

생쥐 초기 배 발달 동안 변화되는 칼슘과 포타슘 이온

강다원^{1,2} · 허창기¹ · 최창록¹ · 박재용^{1,2} · 홍성근^{1,2} · 한재희^{1,2,*}
¹경상대학교 의과대학 생리학교실, ²건강과학연구원

Ca²⁺ and K⁺ Concentrations Change during Early Embryonic Development in Mouse

D. W. Kang^{1,2}, C. G. Hur¹, C. R. Choi¹, J. Y. Park^{1,2}, S. G. Hong^{1,2} and J. H. Han^{1,2,*}

*Department of Physiology, College of Medicine and Institute of Health Science,
Gyeongsang National University*

SUMMARY

Ions play important roles in various cellular processes including fertilization and differentiation. However, it is little known whether how ions are regulated during early embryonic development in mammalian animals. In this study, we examined changes in Ca²⁺ and K⁺ concentrations in embryos and oviduct during mouse early embryonic development using patch clamp technique and confocal laser scanning microscopy. The intracellular calcium concentration in each stage embryos did not markedly change. At 56h after hCG injection when 8-cell embryos could be isolated from oviduct, K⁺ concentration in oviduct increased by 26% compared with that at 14h after injection of hCG. During early embryonic development, membrane potential was depolarized (from -38 mV to -16 mV), and Ca²⁺ currents decreased, indicating that some K⁺ channel might control membrane potential in oocytes. To record the changes in membrane potential induced by influx of Ca²⁺ in mouse oocytes, we applied 5 mM Ca²⁺ to the bath solution. The membrane potential transiently hyperpolarized and then recovered. In order to classify K⁺ channels that cause hyperpolarization, we first applied TEA and apamin, general K⁺ channel blockers, to the bath solution. Interestingly, the hyperpolarization of membrane potential still appeared in oocytes pretreated with TEA and apamin. This result suggest that the K⁺ channel that induces hyperpolarization could belong to another K⁺ channel such as two-pore domain K⁺ (K_{2P}) channel that are insensitive to TEA and apamin. From these results, we suggest that the changes in Ca²⁺ and K⁺ concentrations play a critical role in cell proliferation, differentiation and reproduction as well as early embryonic development, and K_{2P} channels could be involved in regulation of membrane potential in ovulated oocytes.

(Key words : Ca²⁺ current, membrane potential, potassium, oocytes, oviduct)

서 론

세포막에는 세포의 생리기능을 조절하는 칼슘

* 본 연구는 2003년 Brain Korea 21에 의하여 지원되었음.

¹ 경상대학교 의과대학 생리학교실 (Department of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University)

² 경상대학교 의과대학 건강과학연구원 (Institute of Health Science, Gyeongsang National University)

* Correspondence : E-mail : jhcehan@nongae.gsnu.ac.kr

(Ca²⁺), 포타슘(K⁺), 소듐(Na⁺) 등의 이온들이 세포 안팎으로 이동할 수 있는 이온 통로가 다수 존재한다. 이러한 이온 통로를 통한 이온들의 움직임에 의해 세포의 흥분성은 조절되며, 막 전압의 변화, 신경 전달 물질, 기계적 자극 등과 같은 다양한 인자들이 이온 통로의 개폐를 조절한다.

포유동물 난자의 이온 통로 연구는 생쥐 난자의 막전압 변화 및 이온 전류를 기록함으로써 시작되었으며(Okamoto 등, 1977), 햄스터 난자에서 체외 수정 시 발생하는 과분극 반응의 기록은 포유류 난자의 전기적인 세포막 성상과 이온 전류에 관한 연구를 가속화시켰다(Miyazaki와 Igusa, 1981). 포유동물 난자는 배란 난자가 수정이 되어야 비로소 개체로 분화될 뿐만 아니라 수정이 이루어지지 않으면 퇴화되는 비흥분성 세포라 생각되어 이온통로 연구 대상에서 큰 관심을 얻지 못하였다. 그러나 최근 세포 분화에 따른 이온 통로 연구의 결과로 미분화 세포의 대사 및 이온 항상성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 따라서 미분화 세포인 난자 역시 중요한 연구대상이 된다.

지금까지 난자에서의 이온 통로 연구는 주로 칼슘 통로에 집중되었다. 칼슘은 세포의 생존을 위한 여러 가지 대사과정에서 효소의 촉매제로써 신경 세포에서 신경 전달 물질의 분비 과정, 근육세포의 수축 과정 및 활동 전압에 직접적으로 관여할 뿐만 아니라(Hosey 등, 1989) 난자의 성숙, 수정 및 난할 과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Homa 등, 1993; Jaffe, 1983). 특히, 생쥐 난자에서 수정 후 초기 2세포기 배까지는 칼슘의 요구가 절대적으로 필요한 것으로 알려진데 반하여 후기 2세포기 배는 배양액 내 칼슘 없이도 8세포기 배까지 발생이 가능하다(Bae와 Park, 1987). 그러나 초기 8세포기 배에서 일어나는 밀집화(compaction) 과정에서는 반드시 칼슘이 요구된다. 이러한 결과들로부터 각 시기의 배는 칼슘의 요구도가 각각 다르다는 것을 알 수 있다. 난자 내 칼슘의 조절은 세포막에 존재하는 칼슘 통로를 통한 세포 밖으로부터의 칼슘 유입(Ca²⁺-influx)과 세포내 소기관, 소포체 등에 존재하는 inositol triphosphate receptor (IP3R) 혹은 ryanodine receptor (RyR)를 통한 분비(Ca²⁺-release)로 이루어진다.

