

골격근과 평활근의 K_{ATP} 통로 활성화에 대한 세포내 ATP의 다른 효과

대구 가톨릭의료원 및 계명대학교 의과대학 신경과학교실¹, 생리학교실 및 만성질환연구소²,
내과학교실³, 동국대학교 의과대학 마취과학교실⁴

권오대 · 임정근¹ · 김행균⁴ · 김대광² · 황재석³ · 박근규³ · 박성희² · 조치흠² · 이인규³ · 송대규²

A Differential Effect of Intracellular ATP on Skeletal- and Smooth Muscle-Type K_{ATP} Channel Activities

Oh Dae Kwon, Jeong Geun Lim¹, Haeng Gyun Kim⁴, Dae Kwang Kim², Jae Seok Hwang³,
Keun Gyu Park³, Sung Hee Park², Chi Heum Cho, In Kyu Lee³, Dae Kyu Song²

*Department of Neurology, Daegu Catholic Medical Center; Department of Neurology¹,
Physiology & CDR center², Internal Medicine³, Keimyung University School of Medicine, Daegu
Department of Anesthesiology⁴, College of Medicine, Dongkuk University, Kyungju*

- Abstract -

Background: The ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel comprises an inwardly-rectifying K^+ channel (Kir) and a sulfonylurea receptor (SUR). This study investigated the mechanism of different ATP sensitivity between skeletal- (Kir6.2/SUR2A) and smooth muscle- (Kir6.2/SUR2B) type K_{ATP} channels.

Methods: Messenger RNAs encoding mouse Kir6.2, and rat SUR2A or 2B were co-injected into *Xenopus Laevis* oocytes to express each type of K_{ATP} channel. Using the inside-out patch clamp technique, the channel currents for MgATP sensitivity were measured and analyzed.

Results: By addition of 100 μ M of MgATP, the current initially decreased and then slowly increased in Kir6.2/SUR2A. This gradual, ATP sensitivity decrease during prolonged MgATP application was totally blocked by LY 294002, a phosphatidylinositol-3 and -4 kinase inhibitor. In contrast, a rather rapid sensitivity decrease after initial inhibition was observed in Kir6.2/SUR2B by 100 μ M of ATP, which was not blocked by LY 294002. This channel activation was Mg^{2+} -dependent, suggesting that ATP hydrolysis is critical.

Conclusion: This result supports the idea that the ability of MgATP to stimulate Kir6.2/SUR2B channels reflects a faster rate of ATP hydrolysis at NBD2 of SUR2B (J Kor Diabetes Assoc 27:332~342, 2003).

Key Words: ATP-sensitive potassium channel, MgATP, MgADP, Sulfonylurea receptor, Skeletal and smooth muscles

서 론

ATP-민감성 칼륨 통로 (ATP-sensitive potassium, K_{ATP} channel)는 세포의 대사정도를 세포의 전기적 활성도로 연결시키는 기능을 한다. K_{ATP} 통로는 췌장 베타세포에서 포도당과 설폰요소제에 반응, 활성이 감소하여 인슐린분비를 증가시키는 기능 외에, 허혈시에 세포내 ATP 농도가 감소할 때 활성이 증가되어, 세포막 전압을 안정화 시켜, 조직의 과도한 에너지 소모를 줄여 세포를 보호하는데 기여한다^{1~6)}. 그러나 여러 조직에 존재하는 다른 종류의 K_{ATP} 통로는 대사 억제에 대해 각각 다른 감수성 (sensitivity)을 보인다. 베타세포와 관상동맥의 혈관 평활근세포에서는 낮은 농도의 세포외 포도당에 노출될 때 K_{ATP} 통로가 개방될 수 있는 반면^{7,8)}, 골격근과 심근에 존재하는 K_{ATP} 통로는 실험시 포도당이 없는 용액에서조차 닫힌 상태로 있다가 대사억제제를 투여할 때와 같은 심각한 수준의 ATP 농도 감소에 의해서만 개방된다¹⁾. 이러한 사실은 베타세포와 혈관 평활근 K_{ATP} 통로는 대사성 억제, 즉, 세포내 ATP 농도감소에 훨씬 더 민감한 반면, 골격근과 심근의 K_{ATP} 통로는 상대적으로 덜 민감함을 암시한다²⁾. 예기치 않은 허혈시 인체에서 손상이 심한 조직 중의 하나는 심근이며, 여러 가지 원인이 있을 수 있으나, 위의 사실들을 근거하여서는 K_{ATP} 통로가 다른 조직보다 같은 세포내 ATP 농도감소에 의해 보다 늦게 열려, 안정막 전압으로의 회복이 늦은 것도 한 원인일 수 있겠다.

K_{ATP} 통로는 실질적인 통로인 Kir6.2 (pore-forming subunit, inward-rectifier potassium channel) 이단위 4개와 설폰요소제 수용체 (sulfonylurea receptor; SUR) 아형 (isoform) 4개로 구성된 octamer로 하나의

이온통로를 만든다. SUR은 각 조직마다 아형이 다르며, 즉 베타세포에서 K_{ATP} 통로는 Kir6.2/SUR1, 심근과 골격근은 Kir6.2/SUR2A 그리고 평활근에서는 Kir6.2/SUR2B로 이루어져 있다^{9~13)}. K_{ATP} 통로 활성의 대사적 조절은 아데닌 뉴클레오티드인 ATP와 MgADP의 상대적 세포질 농도의 비 (ATP/ADP ratio)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. Kir6.2에 ATP가 직접 작용할 때, K_{ATP} 통로는 억제되는 반면, MgADP는 SUR에 작용하여, K_{ATP} 통로를 활성화시킨다^{14~17)}. 다른 ATP-binding cassette (ABC) 수용체처럼¹⁸⁾, SUR은 두개의 뉴클레오티드 결합 부위 (nucleotide-binding domain)인 NBD1과 NBD2를 가지는데 각각은 Walker A (WA) motif, Walker B (WB) motif, 그리고 그들의 연결 부위 (linker region)로 구성되어 있다.

