

## 햄스터 난자에서 존재하는 Chloride 통로

김양미 · 김종수<sup>2</sup> · 홍성근<sup>1†</sup>  
충북대학교 의과대학 생리학교실

### Identification of Chloride Channels in Hamster Eggs

Y. M. Kim, J. S. Kim<sup>2</sup> and S. G. Hong<sup>1†</sup>

*Department of Physiology, College of Medicine, Chungbuk National University, Jinju*

#### SUMMARY

Chloride( $\text{Cl}^-$ ) channels play critical roles in cell homeostasis and its specific functions such as volume regulation, differentiation, secretion, and membrane stabilization. The presence of these channels have been reported in all kinds of cells and even in frog oocytes. These essential role of  $\text{Cl}^-$  channels in cell homeostasis possibly play any role in egg homeostasis and in the early stage of development, however, there has been no report about the presence of  $\text{Cl}^-$  channel in the mammalian oocyte. This study was performed to elucidate the presence of  $\text{Cl}^-$  channels in hamster eggs.

When allowing only  $\text{Cl}^-$  to pass through the channel of the egg membrane by using impermeant cation such as N-methyl-D-glucamine(NMDG), single channel currents were recorded. These channel currents showed typical long-lasting openings interrupted by rapid flickering. Mean open time( $\tau_o$ ) was  $43 \pm 10.14$  ms( $n=9$ , at 50 mV). The open probability( $P_o$ ) was decrease with depolarization. The current-voltage relation showed outward rectification. Outward slope conductance( $32 \pm 5.4$  pS,  $n=22$ ) was steeper than the inward slope conductance( $10 \pm 1.3$  pS). Under the condition of symmetrical 140 mM NaCl, single channel currents were reversed at 0 mV( $n=4$ ). This reversal potential( $E_{rev}$ ) was shifted from 0 mV at 140 mM concentration of internal NaCl(140 mM  $[\text{N}^+]_i$ ) to  $-9.8 \pm 0.5$  mV( $n=4$ ) at 70 mM  $[\text{N}^+]_i$  and  $11.5 \pm 1.9$  mV at 280 mM  $[\text{N}^+]_i$ ( $n=4$ ) respectively, strongly suggesting that these are single  $\text{Cl}^-$  channel currents. To examine further whether this channel has pharmacological property of the  $\text{Cl}^-$  channel, specific  $\text{Cl}^-$  channel blockers, IAA-94(Indanyloxyacetic acid-94) and DIDS(4, 4'-diisothiocyanostillbene-2,2'-disulfonic acid) were applied. IAA-94 inhibited the channel current in a dose-dependent manner and revealed a rapid and flickering block.

From these electrophysiological and pharmacological results, we found the novel  $\text{Cl}^-$  channel present in the hamster oocyte membrane. The first identification of  $\text{Cl}^-$  channel in the hamster oocyte may give a clue for the further study on the function of  $\text{Cl}^-$  channel in the fertilization and cell differentiation.

(Key words : chloride channel, single channel recording, hamster eggs, IAA, DIDS)

본 연구는 한국과학재단(KOSEF, 과제번호 961-0701-004-2)에 의하여 지원되었음.

<sup>1</sup> 경상대학교 의과대학 생리학교실(Department of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University)

<sup>2</sup> 경상대학교 수의과대학 약리학교실(Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : hong149@nongae.gsnu.ac.kr

## 서 론

세포에서 발생하는 흥분성은 세포막에 존재하는 이온통로를 통한 이온의 움직임에 의해 조절된다. 이온통로의 개폐는 막전압의 변화, 신경전달물질, 기계적 자극 즉 소리, 빛, 세포막의 신전 등과 같은 다양한 조절 인자에 의해 조절된다. 이러한 인자에 조절되는  $\text{Cl}^-$  통로는 거의 모든 세포에서 생리학적으로 중요한 역할을 한다(Greenwood & Large, 1996; Duszyk et al., 1995; Janssen and Sims 1995; Ehara & Matusuura, 1993; Akbarali and Giles, 1993; Ehara and Ishihara, 1990; Frizzell and Halm, 1990; Weiss & Magleby, 1990; Pacaud et al., 1989; Mayer, 1985). 신경세포에서는 억제성 신경전달물질인 GABA 등이  $\text{Cl}^-$  통로를 활성화시킴으로서 시냅스 억제를 유발하며(Alger, 1985), 골격근에서  $\text{Cl}^-$  평형전압( $E_{\text{Cl}}$ )을 결정하는데 기여하여 안정막전압을 유지함으로써 세포를 안정시킨다(Blatz & Magleby, 1983). 뿐만 아니라  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransport,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange,  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransport,  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$  cotransport와 같은  $\text{Cl}^-$  이온의 교환 기전에 관여하여 pH 조절, 전해질의 흡수 분비, 용적 조절, 세포의 분화에 기여한다(Jentsch, 1993; Cala, 1990; Thomas, 1984).

이처럼 다양한 역할을 하고 다양한 전도도를 가진  $\text{Cl}^-$  통로는 생명의 기원이 되는 난자에서도 관찰된다. *Xenopus* oocyte에서는 acetylcholine(ACh), catecholamine, adenosine, vasoactive intestinal peptide(VIP), prostaglandins, FSH, serotonin에 의해  $\text{Cl}^-$  통로가 활성화된다고 한다(Arellano & Miledi, 1993; Miledi & Woodward, 1989; Takahashi et al., 1987; Kusano et al., 1982; Lotan et al., 1982). 특히 ACh에 의해 활성화되는  $\text{Cl}^-$  전류는 수정 시에 관찰되는 fertilization potential 형성에 기여한다(Webb & Nuccitelli, 1985; Hagiwara & Jaffe, 1979). Ascidian embryo에서  $\text{Cl}^-$  통로는 막전압에 의해 조절되며, 세포의 주기에 따라 세포 용적이 변화하고 이 변화에 따라 이온 통로의 활성이나 비활성이 조절된다고 한다(Villaz et al., 1995; Lang et al., 1992). 수정 후 세포 발달주기에 따라

세포막에 분포하는 이온통로의 밀도가 달라진다는 것은 이온 통로들이 세포의 분화와 밀접한 관련 있을 가능성을 제시한다(Villaz et al., 1995).

