

## 햄스터난자에서 신전에 의해 활성화되는 통로의 정상

김 양 미 · 홍 성 근<sup>†</sup>  
충북대학교 의과대학 생리학교실

## Characterization of the Stretch-Activated Channel in the Hamster Oocyte

Y. M. Kim and S. G. Hong<sup>†</sup>

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

### SUMMARY

Stretch-activated channels (SACs) responds to membrane stress with changes in open probability ( $P_o$ ). They play essential roles in regulation of cell volume and differentiation, vascular tone, and in hormonal secretion. SACs highly present in *Xenopus* oocytes and *Ascidian* oocytes are suggested to be involved in the regulation of pH and fluid transport to balance the osmotic pressure, but remain unclear in mammalian oocytes. This study was investigated to find the presence of SACs in hamster oocytes and to examine their electrophysiological properties. To infer a role of SAC in relation to the development of early stage, we followed up to the stage of two-cell zygote with patch clamp techniques.

Single channels were elicited by negative pressure (lower than  $-15$  cmH<sub>2</sub>O). Interestingly, SACs were dependent on permeable cations such as Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>. As permeable cation removed from both sides across the membrane, SAC activity completely disappeared. When permeable cations present only in intracellular compartment, outward currents appeared at positive potentials. In contrast to this, inward currents occurred only at the negative voltage when permeable cation absent in cell interior. These result suggests that SAC carry cations through the nonselective cation channel (NSC channel).

Taken together, we found that stretch activated channels present in hamster oocyte and the channel may carry cations through NSC channels. This stretch activated-NSC channels may play physiological role(s) in oocyte growth, maturation, fertilization and embryogenesis in fertilized oocytes to two-cell zygotes of hamster.

(Key words : stretch activated channel, hamster oocyte, nonselective, cation)

### 서 론

세포가 저장성 용액에 노출되거나 세포막 장력이 증가하거나 압력에 의하여 세포막의 물리적 변

---

본 논문은 한국과학재단(KOSEF, 과제번호; 961-0701-004-2) 및 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

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

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

형이 일어날 때 세포는 통로의 활성을 변화하여 이런 물리적 변화에 반응하여 새로운 환경 속에서도 항상성(homeostasis)을 유지한다. 삼투압 또는 stretch와 같은 물리적 변성이 이루어질 때 활성이 이루어지는 통로를 stretch-activated channel(SAC)라고 한다. 실험적으로는 pipette에 음압을 가하면 세포막과 접하고 있는 pipette tip 안의 세포막 부분(membrane patch)이 pipette 내로 빨려들어 오면서 신전(stretch)이 이루어질 때 음압이 걸린 membrane patch에 존재하는 통로의 활성을 유발시킨다. 이런 SAC는 골격근(Guharay & Sachs, 1984), 달팽이의 심근(Brezden et al., 1990; Sigurdson et al., 1989), 신경세포(Yang et al., 1987), 혈관상피세포(Lansamn et al., 1987) 세뇨관 상피세포(Sackin, 1987), 난자와 적혈구(Yang and Sachs, 1988) 등에서 관찰되고 있다. 뿐만 아니라 미생물인 bacteria(Martinac et al., 1987), yeast 이외에도 식물세포(Falke et al., 1988) 등 거의 모든 생물계에서 분포하고 있다. 이 통로는 mechanoreception(Guharay & Sachs, 1984), 세포의 용적조절(Christensen, 1987), 혈관반사(Lansman et al., 1987; Lansamn, 1988; Olesen et al., 1988)나 세포의 분화(Franco & Lansman, 1990) 및 atrial natriuretic peptide(ANP or ANH)의 분비에 기여한다. 이와 같이 세포생존에 절대적인 역할을 수행할 것으로 추측되는 SAC는 양이온인  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  뿐만 아니라 음이온인  $\text{Cl}^-$ 에 투과성을 가지는 것도 있다(Sigurdson et al., 1989; Martinac et al., 1987). 특이 cation selective SAC는 inward rectifying을 보이기도 하며  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  등에 투과성을 보인다고 알려져 있다(Yang and Sachs, 1990, 1993). NSC 와 SAC의 연계 가능성이 강력하게 시사되고 있다(Reifarth et al., 1999).

최근 들어 정자에서 cation channel이  $\text{Ca}^{2+}$  유입( $\text{Ca}^{2+}$ -entry)을 제공하여 수정 전 acrosome reaction을 조절한다는 보고가 있어 NSC의 중요성이 인지되기 시작했다(Jungnickel et al., 2001). 난자에서도  $\text{Ca}^{2+}$ -entry는 세포막전압의 변화와 난자의 활성화 과정에 필수적이지만 정자와 같이 NSC channel 경로를 통한 것은 확인되지 않고 있다.

