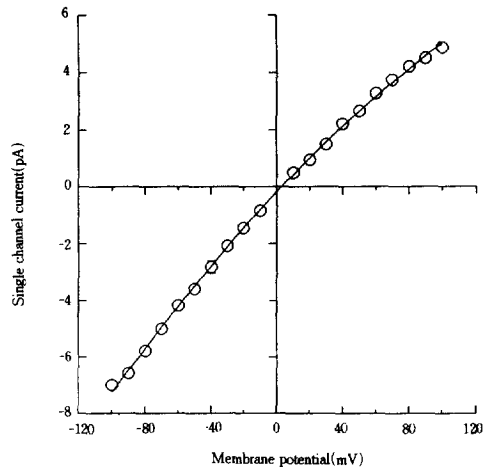


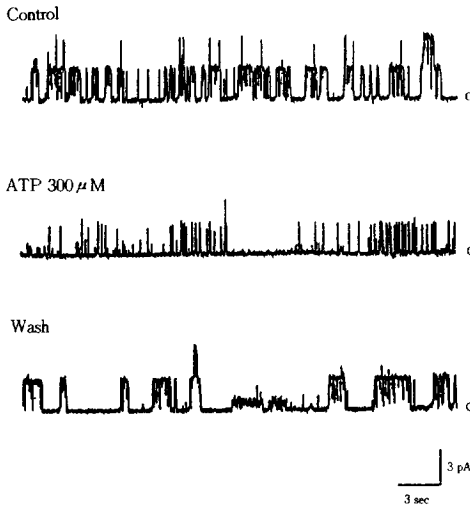
Fig 2. Current-voltage relations for K(ATP) channels in symmetrical 200mM KCl. Unitary currents were measured at various voltages in the solution containing 1mM EGTA, 10mM HEPES-NMDG, 200mM KCl, pH 7.2. Data points are means of 3 experiments. Slope conductance at reversal potential is 60.1. Error bars: not shown are smaller than symbols. Solid line is drawn by eye.

였을 때 그 통로의 활성이 감소하며, ATP를 씻어냈을 때 활성이 회복되고 있음을 보여주고 있다. Fig 3B는 ATP 10~200 μM을 적용하였을 때의 통로활성도는 ATP에 의하여 농도의 존적으로 통로의 활성도가 감소됨을 보여주고 있다.

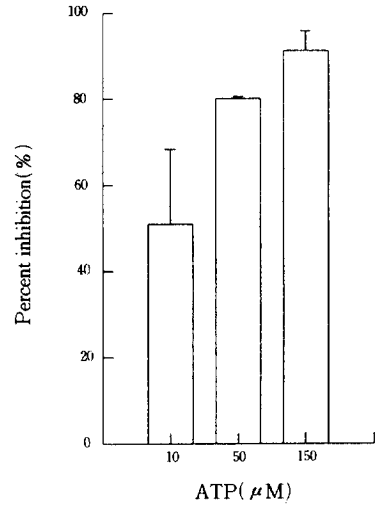
**K(ATP)통로의 이온 선택성:** 안쪽과 바깥쪽의 KCl 농도를 변화시켜가면서 단일이온통로의 전류와 전압과의 관계를 구한 그래프를 표시한 것이 Fig 4에 나타나 있다. 바깥쪽의 KCl 농도를 감소시키면 그래프와 역전 전압이 그래프의 왼쪽으로 이동하고 안쪽의 KCl 농도를 감소시키면 그 반대의 현상이 나타났다. 이렇게 하여 얻어진 역전전압이 Table 1에 나와 있다. "K<sup>+</sup>에 선택성이 있는" 통로일 경우의 이론적인 역전전압은 Nernst 공식에 의하여 구해지는데 Table 1에서 처럼 이론적인 역전전압과 각각의 실험조건에서 얻어진 역전전압이 서로 비슷하여 이 통로가 K<sup>+</sup>이온에 대한 선택성이 높음을 보여주고 있다. Fig 4B는 역전전압과 안쪽의 K<sup>+</sup> 농도에 대한 바깥쪽의 K<sup>+</sup> 농도의 상용로그값을 그래프로 표시한 것으로 K<sup>+</sup> 농도비가 10배 변할 때 역전전압이 47.8mV 변함을 알 수 있다.

통로의 이온에 대한 투과도는 Goldman-Hodgkin-Katz식<sup>17</sup>에 의해서 추정할 수가 있는데 이때 이온이 통로를 통과하는 동안 통로안팎의 전압차가 이온의 위치와 상관없이 일정하게 그 이온에 부하된다는 가정을 하고

A



B



**Fig 3.** Concentration-dependent and reversible inhibition of K(ATP) channels by internal ATP. A, ATP(300 μM) reversibly inhibited the K(ATP) channel from frog skeletal muscle. Currents were recorded at 0 mV in 40 mM external and 200mM internal KCl. Outward currents are plotted upward. The channel activities, quantified by measuring NPo for 1.5~3 minutes, during control period, in the presence of 300 μM ATP and after washout were 0.47, 0.12 and 0.42, respectively. Stock disodium ATP (pH 7.0 with KOH) was added to the cytoplasmic side and washed out by perfusing the chamber(1.2ml) with 12 ml of 200mM KCl buffer solution. B, Dose-dependent inhibition of the activity of K(ATP) channel by 10, 50 and 150 μM internal ATP. Averages of 3, 2 and 6 experiments, respectively.

