

Xenopus laevis oocytes에서 진세노사이드에 의하여 활성화되는 Ca^{2+} -activated Cl^- 이온 통로의 유전자 클로닝, 조직 분포 및 채널 특성

정상민 · 이준호 · 윤인수 · 나승열[#]

건국대학교 수의과대학 인삼학 및 생리학교실
(접수 2005년 12월 5일, 수리 2005년 12월 16일)

Gene cloning, tissue distribution, and its characterization of Ca^{2+} -activated Cl^- channel activated by ginsenosides in *Xenopus laevis* oocytes

Sang Min Jeong, Jun-Ho Lee, In-Soo Yoon and Seung-Yeol Nah[#]

Ginsentology Research Laboratory and Department of Physiology, College of Veterinary Medicine,
Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

(Received December 5, 2005; Accepted December 16, 2005)

Abstract : The Ca^{2+} -activated chloride channel (CLCA) was activated by ginseng total saponin (GTS) in *Xenopus* oocytes. The reverse transcription PCR (RT-PCR) method was performed with gene specific primers on oocytes. The gene specific primers were deduced from spleen cDNA in expressed sequence tags (EST) database showing high homology to the mouse CLCA. Full length of cDNA sequence was completed by linkage of several 5' and 3'-half cDNA fragments have been sequenced. We named the full cDNA to oCLCA transiently. The oCLCA gene encodes a protein of 911 amino acids with 48.9% identity overall to that of mouse CLCA (mCLCA4). A predicted oCLCA amino acids sequence shows the molecular weight of 108 kDa and has four or more transmembrane domains, and also the one hydrophobic C-terminal domain. oCLCA gene was expressed ubiquitously in various tissues included oocytes, also interfered in oocytes by siRNA for oCLCA. Here, we suggest that oCLCA is an endogenous chloride channel gene in oocytes. We are studying for the identification of oCLCA gene and further physiological research.

Key words : ginsenosides, CLCA (calcium-activated chloride channel), siRNA, RT-PCR

서 론

Ca^{2+} -activated Cl^- channels(CaCC 또는 CLCA, 이하 CLCA로 칭함)은 세포막 전압에 의존(voltage-dependent)하여 수용체 활성화 경로를 통하여 세포질 내 유리(free) 칼슘의 양이 증가하면 이 채널이 활성화되어 Cl^- 이온이 세포 안쪽으로 유입되거나 세포 바깥쪽으로 나가는 것으로 알려져 있다. CLCA의 활성화를 통한 Cl^- 이온의 유입(influx) 및 배출(efflux)은 생체 내 여러 조직에서의 다양한 생리적 기능과 무관하지 않다. 즉, 기도(airway)의 상피조직(epithelium)에서는 수분 분비(H_2O secretion)에 관여하며¹⁾, 심장에서는 cardiac

action potential의 재분극(repolarization)에 관여하며²⁾, 혈관의 vascular tone 조절 및 혈소판에서는 혈소판의 volume을 조절하는 것으로 보고 되어 있다^{3, 4)}. 또한, 신경계에서는 신경세포의 흥분성 조절에 관여하며, 감각기에 포함된 빛 수용기(photoreceptor)에도 존재하는 이 채널은 빛반응의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 생식기 중 난자(oocytes)에 존재하는 이 채널은 정자와 난자의 수정(fertilization)시에 생길 수 있는 polyspermy 현상을 차단하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 최근에 CLCA의 특성을 밝혀내기 위하여 포유류의 기도(trachea), 폐(lung) 및 유선(mammary gland)에서 이 이온 채널에 대한 유전자 클로닝이 부분적으로 이루어져 여러 종류의 CLCA subtypes들이 보고 되어 있다⁷⁻¹⁰⁾.

한편, 백서(rat)나 생쥐(mouse)처럼 실험동물로 연구실에서 널리 이용되고 있는 *Xenopus laevis*(아프리카 발톱 개구리,

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-450-4154; (팩스) 02-450-3037
(E-mail) synah@konkuk.ac.kr

이하 개구리) ovary에서 분리한 oocytes(이하 미수정란)는 CLCA가 가지고 있는 여러 특징들을 연구하는데 있어서 하나의 좋은 model system으로 알려져 있다¹¹⁾. 첫째, 개구리 미수정란에 존재하는 CLCA(s)는 다른 내인성(endogenous) 이온 통로들에 비하여 주된 형태이고, 두 번째, 개구리 미수정란에서 이 CLCA가 아주 풍부하게 발현되고 있기 때문이며, 세 번째는 개구리 미수정란에 존재하는 CLCA(s) 활성화 연구를 통하여 외인성(exogenously)으로 expression된 세포막 수용체 신호전달 경로(signal transduction pathway)를 이해하는데 아주 유용하게 이용되고 있다. 즉, 이미 알려진 수용체 유전자를 미수정란에 주사하여 발현시킨 다음 그 수용체에 대한 agonist를 처리할 경우 다음과 같은 신호 전달 과정을 관찰할 수 있다; 발현된 세포막 수용체에 ligand 결합 및 수용체 활성화 → $G\alpha_{q/11}$ 단백질 활성화 → phospholipase C(PLC) 활성화 → Inositol triphosphates(IP_3)와 diacylglycerol (DAG, PKC activator) 생성 → 생성된 IP_3 가 endoplasmic reticulum (ER; 소포체, 세포질 내 칼슘 저장장소)에 있는 IP_3 receptor 결합 및 수용체 활성화 → ER로부터 세포질 쪽으로 유리 Ca^{2+} 이온 방출 → 방출된 유리 Ca^{2+} 이온은 개구리 미수정란의 세포막에 존재하는 CLCA(s)를 활성화시킨다¹¹⁾.