세포막의 신전이 예상되는 저장성 속(hypotonic

shock)에 의한 처녀생식(parthenogenesis)의 발생(Kaufman and Surani, 1974; Kaufman, 1983)은 우리가 보고하는 세포막의 변형을 유도하는 세포막 신전에 의해 활성화되는 SAC에 의해 조절될 가능성이 있다. SAC가 NSC와 연관되어 있다면 더욱 더 수정 또는 처녀생식시 난자의 활성화 과정을 설명하는데 있어서 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다. 이런 가능성은 *Xenopus* oocyte에서의 SAC가 난자의 성숙, 수정, 분화, 배아발생에 관여할 가능성이 있다는 연구결과로도 짐작될 수 있다(Wilkinson et al., 1998; Weber, 1999a; Weber, 1999b). 위와 같이 실험적으로 크고 손쉽게 다룰 수 있는 *Xenopus* oocyte나 *acidian* oocyte에서 SAC의 존재와 정상 및 기능에 대한 연구는 많이 있지만(Yang and Sach, 1988; Moody and Bosma, 1989; Hamill and Macbride, 1992; Medina and Bregestovski, 1988), 실험기법 적용이 어려워 정작 포유류 난자에서 SAC에 대한 직접적인 증거는 아직 확인되지 않고 있다. 이에 본 연구는 포유류인 햄스터의 난자에 직접 patch clamp 기법을 적용하여 세포막 신전에 의해 활성화되는 통로를 규명하고 그 성상을 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 햄스터 난자의 분리

6 주령 이상의 Chinese 햄스터 암컷을 대상으로 실험개시 전 60 시간 전에 20 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin)을, 12 시간 전에 20 IU hCG (human chorionic gonadotrophin)을 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. 배란이 이루어졌다고 확인된 햄스터 암컷의 복강을 열고 난관 팽대부를 분리하여 정상 Tyrode 용액에 담고 가늘게 뽑은 glass tube를 난관내에 삽입하고 flushing하여 난자를 수집하였다. 수집된 난자를 둘러싸고 있는 cumulus cell은 hyaluronidase로 분리시키고 투명대(zona pellucida)로 녹여 세포막의 성상이 변하지 않도록 하였다. 투명대가 제거된 난자를 식염수로 여러 번 세척하고 난자 1~2 개씩 35 mm petri dish에 담아 실험에 사용할 것만 남겨두고 4 °C에 보관하여 계속실험에 이용하였으나 분리한지 8 시

간 이후의 난자는 실험 대상에서 제외하였다.

## 2. 수정란의 분리

동물은 오전 5시에 백열등이 켜지고, 오후 7시에 백열등이 꺼지는 방에서 낮을 14시간, 밤을 10시간으로 하여 사육하였으며, 실험동물을 2 주 이상 적응시킨 후 교미대상에 적용하였다. 1-세포기 수정란(fertilized zygote)은 hCG 주사 후 암컷 한 마리당 수컷 두 마리를 합사시켜 교미를 유도한 후 다음날 아침 질 도말을 하여 정자를 확인하고 미수정란과 같은 시간에 1-세포기 수정란을 분리하였다.

## 3. 실험용액

SAC 기록에 사용되는 기본 pipette 용액은, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub>, 2 mM, CsOH/EGTA 2 mM, HEPES 10 mM (pH 7.4)로 조성된 용액을 사용하고, cation selectivity를 관찰하기 위해 Na<sup>+</sup> 대신, 같은 농도로 Cs<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, TMA<sup>+</sup>(tetramethylammonium), Ba<sup>2+</sup>, Choline 등을 사용하였다. 불필요한 양이온의 이동을 막기 위하여 NMG (N-methyl D glucamine, 일명 meglumine)나 methansulphonate를 사용하였다. HEPES buffer는 일부 세포에서 Tricine buffer로 바꿔 사용하면서 비교하였다. 필요한 경우 dimethylsulfoxide(DMSO)를 용매로 하는 약제를 사용할 때는 DMSO의 농도가 0.1% 이내에서 유지되도록 조절하였다.

## 4. 이온 통로의 기록

1~2 MΩ 크기의 pipette을 sylgard coating하여 사용하고 cell-attached(C/A) patch 상태에서 적어도 5분 이상 기록한 후, 음압을 주어 기록하였다. Pipette에 가해지는 음압은 연결된 유리 물기둥의 수위를 읽어서 측정하였다. 압력의 변화는 물기둥의 높이로 결정하고 SAC는 음압이 가해지지 않으면 활성화되지 않기 때문에 항상 음압이 걸린 상태에서 10~30초 동안 기록하였다. 이 상태에서 inside-out(I/O) patch를 형성한 후 같은 전압대에서 적어도 5 분 이상씩 기록하였다. 동시에 PCM을 통하여 VCR tape에 저장하며 2 kHz 8-pole Butterworth filter를 사용하였다.

결과는 pClamp(V6.04, Axon, USA)의 분석프로그램을 이용하여 각 parameter를 구하였다. 이때 분리한지 8시간 이후의 난자에서 기록한 결과는 분석대상에서 제외하였다.

