

## 뱀장어 근육내 Ryanodine Receptor의 기능 및 면역학적 성질

충남대학교 의과대학 약리학교실

석 정 호 · 이 연 수 · 남 장 현  
최 속 정 · 홍 장 희 · 이 재 흔

= Abstract =

### Functional and Immunological Properties of Ryanodine Receptor in the Eel Skeletal Muscle

Jeong Ho Seok, Yeon Soo Lee, Jang Hyeon Nam  
Suk Jeong Choi, Jang Hee Hong and Jae Heun Lee

*College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-131, Korea*

To investigate the functional and immunological properties of the Ca-release channel in the sarcoplasmic reticulum(SR) of the eel skeletal muscle, [<sup>3</sup>H]ryanodine binding, SDS gel electrophoresis, <sup>45</sup>Ca release studies, and immunoblot assay were carried out in the SR of the eel skeletal muscle.

Maximal binding sites(B<sub>max</sub>) and K<sub>D</sub> values of [<sup>3</sup>H]ryanodine for Ca-release channel of the SR of the eel skeletal muscle were 19.44 ± 1.40 pmole/mg protein and 15.55 ± 1.69 nM, respectively. [<sup>3</sup>H]Ryanodine binding to RyR was increased by calcium and AMP.

The SR of the eel skeletal muscle has two high molecular weight bands on the SDS PAGE. The mobility of upper band was more slower than the single band of the rabbit skeletal muscle, and that of the lower band was similar with the single band of canine cardiac muscle.

Vesicular <sup>45</sup>Ca-release was activated by calcium. Ca-induced <sup>45</sup>Ca-release was significantly inhibited by MgCl<sub>2</sub>(2 mM), ruthenium red(10 μM) or tetracaine(1 mM), but not by high concentration of calcium itself. AMP-induced <sup>45</sup>Ca-release was slightly occurred only in the absence of calcium, it was not inhibited by MgCl<sub>2</sub> or ruthenium red. Caffeine also increased <sup>45</sup>Ca-release from the SR vesicles, but it was not affected by MgCl<sub>2</sub> or ruthenium red.

Polyclonal Ab against rat skeletal muscle RyR is reacted with that of rabbit, but not reacted with that of the eel skeletal muscle.

These results suggested that ryanodine receptor of the SR of the eel skeletal muscle is showing some similar properties with that of mammalian skeletal muscle, but might be an another isotype channel having two bands which is less sensitive to AMP, not cross-reacted with anti-sera against rat RyR, and not inhibited by high concentration of calcium.

---

**Key Words:** Ryanodine receptor, Ca-channel, Sarcoplasmic reticulum, Eel

---

\* 이 논문은 1994년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

## 서 론

근형질내세망(SR=sarcoplasmic reticulum)은 골격근이나 심근의 수축에 필요한 상당량의 칼슘을 공급하는 것으로 이미 잘 알려져있다(Ebashi, 1976; Endo, 1977; Fabiato, 1981; Fabiato, 1983). 근세포막에 형성된 활동전압은 근세포막의 세포내 함입으로 형성된 T-tubule의 특수 수용체를 통해 SR의 junctional area에 전달되어 SR내에 저장되어 있는 칼슘을 유리시키게 된다(Ebashi, 1976; Fabiato, 1983) 그 과정은 아직 확실하게 밝혀지지 않았다. 포유류 근육의 Junctional SR은 ryanodine 수용체(RyR)로 알려진 칼슘유리 channel을 보유하고 있고, 이들 channel은 polypeptides 4개로 구성된 homotetramer로 이루어져 있으며(Fleischer, 1989; Lai와 Meissner, 1989; Lai등, 1989), 생체내에 존재하는  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , 또는 ATP에 의해 그 기능이 조절된다고 알려져 있다(Meissner등, 1989; Meissner와 Henderson, 1987; Meissner, 1984).

포유류 골격근이나 심근 SR의 칼슘유리 channel은 전기영동에서 RyR band의 mobility 차이를 나타내며 아미노산 조성이 약간 다른(Zorzato등, 1990; Otsu등, 1990; Nakai등, 1990) 단일 고분자량 band를 나타내지만, 기본적으로 칼슘유리 속도에서의 차이를 제외하고는 거의 유사한 기능적 특징을 갖는다(Meissner등, 1986; Meissner와 Henderson, 1987). 그러나 갑각류 골격근 SR의 RyR는 전기영동에서 포유류 골격근과 심근 중간의 mobility를 갖고 있지만, 면역학적 및 기능상 포유류의 것과는 큰 차이가 있음이 최근 보고되면서(Seok등, 1992; Seok등, 1994), SR 칼슘유리 channel의 isoform이 동물의 종(species)에 따라 다양하게 존재할 수 있다는 가능성을 제시해 주었다.

따라서 저자들은 최근 뱀장어의 골격근 SR이 포유류 골격근과 심근의 각각의 고분자량 band와 비슷한 위치에 두개의 band를 나타내는 고분자량

단백을 갖고 있음을 발견하였기에, 뱀장어 골격근 SR에도 ryanodine 수용체가 있는지 또 있다면 칼슘유리 기능은 단일 band로 구성된 channel과 어떻게 다른지 알아보기 위하여  $^{45}Ca$ 유리,  $[^3H]ryanodine$  결합실험 및 immunoblot assay를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1) SR vesicles의 제조

