



공학석사 학위논문

오징어 (Todarodes pacificus)의 뇌로부터 평활근 수축활성을 지닌 새로운 신경성 펩타이드의 정제 및 특성



조 은 희

공 학 석 사 학 위 논 문

오징어 (Todarodes pacificus)의 뇌로부터 평활근 수축활성을 지닌 새로운 신경성 펩타이드의 정제 및 특성



생물공학과

조 은 희

조은희의 공학석사 학위논문을 인준함

2010 년 8 월



차

List of Tables	IV
List of Figures	IV
Abstract ·····	VIII

I.서 론…………1

Ⅱ. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
1.1. 실험동물 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	5
1.2. 시약 및 재료	5
2. 실험방법 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	5
2.1. 추출	5
2.1.1. 오징어 뇌로부터 평활근에 대한 수축성물질의 추출	5
2.2. 평활근 수축활성 물질의 정제	7
2.2.1. 오징어 뇌 추출물 (RM60)로부터 수축성 펩타이드의 정제	7
2.3. 천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열결정	8
2.3.1. 분자량 측정	8
2.3.2. 아미노산 서열 결정	8
2.4. 천연 및 합성 펩타이드들의 동일성 비교	9
2.4.1. 오징어 뇌로부터 정제된 SBTP와 합성물의 동일성 비교	9
2.5. 펩타이드의 합성 및 정제	9
2.5.1. 펩타이드의 합성	9

2.5.1.1. 오징어 뇌 유래의 신경성펩타이드 및 유도체9
2.5.2. 펩타이드-수지의 절단과 탈보호
2.5.3. 합성 펩타이드의 정제
2.5.3.1. 오징어 뇌 유래의 합성펩타이드 및 유도체
2.6. 생리활성 측정
2.6.1. 조직의 표본제작
2.6.1.1. 오징어 (<i>Todarodes pacificus</i>) esophagus
2.6.1.2. 낙지 (<i>Callistoctopus minor</i>) esophagus
2.6.1.3. 바다고둥 (<i>Neptunea cumingii</i>) esophagus
2.6.1.4. 달팽이 (<i>Achatina fulica</i>) crop
2.6.1.5. 갯지렁이 (<i>Marphysa sanguinea</i>) crop-gizzard
2.6.1.6. 귀뚜라미 (<i>Verlarifictorus aspersus</i>) crop ·································12
2.6.1.7. 불가사리 (<i>Asterina pectinifera</i>) dorsal retractor muscle (DRM)과
cardiac stomach(CS)12
2.6.1.8. Rat (<i>Sprague-Dawley</i>) duodenum과 aorta ·································13
2.6.2. 수축활성의 측정
2.6.2.1 오징어 (<i>T. pacificus</i>)의 esophagus에 대한 수축활성 측정 13
2.6.2.2 낙지 (<i>C. minor</i>)의 esophagus에 대한 수축활성 측정13
2.6.2.3. 바다고둥 (<i>N. cumingil</i>) esophagus, 달팽이 (<i>A. fulica</i>), 귀뚜라미
(<i>V. aspersus</i>) crop, 지렁이 (<i>M. sanguinea</i>) crop-gizzard, 불가
사리 (<i>A. pectinifera</i>)의 DRM과 CS에 대한 수축활성 측정 14
2.6.2.4. Rat (<i>Sprague-Dawley</i>) duodenum과 aorta에 대한 활성 측정·14
2.6.3. 통계처리

