# 세포외 pH 변화에 따른 TRPV6 이온 통로의 기능조절

연세대학교 대학원

의 학 과

이 영 복

# 세포외 pH 변화에 따른 TRPV6 이온통로의 기능조절

지도교수 예 병 일

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2010년 1월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 영 복

# 이영복의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

## 연세대학교 대학원

2010년 1월 일

# 감사의 글

이 논문이 이루어지기까지 도움을 주신 모든 분들께 깊은 감사를 드립니다. 항상 자상한 배려와 지도를 해주신 예병일 교수님께 감사 드립니다.

또한, 바쁘신 중에도 각별한 관심과 정성으로 논문이 완성되도록 도움을 주신 고창만 교수님과 최종환, 이광호, 공인덕 교수님께도 감사 드립니다. 실험과 논문 작성에 도움을 주신 생화학교실 여러 선생님께도 심심한 사의를 드립니다. 그리고 오늘의 이 작은 영광을 저의 가족에게 드립니다.

2010년 1월

저 자 씀

# 차 례

그림 차례 ..... i
표 차례 ..... ii
국문요약 ..... 1
Ⅰ. 서론 ..... 4
Ⅱ. 재료 및 방법 ..... 8
1. 재료 ..... 8
2. 세포배양 및 형질전환 ..... 8
3. 전세포 패치 클램프(whole cell patch clamp) ..... 9
3.1. 실험용액 및 시약 ..... 10
3.2. 전류측정 프로토콜 ..... 10
3.3. 세포외 pH 변화에 따른 TRPV6의 기능 측정 ..... 11
3.4. SCAM(substituted-cysteine accessibility method) ..... 11
4. TRPV6 돌연변이 제조 ..... 12
5. 통계 분석 ..... 13
Ⅲ. 결과 ..... 16
1. 세포외액의 pH 변화에 따른 TRPV6의 기능 변화 ..... 16
2. 세포외 pH를 감지하는 아미노산 결정 ..... 18
3. 521번째 아미노산 histidine의 세포외 pH 감지기능 평가 ..... 21
4. Substituted Cysteine Accessibility Method(SCAM)을 이용한 TRPV6의 구조와 기능의 상관관계 규명 ..... 21
Ⅳ. 고찰 ..... 26
Ⅴ. 결론 ..... 32
참고문헌 ..... 33
영문요약 ..... 38

# 그림 차례

**Fig. 1.** Current changes through TRPV6 by extracellular acidification ..... 17

**Fig. 2.** Locations of the mutated amino acids ..... 19

**Fig. 3.** Inward currents through the mutated TRPV6 and its pKa values ..... 20

**Fig. 4.** Effects of amino acid substitutions for histidine 521 on the pHe sensitivity ..... 22

**Fig. 5.** Effect of MTSET on cysteine mutant of H521 ..... 23

**Fig. 6.** Comparison of the effect of MTSET on wild type, cysteine mutant of Y523 and H521 ..... 25

# 표 차례

**Table 1.** Oligonucleotides used to get site-directed mutants for titrable amino acids between transmembrane domain 5 and 6 .....14

**Table 2.** Oligonucleotides used to get site-directed mutants for H521 amino cid .....15

국문요약

## 세포외 pH 변화에 따른 TRPV6 이온통로의 기능조절

제2형 상피 칼슘이온통로(Epithelial Calcium Channel type 2, ECaC2, TRPV6)는 주로 작은창자에서 음식으로 섭취한 칼슘을 흡수하는 기능을 담당하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이외에 콩팥, 태반, 전립샘, 이자 등에서도 발현되고 있다. 콩팥에 주로 분포하면서 혈액으로부터 걸러진 칼슘의 재흡수를 담당하는 제1형 상피 칼슘이온통로(Epithelial Calcium Channel type 1, ECaC1, TRPV5)는 소변의 pH 변화에 따라 그 기능이 민감하게 반응하고 있음이 이미 보고되었으나 TRPV6는 그와 아주 유사한 구조를 지니고 있음에도 불구하고 pH 변화에 따른 기능과 구조의 변화에 대한 연구가 이루어지지 않았다. 이것은 아마도 작은창자를 비롯하여 TRPV6가 분포하고 있는 신체내 여러 기관이 pH 변화가 거의 일어나지 않는 기관이므로 생리적으로 발생할 수 있는 pH 변화를 TRPV6의 기능과 연관지어 그 의미를 설명하기 곤란하기 때문으로 생각된다.

TRPV6가 피부에도 분포하고 있다는 연구결과는 비록 한 연구팀에서만 이루어지기는 했지만 2001년에 이미 발표된 바 있다. 피부표면이 손상되어 일부가 떨어져 나가는 경우 이러한 손상이 재생에 의해 치유되는 과정이나 피부가 노화하는 과정에서 피부세포에 존재하는 칼슘의 농도변화가 중요하다는 사실을 보여 주는 연구결과가 계속 발표되면서 피부의 칼슘농도 변화와 가장 관계깊은 단백질이 TRPV6가 아닌가 하는 의문이 제기되고 있다.

본 연구는 피부세포의 경우 표면과 내부의 pH가 다르고 칼슘 농도 변화가 잘 일어나므로 TRPV6가 pH 변화에 따라 기능이 변화하는 기전이 피부세포 칼슘농도를 조절할 것이라는 가설을 검증함으로써 TRPV6의 기능

이 생리적인 pH 변화에 의해 변화할 수 있음을 설명하는 것을 목표로 진행하였다.

이를 위해 전세포 패치클램프(whole-cell patch clamp)방법을 이용하여 TRPV6를 통해 흐르는 전류의 양이 세포외 pH 변화에 민감하게 반응함을 확인하였다. 이 때 TRPV6의 기능이 50% 억제되는 pKa값은 5.71로 나타났다.

TRPV6에서 세포외 pH를 감지하는 감지기능을 하는 아미노산(extracellular pH sensor)을 찾아내기 위해 막을 통과하는 다섯 번째와 여섯 번째 부위 사이에 위치한 아미노산들의 여러 변이체를 만들어 전류의 변화를 확인해 본 결과 521번째에 위치하는 히스티딘(histidine)이 핵심적인 역할을 하고 있음을 확인하였다. 이 아미노산에 대한 여러 변이체를 제조하여 그 기능을 확인해 본 결과 아르지닌(arginine)으로 치환했을 때 세포외 pH에 대한 민감도가 가장 감소되었고, 기능이 50% 억제되는 pKa 값은 5.02였다.

pH가 작아지는 경우 TRPV6의 기능이 억제되고 pH가 커지는 경우 TRPV6의 기능이 잘 나타나는 기전을 설명하기 위하여 521번째 아미노산인 히스티딘을 시스테인(cysteine)으로 치환시킨 변이체를 이용하여 TRPV6의 구조가 기능변화와 어떤 상관관계를 가지는지를 추적한 결과 521번째 아미노산 부위가 세포바깥부위에 다른 물질이 접근하기 쉬운 곳에 노출되어 있고, 수소이온이 결합하면 TRPV6의 입체구조에 변화를 일으켜 기능에도 변화가 생긴다는 사실을 유추할 수 있었다.

본 결과를 종합하면 TRPV6의 521번째 아미노산인 히스티딘은 세포외 pH를 감지하는 담당하며 수소이온($H^+$)에 노출되었을 경우 (이 수소이온이 TRPV6에서 이온이 통과하는 pore 부위를 직접 막거나 정전기적 효과에 의해 기능변화를 일으키는 것이 아니라) TRPV6의 구조를 변화시킴으

로써 세포외 pH 변화에 의해 TRPV6의 기능변화가 유발되는 것으로 판단된다.

---

핵심되는 말: TRPV6, 세포외 pH sensor, 칼슘, 이온통로, 피부노화, 손상치유

# 세포외 pH 변화에 따른 TRPV6 이온통로의 기능조절

<지도교수 예 병 일>
연세대학교 대학원 의학과
**이 영 복**

## Ⅰ. 서 론

세포외액의 칼슘이온 농도는 음식으로 섭취되어 소화에 의해 작은창자를 통해 흡수되는 칼슘이온양, 뼈에서 교환되는 칼슘이온양, 비뇨기계를 통해 재흡수되는 칼슘이온양 등에 의해 조절된다 (Hurwitz, 1996; Fukugawa와 Kurokawa, 2002). 콩팥과 창자를 통해 흡수되는 칼슘이온은 각각 TRPV5와 TRPV6에 의해 조절되고 있으며, 콩팥에서는 distal convoluted tubule과 cortical connecting duct를 통해 재흡수가 일어나고 창자에서는 proximal small intestine을 통해 주로 흡수된다(Bronner 등, 1986; Friedman과 Gesek, 1995).