**Table 1.** Reversal potentials at various potassium gradients

[K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> /[K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> *	Reversal potential(n)	Theoretical
40/200mM	-30.8±2.9mV (3)	-34.5mV
200/200	-1.1±2.7 (3)	0
200/100	10.5 (1)	15.3
200/40	30.6 (1)	34.5

\* Activity was used in actual calculation.

있다(constant field assumption). 역전전압이나 이에 가까운 전압에서는 이 가정이 유효하다고 보면 우리는 K(ATP)통로의 K<sup>+</sup>에 대한 투과도를 아래의 식에 의해서 계산해 낼 수 있다.

$$I = \frac{F^2 \cdot P_k \cdot V}{R \cdot T} \cdot \frac{([K^+]_i \cdot \exp(F \cdot V / R \cdot T) - [K^+]_o)}{\exp(F \cdot V / R \cdot T) - 1} \quad (1)$$

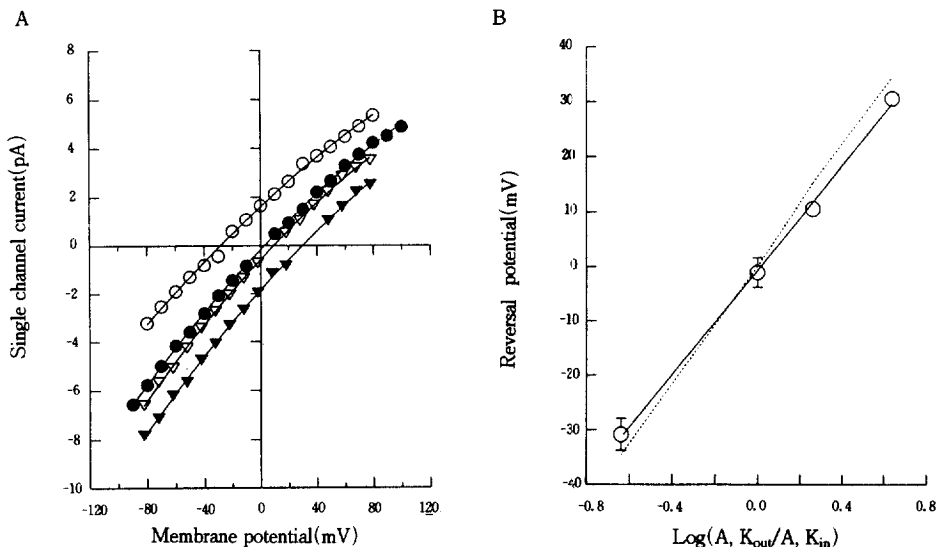
여기서 I는 측정된 전류이고 P<sub>k</sub>는 K<sup>+</sup>에 대한 투과도(permeability), F, R, T는 각각 Faraday 상수, 가스 상수, 절대온도를 나타내며, K<sup>+</sup>의 활성도(activity)는 mM로 표기하였다. 통로 안팎에 40/200, 200/200 mM의 KCl이 존재하는 조건에서 측정된 전류의 값들을 식(1)에 대입하여 non-linear least square regression을 하여

최적의 P<sub>k</sub> 값을 구했다. 얻어진 P<sub>k</sub> 값은 40/200mM인 경우, 1.521×10<sup>-13</sup> Cm<sup>3</sup>/sec이었고, 200/200mM에서는 1.103×10<sup>-13</sup> Cm<sup>3</sup>/sec 이었다. 한편 역전전압 주위에서 측정된 slope conductance는 통로 안팎의 KCl 농도가 40/200, 200/200 mM일 때 각각 59.7±0.71(n=3), 60.01±0.43(n=3)pS 이었다.