## 결 과

### 1. 햄스터 난자에서 세포막 신전에 의해 활성화되는 통로

햄스터 난자에서 pipette 내에 140 mM KCl과 같은 등장성용액으로 조성한 상태에서 자발적으로 열리는 단일 통로는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 음압을 가하면 단일 통로의 활성이 관찰되었다(Fig. 1A). 음압을 주기 전(-S)에 단일통로는 열리지 않았으나 -15 cmH<sub>2</sub>O의 음압을 주면(+S) 통로 활성이 기록되었다. 이와 같은 통로의 활성의 막전압-의존성을 알아보기 위하여 음압이 가하기 전과 음압이 주어진 상태에서 -100 mV부터 +100 mV까지 램프자극(ramp pulse, 400 ms, upper panel in Fig. 1A)에 대한 단일 통로 활성변화를 비교하였다(n=25, Fig. 1B). Fig. 1B에 제시한 것과 같이 음압에 의하여 관찰된 단일통로 전류는 음전위(negative potential) 대에서 뚜렷하게 통로의 개폐가 구분되었으나 양전위(positive potential) 대에서는 음전위대보다 적은 크기의 통로전류가 계속 열리는 특징적인 양상을 나타내었다. 전압대에 따라 달라 나타나는 통로활성의 특징은 막전압을 지속적으로 유지하면서 기록한 결과에서 분명하게 확인할 수 있었다. +50 mV에서는 0.5 pA(10 pS) 내외의 크기였으나, -50mV일 때는 1.5 pA(36 pS)이었고 통로의 닫힘이 +50 mV보다 자주 관찰되었다(Fig. 1C). 이렇게 나타나는 단일통로 전류를 전압과의 관계(current-voltage relation, I-V curve)로 나타내면 Fig. 1D에서 보여주는 바와 같이 0 mV에서 전류의 방향이 전환되며, 즉 내향전류에서 외향전류(또는 그 반대)로 바뀌며 내향전류의 크기가 외향전류보다 상대적으로 크게 나타나는 inward rectification 양상을 보였다(Fig. 1B and D). 이러한 I-V 관계는 적혈구와 난자에서 관찰된 SAC의 I-V 관계와 유사하였다(Yang & Sachs, 1990). 햄스터 난자에서 음압에 의하여 활성이 이루어지는 단일 통

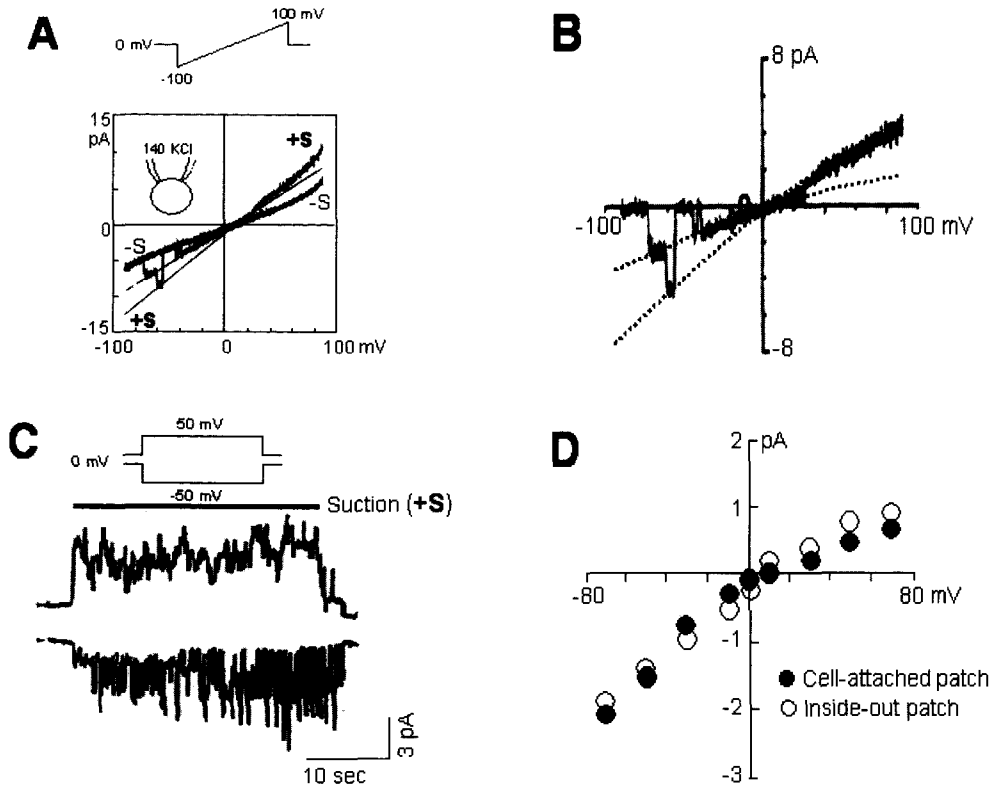


Fig. 1. Single channel currents activated by negative pressure in the hamster oocyte.

A, Single channel currents before (-S) and after applying suction (+S) in cell-attached patch configuration. Currents were recorded by applying the ramp pulse from -100 mV to 100 mV at the holding potential of 0 mV (upper panel), with 140 mM KCl in the pipette. Note two channels elicited upon applying negative pressure. B, Current-voltage (I-V) relation of the single channel current components activated by negative pressure. This I-V relation was obtained by subtracting the ramp current without pressure (-S) from that elicited by the negative pressure (+S, -15 cm H<sub>2</sub>O). This subtraction reflects the component of stretch-activated channel (SAC) current. C, Example traces of single channel activities by stretch at +50 mV (upper trace) and -50 mV (lower trace), respectively, under the condition of negative pressure (solid bar, +S) in cell attached patch configuration for 30 sec. Pipette solution contained 140 mM KCl. Voltage protocols were shown in the upper panel. D, Inwardly-rectified I-V relations of SAC. Each I-V curves were obtained from the data observed in cell-attached patch (●) and inside-out patch (○) configurations. Note similar I-V curves in both configurations.

로의 inward rectification 양상은 C/A patch에서나 cell-free I/O patch에서나 거의 같게 나타나고 있음을 확인하였다(Fig. 1D).