칼슘이 비뇨기계에서 세포로 흡수되는 과정은 일반적으로 세 가지 과정으로 구분할 수 있다. 칼슘이온에 특이하게 작용하는 이온통로를 통해 세포내로 들어가는 과정, 칼슘 결합단백질인 calmodulin과 결합하여 세포질 내에서 이동하는 과정, basolateral membrane에 위치하고 있는 $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger(NCX1)와 plasma membrane $Ca^{2+}$-ATPase(PMCA)를 통해 세포를 빠져나가는 과정이 그것이다 (Hoenderop 등, 1999; van Abel등, 2005; Hoenderop 등, 2005). 비뇨기계에서 TRPV5가 칼슘 재흡수를 담

당하는 것과 비교하여 작은 창자의 세포벽에서 이에 해당하는 과정을 담당하는 단백질이 바로 TRPV6 이온통로다. 칼슘에 결합하는 단백질의 종류가 다르고, 세포내로 흡수된 후 빠져나갈 때 PMCA만 관여할 뿐 NCX1가 관여하지 않는다는 점을 제외하면 칼슘을 흡수하는 세 가지 과정도 서로 유사하며, TRPV5가 콩팥에 주로 발현되는 것과 달리 TRPV6는 발현 정도에 차이가 있기는 하나 작은창자 외에 이자, 전립샘, 뇌, 위, 폐 등에도 발현되고 있다는 점이 차이점이다 (Hoenderop 등, 1999; Peng 등, 1999; Hoenderop 등, 2002; Montell 등, 2002).

칼슘이온 흡수에 가장 핵심적인 기능을 담당하는 TRPV5와 TRPV6 유전자는 15개의 exon으로 구성되어 있고, 약 730개의 아미노산을 합성할 수 있는 유전정보를 지니고 있으며, 75%의 상동성을 지닌다(Hoenderop 등, 1999; Peng 등, 1999; Muller 등, 2000; Peng 등, 2001). 이 두 이온통로는 모두 TRP(transient receptor potential) superfamily중 TRPV(vanilloid계) subfamily에 속하며, TRPV중에서 칼슘이온통로는 TRPV5와 6가 전부다 (Peng 등 2003; Hoenderop 등, 2005).

TRPV5는 세포내외에 존재하는 액체의 pH에 민감하게 반응하여 기능이 쉽게 변화한다는 연구결과가 이미 발표되었다(Yeh 등, 2003; Yeh 등, 2005). 그러나 TRPV6의 기능을 조절하는 인자로는 전사를 조절하여 TRPV5의 기능에도 함께 영향을 미치는 것으로 알려진 Vitamin D, 음식으로 섭취한 칼슘의 양, 여성호르몬 에스트로겐, 막에서의 발현을 조절하는 S100A10-annexin 2 complex, PDZ motifs, Ankyrin repeat, 칼슘에 결합하는 단백질로 두 통로 모두의 활성을 조절하는 calmodulin 등이 제시되어 있을 뿐(van Abel 등, 2005) 세포외 pH에 대한 TRPV6의 기능변화에 대한 연구결과는 지금까지 보고된 바가 없다.

그런데 이 두 이온통로는 전체적으로 아미노산 서열의 상동성이 75%에 이르는 것 외에 pore helix 부위의 DNA 염기서열과 아미노산 서열이 아

주 유사하다는 사실이 알려져 있으므로 기능적으로도 두 이온통로가 아주 유사할 가능성을 내포하고 있다. 그러나 TRPV6가 주기능을 하는 작은창자의 윗부분, 즉 샘창자는 pH가 서로 다른 위에서 분비되는 물질, 담즙에 포함된 물질, 소화효소를 포함하고 있는 이자 분비물 등이 혼합되는 부위임에도 불구하고, 중성인 pH가 비교적 안정된 상태로 유지되고 있다. 따라서 TRPV6가 세포외 pH에 민감하게 반응한다는 사실을 생리적으로 설명하기가 불가능한 상황이다.

그런데 최근에 피부손상과 노화에 대한 연구가 진행되면서 과거에 무심코 지나친 피부에서의 TRPV6 발현(Weber 등, 2001)에 관심을 기울여야 할 필요가 생겼다. 피부노화는 유전적으로 결정되는 내인성 노화와 주로 장기간 자외선 노출에 의한 광노화를 포함하는 외인성 노화로 구분되는데, 현재까지 피부노화의 기전을 밝히고 치료방법을 찾는 대부분의 연구는 진피단위에서 이루어져 왔을 뿐 표피에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 75세 이상의 노인에서는 표피내 지질합성 자체가 감소하여 피부장벽의 주요소인 각질세포 사이에 분포하는 콜레스테롤, 세라마이드(ceramide), 지방산 등의 전체적인 양이 감소하는 것이 피부장벽 손상의 주원인이고 표피분화도 충실하지 못하지만 (Ghandially 등, 1995), 60-75세 노인들은 피부장벽 손상 후 회복이 지연되나 그 원인이 표피지질합성의 감소 때문이 아니라 세포외 pH를 조절하는 NHE1 exchanger의 기능감소에 의해 각질층-과립층사이 pH가 증가함으로써 $\beta$-glucocerebrosidase 기능이 감소되는 현상은 각질세포와 각질세포 사이의 지질막 형성이 불완전하기 때문이라는 사실이 알려졌다(Choi 등, 2007)

인체 피부표면은 pH 4.5-5.5 정도의 약산성을 유지하고 있다. 그러나 피부장벽이 손상되면 피부표면의 pH는 중성으로 변화되면서 각종 생리학적 반응이 일어난다. 그 결과 산성 pH에서는 $\beta$-glucocerebrosidase의

활성이 증가하여 손상된 피부장벽 회복이 촉진되고, 중성 pH에서는 serine protease의 활성이 증가하여 각질세포 사이의 결합력을 감소시켜 피부장벽 회복이 지연된다는 사실이 알려져 있다 (Choi 등, 2007). 또한 표피에서 칼슘이온의 농도변화가 표피분화를 조절하고, 이는 피부장벽 형성에 아주 중요한 기능을 한다는 사실이 알려져 있다. 그 원인에 대한 설명으로는 노화피부에서 칼슘이온 기울기가 소실되어 있고, 이는 이온펌프나 이온통로에 의한 것이라는 추측이 있다 (Denda 등, 2003).

노화피부의 표피분화 및 피부장벽 이상은 칼슘이온통로와 관련이 있을 가능성이 매우 높다. 그런데 최근까지 피부에서 칼슘을 조절하는 이온통로가 발견이 있었음에도 불구하고 그 발현량이 낮아서 세간의 관심을 끌지 못한 것이 노화피부에서 이온통로를 표적으로 한 연구가 이루어지지 않은 이유로 판단된다. 또한 피부손상 후 창상치유가 지연되는 현상도 피부장벽 회복의 지연 기전과 연관성이 많으므로 (Elias 및 Feingold, 2001) 칼슘이온통로 연구를 통해 이와 같은 병리상태에서 일어나는 기전을 연구해야 할 필요가 있다. 이상의 연구결과를 종합해 보면 피부손상이나 노화과정에서 볼 수 있는 피부의 칼슘이온 농도 변화는 피부에 발현되는 TRPV6에 의해 칼슘이 조절되는 기전에 의해 발생할 것이라는 가정을 할 수가 있다.

따라서 본 연구에서는 TRPV6가 세포외액의 pH 변화에 따라 기능에 영향을 받는지를 확인하고, 세포외액 pH가 기능에 영향을 미친다면 TRPV6의 구조에서 pore helix와 세포막 바깥쪽에 위치한 아미노산중 어떤 아미노산이 세포외 pH를 감지하는 할을 하고 있는지를 확인함으로써 TRPV6를 통한 칼슘이온의 이동과 세포외 pH와의 연관성 여부를 밝히고, 어떤 기전에 의해 TRPV6 구조에 어떤 변화가 일어남으로써 이와 같은 결과가 일어나는지를 확인하고자 하였다.

# Ⅱ. 재료 및 방법

## 1. 재료

본 실험에 사용한 TRPV6 유전자는 생쥐의 콩팥에서 분리한 mRNA를 이용하여 역전사반응에 의해 cDNA를 얻은 후 단백질 발현에 유리하다고 알려진 pCDNA3 플라스미드 벡터(plasmid vector)에 클로닝(cloning)한 것을 사용하였다. Wild type TRPV6를 클로닝한 이 플라스미드 DNA는 University of Texas, Southwestern Medical Center 내과학교실 신장내과 교수인 Chou-Long Huang으로부터 얻은 것이다.

## 2. 세포배양 및 형질전환

TRPV6를 발현시키기 위해 사용한 CHO-K1 세포주는 ATCC (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다.

100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum을 포함하는 HAM's F-12 배지(all from Lonza, Walkersville, MD, USA)를 이용하여 5% $CO_2$ 를 포함한 배양기(humidified incubator)에서 37° C 를 유지하면서 배양하였다.

Transfection은 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Basil, Switzerland)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 아래와 같이 실시하였다.

Transient transfection을 위하여, CHO-K1 세포를 6-well culture plates(Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 $5\times10^5$ cells/well

씩 가하고 24시간 배양한 후 이용하였다. 1 $\mu$g의 vector DNA와 0.2 $\mu$g의 pEGFP-N1 vector DNA를 동시에 transfection하였다.

Transfection 후 24-48시간이 지난 다음 배양액을 제거하고, 0.5 ml의 trypsin을 처리하였다. Trypsin에 의해 세포가 바닥에서 떨어지면서 둥근 모양으로 변해 가는 과정을 관찰하면서 경험적으로 전세포 패치클램프 실험을 위해 가장 적합한 시점에 도달하면 trypsin을 제거한 후 HAM's F-12 배지를 1 ml 첨가하였다. 물리적 힘을 가하여 바닥에 붙은 세포를 모두 떼어낸 후 냉장상태로 보관해 놓고 35 mm plate에 혈청분리관으로 2-3방울을 떨어뜨린 다음 세포가 바닥에 충분히 붙은 후에 다음 실험에 이용하였다.