이처럼 개구리나 멧게의 난자에서  $\text{Cl}^-$  통로가 존재함이 확인되었지만 포유류에서는  $\text{Cl}^-$  통로에 대한 직접적인 보고는 없다.  $\text{Cl}^-$  이온은 세포외액에서와 같이 난관에 가장 많이 존재하는 음이온이므로 난자의 세포막에는  $\text{Cl}^-$  이온이 통과할 수 있는 독립적인 통로가 있을 가능성이 있다. 이런 가능성을 지지하는 예로서, Zhao 등(1995)은 mouse embryo에서  $\text{Cl}^-$  이온이 pH 조절에 기여함으로써 embryo의 발달에 관여한다고 하였다. 그들의 보고에 따르면 착상하기 전 embryo의 모든 단계에서  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  교환기전의 활동도가 관찰되며, 이 활동도는  $\text{Cl}^-$  이온의 교환기전을 억제하는 DIDS(4, 4'-diisothiocyanostillben-2,2'-disulfonic acid)에 의해 감소되어 세포내 pH의 변화를 초래하였으며, 세포의 pH가 높을 경우 2 세포기에서 포배기로 가는 embryo 발달을 억제한다고 하였다. 햄스터 난자에서  $\text{Cl}^-$  통로 존재 가능성은 햄스터 난자에서 선행된 일부 연구에 의해 제안되었다. Choi 등은 저장성 용액에 노출되어 팽창된 난자는 정상 용적으로 되돌아가려는 세포용적 감소(regulatory volume decrease, RVD) 반응이 일어나고 이때  $\text{Cl}^-$ 가 손쉽게 유출됨으로써 용적 감소 기전에 관여하는 것을 관찰하였다(Choi et al., 1996). 이러한 보고는 저장성 용액에 노출시 일어나는 세포용적 감소 반응이  $\text{Cl}^-$  이온의 관련 가능성을 제시한다. 또한 세포용적조절시 나타나는  $\text{Cl}^-$  이온의 관련 가능성은 개구리 알에서도 보고된 바 있다(Ackerman et al., 1994).

$\text{Cl}^-$ 는  $\text{Na}^+$ 과 같이 세포외액에 높은 농도로 존재하며 농도 경사에 따라 세포막 통로를 통하여 이동하는 이온이다. 난자는 세포외액으로 조성된 난관과 자궁환경에서 격렬한 발달과정을 진행하는 미분화세포이므로 주위환경(세포외액)과 밀접한 물질교환을 한다고 가정한다면 난자에서  $\text{Cl}^-$  통로의 존재는 필수적이라고 예상된다. 그럼에도 불구하고 포유류 난자에서는  $\text{Cl}^-$  통로에 대한 직접적인 연구는 아직 시도되지 않았다. 이러한 가능성을 근거로 포유류인 햄스터 난자에서 단일 통로 기록법

으로 Cl<sup>-</sup> 통로를 분리하고 그 성상을 알아보고자 본 실험을 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 햄스터 미수정란의 분리

실험동물은 6주에서 6월령 사이의 Golden 햄스터를 사용하였다. 미수정란(unfertilized oocyte)은 실험 개시 63~68시간 전에 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 20 unit를 복강내 주사한 후, 48시간만에(실험 개시 15~20시간 전) human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma) 20 unit를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. 미수정란은 hCG 주사 15~20시간 후 경추를 탈구시키고 복강을 열어 유리미세관으로 cumulus cell에 싸여 있는 난자들을 수집하여 0.1% hyaluronidase (Sigma, type I-S) 용액으로 실온(20~22°C)에서 cumulus cell을 제거한 후 표준 용액(NaCl 145 mM, KCl 5.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, HEPES 5 mM, glucose 5 mM, polyvinylpyrrolidone 0.05 mM, pH 7.4)에 넣어 4°C에 보관하였다가 분리 후 8시간 이내에 실험에 사용하였다. 실험 직전에 0.1 unit protease(Sigma, type VII)로 투명대(zona pellucida)를 제거하였다. 투명대 소실 후 protease에 의한 추가적인 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 표준 용액으로 10번 이상 세척하였다.

### 2. 실험 용액

실험에 사용한 주된 용액은 NMDG(N-methyl-D-glucamine)-Cl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 10 mM으로 조성하였다. 140 mM NMDG-Cl은 강알칼리이온 세포막을 투과하지 못하는 양이온인 NMDG<sup>+</sup> 140 mM와 강산인 140 mM HCl을 혼합하여 조성하였다. pH는 NMDG나 HCl로 적정하여 7.2로 맞추었다. 실험에 사용된 용액 조성표는 Table 1과 같다. 본 실험에 사용된 Cl<sup>-</sup> 억제제로는 Indanyloxyacetate 94(IAA-94), 4,4'-diisothiocyanostillben-2,2'-disulfonic acid(DIDS)를 사용하였다. IAA-94는 유기용매인 알코올에 녹여 사용하

였다. Alcohol에 녹인 시약을 첨가할 때는 alcohol의 양이 0.1%(v/v)가 넘지 않도록 조성하여 실험에 사용하였다. 이온 통로에 대한 alcohol의 통로에 대한 검증 결과 아무런 영향도 주지 않았다.

### 3. 단일 통로 전류의 기록

본 실험에서는 단일통로전류를 기록하기 위하여 Hamill 등(1981)에 의하여 개발된 patch clamp 기법 중 cell-attached patch와 inside-out patch clamp 기법을 적용하였다. 투명대를 제거한 난자를 도립현미경(CK-2, Olympus, Japan) 위에 장착된 35 mm 크기의 실험용기로 옮기고 NaCl이나 NMDG-Cl 용액을 관류시켜 다시 5분간 기다린 후 실험을 개시하였다. 실험에 사용된 유리 pipette (KIMAX-51, Kimble products, USA)은 two step puller(PP-83, Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan)로 끝을 3~4 μm로 뽑은 후 Sylgard (Sylgard 184, Dow-corning, Midland, MI, USA)로 coating하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 pipette 저항은 140 mM NMDG-Cl 용액을 채웠을 때 1.5~2 MΩ 이었다. 이러한 pipette을 이용하여 gigohm-seal을 형성하고 cell-attached mode에서 단일 통로의 활동을 patch clamp amplifier (Axopatch 1-D, Axon instrument, USA)를 이용하여 4-pole Bessel filter로 2 kHz로 filtering하여 기록하였다. 실험용액의 관류는 미세한 관류관을 난자에 근접시켜 30 초 이내에 용액이 교환될 수 있도록 하였다. Reference electrode는 3 M KCl-agar bridge를 사용하였다. 모든 실험은 20~22°C에서 진행하였다.

### 4. 결과 분석

Pulse code modulator(PCM-2, Medical Systems, USA)를 거쳐 VCR tape에 기록된 data들은 A/D (analogue-to-digital) converter를 거쳐 personal computer로 옮겨서 pClamp program(Version 6.02, Axon Instruments, Foster City, CA)을 이용하여 분석하였다. Current는 10 kHz로 sampling 하였다. Mean open time( $\tau_o$ )은 통로의 특성상 fitting이 잘 되지 않았으므로 산술평균값을 사용하였다. 통로의 활성도를 관찰하기 위해서는 open probability를 구하여 channel activity( $N \times P_o$ )를 계산하였다. 약

물에 의한 반응은 약물 투여 후 1분 이후부터의 결과로부터 얻어 분석하였다.

