

O-1 햄스터 난자의 Stretch-Activated Channel의 특성과 수정 후 변화

김양미*, 강다원, 박춘옥, 홍성근
경상대학교 생리학교실

서 론

세포막 신전에 의하여 활성이 이루어지는 통로 (stretch-activated channel, SAC)는 Na⁺나 K⁺에 투과성을 보여 선택성이 없는 nonselective channel 이나 Cl⁻에 선택성을 나타낸다. 특히 Cl⁻ 통로의 성상이나 생리적 역할에 관해서는 Na⁺, Ca²⁺, 및 K⁺과 같은 양이온에 선택적인 통로에 비하여 아직도 명확하지 않으나 대부분 흥분을 억제하거나 fluid secretion, 세포용적 조절 등에 관여한다고 추측하고 있다.

난자에서 처녀생식 (parthenogenesis)을 유도하는 한 방법으로 hypoosmotic shock을 이용하고 있으며, 많은 종류의 세포에서 삼투압 변화에 따른 세포용적 조절에 Cl⁻ ion이 관여한다고 알려져 있기 때문에 난자에서도 삼투변화에 따르는 용적 변화에 Cl⁻ ion의 관련 가능성이 높은 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 Cl⁻ 농도변화에 민감한 햄스터 난자의 SAC의 기능이 흥분성의 억제나, fluid 분비조절, 세포용적 조절기능 이외에 cell cycle의 변화 및 수정 시 관찰되는 과분극반응에 대한 관련 여부를 관찰하고자 하였다. 미분화 세포인 hamster 난자의 SAC 구조가 cytoskeleton과 연계되어 있다면 세포분열시 세포막 지지구조인 cytoskeleton의 변화가 일어나므로 stretch-activated Cl⁻ 통로의 기능과 세포 주기에 대한 이들의 역할을 알아보기 위하여 SAC의 구조적 성상과 통로의 조절기전 및 수정전후의 전도도를 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

6 주령 이상의 Chinese hamster 암컷을 대상으로 PMSG와 hCG를 복강내 주사하여 과배란을 유도하였다. 배란이 이루어진 햄스터 난관의 팽대부를 분리하여 난자를 수집하고 수집된 난자는 hyaluronidase와 protease로 처리하여 cumulus cell 과 투명대를 분리하였다. 수정란을 얻기 위하여 light/dark (L/D) 주기가 조절되는 시설에서 L14/D10 hr 주기로 2주 이상 적응 후 교미대상에 적용하였다. 수정란 (fertilized zygote)은 HCG 주사 후 암컷 한마리당 수컷 두마리를 합사시켜 교미를 유도한 후 다음날 아침 질도말을 하

여 정자를 확인하고 미수정란과 같은 시간에 1-세포기 수정란을 분리하였다.

SAC 기록에 사용되는 기본 pipette 용액은, NaI 140 mM, MgCl₂ 2 mM, CsOH/EGTA 2 mM, HEPES 10 mM (pH 7.4)로 조성된 용액을 사용하였다. 실험용액내 일가 양이온으로 Na⁺이나 K⁺을 구분없이 사용하였으며 필요에 따라 Cl⁻는 glutamate나 acetate, aspartate로 대체하였다.

단일통로의 기록은 patch clamp 기법을 활용하여 cell-attached나 inside-out 상태에서 기록하였다. SAC의 관찰은 cell-attached 상태에서 적어도 5 분이상 기록한 후, 음압을 주어 기록하였다. SAC는 음압이 가해지지 않으면 활성화되지 않기 때문에 항상 음압이 걸린 상태에서 10~30 초 동안 기록한다. 이 상태에서 inside-out patch로 이행한 후 한 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 분석 프로그램을 이용하여 각 parameter를 구한다. 이때, 분리한 지 8 시간 이후의 난자에서 기록한 결과는 분석대상에서 제외하였다.

결과 및 논의

Hamster 난자의 안정막전압과 유사한 -50 mV에서 기록된 SAC는 140 mM NaCl과 같은 등장성 용액으로 조성한 상태에서 자발적으로 활성이 나타나는 단일 통로가 드물게 관찰되었으며 대부분 음압에 의한 신전이나 양압을 가하였을 때 세포막의 변형이 나타나면 단일 통로의 활성이 관찰되었다. 때로는 평균 10 분이상 방치하였을 때 자발적으로 활성이 이루어지는 통로도 관찰되었으나 발생확률은 매우 낮은 수준이었다. SAC의 크기나 open time 등을 기준하였을 때 약 4 종류로 대별되었다.