Ⅲ. 결 과
1. 오징어 뇌로부터 평활근 수축성물질의 추출
2. 평활근 수축성 펩타이드의 정제
2.1. 오징어 뇌 추출물 RM60의 정제
3. 정제한 펩타이드들의 분자량 및 아미노산서열 결정
3.1. 오징어 뇌 유래의 평활근 수축성 펩타이드
3.2. 천연물과 합성물의 동일성 비교
3.2.1. 천연물 SBTP과 합성물과의 동일성 비교
4. SBTP의 유도체 합성 및 분자량 측정
5. 평활근 수축활성 측정
5.1. SBTP 및 SBTP-OH 간의 수축활성 비교
5.2. SBTP 및 그 유도체들의 오징어 (<i>T. pacificus</i>) esophagus에 대한 수축
활성비교
5.3. SBTP의 다른 종의 동물에 대한 수축활성비교
IV. 토 론···································
V. 참 고 문 현 45
감사의 글

List of Table

Table 1. The amino acid sequence of MATP-RP.4

Table 2. The amino acid sequences of SBTP analogs.18

List of Figure

- Fig. 1. Summaraized procedures for the extraction of squid's brain tissues.
- Fig. 3. Physiography system to measure the contractile effect on the smooth muscle. 19
- Fig. 4. Traces illustrating the contractions induced by squid brain extract in the esophagus of the squid. Each arrow represents the sample applied to the esophagus. 22
- Fig. 5. The 1st reversed-phase HPLC profile of squid brain extract RM60 a Capcell PAK C₁₈ column. RM60 was eluted with a linear gradient of 5 %~ 65 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 60 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The black bar shows the fractions with the contractile activity on the esophagus of squid. Aliquot

(1/800) of the obtained fraction was applied at the time indicated by an arrow. 23

- Fig. 7. The 3rd reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a Capcell PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 13 %~30 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 51min at a flow rate of 1.0 ml/min. The downarrow shows the fractions with the contractile activity on the esophagus of the squid. Aliquot (1/600) of the obtained fraction was applied at the time indicated by uparrow. 25
- Fig. 9. The 5th reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a Capcell Pak C₁₈ column. Active fraction eluted with a linear gradient of 15 % ~ 30 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 75 min at a flow rate of 0.5 ml/min. The downarrow shows the fractions with the contractile activity on the esophagus of squid. Aliquot (1/400) of the obtained fraction was applied at the time indicated by uparrow......27

- Fig. 10. The Final purification of bioactive peptide on a CapcelIPAK C₁₈ column. Active fraction was eluted isocratically with 21 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) at a flow rate of 0.5 ml/min. The downarrow shows the fraction with the contractile activity on the mid-esophagus of squid. Aliquot (1/10) of the purified peptide was applied at the time indicated by uparrow......28
- Fig. 11. Determination of molecular weight by MALDI-TOF. Molecular weight was 1561.2Da. 29
- Fig. 12. Comparisons between HPLC profiles of the native SBTP (N), synthetic SBTP-NH₂ (S1), and synthetic SBTP-OH (S2). N, S1, and S2 were injected to a reverse-phase CapcellPak C₁₈ column and eluted with a linear gradient of 5 % ~ 65 % CH₃CN in 0.1% TFA (pH2.2) for 30min at a flow rate of 1.0 ml/min. N+S1 and N+S2 represent a mixture of the native and synthetic peptides. 31

- Fig. 15. Typical tracing illustrating the contractile response of SBTP-NH₂ on the various tissues of invertebrates. The peptide was applied at the time indicated by arrows. (A: the esophagus of *Octopus*

<i>minor</i> , l	B: tł	ne es	soph	nagus	s of	Nepi	tunea	cuming	<i>ii</i> , C:	the	crop	of
Achatin	a fu	llica,	D:	the	crop	of	Verlari	fictorus	aspe	rsus,	E:	the
crop-gi	zzar	d of	Mar	phys	a sa	nguii	nea)…	•••••	•••••		•••••	· 38



Purification and characterization of a novel neuropeptide with contractile activity on the smooth muscle from the brain of squid, *Todarodes pacificus*.