이전의 보고에 따르면 처음으로 인삼의 주요 유효 성분으로 알려진 진세노사이드를 개구리 미수정란에 처리할 경우 EC_{50} 이 약 $5 \mu g/ml$ 만으로도 내인성 CLCA의 활성을 유도하는 것으로 보고하였다¹²⁾. 진세노사이드에 의한 신호전달과 관련한 특성을 연구한 결과 아직 확인되지 않은 미수정란 세포막에 존재하는 단백질과 상호 작용을 통하여 위에서 언급한 세포막 신호전달 경로를 통하여 CLCA를 활성화시킨다는 사실을 밝혀내었다¹³⁾. 또한 진세노사이드 처리에 의한 PLC 활성화는 IP_3 생성 뿐만 아니라 PKC(단백질인산화효소 C) 활성화인자인 DAG의 생성을 유도하는데 IP_3 는 CLCA의 활성화와 공역되어 있으며 이와 함께 생성된 DAG는 PKC 활성을 통하여 oocytes에 발현된 GIRK(G protein coupled inwardly rectifying K^+) 채널을 조절한다는 것을 발견 보고하였다^{14, 15)}.

본 연구에서는 진세노사이드 신호전달 과정에 주요 인자로 작용하는 개구리 미수정란의 CLCA유전자를 클로닝 하여 그 유전자의 특징 및 각 장기나 조직에서의 이 채널의 발현 정도를 확인 검토하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

시약 및 효소

실험에 사용된 주된 시약 및 효소, kit류는 아래의 회사로부터 구입하였으며, 주문 또는 제작의뢰는 아래 업체의 협력

을 받았다.

1) 시약 및 효소, kit류

iNtRON biotechnology (Seongnam, Korea), Invitrogen (San Diego, CA), Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England), Promega (Madison, WI), TOYOBO (Osaka, Japan), 기타 모든 시약류는 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

2) 주요 장비 및

PCR cycler는 MJ research사 (Watertown, MA)의 PTC 200모델을 이용하였다.

3) 의뢰

primer의 합성 및 염기서열 결정은 COSMO사에, siRNA 합성은 QIAGEN(엘알에스 Lab, 대한민국), 펩타이드 합성 및

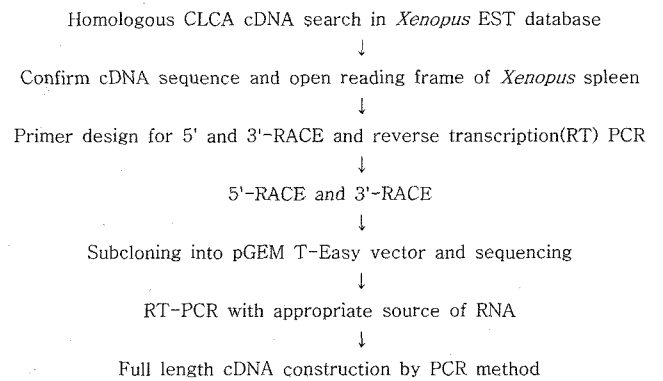


Fig. 1. The strategy for cDNA cloning for *Xenopus* CLCA.

	250	260	270	280	290	300
mCLCA1	F	M	O	N	L	N
mCLCA3GOB_5	F	M	O	N	L	N
xSpleen						P
					*	*
	310	320	330	340	350	360
mCLCA1	F	S	L	L	K	S
mCLCA3GOB_5	F	S	L	L	K	S
xSpleen	V	S	L	L	K	S
	***	*	*	*	*	*
	370	380	390	400	410	420
mCLCA1	N	Y	L	I	K	I
mCLCA3GOB_5	S	E	L	K	L	N
xSpleen	S	P	L	A	K	I

Fig. 2. A alignment of mCLCA1, mCLCA3 and open reading frame of frog EST database. The amino acids of xSpleen was deduced from the searched frog (*Xenopus*) EST database. The frog EST has a very high homologous region to mCLCA1, mCLCA3 in half region. The homology of amino acids of xSpleen, mCLCA1 and mCLCA3 are indicated as follows: identical (*), very similar (:), and similar (·).

항체의 제작은 PEPTRON사(대전, 대한민국)에 의뢰하였다.

EST 데이터베이스 검색

개구리에서 발견되는 유전자에 대하여 무작위로 작성한 cDNA (상보적 DNA) 염기서열을 모아서 대량으로 보유하고 있는 미국 NCBI (national center for biotechnology information)의 EST (expressed sequenced tag) 데이터베이스를 이용하여 생쥐에서 이미 알려진 CLCA 유전자와 homology (상동성)가 있는 클론을 탐색 확인하였다(그림 1, 2).

조직 RNA의 추출

성숙한 암 개구리의 난소를 적출하여 콜라겐 분해효소를 처리하여 미수정란을 분리한 후 성숙도에 따라 적절하게 나

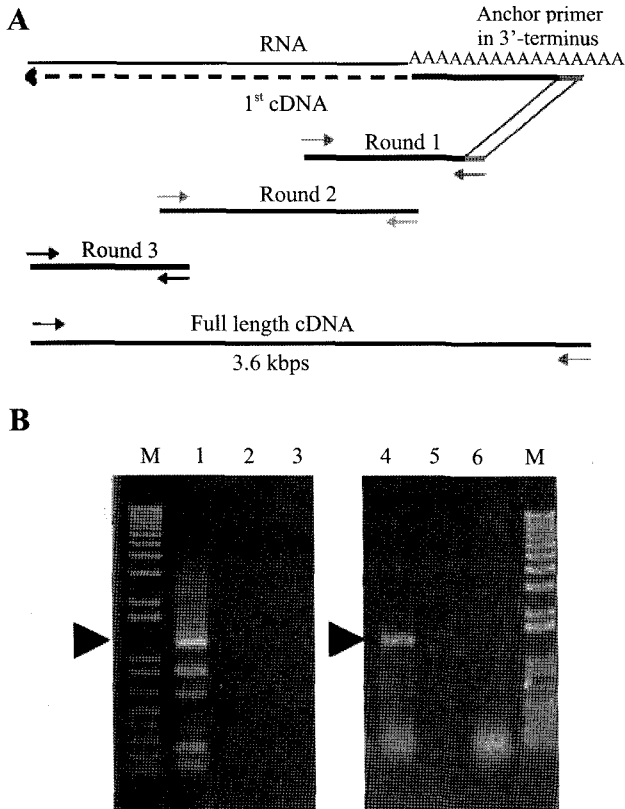


Fig. 3. 3' and 5'-Rapid amplification cDNA ends in *Xenopus oocytes* RNA. The total RNA were extracted from *Xenopus* spleen. A, Three rounds of reverse transcriptional PCR (RT-PCR) were performed to construct the full length of *Xenopus* CLCA cDNA. To clone the *Xenopus* spleen-type CLCA, a lot of designed primer sets from *Xenopus* EST clone and cDNA were synthesized (not shown). B, The two rounds of RT-PCR products of 3' and 5'-RACE were represented in left and right side, respectively. About 1.3 and 1.6 kilo-base pairs of the target products were indicated with arrowheads. The negative controls of primer mock were shown in lane 2, 3, 5, and 6.