그러나 난자 및 수정란의 세포막에는 칼슘 통로 뿐만 아니라 포타슘, 소듐, 클로라이드 등과 같은 다양한 이온 통로가 존재하고 있으며(Winston 등, 2004; Trimarchi 등, 2002; Kolajova 등, 2001; Day 등, 1993; Mitani, 1985), 이러한 이온 통로들을 통해 난자 내 이온 항상성을 유지하고 있다. 특히, 포타슘 통로를 통해 이동하는 포타슘 이온은 세포 내에서 가장 높은 비율을 차지하는 중요한 이온으로써 세포의 안정막 전압을 적정할 수준으로 맞춘다. 그리고 정자의 침체반응, 수정, 세포주기 조절 등에도 관여한다(Day 등, 1993). 최근 two-pore domain 포타슘 통로가 수정란의 세포 사멸과 관련 있음이 보고됨으로써(Trimarchi 등, 2002), 수정란이 후기 배로의 발달 과정에 있어 포타슘 이온의 중요성이 더해졌다.

본 연구에서는 전기 생리학적 실험 기법 및 공초점 현미경을 이용하여 생쥐 난자 및 수정란에서 칼슘 및 포타슘 이온 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 사양 관리

본 실험에 사용된 실험 동물은 유한양행으로부터 분양 받은 4주령의 암컷 생쥐(ICR)를 경상대학교 의과대학 실험 동물 사육장에서 점등 시간 14시간, 온도 20~24℃ 및 환풍 조절 하에서 2주 정도 적응시킨 후 사용하였다. 실험 전에 각 우리(cage)에 분리하여 사육하였으며 사료와 물은 자유로이 급식하였다.

2. 과배란 유도, 난자 및 수정란의 채란

과배란을 유도하기 위하여 암컷 생쥐(6주령)에 5 IU의 PMSG(Denka Pharmaceutical Co., Kawasaki, Japan)를 복강 내 주사한 후 48시간째에 5 IU의 hCG(Yuhan Co., Korea)를 역시 복강 내 주사하였다. 난자는 hCG 주사 후 14 시간째에 채란하였으며, 회수된 난자는 0.01% hyaluronidase(Type I-S, Sigma, USA) 용액에 30초간 노출시킨 후 실온에서 반복 pipetting하여 난구세포를 제거하고, 제 1극체가 명확하며 세포질이 균일하고 충실한 것만을 선택하여 사용하였다. 수정란은 hCG 주사와 동시에 수컷 생쥐와 교미시킨 후 배발달 시기에 맞

추어 채란하였다. 칼슘 전류를 기록하기 위해서는 난자의 투명대(zona pellucida)를 0.5%의 protease (Type XXIV, Sigma, USA)에 30초 동안 노출시킨 후 피펫(pipette)으로 부드럽게 세척하여 제거하였다. Protease에 의한 추가적인 세포막 손상을 줄이기 위하여 투명대가 소실되는 즉시 HEPES-buffered cultured medium (M2)으로 3번 이상 세척하여 실험에 이용하였다.

3. 실험 용액

칼슘 전류를 기록하기 위해 사용된 HEPES buffered Tyrode 용액(125 mM NaCl, 6 mM KCl, 0.3 mM Na-pyruvate, 10 mM Lactate, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1.7 mM CaCl₂)은 NaOH를 이용하여 25°C에서 pH 7.3로 적정하였다. 세포내(또는 pipette) 용액은 외향 전류를 억제하기 위하여 Cs⁺을 주성분으로 하여 130 mM CsCl, 15 mM TEA-Cl, 1 mM Mg-ATP, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM di-Tris creatine phosphate로 조성하였고, pH는 CsOH를 이용하여 7.3으로 적정하였다. 세포 내외 용액의 삼투압은 모두 280 mOsm로 조정하였다. 본 실험에 이용한 whole cell recording 기법 상 세포막의 안정과 gigaseal 형성을 촉진하기 위하여 칼슘 농도는 생리적 수준보다 높여 10 mM으로 사용하였다. 칼슘 전류 측정 외 배양 실험 및 세포내 칼슘 농도 측정은 M2 배양액을 사용하였으며, 실험 목적에 따라 0.4% bovine serum albumin(BSA)의 첨가 유무를 결정하였다.