### 3. 전세포 패치 클램프(whole cell patch clamp)

TRPV6를 통하는 전류의 흐름을 측정하기 위한 전기생리 실험은 Axopatch 200B 증폭기(Axon Instruments, Foster city, CA)를 이용하여 전세포 패치클램프를 실시하였다(Hamil 등, 1981).

세포표면에 흐르는 미세전류를 측정하기 위한 전극은 바깥지름 1.65 mm, 안지름 1.2 mm인 borosilicate glass capillary(corning 7052, Harvard Apparatus, Holiston, MA)를 이용하였다. 이 모세관 끝을 적절한 굵기로 뽑아내기 위하여 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co., Novato, CA)를 이용하였다. 이 기계로 뽑아낸 모세관 전극은 microforge를 이용하여 끝 부분을 열처리하여 다듬었으며, 전극 내부에 용액을 채웠을 때 저항이 3~5 M$\Omega$에 해당하는 것을 실험에 이용하였다.

세포가 붙은 plate를 도립현미경 위에 올려놓은 후 막전압고정법

(voltage-clamp method)을 이용하여 전류를 측정하였다. 미세전류를 기록하기 위하여 세포막의 용량(capacitance)과 직렬저항(series resistance)은 70% 이상 보정하였고, 실험결과는 pClamp6(Axon Instrument)의 Clampex 소프트웨어를 이용하여 기록하였다. 이상과 같은 방법으로 기록한 전류에 대한 결과 분석은 같은 회사의 Clampit 소프트웨어를 이용하였다.

모든 전기생리학적 실험은 실온에서 시행하였다.

### 3.1. 실험용액 및 시약

TRPV6를 통한 전류를 측정하기 위한 pipette 용액은 130 mM CsAsp(cesium aspartate), 10 mM $CaCl_2$, 4 mM $Na_2ATP$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM BAPTA(또는 EDTA, pH 8.0), 10 mM HEPES를 포함한 용액에 CsOH를 이용하여 pH 7.2로 맞춘 후 사용하였다.

Bath 용액은 140 mM Na-Asp(sodium aspartate), 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 8.0, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES를 포함한 용액을 기본으로 세포외 pH를 변화시켜야 하는 필요에 따라 NaOH 용액으로 pH를 조절해 가면서 사용하였다.

### 3.2. 전류측정 프로토콜

전류측정은 주로 ramp protocol을 이용하였다. 400 msec에 걸쳐 −100 mV로부터 100 mV까지 전압을 변화시켜 가면서 막을 통해 흐르는 전류를 측정하였다. 이 때 −100 mV의 전압에 의해 전류가 충분히 활성화할 수 있도록 100 msec 동안 −100 mV를 유지한 후 전압을 −100 mV부터 100 mV까지 변화시켰다. TRPV6를 통한 전류의 기록은 세포외 pH를 감지하는 아미노산을 찾기 위한 실험에서는 10초 간격으로 한 번씩 측정하였고, MTSET를 처치하는 실험에서는 상대적으로 빠른 시간에 전류가 급

격히 변화하는 현상을 관찰할 수 있도록 1초에 한 번씩 전류를 기록하였다.

### 3.3. 세포외 pH 변화에 따른 TRPV6의 기능 측정

세포외액은 위에서 기술한 바와 같이 NaOH용액을 이용하여 bath 용액의 pH를 변화시키며 사용하였다.

전세포 패치를 얻은 후 세포외액을 교체하면서 전류가 안정된 상태를 유지할 때까지 기다린 다음 세포외액의 pH를 최대 전류가 나타나는 pH를 구한 결과 세포외액의 pH가 8.4~8.8인 용액으로 최대 전류를 얻었다. 이로부터 세포외액의 pH를 7.4, 6.4, 5.4, 4.9, 4.4로 변화시켜 가면서 전류가 줄어드는 정도를 측정한 다음 1 mM $LaCl_3$ 용액을 처리하여 세포막을 통해 새고 있는 전류(leak current)가 어느 정도인지를 확인하였다. 이후 세포외액의 pH를 다시 역순으로 올려 가면서 전류가 원상태로 회복되는지를 확인하였다.

### 3.4. SCAM(substituted-cysteine accessibility method)

실험에 사용한 MTSET는 Toronto Research Chemicals(North York, Ontario, Canada)에서 구입하였다. 구입 후 가루를 냉장보관해 두었다가 실험직전에 bath 용액에 10 mM 농도로 녹인 다음 빛을 차단한 상태로 얼음에 보관하였다. 전세포 패치에 가할 때에는 적절한 농도를 선택하여 저장된 MTSET 용액을 희석하여 사용하였다.

SCAM은 앞선 연구자들이 사용한 방법(Akabas 등, 1992; Liapakis 등, 2001)을 응용하여 위에서 준비한 MTSET 용액을 직접 전세포 패치클램프에 투여하는 형태로 진행하였다.

## 4. TRPV6 돌연변이 제조

pcDNA3 plasmid vector에 cloning되어 있는 wild-type mice TRPV6의 유전자를 이용하여 site-directed mutagenesis 방법으로 특정 아미노산이 치환된 돌연변이형을 만들었다. 돌연변이 형성은 *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제조사에서 제시한 방법을 변형하여 아래와 같이 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하였다.

PCR을 시행하기 위한 혼합용액은 10 × 반응 완충액 2 ㎕, dNTPs (2.5 mM each dATP, dTTP, dGTP and dCTP) 5 ㎕, 0.5 ㎕M primer 혼합액 1 ㎕, *Pfu* Turbo DNA polymerase 0.4 ㎕, PCR-grade 증류수 11.1 ㎕, 10 ng/㎕, TRPV6 plasmid DNA 0.5 ㎕을 혼합하여 사용하였다. PCR은 template DNA를 완전히 변성시키기 위해 95° C 1분간 먼저 반응시킨 다음 95° C/30초, 55° C/1분, 68° C/9분간 18회 반복하며 DNA를 증폭하고, 마지막 반응이 끝난 후에는 72° C에서 10분간 추가 반응시켜 합성되다 만 DNA를 최소화하였다. 돌연변이 형성에 사용된 primer는 Table 1과 Table 2에 표시하였다.

PCR이 끝난 후 반응액에 *Dpn*I (New England Biolabs, Ipswich, MA)을 가하여 37° C에서 4시간 동안 반응시켜 PCR 산물이 아닌 DNA를 제거한 다음 XL-1 Blue competent 세포에 형질전환(transformation)하였다. 형질전환된 세포에서 Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 플라스미드 DNA를 분리한 다음 변이체가 제대로 만들어졌는지 확인하기 위해 제노텍(Genotech, Daejeon, Korea) 회사에 의뢰하여 DNA 염기서열을 확인하였다.

## 5. 통계분석

세포외 pH 변화에 따라 TRPV6의 전류가 억제되는 정도를 확인하는 실험은 Sigma-Plot 소프트웨어의 Hill equation을 이용하여 전류가 50% 억제되는 값을 비교하였다. 이 값을 pKa라 하고, 각 변이체들에 대한 pKa 값을 Student's t-test를 이용하여 비교하였다.

Table 1. Oligonucleotides used to get site-directed mutants for titrable amino acids between transmembrane domain 5 and 6

| Name | Forward primer (5'-3') | Exchanged amino acid |
|---|---|---|
| E514Q | ATTTTCCAGACA**C**AGGATCCCGATGAG | glutamine |
| D515N | TTCCAGACAGAG**A**ATCCCGATGAGCTG | asparagine |
| D517N | ACAGAGGATCCC**A**ATGAGCTGGGTCAT | asparagine |
| E518Q | GAGGATCCCGAT**C**AGCTGGGTCATTTC | glutamine |
| Y523F | GCTGGGTCATTTCT**TT**GACTACCCCATGG | phenylalanine |
| Y525F | GGTCATTTCTATGAC**TTC**CCCATGGCACTGTTC | phenylalanine |
| E534Q | TTCAGCACCTTT**C**AGCTCTTCCTCACC | glutamine |
| D541N | CTCACCATCATC**A**ATGGCCCTGCGAAC | asparagine |
| D547N | CCTGCGAACTAT**A**ATGTGGATCTGCCC | asparagine |
| D549N | AACTATGACGTG**A**ATCTGCCCTTCATG | asparagine |
| Y554F | CTGCCCTTCATG**TT**CAGCGTTACCTACG | phenylalanine |

The mutated amino acid sequences are underlined.

The sequences of backward primers are complementary sequences of forward primers.

The mutated DNA sequences are shown in bold.

Table 2. Oligonucleotides used to get site-directed mutants for H521 amino acid

| Name | Forward primer (5' -3' ) | Exchanged amino acid |
|---|---|---|
| Wild-type | CCCGATGAGCTGGGTCAUTTCTATG ACTAC | histidine |
| H521D | CCCGATGAGCTGGGT**G**ATTTCTAT GACTAC | aspartate |
| H521C | CCCGATGAGCTGGGT**TG**TTTCTAT GACTACC | cysteine |
| H521Y | CCCGATGAGCTGGGT**T**ATTTCTAT GACTAC | tyrosine |
| H521K | GATCCCGATGAGCTGGGT**A**A**A**TTC TATGACTACCCCATG | lysine |
| H521G | CCCGATGAGCTGGGT**GG**TTTCTATG ACTACC | glycine |
| H521N | CCCGATGAGCTGGGT**A**ATTTCTAT GACTAC | asparagine |

The sequences of the 521st amino acid encoding sites are underlined.
The sequences of backward primers are complementary sequences of forward primers.
The mutated DNA sequences are shown in bold.