누었다. 멸균 ND96 medium으로 수차례 세척한 후 여분의 medium을 완전하게 제거하여 이들 미수정란에 페놀 및 guanidine isocyanate계열의 시약인 easy-BLUE™(iNtRON biotechnology)와 균질기 ULTRA-TURRAX T8(IKA-WERKE, 독일) 등을 이용하여 균질액을 만들었다. 상세한 방법은 시약에 제공된 사용방법에 준하여 시행하였다. Isopropanol침전과 75% 알코올 세척을 거친 다음, 완전하게 알코올을 제거하였다. 3-4 분간 자연 건조한 침전물에서 염색체 DNA의 오염을 막기 위해 DNase I 처리를 실온에서 15분간 실시하고 알코올 침전과 세척을 거쳐 전RNA를 완성하였다.

Oligonucleotide primer의 제작

Tm (melting temperature: 해리 온도)을 고려하여 너무 높거나 낮지 않게 55-65°C 정도로 제작하였다. 길이는 가급적 20~24-mer 정도로 하였고 GC함량은 Tm과 유관하므로 annealing 온도에 맞추어 적절히 조절하였다. 그리고 3'쪽에 5 염기이상의 GC서열이 가급적 오지 않도록 설계하였다. Nested PCR을 실시할 경우에 사용될 프라이머는 바깥쪽 프라이머보다는 높은 Tm을 유지하도록 하였다.

siRNA의 제작

oCLCA 유전자의 염기서열 특이적으로 개시코돈인 Methionine의 하류 100-400bps 영역에 존재하는 서열 중에서 적합한 서열을 설계하였다. 설계한 19잔기 서열의 5'쪽에 AA서열을 부가하여, 최종적으로는 19잔기의 상응하는 RNA서열과 3'쪽에 dT(deoxy T) 두 잔기를 부가하여 sense쇄를, 그리고 그와 상보적인 RNA에 마찬가지로 두 잔기의 oligo dT를 부가한 서열을 각각 합성하였다. 또한 대조군 siRNA로서, 의미 없이 잔기 수와 종류만이 일치하도록 설계한 siRNA도 같은 요령으로 제작하였다.

합성한 siRNA는 적절한 완충액으로 1 µg/µl로 현탁하여 90°C 1분, 37°C 1시간 동안 가온하여 이중쇄로 만든 다음 적당량으로 분주하여 -20°C에서 보관하였다.

RACE (rapid amplification of cDNA ends)

그 RNA를 주형으로 5', 3'-RACE 모두 Superscript™ III 역전사효소(Invitrogen)를 이용하여 역전사 반응을 함으로써 1차 cDNA를 시험관내에서 합성하였다(사용설명서를 일부 수정하여 사용). RACE의 1차 및 2차 PCR에 쓰인 Taq polymerase는 변이율이 대단히 낮은 Pfu계열의 효소(KOD-Plus, TOYOBO)를 이용하였다.

3'-RACE: 제작한 oligo-dT에 anchor서열을 연결한 프라이머를 RNA와 annealing(결합)시킨 후, 1차 cDNA를 합성하였

다. 1차 cDNA를 주형으로 oligo-dT 프라이머 안에 존재하는 anchor 프라이머와 유전자 특이적 프라이머를 한 쌍으로 1차 PCR을 실시하였다. 얻어진 산물을 주형으로, anchor 프라이머와 또 다른 유전자 특이적 프라이머를 한 쌍으로 nested 2차 PCR을 하여 poly-A tail을 포함한 3' 말단의 단편을 획득하였다.

5'-RACE: 5'말단은 일반적으로 유전자의 길이가 길수록 그 RNA의 비율이 낮고 희박할수록 증폭하기가 어렵다고 알려져 있다. 일반적으로는 기지의 DNA영역에 대하여 유전자 특이적으로 제작된 프라이머로 1차 cDNA를 합성하여, 그 cDNA를 주형으로 사용하였다. 본 실험에서는 5'쪽의 미지의 서열을 증폭하기 위한 방법으로 적절한 anchor 프라이머를 두 개 고안하여 제작하였다. 그 두 개의 프라이머와 하류의 이미 알고 있는 염기서열에 근거한 유전자 특이적 프라이머를 각각 한 쌍으로 하여 1, 2차 PCR을 하는 방법을 고안하였다. 이렇게 하여 얻어지는 5'쪽 산물의 염기서열을 확인한 후, 그에 근거한 primer를 다시 제작하여 수차례의 PCR을 거듭하여 원하는 영역을 증폭하였다.

subcloning 및 염기서열의 결정

PCR로 얻어진 CLCA를 coding하는 유전자로 생각되는 DNA 단편은 PCR산물을 바로 삽입할 수 있는 TA cloning vector를 이용하여 클로닝하였다. 우선, DNA단편은 3'쪽에 A 서열이 부가되어 있지 않은 것이 대부분이므로 클로닝 효율을 높이기 위해 A서열을 시험관 안에서 부가하였다. 그 단편의 일부를 TA cloning vector인 pGEM-T-Easy vector에 연결한 후, 대장균에 형질 전환하여 목적하는 클론의 size screening을 실시하였다.

클로닝으로 확보된 플라스미드를 iNtRON사 DNA-spin™ 칼럼을 사용하여 정제하였다. 그 플라스미드를 Taq polymerase를 이용한 sequencing법으로 후보 클론에 대한 염기서열을 결정, 해석하였다. 3'말단 산물일 경우, poly-A tail 서열과 유전자 특이적 프라이머 서열이 존재하는 클론을 우선적으로 선별하였다. 그들 중 확보한 염기서열을 근거로 상동성(homology)을 검색하는 프로그램인 BLAST를 이용하여 다른 생물 유래의 CLCA 유전자와 상동성을 갖는 클론을 확인한 후 그 클론을 최종적으로 선택, 분리해냈다.