4. 이온 전류의 기록

투명대를 제거한 난자를 도립현미경 위에 설치된 용기로 옮긴 후 미세조정기(WR-88, Narishige, Japan)를 이용하여 tip 저항이 4~8 MΩ인 유리전극을 난자의 세포막에 접근시키고 10~20 cmH₂O 정도의 음압을 가하여 giga seal(seal resistance > 1GΩ)을 형성시킨 후 순간적으로 음압을 높여 세포막을 파열시켜 whole cell patch를 형성하였다. 실험용액은 1 ml/min의 속도로 관류시키며, 실온에서 실험을 진행하였다. Patch clamp 증폭기(CEZ-2100, Nihon Kohden, Japan)와 pClamp(V6.01, Axon, USA) 및 A/D & D/A converter(TL-1-125, Axon,

USA)를 사용하여 막 전압 고정과 test pulse를 적용하였다. 막 전압은 -80 mV로 유지하고 -50 mV부터 10 mV 간격으로 50 mV까지 250 ms의 탈분극 자극을 15초마다 한번씩 가하여 전류를 기록하였다. Patch clamp 증폭기를 통해서 나온 전류와 전압 신호는 digital oscilloscope(TDS 220, Tektronix, USA)와 pen recorder (Harvard, England)로 관찰하고, 결과의 기록은 컴퓨터의 하드디스크에 저장하였다.

5. 세포내 Ca²⁺ 농도

배란 난자의 세포내 칼슘 농도를 기록하기 위하여 먼저 fluo 3-AM(Molecular probes, Ca²⁺ indicator) 5 μM을 45분간 난자와 함께 배양한 후 0.4% BSA가 첨가된 M2 배양액으로 세척하였다. 그리고 난자의 움직임을 막기 위해 Cell Tak(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)으로 미리 코팅시켜 놓은 용기(chamber)를 BSA가 첨가되지 않은 M2 배양액 50 μl로 먼저 채운 다음 난자를 살며시 올려놓았다. 피펫으로 난자의 움직임을 확인한 후, 움직임을 없을 때 공초점 현미경(IX 70 Fluoview, Olympus, Japan)을 이용하여 10분 동안 5초 간격으로 scanning하였다. 난자에 약물을 처리할 때는 난자가 움직이지 않도록 stock 용액을 이용하여 소량씩 점적하였다. Scanning 후에는 Fluoview(version 2.0, Olympus, Japan)를 이용하여 영상을 분석하였다.

6. 세포막 전압의 기록

막 전압은 3M KCl을 채운 유리 미세 전극(30 MΩ)을 이용하여 난자 및 수정란의 투명대를 통과시킨 후 세포막내에 삽입하여 기록되었다. 막 전압은 oscilloscope(CS-8010, Kenwood, Tokyo, Japan)와 pen recorder(Harvard, England), digital multi meter 등을 통하여 관찰 기록되었다.

7. 난관 내 포타슘 농도 측정

생쥐 난관 내 포타슘 농도 측정을 위해 먼저 난소·난관 접합부와 난관·자궁 접합부를 묶은 후 조심스럽게 난관을 적출하였다. 적출된 난관을 기본 배양액(M2)으로 세척한 다음 radiometer(ABL

505, Copenhagen)를 이용하여 세척용액에서 포타슘 농도를 측정하였다. hCG 호르몬을 처리한 후 14시간, hCG 처리와 동시에 교미를 시킨 후 20시간, 24시간, 33시간, 48시간, 64시간 그리고 72시간 후에 생쥐의 난관을 절단하여 포타슘 농도를 측정하였다.

8. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 처리구 간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 수정 시 관찰되는 Ca^{2+} Oscillation과 난자 활성화 전류

수정 시에는 세포내의 칼슘 농도 및 난자 세포막의 일시적인 전기적 변화를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 지금까지 잘 알려진 수정 시에 나타나는 이온 변화를 공초점 현미경을 이용하여 기록하였다. 세포 내 칼슘 이온은 정자에 의해 주기적으로 변화되었다(Fig. 1A). 정자에 의해 나타나는 칼슘 농도의 변화는 난자마다 칼슘 파형(wave)의 횟수(frequency)와 높이(amplitude)에 있어 차이를 보였지만, 그 현상이 주기적으로 나타나는 것은 동일하였다. 칼슘 파형(wave)이 시작되는 시간이 다른 것은 각 난자마다 정자의 수정능 획득 시간이 다르기 때문으로 생각된다. Whole cell mode에서 정자로부터 추출한 sperm factor를 난자가 놓여있는 실험용액(bath solution)에 처리하였을 때 sperm factor에 의해 활성화되는 활성화전류(activation current)를 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

2. 생쥐 수정란의 세포 내 칼슘 변화

생쥐 수정란의 배 발달 동안 나타나는 세포 내 칼슘 변화를 조사하기 위하여 Fluo 3-AM이 처리된 난자를 실온에서 45분간 배양한 후 공초점 현미경을 사용하여 5초 간격으로 스캔하였다. 난자와 수정란에서 세포 내 칼슘 농도 변화를 조사한 결과 배 발달에 따른 세포 내 칼슘 농도 변화가 난자와 비교하였을 때 유의한 변화를 보이지 않았다 ($p > 0.05$, Fig. 2). 그러나 배반포에서는 영양막 세포(trophoblast)와 내부 세포괴(Inner cell mass)에서 관찰되는 칼슘 농도가 배반포강을 형성하는 영양

막 세포에서 보다 높게 나타나는 것을 볼 수 있다 (Fig. 2). 따라서 세포 내 칼슘 농도는 배 발달 단계에 상관없이 어떤 특정 자극을 받거나 현상이 일어나기 전에는 일정한 수준으로 유지되는 것처럼 보여진다. 포배에서 내부 세포괴보다 영양막 세포 및 배반포강에서 칼슘의 농도가 높게 나타나는 것은 Fluo 3-AM의 화학적 침투 정도의 차이로 보여진다.