# Ⅲ. 결　　과

## 1. 세포외액의 pH 변화에 따른 TRPV의 기능 변화

본 연구과정에서 전기생리학적 연구결과를 얻기 위한 전세포 패치클램프 실험을 위해 사용한 기본적인 방법을 Fig. 1의 A와 B에 표시하였다. A는 전세포 패치클램프시 사용한 세포외액과 내액의 조성을 표시한 것이며, B는 세포막을 흐르는 미세전류를 측정하기 위한 실험 프로토콜을 표시한 것이다.

전세포 패치클램프시 TRPV6를 통해 흐르는 전류는 Fig. 1C에 표시하였다. 이 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 세포외액의 pH(pHe)가 8.4-8.8일 때 최고치를 기록했으며, pH가 더 높아져 염기성이 강해지면 전류는 줄어들었고, 세포외액의 세포외액의 pH가 낮아져 산성화할수록 TRPV6를 통한 전류는 줄어들었다. 1 mM $La^{3+}$을 처치하자 TRPV6를 통한 전류가 거의 바닥수준으로 떨어졌으며, 그림에 표시한 전류는 전세포 패치클램프를 이용하여 측정한 전류에서 $La^{3+}$처치시 얻은 전류를 제외하고 수치를 비교하였다.

Fig. 1D는 세포외액의 pH 변화에 따라 세포외 pH가 다양하게 변해 가는 경우 특정 pH를 가진 세포외액에서 최대전류와 비교할 때 전류가 얼마나 억제되는지를 그래프로 나타낸 것이다.

Fig. 1D에서 세포외액의 pH 변화에 따라 TRPV6의 기능이 얼마나 억제되는지를 알아보기 위해 통계처리를 위한 regression line은 Sigma-Plot program을 이용하여 Hill equation에 의해 그은 것이다. pKa라 표시한 것은 최대 전류와 비교하여 전류량이 50% 감소하는 지점의 pH를 가리킨다.

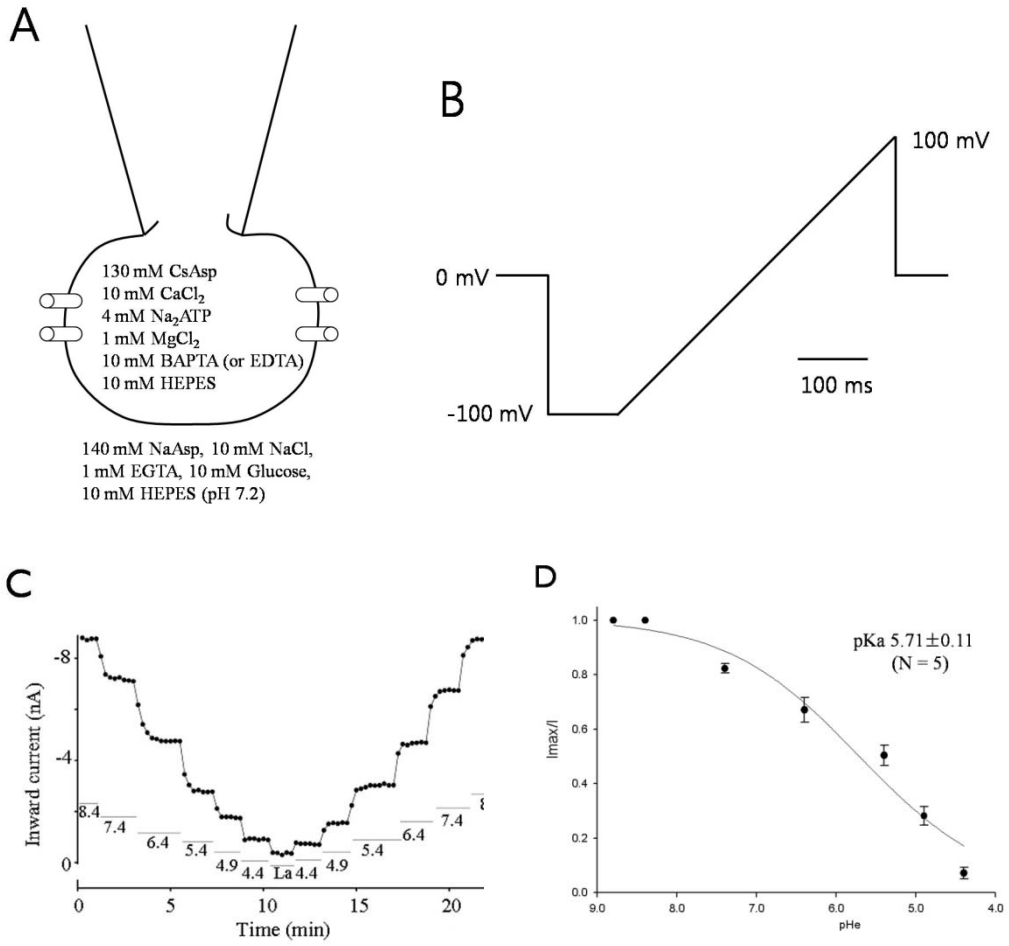


**Fig. 1.** Current changes through TRPV6 by extracellular acidification. A. The components of extra- and intracellular solution. Numbers mean the concentrations(mM). B. The protocol to check the currents. C. Inward currents (at −100mV) at extracellular pH(pHe) from 8.8 to 4.4. 1 mM $LaCl_3$ was added to check the leak currents. D. Relative inward currents compared with maximal one. Inward currents were determined after subtraction of the leak currents. Hill equation was used to draw regression line with Sigma-Plot program. pKa is the pHe for 50% inhibition of the current. Date points represent mean ± S.E.

## 2. 세포외 pH를 감지하는 아미노산 결정

TRPV6의 어느 특정부위에서 세포외 pH를 감지하는 기능을 하는지 확인하기 위하여 다섯번째와 여섯번째 transmembrane domain에 존재하는 아미노산중 aspartic acid, glutamic acid, histidine, tyrosine을 각각 asparagine, glutamine, arginine, phenylalanine으로 치환시켰다. 본 연구에 이용한 13개의 변이체들이 각각 어느 아미노산을 치환시킨 것인지를 Fig. 2에 표시하였다.

Site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 제조한 13개의 TRPV 변이체중에서 Y546F를 발현시킨 경우에는 전류가 전혀 검출되지 않았다. 이를 제외한 12개의 변이체를 각각 발현시킨 경우 이 변이체를 통해 흐른 전류가 세포외 pH 변화에 대하여 어떤 변화를 보이는지를 Fig. 3에 표시하였다.

여기에서 볼 수 있듯이 H521R을 제외한 나머지 11개의 변이체는 wild type TRPV6와 유사한 형태로 전류가 억제되는 것을 관찰할 수 있었으나 H521R 변이체를 통한 전류가 세포외 pH 변화에 따라 억제되는 정도는 wild type TRPV6를 이용했을 때보다 낮은 pH에서 현저히 민감도가 떨어짐을 발견할 수 있었다.

H521R 변이체 외에 Y523F나 Y525F를 비롯한 소수의 변이체에서 연구자에 따라서는 세포외 pH의 산성화가 TRPV6의 기능이 둔감하게 하는 변화를 일으킨다고 볼 수 있을 정도로 낮은 pKa 값을 가지는 연구결과를 얻었다. 그러나 이들 부위의 둘 또는 세 개의 아미노산을 동시에 치환시킨 변이체를 이용하여 세포외 pH에 대한 민감도를 측정한 결과(data not shown) H521R 변이체를 제외하면 wild type TRPV6와 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

A

```
TRPV5   513 Q T E D P D N L G E F S D Y P 527
TRPV6   512 Q T E D P D E L G H F Y D Y P 526

TRPV5   528 T A M F S T F E L F L T I I D 542
TRPV6   527 M A L F S T F E L F L T I I D 541

TRPV5   543 G P A N Y R V D L P F M Y S V 557
TRPV6   542 G P A N Y D V D L P F M Y S V 556
```

B

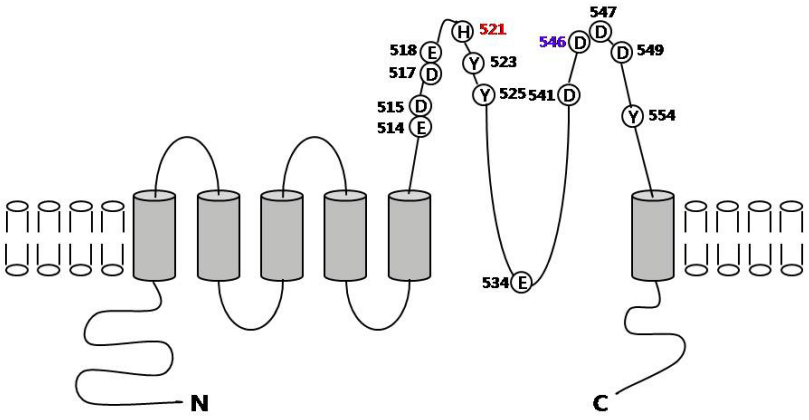


Fig. 2. Locations of the mutated amino acids. A. Amino acid alignment of TRPV6 and TRPV5. N and C indicate amino and carboxyl terminus of the TRPV6, respectively. Angular circle indicates the mutated amino acids. B. Putative membrane topology of TRPV6 and mutated amino acids.

