

## ADP에 의한 생쥐 난자의 외향전류 증가 효과

한재희<sup>1</sup> · 박홍기<sup>1</sup> · 강다원<sup>1</sup> · 이상미<sup>1</sup> · 이상호<sup>2</sup> · 배인하<sup>3</sup> · 홍성근<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 의과대학 생리학교실, <sup>2</sup>흉부외과학교실, <sup>3</sup>성신여대 자연과학대학 생물학과

### Internal Perfusion of ADP in Mouse Oocytes Increases Outward K<sup>+</sup> Currents

Jae-Hee Han<sup>1</sup>, Hong-Gi Park<sup>1</sup>, Da-Won Kang<sup>1</sup>, Sang-Mi Yi<sup>1</sup>, Sang-Ho Lee<sup>2</sup>,  
In-Ha Bae<sup>3</sup> and Seong-Geun Hong<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Departments of Physiology and <sup>2</sup>Thoracic Surgery, Gyeongsang National University College of Medicine, Chinju,

<sup>3</sup>Deaprtment of Biology, Sungshin Woman University College of Natural Sciences, Seoul, Korea

**요약** : 생쥐 난자의 외향전류에 대한 ADP와 ATP의 효과를 관찰하였다. 6주령 이상의 ICR 계통 생쥐를 PMSG와 hCG로 과배란을 유도하여 난관에서 채취한 난자를 대상으로 whole cell voltage clamp 기법과 세포내 관류기법을 함께 적용하였다. 막전압을 -60 mV로 고정하고 20 mV 간격으로 300 ms동안 저분극 pulse에 의해 관찰되는 이온전류를 기록하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 생쥐 난자의 외향전류는 0 mV부터 나타나기 시작하여 20 mV 이후부터 크게 상승하는 양상을 보였다. 이 외향전류는 세포내 관류기법에 의하여 교환된 5 mM ADP에 의하여 5분 후 대조군보다 150% 이상 증가하였으며 outward rectification도 발달하였다. ADP에 의하여 증가된 외향전류는 모든 전압대에서 ATP에 의해 억제되어 외향전류 성분이 ADP와 ATP에 의하여 조절됨을 시사하였다. 반면 Ca<sup>2+</sup> 전류 성분에 대한 ADP와 ATP의 유의한 효과는 관찰되지 않았다. G 단백질 관련 여부를 조사하기 위하여 주어진 세포내 GTP (1 mM)는 Ca<sup>2+</sup> 전류를 증가시켰으나 외향 전류의 전도도는 감소시켰다. 이러한 결과는 생쥐 난자의 전압-의존성 이온전류가 ATP가 요구되는 세포 조절기전과 관련된 것으로 추측되며 GTP에 의한 내향 및 외향전류의 변화는 통로 조절과정에 G-protein 관련 통로 조절기전이 존재하는 것으로 추측된다.

**ABSTRACT** : To find the mechanism underlying the ADP-induced increase in the outward current in ovulated mouse oocytes, we examined changes in voltage-dependent currents using the whole cell voltage clamp technique and the internal perfusion technique. Eggs were collected from the oviduct of superovulated mice with PMSG and hCG. Membrane potential was held at -60 mV (or -80 mV in the case of recording Ca<sup>2+</sup> currents) and step depolarizations or hyperpolarizations were applied for 300 ms. By step depolarizations, outward currents comprising steady-state and time-dependent components were elicited. They were generated in response to the positive potential more than 20 mV with severe outward rectification and were blocked by external TEA, a specific K<sup>+</sup> channel blocker, suggesting that they be carried via K<sup>+</sup> channels. Internally-perfused 5 mM ADP gradually increased outward K<sup>+</sup> currents (IK) 1 min after perfusion of ADP and reached slowly to maximum (150~170%) 5 min later over the positive potential range, implying that ADP might not be acted directly to the K<sup>+</sup> channels. IK were decreased by 5 mM ATP without affecting the steady-state component of outward current. In contrast to the effect of ADP and ATP on IK, both effect of ATP and ADP on inward Ca<sup>2+</sup> currents (ICa) could not be detected due to the continuous decrease in current amplitudes with time-lapse ("run-down" phenomena). To check if there is a G protein-involved regulation in the ionic current of mouse oocytes, 1 mM GTP was applied to the cytoplasmic side, and the outward current and inward currents were recorded. ICa was promptly increased in the presence of GTP whereas IK was not changed. From these results, it is concluded that the ATP-dependent regulation is likely linked in the ADP-induced increase in the outward K<sup>+</sup> current, and G protein-involved cellular signalling might affect ion channels carrying Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> in mouse oocytes.

**Key words** : ADP, GTP, ATP, Mouse oocytes, Whole cell voltage clamp, Internal perfusion

## 서 론

난자에서 수정이 이루어질 때 주기적으로 관찰되는 과분극 반응 (Hyperpolarizing response, HR)은(Miyazaki & Igusa, 1981) 세포내 Ca<sup>2+</sup>이 증가하면서 활성화 되는 외향전류에 의하여 이루어진다고 알려져 있다 (Igusa & Miyazaki, 1986; Igusa et al., 1983; Miyazaki & Igusa, 1982). 최근 hamster 난자에서 과분극 반응에 기여하는 Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> 통로 (KCa

This study was supported by the grant from KOSEF (1999 -2-204-001-3).