3. 배 발달에 따른 난관 내 포타슘 농도 및 막전압 변화

A

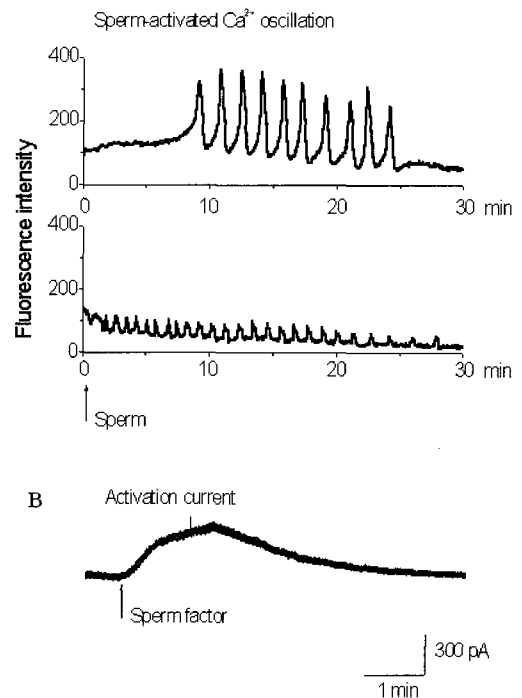


Fig. 1. Representative Ca^{2+} oscillations during fertilization and activation current in mouse oocytes. A. Ca^{2+} oscillation appeared by spermatozoa. The mouse oocytes were exposed to mouse spermatozoa for 30 min. B. Typical trace of the activation current in mouse oocytes. The mature oocytes were whole-cell voltage clamped at 0 mV. A bell-shaped outward ion activation current was recorded when the addition of sperm factor to the oocytes. Pipette and bath solutions contained 150 mM and 5 mM K^+ , respectively.

hCG 처리 및 교미 후 난자, 집합자, 2세포기, 4세포기, 8세포기, 상실배 및 포배가 회수될 수 있는 시기에 난관으로부터 배양액으로 세척된 난관액을 채취하였다. hCG 처리 후 56시간(난관에서 8세포기가 회수되는 시기)까지는 포타슘 농도가 상승하다가 이미 수정란이 자궁으로 이동하였을 것으로 예상되는 시기(hCG 처리 후 64시간과 72시간)의 난관에서는 포타슘 농도가 감소하는 것을 볼 수 있다(Fig. 3A). 그러나 배발달에 따른 난관액내 칼슘 농도는 유의한 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 난관 내 포타슘 농도가 배발달에 중요하게 작용할 가능성을 제시한다. 난관 내 포타슘 농도의 변화가 난자의 안정막 전압에 관여할 것으로 생각되어, 난자 및 수정란에서 전류 고정법을 이용하여 막전압을 기록하였다. Fig. 3B에서 보는 바와 같이 수정란의 막 전압이 난자에서 보여주는 -38 ± 4 mV에 비해 배발달이 진행됨에 따라 탈분극됨을 알 수 있었다. 배반포에서는 -16 ± 4 mV를 나타내었다. 그리고 배발달이 진행됨에 따라 칼슘의 세포내로 유입 정도를 whole cell mode에서 확인하였다(Fig. 3C). 1.7 mM과 10 mM의 칼슘 농도에서 배발달에 따른 칼슘 전류 변화 양상을 비교해 보았

을 때 두 농도에서 모두 세포내로의 칼슘 유입이 감소하는 것을 확인하였다.

4. 칼슘 처리에 따른 생쥐 난자의 막 전압 변화

세포내로의 칼슘 유입은 다른 단계의 배아보다 난자에서 현저하게 증가하였다. 칼슘의 세포내 유입에 따른 막 전압의 변화를 확인하기 위하여 5 mM의 칼슘을 bath solution에 처리하였다. 칼슘을 처리하자마자 막 전압은 일시적인 과분극 현상을 보였다. 일시적인 과분극 현상을 보이다가 칼슘 처리 전의 막 전압으로 회복되었다(Fig. 4A). 연속적인 칼슘의 처리에도 과분극 현상은 동일하게 관찰되었으나 과분극 정도는 처음 처리보다 반복 처리시 작게 나타났다(Fig. 4B). 칼슘 처리시 나타나는 막 전압의 변화가 칼슘에 의해 활성화되는 포타슘 통로에 기인한 것으로 추정되어 포타슘 통로 억제제를 처리하였다. Fig. 4C에서 보는 바와 같이 잘 알려진 포타슘 통로 억제제 TEA 1 mM을 처리하였을 때 대조구에 비해 유의한 변화를 확인할 수 없었다($p > 0.05$). TEA와 함께 small conductance 포타슘 통로의 억제제, apamin을 처리한 결과 과분극의 정도가 다소 감소하는 경향을 보였다. 그러나 그 결