Eun-Hee Jo

Department of Biotechnology, Graduate School, Pukyong National University

Abstract

A novel neuropeptide with contractile activity was isolated from the brain of the squid, *Todarodes pacificus* using the esophagus of the squid as the bioassay system. To purify the neuropeptide the acidified extract was partially purified with Sep-Pak C₁₈ solid phase extraction cartridges using stepwise gradient with increasing the percent of methanol (10 %, 60 % and 100 %) containing 0.1 % TFA. Contractile activity was recovered in the 60 % methanol fraction and this fraction was further purified by ion-exchange and C₁₈ reversed-phase HPLC. Finally, a new peptide was obtained in isocratic condition of 21 % CH₃CN at a flow rate of 0.5 ml/min. This peptide was analyzed by MALDI-TOF mass and Edman degradation method. The molecular weight of this peptide was synthesized by the solid phase method. The C-terminal portion of this peptide turned out to be $-NH_2$ form.

From these results, the structure of this peptide was having the following primary structure: GFKDNVSNRIAHGFamide. We have named it squid brain tetradecapeptide (SBTP). SBTP showed a potent excitatory action on the esophagus of the squid. The threshold concentration of SBTP was between 5 x 10^{-10} M and 10^{-9} M, and E_{max} was 166.39 ± 26.09 % at 10^{-6} M. In order to investigate the structure-activity

relationship of SBTP, various analogs of SBTP were synthesized. They are analogs with is deleted one by one amino acid residue in N- and C-terminus. Contractile activities of these peptides were measured by using the mid-esophagus of squid. N-terminal deleted analog, 1DES -SBTP, showed a similar contractile effect compared with that of SBTP-NH₂, while, other analogs was inactive. These results indicate that 1DES-SBTP is the minimum structure required for the contractile activity on the esophagus of the squid.



Ⅰ.서 론

Neuropeptide는 뉴런으로부터 분비되어지는 생체신호전달물질로 보통 4-30 개정도의 아미노산으로 구성된 물질이다. 이들은 중추신경계와 말초신경계에 넓 게 분포하고 있으며, 일반적으로 생체 내에서 호르몬 혹은 비 호르몬으로서 평 활근의 운동조절, 혈관의 수축 및 이완, 통증전달 및 혈압조절 등의 역할을 담 당하고 있는 neuromodulator 및 neurotransmitter이다 (Brown, 1994; Shuttleworth *et al.*, 1995; Zadina *et al.*, 1986). 이들 neuropeptide는 신경조 직에만 국한되지 않고, endocrine cell에서도 종종 동일하거나 유사한 분자들이 발현되어지며, 호르몬으로도 분비되어 진다 (Holmgren *et al.*, 2001; Solcia *et al.*, 1989).

이러한 신경성 peptide들에 대한 연구는 척추동물과 무척추동물에서 활발히 진행되어오고 있다. 그 중 무척추동물의 중추신경계는 그 system에 비교적 간 단하고 이해하기 쉽기 때문에 최근 많은 연구가 이루어지는 대상중의 하나이다. 무척추동물에서 발견된 대표적인 neuropeptide들로는 연체동물인 조개류 (*Macrocallista nimbosa*)의 cardiac muscle에서 발견된 cardio-excitory 활성을 가지는 FMRF-amide (Price *et al.*, 1977)와 홍합류 (*Mytilus edylis*)에서 분리 된 통각 조절물질인 enkephalin (Leung *et al.*, 1984), 고동 (*Thais clavigera*) 으로부터 *Thais clavigera*의 esophagus와 penial complex에 대해 수축활성을 가지는 GGNG peptide (Morishita *et al.*, 2006), 문어 (*Octopus vulgaris*)로부 터 평활근에 수축활성을 가지는 tachykinin (Kanda *et al.*, 2003), 극피동물인 불가사리 (*Asterina rubens*와 *Asterina forbesi*)의 radial nerve cord로부터 cardiac stomach, tube foot, apical muscle에 대해 근육이완 활성을 가지는 SALMFamide (Elphick *et al.*, 1991; Elphick *et al.*, 1995; Melarange *et al.*, 1999; Elphick and Melarange, 2001; Melarange and Elphick, 2003)가 있다.