†교신저자: 경남 진주시 칠암동 90, 경상대학교 의과대학 생리학교실 (우) 660-751 (전) 055-751-8721 (팩) 055-759-0169 e-mail: hong149@gsnp.snu.ac.kr

통로)가 기록되었으며 세포내  $Ca^{2+}$  이외에도 ADP에 의해서도 이 통로의 활동이 증가한다고 보고되었다 (Yoshida et al., 1990). 이에 반하여 생쥐 난자에서는 과분극 반응에 대한 관찰 (Igusa et al., 1983)과 생쥐 난자의 내향전류의 성상에 관한 연구 (Okamoto et al., 1977; Peres, 1986; Peres, 1987)에 의하여 외향전류가 이동할 수 있는 통로가 있을 것으로 추측되고 있는 정도이다. 더구나 세포내  $Ca^{2+}$ 과 ADP에 의해 조절되는 KCa 통로는 물론 외향전류에 관한 성상은 아직 분명하지 않다. 다만 생쥐 난자에서 외향전류에 관한 지금까지의 추정 은 세포막 전압에 의해 통로 개폐가 조절되는 voltage-sensitive  $K^+$  통로에 관한 결과에 의존하고 있을 뿐이다 (Okamoto et al., 1977; Peres, 1987). 일반적으로  $K^+$  통로는 막전압 의존성  $K^+$  통로 이외에도 세포막의 receptor와 연결되어 작동하는 것들과 세포내  $Ca^{2+}$ , ATP와 cell-signalling에 관련된 물질들에 의하여 직접 또는 간접적으로 조절되는 많은 종류가 밝혀져 있으므로 (Cook, 1988; Cook 1990; Farley & Rudy, 1988) 생쥐 난자의 외향전류에 대한 ADP의 작용을 파악하기 위해서는  $K^+$ 에 의하여 이루어지는 외향전류를 기록하고 ATP와 같이 관련 가능성이 높은 물질, 그리고 ADP와 cell-signalling 사이에 G protein과 같이 널리 알려진 통로활성 인자간의 상관관계가 요구된다.

ADP가 외향전류에 효과를 나타낼 수 있는 가능성은 다음과 같은 근거로 생각할 수 있다. 첫째, 양서류 원위세뇨관 세포의 KCa 통로와 같이 ATP에 의하여 직접 억제되거나 적혈구에서 ATP 감소로 증가되는  $Ca^{2+}$ 에 의해 KCa 통로활성이 이루어지는 경우와 같이 여러 가지 경로를 통하여 ADP가 ATP에 길항적으로  $K^+$  통로에 작용할 수 있다. 둘째, 외향전류 성분에 ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ )통로 (Noma et al., 1983; Castle & Haylett, 1987; Kakei et al., 1985)가 포함되어 있거나 ATP 관련 신호전달체계 관련물질에 의하여 조절되는  $K^+$  통로에 ATP와 길항적으로 작용할 수도 있다. 셋째, 생쥐난자에서 난자 내외의 이온균형을 유지하는 Na-K pump (홍, 1989a; 홍, 1989b)나 Ca-pump (Miyazaki, 1991)와 같은 능동운반기전에 대한 ADP의 억제효과도 고려되어야 한다. 그러므로 생쥐 난자가 외향전류와 이를 전도하는  $K^+$  통로에 관한 연구는 ATP 및 ADP에 대한 외향전류의 변화와 GTP에 의한 이온전류의 변화에 대한 관찰로부터 얻은 결과를 전제로 시작되어야 한다. 이에 본 실험은 생쥐 난자에서 외향전류를 관찰하고 외향전류에 대한 ADP와 ATP의 효과, 그리고 GTP 유무에 따른 이온전류 변화를 관찰하여 ADP에 의한 외향전류의 증가효과 기전을 유추하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 난자 준비

6주령 이상의 생쥐 (ICR, female)를 대상으로 실험 개시 60~65시간 전에 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sigma) 5 unit를 복강내 주사한 후, 48시간만에 (실험개시 12~17시간 전) human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma) 5 unit를 동일한 경로로 주사하여 과배란을 유도하였다.

hCG 투여 12~17시간 후 배란된 난자를 난관으로부터 pipette으로 수집하여 0.1% hyaluronidase (Sigma, Type I-S) 용액으로 실온에서 cumulus cell을 제거하였다. Whole cell recording 기법을 적용하기 위하여 난자의 투명대 (zona pellucida)는 10~20 unit의 protease로 제거하였으며 protease에 의한 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 정상 Tyrode 용액 (125 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , buffered with HEPES-NaOH 20 mM, pH 7.3 at 35°C)으로 3번 이상 배란된 난자를 세척하여 실험에 이용하였다.