SUR2A와 SUR2B는 일종의 splice variant로서, C-말단 42개의 아미노산 서열 안에서만 구조적 차이를 보이지만, 기능적으로 SUR2A와 SUR2B는 MgATP에 현저히 다르게 반응함을 보여준다. 8-azido-ATP 결합 연구에서는 ATP에 대한 SUR2B의 NBD1과 NBD2의 결합 친화력이 SUR2A의 그것보다 현저히 높음을 보여준다¹⁹⁾. 비록 SUR2A와 2B의 MgADP에 대한 활성 증가 반응정도는 비슷하지만, MgATP에 대한 반응은 다르다^{20,21)}. 즉, ATP에 노출시 초기에 K_{ATP} 통로 활성도는 ATP가 Kir6.2에 직접 작용하여 억제되지만, 오히려 ATP의 계속적 존재에 의해 그 억제가 서서히 약화되며, 그 약화속도는 Kir6.2/SUR2B에서 훨씬 빠르다²⁰⁾. 더욱이 ATP의 존재시 MgADP의 통로활성 증가 능력도 Kir6.2/SUR2A보다 Kir6.2/SUR2B에서 현저히 크다²²⁾. 이러한 사실로 미루어 ATP가 Kir6.2외에 SUR에도 작용할 수 있음을 의미하며, 계속적 ATP 존

재시 ATP 감수성이 감소함으로 볼 때, 그 작용은 마치 ADP처럼 통로 활성화이며, 그 작용이 SUR2B에서 SUR2A보다 더 크다는 것을 암시한다고 하겠다. 생리학적으로 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킬 수 있는 요인으로, 세포내 MgADP 및 MgATP 외에도 세포막 인지질로부터 유래된 포스파티딜이노시톨 이인산 (phosphatidylinositol biphosphate, PIP2)이 있다. PIP2는 세포막에 부착 존재하는 포스파티딜이노시톨 -3 또는 -4 키나아제 (PI-3, -4 kinase)에 의해 만들어져, 통로활성을 증가시킬 수 있다.

이에 저자들은 SUR에서 어떤 기전으로 인해 ATP의 장기간 투여가 ATP의 고유기능인 통로활성 억제 뿐 만 아니라, 서서히 K_{ATP} 통로의 활성을 증가시킬 수 있는지, 그리고 단지 C-말단 32개의 아미노산 배열만 서로 다른 SUR2A와 SUR2B에서 그 정도에 차이가 나는 이유를 밝히고자 하였다. 그리하여 허혈시에 나타나는 조직별 손상정도의 차이에 대한 원인중 하나를 규명하고, 거기에 대비한 예방 및 치료제의 개발에 도움을 주려고 하였다. 또한, K_{ATP} 통로 활성을 억제하여 인슐린 분비를 증가시키는 설폰요소제 당뇨병 약들은 허혈성 질환을 가지고 있는 환자에서는 특히 위험하며, 그 기전을 정확히 이해한다는 것은 앞으로의 환자 치료 지표 설정에 있어 큰 도움이 되리라 생각하여 실험을 계획하였다.

방 법

1. 유전자 클로닝 (gene cloning)

생쥐의 Kir6.2 (Genbank D50581)와^{10,12)} 백서의 SUR2A (Genbank D83598)와¹¹⁾ SUR2B (Genbank D86038)의¹³⁾ cDNA들을 pBF 벡터를 이용하여 클로닝 하였다. 각 cDNA로부터 mRNA의 제조에는 mMESSAGE mMACHINE large scale in vitro transcription kit (Ambion, Austin, TX)을 이용하였으며, Capped mRNA 형태로 만들어 실험에 사용하였다²³⁾.

2. 난자의 수집

암컷 *Xenopus laevis*를 MS222 (2 g/L added to the water with pH 7.4; Sigma Co., St. Louis, MO)로 마

취하고 난소 하나를 개복수술로 제거하였다. 미성숙 V-VI기 난자를 1.0 mg/mL 콜라게나아제 (collagenase type V; Sigma Co., St. Louis, MO)와 함께 실온에서 60분간 배양한 후 미세핀셋으로 현미경하에서 난자막을 제거하였다. 이후 각각 ~ 2 ng의 SUR2A 혹은 SUR2B mRNA와 ~ 0.1 ng의 Kir6.2 mRNA를 미세 유리관내로 함께 흡인한 후 난자를 통해 유도기를 통해 주입하였다. 최종 주사량은 난자당 50 nL이었다. 분리된 난자를 Barth 용액에 보관하고 19°C 배양기에서 배양하였으며, 주사 후 1~4일에 K_{ATP} 통로 활성을 보이는 난자를 대상으로 실험을 시행하였다²³⁾.