완전한 길이의 cDNA 완성

부분적으로 분리한 유전자 단편의 염기서열을 근거로 앞에서 언급한 RACE 방법을 순차적으로 적절하게 적용하여 완전한 상류의 5'영역을 3'영역과 일부 중복되도록 PCR 증폭한다. 앞의 염기서열 확인 및 BLAST search방법에서 언급

한 방법을 이용하여 다른 종류의 Ca²⁺-activated Cl⁻ channel을 coding하는 유전자 (CLCA family)와의 상동성 비교를 기준으로 보아, 상동성이 높은 단편임이 확인되면 그 상류의 단편과 이미 분리한 3' 영역의 단편을 연결하였다. 이런 방법으로 몇 개의 단편 사이에 중복되는 서열을 확인하며, PCR을 이용하여 서로 연결하여 전체 영역을 포함하는 cDNA서열을 완성하였다.

oCLCA유전자 발현 확인을 위한 RT-PCR

개구리 조직에서의 oCLCA유전자 발현양의 분석을 위하여 위에서 언급한 것과 같이 합성한 1차 cDNA를 합성하였다. 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 각 조직에서의 발현차가 인정되는 조건에 맞추어 전 과정을 두 부분(1, 2회차)으로 구분하고, 1회, 2회차에 걸쳐 도합 45회의 PCR을 ATC 200 thermocycler를 이용하여 실시하였다. 1회차 PCR의 조건은 94°C 1분 1회, 94°C 15초, 55°C 30초, 72°C 50초를 25회 반복하였다. 증폭된 PCR산물은 Sephacryl™ S-400 스피너 칼럼을 이용하여 정제하였다. 이어서, 다시 2회차의 PCR을 94°C 1분 1회, 94°C 15초, 55°C 30초, 72°C 35초를 20회 반복하였다.

oCLCA에 대한 polyclonal 항체의 생산

oCLCA단백질의 입체구조 분석을 통하여 1차 서열로부터 항원성이 우수한 서열 중에서 몇 가지 합성 펩타이드를 작성하고, HPLC (SHIMADZU제작소, 일본)를 이용하여 순도 98% 이상으로 정제하였다. 정제한 펩타이드 항원 1mg을 4mg의 adjuvant와 conjugation시킨 현탁액(emulsion)을 만든 후, 2주 간격으로 2마리의 토끼에게 주사하였다. booster 주사를 하고 약 7-10일 후에 혈액에서 항혈청을 분리하여 Western blotting으로 CLCA단백질의 위치에 결합하는지 확인하였다. 충분한 항체역가가 인정되어 전혈액을 채취하여 수 시간 방치하여 항혈청만을 회수하였다.

Western Blotting

개구리 미수정란을 균질기 및 초음파 파쇄기를 이용하여 균질액을 만든 다음 원심분리기를 이용하여 세포질에 해당하는 상등액(S)과 세포막에 상응하는 침전물(P)로 나누어 분획하였다. 회수된 단백질 50 µg을 SDS-PAGE를 실시한 후, PVDF 나일론 막 (PolyScreen®, NEN)으로 겔에 있는 단백질을 전사한다. 단백질이 전사된 막을 벗겨내고 단백질 쪽이 위로 향하도록 blocking 용액에 담가 한시간 정도 담가두었다. 여분의 원충액을 버리고 1차 항체원액이 막에 직접적으로 닿지 않도록 조심스럽게 투여한 후, 실온에서 한 시간 이상 부드럽게 저속으로 진탕하였다. PBS(phosphate-buffered saline) 세

척액으로 수차례에 나누어 15-30분 정도 세척한 후, 2차 항체(Anti-Rabbit IgG, Heavy and Light Chain, Goat Biotin Conjugate)를 넣은 완충액에서 약 1시간 진탕하였다. 세척액을 수차례 교환하며 약 30분간 세척하였다. 이어서 streptavidin peroxidase(HRP; horse raddish peroxidase) conjugate를 약 1시간에 걸쳐 결합시키고, 위와 같은 방법으로 세척한 후, HRP에 의한 발색을 유도하는 시약으로 발색반응을 일으켜 목적하는 띠를 동정하였다^{16, 17}.

개구리 미수정란의 처리 및 미세주사(microinjection)

사용된 아프리카 발톱 개구리는 *Xenopus I*(Ann Arbor, MI)로부터 구입하였다. 사육 및 처치 방법에 대한 실험실에서 지침을 준수하였으며, 알은 3-amino benzoic ethyl ether 또는 얼음 위에서 마취한 상태에서 채취하였다. 채취된 알은 ovarian follicles을 제거하고 Ca^{2+} 을 배제한 배지(82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 2.5 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin)에 콜라겐 분해효소를 넣어 2시간가량 약하게 진탕하여 알을 각각 분리하였다. V-VI기의 알만을 따로 분별하여 0.5 mM theophylline and 50 μ g/ml gentamicin이 첨가된 ND96(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$, and 5 mM HEPES, pH 7.5)완충액에 알을 모아 계류시킨다. 알을 담은 용액은 18°C에서 천천히 진탕하면서 매일 일회 새 완충액으로 갈아주었다. 전기생리학적 실험은 미수정란을 분리하고 약물을 첨가한지 5-6일 이내에 실시하였다. Cl^- 채널실험을 위하여 분리한지 하루가 된 미수정란의 동물극(animal pole) 또는 그 대극(vegetal pole)에 상기 방법으로 제작한 oCLCA-siRNA 40 μ l(40 ng)를 끝을 날카롭게 뾰 유리 피펫인 10- μ l VWR microdispenser(VWR scientific, San Francisco, CA)로 미세주사 하였다.