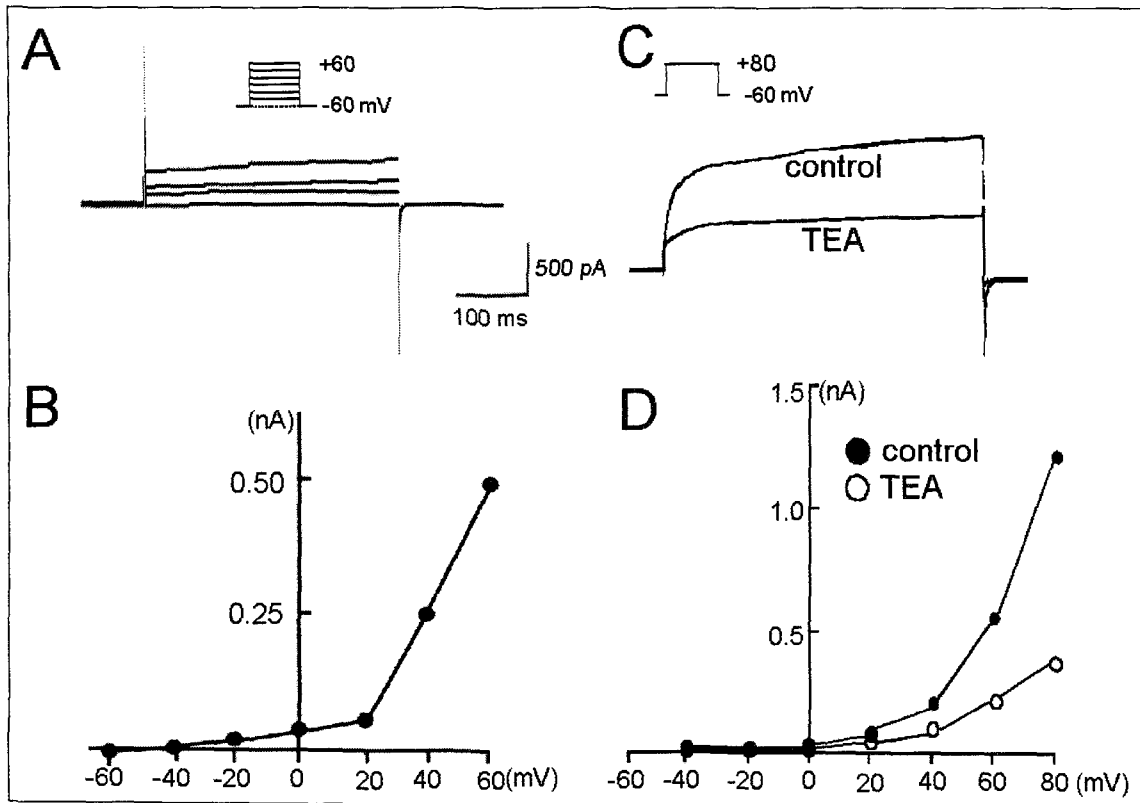
### 2. 실험 용액

실험에 사용된 HEPES buffered Tyrode 용액 (125 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ )은 NaOH를 이용하여 35°C에서 pH 7.3으로 적정하였다. 세포 내 (또는 pipette) 용액 (140 mM KCl, 1.0 mM  $CaCl_2$ , 10 mM EGTA, 2.0 mM  $MgCl_2$ , pH 7.2 at 35°C with 10 mM HEPES-KOH)은 외향전류에 대한 ADP와 ATP의 효과를 관찰하기 위하여 ADP (Sigma)와 ATP (Sigma)를 각각 5 mM씩을, GTP의 경우는 1 mM을 세포 내 용액에 첨가하였다.

본 실험에 이용한 whole cell recording 기법 상 세포막의 안정과 gigaseal 형성을 촉진하기 위하여  $Ca^{2+}$  농도는 생리적 수준보다 높여 10 mM로 사용하였다.

### 3. 실험진행 및 기록장치

투명대를 제거한 난자는 실험용액이 담긴 35 mm petri dish (Falcon)에서 5분간 회복시킨 후 micromanipulator (WR-88, Narishige)를 이용하여 1~2 M $\Omega$  크기의 pipette을 난자에 근접시키고 5~25 cm H $_2$ O 정도의 음압으로 gigaseal을 형성한 후 순간적으로 음압을 가해 whole cell patch를 형성하였다. Whole cell patch 형성과정을 도립현미경 (CK-2, Olympus)으로 관찰하면서 음압을 가할 때 난자의 세포질이 pipette 내로 빨려 들어와 난자의 크기가 변한 경우는 실험대상에서 제외하였다. 실험에 사용된 난자는 난관에서 꺼낸 후 8 시간 이내에 사용하였고 실온 또는 37°C에서 진행하였다.



**Fig. 1. Outward K<sup>+</sup> currents elicited by voltage step in ovulated mouse oocytes.** A, Whole cell current traces in response to voltage pulses from a holding potential of -60 mV as shown above current traces. Current traces are recorded in a same oocyte. B, Currents-voltage (I-V) relation with the development of the outward rectification more positive than -20 mV. C, Blockade of outward currents by 100 mM tetraethylammonium (TEA), a specific K<sup>+</sup> channel blocker. D, I-V plot of currents reduced by application of TEA (○) and currents in the absence of TEA (●).

Patch clamp용 증폭기 (EPC-7, List)와 pClamp (V6.01, Axon, USA) 및 A/D & D/A converter (TL-1-125, Axon, USA)를 통하여 막전압의 고정과 test pulse를 적용하였다. 막전압은 -60 mV로 유지하고 200 ms 또는 300 ms 동안 10 mV 또는 20 mV 간격의 저분극 pulse를 주어 전류를 기록하였다. Patch clamp기법은 pipette과 membrane 사이에 10<sup>9</sup> Ω(GΩ) 이상의 높은 저항 (gigaseal)을 유지하므로 막전압의 조절이 용이하고 leak current가 무시할 정도로 작은 장점을 가지고 있다. 그러나 본 실험에 사용한 일부 난자는 whole cell patch 형성 후 시간이 경과함에 따라 pipette과 membrane를 보정하지 않고 전류를 기록하였다. 생쥐 난자의 전류-전압 관계상 outward rectification이 나타나므로 (Fig. 1), 계산된 막저항 값을 이용한 leak subtraction 방법에 의하여 결과를 제시하였다. 실험진행 및 결과는 oscilloscope (R5113, Tektronics)와 pen recorder로 관찰하면서 결과의 기록은 personal computer와 PCM (501ES, Sony)을 거쳐 video cassette recorder에 저장하고 실험 종료 후 결과측정과 분석에 활용하였다.

## 결 과

### 1. 외향전류의 관찰

생쥐 배란난자의 외향전류를 관찰하기 위하여 whole cell voltage clamp 기법을 이용하여 0 mV부터 20 mV 간격으로 100 mV 까지 300 ms의 저분극 pulse에 대한 이온전류를 기록하였다 (Fig. 1). Seal 저항이 감소할수록 주어진 test pulse 크기에 비례하는 leak 성분에 의한 전류 (leak current)가 증가하기 때문에 외향전류와 leak 전류성분을 구분하기 위하여 과분극 pulse를 4회 선행하여 얻은 값을 저분극 pulse로부터 기록한 전류 값으로부터 감해주는 4회 P/N subtraction 기법 (pClamp V6.01, Axon, USA)을 적용하여 얻은 전류도 Fig. 1A와 같은 크기의 외향전류가 기록되었으므로 외향전류 성분이 leak 전류가 아님을 확인하였다. 난자의 Ca<sup>2+</sup> 통로는 낮은 저분극으로도 쉽게 비활성화되어 나타나지 않으므로 내향전류 성분이 혼합되지 않도록 막전압을 -60 mV로 고정하였