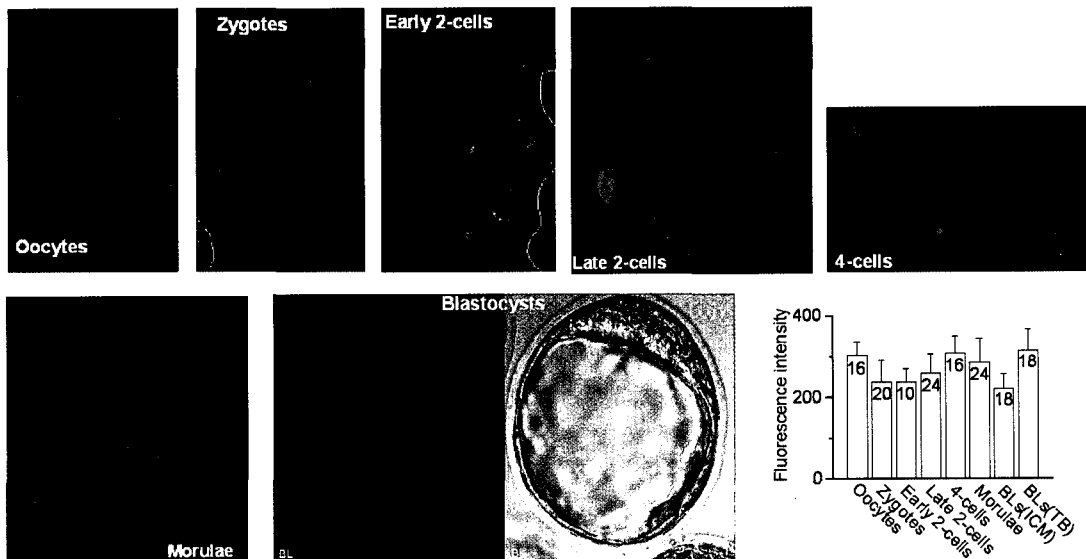


Fig. 2. Basal Ca^{2+} concentration in mouse oocytes and embryos. A. Ca^{2+} images in oocytes and embryos. B. Fluorescence intensity of Ca^{2+} changes. Each bar is the mean \pm SD, and the numbers inside the bar represent the number of eggs used.

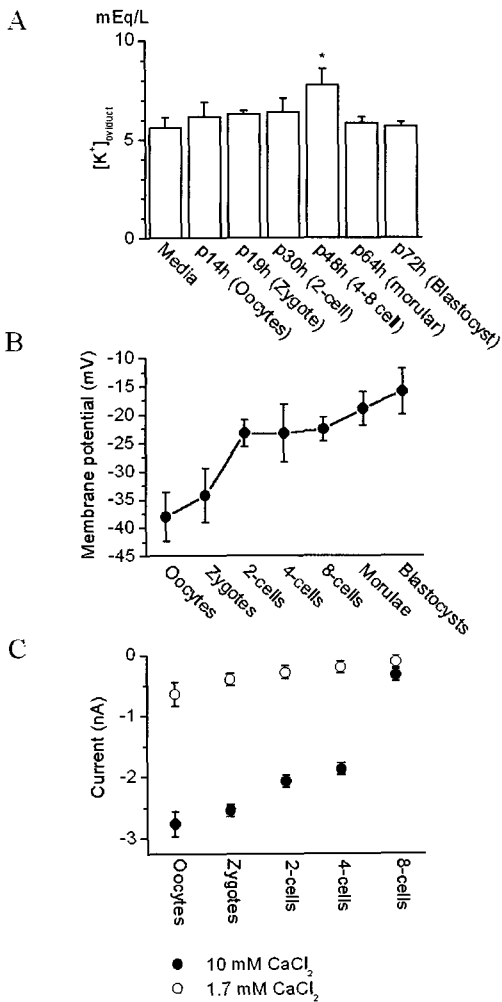


Fig. 3. Changes in K^+ concentration and Ca^{2+} current during early embryonic development. A. K^+ concentration in oviduct. Each bar represents the mean \pm SD of 10 determinations. Asterisk indicates a significant difference from the media K^+ concentration ($p < 0.05$). B. Depolarized membrane potential with the embryonic development. Asterisk indicates a significant difference from oocytes ($p < 0.05$). C. Reduced Ca^{2+} current with the embryonic development. The whole-cell currents were recorded from mouse oocytes and embryos in bath solution containing 1.7 mM (○) and 10 mM (●) Ca^{2+} . The membrane potential was held at -80 mV. Each data represents the mean \pm SD of 10 determinations. p14h–p72h: 14h–72h after injection of hCG.