oocyte 레코딩

주문 제작한 Plexiglas net chamber(레코딩 작업대)를 이용하여 two-electrode voltage-clamp recordings법으로 데이터를 기록하였다. 작업대에는 두 부분으로 나누어 well 규격을 위는 8 mm, 3 mm로 또 다른 아래의 well은 6 mm, 5 mm의 직경과 높이로 각각 설치하였다. 그리고 위쪽 well의 바닥에는 플라스틱 망(~0.4 mm 사각 눈금 규격)을 깔았다. 그리고 직경 1 mm로 된 하나의 관류용 통로를 위해 아래 well의 벽에 드릴로 구멍을 내었고, 흡입용 관(튜브)를 위쪽 well의 테두리에 오게 제작하였다. 실제 실험에서는 한 개의 알(미수정란)은 위와 아래를 구분하는 망위에 놓았다. 이 때 망에 있는 사각눈금은 전기생리학적 레코딩을 하는 동안에 그

위의 알을 고정하는 역할을 하게 된다. 미세전극은 3 M KCl(0.2-0.7 M Ω)을 충전하였고, 전기생리학적 실험은 oocyte clamp(Warner Instruments, Hamden, CT)를 사용하여 실온에서 실행하였다. 자극과 데이터 수집은 pClamp 8(Axon Instruments, Union City, CA)로 조절하였다.

데이터 해석

GTS를 첨가한 상태에서 일시적(1차) 또는 지속적(2차)인 Ca^{2+} -activated Cl^- current를 농도에 따른 곡선을 얻기 위하여 관찰된 피크의 폭을 점으로 모아 Origin software (Northampton, MA)를 이용하여 Hill 반응식에 대입하였다. $y/y_{max} = [A]^n / ([A]^n + [EC_{50}]^n)$ 에서, y 는 GTS 농도에 따른 1차 또는 2차 Ca^{2+} -activated Cl^- current이며, y_{max} 는 1차 또는 2차 Cl^- 최대 피크이고, EC_{50} 은 GTS에 대한 대조구 최대 반응효과의 절반에 이르게 하는 GTS 농도이다. 그리고 $[A]$ 는 GTS 농도이다. n 은 상호반응 계수이다. 모든 값은 \pm S.E.M 평균치로 나타내었다. 대조구와 처리 데이터 평균치의 차이는 쌍을 이루지 않은(unpaired) t-test법을 이용하여 분석하였다. 신뢰할 만한 유의성은 $p < 0.05$ 이다.

결과 및 고찰

spleen cDNA 단편의 확인

EST 염기서열 데이터베이스로부터 상동성 검색을 통하여 유의성이 인정된 cDNA 클론(Accession number CF283776)으로부터 가능한 일부분의 ORF를 만들어 생쥐의 CLCAs와 비교한 결과를 그림 1에 표시하였다. 이 cDNA단편의 염기서열은 primer설계 등, 이후의 유전자 클로닝을 위한 서열 재료로 활용하였다.

개구리 미수정란 CLCA 채널 유전자의 클로닝

CLCA에 대한 다양한 oligonucleotide primers를 이용하여 많은 실험을 실시하였지만, 초기에는 개구리 미수정란에 존재하는 CLCA를 찾지 못하다가 개구리의 다른 장기들 중에서 CLCA를 비장(spleen)에서 먼저 클로닝하게 되었다(그림 1). 개구리 미수정란의 spleen-type CLCA의 전 서열은 위에서 기술한 바와 같이 RACE를 이용하여 유전자를 확보할 수 있었다. 이어서 클로닝 방법(5', 3'-RACE)을 약간 수정하여 미수정란의 CLCA 유전자 클로닝을 실시하였다. 그 결과, 비장 CLCA와 미수정란 CLCA의 염기서열 사이의 어떠한 차이점도 발견할 수 없었다. 그 것은 동일한 유전자가 각각 다른 장기에서도 발현하는 사실이 이유일 것으로 생각되었다. 우리는 결과적으로 이 유전자를 미수정란에서 처음으로 전체

cDNA를 확보한 사실에 의미를 두어 잠정적으로 oocyte CLCA(oCLCA)로 명명하였다.

oCLCA 유전자의 구조

클로닝을 통하여 밝혀낸 개구리 미수정란에 존재하는

oCLCA단백질의 1차 구조의 비교 해석(alignment)과 소수성 검사(hydrophobicity) 결과를 그림 4A, B에 각각 나타내었다. 특징은 첫째, 포유류(사람, 생쥐)에서 알려진 CLCA 유전자(gene)의 크기와 비슷한 911개(3604 염기쌍)의 nucleotide로 구성)의 아미노산으로 구성되어 있었으며, 등전점(pI)은 약

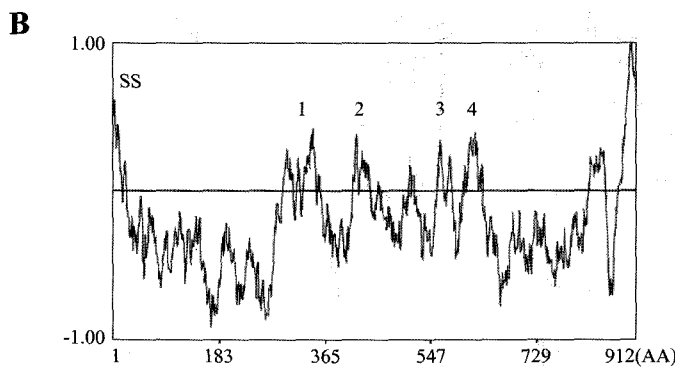


Fig. 4. Structure of the oCLCA polypeptide. A, The predicted amino acid sequence (top strand) aligned with that of mCLCA4 (Clustal W method). Identical amino acids are indicated by marks as shown in Fig. 1. The six hydrophobic regions are underlined and assigned as signal sequence (SS), putative transmembrane regions (1 to 4), and hydrophobic carboxy terminus (H). All cysteine residues upstream of the first putative transmembrane domain are conserved (v). Consensus sites are marked for N-linked glycosylation (∇), for phosphorylation by PKC (#), and for phosphorylation by Ca^{2+} /calmodulin kinase II (\diamond). B, Hydrophobicity plot of the oCLCA amino acid sequence (Kyte-Doolittle analysis). Hydrophobic domains are given as positive values. Proposed transmembrane segments are marked as 1 to 4. The hydrophobicity plot is similar to those of CLCA family.