다. Fig. 1B의 전류-전압 관계에서 보이는 것과 같이  $-60$  mV에서  $20$  mV까지 거의 직선상의 관계를 보이고 있으며 거의 외향전류는 관찰되지 않았다. 그러나  $20$  mV 이상의 막전압대에서 outward rectification 현상이 나타나며  $20$  mV 이상의 저분극 pulse부터 외향전류가 현저하게 발달하였다 (Fig. 1B). 이와 같은 외향전류는  $K^+$  통로 차단제인 tetraethylammonium (TEA,  $10\sim 100$  mM)에 의하여  $20$  mV 이상의 막전압 범위에서 억제되었으므로 이 외향전류는  $K^+$  통로를 통한  $K^+$  전류임을 시사하였다 (Fig. 1C & 1D).

## 2. ADP에 의한 외향전류의 증가효과

세포내 관류기법 (internal perfusion)을 이용하여 세포내 용액을 표준 대조 용액으로부터  $5$  mM ADP가 추가된 용액으로 교환한 후 전류변화를 기록하였다 (Fig. 2). 두드러진 변화를 관찰하기 위하여  $100$  mV의 전압 pulse를 주었다. ADP는 과분극 pulse에 의한 내향전류보다 저분극 pulse에 의한 외향전

류를 현저하게 증가시켰다 (Fig. 2A&B). 이러한 ADP의 작용은 곧 바로 나타나지 않았으며  $1$  분 이후부터 증가하기 시작하여  $5$  분 경에 최대에 이르렀다 (Fig. 2C). 시간경과에 따른 ADP의 증가효과가 세포막의 손상이나 seal 저항의 감소에 기인한 것인지 구별하기 위하여 ADP 용액으로부터 대조용액으로 교환시키는 역순으로 진행된 결과, Fig. 2의 결과와 같이 외향전류 성분을 현저하게 감소시켰다 (Fig. 3A). 본 실험에 이용된 난자의 세포막 성상에 따라 외향전류의 크기가 다르기 때문에 대조전류와 ADP 관류에 의한 전류변화 비율을 계산하여 막전압대에 도시한 결과,  $0$  mV 이상의 막전압대에서 외향전류가 ADP에 의하여  $157\%$ 부터  $178\%$  사이에서 고르게  $1.5$  배 이상 증가하였다 (Fig. 3B).

## 3. 내향전류에 대한 ADP의 효과

ADP에 의한 외향  $K^+$  전류의 증가는 ADP가  $K^+$  통로 활성을 증가시킨 결과로 해석될 수 있다. 이 결과에 근거하여  $K^+$

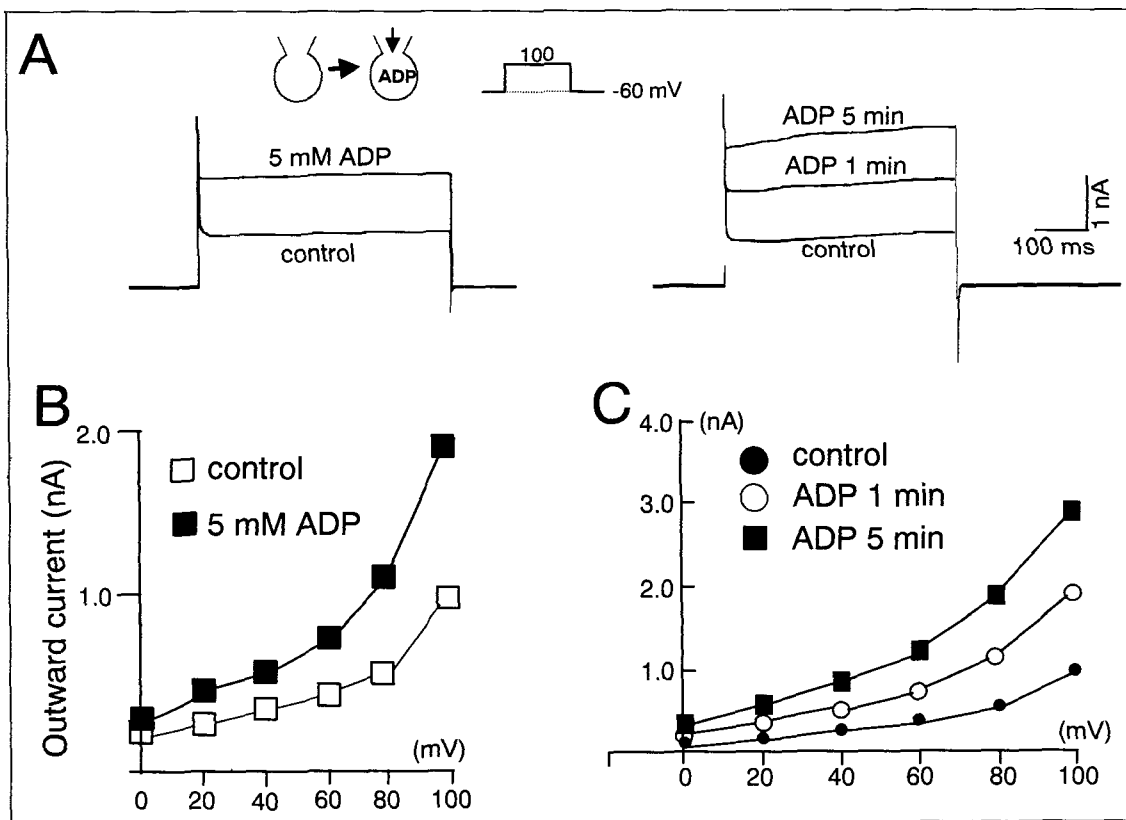
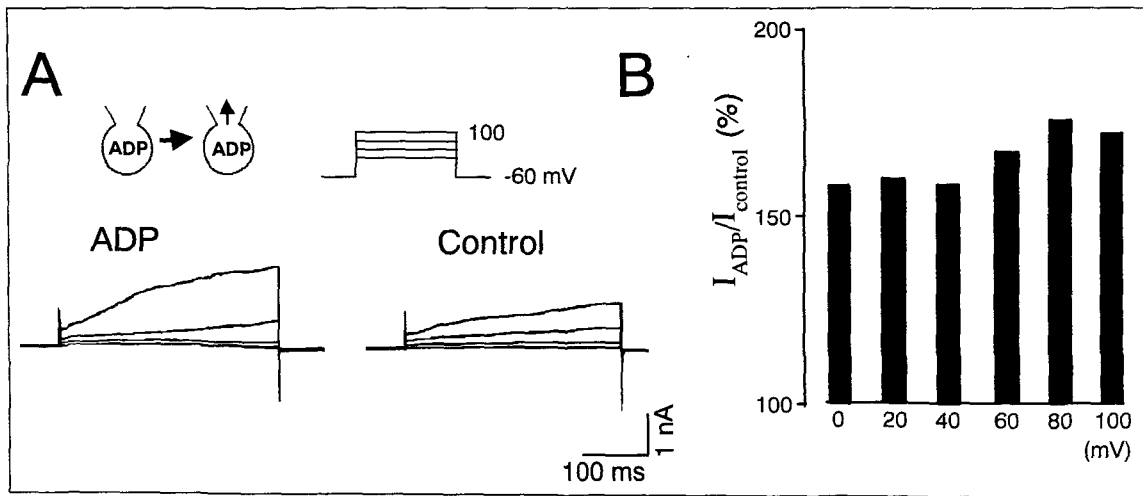