특히 myoactive tridecapeptide 및 tetradecapeptide (MATP)는 최근 달팽 이, 그 결과 오징어 뇌 고둥, 조개, 지렁이, 메뚜기로부터 정제된 평활근 수축

- 1 -

펩타이드이다 (Ohta *et al.*, 1990, Ukena *et al.*, 1995, Paemen *et al.*, 1991; Veenstra *et al.*, 1994). MATP는 복족류인 *Fusinus ferrugineus* 와 *Achatina fulica*로 부터 최초로 발견되었다 (Ohta *et al.*, 1990). 그 후 환형동물인 *Eisenia foetida*의 gut와 *Pheretima vittuta*의 whole body에서 지령이 (*Eisenia foetida*)의 gut와 펼조개 (*Anodonta woodiana*)의 rectum, 귀뚜라미 (*Gryllus bitmaculatus*)의 crop에 대해 수축활성을 가지는 MATP-related peptide (MATP-RP)가 발견되었다 (Ukena *et al.*, 1995). 또한 절지동물인 *Manduca sexta*에서 juvenile hormone의 분비를 촉진시키는 활성을 나타내는 MATP-RP, *Locusta migratoria*로 부터 메뚜기 (*Locusta migratoria*)의 수정관과 바퀴벌레 (*Leucophaea maderae*)의 hindgut에 대해 수축활성을 나타내는 MATP-RP가 발견되었다 (Paemen *et al.*, 1991; Veenstra *et al.*, 1994). 지금까지 발견된 MATP-RP의 일차구조는 Table 1에 나타내었다. MATP는 13~14개의 아미노산 으로 이루어져 있으며 주로 연체동물의 평활근에 대해 수축활성을 나타냈다. 이 들 MATP-RP는 무척추동물의 다양한 종에서 발견되었지만 문어나 오징어와 같 은 두족류에서는 아직까지 보고된 바 없다.

두족류는 척추동물과 비슷하게 혈관계가 동맥과 정맥으로 나누어져 있으며, 신경 전달계 또한 신경신호가 혈관을 타고 말초 조직으로 전해지는 system을 지니고 있다. 이러한 이유로 두족류의 뇌를 이용하여 생리활성을 가지는 peptide를 밝히는 연구가 많이 진행되어있다. 대표적인 생리활성 peptide로는 낙지 (*Octopus minor*)의 뇌로부터 심근육 수축과 심박동 증가 활성을 가지는 cardioactive peptides (Iwakoshi *et al.*, 2000), 왜문어 (*Octopus vulgaris*) 뇌 에서 small cardioactive peptide-related peptide (Kanda *et al.*, 2006)와 nerve terminal에서 정제된 oxytocin/ vasopressin (OT/VP) superfamily (Reich, 1992)등이 있다. 그리고 오징어 (*Loligo vulgaris*)의 뇌로부터 neuropeptide F-related nonapeptide가 발견되었다 (Smart *et al.*, 1992).

따라서 본 실험에서는 오징어 뇌의 추출물로부터 새로운 생리활성 펩타이드 를 분리하고 그 구조와 활성의 관계를 밝히기 위한 목적으로 실험을 하였다. 추 출물로부터 오징어 식도를 수축시키는 물질을 정제하였으며, 이 물질의 일차구

- 2 -

조는 Edman 분해법, 분자량 측정 및 HPLC에 의해 GFKDNVSNRIAHGF-amide 인 peptide로 밝혀졌다. 또한 이 펩타이드는 gut mobility에 영향을 미치는 MATP와 높은 유사성을 나타냈으며 두족류로부터는 처음 발견된 MATP-related peptide (MATP-RP)이다. 이 peptide는 편의상 squid brain tetradecapeptide, SBTP라 명명하였다.