Junctional vesicles은 Seok 등이 기술한 방법(1992)을 일부 변경하여 얻었다. 이를 간단히 기술하면 다음과 같다. 민물 뱀장어를 전기충격으로 치사시켜 얻은 근육 약 40 그램을 300 ml의 저삼투용액[ 조성: 0.1 M NaCl, 20 mM K/Pipes, pH 6.8, 1.0 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 100 nM aprotinin, 1  $\mu$ M leupeptin, 1  $\mu$ M pepstatin, 1 mM iodoacetamide 및 1 mM benzamidine]내에서 잘게 자르고, Polytron(Kinematica)를 사용하여 균질화한 후, 2,500 $\times$ g(Sorvall 고속 냉동원 심분리기; GSA rotor)로 30분 원침시키고 3층의 cheesecloth를 통과시켜 상정액을 얻었다. 이 상정액을 33,500 $\times$ g(Sorvall 초원심분리기; T865 rotor)로 30분간 원침시켜 침사를 얻었고, 0.6 M KCl 용액[ 조성: 0.6 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 100  $\mu$ M EGTA, 75  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 0.2 mM PMSF 및 1  $\mu$ M leupeptin]내에 부유시켜 30분간 얼음상자속에 방치한 후 126,000 $\times$ g(T865 rotor)로 30분 원침시켜 다시 얻은 침사를 20 ml의 0.6 M KCl 용액에 부유시켰다. 이를 0.6 M KCl 용액으로 만든 40%, 30% 및 20% sucrose gradient위에 첨가하여 121,500 $\times$ g(Sorvall; AH629 rotor)로 16시간 원침시켜 40%와 30% 사이에서 SR vesicles을 회수하였고, 이를 두배 부피의 찬 증류수로 천천히 희석하여 126,000 $\times$ g(T865 rotor)로 30분 원침시켰다. 회수된 침사는 0.3 M sucrose, 5 mM K/Pipes, pH 7.0 용액에 부유시켜 사용할 때까지 냉동고에 보관하였다( $-70^{\circ}C$ ).

## 2) [<sup>3</sup>H]Ryanodine 결합 실험

SR vesicles(30~50  $\mu$ g)을 고농도의 K 용액[1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.4, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM adenosine-5'-monophosphate(AMP), 0.2 mM PMSF, 2  $\mu$ M leupeptin, 2 mM dithiothreitol, 2~162 nM [<sup>3</sup>H]ryanodine]내에서 2시간 incubation(20°C)한 후 그 일부를 꺼내 40배의 증류수로 희석하여 2% polyethylenimine용액에 적신 여과지(Whatman, GF/B; pore 1  $\mu$ m)에 흡인 여과하고 증류수로 세척하였다(5 ml $\times$ 3). 회수된 여과지를 계측용 vial에 넣고 scintillation cocktail(조성: 아래)을 첨가한 후 결합된 [<sup>3</sup>H]ryanodine의 radioactivity를 liquid scintillation counter(Packard)로 측정하였다. 이 실험에서 비특이성 결합은 1,000 배의 unlabeled ryanodine을 반응액에 넣어 위에서 서술한 것과 동일한 방법으로 얻었고, 특이성 결합은 전체 결합에서 비특이성 결합을 빼준 값으로 하였고, 이를 Scatchard 분석하여 B<sub>max</sub>와 K<sub>d</sub>값을 구하였다.

[<sup>3</sup>H]ryanodine 20 nM 존재시의 ryanodine 결합에 대한 칼슘, AMP(5 mM), tetracaine(1 mM), Mg(1 mM), 및 ruthenium red(10  $\mu$ M) 효과는 20°C에서 한시간 동안 반응시킨 후 위에서 설명한 것과 동일한 방법으로 처리하였으며, 사용된 반응액의 조성은 다음과 같다.

반응액: 1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 2 mM dithiothreitol, 1.6  $\mu$ M leupeptin, Ca(1, 100, or 300  $\mu$ M), 20 nM [<sup>3</sup>H]ryanodine, 및/또는 5 mM AMP

Scintillation cocktail의 조성: [triton 300 ml, toluene 694.5 ml, 2,5-diphenyloxazole 5 g, 1,4-bis-4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl-benzol 0.5 g] /L

## 3) <sup>45</sup>Ca 유리 실험

SR vesicles(~3 mg)을 부유용액[0.1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 1  $\mu$ M leupeptin, 0.2 mM PMSF, 0.1 mM EGTA, 및 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>]에 넣고 30분간 ice bath에서 preincubation한 후

126,000 $\times$ g(T865 rotor)로 30분 원침하여 얻은 침사를 소량의 같은 용액에 부유시켰다. SR vesicles 5  $\mu$ l를 2 mM <sup>45</sup>Ca(부유용액으로 만듦) 5  $\mu$ l에 첨가하여 20°C에서 2시간 동안 incubation한 후 100배 용적의 등장성 유리 또는 rinse용액으로 희석하고, 일정 시간 동안(25초 및 60 초) <sup>45</sup>Ca을 유리시킨 후 0.4 ml씩 취하여 여과지(Gelman GA/6; pore 0.45  $\mu$ m)에 흡인 여과하고 rinse액으로 세척하였다(1 ml 씩 3회). 세척된 여과지는 계측용 vial에 넣고 scintillation cocktail을 첨가하여 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

유리용액은 0.1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 및 0.1 mM EGTA를 바탕으로 칼슘 농도를 조정하였고(Fabiato, 1988), 유리 촉진제(AMP)나 억제제(MgCl<sub>2</sub>, tetracaine 또는 ruthenium red)는 별도로 유리용액에 첨가하였다. Rinse 용액의 조성은 0.1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 2 mM EGTA, 10  $\mu$ M ruthenium red, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 2 mM MgCl<sub>2</sub>이었다.

한편 SR vesicles에 caffeine에 의한 칼슘유리 부분이 존재하는 지 알아보기 위해 caffeine, MgCl<sub>2</sub>, 또는 ruthenium red를 반응액에 첨가하여 상술한 것과 동일한 방법으로 시행하였다.

본 실험에 사용한 재료로 <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>(10.58 mCi/mg)와 [<sup>3</sup>H]ryanodine은 Dupont-New England Nuclear, AMP 및 protease inhibitors는 Sigma로부터 구입하였고, 기타 시약들은 analytical grade를 사용하였다.