3. 전기생리학

세포막편 (patch) 피펫은 붕규산 재질 유리로부터 뽑았고 피펫 용액으로 채웠을 때 250~500 k Ω 저항을 가졌다. 전류 (current)를 0 mV의 전위에서 inside-out mode로 기록하였다²³⁾. 전류는 -110 mV에서 +100 mV 사이에서 반복적인 3 초간 voltage ramps를 유발하고 GeneClamp 500 patch-clamp 증폭기 (Axon Instrument, Foster City, CA)를 사용하여 기록하였다. 결과를 5 KHz에서 여과하였고 Digidata 1200 Interface를 사용하여 1 KHz에서 디지털화하였으며 pClamp 소프트웨어 (Axon Instruments, Foster City, CA)를 사용하여 분석하였다. 기록을 비디오테이프에 저장하였다.

피펫용액은 KCl 140 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 2.6 mM, HEPES 10 mM (pH 7.4 with KOH)을 함유하였고 세포내 용액은 KCl 110 mM, MgCl₂ 1.4 mM, EGTA 10 mM, HEPES 10 mM (pH 7.2 with KOH; final [K⁺] ~ 140 mM)을 함유하였다.

ATP의 투여농도는 무작위 순서로 적용하였고 세포막편에서 자연적 통로 활성 감소를 역전시키기 위해 실험동안 간혹 필요시 1 mM MgATP에 노출시켰다. 포스파티딜이노시톨 (phosphatidylinositol) -3과 -4 키나아제 억제제인 LY 294002는 CalBiochem (La Jolla, CA)로부터 구입하였다.

4. 자료 분석

K_{ATP} 통로를 통한 이온전도도 (conductance)는 -20 mV와 -100 mV 사이의 전류-전압 관계 곡선을 직선

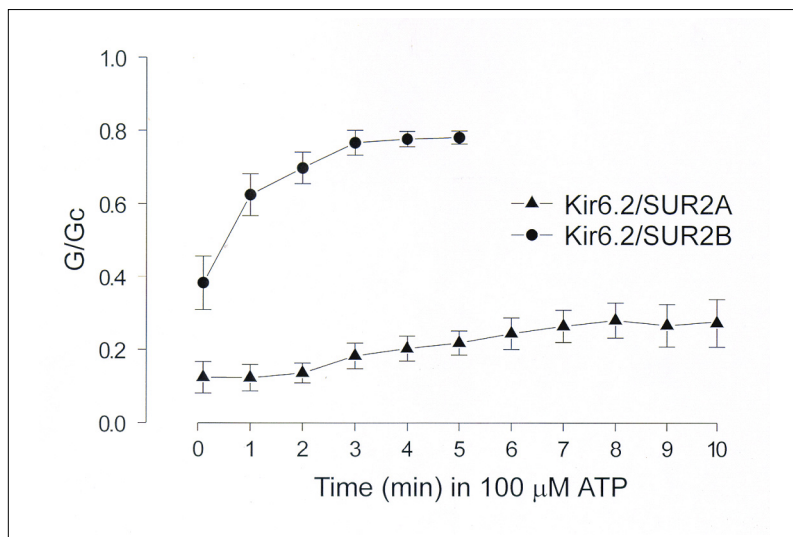


Fig. 1. Effect of prolonged ATP application on K_{ATP} channel currents for Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B. Mean K_{ATP} conductance recorded for Kir6.2/SUR2A ($\blacktriangle$, $n=7$) or Kir6.2/SUR2B ($\bullet$, $n=7$) currents at different times after the addition of $100 \mu M$ ATP to the intracellular solution. The slope conductance (G) is expressed as a fraction of the mean (G_c) of that obtained in control solution before exposure to ATP. All solutions contained $2 mM$ Mg^{2+} .

으로 함수화 하여 그 기울기로 측정하였다. 5번 연속적인 ramp 전류의 평균을 각 실험용액의 값으로 나타내었다. 결과를 평균 ± 1 평균의 표준오차로 표시하였다.

ATP 농도 반응 곡선은 현재 보편적으로 사용되고 있는 공식인 Hill 방정식에 의해 구하였다.

$$G/G_c = 1/(1 + ([ATP]/IC_{50})^h)$$

여기서 [ATP]는 ATP 농도이고, IC_{50} 은 이온통로 활성 억제정도가 최대값의 절반일 때의 ATP 농도, h 는 Hill 계수 (slope factor), G 는 ATP 존재하에서 이온통로 전도도 그리고 G_c 는 ATP 투여 전 대조용액에서의 전도도이다. 실험결과들은 Microcal Origin software 5.0 (Northampton, MA)를 사용하여 분석하였다.

결 과

Kir6.2/SUR2A 혹은 Kir6.2/SUR2B 통로 둘중 하나를 발현하는 *Xenopus* 난자로부터 전류를 기록하였

다. ATP가 전혀 없는 실험용액에 세포막편이 노출되었을때 초기 전류의 진폭은 Kir6.2/SUR2A와 Kir6.2/SUR2B 통로에서 비슷하였다.