햄스터 난자 세포막에서 음압에 의해 세포막 장력이 발달했을 때 변형으로 활성화되는 통로는 pipette 용액에 투과 가능한 양이온 (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>)이 있

으면 관찰되었다(n=15). 이는 햄스터 난자에서 세포막의 신전에 의해 활성화되는 통로(SAC)가 있음을 시사하고 있다.

Fig. 1에서 명확하게 음압에 의해 열리는 통로가 작동하는 것을 확인할 수 있었다. 그 다음 단계로 음압에 의해 활성화된 전류가 어떤 이온에 의

해 이행되는지 알아보기 위하여 I/O patch 상태에서 세포밖(pipette)과 안(bath)의 양이온의 구성을 변화시키면서 관찰하였다(Fig. 2). 세포 안과 밖에 세포막이나 통로를 통하여 이동하지 못하는 NMG-Cl(140 mM) 용액으로 조성하고 음압을 가할 때 단일통로 전류는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2B). 그러나 세포내에 140 mM NaCl 용액으로 바꾸어 주었을 때 Fig. 2A에서 제시된 것처럼 음압에 의하여 양전압 대에서만 외향전류가 관찰되었다(n=15, lowe panel in Fig. 2A). 이는 세포막의 신전에 의해 이온통로를 통해 양이온이 세포 밖으로 나감을 의미하거나 음이온인 Cl<sup>-</sup>가 세포내로 유입되었음

을 추측할 수 있었다. 그러나 음압에 의하여 Cl<sup>-</sup>가 이동한다면 음전위(negative potential, 세포 내가 음전위를 의미함)에서 세포 밖으로 이동하여 내향 전류를 나타내야 하나 Fig. 2C에서 보이는 바와 같이 음전위대에서 내향전류는 관찰되지 않았으므로 Cl<sup>-</sup>가 이동한 결과로 해석할 수 없으므로 음압에 의해 양이온이 이동한 결과로 판단하였다.이런 음압에 의하여 나타나는 단일통로 전류는 140 mM KCl 용액에서도 관찰되므로(data not shown) 양이온의 이동은 비선택적인 양이온 통로(non-selective cation channel, NSC channel)를 통한 것으로 추측되었다.

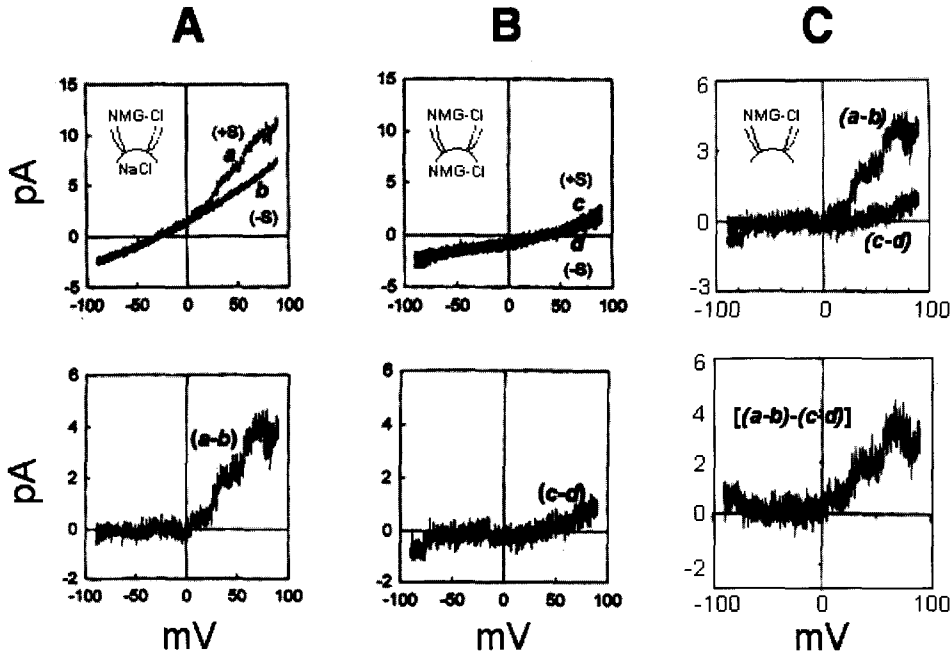


Fig. 2. Effects of the internal cationic permeant on channel currents through SAC. A Stretch-activated currents elicited by ramp pulse in the presence of internal 140 mM NaCl. Both traces *a* and *b* were recorded with (+S) and without negative pressure (-S, -15 cmH<sub>2</sub>O). The difference between two currents, reflecting the SAC current component, was shown as (*a-b*) in the lower panel. B. Disappearance of the SAC component in the absence of internal cationic permeant, NaCl. Sodium (140 mM) was replaced by equimolar impermeable cation, meglumine (NMG). Both traces *c* and *d* were recorded with (+S) and without the same negative pressure (-S) in panel A. (*c-d*) was difference between trace *c* and *d*. C. Outward current component carried by internal Na<sup>+</sup> through SAC by negative pressure. Traces designated by (*a-b*) and (*c-d*) were adopted from panel A and B, respectively. Experimental solutions were shown as insets with inside-out patch configuration in each upper panel.