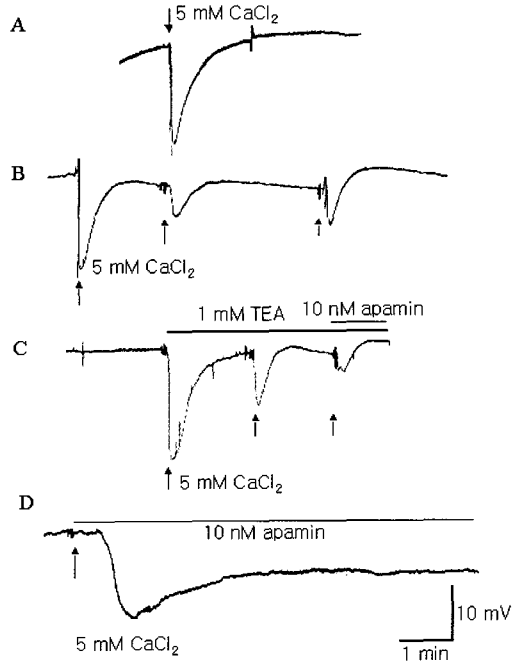


Fig. 4. Hyperpolarization induced by Ca^{2+} in mouse oocytes. A-B. Ca^{2+} hyperpolarized membrane potential of mouse oocytes. C. Effect of TEA on hyperpolarization of membrane potential in mouse oocytes. D. Apamin failed to change Ca^{2+} -induced hyperpolarization in membrane potential.

과가 연속적인 칼슘 처리의 오차인지 실제로 apamin에 의한 영향인지를 확인하기 위하여 apamin만을 단독으로 처리하였다. Apamin을 처리하였을 때 과분극의 정도에는 특별한 변화를 보이지 않았지만, apamin 처리 전의 막 전압으로 회복하는데 있어 다소 시간의 지연을 볼 수 있었다(Fig. 4D). 이상의 결과로부터 일시적인 과분극 현상을 유발시키는 포타슘 통로는 TEA와 apamin에 억제되지 않는 포타슘 통로일 것으로 생각된다. 그리고 small-conductance 포타슘 통로도 부분적으로 안정막 전압 유지에 관여할 것으로 보인다.

고찰

생쥐 난자의 수정과 분화 과정에 있어 칼슘과 포타슘 이온의 농도 변화에 따른 세포의 막 전압

변화는 정상적으로 진행되는 배 발달에 있어 중요한 지표로 작용할 수 있음을 시사한다. 그리고 본 연구에서는 난자의 막 전압 조절에 two-pore domain 포타슘(K_{2p}) 통로가 칼슘 통로와 함께 관여할 수 있음을 처음으로 제시한다.

1. 배 발달 동안 나타나는 이온 농도 및 막 전압의 변화

이온들은 다양한 생물학적 시스템에서 중요한 생화학적·생리학적 변화를 조절하며, 수정 현상, 정자의 침체 반응, 할구의 밀집화 현상에도 관여한다(Stock와 Fraser, 1989; Fraser, 1982; Yanagimachi, 1982). 세포의 이온조성에서 소듐과 칼슘 이온이 세포 밖에서 유의하게 작용하는 반면 포타슘은 세포 안에서 가장 높은 농도로 존재함으로써 세포의 안정막 전압을 조절하는 주된 기능을 나타낸다(DeFelice, 1997). 특히, 난관협부에서 포타슘 농도는 토끼 정자의 운동성을 조절하는데 관여하고 있다(Burkman 등, 1984). 난관은 수정 현상과 초기 배 발달이 이루어지는 곳이다. 난관에서 성숙 과정을 거친 후 체외에서 수정 및 발생 과정을 거친 배와 체내, 난관에서 성숙·수정·발생 과정을 마친 배를 비교해 보았을 경우 난관에서 세 과정을 지낸 배의 생존률이 일반적으로 높았다(Galli와 Lazzari, 1996; Bavister, 1988). 소(bovine) 난관내의 pH를 측정해 본 결과 발정주기에 상관없이 자궁의 pH보다 0.64 정도 높은 pH 7.60을 나타내었으며(Hugentobler 등, 2004), 포타슘 농도도 일반적으로 혈청보다는 난관액에서 높게 나타났다(Grip-po 등, 1992). 생쥐 난관의 삼투압은 290~300 mOsm/kg을 나타내었다(Collins와 Baltz, 1999). 난관의 생리학 특성을 잘 알고 있다면 난자 및 초기 배의 성숙 및 배발달이 체외에서 이루어지더라도 체내 배양과 동일한 결과를 얻을 수 있을 것이다. 본 연구에서도 8세포기 배가 회수되는 시기의 난관액과 난자 회수 시 얻어지는 난관액을 비교해 보았을 때 8세포기 배를 회수하는 시기에 포타슘 농도가 1.5 mM 정도 높게 나타났다. 이와 같은 결과들은 포타슘 농도가 배발달에 직접적인 영향을 보일 수 있다는 가능성을 암시한다.