## 4) SDS polyacrylamide gel 분석

제조된 SR vesicles을 3~12% SDS polyacrylamide running gel과 3% stacking gel을 이용하는 Laemmli buffer system(Laemmli, 1970)으로 단백질 band를 분석하였다. 약 100  $\mu$ g의 토끼 골격근, 개 심근, 바다가재 및 뱀장어 골격근 SR vesicles을 30 V로 16시간 전기영동하였고, 1시간 동안 12% Trichloroacetic acid액에서 고정한 후 colloidal Coomassie Blue staining 방법(Neuhoff

등, 1988)으로 3시간이상 염색하고 증류수와 소량의 methanol로 수차 반복 탈색하여 SR 각각이 갖고 있는 단백 band의 mobility를 관찰하였다.

### 5) Ryanodine receptor에 대한 항체 생산과 면역학적 교차반응

(1) Polyclonal Ab 생성: 포유류의 RyR와 뱀장어의 RyR간에 면역학적 교차반응을 알아보기 위해 백서의 골격근 SR에서 Seok 등(1994)이 사용한 방법으로 RyR을 정제하여 centricon 30 (Amicon)으로 농축하였다. 농축된 RyR 1 ml(50~100  $\mu$ g)를 같은 부피의 Freund's adjuvant (complete)와 섞어 emulsion화 시켜 토끼의 피내에 일차 주사하고, 4주 후 RyR를 incomplete adjuvant와 일차와 같은 방법으로 섞어 이차 주사하였다. 마지막 주사는 이차와 같은 방법으로 실시한 후 10일에서 14일 사이에 토끼의 귀 central artery에서 채혈하고 혈청을 분리하여 RyR간 면역학적 교차반응의 polyclonal Ab로 사용하였다.

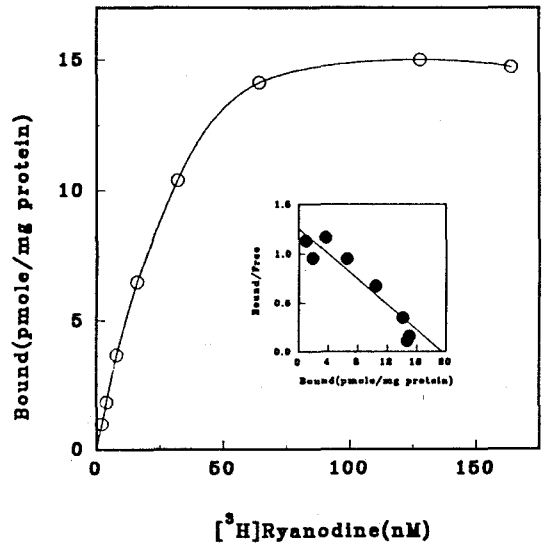
(2) 면역학적 교차반응: 실험 2에서와 같은 방법으로 토끼와 뱀장어 골격근 및 개 심근 SR vesicles을 전기영동한 후 Tris-glycine buffer(25 mM Tris base, 190 mM glycine, pH 8.2~8.5) 내에서 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 1 A에서 20~24시간 전사시켰다. 전사가 끝난 PVDF membrane은 5% non-fat dried milk용액(phosphate buffer saline=PBS)에 넣어

한 시간 이상 shaker에서 흔들어 준 다음 PBS로 세척하고, PBS/Tween(0.02%) 용액에서 1° Ab(A에서 제조)와 최소 3시간 이상 반응시켰다. Ab와 결합된 PVDFmembrane은 다시 2° Ab(goat anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated Ab)와 한 시간 이상 반응시킨 다음 PBS/Tween 용액으로 세번 세척하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 3,3'-diaminobenzidine. 4HCl을 써서 발색시켜 RyR 간 면역학적 교차반응을 관찰하였다.

## 실험 성적

### 1) SR vesicles에 대한 [<sup>3</sup>H]Ryanodine 결합

뱀장어 SR vesicles에 ryanodine binding site가 있는지 알아보기위해 [<sup>3</sup>H]ryanodine 결합 실험을



**Fig. 1.** Specific binding of [<sup>3</sup>H]ryanodine to SR vesicles of the eel skeletal muscle. Binding was carried out in the solution containing 1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.4, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 5 mM AMP, 0.2 mM PMSF, 100  $\mu$ M dithiothreitol, 1  $\mu$ M leupeptin, and 2~162 nM [<sup>3</sup>H]ryanodine. Nonspecific binding was assessed using a 1,000 fold excess of unlabeled ryanodine. *Inset:* Scatchard plot of the same data.

**Table 1.** Ryanodine binding sites and K<sub>D</sub> values of SR vesicles of the eel skeletal muscle

Bmax(pmole/mg protein)	K <sub>D</sub> (nM)
19.44 ± 1.40	15.55 ± 1.69

Data(mean ± SE) were obtained from Scatchard analysis of 8 binding experiments. [<sup>3</sup>H]ryanodine binding to the SR vesicles of the eel skeletal muscle was done in the solution containing 1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.4, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 5 mM AMP, 0.2 mM PMSF, 100  $\mu$ M dithiothreito, 1  $\mu$ M leupeptin, and 2~162 nM [<sup>3</sup>H]ryanodine. Nonspecific binding was assessed using a 1,000-fold excess of unlabeled ryanodine.

실시하여 특이성 결합량을 구하고, 이를 Scatchard 분석하여 그 결과를 Fig. 1과 Table 1에 제시하였다. 뱀장어 골격근 SR은 ryanodine binding sites(Bmax)가  $19.44 \pm 1.40$  pmol/mg protein이었고,  $K_D$  값은  $15.55 \pm 1.69$  nM로 high affinity binding site를 가지고 있는 것으로 나타났다.