**알칼리금속의 양이온에 대한 투과도의 비교 :** 알칼리 금속의 양이온(group Ia cation)에 대한 이온통로의 상대적인 투과도는 통로의 성질을 비교하는데 널리 이용되고 있는 지표이다. 본 연구에서는 통로 안쪽에 200mM의 KCl이, 통로 바깥쪽에는 200mM의 NaCl, CsCl, LiCl, RbCl, KCl이 있는 상태에서 측정된 전류와 전압과의 관계(bi-ionic experiment)에서 역전전압을 구하고 아래와 같은 Goldman-Hodgkin-Katz식으로 K<sup>+</sup>에 대한 각 이온들의 투과도의 비율을 구했다.<sup>17</sup>

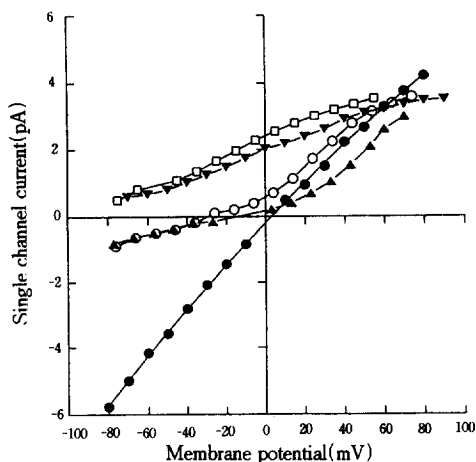
$$V_{rev} = -(R \cdot T / F) \cdot \ln \frac{P_t \cdot [T^+]_o + P_{cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_k \cdot [K^+]_i + P_{cl} \cdot [Cl^-]_o} \quad (2)$$

여기서 RT/F는 22°C에서 25.4로 계산하였고 아랫첨자 o, i는 각각 outside와 inside를 뜻한다. 또 P<sub>k</sub>, P<sub>t</sub>, P<sub>cl</sub>은 K<sup>+</sup>, test cation, Cl<sup>-</sup>에 대한 투과도(permeability)를

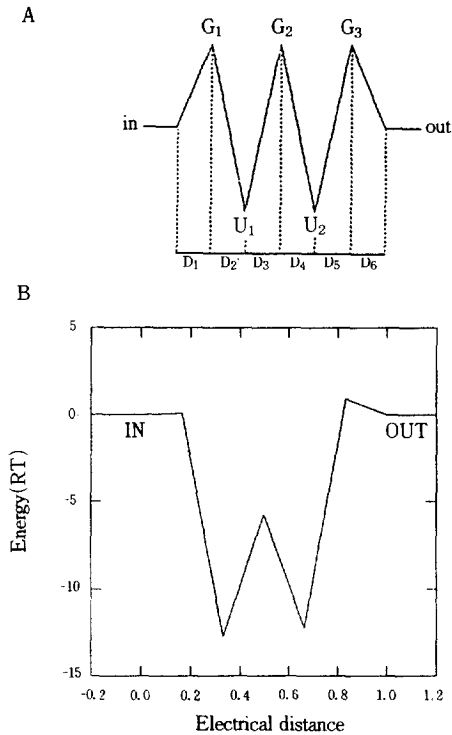


**Fig 4.** A, Single channel current-voltage relations at various external and internal  $K^+$  concentrations. The concentrations of external/internal KCl(mM) are 40/200( $\circ$ ,  $n=3$ ), 200/200( $\bullet$ ,  $n=3$ ), 200/100( $\nabla$ ,  $n=1$ ) and 200/40 ( $\blacktriangledown$ ,  $n=1$ ). Solid lines are drawn by eyes. B, Relation between reversal potentials and  $K^+$  concentration. Reversal potentials obtained from the experiment shown in Fig 5, are plotted against the activity ratio of external  $K^+$ ,  $A$  ( $K_{out}$ ), to internal  $K^+$ ,  $A$  ( $K_{in}$ ). Error bars (S.E.M.) not shown are smaller than symbols. Solid line is drawn by linear regression (correlation coefficient=0.999). Dashed line is the prediction by Nernst Equation for  $K^+$  selective electrode.

뜻한다. 그리고  $K^+$ (ATP) 통로는  $K^+$ 에 대한 투과도가 Cl보다 월등히 높다고 여겨지기 때문에 (Fig 4A) 실제의 계산에서는  $P_{Cl}$ 값은 무시하였다. Fig 5는 이러한 일련의 실험의 결과를 종합하여 보여주는 전류-전압 그래프이다. 이론적으로는 이렇게 통로의 안쪽과 바깥쪽에 동일한 200mM의 이온이 존재하는 상태에서는 바깥쪽 test ion의 투과도가  $K^+$ 과 비슷하다면 역전전압이 0 mV에 가깝고, test ion이 투과도가 0이라면 역전전압은 마이너스 무한대로 접근하며 역전전압은 존재하지 않게 된다. Fig 5에서는 test ion이  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ 인 경우 역전전압이  $-18.6 \pm 0.81$  ( $n=3$ ),  $-33.7 \pm 2.1$  ( $n=4$ ) mV로  $P_{Rb}/P_K$ 값이 비교적 크고 외삼으로 구한  $Na^+$ 과  $Li^+$ 에 대한 역전전압은 각각  $-90.8 \pm 3.9$  ( $n=5$ ),  $-96.5 \pm 2.94$  ( $n=5$ ) mV로 낮아  $P_{Na}/P_K$ ,  $P_{Li}/P_K$ 의 값이 상대적으로 작고 투과도가 낮음을 알 수 있다. K(ATP)통로의 알칼리금속이온에 대한 투과도를 큰 순서로 나열하면,  $K(1) > Rb(0.49) > Cs(0.27) > Na(0.027) > Li(0.021)$ 이며 팔호안의 숫자는 식(2)에 의해 구해진  $K^+$ 에 대한 상대적인 투과도이다. 이 투과도의 순서는 Eisenman<sup>22</sup>이 제시한 투과도 크기 순서의 하나로 selectivity sequence IV에 해당한다. 비슷한  $P_{Na}/P_K$  값이 insulin-secreting cell의 K(ATP)통로에서 (0.025)<sup>23</sup> 그리고 개구리 골격근의 K