1. 장기간 ATP 노출에 대한 K_{ATP} 통로활성 억제 정도의 변화

Inside-out mode로 세포막 내면을 실험용액에 노출시킨 후 $100 \mu M$ 의 ATP를 실험용액에 투여하였다. 투여된 ATP는 Kir6.2/SUR2A와 Kir6.2/SUR2B의 전류모두를 억제하였다. 그러나 ATP의 지속적인 존재에도 불구하고 Kir6.2/SUR2B에 대한 ATP의 이온전류 차단효과는 급격히 감소하여 이온통로의 ATP에 대한 감수성 (sensitivity)이 현저히 떨어짐을 알 수 있었고 상대적으로 Kir6.2/SUR2A에서는 ATP에 의한 이온전류 차단 상태가 ATP의 존재하에서 비교적 잘 유지되었으며, 시간이 지남에 따라 점진적으로 ATP에 대한 미세한 감수성 저하만이 관찰될 뿐이었다 (Fig. 1). Kir6.2/SUR2B에서 초기에는 $100 \mu M$ ATP에 의해 60% 가까운 전류의 차단이 유발되었지만 이후 급격히 ATP에

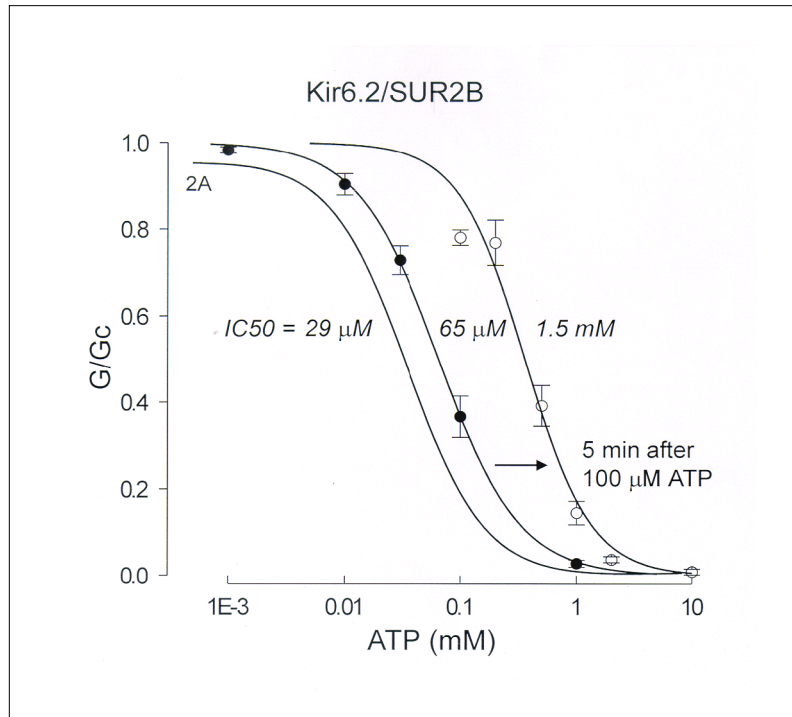


Fig. 2. Effect of prolonged ATP application on ATP dose-response curve in Kir6.2/SUR2B channel. Concentration-response curves for Kir6.2/SUR2B conductances immediately after 100 μ M ATP application (●, n=5) and 5 min later (○, n=7). The slope conductance (G) is expressed as a fraction of the mean (G_c) of that obtained in control solution before exposure to ATP. All solutions contained 2 mM Mg^{2+} .

대한 감수성이 낮아져, ATP 노출 후 3~5분이 지나서는 20% 정도의 전류억제 효과만이 나타났다. Kir6.2/SUR2A의 전류에 대해서 ATP는 초기에 SUR2B에서 보다 더 크게 전류를 차단하였다(약 90%).

2. 장기간의 ATP 노출시 SUR2B에 대한 ATP 억제제의 시간별 농도-반응 관계

Kir6.2/SUR2B 이온통로 전류에 대한 ATP의 농도-반응 관계를 ATP 투여 직후(0~30초)의 통로활성 억제 정도를 측정하여 작성하였다(Fig. 2, closed circles). 그리고 100 μ M ATP를 적용하고 5분후에, 즉 세포막 내측 표면에 ATP를 충분히 포화시킨 상태에서, 각 농도의 ATP에 대한 통로 활성 변화를 농도-반응곡선으로 나타내었다(Fig. 2, open circles). ATP 첨가 직후

ATP의 이온통로 활성 억제정도를 측정하였을 때, 최대 억제중간값(half-maximal inhibition, IC_{50})은 $64.9 \pm 1.5 \mu$ M이었으며, 100 μ M ATP 적용 이후 5분에 측정된 IC_{50} 은 1.53 ± 39 mM ATP로 크게 증가하여, ATP에 노출된 5분간 Kir6.2/SUR2B 이온통로의 ATP 감수성이 현저히 감소하였음을 알 수 있었다. Hill 계수는 각각 1.25 ± 0.03 과 1.53 ± 0.22 이었다. Kir6.2/SUR2A의 ATP에 의한 전류 억제를 ATP 투여 즉시 측정하였을 때 IC_{50} 는 29 μ M로 알려져 있어^{20,24)}, Kir6.2/SUR2B의 초기 값보다 다소 작은 값이었다.