SR vesicles에 대한 [ $^3$ H]ryanodine(20 nM) 결합은 반응액내 칼슘 농도 증가와 더불어 증가되었고, AMP를 첨가하였을 때 더 증가하는 경향을 보였으나(Table 2), 이는 칼슘 유리 channel을 억제시키는 것으로 알려진  $MgCl_2$ 나 ruthenium red로 영향을 받지 않았다(Table 3). 이 실험에서 비특이성 결합량은 전체 결합량(total binding)의 5~8% 정도이었다.

## 2) 전기영동상의 SR 단백 Band

3~12% SDS polyacrylamide gel을 만들어 토

**Table 2.** Effect of Ca and/or AMP on the specific [ $^3$ H]ryanodine binding to SR vesicles of the eel skeletal muscle

	[ $^3$ H]Ryanodine binding in the presence of Ca		
	1 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M
⊖ AMP	$1.47 \pm 0.16$	$2.86 \pm 0.15$	$3.22 \pm 0.26$
⊕ AMP	—	$3.55 \pm 0.25$	$3.60 \pm 0.28$
	pmole/mg protein		

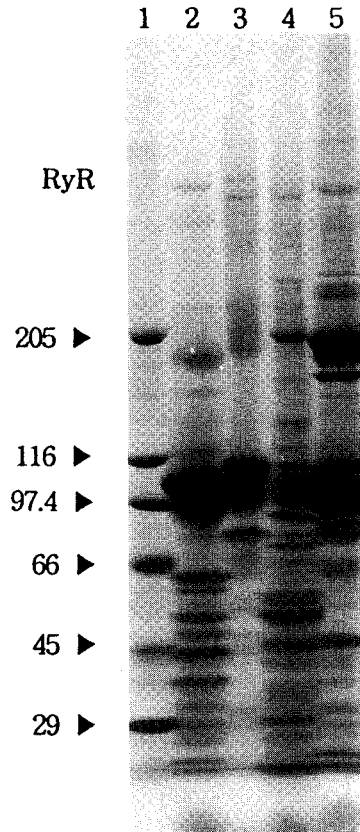
Data(mean  $\pm$  SE) were obtained from 6 experiments. [ $^3$ H]Ryanodine binding(20 nM) was done for 1 h at 20°C in the solution containing 1 M KCl, 20 mM K/Pipes pH 7.0, 2 mM dithiothreitol, 1.6  $\mu$ M leupeptin, Ca (1, 100 or 300  $\mu$ M), and/or 5 mM AMP.

**Table 3.** Effect of some Ca-release inhibitors on [ $^3$ H]ryanodine binding to eel SR vesicles

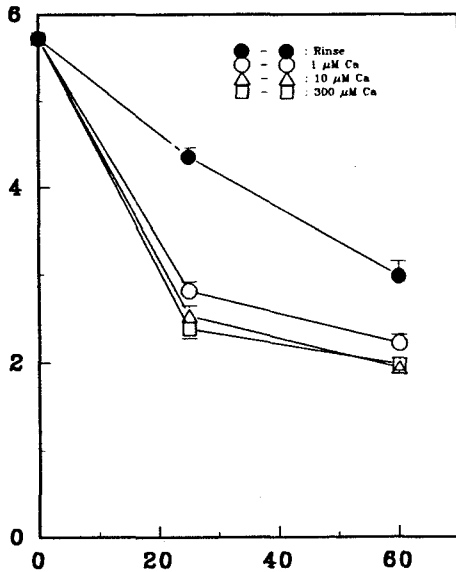
	[ $^3$ H]Ryanodine binding in the presence of 300 $\mu$ M $CaCl_2$			
	+ AMP	+ AMP+Tetra	+ AMP+RR	+ AMP+Mg
	$3.22 \pm 0.26$	$3.60 \pm 0.28$	$3.68 \pm 0.33$	$3.93 \pm 0.21$
	pmole/mg protein			

Legend is same as in Table 2, except the addition of Ca-release inhibitors(tetra=1 mM tetracaine, RR=10  $\mu$ M ruthenium red, or Mg=1 mM  $MgCl_2$ ).

끼 골격근, 개의 심근 및 바다가재의 SR과 함께 뱀장어의 SR을 전기영동시켜 그 결과를 Fig. 2에



**Fig. 2.** SDS-gel of rabbit, eel, lobster skeletal and canine cardiac muscle. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of molecular weight standard (lane 1), rabbit(lane 2), eel(lane 3), canine(lane 4), and lobster(lane 5) SR vesicles. Molecular weight values( $\times 10^{-3}$ ) of standard proteins are indicated on the left. RyR=ryanodine receptor

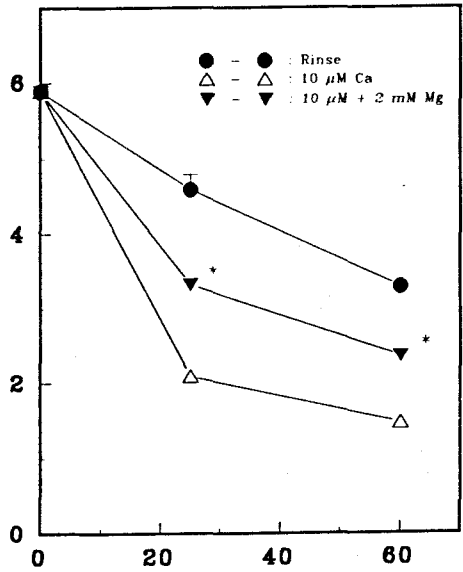


**Fig. 3.** Ca-induced  $^{45}\text{Ca}$ -release from the SR vesicles of the eel skeletal muscle.  $^{45}\text{Ca}$  was passively taken up into SR vesicles for 2 hours at 25°C in 0.1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, solution containing 1 mM  $^{45}\text{Ca}$ . Release was started with the addition of rinse or release solution, and stopped with filtration through GA / 6 filter (pore; 0.45  $\mu\text{m}$ ) at 25 and 60 seconds. Rinse contained 0.1 M KCl, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 2 mM EGTA, and 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Calcium concentration (1, 10, or 300  $\mu\text{M}$ ) in release solution was changed by Fabiato's computer program (Fabiato, 1988).