**Fig 5.** Current voltage relations of K(ATP) channels under nearly bi-ionic conditions. Alkali cations (200mM) in extracellular side are NaCl( $\square$ ,  $n=5$ ), LiCl( $\blacktriangledown$ ,  $n=5$ ), CsCl( $\circ$ ,  $n=4$ ), RbCl( $\blacktriangle$ ,  $n=3$ ) and KCl( $\bullet$ ,  $n=3$ ) with 200mM KCl in intracellular side. The respective reversal potentials are:  $-90.8 \pm 3.88$ ,  $-96.5 \pm 2.94$ ,  $-33.68 \pm 2.1$ ,  $-18.6 \pm 0.81$  mV, and  $-1.1 \pm 2.7$ . K(ATP) channels were incorporated in 200/0mM KCl gradient. Then, the salt concentration of test ions were raised to 200mM by adding 3M stock solutions.



**Fig 6.** Best-fit energy barrier profiles for  $K^+$  that predict permeation through K(ATP) channels. A, Parameters of the three barrier two site model for an unoccupied channel at 0 mV :  $G_1$ ,  $G_2$  and  $G_3$ , peak energies ;  $U_1$  and  $U_2$ , well energies ;  $D_1 \sim D_6$ , fractions of electrical distances with respect to the inner and outer solutions. B, Best-fit energy profiles of K(ATP) channel at 0 mV for  $K^+$  obtained from the data points shown in C. The best fit parameters for  $K^+$  obtained from the data points shown in C. The best fit parameters for  $K^+$  are :  $G_1=0.09$ ,  $G_2=-5.76$ ,  $G_3=0.93$ ,  $U_1=-13.14$ ,  $U_2=-12.85$ ,  $D_1=0.1667$ ,  $D_2=0.1636$ ,  $D_3=0.1667$ ,  $D_4=0.1666$ ,  $D_5=0.1713$  and  $D_6=0.1651$ . The solution reference state is 55.5 M.

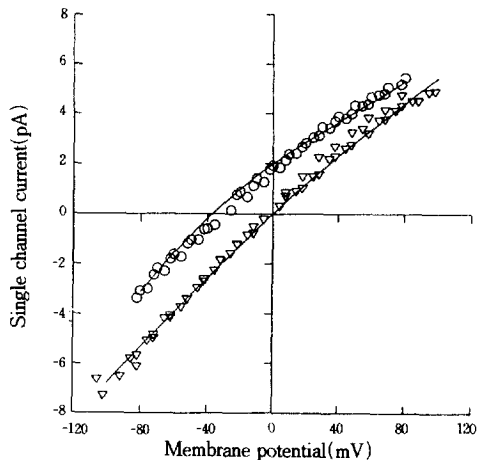
(ATP)통로에서도 보고되었다(0.015).<sup>3</sup>

**$K^+$  통과에 대한 3-barrier 2-site model :** 지금까지 K(ATP)통로의  $K^+$  이온의 통과에 대한 energy profile은 3B2S model과 통로안에는 이온이 하나만 머물수 있다는 단일이온 점유모델(single ion occupancy model)에 의하여 시도되었다.<sup>2,23</sup> 재료 및 방법에서 설명된 것처럼, 본 연구에서는 3B2S model과 multiple occupancy model을 시도하였으며 이는 Eyring의 rate theory에 근거하여 Hille와 Schwarz에 의하여 이미  $K^+$  통로에 적용된 것이기도 하다.<sup>15</sup>

Fig 6B에 나오는 다이어그램은 Fig 7에 나온 모든 측

정치들을 동시에 non-linear least square fitting을 하여 얻은 일련의 파라미터 값에 근거하여 그린것이다. K(ATP)통로의  $K^+$ 에 대한 energy barrier profile은 봉우리들이 전반적으로 낮고 특히 가운데 봉우리의 값이 낮으며(-5.76 RT), 두 골짜기의 값은 더 낮으며 서로 비슷하다(-13.1, -12.9 RT). 안쪽의 봉우리와 바깥쪽 봉우리의 energy값은 큰 차이가 없으며(0.1, 0.93 RT), 가운데 봉우리의 값이 낮아 이 통로의 energy profile이 2-barrier 1-site model과 비슷하게 나타나고 있다. 또한 가운데 봉우리는 통로에 부하되는 전압경사의 가운데에 위치하고 두 well이 있는 곳의 위치는 안과 바깥에서 각각 1/3이 되는 지점이라는 것도 알 수 있다.