3. MgATP의 Kir6.2/SUR2B 이온통로 활성 촉진 효과에 대한 PI-키나아제 억제제의 효과

투여된 MgATP는 세포 지질 막으로부터 포스파티

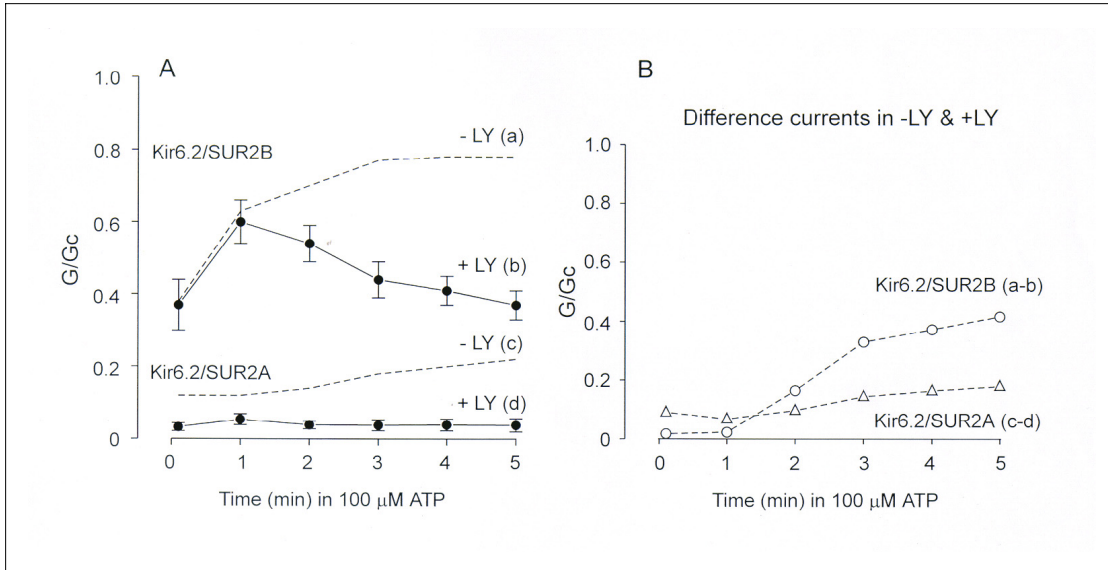


Fig. 3. LY 294002-insensitive and -sensitive currents during ATP application in Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B channels. A. Mean Kir6.2/SUR2A or Kir6.2/SUR2B conductance recorded in the presence of 100 μ M MgATP with (●, $n = 3$ for 2A; $n = 11$ for 2B) or without (dotted lines) 100 μ M LY 294002. B. The dotted lines show the difference currents ($\triangle$ for 2A; $\circ$ for 2B). The slope conductance (G) is expressed as a fraction of the mean (Gc) of that obtained in control solution before exposure to the test substances. All solutions contained 2 mM Mg^{2+} .

딜이노시톨 이인산 (phosphatidylinositol bisphosphate, PIP2)을 만들 수 있는데, 이는 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킨다. 이 화학반응의 효소는 PI3-키나아제와 PI4-키나아제이다. LY294002는 100 μ M 농도에서 PI3-키나아제와 PI4-키나아제 모두를 억제하는데 이 농도는 PIP2의 막 농도의 감소를 유발할 수 있다. LY294002를 미리 투여한 후, Kir6.2/SUR2A 이온통로를 100 μ M ATP에 노출시킨 결과, LY294002가 없었을 때 나타났던, 점진적인 이온전류의 증가현상 (즉, ATP 감수성 약화현상) 이 완전히 차단되었다 (Fig. 3A-d). 이것은 Kir6.2/SUR2A 이온통로 인접 세포막에서 PI-키나제들이 투여된 ATP를 이용하여 점진적으로 PIP2를 생성하여 이온통로의 시간에 따른 ATP 감수성의 감소를 초래하였음을 알 수 있게 하였다²⁵⁾. Kir6.2/SUR2B에서 100 μ M LY294002는 ATP 투여 초기의 급격한 ATP 감수성 감소를 막지 못하였으며, 단지 1분 이후 이온통로 전류의 점진적인 ATP에 대한 감수성의 약화

만을 억제하였다 (Fig. 3A-b). 이러한 사실은 Kir6.2/SUR2B에서 관찰된 초기 전류증가는 ATP에 의한 막 인지질(PIP2)의 생성 외에 다른 기전이 있음을 암시하였다.

Kir6.2/SUR2B에서도 LY294002에 의해 차단되는 전류 (LY부재시 이온전류-LY존재시 이온전류)를 구해 보면 (Fig. 3B), 크기는 SUR2A보다 컸으나, Kir6.2/SUR2A에서 관찰된 바와 같이²¹⁾ 점진적이었으며, PIP2의 생성이 충분히 막내에서 이루어지기 위해 일정 정도의 시간 (1~2분)이 필요함을 암시하였다.

4. Mg^{2+} 가 SUR2A와 SUR2B에 대한 ATP 농도-반응관계에 미치는 영향

저자들은 Mg^{2+} 가 없는 용액에서 ATP에 대한 이온통로 감수성을 조사하였다. Kir6.2/SUR1의 경우, ATP의 통로 활성증가 효과를 위해 Mg^{2+} 가 필요함이 보고되었고²⁴⁾, Mg^{2+} 가 없을 때 ATP에 의한 전류억제 효과