Fig. 2. Increased  $K^+$  currents by ADP. A, Effect of internally perfused ADP on outward currents. These currents elicited by the step depolarization of  $100$  mV with or without ADP. Right traces show the chronological effect of the internally dialyzed ADP. Schematic diagram in the left top represents the experimental procedure of the internal dialysis of ADP. B, ADP-induced reduction in currents over the entire voltage range in the absence ( $\square$ ) or presence of  $5$  mM ADP ( $\blacksquare$ ). C, Changes of I-V plot  $1$  min later ( $\circ$ ),  $5$  min later ( $\blacksquare$ ) application of ADP, comparing to the control recorded in the absence of ADP ( $\bullet$ ). Current amplitudes were adopted the end of each current trace in response to the step depolarization.



**Fig. 3. Enhancement effect of ADP on the outward current.** A, Inhibition of whole cell current traces by removal of internal ADP as shown in the schematic diagram in the top left. This procedure is reverse process to that in Fig. 2. Note currents decreased by depriving of ADP from oocyte cytoplasm. B, Bar plots of the averaged currents normalized to the currents recorded in the absence of ADP.

통로 활성을 증가시킬 수 있는 기전으로서 본 연구에서는 두 가지 가능성을 조사하였다. 첫 번째로 ADP에 의하여 증가된 외향성의 K<sup>+</sup> 전류가 hamster 난자에서 밝혀진 것과 같은 KCa 전류성분인지 알아보려고 하였다. KCa 전류는 Ca<sup>2+</sup> 내향전류 크기에 의존하므로 ADP가 Ca<sup>2+</sup> 전류를 증가시킨다면 K<sup>+</sup> 외향전류가 증가할 수 있다. ADP에 의한 Ca<sup>2+</sup> 내향 전류변화 여부를 관찰하기 위하여 막전압을 -80 mV로 유지하고 0 mV 크기의 저분극 pulse를 주어 내향전류를 유발시키면서 ADP 관류 전후의 Ca<sup>2+</sup> 전류변화를 관찰하였다. 5 mM ADP를 관류시킨 후 내향전류의 크기는 40%가량 감소하였으며 반대로 ADP로부터 대조용액으로 교환하여도 내향전류는 같은 정도로 감소하였다. 이를 다시 한번 확인하기 위하여 동일한 난자에서 대조용액 → ADP → 대조용액의 순서로 교환하면서 내향전류 변화를 관찰한 결과, 앞의 결과와 같이 ADP와 대조용액 교환과 관계없이 내향전류의 크기는 시간이 경과할수록 감소하였다. 내향전류의 비활성화 시정수 (inactivation time constant) 및 전류-전압관계 등 통로역학과 관련된 지표는 변화되지 않았다. 따라서 ADP는 Ca<sup>2+</sup> 내향전류에 대한 효과는 확인되지 않았다.