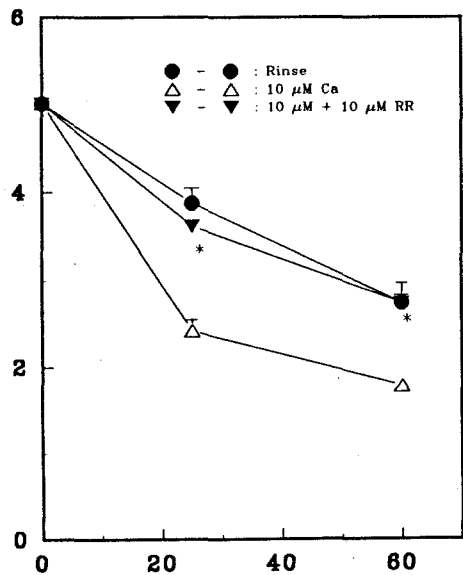
제시했다. 토끼 (lane 2), 개 (lane 4), 및 바다가재 (lane 5)의 SR은 각각 다른 위치에 단일의 고분자량 단백 band (RyR)를 가지고 있고, 그 각각의 mobility는 개, 바다가재, 그리고 토끼 순서로 느린 것으로 나타났다. 이들에 비해 뱀장어의 SR (lane 3)은 두개의 고분자량 단백 band를 가지고 있고, upper band의 mobility는 토끼의 것보다 더 느렸으나, lower band는 심근의 것과 유사한 mobility를 가지고 있는 것으로 나타났다.

### 3) SR vesicles로 부터 $^{45}\text{Ca}$ 유리

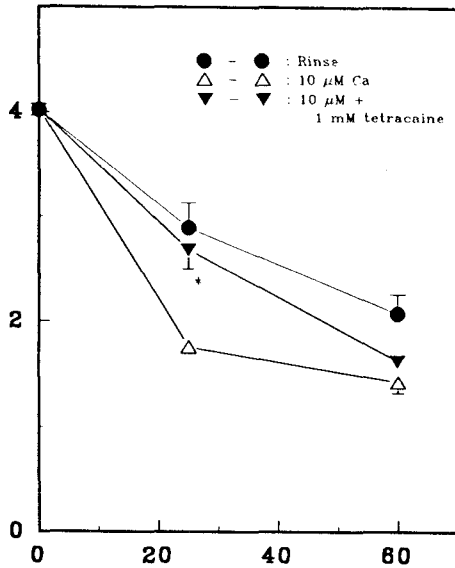
(1) Calcium과 AMP에 의한  $^{45}\text{Ca}$  유리: SR vesicles에 수동적으로 흡수시킨  $^{45}\text{Ca}$ 의 vesicles로



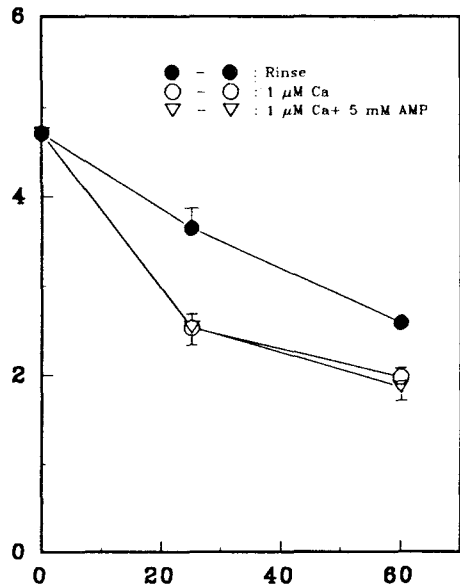
**Fig. 4.** Effect of Mg on the Ca-induced  $^{45}\text{Ca}$ -release from the SR vesicles of the eel skeletal muscle.  $^{45}\text{Ca}$ -release induced by 10  $\mu\text{M}$  Ca was significantly inhibited by 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (\* $P < 0.001$ ).



**Fig. 5.** Effect of ruthenium red on the Ca-induced  $^{45}\text{Ca}$ -release from the SR vesicles of the eel skeletal muscle.  $^{45}\text{Ca}$ -release induced by 10  $\mu\text{M}$  Ca was significantly inhibited by 10  $\mu\text{M}$  ruthenium red (\*:  $P < 0.001$ ).



**Fig. 6.** Effect of tetracaine on Ca-induced  $^{45}\text{Ca}$ -release from the SR vesicles of the eel skeletal muscle. Tetracaine was added into the incubation solution at 1 hr after addition of  $^{45}\text{Ca}$  and the release solution.  $^{45}\text{Ca}$ -release induced by  $10\ \mu\text{M}$  Ca was significantly inhibited by 1 mM tetracaine (\* $P < 0.001$ ).