5.11을 보였다(염기서열은 제시하지 않음). 두 번째, 마우스의 CLCA4와 가장 상동성이 높아 48.9%의 상동성을 나타내었다. 그 구조는 다른 CLCA family와도 대단히 유사하였다. 비교 검색결과는 제시하지 않지만 생쥐의 다른 subtypes (mCLCAs) 및 사람 (hCLCA)과는 44-48% 정도의 상동성을 보였다. 단백질 기능에 관여하는 것으로 알려진 보존된 시스템인 잔기, N-linked glycosylation 부위, Protein Kinase C(PKC), 그리고 Ca^{2+} /calmodulin kinase II효소에 의한 인산화 부위 등이 잘 보존되어 있었다(그림 4A). 세 번째, 또한 그림 4B에서 보는 바와 같이 개구리 미수정란에 존재하는 oCLCA의 막관통(transmembrane: TM) 형태는 4개의 TM domains을 지닌 단백질로 생각된다. 아미노 말단 소수성 영역에는 SS(시그널 서열), 그리고 카복시 말단에 또 하나의 소수성 domain이 존재하였다. 또한 소수성 영역의 도출에서 보았듯이 카복시 말단에 있는 소수성 영역이 막관통 부위 인지는 잘 알려져 있지 않다. 아울러서 그 기능에 대해서는 현재까지 구체적으로 알려진 바가 없다. 채널 기능에 어떤 형태로든 관여할 것이라는 추측의 범주를 벗어나지 못하는 상황이다. 4곳 이상으로 알려진 막관통 부위는 생물종마다 다소 차이를 보이는데, 그 것은 아마도 채널의 이온 투과성에 관여하는 pore주변구조의 다양성은 채널의 구조적 차이를 유도하고, 그에 따라 역할이 서로 조금씩 다르게 분화한 것으로 생각된다.

개구리 장기 조직에서의 oCLCA의 발현분포

이 oCLCA가 개구리의 각 장기에 얼마나 분포하는가를 알기 위하여 뇌, 심장, 허파, 간, 소장, 대장, 신장, 비장, 및 미수정란에 대한 RT-PCR를 실시하였다. 그림 5A에서 보는 바와 같이 개구리 미수정란에도 상대적으로 적은 양이지만 spleen 등 다른 장기의 띠와 같은 크기의 단편을 볼 수 있었다. oCLCA의 각 장기의 분포 정도(발현양)를 보면, 허파=간=소장=대장>신장=비장>뇌>심장>미수정란의 순서 인 것으로 나타났다. 반면에 실시한 조건하에서는 대조구는 이미 포화되어 있고 또한 장기별 발현양의 차이도 인정되지 않았다. oCLCA의 발현양을 대조구와 비교하면 띠의 두께가 그에 미치지 못하는 것으로 보아 대조구로 쓰인 beta actin보다는 발현 정도가 약한 유전자임을 알 수 있었다. 한가지 특이한 점은 미수정란에서 oCLCA는 약하게나마 검출할 수 있었지만 대조구에서는 beta actin의 띠를 볼 수 없었다. 그 것은 미수정란에서의 beta actin유전자의 발현이 미미하기 때문일 것이다. 결과는 제시하지 않으나, 또 다른 대조구 유전자로 잘 쓰이는 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 이용한 실험에서는 고루 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

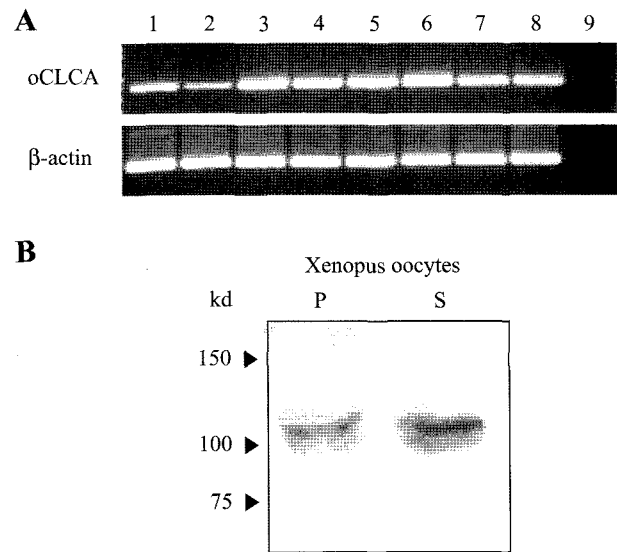


Fig. 5. oCLCA expression in various *Xenopus* tissue. The first cDNA was synthesized from total RNA as shown in Fig. 2. Two rounds 45 repeats of PCR were performed with several sets of gene specific primers as described in Materials and Methods. A, The specific 0.45 kbps of RT-PCR products for oCLCA on upper side. 0.5 kbps of beta actin gene as internal control on lower side. Lane 1, brain; 2, heart, 3, lung; 4, liver; 5, small intestine; 6, colon; 7, kidney; 8, spleen; 9, oocytes, respectively. B, Confirmation of the oCLCA protein. Western analysis was performed with the fractionated S(supernatant) and P(precipitates) from oocytes as described in Materials and Methods. The cross-reacted protein with anti-oCLCA antibody was observed in the migrated region for 100-120 kd.

한편, oCLCA의 아미노산 서열에 근거하여 합성한 펩타이드 항원에 대한 anti-oCLCA 항체를 성공적으로 제작하였다. 그 항체를 이용하여 oCLCA단백질의 존재를 확인하기 위하여 미수정란의 세포 과쇄액을 상등액과 침전물로 나누어 분획하고, 재료 및 방법에서 기술한 것처럼 Westren blotting을 실시한 결과를 그림 5B에 제시하였다. 그림에서 보듯이 1차 아미노산 서열로 추측 가능한 분자량 100-120 kd에 가까운 특이적으로 결합한 띠를 상등액과 침전물 분획에서 모두 검출할 수 있었다. 일반적으로 저속으로 원심분리를 하였을 경우, 상등액은 세포질 분획을, 침전물은 막을 가장 많이 포함한다고 볼 수 있으므로 두 곳에서 모두 검출 된다는 것은 양쪽에 모두 존재한다고 보아야 할 것이다. CLCA family에 속하는 채널 단백질은 궁극적으로는 막에 국재(localization)하게 되어있으므로 일견 불합리할 수도 있으나, 세포질의 oCLCA는 합성된 다음 막으로 제 위치를 잡아 국재하게 되기까지 단백질 기능의 부가를 위한 수식과정 등에 필요한 시간동안 세포질에 머무는 점을 감안하면 납득할 수 있다. 또 한 가지,