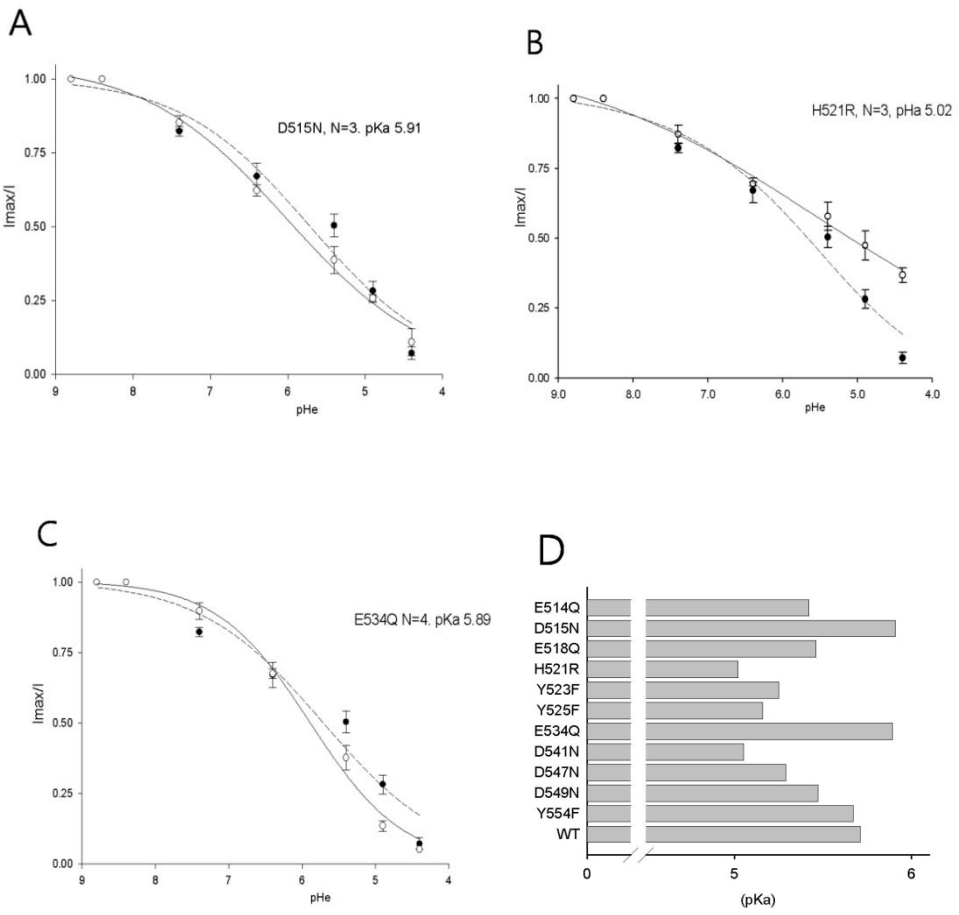


**Fig. 3.** Inward currents through the mutated TRPV6 and its pKa values. Dotted line in each panel(A–C) indicates the regression line from wild type. The extracellular pH sensitivity of the mutated TRPV6 and wild type are indicated as solid lines and open circles with error bars, respectively. A–C are D515N, H521R, and E534Q, respectively. D shows the pKa values of mutated and wild type TRPV6.

### 3. 521번째 아미노산 histidine의 세포외 pH 감지기능 평가

pH에 민감하게 반응할 수 있는 각 아미노산의 구조와 각 구조에 대한 pKa 값을 Fig. 4A에 표시하였다.

521번째 아미노산이 세포외 pH를 감지하는 기능을 하는지 확인하기 위하여 이 아미노산을 cysteine, lysine, asparagine, glycine, tyrosine, arginine으로 치환하였다. 이 여섯 가지 변이체들을 각각 Chinese hamster ovary(CHO) 세포에 발현시킨 다음 전세포 패치클램프를 실시하여 측정한 전류가 50% 억제되는 지점에서의 pH를 pKa라 하고, Fig 4B에 표시하였다.

이상의 결과에서 TRPV6의 521번째 아미노산에 변이가 발생한다 하더라도 arginine으로 치환시킨 경우에는 세포외 pH에 대한 민감도가 떨어지지만 arginine이 아닌 다른 아미노산으로 치환시킨 경우에는 wild type TRPV6와 비교할 때 세포외 pH에 대한 민감도에 큰 차이가 없음을 볼 수 있었다.

### 4. Substituted Cysteine Accessibility Method(SCAM)을 이용한 TRPV6의 구조와 기능의 상관관계 규명

TRPV6의 세포외 pH를 감지하는 것으로 생각되는 521번째 아미노산을 cysteine으로 치환시킨 다음 1 mM MTSET를 처치하여 이 변이체를 통한 전류의 흐름을 측정한 결과 MTSET 처리 직후부터 전류가 급격하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5A).

일단 감소된 전류는 세척을 여러 차례 반복하더라도 전류가 회복되지 않았으나 환원제인 dithiothreitol을 100 mM 로 처리하자 전류가 원상태로 회복되기 시작하였다(Fig. 5B). 이상의 결과를 통해 MTSET에 의한 TRPV6의 기능 억제는 가역반응임을 확인할 수 있었다.

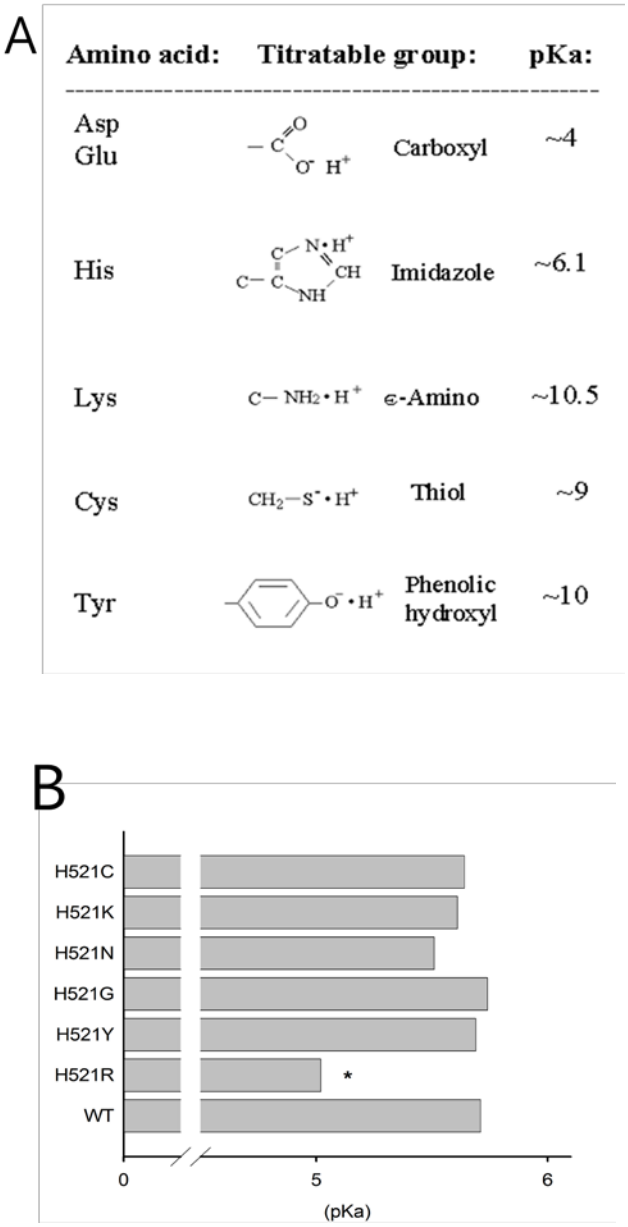


Fig. 4. Effects of amino acid substitutions for histidine 521 on the pHe sensitivity. A. pKa and charge of side groups of a variety of titrable amino acids. B. pKa values of the mutants of H521. WT, wild type.