**Fig. 7** Effect of AMP(5 mM) on the  $^{45}\text{Ca}$ -release from the SR vesicles of the eel skeletal muscle.

**Table 4.** Effect of Mg and ruthenium red on the  $^{45}\text{Ca}$ -release by AMP from the SR vesicles of the eel skeletal muscle

	$^{45}\text{Ca}$				
	Rinse	R1	R1+AMP	R1+AMP+Mg	R1+AMP+RR
25 sec	$3.30 \pm 0.087$	$2.98 \pm 0.110$	$2.73 \pm 0.199$	$2.75 \pm 0.205$	$2.70 \pm 0.202$
60	$2.49 \pm 0.010$	$2.40 \pm 0.057$	$1.99 \pm 0.147$	$1.94 \pm 0.078$	$1.97 \pm 0.152$

(nmole/mg protein)

Data(mean  $\pm$  SE) obtained from 4 experiments show residual  $^{45}\text{Ca}$  amount in the SR vesicles of the eel skeletal muscle after  $^{45}\text{Ca}$ -release by AMP(5 mM) in the absence or presence of Mg(2 mM) or ruthenium red(RR:  $10\ \mu\text{M}$ ). Rinse contained 0.1 M CK1, 20 mM K/Pipes, pH 7.0, 2 mM EGTA, and 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . R1 is solution containing 0.1 M KCl, 20 mM K/Pipes pH 7.0, and 0.1 mM EGTA.

부터의 유리 현상을 알아보기 위해 vesicles 외부의 칼슘 농도를 변화시켰을 때의  $^{45}\text{Ca}$  유리 pattern을 Fig. 3에 제시하였다. 외부 칼슘을  $1\ \mu\text{M}$ 에서  $300\ \mu\text{M}$ 까지 증가시켰을 때의 25초 동안의  $^{45}\text{Ca}$  유리는 외부칼슘이 전혀 없는 rinse액으로 반응시켰을 때에 비해 유의성 있게 증가되었을 뿐(35~

45%)( $P < 0.001$ ) 포유류에서 관찰되는 고농도의 칼슘에 의한  $^{45}\text{Ca}$  유리 억제 현상은 나타나지 않았다.

$^{45}\text{Ca}$  유리가 생체내 존재 물질인  $\text{MgCl}_2$ , ruthenium red 또는 tetracaine에 의해 조절되는지 알아보기 위해  $10\ \mu\text{M}$  칼슘이 포함된 유리 용액에 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $10\ \mu\text{M}$  ruthenium red 또는 1 mM

**Table 5.** Effect of caffeine on <sup>45</sup>Ca-release from the SR Vesicles of the eel skeletal muscle

	<sup>45</sup> Ca				
	Rinse	R1	Ca	R1+Caffeine	Ca+Caffeine
25 sec	4.45±0.225	3.71±0.011	2.54±0.219	2.19±0.017	1.87±0.208
60	3.27±0.251	2.80±0.070	1.84±0.173	1.75±0.040	1.49±0.010

(nmole/mg protein)

Data(mean±SE) obtained from 4 experiments show residual <sup>45</sup>Ca amount in the SR vesicles of the eel skeletal muscle after <sup>45</sup>Ca-release by caffeine(20 mM) and/or Ca(10 μM). Other legends are same as Table 4.

**Table 6.** Effect of Mg and ruthenium red on <sup>45</sup>Ca-release from the SR vesicles of the eel skeletal muscle

	<sup>45</sup> Ca			
	Rinse	R1+Caffeine	R1+Caffeine+Mg	R1+Caffeine+RR
25 sec	4.45±0.225	2.19±0.017	2.18±0.011	2.29±0.219
60	3.27±0.251	1.75±0.040	1.67±0.011	1.87±0.219

(nmole/mg protein)

Legends are same as Table 4 and/or 5.

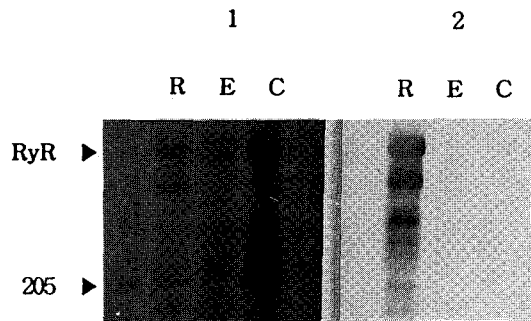
tetracaine을 첨가시켰을 때 이들 물질 각각은 10 μM 칼슘 만으로 유리되는 량의 51, 49 또는 52 %를 억제시켰다(P<0.001)(Fig. 4, 5, 6).

한편 AMP는 1 μM 칼슘에 의한 <sup>45</sup>Ca유리를 증가시키지 않았으나(Fig. 7), 칼슘 없이 AMP만 있을 때 8% 정도만 더 유리 시켰으며 이는 2 mM의 MgCl<sub>2</sub>나 10 μM로 차단되지 않았다(Table 4).

**(2) Caffeine에 의한 <sup>45</sup>Ca 유리:** SR vesicles에서 caffeine(20 mM)에 의한 <sup>45</sup>Ca 유리는 반응액내에 칼슘을 넣지않았을 때(R1)와 비교하여 약 40% 정도 증가되었으나(Table 5), MgCl<sub>2</sub>(2 mM)나 ruthenium red(10 μM)로 차단되지 않았다(Table 6). 따라서 제조된 SR vesicles은 RyR 이외에 다른 경로를 통해 칼슘을 유리 시킬 수 있는 요소를 가지고 있음을 알 수 있다.

#### 4) 면역학적 교차반응

정제된 흰쥐 골격근의 RyR을 토끼에 주사하여 만든 polyclonal Ab와 뱀장어 골격근 RyR간에



**Fig. 8.** Immunoblot analysis of ryanodine receptors. SR proteins(rabbit=R, Eel=E, canine=C) were electrophoresed through 3~12% SDS polyacrylamide gel and electrophoretically transferred onto immobilon PVDF membranes. Transfer membranes were either stained with Coomassie Blue(panel 2) or probed with purified rat skeletal muscle RyR antisera(panel 2).

면역학적 교차반응이 일어나는지 알아보기 위해 토끼 골격근 또는 뱀장어 골격근 RyR을 포함하고 있는 SR vesicles을 전기영동하고, 이를 다시



PVDF membrane에 전사시켜 Ab와 반응시켰다. 제조된 항체는 뱀장어의 RyR과는 면역 반응을 일으키지 않았으나, 토끼의 RyR band 및 그의 몇개의 band와 반응을 나타냈다(Fig. 8).