## 결 과

### 1. 햄스터 난자에서 단일통로

난자에서 단일 통로를 기록하기 위하여 patch clamp 기법 중 inside-out patch를 이용하여 세포내외의 이온을 달리하여 기록하였다(Fig. 1). 이 때 막전압은 50 mV와 -50 mV로 고정하였다. Pipette 용액과 bath 용액을 140 mM NaCl(n=10, Fig. 1A), 90 mM BaCl<sub>2</sub>(n=3, Fig. 1 B), 140 mM, 140 mM NMDG-Cl(n=22, Fig. 1 C)으로 조성하였을 때 유사한 kinetics를 가진 단일 통로전류를 관찰할 수 있었으며 140 mM CsCl(n=3), TMA-Cl (n=2)도 관찰되었다. 각기 다른 이온용액에서 기록된 통로의

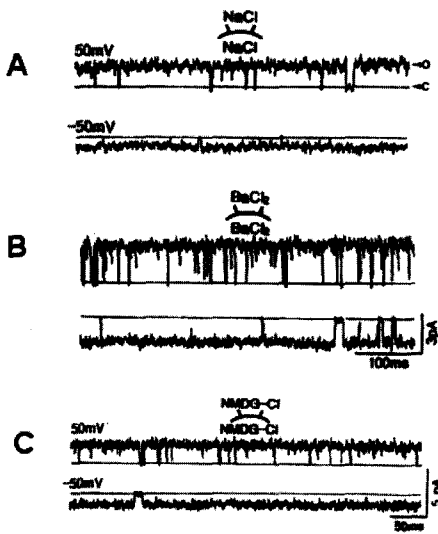


Fig. 1. Single channel current in the hamster oocyte recorded in three different cations. Experimental solutions were symmetrical 140 mM Cl<sup>-</sup> and equimolar Na<sup>+</sup> in A, Ba<sup>2+</sup> in B, NMDG<sup>+</sup> in C. The recording traces were obtained at 50 mV and -50 mV in excised inside-out patch configuration. Note similar kinetics with long openings and brief closings in 140 mM chloride. Channel opening was represented as "O" and closing as "C".

전도도는 NaCl 용액에서 28.3±2 pS(n=10), CsCl 용액에서 25.6±0.2 pS(n=3), BaCl<sub>2</sub> 용액에서 51±5.0 pS(n=3), TMA-Cl 용액에서 38.5±4.0 pS(n=2), NMDG-Cl 용액에서 32±5.0 pS(n= 22)로 전도도의 크기는 약간의 차이가 있었지만 모두 오랫동안 열리는 양상을 보였다. Ba<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, TMA<sup>+</sup>는 잘 알려진 K<sup>+</sup> 통로 차단제이고 NMDG와 TMA는 세포막을 투과하지 못하는 이온이므로 모든 조건에서 유사한 행태의 단일 통로전류가 관찰되었으므로 이 전류는 Cl<sup>-</sup>에 의하여 나타나는 것으로 생각되었다.

### 2. 햄스터 난자의 단일 통로전류의 막전압-의존성과 역전전압(reversal potential)의 변화

위의 결과에서 단일통로가 어떤 이온을 이동시키는지 확인하기 위하여 역전전압(reversal potential, E<sub>rev</sub>)을 조사하였다. Inside-out patch 상태에서 140 mM NaCl의 pipette 용액을 기준으로 bath 용액(세포내 용액)을 140 mM NaCl, 70 mM NaCl, 280 mM NaCl로 교환하면서 E<sub>rev</sub> 변화를 관찰하였다(Fig. 2 C). 역전전압은 70 mM NaCl과 280 mM NaCl에서 각각 -9.8±0.5 mV, 11.5±1.9 mV에서 역전되었다(n=4, mean±SD). 이 통로를 통하여 Na<sup>+</sup>이 이동하였다면 Nernst식에 의한 이론치는 70 mM NaCl에서 17.6 mV, 280 mM NaCl에서는 -17.6 mV로 예상되며 Cl<sup>-</sup>에 선택성을 나타낼 경우 반대인 70 mM NaCl에서 -17.6 mV, 280 mM에서 17.6 mV이므로 실험 값과 비교하였을 때 Fig. 1에 나타나는 단일 통로는 Cl<sup>-</sup>에 선택성을 나타내는 것으로 판단되었다. 다만 이론치와 실측치와의 차이는 Cl<sup>-</sup> 뿐만 아니라 Na<sup>+</sup>에 대해서도 투과성을 보이고 있다고 추측할 수 있었다. 실험 용액이 Na<sup>+</sup>과 Cl<sup>-</sup>로 조성되었을 경우 Goldman-Hodgkin-Katz constant-field equation을 사용하여 Cl<sup>-</sup> 투과도에 대한 Na<sup>+</sup> 투과도 비율(P<sub>Na</sub>/P<sub>Cl</sub>)은 약 0.25로서 Cl<sup>-</sup>가 Na<sup>+</sup>보다 약 4 배 이상의 투과도를 나타내는 것을 알 수 있었다.

투과성 이온과 역전전압의 결과로서 난자에서 관찰되는 이온통로는 Cl<sup>-</sup> 통로로 생각되었다. 이 통로의 특징적인 kinetics를 파악하기 위하여 단일 통로 전류의 전류-전압관계를 조사하였다(Fig. 2).

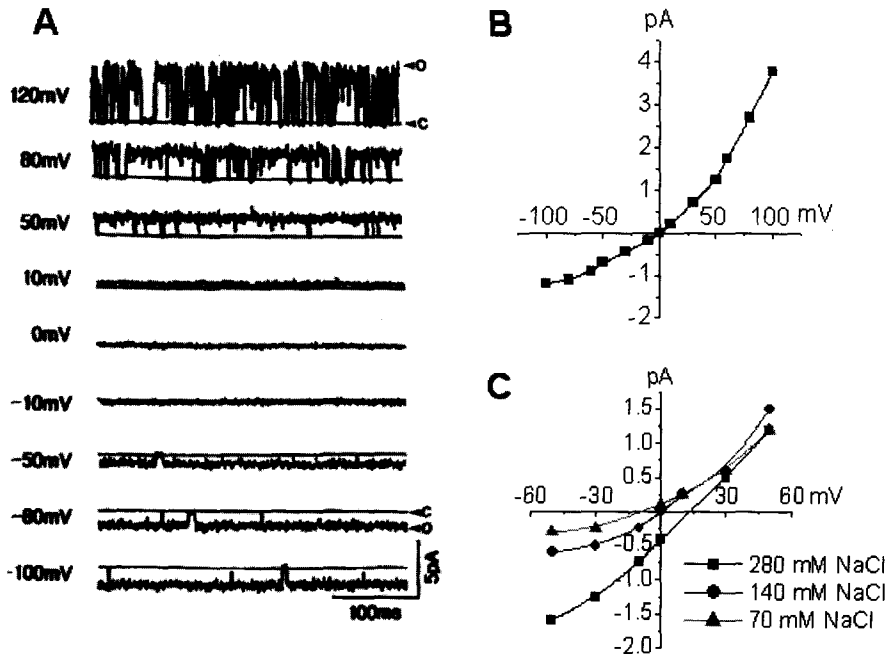


Fig. 2. A: Typical outward rectifying single  $\text{Cl}^-$  channel currents. A. Single channel currents were recorded at various membrane potentials in the presence of an impermeable cation ( $\text{NMDG}^+$ ). B: Outward rectifying current-voltage (I-V) relation in the symmetrical 140 mM  $\text{NMDG-Cl}$  in inside-out patch configuration. C: Shifted I-V relations according to the Intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration ( $[\text{Cl}^-]$ ) rather than  $\text{Na}^+$  concentration. I-V relationships were plotted at different  $\text{NaCl}$  concentration from 280 mM to 70 mM.