음압에 의하여 열리는 통로가 NSC channel임을 확인하기 위하여 Fig. 2에 제시된 실험에서와 반대로 세포 밖(pipette 용액)에는 확산 가능한 140 mM NaCl로 조성하고 세포 안 용액 조성을 바꾸어 주면서 기록하였다(Fig. 3, n=5). 먼저 세포 내외를 동일하게 140 mM NaCl로 조성하여 음압 전후의 변화를 기록한 후(Fig. 3A), 세포 내에 비투과성의 tetramethylammonium chloride(TMA-Cl, 140 mM) 용액으로 교환한 후 음압 전후의 변화를 기록하였다(Fig 3B). 그 결과 대부분 음전위 대에서 내향전류가 관찰되었다(lower panel in Fig. 3B). 음압에 의하여 활성이 이루어지는 전류성상만을 확인하기 위하여 세포 안이 140 mM NaCl일 때와 같은 농도의 TMA-Cl일 때의 전류의 차이를 조사하였다

(lower panel in Fig. 3C). 순수하게 NaCl에 의하여 나타나는 통로 전류는 양전압에서는 전류가 거의 관찰되지 않고 성분이 분만을 투과성 전기적 경사와 화학적 경사에 의해 대부분 음전압에서만 내향전류가 관찰되었다. Fig. 2와 Fig. 3에 나타난 결과에 의하여 햄스터 난자에서 음압에 의해 열리는 통로는 비선택적 양이온 통로(stretch-activated non-selective cation 통로, SA-NSC channel)임을 시사하였다. 이 모든 전류는 240 patch에서 55 patch에서 얻은 데이터를 평균하여 나타낸 것이다.

## 2. SAC 활성화에 대한 cAMP-dependent protein kinase (PKA)의 효과

세포막 신전이나 물리적 변형은 세포형태를 결

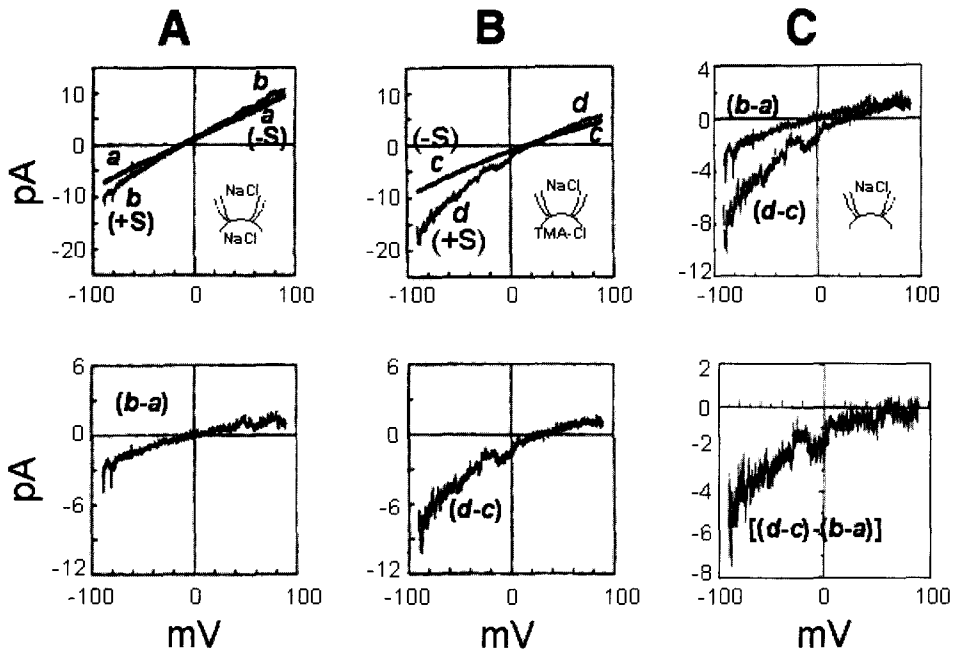


Fig. 3. Effects of the external cationic permeant on SAC current. A. Stretch-activated currents in the presence of both internal and external 140 mM NaCl. Both traces *b* and *a* were recorded with (+S) and without negative pressure (-S). The difference reflecting the SAC current component was shown as (*b-a*) in the lower panel. B. Appearance of the SAC component in the absence of internal cationic permeant, NaCl. Sodium (140 mM) was replaced by equimolar impermeable cation, tetramethylammonium (TMA). Both traces *d* and *c* were recorded with (+S) and without the same negative pressure (-S). (*d-c*) was difference between trace *c* and *d*. C. Inward current component carried by external  $\text{Na}^+$  through SAC by negative pressure. Traces designated by (*b-a*) and (*d-c*) were adopted from panel A and B, respectively.

정하는 세포 골격계(cytoskeleton)의 변형을 의미하므로 SAC의 기능은 cytoskeleton의 기능과 밀접한 것으로 추측되고 있다. 또한 세포골격계를 구성하는 tubule이나 filament의 조절에는  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase(PKC)가 보편적으로 관여하고 있다고 알려져 있다. 본 연구에서도 난자에서 관찰되는 SAC의 활성이 cytoskeleton과 관계가 있다면 cytoskeleton을 파괴하는 cytochalasin B 나 D에 의하여 SAC 활성의 변화가 생길 것으로 추정하였으나 본 연구에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 난자는 수정 후 왕성한 세포분열을 거쳐 개체로 발전하는 전 단계의 세포로서 난자에서 일어나는 분열과 성장에  $Ca^{2+}$  및 PKC와 관계가 중요한 역할을 수행한다고 잘 알려져 있다. 본 연구에서도 PKC 억제제인 sphingosine과 PKC activator인 phorbol ester를 사용하여 SAC 활성에 대한 PKC 효과를 관찰하였으나 난자마다 편차가 심하여 유의한 결과를 도출할 수 없었다(n=5). 그러나 PKC와는 달리 오히려 햄스터 난자의 SAC에 대하여 PKA가 유의한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 4). 세포질이 존재하는 C/A patch 상태에서 음압에