일반적으로 첫 음압에 대하여 50 pS 내외의 통로가 관찰되나 음압 자극이 지속되는 동안 적응 현상을 나타내어 0.6~1.0 pA 가량 감소된 크기의 sublevel의 통로 활성이 관찰되었다. Amplitude histogram 분석시 0.8 pA 및 2.8 pA 크기인 두 종류 이상의 SAC 통로 활성으로 이루어진 결과로

보였다.

음압을 가하여 기록되는 SAC의 활성은 압력에 따라 그 활성정도가 증가하였으며 음압에 대한 SAC의 활성은 난자의 세포막 상태와 patch membrane에 존재하는 통로의 분포에 따라 음압에 대한 sensitivity가 다르게 관찰되었다. 30 mmHg 이내의 압력에서 SAC의 활성은 비례적으로 증가하였으나 그 이상의 큰 음압에 대해서는 SAC 전류크기는 증가하지 않고 포화되었다. 그러나 대부분의 난자에서 관찰되는 SAC의 활동은 반복적인 음압자극에 대하여 쉽게 적응하는 통로 활성이 현저하게 감소하였다.

Hamster 난자의 SAC는 cytoskeleton의 활성을 저해하는 cytochalasin D나 B로 처리하였을 때, 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 8-bromo cAMP (10 μ M)에 의하여 활성이 0.8 pA 크기의 SAC 활성이 2.4 pA로 증가되었으며 cAMP-의존성 protein kinase (PKA) 억제제인 H-7에 의하여 감소되어 SAC 활성이 PKA에 조절될 수 있음을 시사하였다.

4 종류의 양상으로 표현되는 SAC의 활성은 수정 전후의 난자에서 모두 관찰되어 수정 전후에 특징적인 변화는 확인되지 않았다. 그러나 SAC 활동을 모두 종합하여 단일 통로의 amplitude histogram으로 분석하여 보면 수정전과 수정 후 1-세포기 난자와 2-세포기 난자에서 음압에 의하여 관찰되는 SAC의 활성은 각각 일정한 양상으로 구분될 수 있었다. 수정전의 난자에서는 0.6~0.8 pA 사이의 단일통로 전류와 1.5~2.0 pA 내외의 단일 통로가 SAC 활동의 대부분을 담당하는 데 반하여, 수정 후 1-세포기에서는 2.4 및 3.2 pA 크기의 SAC 활동이 크게 증가하였다. 2-세포기에서는 큰 amplitude의 SAC 활성은 현저하게 감소하고 0.3~0.6 pA 크기의 오래 열리는 SAC가 음압에 의한 내향전류를 담당하는 것으로 추측되었다. 이러한 결과는 수정 후 왕성한 세포 분열이 이루어짐에 따라 전도도가 큰 SAC 활동이 작은 전도도를 가진 통로의 활성으로 전환되며 이는 세포분화가 진행될수록 이온전도도가 감소한다는 이전의 연구 결과와도 일치하여 발생초기 난자의 세포외액 (난관액) 조성이 일정하게 유지될 경우 세포 내외간의 물질이동은 수정 전보다 크게 감소되고 있는 것으로 판단되었다.

요 약

햄스터 난자에서 관찰되는 SAC의 활동은 30 mmHg 이내의 음압자극에 대하여 잘 관찰되었으며 단일통로의 크기나 open time에 따라 4 종류로 구분될 수 있었다. SAC 활동은 PKA에 의하여 활성이 조절되었으며 수정 후 할구분할이 진행될수록 SAC 전도도가 작은 통로로 전환되어 발생 초기 SAC 활동양상이 특징적인 변화가 관찰되었다.

참고문헌

- Lansman JB, Hallam TJ, and Pink TJ (1987) *Nature* 325: 811-813
- Martinac B, Buechener M, Delcour AH, Alder J, and Kung C, (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2297-2301
- Kaufman MH and Surani MAH (1974) *J Embryol Exp Morph* 31: 513-526
- Coombs JL, Villaz M, and Moody WJ (1992) *Develop Biol* 153: 272-282
- Miyazaki S and Igusa Y (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 931-935