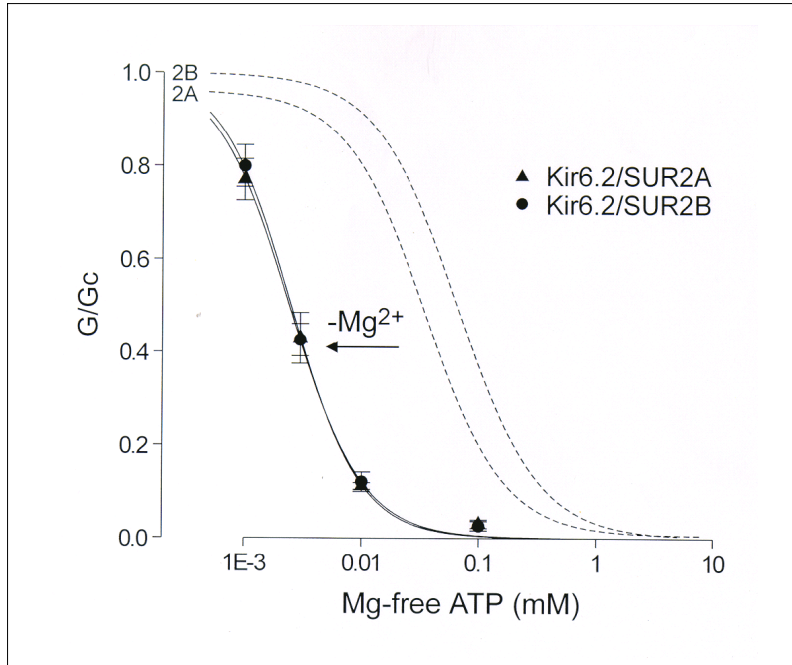


Fig. 4. Mg-free ATP dose-response curves in Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B channels. Concentration-response curves for Kir6.2/SUR2A (▲, n=4) and Kir6.2/SUR2B (●, n=4) conductances without intracellular Mg^{2+} . The dotted lines represent the data from MgATP. The slope conductance (G) is expressed as a fraction of the mean (G_c) of that obtained in control solution before exposure to the test substances.

가 명백하게 증가($IC_{50}=5.8 \mu M$)가 됨으로서 ATP의 이온통로 활성화증가 효과가 사라진다. Mg^{2+} 는 ATP가 가수분해되기 위해 꼭 필요함으로 Mg^{2+} 부재 용액은 그 가수분해를 차단하는 효과가 있다. Fig. 4는 Mg^{2+} 가 없는 용액에서 Kir6.2/SUR2A와 Kir6.2/SUR2B 이온통로의 ATP 농도-반응곡선을 보여 준다. IC_{50} 는 Kir6.2/SUR2A 전류에 대해서는 $2.4 \pm 0.1 \mu M$ 이었고, Kir6.2/SUR2B 전류에 대해서는 $2.5 \pm 0.1 \mu M$ 이었다. 이에 해당하는 Hill 계수는 각각 1.4 ± 0.1 , 1.5 ± 0.9 였다. 이러한 결과는 Mg^{2+} 가 없을 때 Kir6.2/SUR2A와 Kir6.2/SUR2B 이온통로의 ATP 감수성은 서로 다르지 않음을 증명하였고, Mg^{2+} 를 포함한 용액에서 각기 다른 IC_{50} 이 관찰된 것은 SUR2A와 SUR2B에서 투여된 ATP에 대해 각기 다른 정도의 가수분해가 일어남을 알 수 있었다.

고 찰

이 실험에서 나타난 결과는 K_{ATP} 통로에 대해 MgATP의 고전적 전류억제 효과와는 별개로 MgATP가 이온통로 활성화효과도 가지고 있음을 암시한다. 또한 MgATP의 K_{ATP} 통로 전류활성 효과는 Kir6.2/SUR2A에서 보다 Kir6.2/SUR2B에서 더 크다는 것을 알 수 있었다. MgATP의 투여에 의해 Kir6.2/SUR2A의 전류가 점진적이며 시간의존적으로 서서히 증가한 것은 세포막으로 부터 PIP2가 생성되어 이온통로의 ATP 감수성을 서서히 감소시킨 것으로 보인다²¹⁾. 이러한 현상은 Kir6.2/SUR2B에서도 LY294002에 의해 차단되는 전류가 관찰되어 장기간 ATP 투여시 SUR2B 이온전류의 ATP에 대한 감수성 약화 현상에 PIP2가 어느 정도는 관여한 것으로 보인다. 그러나, Kir6.2/

SUR2B에서 ATP 투여 초기에 이온 전류의 급격한 ATP에 대한 감수성 저하는 LY294002에 의해서 차단되지 않아, SUR2B에서는 또 다른 기전이 있음을 암시하였고, 그 감수성 저하현상은 Mg 부재시에는 완전히 차단되었다. 뉴클레오티드(ATP 또는 ADP)가 SUR2A와 SUR2B의 NBD1이 아닌 NBD2에 결합하기 위해서 Mg^{2+} 를 필요로 한다는 점에서¹⁹⁾ Mg-뉴클레오티드의 억제 및 촉진효과 모두 NBD2를 경유하여 일차적으로 중개된다고 할 수 있겠다.

최근의 연구보고에서 NBD2에 MgATP가 결합하면 뉴클레오티드의 가수분해가 일어날 수 있다는 사실이 알려졌다²⁶⁾. 그 가수분해에 의해 NBD2는 MgADP와 결합하는 상황이 되고, 그 ADP에 의해 통로 활성이 촉진될 수 있다. 본 실험에서 SUR2B의 NBD2에서 가수분해가 일어났다는 증거는 Mg^{2+} 가 없는 경우, 투여된 ATP에 대한 반응에서 SUR2A와 차이가 없다는 점을 통해 확인할 수 있었다. MgATP에 의한 통로 활성은 결합된 ATP가 통로를 폐쇄시키는 속도와 ATP 가수분해 속도, MgADP에 의한 통로 개방 그리고 MgADP의 NBD2로부터의 분리 속도에 영향을 받을 수 있다. ATP를 투여시 SUR2A의 NBD2가 가수분해 반응이 약해 MgATP와 결합한 상태에서 더 많은 시간을 소비함을 암시하는데 이는 통로억제를 증진시킬 것이다. 반면 SUR2B의 NBD2에서 가수분해 반응이 SUR2A보다 왕성하다면, MgADP 결합 상태에서 더 많은 시간을 소비하는데 이는 통로를 활성화하는데 용이할 것이다. 본 실험의 결과는 SUR2B의 NBD2에서 SUR2A의 NBD2보다 더 빠른 ATP 가수분해가 일어난 것으로 보인다. 이것은 SUR2A의 NBD2가 ATP를 가수분해하지 않는다는 것이 아니라 단지 SUR2B에 비해 가수분해 속도가 느릴 수도 있다. 또 다른 방식의 설명은 ATP 가수분해가 SUR2A와 SUR2B에서 비슷한 속도로 일어나지만 MgADP 분리가 SUR2B의 NBD2에서 서서히 일어날 것으로 설명할 수도 있으나, 이러한 견해는 사실일 가능성이 낮는데, 그 이유는 SUR2A와 SUR2B의 NBD2에서 MgADP의 해리속도는 비슷하기 때문이다²⁰⁾.