Fig. 4. PKA-induced increase in SAC activity. Inward currents was evoked by stretch stimuli applied to the cell-attached membrane patch held at -50 mV in the fertilized egg. SAC activities were recorded under the same negative pressure( -20 cmH<sub>2</sub>O) before adding 8 - Br cAMP (a), in the presence of 8- Br cAMP(b), and H-7 (c). Membrane permeable cAMP analogue, 8-Br-cAMP(10  $\mu$ M) and a selective PKA inhibitor, H-7(20  $\mu$ M) was directly applied to the bath solution This antagonistic effect between 8-Br cAMP and H-7 was tested in a same patch. Interruptions between tracing were deleted recording artifacts occurred during exchanging perfusates.

의하여 생성된 0.8 pA 크기의 내향전류 성분(a)은 세포막 투과성 cAMP analogue인 8-Br cAMP에 의하여 2.4 pA까지 증가하였다(b in Fig. 4). 증가된 SAC 내향전류 성분은 8-Br cAMP를 제거한 이후에도 계속 지속되나 PKA 억제제인 H-7에 의하여 50% 수준으로 감소하였다(n=3). cAMP 효과는 대개 PKA를 통하여 발휘되므로 비록 간접적인 증거이지만 SAC 활성에 PKA가 관여하는 것으로 추측되었다.

### 3. 수정 전후에 관찰되는 SAC 활동변화

난자는 수정을 통하여 할구분할이 개시되므로 세포분열시 이루어지는 세포막 변형은 곧 SAC 활성으로 이루어질 수 있다. 또한 수정 전의 난자에서 저장성 용액으로 처녀발생을 유발된다는 사실은 널리 알려져 있다. 이러한 현상에는 SAC 활성이 수반되므로 SAC가 세포분열과 생식에 결정적인 역할을 수행할 것으로 생각된다. 위의 결과에서 SAC는 다양한 활동양상을 나타내고 있으며 수정 전후에 SAC 활성이 어떻게 변하는지 관찰하였다. 본 연구를 진행하면서 세포막 신전에 의해 활성화되는 통로는 다양한 kinetics를 보였다(data not shown). 이는 단일 통로의 활동이 수정 전후의 난자에서 음압 자극에 대하여 모두 관찰되어 특징적인 변화를 확인하지 못하였다. 그러나 SAC 활동을 모두 종합하여 단일 통로의 amplitude histogram으로 분석하여 보면 수정 전과 수정 후 SAC 활동양상이 변화하였다(Fig. 5). Fig. 5는 발생단계에 따라 4-5개의 난자 및 수정란에서 기록된 SAC활동을 all-point histogram으로 분석하여 전류크기를 관찰 빈도수에 대하여 표현하였다. 흥미롭게도 수정전의 난자에서 0.6~0.8 pA 사이의 단일 통로 전류와 1.5~2.0 pA 내외의 단일 통로로가 SAC 활동의 대부분을 담당하는데 반하여(арrows, left histogram in Fig. 5B), 수정 후 1-세포기에서 2.4 및 3.2 pA 크기의 SAC 활동이 증가하였다(middle in Fig. 5B). 2-세포기에서는 큰 amplitude의 SAC 활성은 현저하게 감소하고 0.3~0.6 pA 크기의 오래 열리는 SAC가 음압에 의한 내향전류를 담당하는 것으로 추측되었다. (right in Fig. 6)

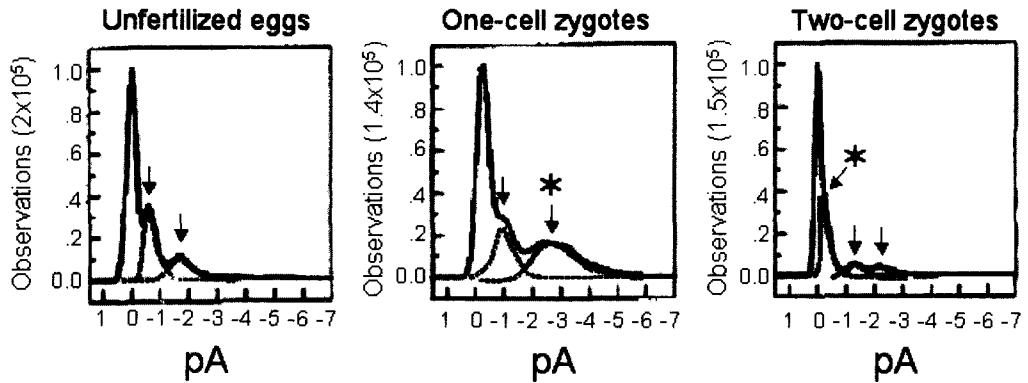


Fig. 5. Changes in SAC activities after fertilization. Amplitudes of SACs observed in three stages of development were plotted against the number of observation. Representative plots of the current amplitude at -50 mV in unfertilized eggs (left panel), 1-cell zygotes (middle) and 2-cell zygotes (right). Highest peaks in each plot at 0 pA stand for the channel closure. Amplitude peaks were fitted by the Gaussian function with Marquardt least square method supplied from the analysis program (pClamp6 V6.04, Axon, USA). Plot for unfertilized egg (left panel) was well fitted by order of 3, for the 1-cell stage egg (middle) by order of 4, and for 2-cell zygote (right) by order of 3, respectively. Histogram of SAC amplitudes were plotted against the number of observations. Number of observations in each plot were total sum from data in 6 unfertilized eggs, from 4 fertilized eggs in 1-cell stage and 4 zygotes in 2-cell stage.