본 논문에서는 SBTP의 구조-활성간의 상관관계를 알아보기 위해 그 유도 체를 합성하였다. 또한 생리활성을 조사하기 위한 Bioassay system으로는 오징 어를 비롯한 다양한 종의 평활근을 이용하여 활성을 측정하였다.



Phylum / Species	Structure	Name	Reference			
Mollusca						
Todarodes pacificus	GFKDNVSNRIAHGF a	SBTP				
Fusinus ferrugineus	GFRMNSSNRVAHGFa	Fusinus MATP	Otha et al., 1990			
Achatina fuliaca	GFRGDAASRVAHGFa	Achatina MATP ₁	Otha et al., 1990			
	GFRQDAASRVAHGYa	Achatina MATP ₂	Otha et al., 1990			
Lymnaea stagnalis	GFRANSASRVAHGYa		Li et al., 1993			
Annelida						
Eisenia foetida	GFKDGAADRISHGFa	ETP	Ukena <i>et al.</i> , 1995			
Pheretima vittata	GFRDGSADRISHGFa	PTP	Ukena <i>et al.</i> , 1995			
Arthropoda						
Manduca sexta	GFKNVEMMTARGFa	Allotropin	Paemen et al., 1991			
Locusta migratoria	GFKNVALSTARGFa	Lom-AG-MT1	Veenstra et al., 1994			

Table 1. The amino acid sequence of MATP-RP



Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 실험동물

실험에 사용한 오징어 (*Todarodes pacificus*, 체장 30 - 50 cm)는 2008 년 6월 부산광역시 남천 해변시장에서 구입하였다. 살아있는 상태의 오징어로 부터 뇌를 분리한 후, 액체질소로 급속 동결시켜서 실험에 사용하기 전까지 -70 ℃에 보관하였다.

1.2. 시약 및 재료

Sep-Pak C₁₈ cartridge는 Waters사 (Miliford, MA, USA)에서 구입하였다. 그리고 펩타이드들을 합성하기 위해 Fmoc-NH₂-PAL-Resin (0.55 mmol/g), Fmoc-amino acid Wang Resin, Fmoc-amino acid 및 1-hydroxy benzotriazole (HOBt)은 Advanced ChemTech사 (Louisville, KY, USA)에서 구 입하였다. *N*,*N*-DiisopropyIcarbodiimide (DIPCI)는 Watanabe 화학회사 (Hiroshima, Japan)로부터 구입하였다. Piperidine, trifluoroacetic acid (TFA), *m*-cresol, 1,2-ethanedithiol (EDT), thioanisole은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC-grade의 *N*, *N*-dimethyl formamide (DMF), water (H₂O) 및 acetonitrile (CH₃CN)은 TEDIA사 (Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 추출

2.1.1. 오징어 뇌로부터 평활근에 대한 수축활성물질의 추출

오징어 brain (1.5 Kg)의 4배 volume에 해당하는 증류수를 첨가하여 100 ℃에서 10분간 끓였다. 식힌 후 조직을 잘게 파쇄한 다음, 전체 용액 농도가 5