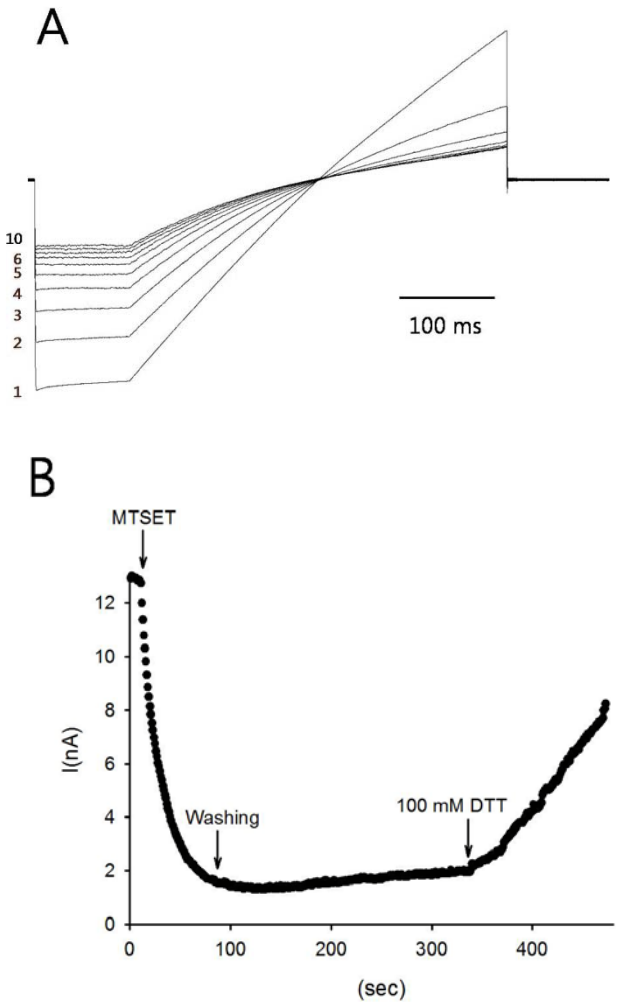


**Fig. 5. Effect of MTSET on cysteine mutant of H521.** A. Inhibition by 1 mM MTSET on H521C at pHe 8.4. The protocol to check the currents is the same as in Fig. 1. The dotted line indicates the level of no current. 0 means the point MTSET was added and 1 to 10 shows the currents at 10 to 100 seconds after addition of MTSET. B. The inhibition effect of MTSET and recovery of the currents by dithiothreitol (DTT). Washing couldn't recover the MTSET-inhibited current. The currents were recorded with ramp protocol every second.

Wild type TRPV6, Y523C 변이체, H521C 변이체를 대상으로 TRPV6가 기능을 잘 나타내는 상태인 세포외 pH 8.4인 경우와 기능이 40% 정도 떨어진 상태인 세포외 pH 6.4인 경우를 대상으로 1 mM MTSET를 처치하였다 (Fig. 6).

Wild type과 523번째 아미노산이 cysteine으로 치환된 변이체는 세포외 pH에 관계없이 MTSET 처치가 TRPV6의 기능에 어떤 영향도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그러나 521번째 아미노산이 cysteine으로 치환된 변이체는 세포외 pH가 8.4인 경우에 MTSET 처치 후 전류가 억제되기 시작하여 약 1분 후에는 전류가 최고인 경우와 비교하여 약 90%의 전류가 억제되었으며, 세포외 pH가 6.4인 경우에는 상대적으로 억제되는 정도가 낮기는 하지만 약 3분 동안 50%의 전류가 꾸준히 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

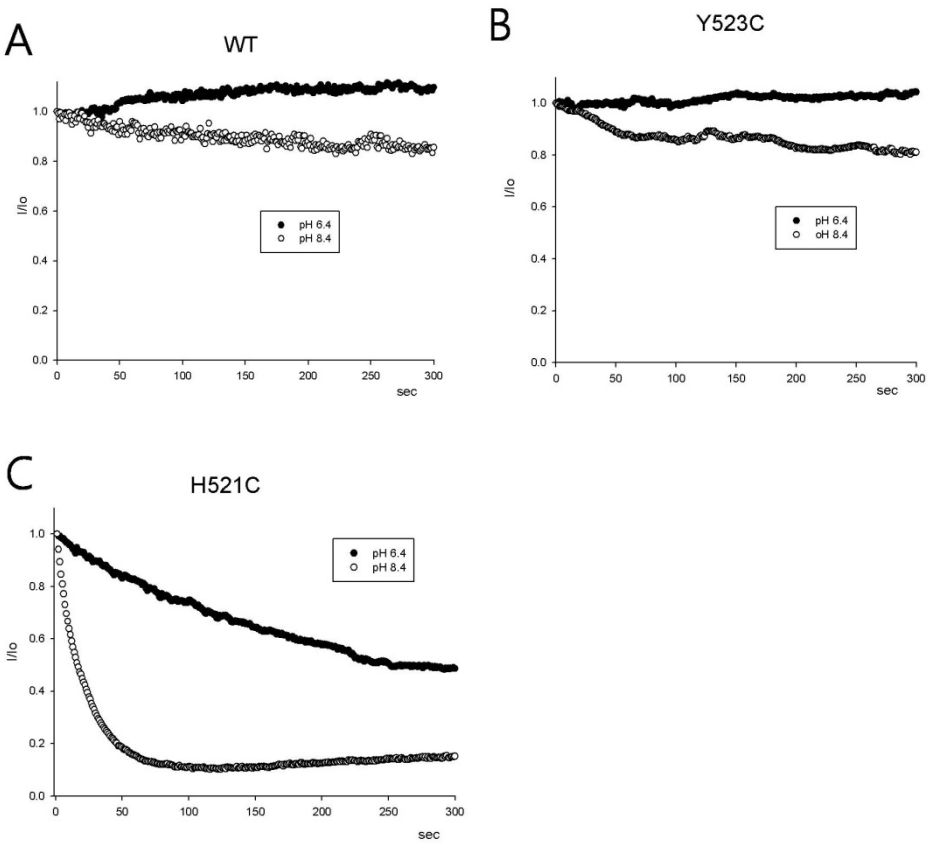


**Fig. 6. Comparison of the effect of MTSET on wild type, cysteine mutant of Y523 and H521.** MTSET effects were checked both at pHe 8.4(open circle) and pH 6.4(closed circle). A. wild type. B. Y523C, C. H521C.

# Ⅳ. 고　　찰

TRPV5와 TRPV6 유전자는 상피 칼슘이온통로를 발현하는 두 종류의 유전자로 크기는 약 22kb이고, 7번 염색체에 위치하고 있다(Hoenderop 등, 2001; Peng 등, 2001; Hoenderop 등, 2003). 아미노산 서열이 서로 유사하고, 특히 pore helix 부위의 아미노산은 유사성이 더 강하게 나타난다(Hoenderop 등, 2001; Peng 등, 2001; Hoenderop 등, 2003; Qiu 등, 2004). 이와 같은 유사한 특징은 여러 연구자들이 TRPV6의 경우 이전 연구를 통해 구조와 기능의 상관관계가 잘 알려져 있는 TRPV5와 그 작용기전에 대해서도 유사성이 클 것이라는 추측을 하게 했다. 두 이온통로 모두 칼슘에 대한 친화성이 강하여 TRPV5는 비뇨기계에서 칼슘 재흡수에 관여하고, TRPV6는 소화기계에서 음식으로 섭취된 칼슘 흡수에 관여한다는 사실은 오래 전부터 알려져 있었으나(Hoenderop 등, 2001; Peng 등, 2001; Hoenderop 등, 2003; Qiu 등, 2004) 작용기전에 대해서 연구되기 시작한 것은 비교적 최근의 일이다.

대사성 산증이나 호흡성 산증이 발생한 경우를 비롯하여 소변의 pH가 산성화하는 경우 소변으로 배출되는 칼슘양이 증가되는 사실이 일찍부터 알려져 왔으며(Hoenderop 등, 1999; Peng 등, 2000; Vennekens 등, 2001) 이를 설명하기 위한 기전으로 비뇨기계에 존재하는 TRPV5의 기능이 세포외 pH가 산성으로 변화하면 기능이 떨어지기 때문이라는 연구결과가 보고되어 있다(Yeh 등, 2003).

TRPV6의 경우 TRPV5와 아미노산 서열과 구조가 유사하므로 이 이온통로도 pH 변화에 민감하게 반응할 것이라는 예상은 쉽게 할 수 있다. 그러나 지금까지 아무도 이에 대한 연구를 진행하지 않은 것은 아마도 TRPV6와 pH 변화에 따른 상관관계를 생리학적으로 설명하는 일이 불가능했기 때문으로 판단된다. 지금까지 TRPV6가 존재하는 것으로 알려진 창자, 태반, 이자, 전립샘 등(Hoenderop 등, 1999; Peng 등, 1999;

Hoenderop 등, 2002; Montell 등, 2002)은 pH 변화가 거의 일어나지 않는 장기이기 때문이다. 그런데 TRPV6가 피부에도 존재한다는 사실이 2001년에 이미 논문으로 발표되었으나(Weber 등, 2001) 여러 연구자들의 관심을 끌지 못하고 있었다.

본 연구는 피부세포가 손상을 입은 후 상처가 치유되는 과정과 노화 과정에서 칼슘이 중요한 역할을 한다는 사실(Ghandially 등, 1995; Denda 등, 2003)과 피부의 pH가 표면에서부터 진피쪽으로 들어가면서 달라진다는 사실(Choi 등, 2007)에 착안하여 연구계획을 세웠다. 즉 피부에서 일어나는 칼슘에 의한 손상치유 및 노화 기전이 pH 변화에 따라 TRPV6의 기능과 구조가 변하는 현상에 의해 일어날 수 있는 것이다. 따라서 본 연구에서는 pH 변화에 따라 TRPV6의 기능이 어떻게 변화하는지를 확인하고자 하였다.