Western해석에 쓰인 단백질의 양이 적지 않았던 점을 감안하면 상대적으로 crosslink한 띠의 두께가 가는 것으로 생각된다. 이 사실을 설명할 수 있는 추측, 그리고 가설 하나를 생각할 수 있을 것이다. 첫 번째, 그 추측이란 비록 polyclonal 항체이기도 하나, 짧지만 대단히 항원성이 높은 영역을 고안 하였으므로 비특이적 결합을 하는 단백질이 많지 않았음을 예상할 수 있다. 결합한 띠가 거의 특이적으로 하나만 검출된 사실이 항체의 특이성을 뒷받침한다고 볼 수 있다. 두 번째, 우리는 다른 CLCA가 존재한다고 가정하였을 경우, 항체가 또 다른 항원이 될 수 있는 CLCA단백질과 결합할 개연성을 간과할 수 없다. 그러나 Western의 결과는 다른 CLCA가 모두 crosslink한 결과로 보기에 그 정도가 미약하게 보인다. 이러한 두가지 점을 감안하여 예상할 수 있는 가설은 대단히 항체특이성이 높거나, 또 다른 형태(subtypes)의 CLCA

가 미수정란에 존재할 수도 있음을 시사하는 것이다. 현재 이에 관한 일을 추진 중이다.

siRNA에 의한 oCLCA채널 기능의 억제 효과

이전 보고에서 우리는 개구리 미수정란에서 전압을 탈분극 시킴으로써 발생하는 진세노사이드(ginseng total saponin; GTS)가 Ca^{2+} -activated Cl^- current에 어떠한 효과를 나타내는지 밝혀내었다¹³⁾. 또한 이러한 GTS에 의한 Ca^{2+} -activated Cl^- current의 활성화는 세포내 소포체에서 방출된 Ca^{2+} 과 세포 외부에서 유입된 Ca^{2+} 에 의한 것임을 밝혔다¹⁸⁾. 보고한 내용을 근거로 보면, 미수정란의 내인성 CLCA의 발현산물이 단백질로 합성되어 채널로 작용하는 것을 차단한다면 분명한 Cl^- current의 변화를 유도할 수 있을 것이라 예상되었다. 클로닝 된 oCLCA 염기서열 중에서 5'서열에 가급

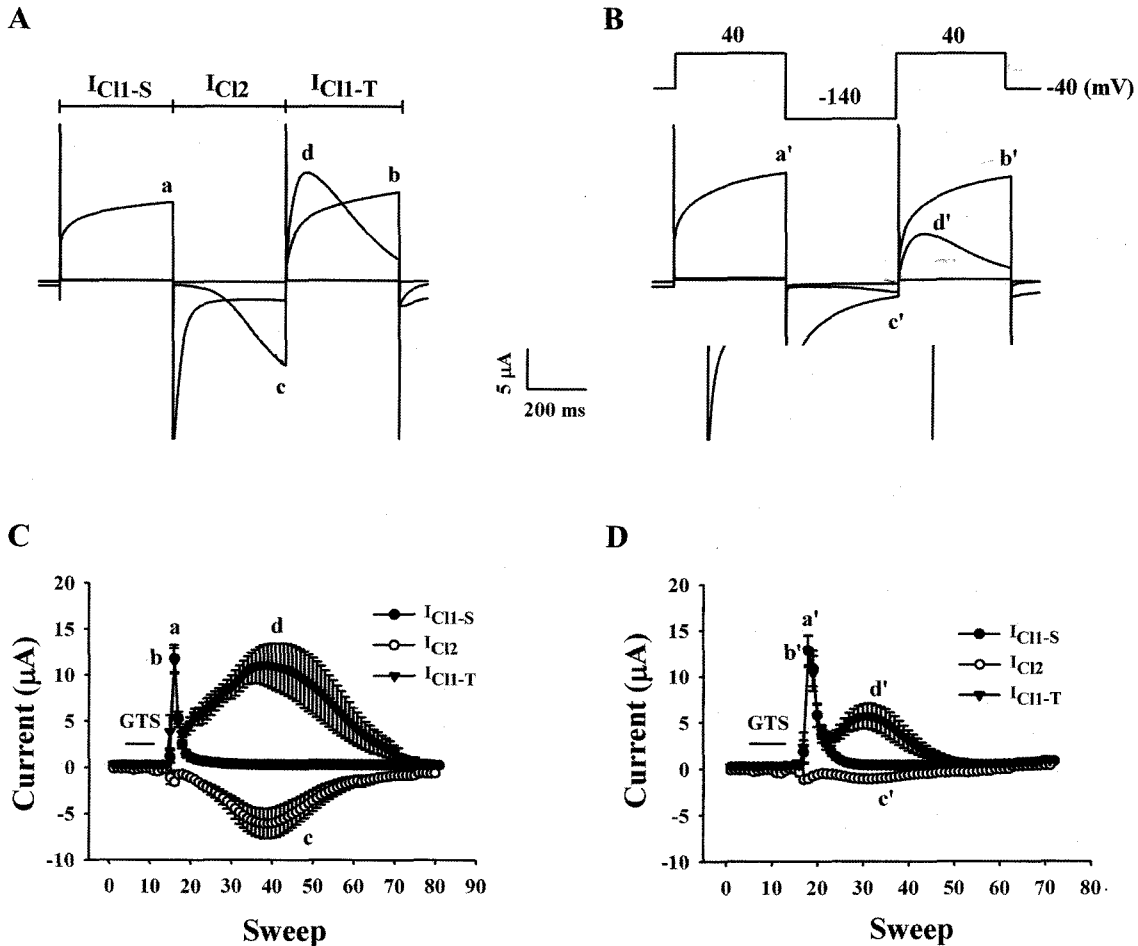


Fig. 6. Effect of oCLCA-siRNA on chloride current. Chloride current amplitude induced by interfering the expression of endogenous oCLCA gene was recorded by using two-microelectrode voltage clamp technique in oocytes control (A, C) and the siRNA-injected oocytes (B, D). The endogenous CLCA currents was activated with 50 µg/ml concentration of GTS. A, Current amplitudes recorded at every 10 s, and then peak current values of chloride current components were measured at the points of I_{Cl1-S} , I_{Cl2} , and I_{Cl1-T} . B, Time course of development I_{Cl1-S} , I_{Cl2} , and I_{Cl1-T} in response to GTS. Recording intervals by sweep was 10 seconds. (n=9 oocytes)