한편 3B2S model에 의하여 구해진 값들은 Fig 7의 실선처럼 측정치들이 보여주는 기울기에서는 다소 벗어나지만 전체적으로는 두 조건에서 전류와 전압과의 관계를 비교적 정확하게 예측하고 있다.



**Fig 7.** Comparison of current-voltage relations obtained from experiments (symbols) and those predicted by three-barrier two-site model with best fit parameters shown in Fig 6B (solid lines).  $\circ$  : 40mM external/200mM internal ;  $\nabla$  : 200mM symmetrical KCl.

## 고 찰

본 연구에서는 개구리 골격근의 K(ATP)통로를 평지방막에 재구성하여 전류-전압의 관계,  $K^+$ 이온에 대한 선택성, 알칼리금속류 이온에 대한 상대적인 투과도 그리고 3B2S model을 이용하여  $K^+$  이온의 통과에 대한 energy profile을 구하였다.

**단일 K(ATP)통로의 일반적 성질 :** 평지방막에 융합된 개구리 골격근 K(ATP)통로의 conductance는 200mM KCl 대칭용액에서 60pS이었다. Patch rec-

ording에 의한 개구리 골격근의 경우에는 53 pS(140mM KCl 대칭용액)<sup>24</sup>, 43 pS (60/120 KCl 용액)<sup>3</sup>, 54.8 pS (100mM KCl 대칭용액)<sup>25</sup>으로 나타나고 있으며, 이는 사용된 통로안팎의 KCl의 농도를 고려할 때 본 실험의 평지방막에서 기록된 K(ATP)통로의 conductance는 patch recording에서 얻어진 값들과 일치되고 있다. 그러나 140mM KCl 대칭용액에서 얻어진 심장근(80 pS)<sup>1</sup>, 사슴(120 pS)<sup>26</sup>, 마우스(74 pS)<sup>20</sup>의 골격근의 K(ATP)통로의 conductance 보다는 낮다. 이는 골격근 K(ATP)통로의 conductance에 있어서도 종과 조직간의 차이가 있음을 알 수 있다.

K(ATP)통로임을 확인하는 가장 직접적인 방법은 ATP에 의하여 활성이 억제되는 것을 확인하는 것이다. 본 연구에서는 10~500 μM의 ATP를 통로의 안쪽에 적용하였을 때 농도의존적으로 활성이 감소됨을 확인하였고, K<sub>i</sub>의 값은 50 μM 이하인 것으로 보인다. 이는 개구리 골격근의 split-fiber bleb에서 기록된 K(ATP)통로의 경우와 비슷하다.<sup>24</sup> 또한 ATP의 억제작용은 Mg<sup>2+</sup>이 없는 상태에서도 관찰되어 이는 다른 단백질을 인산화시켜서가 아니라 ATP 자체의 직접적인 작용임을 확인할 수 있었다.<sup>9</sup>

다수의 이온통로들의 활성이 막전압의존성인데 반하여 K(ATP)통로의 활성도는 막전압에 대한 의존성을 보이지 않았다. 이는 Vivadou 등<sup>24</sup>의 보고와도 일치한다. 그러나 Fig 1에서 처럼 burst기간중의 여담이는 음전압에서 더욱 심하게 나타났다. 이러한 burst내의 여담이에 대하여는 마우스골격근에서 자세하게 조사되었는데<sup>20</sup>, 양전압에서 mean open time이 길게 나타나 본 연구의 관찰과 일치한다. 이러한 사실은 통로안에 일종의 voltage-sensitive gate가 있음을 암시하고 있으며 이를 whole cell voltage clamp 등 다른 방법으로 확인하는 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

이온의 투과성과 선택성: 통로안팎의 KCl농도경사를 달리하며 관찰한 역전전압은 Nernst equation에 의하여 예측되는 역전전압에 비교적 가깝게 나타나 K(ATP)통로는 K<sup>+</sup>에 대한 선택성이 높은 통로로 여겨진다. 이 자료를 Goldman-Hodgkin-Katz식<sup>17</sup> 대입하여 얻어지는 P<sub>o</sub>/P<sub>k</sub>의 값은 0.049이다. 본 연구에서는 얻어진 P<sub>o</sub>/P<sub>k</sub> 값이 실험오차에서 오는 것으로 보고 bi-ionic experiment의 자료를 처리하는 과정에서는 무시하였다. 그러나 K(ATP)통로가 음이온에 대한 투과성이 있느냐 하는 것에 대하여는 별도의 체계적인 연구가 있어야 할 것이다.