**4. ADP 효과에 대한 ATP의 억제작용**

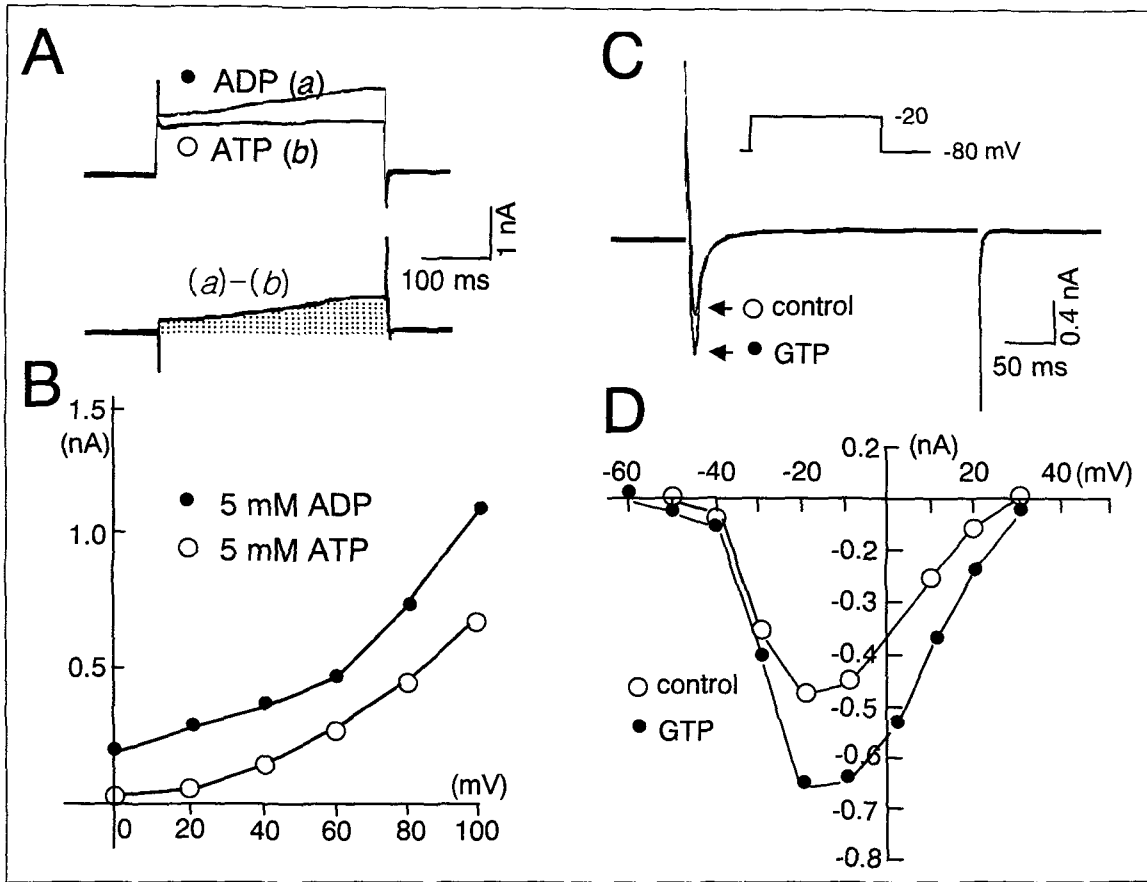
외향전류에 대한 ADP의 효과는 시간이 경과하면서 증가하였다 (Fig. 2). 이는 ADP가 이온통로에 직접 agonist나 antagonist로서 작용하는 것이 아니라 세포내 대사 또는 신호과정에 따른 결과로 추정되었다. 따라서 두 번째로 ATP가 사용되는 인산화 같은 과정에 ADP가 길항적으로 작용한 결과인지

알아보기 위하여 외향전류에 대한 ADP와 ATP의 효과를 비교하였다 (Fig. 4A&B). 이러한 가정은 수정 후 난자내 ATP/ADP의 비율이 감소한다는 보고에서도 추측될 수 있다. 세포내 ADP를 ATP로 교환하였을 때 외향전류는 0.3~0.6 nA 범위에서 감소하였으며, 특히 천천히 증가하는 steady-state component를 억제시켰다 (Fig. 4A). ATP에 의한 외향전류 억제 효과는 0 mV 이상의 모든 막전압에서 확인되었다 (Fig. 4B). 그러나 동일한 조건에서 기록한 대조전류와 유의한 차이는 없었다. 또한 외향 전류의 slope conductance에 대한 유의한 차이가 관찰되지 않아 ATP에 의한 세포막 전도도의 변화는 확인되지 않았다.

**5. 내향전류에 대한 ATP의 효과**

외향전류에 대하여 ADP와 ATP가 서로 억제적으로 작용하였다. ADP와 ATP의 길항효과가 Ca<sup>2+</sup> 내향전류에 대해서도 효과를 미치는지 확인하기 위하여 내향전류에 대한 ADP의 작용을 조사할 때와 같은 방법으로, 고정전압 -80 mV로부터 60 mV 크기의 저분극 pulse (-20 mV step depolarization)에 의하여 나타나는 전류를 기록하였다. 대조용액으로부터 5 mM ATP를 세포내로 관류시키거나 반대로 세포내 5 mM ATP를 대조용액으로 교환하면서 나타나는 전류는 ATP의 유무와 관계없이 시간경과에 따라 감소하는 run-down 현상이 나타났다. 따라서 본 실험에서는 Ca<sup>2+</sup> 내향전류에 대한 ATP의 효과는 없는 것으로 나타났다.

**6. 내향 및 외향전류에 대한 GTP의 효과**



**Fig. 4. Antagonistic action of ATP against the effect of ADP on the outward current.** A, Inhibition of time-dependent outward current by the internal dialysis of ATP. Shaded area in lower trace represents the amount of current inhibited by 5 mM ATP. B, I-V plots in the presence of ADP (●) and ATP (○). C, Effect of GTP on the inward current. Arrows indicate the peak level of the superimposed currents. D, Effect of GTP on inward current and outward currents. I-V plots of inward currents before (○) and after application of 1 mM GTP (●) are shown with those for outward currents. Amplitude of steady-state currents was measured at the end of voltage step. Both solid line with open circles and dotted line with closed circles indicated the slope conductances and the amplitude of steady-state currents with (●) and without GTP (○) in the pipette solution, respectively.

Fig. 2와 Fig. 4A에서 보여준 것과 같이 천천히 이루어지는 외향전류에 대한 ADP 작용과 아울러 ATP 간의 길항작용은 ADP의 효과가 이온통로에 직접적으로 작용한 결과라기보다는 세포내 과정을 유발시켜 나타날 가능성을 시사하므로 본 연구의 세 번째 시도로서 G protein의 관련 여부를 살펴보았다 (Fig. 4C & 4D). ADP와 ATP의 효과가 난자 내에 존재하는 G protein에 의하여 증개될 가능성과 GTP 또는 G protein에 의한 통로활성 가능성을 관찰하기 위하여 GTP가 담긴 pipette 용액을 세포내로 관류시켜 내향 전류와 외향전류의 변화를 기록하였다. G protein의 빠른 활성을 위하여 1 mM GTP를 pipette 용액에 첨가하여 internal perfusion 기법을 이용하여 세포 안으로 관류시켰다. 관류 직후부터 0.2~0.4 nA 전류의 수준으로 내향전류의 크기만이 모든 전압대에서 증가

하였으나 역전전압 등 전류-전압 곡선상의 중요한 지표변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 4D). K<sup>+</sup> 외향전류는 난자의 상태나 gigaseal의 상태에 따라서 막전압에 따른 편차가 있었으나 slope conductance가 3.97에서 4.19로 약간 감소 (5%)하는데 그침으로써 K<sup>+</sup> 통로 전도도에 대한 GTP의 효과를 확인할 수 없었다.