Inside-out patch 상태에서  $\text{Na}^+$  투과를 배제하기 위하여 140 mM  $\text{NMDG-Cl}$  용액을 사용하였다. 각 전압대별로 나타나는 전류의 trace에서 보이듯이 오랫동안 열린 상태에서 아주 짧은 시간동안 닫혔다가 열리는 양상을 보이고 있다. 이때 관찰되는 mean open time은  $43 \pm 10.2$  ms이었다( $n=9$ , 50 mV). 이는 cell attached patch 상태에서 나타나는 전류의 성상과 유사하게 관찰되었다. 이 통로의 전도도는 전류전압 곡선에서 보이는 것처럼 유지전압이 50 mV에서  $32 \pm 5.4$  pS( $n=22$ )의 전도도를 보였으며, -50mV에서는  $10$  pS $\pm 0.7$ 의 전도도로 양전압(positive potential)에서 보다 더 작은 전도도를 보여 상대적으로 높은 외향성(outward rectifying)을 나타내었다.

### 3. $\text{Cl}^-$ 통로 차단제의 효과

기록된 전류가 햄스터 난자에서 관찰되는  $\text{Cl}^-$

통로임을 강력하게 시사하고 있으므로 이를 확인하기 위하여 선택적인  $\text{Cl}^-$  차단제로 알려진 IAA-94(Indanyloxyacetic acid-94, IAA)의 효과를 관찰하였다(Fig. 3). IAA는 bovine kidney cortex에서 분리된 세포막소포에서  $\text{Cl}^-$  transport의 가장 강력한 억제제로 알려져 있다(Landry et al., 1987; Landry et al., 1989). Pipette 용액과 bath 용액은 동일하게 140 mM  $\text{NaCl}$ 로 구성하였고, inside out patch 상태에서 bath에 100  $\mu\text{M}$  IAA를 첨가하였다. 이 때 통로는 빈번하게 닫혔다가 열리는 양상이 나타났으며(flickering block), IAA를 제거하면 다시 회복되었다. IAA 효과는 pipette 내외의  $\text{NaCl}$  뿐만 아니라,  $\text{NMDG-Cl}$ ,  $\text{BaCl}_2$ 에서도 유사한 양상으로 관찰되었다. 이러한 결과만으로도  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NMDG-Cl}$ 에서 관찰되었던 통로, 즉 오랫동안 열리는 통로가 같은 종류의 통로이며,  $\text{Cl}^-$  통로임을 더욱 명확하게 시사하였다. 정상용액에서 세

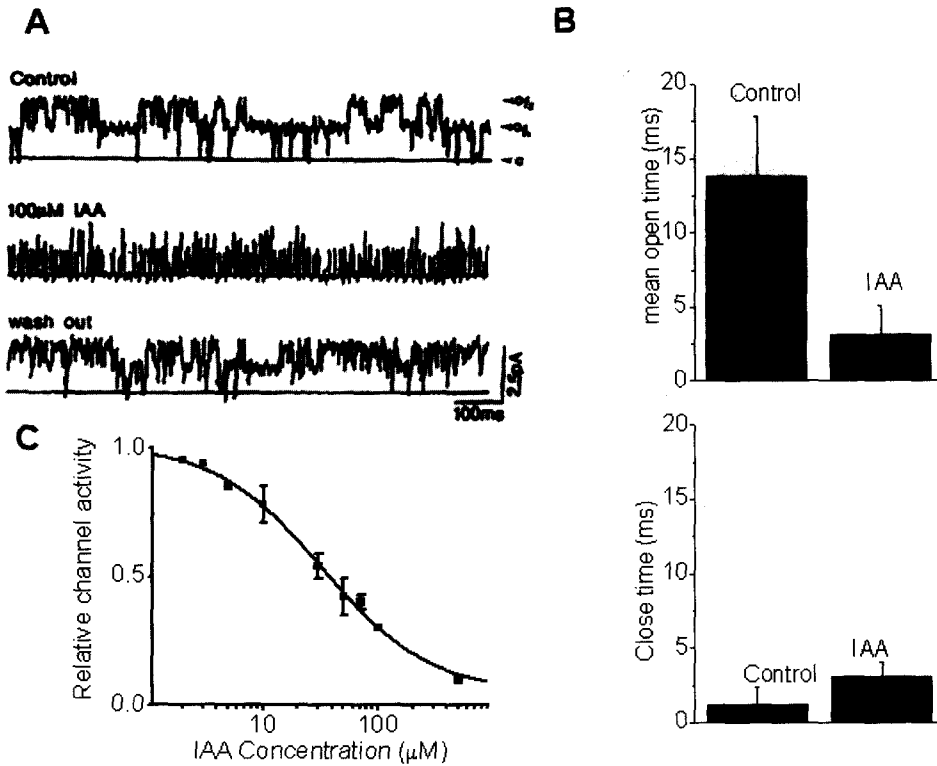


Fig. 3. Reversible blockade of the  $\text{Cl}^-$  channel by a specific  $\text{Cl}^-$  channel blocker. A: Upper trace; single channel opening before application of IAA-94, a specific  $\text{Cl}^-$  channel blocker. Middle trace; channel openings in the presence of IAA-94. Lower trace; recovered channel openings after wash out of IAA-94. B: Changes in the mean open time and the close time by IAA-94. Note that IAA-94 reduced mean open time and elevated the close time. C: Dose-dependent curve of IAA-94 on the  $\text{Cl}^-$  channel. Plot of relative channel activity vs. concentration of IAA-94. From this plot, both apparent  $\text{pK}$  ( $k_{1/2}$ ) and Hill coefficient were determined. The data were fitted to the Hill equation,  $y = 1/(1 + (k_{1/2}/[\text{IAA}])^n)$ , where  $k_{1/2}$  is the  $[\text{IAA}]$  at which half maximal inhibition occurs and  $n$  is the Hill coefficient.