식(1)에서 얻어진 200mM KCl 대칭용액에서 얻어진 K<sup>+</sup> 이온에 대한 K(ATP)통로의 투과도(permeability)

는 1.13cm<sup>3</sup>/sec로, 이는 핵장 베타세포(0.98 × 10<sup>-13</sup>cm<sup>3</sup>/sec, 140mM KCl 대칭용액)<sup>11</sup> 심실근세포(1.4 × 10<sup>-13</sup> cm<sup>3</sup>/sec, 150mM KCl 대칭용액)<sup>27</sup> K(ATP)통로에서 얻어진 값과 유사하다. 한편 Fig 4에서의 기울기 47.8 mV는 Goldman-Hodgkin-Katz식에 의해서 예측되는 기울기의 값 58.5 mV보다 작으며 또 식(1)에서 계산되는 투과도가 K<sup>+</sup> 농도경사에 따라 다르게 계산되고 있다(Fig 4A 참조). 이러한 실험자료는 Goldman-Hodgkin-Katz식<sup>17</sup>의 가정으로 되어 있는 constant permeability에서 벗어나고 있음을 보여주고 있다.<sup>28</sup>

Bi-ionic experiment와 식(2)로부터 계산되는 1가 알칼리금속 양이온의 K<sup>+</sup> 이온에 대한 상대적인 투과도는 Eisenman의 selectivity sequence IV에 해당한다. Eisenman의 selectivity sequence는 이온이 결합하는 음이온성 부위의 위치에 가해지는 electrostatic field strength와 이온들의 dehydration energy 등을 고려한 것인데 sequence IV는 이온의 결합부위에 비교적 낮은 electrostatic field strength가 부하되는 경우의 sequence이다.<sup>28</sup> 동일한 selectivity sequence는 개구리 골격근의 또 다른 종류의 K<sup>+</sup>통로인 delayed rectifier에서도 보고가 된 적이 있다.<sup>29</sup>

본 연구에서는 K<sup>+</sup>이온이 통로를 통과하는 과정중의 이온과 통로간의 상호작용을 3B2S, multiple occupancy model을 이용하여 설명하고자 시도하였으며<sup>15</sup>, 이 모델은 측정치를 비교적 잘 예측하고 있다(Fig 7 실선). 컴퓨터를 이용한 계산에 의해서 구해진 최적의 파라미터 값들로 그려진 에너지 다이어그램(Fig 6B)에서 골짜기의 에너지값들의 경우에는 patch recording에서 얻어진 값<sup>3</sup>보다 전반적으로 3~7RT 만큼 낮게 나타나는 경향을 보였으며 특히 차이가 나는 점은 본 연구에서는 가운데 봉우리의 에너지값이 아주 낮게 나타났다는 점이다. 얻어진 다이어그램의 전체적인 경향은 인슐린을 분비하는 cell-line의 K(ATP)통로에서 얻어진 것과 흡사하였다.<sup>23</sup>

본 연구에서 얻어진 파라미터값은 양전압에서의 휘어짐 등 전류전압곡선의 기울기를 예측하는데는 다소 오차를 보이고 있다(특히 40/200mM KCl 용액에서). 그러나 이런 오차가 model의 가정이 실제와 맞지 않지 때문에 오는 것인지는 측정치를 더 늘리고 동시에 curve fitting 작업을 더 해보아야 알 수 있을 것으로 보인다. 궁극적으로 이런 modelling의 목적은 알칼리금속이온들에 대한 전류와 전압의 관계와 K<sup>+</sup>에 대한 상대적인 투과도의 예측을 가능하게 하며 역으로 전류와 전압의 관계를 근거로 하여 이온통로와 이온간의 상호작용을 분자수준에서 설명하는데 있다고 하겠다.

골격근 K(ATP)통로의 생리적인 기능: 골격근세포의 ATP농도는 creatine phosphate와 creatine kinase에 의하



여 거의 일정하게 유지되고 있음을 고려할 때 골격근에서 ATP에 의하여 활성이 조절되는 K(ATP)통로의 생리적 기능을 찾기가 쉽지 않다. 한편 Spruce 등<sup>3</sup>과 Vivadou 등<sup>24</sup>의 보고는 K(ATP)통로가 근세포의 표면막(sarcolemma)에 위치하고 있음을 암시하고 있다. 현재로서는 극도의 근육피로(rigor)를 유발시켰을 때 증가되는 K<sup>+</sup>전류가 바로 K(ATP)통로의 활성화 때문일 것이라고 짐작하고 있을 뿐이다.<sup>30</sup>