### 고 찰

본 실험은 생쥐 난자의 외향전류에 대한 ADP 및 ATP와 GTP의 효과를 관찰하여 ADP 및 ATP에 의한 외향전류 조절 기전, 또는 GTP와 관련되어 있는 생쥐 난자의 신호전달체계 경로를 알아내기 위하여 시행되었다. 이와 같은 물질들은 세

포 내에서 적용시켜야 하므로 그 효과를 살피기 위하여 whole cell voltage clamp 기법과 함께 세포내 관류 기법을 적용하였다.

본 실험에서 관찰된 외향전류 성분은 세포 내외의 실험 조건 ( $140 \text{ mM } [K^+]_o$  vs.  $6 \text{ mM } [K^+]_i$ )과  $K^+$  전류 차단제인 TEA에 의하여 차단되는 것으로 보아  $K^+$  전류로 판단하였다. 그러나  $10 \sim 100 \text{ mM TEA}$ 에 의해서도 완벽하게 차단되지 않는 점은 이 외향성분이  $K^+$  성분 이외에 Cl-나 다른 양이온에 의한 것이거나 TEA-insensitive한  $K^+$  통로일 가능성을 배제할 수 없었다. 실제로 생쥐 난자에서 외향전류의 kinetics가 내향성분의 것과 같으므로 생쥐 난자에 존재하는 이온통로는 선택성이 떨어지는 이온통로일 가능성 (Peres, 1987)을 고려한다면 지금으로서는 생쥐 난자에 존재하는 외향전류는 TEA-insensitive  $K^+$  channel을 통하여 이동한 결과로 해석하는 것이 더욱 타당하다고 생각된다.

ADP는 곧 바로 작용하지 않고 수분에 걸쳐 외향전류를 증가시켰다 (Fig. 2C & 3B). 외향전류는 pulse 자극에 반응하여 변하지 않는 항정상상태 성분 (steady-state component)과 약 100 ms 이후부터 발달하기 시작하는 시간-의존성 성분 (time-dependent component)으로 나눌 수 있었다 (Fig. 4A의 trace 참조). 흥미롭게도 ADP는 시간-의존성 성분을 효과적으로 증가시켰다. Whole cell patch 형성 후 10분이 경과하여도 0 mV에서 보이는 외향전류의 차이가 100 pA 전후임을 감안할 때 (Fig. 2D), 외향성 항정상상태 전류의 증가는 용액교환 중 seal 저항 감소로 생기는 leak에 의한 것으로 보기 어려우므로 ADP의 효과로 판단된다. 시간 의존성 외향전류는 ATP 용액에 의하여 억제되며 (Fig. 4A & B), ADP 용액의 교환 직후부터 관찰되지 않고 적어도 3분 이상 지난 후 발달하였다 (Fig. 2C). ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) 전류는 ATP와 통로간에 직접 결합에 의하여 바로 통로활성이 조절되므로 (Ashcroft, 2000), 수분 이상 걸리는 외향전류의 증가로는  $K_{ATP}$  통로를 통한 것으로 보기 어렵다.

많은 종류의  $K^+$  통로가 cAMP나  $InsP_3$  등과 같은 이차전령 또는 이차전령에 의해 활성화되는 PKA, PKC 및 cell-signaling에 관련된 G protein에 의하여 통제되는 것으로 널리 알려져 있다 (Cook, 1990). 그러므로 외향전류에 대한 ADP의 작용을 규명하기 위해서는 생쥐 난자에서 신호전달 과정에서 생성되는 물질과 ADP간의 관련여부를 확인할 필요가 있다. 본 실험 결과만으로는 외향전류에 대한 ADP와 ATP의 작용경로를 구체적으로 설명할 수 없으나  $-30 \text{ mV}$  내외의 안정막 전압을 유지하기 위하여 작동하는 Na-K pump의 존재 (홍,

1989a; 홍, 1989b)와 hamster 난자에서 보고된 다음의 몇 가지 연구 결과로부터 생쥐 난자의 외향전류에 대한 ADP의 작용 기전을 유추할 수 있다. 최근 hamster 난자에서 수정에 의하여 나타나는 과분극반응이 GTP,  $InsP_3$  및 serotonin에 의해서도 나타나는 것으로 보고되었다 (Miyazaki, 1988; Miyazaki, 1991; Miyazaki, et al., 1990). 이는 hamster 난자에서 정자와의 수정시 관찰되는 반복적인 과분극 반응은 세포내  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}_i$ )의 oscillation에 따라 주기적으로 이루어지는 KCa 통로의 활동에 의한 결과로 알려져 있다 (Igusa & Miyazaki, 1986; Miyazaki & Igusa, 1981; Miyazaki & Igusa, 1982).  $Ca^{2+}$  oscillation이 이루어지기 위해서는 ATP을 사용하는  $Ca^{2+}$ -pump나 Na-Ca exchange system, KCa 통로와 같은 다양한 세포장치를 활용하여  $Ca^{2+}_i$ 을 반복적으로 조절하는 것으로 생각하고 있다 (Miyazaki, 1991). Hamster 난자와 생쥐 난자에서 관찰되는 과분극 반응을 비교한 실험에 의하여 생쥐 난자에도 KCa 통로가 있을 것으로 예상하고 있으며 (Igusa et al., 1983), 생쥐 난자에서도  $Ca^{2+}$  oscillation이 관찰되고 있다 (Peres, 1990; 강 등, 2000). 생쥐 난자에서도 hamster와 유사하게 능동운반을 통하여 세포내  $Ca^{2+}$  농도가 조절된다면 ADP가 증가할 때 ATP/ADP ratio의 감소에 따라 능동운반 능력이 저하되어  $Ca^{2+}_i$ 이 축적되고 그만큼 KCa 전류가 커져 외향전류의 conductance 증가로 반영될 수 있다. 이에 더하여 인산화와 같은 일반적  $K^+$  통로조절 기전이 가세한다면 효과적으로  $K^+$  전류 변화는 더욱 큰 폭의 변화로 나타날 수 있을 것이다.