세포 바깥의 포타슘 농도 상승은 세포를 탈분극

시킨다. 생쥐난자 및 수정란에서 막 전압을 기록하였을 때 배 발달이 진행됨에 따라 막 전압이 탈분극 되는 것을 본 연구에서 확인하였다(Fig. 3B). 그러나 막 전압의 탈분극 현상은 배 발달이 진행되면서 나타나는 포타슘 이온과 칼슘 이온의 변화로 설명할 수 있다(Day 등, 1993). 세포내로의 칼슘 유입을 whole cell current로 기록하였을 때, 배 발달이 진행됨에 따라 칼슘 유입이 감소하였다(Fig. 3C). 칼슘 유입의 감소는 세포 크기의 감소에 따른 칼슘 통로 분포의 감소 및 다른 통로의 활성화로 추정하고 있다(Mitani, 1985). 그러나 배 발달 단계에 상관없이 난자 및 수정란에서 거의 일정한 수준의 칼슘 농도를 유지하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 칼슘 유입의 감소에 따른 보상 현상으로 세포안의 칼슘 저장고로부터 칼슘 분비가 증가하는 것으로 보여진다. 그러나 본 연구에서 기록된 전압 의존성 칼슘 통로를 제외한 다른 칼슘 유입 통로 및 수송체에 의한 칼슘 유입 가능성도 고려해야 할 것이다. 수정과정에서 난자와 정자가 결합할 때 막 전압은 큰 과분극과 연이은 탈분극 현상을 보인다(Tosti와 Boni, 2004). 본 연구에서 칼슘 유입에 따른 막 전압의 변화는 수정과정에서 나타나는 현상과 동일하게 일시적인 과분극 현상을 유발한 후 탈분극 현상을 보여 주었다(Fig. 4). 이러한 일시적인 과분극 현상은 포타슘 통로에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 어떠한 포타슘 통로가 막전압의 과분극 현상을 유발하는지를 조사하고자 잘 알려진 포타슘 통로 차단제인 TEA를 처리하였다. 그리고 TEA에 의해 억제되지 않는 포타슘 통로(칼슘에 의해 활성화되는 small conductance 포타슘 통로)의 차단제인 apamin을 함께 처리하였다. 그러나 난자에서 나타나는 칼슘 유입에 의해 유도된 막 전압의 과분극 현상은 TEA와 apamin에 의해 억제되지 않았다. 따라서 난자의 막 전압 조절에는 지금까지 알려진 포타슘 통로가 아닌 또 다른 포타슘 통로가 관여할 것으로 생각된다.

2. 생쥐 난자에 존재하는 Two-pore Domain 포타슘 통로

K_{2p} 통로는 선택적 억제제가 아직 알려져 있지

않다. 그러나 K_{2p} 통로는 대표적인 포타슘 통로 개방 억제제인 TEA(1 mM), Ba^{2+} (1 mM)에 의해 통로 활성도가 억제되지 않고, 칼슘 의존성 포타슘 통로(Kca, SK)의 개방 억제제(apamin)에 의해서도 영향을 받지 않는 약리학적 특징을 보인다. 본 연구에서는 칼슘에 의해 유도되는 막전압의 과분극 현상에 TEA와 apamin이 영향을 주지 못한다는 데 근거하여 막전압 변화에 K_{2p} 통로가 관여할 수 있음을 제시하였다. K_{2p} 통로는 16종이 알려져 있으며(Kim, 2005), 그 중 TWIK-related spinal cord K^+ 통로(TRESK) 그룹은 세포내 칼슘 농도의 증가에 의해 활성화되는 포타슘 통로이다(Czirjak 등, 2004). 세포 바깥의 칼슘 농도에 의해 변화되는 통로는 TASK-3 통로를 들 수 있고, 아직 논쟁 중에는 있지만 TREK-1과 TREK-2 통로도 세포내 칼슘 농도에 따라 변화되는 것으로 알려져 있다. 역전사 효소 중합 연쇄 반응과 면역 세포 화학 염색법을 이용하여 생쥐 난소에서 여러 종류의 K_{2p} 통로가 존재함을 확인하였다(data not shown). 따라서 생쥐 난자에서 K_{2p} 통로는 세포 내외 칼슘 변화와 함께 난자의 막 전압 조절에 관여할 것으로 예상되며, 배 발달 동안 변화되는 칼슘과 포타슘 이온은 수정 및 초기 배 발달에 중요한 인자로서 작용할 것이다.

적 요

이온 통로 및 이온 농도의 변화는 수정 현상을 포함한 다양한 세포 기능에 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 이온의 변화가 포유동물 배의 발달 과정에 어떻게 관여하는지에 대해서는 알려진 바가 적다. 본 연구에서는 생쥐난자가 수정 이후 배 발달 과정을 거치는 동안 나타나는 칼슘과 포타슘 이온의 변화를 전기생리학적 실험 기법과 공초점 현미경을 이용하여 조사하였다. 수정 시에 나타나는 일시적인 세포내 칼슘 농도 변화는 활성 전류(수정 전류)와 함께 동반되었다. 그러나 수정과 같은 극적인 현상이나 자극이 없는 시기에는 세포내 칼슘 농도가 배 발달 시기와 상관없이 일정한 수준으로 유지되었다. 이것은 세포내외의 칼슘 농도의 보상현상으로도 설명할 수 있을 것이다. 배 발