예비실험으로 Chinese Hamster Ovary 세포에 TRPV6를 발현시킨 후 세포외 pH 를 변화시키자 pH가 낮아질수록 전세포 패치클램프 방법으로 기록한 전류가 급격히 감소함을 확인할 수 있었다. 이 실험 결과를 바탕으로 세포외 pH를 8.8에서 4.4까지 감소시켜 가면서 세포막에 발현시킨 TRPV6를 통한 전류를 측정한 결과 pH 8.8과 8.4에서는 비슷한 정도로 전류가 측정되었으며, 이 값이 TRPV6를 통한 최고값이었고, 이 pH를 기준으로 pH가 더 높아지거나 낮아질수록 전류가 작아짐을 확인하였다. 이러한 현상은 TRPV5의 경우 약한 염기성에서 기능이 최고치를 기록하고 산성화 또는 강한 염기성화에 따라 전류크기가 줄어드는 것(Yeh 등, 2003)과 유사하다. 그러나 TRPV6를 통한 전류의 최고값을 기준으로 세포외 pH에 대한 민감도가 50% 억제되는 세포외 pH값을 구해 TRPV5와 비교한 결과 TRPV6인 경우가 5.71로 6.55인 TRPV5보다 약간 낮은 편이었다.

본 실험에서 TRPV6가 칼슘 이온통로임에도 불구하고 세포외액에 칼슘이 존재하지 않는 용액을 사용한 것은 TRPV5와 마찬가지로 TRPV6가

칼슘에 대해 잘 반응하기는 하지만 칼슘이 존재하면 세포내로 칼슘이 들어오자마자 이 이온통로의 기능이 억제되므로 실험진행이 어렵기 때문이다. 그러나 칼슘이 존재하지 않는 조건에서는 소듐이 이 이온통로를 잘 통과하므로 이 성질을 이용하여 소듐을 실험재료로 이용했기 때문이며, 이와 같은 연구방법은 이미 다른 연구자들에 의해서 진행된 바 있다(Gunthorpe 등, 2002; Benham 등, 2002; Voets 등, 2002; Nilius 등, 2004).

TRPV6가 세포외 pH 변화에 민감하게 반응함에 있어서 감지기능을 하는 아미노산을 찾기 위하여 세포막을 관통하는 다섯번째와 여섯번째 부위 사이에 있는 아미노산중 아스파트산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid), 히스티딘(histidine), 타이로신(tyrosine)이 존재하는 부위에 대한 13개의 변이체를 제작하였다. 이 변이체들이 세포외 pH를 감지하는 기능을 하는 경우 다른 아미노산으로 치환되면 세포외 pH가 변하더라도 이를 감지하지 못하므로 측정되는 전류값의 차이가 적을 것으로 예상하였다. 실험 결과 517번째 아미노산인 아스파트산을 아스파라긴으로 치환시킨 변이체는 측정되는 전류값이 일정하지 않고 변이가 심하여 결과를 제시하지 않았으며, 546번째 아미노산인 타이로신을 페닐알라닌(phenylalanine)으로 치환한 변이체는 다른 변이체와 비교할 때 전류가 워낙 낮게 나와서 실험에 이용하지 않았다. 이 두 변이체를 제외한 11개의 변이체에 대하여 세포외 pH 변화에 따라서 전류가 어떻게 변화하는가를 확인한 결과 521번째에 위치한 히스티딘, 523번째에 위치한 타이로신, 525번째에 위치한 타이로신, 541번째에 위치한 아스파트산 등이 정상적인 TRPV6와 비교하여 세포외 pH 변화에 따른 기능변화가 작은 것으로 나타났다.

이 네 가지 부위를 각각 시스테인으로 치환시킨 변이체를 만들어 MTSET 처리시 기능에 변화가 있는지를 확인해 본 결과 521번째 아미노산을 아르기닌으로 치환시킨 경우를 제외하면 모두 정상적인 TRPV6와 차이를 보여 주지 않았으므로 TRPV6 단백질에서는 521번째 아미노산이 세포외 pH 변화를 감지하는 유력한 아미노산으로 생각되었다. 이를 재차

확인하기 위해 521번 부위를 여러 가지 아미노산으로 치환시켜 각 변이체들의 기능을 확인해 본 결과 521번째 히스티딘을 아르기닌으로 치환시킨 변이체를 제외하면 정상적인 TRPV6와 별다른 차이를 보여 주지 않거나 정상 TRPV6보다 pH에 훨씬 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 토대로 521번째 아미노산인 히스티딘은 TRPV6에서 세포외 pH를 감지하는 기능을 하는 것으로 판단하였다.

세포외 pH 변화에 따른 TRPV6의 기능변화가 세포외 pH를 감지하는 아미노산과 어떤 상관관계를 지니는지를 확인하기 위해 표적 아미노산을 시스테인으로 치환시킨 후 MTS 시약이 얼마나 잘 접근하는지를 확인하는 방법(substituted cysteine accessibility method, SCAM)을 시행하였다. 이를 위해 특정 아미노산을 시스테인으로 치환시킨 변이체를 여러 개 제작하였으며, Fig.5와 Fig.6에 그 결과를 제시하였다.

앞선 실험에서 TRPV6에서 세포외 pH를 감지하는 기능을 담당할 것이라 예상된 521번째 아미노산인 히스티딘을 시스테인으로 치환시킨 변이체의 경우 MTSET를 처리하자 세포외 pH가 8.4인 경우 처치 약 1분 30초 후 90%의 전류가 억제되었다. 이것은 521번째 아미노산의 위치가 분자량 278.23으로 비교적 크기가 큰 MTSET가 접근하기 쉬운 위치에 노출되어 있음을 의미한다. 그러나 세포외 pH를 6.4로 바꾼 경우에는 MTSET에 의해 5분에 걸쳐 60% 이하로 전류가 억제됨으로써 MTSET에 의한 억제 효과가 세포외 pH가 8.4일 때보다 훨씬 느리게 나타났다. 이것은 TRPV6의 기능이 활발한 경우가 그렇지 않은 경우보다 MTSET에 의한 효과가 잘 나타남을 보여 주며, 앞선 연구에서 제시된 연구결과에도 부합된다(Yeh 등, 2003).

521번째 아미노산의 시스테인 변이체가 MTSET에 의해 TRPV6의 기능변화를 야기하는 것과 달리 인접한 523번째 타이로신을 시스테인으로 치환시킨 변이체는 MTSET의 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다. 이것은 523번째 아미노산이 TRPV6의 기능결정에 특별한 역할을 하지 못

함을 가리킨다. Wild type TRPV6의 경우에는 MTSET의 영향을 받지 않았으므로 본 연구에서 얻은 MTSET의 TRPV6 기능억제 효과는 시스테인으로 치환된 변이체에 의해 일어났음을 확인시켜 준다.

MTSET는 disulfide bond(-S-S-)를 환원시켜 두 개의 sulfhydryl기를 형성하므로(Akabas 등, 1992; Liapakis 등, 2001) 521번째에 위치한 히스티딘은 MTSET에 의해 환원됨을 의미하고, 이것은 TRPV6의 기능에 영향을 줄 수 있는 구조적 변화가 일어남을 가리킨다. pH가 낮아지면서 TRPV6의 기능이 떨어진다는 것은 수소 이온이 이온통로의 기능을 막는 것을 가리키는데 이 과정을 설명할 수 있는 기전에는 세 가지가 있다. 수소이온이 직접 이온통로의 pore 부위를 막는 경우, 수소이온이 이온통로에 정전기적 변화를 일으켜 기능을 못하게 하는 경우, 수소이온이 이온통로의 구조변화를 일으켜 이러한 구조변화에 의해 기능이 감소되는 경우가 그것이다.

본 연구에서 세포외 pH 감지기능을 담당하는 아미노산으로 지목된 521번째 아미노산인 히스티딘은 그 위치가 pore helix 부위로부터 멀리 떨어져 있고, MTSET에 의해 전류가 줄어드는 정도가 용액속에 노출된 disulfide bond보다는 느리지만 비교적 세포외부에 노출되었다고 생각될 만큼 빠른 속도를 보여주고 있으므로 수소이온이 pore 부위를 직접 막는다거나 정전기적 효과에 의해 TRPV6의 기능을 억제한다기보다는 구조변화를 일으켜 이것이 기능의 변화로 이어진 것이라 판단된다. 구조변화를 일으키는지 여부를 확인하기 위해서는 TRPV6에 대한 단일 이온통로 기록(single channel recording)을 실시하여 수소이온이 증가하더라도 전도도(conductance)가 줄어들지 않는 상태에서 개방확률(open probability)가 감소됨을 확인해야 하므로 이에 대한 차후의 연구가 요구된다.

또한 TRPV6가 수소이온에 의해 기능에 영향을 받는 것은 확인하였고, 이것이 구조변화에 의해 일어날 것임을 추측하게 하는 결과를 얻기는 했지만 정확히 어떤 구조변화에 의해 기능이 변화하는지를 설명하기 위해서는

더 많은 연구가 필요한 상태이다. 궁극적으로는 TRPV6에 의한 칼슘 조절이 어떤 질병을 일으키는지, TRPV6의 기능을 조절하는 인자에는 어떤 것들이 있는지, TRPV6의 기능을 조절하는 약에는 어떤 것들이 있는지 등을 연구하여 TRPV6의 기능이상에 의한 생리적 변화를 바로잡을 수 있는 방법이 마련되어야 할 것이다.

# Ⅴ. 결　　론

세포외 pH 변화에 의해 TRPV6의 기능이 어떻게 변화하는지를 알아보기 위한 연구를 진행하여 얻은 결론은 다음과 같다.