본 실험에서는 생쥐 난자의 이온통로에 대한 G protein의 작용이 존재하는지도 알아보았다. GTP에 의하여 생쥐 난자의  $Ca^{2+}$  전류는 증가하였다 (Fig. 4C & D). ADP의 작용과는 대조적으로 GTP 효과는 관류 직후부터 관찰되었다 (Fig. 4C). G protein이 직접 통로에 작용할 때 그 효과가 빠르게 나타되며 생쥐 난자에서  $\beta$ -adrenergic agonist인 isoproterenol이나 8-bromo cAMP가 T-type  $Ca^{2+}$  통로를 조절한다는 것을 고려한다면 (Haan et al., 1993; Brown, 1991; Yatani & Brown, 1989), 본 GTP에 의한  $Ca^{2+}$  내향전류의 증가는 시사하는 바가 크다. 더구나  $InsP_3$ 의 활성화에는 PLC가 요구되며 PLC의 활성화는 G protein (Gp)에 의하여 이루어지므로 난자의 이온통로의 활성화는 막전압 의존성 통로 이외에도 G protein을 위시한 일련의 신호전달체계와 연결된 ligand 통로의 작용 가능성을 배제할 수 없다고 판단된다. 그러므로 ADP에 의한 외향전류의 증가 및 GTP에 의한  $Ca^{2+}$  전류 증가는 G protein-liganded channel의 존재, KCa의 기여정도, cell-signalling 경로와 ADP 사이에 관한 추가적인 연구를 거쳐 밝혀질 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- Aschcroft FM (2000) Ion channels and disease (chap 8, inwardly rectifying  $K^+$  channels), Academic Press, San Diego, pp.135-159.
- Brown AM (1991) Ion channels as G protein effectors. *News Physiol Sci* 6: 158-161.
- Castle NA, Haylett DG (1987) Effect of channel blockers on potassium efflux from metabolically exhausted frog skeletal muscle. *J Physiol* 383: 31-43.
- Cook NS (1988) The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trend Pharmacol Sci* 9: 21-28.
- Cook NS (1990) Potassium channels; Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential, Ellis Horwood Limited New York: 337-381.
- Farley J, Rudy B (1988) Multiple types of voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels of large conductance in rat brain synaptosomal membrane. *Biophys J* 53: 919-934.
- Haan JH, Cheong SJ, Kim YM, Park CO, Hong SG (1993) Regulatory action of  $\beta$ -adrenergic agonist and 8-bromocyclic AMP on calcium currents in the unfertilized mouse eggs. *Kor J Physiol* 27(2): 175-183.
- Igusa Y, Miyazaki S (1986) Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium sensitive electrodes. *J Physiol* 377: 193-205.
- Igusa Y, Miyazaki S, Yamashta N (1983) Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse egg fertilized with mouse sperm. *J Physiol* 340: 633-647.
- Kakei M, Noma A, Shibasaki T (1985) Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cell. 363: 441-462.
- Miyazaki S (1988) Inositol 1,4,5-triphosphate induced calcium released and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 160: 345-353.
- Miyazaki S (1991) Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium* 12: 205-216.
- Miyazaki S, Igusa Y (1981) Fertilization potential in golden hamster eggs consist of recurring hyperpolarization. *Nature* 290: 702-704.
- Miyazaki S, Igusa Y (1982)  $Ca^{2+}$ -mediated activation of a  $K^+$  current at fertilization of golden hamster eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 931-935.
- Miyazaki S, Katayama Y, Swann K (1990) Synergic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by Phobol ester of cyclic  $Ca^{2+}$  rises in hamster eggs. *J Physiol* 426: 209-227.
- Noma A (1993) ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148.
- Okamoto H, Takahashi K, Yamashita M (1977) Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J Physiol* 267: 465-495.
- Peres A (1986) Resting membrane potential and inward current properties of mouse ovarian oocytes and eggs. *Pflügers Arch* 407: 534-540.
- Peres A (1987) The calcium current of mouse egg measured in physiological calcium and temperature conditions. *J Physiol* 391: 573-588.
- Peres A (1990)  $InsP_3$ -and  $Ca^{2+}$  release in single mouse oocytes. *FEBS Lett* 275(1,2): 213-216.
- Yatani A, Brown AM (1989) Rapid  $\beta$ -adrenergic modulation of cardiac calcium channel by a fast G protein pathway. *Science* 245: 71-74.
- Yoshida S, Plant S, McNiven AI, House CR (1990) Single  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in exercised membrane patches of hamster oocytes. *Pflügers Arch* 415: 516-518.
- 강다원, 윤숙영, 배인하, 한재희, 홍성근 (2000) Acetylcholine-activated  $Ca^{2+}$  transients in ovulated mouse oocytes. 제 52회 대한생리학회 초록집 p36.
- 홍성근a (1989) 생쥐 난자의 안정막 전압과 pump활동에 대한 양이온의 효과. *대한생리학회지* 23(1): 35-42.
- 홍성근b (1989) 생쥐 미수정란에서의 electrogenic Na pump 활동여부에 관한 연구. *대한수의학회지* 29(3): 245-251.