## 고 찰

본 연구를 통하여 우리는 햄스터 난자에서도 stretch activated channel(SAC)이 존재하며 그 통로가 양이온만을 비선택적으로 통과시키는 nonselective cation channel임을 확인할 수 있었다. 이제까지 햄스터 난자에서 SAC에 관한 보고가 이루어지지 않아 이 통로의 구체적 역할에 관하여 언급하기는 어렵다. SAC는 대부분의 생물에서 광범위하게 존재하며 세포용적이나 pH 조절, 세포분열 및 분화와 같이 세포항상성 유지에 기본적인 역할을 담당하고 있다. 이를 전제로 한다면 본 연구에서 확인한 햄스터 난자의 SAC 통로는 난관액과 물질이동이나 난자 자체의 항상성을 보존하는데 기여할 것이라는 추론을 내릴 수 있다.

이온통로의 활성화와 세포 주기와의 관련성은 ascidian embryo, B lymphocyte(Block and Moody, 1990; Bubien et al., 1990; Coombs et al., 1992), fish나 mouse embryo에서 제시되었다(Medina and Bregestivski, 1991; Day et al., 1993). Fish embryo에서는 직접적으로 stretch에 민감하게 반응하고

이 stretch에 반응하는 통로가 세포 주기에 따라 달라지며 세포분화에 기여한다(Medina & Bregestivski, 1991). 그러나 포유류 난자는 항상 일정하게 유지되는 난관액(oviductal fluid)에서 존재하기 때문에 햄스터 난자의 SAC는 세포분열 및 분화과정에 더욱 중요한 역할을 수행할 것으로 짐작된다. 이런 추측은 햄스터 난자의 SAC 활성이 PKA에 의하여 조절되는 결과(Fig. 4)로도 유추할 수 있다. 직접적인 증거는 아니지만 소의 난자에서 PKA를 활성화시키는 cAMP는 follicular oocyte 성숙과 배발달에 매우 중요한 것으로 알려져 있으므로(Guixue et al., 2001), PKA 조절을 받는 SAC 역시 수정 전후의 난자 생존과 배발달에 직결되어 있음을 암시하기 때문이다.

본 연구에서 주목할 만한 것은 SAC이  $\text{Na}^+$ 이나  $\text{K}^+$ 과 같은 일가 양이온(monovalent cation)의 통로로 작용한다는 점이다(Fig. 2 & 3). 즉 SAC가 NSC 통로로서의 기능을 병행할 수 있다고 판단된다. 신경과 근육과 같이 분화된 세포에서 관찰되는 선택성이 높고 잘 분화된 이온통로를 갖추고 있어 해당 세포의 고유 기능에 수행하지만 이와는 달리



미분화된 원시세포인 난자에서는 SAC가 NSC로도 병행하여 작용한다면 안정막 전압의 형성과 세포 용적 조절 그리고 세포막을 통한 이온 이동 등 항상성을 유지하기 위한 필수기능이 이 통로를 통하여 이루어질 수 있기 때문이다. 하나의 통로를 통한 다양한 역할 병행은 난자 생존에 경제적인 수단으로 작용할 수 있을 것이다.

흥미롭게도 수정 후 난자에서 관찰되는 SAC의 활동양상은 2-cell 단계에서 전도도가 큰 통로의 활동이 감소하고 대신 작은 전도도를 가진 통로의 활성으로 전환되는 것을 알 수 있다(Fig. 5). 이러한 변화는 whole cell recording으로 기록한 막전압 의존성 내향전류도 세포발달에 따라 감소하고 있다는 결과와 일맥 상통한다(Haan et al., 1998). 이와 같은 변화는 세포분열이 거듭될수록 원시 세포막에 존재하는 원시적인 통로가 소멸되고 새로운 형태의 통로가 발현되는 전환기로 생각되나 이에 관한 구체적 증거를 확보하기 위해서는 더욱 세밀한 연구가 요구된다.

## 적 요

음압에 의한 세포막 신전으로 열리는 stretch-activated channel(SAC)은 세포의 부피조절, 세포의 분화, 혈관 긴장도의 조절, 호르몬 분비 조절에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 햄스터 난자에서 SAC 존재 유무를 확인하기 위하여 patch clamp 기법을 시행하여 SAC의 조절기전과 전기생리학적 성질을 조사하였다. 음압이 주어지기 전에는 관찰되지 않던 단일통로 전류가  $-20 \text{ cmH}_2\text{O}$  이하의 음압이 주어졌을 때 관찰되었다. 음압에 의해 열리는 단일통로 전류는  $\text{Na}^+$ 이나  $\text{K}^+$ 과 같은 일가 양이온이 존재할 때 관찰되었으나 대신 비투과성인 tetramethylammonium이나 meglumine과 같은 양이온으로 교환해 주면 나타나지 않았다. 이는 이 단일통로 전류가 양이온만을 투과시키는 nonselective cationic channel(NSC)을 통하여 이동하는 stretch-activated NSC(SA-NSC)임을 시사하였다. 이 SA-NSC 전류는 적혈구나 양서류 난자에서 관찰된 SAC의 전류-전압 관계와 유사한 inward rectification 양상을 나타내었으며 PKA에 의하여