포내를 IAA로 바꾸어 주었을 때의 mean open time( $\tau_o$ )과 mean close time( $\tau_c$ )는 IAA를 넣지 않은 정상용액의  $\tau_o$ 는 16.7 ms였으나 100  $\mu\text{M}$  IAA를 넣었을 때  $\tau_o$ 이 2.3 ms로 현저히 감소하였으며,  $\tau_c$ 도 정상일 경우에는 0.92 ms였으나 IAA를 처리하였을 경우에는 1.5 ms로 증가하였다( $n=10$ , Fig. 3B). 이 때  $\tau_c$ 는 NMDG-Cl에서 기록했을 때보다 훨씬 작았는데 이 또한 양이온과 음이온간의 투과도의 간섭 때문인 것으로 생각되었다. IAA로 처리하였을 경우와 처리하지 않았을 경우(control)를 비교할 수 있었다(Fig. 3B). 또한 이 통로는 IAA 농도

증가에 따라 차단 정도가 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 3C). IAA가 없는 상태에서는 독립적인 두 개의 통로가 잘 관찰되고 있으며, 농도가 증가할수록 flickering block도 자주 관찰되었다.

이 결과를 Hill equation으로 계산하였을 때 절반의 억제효과를 나타내는 농도( $\text{IC}_{50}$ )는 32.6  $\mu\text{M}$ 이었으며 Hill 상수는 0.93이었다(Fig. 3 그림설명 참조). Landry 등(1989)은  $\text{IC}_{50}$ 의 값이 2  $\mu\text{M}$ , Tilmann 등(1991)은 8  $\mu\text{M}$ 임을 감안할 때 거의 같은  $\mu\text{M}$  수준임을 확인할 수 있었다. 또한  $\text{Cl}^-$  통로에 대한 IAA-94의 특징인 flickering block이 본 연구

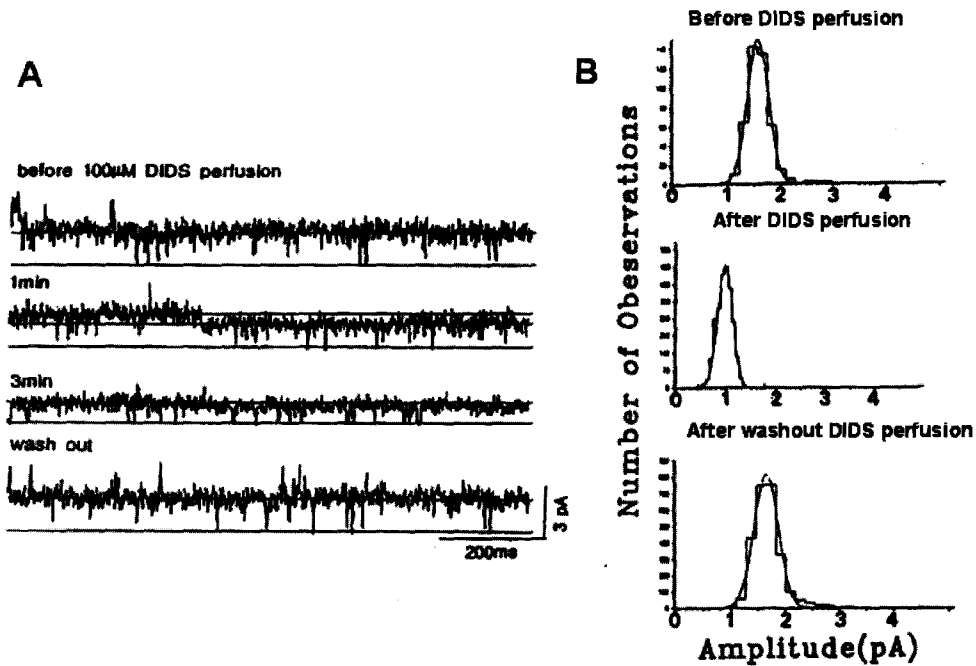


Fig. 4. Effect of DIDS on the  $\text{Cl}^-$  channel. A: example tracings of single channel currents before (top) and 1 min (second), 3 min (third) after applying DIDS, and after wash out DIDS (low trace). B: Reduced amplitude of the single channel current by DIDS. Amplitude histogram obtained before perfusion DIDS is shown in the top panel, during perfusion of DIDS in the middle, and after wash out DIDS in the lower panel, respectively. These channel currents were recorded in symmetrical 140 mM NMDG-Cl at 50 mV.

의 결과와 유사하였다.

본 연구에서 관찰된 통로가  $\text{Cl}^-$  통로임을 더욱 확인하기 위하여 다른 종류의  $\text{Cl}^-$  통로 차단제인 DIDS의 효과를 관찰하였다(Fig. 4). 이온통로를 차단하는 양상이 세포내에 IAA로 바꾸어 준 것과는 달리 flickering block이 아니라, amplitude가 줄어드는 fast block이 관찰되었고, 시간이 지나면서 sublevel로 차단되는 subconductance block이 나타났다. 100  $\mu\text{M}$  DIDS를 넣고 난 후 1 분 후보다 3 분 후에 단일 통로전류 크기가 점진적으로 억제되었다(Fig. 4B). 이러한 subconductance level은 햄스터 난자에서  $\text{Cl}^-$  전류를 기록하면서 관찰할 수 있었다.

## 고 찰

### 1. 햄스터 난자에서 존재하는 $\text{Cl}^-$ 통로

본 연구는 포유류인 햄스터 난자에서 단일  $\text{Cl}^-$  통로의 존재를 처음으로 확인하였다. 단일  $\text{Cl}^-$  통로가 존재한다는 증거로서 첫째 1가 양이온  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CsCl}$ 로 구성된 용액에서 뿐만 아니라 2가 양이온인  $\text{BaCl}_2$ , 이에 더하여 세포막을 투과하지 못하는 TMA-Cl이나 NMDG-Cl로만 조성된 용액에서도 공통적으로 관찰된다. 둘째, 이 통로는 모두  $\text{Cl}^-$  통로 차단제에 의해 억제되었고, 셋째, 역전전압의 이동이  $\text{Cl}^-$  평형전압( $E_{\text{Cl}}$ )과 유사하였기 때문이다. 만약 NMDG $^+$ 나 TMA $^+$ 가 세포막을 통과한다고 가정할 경우 역전전압의 변화가  $E_{\text{Cl}}$ 과는 반대로 방향으로 이동하였을 것이다. 그러나 본 연구에서는 역전전압의 변화가  $E_{\text{Cl}}$  반대 방향으로 이동하지 않았으므로 본 연구에서 관찰된 전류는  $\text{Cl}^-$  이온의 이동에 의한 것이라고 판단하였다.