## 고 찰

근수축 과정(Excitation-Contraction Coupling) (Ebashi, 1976; Fleischer와 Inui, 1989; Frank, 1987; Meissner, 1984)중 필요한 칼슘의 상당량이 저장 장소(SR)로부터 유리된다는 것을 설명하기 위해 포유류 골격근과 심근 SR vesicles에 대한 많은 연구가 이루어졌다(Meissner등, 1986; Meissner와 Henderson, 1987; Meissner, 1984; Ikemoto등, 1985; Rousseau등, 1988). 그 결과 SR의 junctional part에 칼슘유리 channel이 존재하며, 이는 내인성 물질인 칼슘과 ATP에 의해 유리가 촉진되고  $MgCl_2$ 에 의해 억제되며(Meissner 등, 1986; Meissner와 Henderson, 1987; Meissner, 1984; Ikemoto등, 1985), 정제 후 single channel 연구에서 1가 양이온에 high conductance를 나타내는(Lai와 Meissner, 1989) 분자량 565,000 polypeptides 4개로 구성된 거대분자로 알려져왔다(Zorzato등, 1990; Otsu등, 1990; Nakai등, 1990). 그러나 최근에 Seok 등(1992, 1994)은 갑각류 골격근 SR 칼슘유리 channel에 대한 연구로 포유류와는 그 성격이 다른 type의 isoform channel이 있음을 보고하여 종(species)에 따라 다른 type의 ryanodine receptor(칼슘유리 channel)가 존재할 수 있음을 시사하였다. 따라서 저자들은 또 다른 성격의 칼슘유리 channel이 존재하는지 알아보기위해 본 실험을 실시하였다.

뱀장어 SR vesicles에 대한 [ $^3H$ ]ryanodine 결합 실험으로 ryanodine maximal binding sites ( $B_{max}$ ) 19.44 pmole/mg protein과  $K_D$  15.55 nM의 high affinity binding sites를 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 1). 이중  $K_D$  값이 2~3배 큰 것 외에는 포유류나 갑각류의 것과 유사한 것

으로 나타났다.

SR vesicles을 전기영동하였을 때 뱀장어 SR vesicles은 포유류 골격근과 심근 및 갑각류 골격근의 단일 band와 달리 두개의 고분자량 단백질 band를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 2), 그중 upper band는 포유류 골격근의 것보다 느리고 lower band는 심근의 것과 유사하지만 갑각류 것보다는 약간 빠른 mobility를 가지고 있었다. 뱀장어 SR vesicles이 왜 두개의 band를 가지고 있는지 알 수 없으나, 두개의 band를 가지고 있기 때문에 SR vesicles의 칼슘유리 기능이 포유류나 갑각류의 것과 차이가 있는지 알아 볼 필요가 있어서 칼슘유리 실험을 실시하였다.

칼슘 유도에 의한 뱀장어 SR vesicles로부터의  $^{45}Ca$  유리는 유리유도 용액내 칼슘 농도 증가에 따라 증가되었으나(Fig. 3), 포유류 골격근과 심근 SR에서 보이는 고농도 칼슘에 의한 칼슘유리 억제작용(Meissner등, 1986; Meissner와 Henderson, 1987)이 없었다. 이러한 점은 갑각류의 것(Seok등, 1992; 1994)과 유사하였으나 다른점이 있다면 칼슘농도 증가에 따라  $^{45}Ca$  유리가 현저하게 증가되지 않고 있다는 것이다. 그러나  $MgCl_2$ , ruthenium red 또는 tetracaine이 칼슘유리를 유의성 있게 억제한다(Fig. 4, 5, 6)는 점은 포유류의 것과 유사하였고,  $MgCl_2$ 의 억제효과가 낮은 갑각류의 것(Seok 등, 1992; 1994)과는 약간 다른 성질이였다.

AMP는 포유류에서 칼슘유리를 현저하게 촉진시키는 것으로 알려져 있지만, 뱀장어 SR vesicles에서는 칼슘이 없을 때 만 약간 증가(8%)시켰고(Fig. 7),  $MgCl_2$ 나 ruthenium red로 차단되지 않았다(Table 4).

한편 제조된 SR vesicles에서의 칼슘유리가 RyR이외의 방법으로 유리되는 것이 있는 지 알아보기 위해 caffeine을 유리 용액에 첨가하였을 때도 상당량의 칼슘이 유리되었으나(Table 5),  $MgCl_2$ 나 ruthenium red로 거의 차단되지 못한 점(Table 6)으로 미루어 볼 때 본 실험에 사용된 SR vesicles은 RyR이외의 칼슘유리 부분을 가지

고 있음을 알 수 있다.

쥐 골격근 RyR를 정제하여 만든 Ab는 immunoblot assay에서 토끼의 것과 반응을 나타냈으나 뱀장어의 것과는 반응하지 않았다(Fig. 8). 그러나 토끼의 것과 반응시 RyR band외의 단백질도 반응을 한 점으로 보아 RyR정제 과정에서 purity가 낮았거나 혹은 전기영동 과정에서 RyR이 파괴된 것으로 여겨진다.