통로활성이 증가하였다. 햄스터 난자에서 관찰되는 SA-NSC는 수정 전부터 2-세포 배아기까지 관찰되었으며 통로전류의 크기는 수정관과 1-세포기 배아에서 가장 크게 관찰되었으며 2-세포기 배아에서는 그 크기가 현저하게 감소하였다. 이와 같이 본 연구에서는 햄스터 난자의 발생 초기 단계에서 전기생리학적 기법을 사용하여 처음으로 SA-NSC 존재를 직접 확인하였다. 세포 항상성 유지에 필수적인 이 통로의 일반적인 속성으로 미루어 보아, 햄스터 난자의 수정 전후 난자의 활성화와 초기 배아 분화 및 발달에 필수적인 역할을 할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Block ML and Moody WJ. 1990. A voltage-dependent chloride current linked to the cell cycle in ascidian embryos. *Science*, 247 (4946): 1090-1092.
- Brezen DL and Gardner DR. 1990. Non-voltage-gated calcium channels in snail heart ventricle cells. *J. Exp. Biol.*, 150:187-203.
- Bubien JK, Kirk KL, Rado TA, and Frizzell RA. 1990. Cell cycle dependence of chloride permeability in normal and cystic fibrosis lymphocytes. *Science*, 248(4961):1416-1419.
- Christensen O. 1987. Mediation of cell volume regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  influx through stretch-activated channels. *Nature*, 5-11;330 (6143): 66-68.
- 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 DI. 1993. Cell-cycle control of a large-conductance  $\text{K}^+$  channel in mouse early embryos. *Nature*, 365:560-562.
- Falke LC, Edwards KL, Pickard BG, and Misler S. 1988. A stretch-activated anion channel in tobacco protoplasts. *FEBS Lett*, 237(1-2): 141-144.

- Franco A Jr and Lansman JB. 1990. Stretch-sensitive channels in developing muscle cells from a mouse cell line. *J. Physiol.*, 427: 361-380.
- Guharay F and Sachs F. 1984. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.*, 352:685-701.
- Guixue Z, Luciano AM, Coenen K, Gandolfi F and Sirard MA. 2001. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 55(8):1733-1743.
- Haan JH and Hong SG. 1998. Characteristics of the inward current and its changes following fertilization in hamster eggs. *Kor. J. Vet. Res.*, 38(2):280-289.
- Hamill OP and McBride DW Jr. 1992. Rapid adaptation of single mechanosensitive channels in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 89(16):7462-7466.
- Kaufman MH and Surani MA. 1974. The effect of osmolarity on mouse parthenogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 31(2):513-526.
- Kaufman MH 1983. Early mammalian development : Parthenogenetic studies. Cambridge University Press.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, and Florman HM. 2001. Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell Biol.*, 3(5):499-502.
- Lansman JB, Hallam TJ, and Rink TJ. 1987. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature*, 325(6107):811-813.
- Lansman JB. 1988. Endothelial mechanosensors. Going with the flow. *Nature*, 331(6156):481-482.
- Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, and Kung C. 1987. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 84(8):2297-2301.
- Medina I and Bregestovski PD. 1988. Stretch-activated ion channels modulate the resting membrane potential during early embryogenesis. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 235(1278):95-102.
- Medina I and Bregestovski PD. 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.
- Moody WJ and Bosma MM. 1989. A nonselective cation channel activated by membrane deformation in oocytes of the ascidian *Boltenia villosa*. *J. Memb. Biol.*, 107(2):179-188.
- Olesen SP, Clapham DE, and Davies PF. 1988. Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature*, 331(6152):168-170.
- Sackin H. 1987. Stretch-activated potassium channels in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.*, 253(6 Pt 2):F1253-1262.
- Sigurdson WJ and Morris CE. 1989. Stretch-activated ion channels in growth cones of snail neurons. *J. Neurosci.*, (8):2801-2808.
- Wilkinson NC, Gao F, and Hamill OP. 1998. Effects of mechano-gated cation channel blockers on *Xenopus* oocyte growth and development. *J. Memb. Biol.*, 165(2):161-174.
- Reifarth FW, Clauss W, and Weber WM. 1999. Stretch-independent activation of the mechanosensitive cation channel in oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1417(1):63-76.
- Weber WM. 1999a. Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments. *J. Memb. Biol.*, 170(1):1-12.
- Weber WM. 1999b. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1421(2):213-233.
- Yang XC and Sach F. 1987. stretch-activated

channels in several tissues. Biophysical. J., 51: 252a.

Yang XC and Sachs F. 1988. Stretch-activated (SA) ion channels in *Xenopus* oocytes: permeation and block. Biophysical. J., 53: 412a.

Yang XC and Sachs F. 1990. Characterization of stretch-activated ion channels in *Xenopus*

oocytes. J. Physiol., 431:103-122.

Yang XC and Sachs F 1993. Mechanically sensitive, nonselective cation channels. In Non-selective cation channels(Siemen D. and Hescheler, J., editors). Birkhauser Verlag. 79-92.

---

(접수일: 2004. 5. 10/ 채택일: 2004. 7. 20)