다만 단일  $\text{Cl}^-$  통로전류는 같은 개체 양상을 나

타내면서도 NaCl이나 CsCl로 조성하였을 때 25 pA 크기로 관찰되었고 비투과성의 TMA-Cl이나 NMDG-Cl로 조성하였을 때 38 pA 내외, BaCl<sub>2</sub> 환경에서는 50 pA대이었다. 비투과성의 NMDG<sup>+</sup>나 TMA<sup>+</sup> 환경의 35 pA를 기준으로 1 가 양이온 환경과 BaCl<sub>2</sub> 환경에서 각각 12~13 pA 크기의 동일한 편차를 나타내었다. 이런 차이는 역전전압을 산출하면서 GHK 공식을 이용하여 실험치를 보정하면서 0.25로 나타난 상대적 투과도를 고려할 필요가 있다. Na<sup>+</sup>나 Cs<sup>+</sup>와 같은 1 가 양이온이 Cl<sup>-</sup>와 함께 이동한다면 Na<sup>+</sup>이 Cl<sup>-</sup>와 전기적으로 상쇄되어 그만큼 전류 크기가 감소할 수 있을 것이다. 반면 BaCl<sub>2</sub> 환경에서는 오히려 2 가 양이온이 Cl<sup>-</sup> 이동을 촉진시켜 전류가 더욱 크게 나타난 결과로 생각할 수 있다.

## 2. 햄스터 난자에서 관찰된 Cl<sup>-</sup> 통로의 특징

본 연구에서 관찰된 Cl<sup>-</sup> 통로에서 몇 가지 특징이 관찰되었다. 그 중의 하나로서 통로가 닫혀 있을 때보다 열려 있을 때 훨씬 잡파(noise)가 심한 것처럼 관찰된 점이다. 이는 막전압이 주어지는 동안 매우 빠르게 작동되는 통로의 개폐일 수도 있으나 기록장치의 여과능력 한계로 인하여 noise로 표현될 가능성도 배제할 수 없다.

두 번째 특징은 햄스터 난자에서 관찰된 Cl<sup>-</sup> 통로는 cell-attached patch 상태에서 기록할 수 있는 경우가 12.7% 내외 정도로 무척 드물고(71 개의 patch 중 9 개의 patch), inside out patch를 형성한 후에도 수분이 경과한 후에 관찰할 수 있었다. 이때문에 통로를 활성화시키기 위해서는 햄스터 난자에서 종종 막전압을 과도하게 과분극시켜, 아주 조용하던 patch(silent patch)에서 통로를 활성화시킬 수 있었다. 이와 유사한 활성화조건은 신경세포나 근육세포에서 보고된 바 있다(Kirck et al., 1991; Kunzelmann et al., 1991; Gray et al., 1984; Schwarze and Kolb 1984; Blatz and Magleby, 1983). 통로의 비활성에 이어서 수 분만에 나타나는 활성화는 inside-out patch로부터 통로의 활성을 막는 억제요인이 사라지거나 직접적인 막전압 효과일 것이라고 추측되며(Kunzelmann et al., 1991; Schwarze and Kolb, 1984), 아직 밝혀지지 않았지만 생리학

적인 조건에서 통로활성 억제인자의 활동으로 통로활성이 제한될 수도 있다고 알려져 있다(Kirck et al., 1991; Gray et al., 1984). 본 실험에서 관찰되는 Cl<sup>-</sup> 통로의 활성화양상과 유사한 통로는 근육에서 찾아 볼 수 있다. 근육의 Cl<sup>-</sup> 통로는 200 pS 이상의 큰 전도도를 가진 Cl<sup>-</sup> 통로로서(Blatz and Magleby, 1983), 작은 전도도(30 pS)를 가진 햄스터에서와는 약간의 차이가 있으나, inside out patch 형성 후 몇 분 동안이나 통로의 활성화는 관찰되지 않았고 과도한 막전압에 의해 활성화되었다(Blatz and Magleby, 1983; Schwarze and Kolb, 1984). 또한 신경세포에서도 cell-attached patch 상태에서는 거의 관찰되지 않다가 inside out patch를 형성한 후에 비로소 활성화가 나타나는 Cl<sup>-</sup> 통로가 알려져 있다. 이와 같이 제한적인 Cl<sup>-</sup> 통로 활동은 잘 관찰되지 않아 이제까지 발표되지 못한 원인으로 추측된다.

세 번째 햄스터 난자에서 관찰된 Cl<sup>-</sup> 통로는 낮은 전도도(small conductance)를 가지며(32±5.4 pS), 전류-전압 관계곡선은 외향성(outward rectification)을 보인다는 점이다. Outward rectification을 보이는 통로는 다양한 세포에서 관찰된다 (Gosling et al., 1995; Arreola, 1995, Hanrahan & Tabcharani, 1990; Jorissen et al., 1990; Tabcharani et al., 1989). 외향성의 Cl<sup>-</sup> 통로를 지닌 세포는 대부분 비흥분성 상피세포이고 이 세포는 무기물질과 이온들을 이동시키고, pH를 조절하는데 기여한다고 알려져 있다(Janssen & Sims, 1995). 그리고 pH 조절은 mouse 난자에서도 Cl<sup>-</sup>에 의한 것이라고 보고되었으므로(Zhao et al., 1995), hamster 난자에서 존재하는 Cl<sup>-</sup> 전류가 상피세포나 mouse 난자에서처럼 무기물질의 이동이나 pH 조절에도 관여할 수 있을 것이다.

## 3. 햄스터 난자에서 Cl<sup>-</sup> 통로의 약리학적 효과

햄스터 난자에 존재하는 Cl<sup>-</sup> 통로의 약리학적 인 성상을 살펴보면 stilbene sulphonate 유도체인 DIDS에 의해 차단되는 기전이 전류의 크기가 감소하는 fast blocker로 작용하지만, 단일통로전류가 완전 차단되는 것이 아니라 차단되지 않는 부분이 존재하고, 열린 상태와 subconductance level 사이



를 fluctuation하는 것으로 보아 subconductance block이라고 판단되었다. 즉 비특이적인  $Cl^-$  통로 차단제로 알려진 DIDS에 의한 효과는 시간이 흐름에 따라 substate를 두고 차단되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 차단 효과는 여러 개의 substate를 가진 통로가 시간이 흐르면서 하나씩 활성화되어 생길 것이라고 가정하였다(Miller and White, 1984). 햄스터 난자에서 관찰되는  $Cl^-$  통로도 비슷한 양상을 보이는데 이는  $Cl^-$  통로가 substate를 가지고 있을 가능성을 제시한다. 햄스터 난자에서 DIDS에 의한 통로의 완전한 차단은 관찰할 수 없었으며, Miller와 White의 보고(1984)와는 달리 가역적으로 회복됨을 관찰하였다. DIDS에 의한 차단 효과가 가역적으로 회복된다는 결과는 몇몇 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Kunzelmann et al., 1991). 또한 substate의 존재와 substate로 전류의 크기가 줄어드는 유사한 결과도 1996년 Winegar 등에 의해 보고된 바 있다.