SUR의 NBD2는 통로활성과 관련된 ATPase 회로를 거친다는 생각을 근본적으로 뒷받침하는 연구결과

가 있다. SUR2의 NBD2를 함유한 용해 단백질은 ATP를 가수분해할 능력이 있고²⁶⁾ 전장 SUR에 대한 8-azido [α -³²P]-ATP 결합반응 연구는 SUR2A와 SUR2B의 NBD2가 ATP를 가수분해할 수 있음을 제시하였다^{19,27)}. 더욱이 최근 연구는 가수분해 전 (BeF : NBD2의 ATPase 억제) 혹은 가수분해 후 (orthovanadate: NBD2에서 ADP 이탈억제) 상태에서 SUR2 ATPase 회로를 고정하여 지속적으로 심근 K_{ATP} 통로를 각각 억제 혹은 활성화시킬 수 있음을 제시하였다²⁸⁾. 이번 실험에서 Mg^{2+} 에 독립적인 NBD1의 역할은 알 수가 없었다. 그러나 SUR2B의 NBD2의 ATP 가수분해는 NBD1이 필요할 수도 있다. 왜냐하면, SUR1을 포함한 다른 ABC 수송체에서 NBD1의 돌연변이는 NBD2에서 뉴클레오티드 결합과 가수분해가 일어나지 않게 한다는 보고가 있기 때문이다^{29,30)}.

이번 실험결과를 혈관 평활근 K_{ATP} 통로형인 Kir6.2/SUR2B의 NBD2에서 ATP 가수분해가 심근 및 골격근 형의 K_{ATP} 통로인 Kir6.2/SUR2A에서 보다 더 큼을 짐작케 하였다. 세포 대사의 변화는 NBD2의 MgADP 결합 상태의 시간을 조절함으로써 K_{ATP} 통로 활성에 영향을 줄 것이다. 대사활동이 높을 때는 세포 질 ADP 수준은 낮아지고 NBD2로부터 급속히 MgADP가 해리하여 통로활성이 감소하게 한다. 대조적으로 대사적 활성이 감소 할 때는 MgADP가 증가하여 NBD2로부터 MgADP의 이탈속도가 감소하고²⁸⁾, 통로개방이 증진된다. 이것으로 대사 억제동안에 Kir6.2/SUR2A의 극적인 통로개방을 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 SUR2A형 이온통로가 개방될 정도의 대사억제 상태에서는 이미 SUR2B형 이온통로는 이미 개방되어 있을 것이다. 인위적 대사억제 기간 동안에도 세포내 ATP의 농도는 2 mM 이하로 잘 떨어지지 않는다¹⁵⁾. ATP투여 5분후 SUR2B의 농도-반응 곡선을 보면 훨씬 오른쪽으로 이동되어 밀리몰 농도범위에서의 ATP 농도감소에 이온통로 활성이 쉽게 증가될 수 있다. 그러나 상대적으로 SUR2A의 농도 반응 곡선은 SUR2B보다 상당히 왼쪽에 있을 것이므로, 밀리몰 농도범위에서의 ATP 농도감소에 이온통로 활성의 변화가 상대적으로 적을 것이다. 이러한 결과는 같은 허혈에 노출되더라도 SUR2A를 가지는 심근과 골

격근에서 K_{ATP} 통로 활성의 증가가 상대적으로 더 적어, 세포 보호기전이 혈관 평활근 보다 약함을 암시한다고 하겠다. 또한 K_{ATP} 통로 활성을 췌장 베타세포의 조직에서도 억제하는, 즉 SUR1만이 아닌 SUR2A와 SUR2B에서도 작용하는, 설폰요소제의 사용은 허혈성 심근 및 골격근 질환의 위험을 동반한 당뇨병 환자에게는 허혈 발생시 K_{ATP} 통로 활성의 증가기전이 더욱 어려워진다는 사실을 본 실험의 결과로 증명하였다. 먼저는 베타세포 특이적 약물의 선택이 무엇보다도 중요할 것으로 생각되고, 광범위 작용 약물을 부득이 사용할 경우는 특별한 주위와 투여용량조절이 동반되어야 한다고 사료된다.

요 약

연구배경: K_{ATP} 통로는 Kir와 SUR로 구성되어 있다. 이번 연구는 골격근(Kir6.2/SUR2A)과 평활근(Kir6.2/SUR2B)의 K_{ATP} 통로 사이의 각각 다른 ATP에 대한 감수성의 기전을 조사하기 위해 실시하였다.