상술한 바 처럼 뱀장어 골격근 SR로 부터의 칼슘유리에 대한 내인성 물질인 칼슘, AMP, MgCl<sub>2</sub>, ruthenium red 또는 tetracaine의 작용이 포유류나 갑각류의 것과 유사하거나 다른 점이 나타남 점과 RyR간 면역학적 교차 반응이 나타나지 않는 점 등이 칼슘 channel을 이루는 단백질의 homotetramer와 two homooligomer의 차이인 지, 아니면 channel 단백질 자체의 아미노산 조성 차이 때문인 지를 밝히기 위해서는 구조적 또는 분자 생물학적인 깊은 연구가 필요할 것으로 여겨지며, 두 band중 어느 것이 칼슘유리 기능과 더 밀접한 관계가 있는 지 더 추구해 보아야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

뱀장어 골격근 근형질내세망(SR)을 vesicles 형태로 제조하여 칼슘유리 channel의 유무와 기능을 알아보기 위하여 [<sup>3</sup>H]ryanodine 결합실험, 전기영동, <sup>45</sup>Ca 유리실험, 및 immunoblot assay를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 뱀장어 골격근 SR vesicles은 maximal ryanodine binding site(Bmax) 19.44 ± 1.40 pmole/mg protein 와 KD 15.55 ± 1.69 nM의 high affinity binding sites를 가지고 있고, 이들에 대한 [<sup>3</sup>H]ryanodine 결합은 칼슘과 AMP에 의해 증가되었다.

2) 뱀장어 골격근 SR vesicles은 전기영동에서 두개의 고분자량 단백질 band를 가지고 있으며, upper band는 토끼 골격근 SR ryanodine receptor(RyR) band 보다 느린 mobility를 나타냈으

나, lower band는 개 심근의 RyR band와 유사한 mobility를 나타냈다.

3) 뱀장어 골격근 SR vesicles로 부터의 <sup>45</sup>Ca유리는 외부 칼슘 농도 변화에 따라(1, 10 또는 300 μM) 증가되었으며, MgCl<sub>2</sub>(2 mM), ruthenium red(10 μM) 또는 tetracaine(1 mM) 의해 유의성 있게 억제되었으나(P<0.001), 고농도의 칼슘에 의해서는 억제되지 않았다. AMP는 외부 칼슘에 의한 <sup>45</sup>Ca유리를 증가시키지 못하였고, AMP 자체만으로 8% 정도 증가시켰으나, 이는 MgCl<sub>2</sub>나 ruthenium red에 의해 차단되지 않았다. Caffeine도 칼슘 유리를 증가 시켰으나 MgCl<sub>2</sub>나 ruthenium red로 영향받지 않았다.

4) 뱀장어 근육내 RyR는 백서 골격근 RyR에 대한 항체와 면역학적 교차반응을 일으키지 않았다.

이상의 실험성적으로 뱀장어 골격근 SR vesicles은 두개의 고분자량 단백질 band로 된 RyR을 가지고 있으며, 이를 통한 칼슘 유도에 의한 칼슘유리는 포유류의 것과 유사하다. 그러나 기존 RyR와 달리 이들은 AMP에 대한 반응이 낮고, 면역학적으로 교차반응을 일으키지도 않으며, 고농도 칼슘으로 억제되지 않는 RyR(isotype)인 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Ebashi S: *Excitation-contraction coupling. Annul Rev Physiol* 38: 293-313, 1976
- Endo M: *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev* 57: 71-108, 1977
- Fabiato A: *Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. J Gen Physiol* 78: 457-497, 1981
- Fabiato A: *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol* 245: C1-C14, 1983

- Fleischer S and Inui M: *Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling*. *Annul Rev Biophys Biophys Chem* 18: 333-364, 1989
- Fabiato A: *Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands*. *Methods in Enzymol* 157: 379-417, 1988
- Frank GB: *Pharmacological studies of excitation-contraction coupling in skeletal muscle*. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 711-716, 1987
- Ikemoto N, Antoniu B and Meszaros L: *Rapid flow chemical quench studies of calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem* 260: 14096-14100, 1985
- Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Lai FA and Meissner G: *The muscle ryanodine receptor and its intrinsic  $Ca^{2+}$  channel activity*. *J Bioenerg Biomembr* 21: 227-246, 1989
- Lai FA, Misra M, Xu L, Smith HA and Meissner G: *The ryanodine receptor -  $Ca^{2+}$  release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem* 264: 16776-16785, 1989
- Meissner G: *Adenine nucleotide stimulation of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in the sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem* 259: 2315-2374, 1984
- Meissner G, Darling E and Eveleth J: *Kinetics of rapid  $Ca^{2+}$  release by sarcoplasmic reticulum. Effects of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and adenine nucleotides*. *Biochemistry*, 25: 236-244, 1986
- Meissner G and Henderson JS: *Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on  $Ca^{2+}$  and is modulated by  $Mg^{2+}$ , adenine nucleotide, and calmodulin*. *J Biol Chem* 262: 3065-3073, 1987
- Nakai J, Imagawa T, Hakamata Y, Shigekawa M, Takeshima H and Numa S: *Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel*. *FEBS Lett* 271: 169-177, 1990
- Neuhoff V, Arold N, Taube D and Ehrhardt W: *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250*. *Electrophoresis* 9: 255-262, 1988
- Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM and MacLennan DH: *Molecular cloning of cDNA encoding the  $Ca^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem* 265: 13472-13483, 1990
- Rios E and Pizarro G: *Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling*. *Niþs* 3: 223-227, 1988
- Rousseau E, Ladine J, Liu Q-Y and Meissner G: *Activation of the  $Ca^{2+}$  release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds*. *Arch Biochem Biophys* 267: 75-86, 1988
- Seok JH, Xu L, Kramarcy NR, Sealock R and Meissner G: *The 30S lobster skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channel(ryanodine receptor) has functional properties distinct from the mammalian channel protein*. *J Biol Chem* 267: 15893-15901, 1992
- Seok JH, Jung JK, Hur KM and Lee JH: *Characterization of calcium release channel(ryanodine receptor) in sarcoplasmic reticulum of crustacean skeletal muscle*. *Kor J Pharmacol* 30(1): 125-136, 1994
- Zorzato F, Fujii J, Otsu K, Phillips M, Green NM, Lai FA, Meissner G and MacLennan DH: *Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the  $Ca^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem* 265: 2244-2256, 1990