1. TRPV5와 마찬가지로 TRPV6도 세포외 pH 변화에 따라 기능의 변화가 일어난다.
2. TRPV6에서 세포외 pH 변화를 감지하는 역할을 담당하고 있는 아미노산은 521번째에 위치한 히스티딘이다.
3. 세포외에 위치한 수소이온이 521번째 아미노산인 히스티딘에 결합하게 되면 TRPV의 기능이 감소한다.
4. 피부손상이나 노화 과정에서 생리적으로 발생가능한 pH 변화에 의해 피부에서 칼슘이온의 농도에 변화가 일어날 수 있으며, 이 과정을 담당하는 단백질은 TRPV6로 추측된다.

# 참 고 문 헌


Akabas, M. H., D. A. Stauffer, M. Xu, and A. Karlin. 1992. "Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants". *Science*, 258: 307-310.

Benham, C. D., J. B. Davis, and A. D. Randall. 2002. "Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels". *Neuropharmacology*, 42: 873-888.

Bronner, F., D. Pansu, and W. D. Stein. 1986. "An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine". *Am J Physiol Cell*, 250: G561-G569.

Choi, E. H., M. Q. Man, P. Xu, S. Xin, Z. Liu, D. A. Crumrine, Y. J. Jiang, J. W. Fluhr, K. R. Feingold, P. M. Elias, and T. M. Mauro. 2007. "Stratum corneum acidification is impaired in moderately aged human and murine skin". *J Invest Dermatol*, 127: 2847-2856.

Denda, M., A. Tomitaka, H. Akamatsu, and K. Matsunaga. 2003. "Altered distribution of calcium in facial epidermis of aged adults". *J Invest Dermatol*, 121: 1557-1558.

Elias, P. M., and K. R. Feingold. 2001. "Coordinate regulation of epidermal differentiation and barrier homeostasis". *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 1: 28-34.

Friedman, P. A., and F. A. Gesek. 1995. "Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation". *Physiol Rev,* 75: 429-471.

Fukugawa, M., and K. Kurokawa. 2002. "Calcium homeostasis and imbalance". *Nephron*, 92: 41-45.

Ghadially, R., and B. E. Brown, S. M. Sequeira-Martin, K. R. Feingold, and P. M. Elias. 1995. "The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model". *J Clin Invest*, 95: 2281-2290.

Gunthorpe, M. J., C. D. Benham, A. Randall, and J. B. Davis. 2002. "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels". *Trends Pharmacol Sci*, 23: 183-191.

Hamil, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. "Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflugers Arch*, 391: 85-100.

Hoenderop, J. G., A. W. van der Kemp, A. Hartog, S. F. van de Graaf, C. H. van Os, P. H. Willems, and R. J. Bindels. 1999. "Molecular identification of the apical $Ca^{2+}$ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin $D_3$-responsive epithelia". *J Biol Chem*, 274: 8375-8378.

Hoenderop, J. G., D. Müller, M. Suzuki, C. H. van Os, and R. J. Bindels. 2000. "Epithelial calcium channel: gate-keeper of active calcium reabsorption". *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 9: 335-340.

Hoenderop, J. G. J., R. Vennekens, D. Müller, J. Prenen, G. Droogmans, R. J. Bindels, and B. Nilius. 2001. "Function and expression of the

epithelial $Ca^{2+}$ channel family: comparison of the epithelial $Ca^{2+}$ channel 1 and 2". *J Physiol*, 537: 747-761.

Hoenderop, J. G., B. Nilius, and R. J. Bindels. 2002. "Molecular mechanism of active $Ca^{2+}$ reabsorption in the distal nephron". *Annu Rev Physiol*, 64: 529-549.

Hoenderop, J. G., J. P. van Leeuwen, B. C. van der Eerden, F. F. Kersten, A. W. van der Kemp, A M. Merillat, J. H. Waarsing, B. C. Rossier, V. Vallon, E. Hummler, et al. 2003. "Renal $Ca^{2+}$ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5". *J Clin Invest*, 112: 1906-1914.

Hoenderop, J. G., B. Nilius, and R. J. Bindels. 2005. "Calcium absorption across epithelia". *Physiol Rev*, 85: 373-422.

Hurwitz, S. 1996. "Homeostatic control of plasma calcium concentration". *Crit Rev Biochem Bol Biol*, 31: 41-100.

Liapakis, G., M. M. Simpson, and J. A. Javitch. 2001. "The substituted-cysteine accessibility method (SCAM) to elucidate membrane protein structure". *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 4: Unit 4.15.

Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, and R. J. Bindels, E. A. Bruford, M. J. Caterina, D. E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A. M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu, and M. X. Zhu. 2002. "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels". *Mol Cell*, 9: 229-231.

Muller, D., J. G. Hoenderop, F. G. Merkx, C. van Os, and R. F. Bindels. 2000. "Geme structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel". *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 47-52.

Nilius, B, J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, and T. Voets. 2004. "TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity". *Am J Physiol*, 286: C195-C205.

Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, and P. M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. M. Brown, M. A. Hediger. 1999. "Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption". *J Biol Chem*, 274: 22739-22746.

Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, E. M. Brown, and M. A. Hediger. 2000. "A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron". *J Biol Chem*, 275: 28186-28194.

Peng, J. B., E. M. Brown, and M. A. Hediger. 2001. "Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels". *Genomics*, 76: 99-109.

Peng, J. B., E. M. Brown, and M. A. Hediger. 2003 "Epithelial $Ca^{2+}$ entry channels: transcellular $Ca^{2+}$ transport and beyond". *J Physiol*, 551: 729-740.

Qiu, A., and C. Hogstrand. 2004. "Functional characterisation and genomic analysis of an epithelial calcium channel (ECaC) from pufferfish, *Fugu rubripes*". *Gene*, 342: 113-123.

van Abel, M., J. G. Hoenderop, and R. J. Bindels. 2005. “The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol,* 371: 295-306.

Vennekens, R., J. Prenen, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, G. Droogmans, and B. Nilius. 2001. “Modulation of the epithelial $Ca^{2+}$ channel ECaC by extracellular pH”. *Pflugers Arch*, 442: 237-242.

Voets, T., J. Prenen, J. Vriens, H. Watanabe, A. Janssens, U. Wissenbach, M. Bödding, G. Droogmans, and B. Nilius. 2002. “Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4”. *J Biol Chem*, 277: 33704-33710.

Weber, K., R. G. Erben, A. Rump, and J. Adamski. 2001. “Gene Structure and Regulation of the Murine Epithelial Calcium Channels ECaC1 and 2”. *Biochem Biophys Res Commun*, 289: 1287-1294.

Yeh, B. I., T. J. Sun, J. Z. Lee, H. H. Chen, and C. L. Huang. 2003. “Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) by extracellular pH”. *J Biol Chem*, 278: 51044-51052.

Yeh, B. I., Y. K. Kim, W. Jabbar, and C. L. Huang. 2005. “Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons”. *EMBO J*, 24: 3224-3234.

Abstract

## Functional regulation of transient receptor potential vanilloid type(TRPV) 6 channel by extracellular pH

Young Bok Lee

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Byung-Il Yeh)

TRPV6 (epithelial calcium channel type 2, ECaC2) is known to be in charge of calcium absorption in small intestine from the food. Besides small intestine, it is also expressed in kidney, placenta, prostate, and pancreas. The function of TRPV5 (epithelial calcium channel type 1, ECaC1), which is mainly located in the urinary system and have a role to reabsorb calcium, is variable as urine pH changes. The amino acid sequences of TRPV6 have 30% homology with TRPV5, but the amino acid homology in pore helix is about 75%. In addition, their structures in pore helix are very similar.

However, the extracellular pH sensitivity of TRPV6 has not studied yet. Maybe this is because the organs where TRPV6 distributes are generally insensitive to extracellular pH, and therefore, it's difficult to determine physiological meaning of extracellular pH sensitivity of TRPV6.

One study has reported TRPV6 is also distributed in skin. As it is

known that calcium is very important for wound healing and aging in skin now, there is a possibility TRPV6 may play an important role in the calcium concentration regulation in epidermis. It is known that epidermal and dermal pHs are different each other and their calcium concentrations are easily variable. Therefore, this study was planned to explain the physiological mechanism how calcium concentration is regulated in the skin as the pH changes, for example wound healing and/or skin aging.

First, the extracellular pH sensitivity of TRPV6 was examined using whole-cell patch clamp technique. The pKa, 50% of currents are inhibited from the maximum, was 5.71. Next, thirteen mutants were made to find out the amino acids which play a critical role as extracellular pH sensor. Among them, 521$^{st}$ histidine to arginine mutant showed to be less sensitive to extracellular pH(pHe) changes. The findings that only arginine mutant was less sensitive to extracellular pH among six kinds of amino acid mutants on H521, and the pKa was 5.02 strongly indicate 521$^{st}$ histidine may function as a extracellular pH sensor.

To explain the mechanism how proton affects the function of TRPV6 substituted cysteine accessibility method(SCAM) was performed. For this, the 521$^{st}$ amino acid histidine was substituted by cysteine and MTSET was treated. SCAM technique showed 521$^{st}$ amino acid histidine is exposed to extracellular space and proton may provoke functional declines by conformational changes.

In conclusion, the histidine, 521$^{st}$ amino acid of TRPV6, plays a role as extracellular pH sensor and it causes the functional declines not by direct blocking effect or electrostatic effect but by conformational

changes through proton binding.

---

Key words: TRPV6, extracellular pH sensor, calcium, ion channel. skin aging, would healing