적 가까운 곳에서 2개의 후보를 엄선하여 재료 및 방법과 같이 siRNA를 합성하여 예비실험을 실시하였다. 예비실험을 토대로 그 가운데 하나의 siRNA를 사용하여 본 실험을 행하였다. 간략하게 방법을 기술하면, 실험을 위해서 -40 mV로 holding potential을 주고 +40 mV로 500 msec동안, -140 mV에서 500 msec, -40 mV에서 500 msec동안 step을 주고 다시 holding potential로 돌아오는 방식을 택하였다. 그 결과, siRNA에서 Cl^- current의 억제 효과에 대한 유의성이 인정되었다. 즉, GTS를 처리한 것을 대조구와 비교했을 때 siRNA를 주입시킨 미수정란에서는 세포내에 저장된 Ca^{2+} 의 방출에 의해서 발생한 Cl^- current(I_{Cl-S})는 별다른 변화를 관찰할 수 없었지만 세포외에서 유입된 Ca^{2+} 에 의한 inward Cl^- current(I_{Cl2})와 outward Cl^- current(I_{Cl-T})활성은 크게 차이가 나는 것을 알 수 있었다. oCLCA 특이적인 siRNA로 내인성 CLCA를 억제시킨 미수정란에서는 대조구에 비해 I_{Cl2} 가 $81.9 \pm 8.3\%$, I_{Cl-T} 가 $49.5 \pm 12.6\%$ 억제되는 것을 알 수 있었다 (그림 6C, D).

감사의 말씀

이 논문의 실험은 2003년도 한국학술진흥재단 선도연구자 지원사업(KRF-2003-041-E00272)의 지원을 받아 행하였으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- Gray, M. A., Winpenny, J. P., Verdon, B., McAlroy, H. and Argent, B. E. : Chloride channels and cystic fibrosis of the pancreas. *Biosci. Rep.*, **15**, 531-541 (1995).
- Collier, M. I., Levesque, P. C., Kenyon, J. L., and Hume, J. R. : Unitary Cl^- channels activated by cytoplasmic Ca^{2+} in canine ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **78**, 936-944 (1996).
- Yuan, X. J. : Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone. *Am. J. Physiol.*, **272**, L959-L968 (1997).
- Fine, B. P., Marques, E. S. and Hansen, K. A. : Calcium-activated sodium and chloride fluxes modulate platelet volume: role of Ca^{2+} stores. *Am. J. Physiol.*, **267**, C1435-C1441 (1994).
- Barnes, S. and Deschenes, M. C. : Contribution of Ca and Ca-activated Cl^- channels to regenerative depolarization and membrane bistability of cone photoreceptors. *J. Neurophysiol.*, **68**, 748-755 (1992).
- Jaffe, L. A. and Cross, N. L. : Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**, 191-200 (1986).
- Cunningham, S. A., Awayda, M. S., Bubien, J. K., Ismailov, I. I., Arrate, M. P., Berdiev, D. J., and Fuller, C. M. : Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J. Biol. Chem.*, **270**, 31016-31026 (1995).
- Gruber, A. D., Elble, R. C., Ji, H. L., Schreur, K. D., Fuller, C. M. and Pauli, B. U. : Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca^{2+} -activated Cl^- channel proteins. *Genomics*, **54**, 200-214 (1998).
- Gruber, A. D., Schreur, K. D., Ji, H. D., Fuller, C. M., and Pauli, B. U. : Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am. J. Physiol.*, **276**, C1261-C1270 (1999).
- Pauli, B. U., Ghany-Abdel, M., Cheng, H. C., Gruber, A. D., Archibald, H. A. and Elble, R. C. : Molecular characteristics and functional diversity of ClCa family members. *Clin. and Exp., Pharmacol and Physiol.* **27**, 901-905 (2000).
- Dascal, N. : The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem*, **22**, 317-387 (1987).
- Choi, S., Rho, S.H., Jung, S.Y., Kim, S.C., Park, C.S., Nah, S.Y. : A novel activation of Ca^{2+} -activated Cl^- channel in *Xenopus* oocytes by ginseng saponins: evidence for the involvement of phospholipase C and intracellular Ca^{2+} mobilization. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 641-648 (2001).
- Choi, S., Kim, H., J., Ko, Y. S., Jeong, S. W., Kim, Y. I., Simonds, W. F., Oh, J. W., Nah, S. Y. : $G\alpha_q/11$ coupled to mammalian phospholipase C β_3 -like enzyme mediates the ginsenoside effect on Ca^{2+} -activated Cl^- current in the *Xenopus* oocyte. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48797-48802 (2001).
- Choi, S., Lee, J. H., Kim, Y. I., Kang, M. J., Rhim, H., Lee, S. M. and Nah, S. Y. : Effects of ginsenoside on G protein-coupled inwardly rectifying K^+ channel activity expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J Pharmacol.*, **468**, 83-92 (2003).
- Hill, J. J. and Peralta, E. G. : Inhibition of a Gai-activated potassium channel (GIRK1/4) by the G α_q -coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5505-5510 (2001).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. : Molecular cloning: A Laboratory manual (2nd Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- Spector, D. L., Goldman, R. D., and Leinwand, L. A. : Cells: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998).
- Jeong, S. M., Lee, J. H., Kim, S., Rhim, H., Lee, B. H., Kim, J. H., Oh, J. W., Lee, S. M. and Nah, S. Y. : Ginseng saponins induce store-operated calcium entry in *Xenopus* oocytes. *British J. of Pharmacol.*, **142**, 585-593 (2004).