골격근 세포내에서의 ATP농도는 약 5mM인 것으로 조사되어 있고<sup>31,32</sup>, 반복된 근육자극으로 인한 피로시에도 그 농도가 반정도로 감소되는 것으로 알려져 있다.<sup>33</sup> 따라서 본 연구와 Spruce 등<sup>3,20</sup>, Vivadou 등<sup>24</sup>의 결과에서 보인 ATP의 억제작용을 감안하면 근육세포에서 대부분의 K(ATP)통로는 그 활성이 억압된 상태로 있어야 할 것이다. 그러나 whole cell recording에 의하여 기록된 경우 심근세포나 췌장세포에서는 patch recording에서보다 ATP에 대한 감수성이 떨어짐을 보고하고 있어<sup>27</sup>, 결국 골격근세포에서 K(ATP)의 활성을 조절하는 인자는 ATP뿐만 아니라 ADP, pH, 2가 양이온 등 다른 인자들이 함께 혹은 단독으로 관여하고 있을 것으로 여겨진다.<sup>34,35</sup> 보다 그럴듯한 또 다른 가능성은 K(ATP)통로가 있는 근세포막 주위의 ATP농도는 세포질에서 보다 낮으며 세포질과 분리되어 ATPase의 조절하에 있다는 것인데 이를 직접적으로 증명할 수 있는 연구가 요구되고 있다.

한편 개구리, 랫드, 사람의 골격근의 세포막에서 patch recording시에 가장 흔히 분리되는 통로가 K(ATP)통로인 것으로 알려지고 있어<sup>3,20,24,26</sup>, K(ATP)통로는 골격근에서 중요한 기능을 담당하고 있을 것으로 보인다. 그러나 현재까지는 K(ATP)통로를 통하여 심한 근육피로시에 K<sup>+</sup>이 유출될 것이라는 짐작외에는 생리적 기능에 대한 자료가 없어 이 역시 앞으로 많은 연구가 필요한 분야라 하겠다.

## 결 론

평지방막기법을 이용하여 개구리 골격근의 단일 ATP-sensitive K<sup>+</sup>통로의 성질을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 단일 ATP-sensitive K<sup>+</sup>통로의 전류-전압의 관계는 200mM KCl 대칭용액에서 거의 직선으로 나타났으며 양전압하에서는 약간의 휘어짐이 보였다. 역전전압에서의 slope conductance는  $60.1 \pm 0.43 \text{ pS}$  ( $n=3$ )이었다. 통로의 활성화도는  $\pm 50 \text{ mV}$  범위에서 두드러진 막전압의존성은 없었으나 음전압하에서는 burst내에서의 여담이 더 잦았다.

2. 통로안팎의 KCl농도가 40/200, 200/200, 200/100, 200/40mM일때의 역전전압은 각각  $30.8 \pm 2.9$  ( $n=3$ ),  $-1.1 \pm 2.7$  ( $n=3$ ),  $10.5$ ,  $30.6 \text{ mV}$ 이었다. 이러한 역전전압의 변화는 KCl의 농도비가 10배 변할 때  $47.8 \text{ mV}$ 이었다.

3. 통로 안쪽에 200mM KCl, 바깥쪽에 각각 200mM의 KCl, RbCl, CsCl, NaCl, LiCl 등이 존재하는 상태에서 얻어진 역전전압은 각각  $-18.6 \pm 0.8$  ( $n=3$ ),  $-33.7 \pm 2.1$  ( $n=4$ ),  $-90.8 \pm 3.9$  ( $n=5$ ),  $-96.5 \pm 2.94$  ( $n=5$ ) mV 이었다. 이때 K<sup>+</sup>에 대한 각 이온의 상대적인 투과도는  $K(1) > Rb(0.49) > Cs(0.27) > Na(0.027) > Li(0.021)$  순이었다.

4. 측정된 전류와 전압의 관계를 이용한 modelling으로 부터 K<sup>+</sup> 이온이 ATP-sensitive K<sup>+</sup>통로를 통과하는 과정은 3-barrier 2-site multiple occupancy model에 의하여 유의성있게 설명이 될 수 있음을 확인하였다.

이상의 결과로부터 평지방막을 이용하여 기록된 골격근의 ATP-sensitive K<sup>+</sup>통로는 patch recording에 의하여 기록된 통로와 동일한 단일이온통로의 성상을 보이며 이 통로의 이온 선택성이 Eisenman의 selectivity sequence IV에 해당하며 또한 이러한 modelling 등의 실험 결과는 이 통로가 multi-ion pore임을 암시하고 있다.

사사 : 본 연구를 수행하는 동안 물질양면으로 도와주신 Dr. Edward Moczydlowski, 채수완, 홍성근 박사님께 진심으로 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 1983 ; 305 : 147~148.
2. Trube G, Hescheler J. Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane : ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Archiv* 1984 ; 401 : 178 ~ 184.
3. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Studies of the unitary properties of ATP-dependent potassium channels of frog skeletal muscle, *J Physiol* 1987 ; 382 : 213~237.
4. Ryu PD, Moczydlowski E. Ionic selectivity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels from frog skeletal muscle incorporated into planar bilayers. *Biophys J* 1991 ; 59 : 76a.
5. Standen NB, Quale JM, Davies NW, et al. Hyperpo-