#### 4. 햄스터 난자에 존재하는 $Cl^-$ 통로의 생리학적인 의의

이제까지 hamster 난자에서  $Cl^-$  통로에 관한 보고는 없었기 때문에 이 통로의 생리적 역할에 관하여 명확하게 언급할 수는 없다. 다만, 포유동물인 hamster 난자가 안정막 전압을 유지하고 있고 난관액 속에서 수정 전까지 생존을 유지하는 독립적인 세포라는 점을 생각한다면 난관액과의 물질 이동이나 난자의 항상성을 보존하는 데 기여할 것이라는 추론을 내릴 수 있다. 그리고 세포용적 변화에 대응하는 데 있어서  $Cl^-$  통로가 한 몫을 할 것이라는 것도 난자가 저장성 용액에 노출되었을 때 나타나는 세포용적감소 기전에서도 추측할 수 있다(Choi et al., 1996). 이와 같은 단편적인 근거는 저장성 삼투자극으로 이루어지는 처녀생식(parthenogenesis)에 대한  $Cl^-$  통로 기능과 관련된 단서를 제공할 수 있다. 저장성 용액에서 물의 이동이 가속화되어 나타나는 microfilament system의 변화가 이루어진다고 알려져 있다(Kaufman, 1983; Kaufman and Surani, 1974). 처녀생식은 세포막 구조인 cytoskeleton의 변화를 의미하므로 햄스터 난자에 stretch-activated channel(SAC)이 존재하고 이

통로가  $Cl^-$ 와 연관성이 있다는 추측을 할 수 있다. 실제로 SAC와 저장성 용액에 의해 활성화되는 이온전류가 일치하는 세포가 있기 때문이다(Filipovic & Sackin, 1992). 이런 추리가 다소 비약적일 수 있으나 본 연구에 후속으로 이루어진 햄스터 난자에서 SAC가 관찰되었으며 이 통로는  $Cl^-$  의존적이기 때문이다(data not shown).

또한 이온통로의 활성화와 세포주기와 관련 있다는 보고는 ascidian embryo, B lymphocyte(Coombs et al., 1992; Block and Moody, 1990), fish나 mouse embryo에서 제시되었다(Day et al., 1993; Medina and Bregestivski, 1991). Fish embryo에서는 직접적으로 stretch에 민감하게 반응하고 이 stretch에 반응하는 통로가 세포주기에 따라 달라지며 세포의 분화에 기여한다(Medina & Bregestivski, 1991).

이처럼  $Cl^-$  통로는 난자에서 세포의 분화와 관련되어 용적 조절에 기여한다. 햄스터 난자에서도  $Cl^-$  통로의 존재가 증명되었으므로 이 통로의 역할이 주목된다.

## 적 요

본 연구는 포유류인  $Cl^-$  통로의 존재 여부를 확인하기 위하여 수행되었다.  $Cl^-$  통로는 비흥분성 세포에서 용적변화와 pH 조절, 이온운반체 등에 중요한 역할을 수행하므로 활발한 세포분화가 이루어지는 난자의 생존과 기능에 필수적  $Cl^-$  통로 존재 여부를 확인하고자 하였다. 단일통로 전류를 기록하는 patch clamp 기법을 이용하였다. 세포의 (pipette) 용액을 140 mM NaCl로 하고 세포내 (bath) 용액을 70 mM, 140 mM, 280 mM NaCl로 바꾸어 주었을 때, 역전전압( $E_{rev}$ )은  $Cl^-$  평형전압을 반영하는  $-9.8 \pm 0.5$  mV, 0 mV,  $11.5 \pm 0.2$  mV로 변화하였다( $n=4$ ). 이런 결과는 이론치와 약간의 편차를 보이고 있으므로 이를 보정하기 위한 Goldman-Hodgkin-Katz(GHK) 식을 이용한 결과  $Cl^-$ 에 대한  $Na^+$ 의 투과성 ( $P_{Na}/P_{Cl}$ )은 0.25로 추측할 수 있었다. Inside out patch mode에서 pipette 용액과 bath 용액에 impermeant 인 NMDG-Cl로 구성하였을 경우 단일 통로가 기록되었다( $n=22$ ). 막전압이

증가함에 따라 전도도(conductance)가 같이 증가하였으며 전류-전압 관계는 outward rectification을 보였다. 이런 특성을 나타내는 단일통로 전류는 선택적 Cl<sup>-</sup> 통로 차단제인 IAA-94(indanyloxyacetic acid 94)에 의해 농도 의존적으로 차단되었으며 가역적으로 회복되었다. IAA의 IC<sub>50</sub>은 32.6 μM 이었다. DIDS(4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid)에 의해서는 전류크기가 감소되는 빠른 억제 기전을 나타내는 차단효과를 보였으며 시간경과에 따라 sublevel로 감소되는 subconductance block이 나타났다.

이상의 결과는 햄스터 난자에서 chloride 통로가 존재하며, 물질이동과 pH 조절기능을 나타내는 외향성 전류-전압관계를 보이는 Cl<sup>-</sup> 통로의 성상으로 미루어 볼 때 난자의 pH 조절과 용적조절과 같은 생리적 환경 조성에 관여할 것으로 추측된다.