달이 진행됨에 따라 난관액의 포타슘 농도는 계속 증가하여 8세포기 배에서는 난자보다 26% 증가하였다. 상실배, 포배기에서는 포타슘 농도가 감소하였다. 배 발달이 진행됨에 따라 주로 포타슘 이온에 의해 조절되는 막 전압은 탈분극되고, 칼슘 이온의 세포 안으로의 유입은 점점 감소하였다. 생쥐 난자에 5 mM의 칼슘을 처리하였을 때 막 전압은 일시적인 과분극 현상을 보이다가 회복되었다. 칼슘 유입에 따른 막 전압 변화에 관여하는 포타슘 통로를 확인하기 위하여 포타슘 통로 차단제를 전처리한 후 칼슘을 처리한 결과, 칼슘만을 단독으로 처리한 결과와 유의한 차이를 보이지 않았다. 막 전압의 과분극 현상은 잘 알려진 포타슘 통로 차단제인 TEA에 억제되지 않았다. 그리고 small conductance Ca^{2+} -activated 포타슘 통로 차단제인 apamin에 의해서도 억제되지 않았다. 따라서 생쥐 난자에서 과분극을 유발시키는 포타슘 통로는 TEA와 apamin에 억제되지 않는 다른 포타슘 통로로 생각된다. 이상의 결과로부터 배 발달 동안 변화되는 칼슘과 포타슘 이온은 수정 및 초기 배 발달에 중요한 인자로서 작용할 것으로 생각되며, two-pore domain 포타슘 통로가 난자의 막 전압 조절에 관여할 가능성을 제시한다.

참고문헌

- Bae IH and Park JH. 1987. Studies do the requirements of Ca^{2+} for cell division and Ca^{2+} permeability of plasma membrane of fast dividing mouse embryo cells. *Kor. J. Fert. Steril.*, 14:93-100.
- Bavister BD. 1988. A minichamber device for maintaining a constant carbon dioxide in air atmosphere during prolonged culture of cells on the stage of an inverted microscope. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 24(8):759-763.
- Burkman LJ, Overstreet JW and Katz DF. 1984. A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviducal isthmus. *J. Reprod. Fert.*, 71(2):367-376.
- Collins JL and Baltz JM. 1999. Estimates of mouse

- oviductal fluid tonicity based on osmotic responses of embryos. *Biol. Reprod.*, 60(5):1188-1193.
- Czirjak G, Toth ZE and Enyedi P. 2004. The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J. Biol. Chem.*, 279(18):18550-18558.
- Day ML, Pickering SJ, Johnson MH and Cook DI. 1993. Cell-cycle control of a large-conductance K⁺ channel in mouse early embryos. *Nature*, 365(6446):560-562.
- Defelice LJ. 1997. *Electrical Properties of Cells, Patch Clamp for Biologists*. Springer, New York, Chap 2, pp. 49-122.
- Fraser LR. 1982. Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *J. Androl.*, 3(6):412-419.
- Galli C and Lazzari G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:371-379.
- Grippio AA, Henault MA, Anderson SH and Killian GJ. 1992. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.*, 75(1):58-65.
- Homa ST, Carroll J and Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum. Reprod.*, 8:1274-1281.
- Hosey MM, Chang FC, O'Callahan CM and Ptasinski J. 1989. L-type calcium channels in cardiac and skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56:27-38.
- Hugentobler S, Morris DG, Kane MT and Sreenan JM. 2004. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology*, 61(7-8):1419-1427.
- Jaffe LF. 1983. Sources of calcium in egg activation: A review and hypothesis. *Dev. Biol.*, 99: 265-276.
- Kim D. 2005. Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr. Pharm. Des.*, 11(21):2717-2736.
- Kolajova M, Hammer MA, Collins JL and Baltz JM. 2001. Developmentally regulated cell cycle dependence of swelling-activated anion channel activity in the mouse embryo. *Development*, 128(18):3427-3434.
- Mitani S. 1985. The reduction of calcium current associated with early differentiation of the murine embryo. *J. Physiol.*, 363(1):71-86.
- Miyazaki S and Igusa Y. 1981. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature*, 290(5808):702-704.
- Okamoto H, Takahashi K, and Yamashita N. 1977. Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.*, 267(2):465-495.
- Stock CE and Fraser LR. 1989. Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 87(2):463-478.
- Tosti E and Boni R. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Hum. Reprod. Update*, 10(1):53-65.
- Trimarchi JR, Liu L, Smith PJ and Keefe DL. 2002. Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282:C588-594.
- Winston NJ, Johnson MH, McConnell JM, Cook DI and Day ML. 2004. Expression and role of the ether-a-go-go-related (MERG1A) potassium-channel protein during preimplantation mouse development. *Biol. Reprod.*, 70(4):1070-1079.
- Yanagimachi R. 1982. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Mol. Reprod. Dev.*, 5(4):323-344.

(접수일: 2006. 2. 6 / 채택일: 2006. 2. 27)