- larizing vasodilators activate ATP-sensitive  $K^+$  channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989 ; 245 : 177~180.
6. Cook DL, Hales CM. Intracellular ATP directly blocks  $K$  channels in pancreatic  $\beta$  -cells. *Nature* 1984 ; 311 : 269~271.
  7. Peterson OH, Dunne MJ. Regulation of  $K^+$  channels plays a crucial role in control of insulin secretion. *Pflugers Archiv* 1989 ; 414 supplement 1 : S115~120.
  8. Findaly IE, Deroubaix E, Guiraudou P, et al. Effects of activation of ATP-sensitive  $K^+$  channels in mammalian ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989 ; 257 : H151~1559.
  9. Ashcroft SJH, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive  $K$  channels. *Cellular Signalling* 1990 ; 2 : 197~214.
  10. Rorsman P, Trube G. Biophysics and physiology of ATP-regulated  $K^+$  channels(KATP). In : *Potassium channels : Structure, classification and therapeutic potential*. ed. Cook. N.S. 1990 ; 96 ~ 116. Ellis Horwood, Chichester, UK.
  11. Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP. Rubidium and sodium permeability of the ATP-sensitive  $K^+$  channel in single rat pancreatic  $\beta$  -cells. *J Physiol* 1989 ; 408 : 413~430.
  12. Guo X, Uehara A, Ravindran A, et al. Kinetic basis for insensitivity to tetrodotoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry* 1987 ; 26 : 7546~7556.
  13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein binding. *Anal Biochem* 1976 ; 72 : 248~254.
  14. Montal M, Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972 ; 69 : 3651~3566.
  15. Hille B, Schwarz W. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* 1978 ; 72 : 409~442.
  16. Alvarez O, Villarroel A, Eisenman G. A general procedure to calculate ion currents from energy profiles and energy profiles from ion currents in a multi-barrier multi-site multi-occupancy channel model. *Methods in Enzymol* 1992 (accepted)
  17. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949 ; 108 : 37~77.
  18. Robinson RA, Stokes RH. *Electrolyte solutions*. 1959, Butterworth & Co., Ltd., London.
  19. Ryu PD, Park JB. Reconstitution of single potassium channels of skeletal muscle into planar lipid bilayer. *Abstr. 44th Korean Physiol. Soc. Meeting 1992* : 52.
  20. Woll KH, Lonnendonker U, Neumcke B. ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle : Different modes of blockage by internal cations, ATP and tolbutamide. *Pflugers Archiv* 1989 ; 414 : 622~628.
  21. Parent L, Coronado R. Reconstitution of the ATP-sensitive potassium channel of skeletal muscle-Activation by a G protein-dependent process. *J Gen Physiol* 1989 ; 94 : 445~463.
  22. Eisenman G. Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys J* 1969 ; 2(Suppl.) : 259~323.
  23. Ciani S, Ribalet B. Ion permeation and rectification in ATP-sensitive channels from insulin-secreting cells(RINm5F) : Effects of  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Mg^{+}$ . *J Membrane Biol* 1988 ; 103 : 171~180.
  24. Vivadou MB, Arnoult C, Villaz M. Skeletal muscle ATP-sensitive  $K^+$  channels recorded from sarcolemmal blebs of split fiber : ATP inhibition is reduced by magnesium and ATP. *J Membrane Biol* 1991 ; 122 : 165~175.
  25. Krippeit-Dreus P, Lonnendonker U. Dual effects of calcium on ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle. *Biochim, Biophys Acta* 1992 ; 1108 : 119~122.
  26. Quasthoff S, Franke C, Hatt H, et al. Two different types of potassium channels in human skeletal muscle activated by potassium channel openers. *Neurosci Lett* 1990 ; 119 : 191~194.
  27. Kakei M, Noma K, Shibasaki T. Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in Guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1985 ; 363 : 441~462.
  28. Eisenman G, Horn R. Ionic selectivity revisited : The role of kinetic and equilibrium processes in ion

- permeation through channels. *J Membrane Biol* 1983 ; 76 : 197~225.
29. Gay LA, Stanfield PR. The selectivity of the delayed potassium conductance of frog skeletal muscle fibers. *Pflugers Archiv* 1978 ; 378 : 178~179.
  30. Fink R, Luttgau HC. An evaluation of the membrane constants and the potassium conductance in metabolically exhausted muscle fibres. *J Physiol* 1976 ; 263 : 215~238.
  31. Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature* 1978 ; 274 : 861~866.
  32. Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J Physiol* 1980 ; 299 : 465~484.
  33. Bigland-Ritchie B, Woods JJ. Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue. *Muscle and Nerve* 1984 ; 7 : 691~699.
  34. Davies NW. Modulation of ATP-sensitive K channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature* 1990 ; 343 : 375~377.
  35. Tung RT, Kurachi Y. On the mechanism of nucleotide diphosphate activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 1991 ; 437 : 239~256.
-