방법: K_{ATP} 통로를 발현시키기 위해서 생쥐의 Kir6.2와 백서의 SUR2A 혹은 SUR2B를 가지고 있는 mRNA를 *Xenopus Laevis*의 난자에 주입한 후 발현시켰다. Inside-out 막전압고정(patch clamp) 기법을 이용하여 K_{ATP} 통로의 이온 전류를 측정하고 분석하였다.

결과: 100 μ M MgATP를 첨가함으로써, Kir6.2/SUR2A에서 전류는 초기에 감소하였고 이후 천천히 증가하였다. 장기간 MgATP가 적용되는 동안 이러한 점진적인 ATP에 대한 감수성의 감소는 LY 294002, 포스파티딜이노시톨-3과 -4 키나아제 억제제에 의해 완전히 차단되었다. 이외는 대조적으로 100 μ M MgATP에 의해 초기 억제 이후 현저히 빠른 ATP에 대한 감수성 감소가 Kir6.2/SUR2B에서 관찰되었지만 LY 294002에 의해 완전히 차단되지는 않았고, Mg^{2+} 의 부재시 완전히 차단되었다.

결론: 이 실험결과는 SUR2B의 NBD2에서 ATP 가수분해 속도가 SUR2A의 NBD2에서의 ATP 가수분해 속도 보다 빠르며, 이 차이는 SUR2A와 SUR2B의 C-말단 42개의 아미노산의 기능 차이로 일어난다고 생각된다.

Acknowledgements

This work was supported by grant No. (R13-2002-028-01003-0) from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.

참 고 문 헌

1. Nichols CG, Lederer WJ: Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 261:H1675-86, 1991
2. Daut J, Kleiber HG, Cyrys S, Noack T: K_{ATP} channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovasc Res* 28:811-7, 1994
3. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB: ATP-sensitive and inwardly-rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77: 1165-232, 1997
4. Ashcroft FM, Gribble FM: ATP-sensitive K^+ channels in health and disease. *Diabetologia* 42:903-19, 1999
5. Seino S: ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromeric potassium channel/receptor assemblies. *Ann Rev Physiol* 61:337-62, 1999
6. Seino S, Iwanaga T, Nagashima K, Miki T: Diverse roles of K_{ATP} channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49:311-8, 2000
7. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH: Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature* 312:446-8, 1984
8. Langheinrich U, Daut D: Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart by K^+ channel openers and glucose deprivation. *J Physiol* 502:397-408, 1997
9. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrera-

- Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA: *Cloning of the β -cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science* 268: 423-5, 1995
10. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar Bryan L, Seino S, Bryan J: *Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. Science* 270:1166-70, 1995
11. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S: *A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. Neuron* 16:1011-7, 1996
12. Sakura H, Ämmälä C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM: *Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. FEBS Lett* 377:338-44, 1995
13. Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y: *A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. J Biol Chem* 271:24321-4, 1996
14. Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J: *Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. Science* 272:1785-7, 1996
15. Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM: *The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K_{ATP} channel activation by Mg-ADP and diazoxide. EMBO J* 16:1145-52, 1997b
16. Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG: *Regulation of K_{ATP} channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. J Gen Physiol* 110:643-54, 1997
17. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM: *Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K^+ channels in the absence of the sulfonylurea receptor. Nature* 387:179-83, 1997
18. Higgins CF: *ABC-transporters: from microorganism to man. Annu Rev Cell Biol* 8:67-113, 1992
19. Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T, Ueda K: *Different ATP binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes SUR1, SUR2A and SUR2B. J Biol Chem* 275:28757-6, 2000
20. Reimann F, Gribble FM, Ashcroft FM: *Differential response of K_{ATP} channels containing SUR2A or SUR2B subunits to nucleotides and pinacidil. Mol Pharm* 58: 1318-25, 2000
21. Song DK, Ashcroft FM: *ATP-modulation of K_{ATP} channel ATP-sensitivity varies with the type of SUR subunit. J Biol Chem* 276:7143-9, 2001
22. Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y, Kurachi Y: *C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K^+ channels. Circ Res* 87:873-80, 2000
23. Gribble FM, Ashfield R, Ämmälä C, Ashcroft FM: *Properties of cloned ATP-sensitive K^+ currents expressed in Xenopus oocytes. J Physiol* 498:87-98, 1997
24. Gribble FM, Tucker SJ, Haug T, Ashcroft FM: *MgATP activates the beta-cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. Proc Natl Acad Sci* 95:7185-90, 1998
25. Rosado JA, Sage SO: *Phosphoinositides are required for store-mediated calcium entry in human platelets. J Biol Chem* 275:9110-3, 2000
26. Beinengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR,

- Carrasco AJ, Moreau C, Vivadou M, Dzeja PP, Terzic A: *ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the K_{ATP} channel complex*. *FASEB J* 14:1943-52, 2000
27. Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Ueda K: *ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1*. *J Biol Chem* 274:37479-82, 1999
28. Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP, Terzic A: *Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K^+ conductance*. *Neuron* 31:233-45, 2001
29. Ueda K, Inagaki N, Seino S: *MgADP antagonism to Mg^{2+} -independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1*. *J Biol Chem* 272: 22983-6, 1997
30. Senior AE, Gadsby DC: *ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR*. *Semin Cancer Biol* 8:143-50, 1997
31. Carrasco AJ, Dzeja PP, Alekseev AE, Pucar D, Zingman LV, Abraham MR, Hodgson D, Bienengraeber M, Puceat M, Janssen E, Wieringa B, Terzic A: *Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels*. *Proc Natl Acad Sci* 98:7623-8, 2001