### 참고문헌

- Ackerman MJ, Wickman KD and Clapham DE. 1994. Hypotonicity activity a native chloride current in *Xenopus* oocyte. *J. Gen. Physiol.*, 103:153-179.
- Akbarali HI and Giles WR. 1993. Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current in rabbit oesophageal smooth muscle. *J. Physiol.*, 460:117-133.
- Alger BE. 1985. GABA and Glycine : Postsynaptic actions. In : Neurotransmitter actions in the vertebrate nervous system. (Rogawski, M. A., and Barker. J. L. editors). Plenum press, 33-69.
- Arellano RO and Miledi R. 1993. Novel Cl<sup>-</sup> currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocyte. *J. Gen Physiol.*, 102:833-857.
- Arreola J, Melvin JE and Begenisich T. 1995. Volume-activated chloride channels in rat parotid acinar cells. *J. Physiol.*, 484(3):677-687.
- Blatz AL and Magleby KL. 1983. Single voltage-dependent chloride selective-channels of large conductance in cultured rat skeletal muscle. *Biophys. J.*, 43 : 237-241.
- Block ML and Moody WJ. 1990. A voltage-dependent chloride current linked to the cell cycle in ascidian embryos. *Science.*, 247 (4946): 1090-1092.
- Cala PM. 1990. Principle of cell volume regulation ion flux pathways and the role of anions. In : Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells(Alvarea- Leefmans, F. J. and Russell. J. M. editors). Plenum press, 67-83.
- Choi WY, Kim YM, Haan JH, Huh IO, Park CO, Hong SG, Ryu PD and Kim JS. 1996. Ionic currents elicited by the hypotonic solution in hamster eggs. *Kor. J. Vet. Res.*, 36(2):305-312.
- Coombs JL, Viliatz M and Moody WJ. 1992. Changes in voltage-dependent ion currents during meiosis and first mitosis in eggs of an ascidian. *Dev. Biol.*, 153:272-282.
- Day ML, Pickering SJ, Johnson MH and Cook D I. 1993. Cell-cycle control of a large-conductance K<sup>+</sup> channel in mouse early embryos. *Nature*, 365:560-562.
- Duszyk M, Liu D, Kamosinska B, French AS and Paul Man SF. 1995. Characterization and regulation of a chloride channel from bovine tracheal epithelium. *J. Physiol.*, 489(1):81-93.
- Ehara T and Matsuura H. 1993. Single-channel study of the cyclic AMP-regulated chloride current in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 464:307-320.
- Ehara T and Ishihara K. 1990. Anion channels activated by adrenaline in cardiac myocytes. *Nature*, 347:284-286.
- Filipovic D and Sackin H. 1992. Stretch and volume-activated channels in isolated proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.*, 262:F857-F870.
- Frizzell RA and Halm DR. 1990. Chloride channels in epithelial cells. *Current Topics in Membranes Transport*, 37:247-282.
- Gosling M, Smith JW and Poyner DR. 1995. Characterization of a volume-sensitive chloride current in rat osteoblast-like (ROS 17/2.8) cells.

- J. Physiol., 458(3):671-682.
- Gray PTA, Bevan S and Ritchie JM. 1984 High conductance anion-selective channels in rat cultured Schwann cells. Proc. R. Soc. London Ser., 221:395-409.
- Greenwood IA and Large WA. 1996. Analysis of the time course of calcium-activated chloride "tail" currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. Pflugers Arch., 432:970-979.
- Hagiwara S and Jaffe LA. 1979. Electrical properties of egg cell membranes. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 8:385-416.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch., 391:85-100.
- Hanrahan JW and Tabcharani JA. 1990. Inhibition of an outwardly rectifying anion channel by HEPES and related buffers. J. Memb. Biol., 116:65-77.
- Janssen LJ and Sims SM. 1995. Ca<sup>2+</sup>- dependent Cl<sup>-</sup> current in canine tracheal smooth muscle cells. Am. J. Physiol., 269:C163-C169.
- Jentsch TJ. 1993. Chloride channels. Current Opinion in Neurobiology, 3:316-321.
- Jorissen M, Vereecke J, Carmeliet E, van den Berghe H and Cassiman JJ. 1990. Outward-rectifying chloride channels in cultured adult and fetal human nasal epithelial cells. J. Memb. Biol., 117:123-130.
- Kaufman MH and Surani MAH. 1974. The osmolarity of mouse parthenogenesis. J. Embryol. Exp Morph., 31:513-526.
- Kaufman MH. 1983. Early mammalian development: Parthenogenetic studies. Cambridge, Cambridge University Press.
- Krick W, Disser J, Hazama A, Burckhardt G and Fromter E. 1991. Evidence for a cytosolic inhibitor of epithelial chloride channels. Pflugers Arch., 418:491-499.
- Kunzelmann K, Tilmann M, Hansen CP and Greger R. 1991. Inhibition of epithelial chloride channels by cytosol. Pflugers Arch., 418:479-490.
- Kusano K, Miledi R and Stinnakre J. 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. J. Physiol., 328 :143-170.
- Landry DW, Akabas MH, Rehead C, Edelman A, Cragoe EJ Jr and Al-Awqati Q. 1989. Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. Science, 244:1469-1472.
- Landry DW, Reitman M, Cragoe EJ Jr and Al-Awqati Q. 1987. Epithelial chloride channel : Development of Inhibitory Ligands. J. Gen. Physiol., 90:779-798.
- Lang F, Ritter M, Woll E, Weiss H, Haussinger D, Hoflacher J, Maly K and Grunicke H. 1992. Altered cell volume regulation in ras oncogene expressing NIH fibroblasts. Pflugers. Arch., 420:424-427.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S and Lass Y. 1982. Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. Nature, 298(5):572-574.
- Mayer ML. 1985. A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in culture. J. Physiol., 364: 217-239.
- Medina I and Bregestovski P. 1991. Sensitivity of stretch-activated K<sup>+</sup> channels changes during cell-cleavage cycle and may be regulated by cAMP-dependent protein kinase. Proc. R. Soc. Lond., 245:159-164.
- Miledi R and Woodward RM. 1989. Membrane currents elicited by prostaglandins, atrial natriuretic factor and oxytocin in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. J. Physiol., 416:623 -643.
- Miller C and White MM. 1984. Dimeric structure of Cl<sup>-</sup>-channel from torpedo electroplax. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:2772-2775.

- Pacaud P, Loirand G, Lavie JL, Mironneau C and Mironneau J. 1989. Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch.*, 413: 629-636.
- Schwarze W and Kolb HA. 1984. Voltage - dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membrane. *Pflugers Arch.*, 402: 281-291.
- Takahashi T, Neher E and Sakmann B. 1987. Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5063-5067.
- Tabcharani JA, Jensen TJ, Riordan JR and Hanrahan JW. 1989. Bicarbonate permeability of the outwardly rectifying anion channel. *J. Memb. Biol.*, 112:109-122.
- Tilmann M, Kunzelmann K, Frobe U, Cabantchik I, Lang HJ, Englert HC and Greger R. 1991. Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. *Pflugers Arch.* 418:556- 563.
- Thomas RC. 1984. Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. *J. Physiol.*, 354:3-22.
- Villaz M, Cinniger JC and Moody WJ. 1995. A voltage-gated chloride channel in ascidian embryos modulated by both the cell cycle clock and cell volume. *J. Physiol.*, 488(3):689-699.
- Webb DJ and Nuccitelli R. 1985. Fertilization potential and electrical properties of the *Xenopus laevis* egg. *Dev. Bio.*, 207(2):395-406.
- Weingar BD, Haws CM and Lansman JB. 1996. Subconductance block of single mechanosensitive ion channels in skeletal muscle fibers by aminoglycoside antibiotics. *J. Gen. Physiol.*, 107(3):433-443.
- Weiss DS and Magleby KL. 1990. Voltage dependence and stability of the gating kinetics of the fast chloride channel from rat skeletal muscle. *J. Physiol.*, 426:145-176.
- Zhao Y, Chauvet PJ, Alper SL and Baltz JM. 1995. Expression and function of bicarbonate/chloride exchanges in the preimplantation mouse embryo. *J. Bio. Chem.*, 270 (41):24428-24434.

---

(접수일: 2004. 5. 2/ 채택일: 2004. 7. 10)