- 5 -

%의 초산이 되도록 초산을 넣어주었다. 하루 동안 저온실에 정치시켜둔 다음 4 ℃에서 40분 동안 10,000 x g로 원심분리를 하였다. 침전물과 5 % acetic acid를 1 : 5 (v/v)로 넣어 다시 저온실에서 하룻밤 정치시킨 다음 처음과 같은 방법으로 원심분리를 시행하였다. 위와 같은 방법으로 두 번 더 추출을 시행하 였다. 네 번에 걸쳐 얻어진 상층액을 농축시킨 다음, 시료 : ethanol = 1 : 3 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하였으며, -20 ℃에 보관 후 4 ℃에서 50분 동 안 12,000 X g로 원심분리하여 침전물을 제거했다. 처리 후 얻어진 상층액은 농축한 다음 다시 시료 : ethanol = 1 : 4 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가한 후 4 ℃에서 15분 동안 15,000 X g로 원심분리 한 후 침전물을 제거했다. 원심분 리 후 얻은 상층액은 100 ml이 되게 농축하였다. 이 용액에 ethanol 100 ml 과 NaCl 1.5 g을 넣어 4 ℃에서 하룻밤 정치 후, 4 ℃에서 40분 동안 13,000 X g로 원심분리하여 상층액만을 얻었다. 원심분리한 상층액은 농축하여 총 120 ml이 되게 하였고 여기에 총 농도가 1 N HCI이 되도록 HCI을 첨가해주었다. 다음 단계로 시료 : Ether = 1 : 1 (v/v)의 비율로 ether를 첨가한 뒤, ether층 을 분리하여 지용성 물질을 제거한 후 남은 시료를 농축하였다. 농축한 시료는 부분적으로 물질을 분리하기 위하여 Sep-Pak C18 cartridge 에 주입하였다. 먼 저 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 0.1 % TFA가 포함된 100 % methanol을 이용해 활성화 시킨 후, 0.1 % TFA가 포함된 H2O로 충분히 평형화 하였다. 충분히 평 형화 된 다음 시료를 주입하여 0.1 % TFA가 포함된 H₂O (D.W), 10 % methanol (RM10), 60 % methanol (RM60), 100 % methanol (RM100)로 물 질들을 각각 용출시켰다.

2.2. 평활근 수축활성 물질의 정제

2.2.1. 오징어 뇌 추출물 (RM 60)로부터 수축성 펩타이드의 정제

오징어 brain 추출물 중 RM60이 오징어 esophagus에 대해 가장 큰 활성을 보였다. 활성이 가장 큰 RM60으로부터 생리활성 펩타이드를 정제하기 위해 역 상 HPLC와 이온 exchange column을 교차적으로 사용하였으며, 총 6단계의 정제과정을 거쳤다.

첫번째 정제과정으로는 CapcellPAK C₁₈ (4.6 mm X 250 mm, 5 um, Shiseido, Japan)을 사용하였으며 분리조건은 다음과 같다: A용매, 0.1 % TFA 를 포함하는 H₂O (pH 2.2); B용매 0.1 % TFA를 포함하는 100 % CH₃CN (pH 2.2); gradient, 5 ~ 65 % B (60 min); 유속, 1.0 ml/min; 온도, 40 °C. 각 분 획들을 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성을 측정한 결과, 분획 32 - 33번 (23.3 ~ 24.3 min)에서 활성을 나타냈다 (Fig. 5).

두 번째 정제과정으로는 Tskgel SP-5PW HPLC (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)을 사용하였으며 분리조건은 다음과 같다: A용매, 10 mM Phosphate buffer(pH 6.0); B용매 1.0 M NaCl 을 포함하는10 mM Phosphate buffer (pH 6.0); gradient, 0 ~ 0.6 M NaCl (60 min); 유속, 1.0 ml/min; 온 도, 40 °C. 각 분획들을 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성을 측정한 결과, 분획 15 - 16번 (28 ~ 32 min)에서 활성을 나타냈다 (Fig. 6).

세 번째 정제과정으로는 CapcellPAK C₁₈을 사용하였으며 분리조건은 다음 과 같다: A용매, 0.1 % TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2); B용매 0.1 % TFA를 포함하는 100 % CH₃CN (pH 2.2); gradient, 13 ~ 30 % B (51 min); 유속, 1.0 ml/min; 온도, 40 ℃. 각 분획들을 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성을 측정한 결과, 분획 24번 (16.6 ~ 17.4 min)에서 활성을 나타냈다 (Fig. 7).

네 번째 정제과정으로는 Tskgel SP-5PW HPLC를 사용하였으며 분리조건은 다음과 같다: A용매, 10 mM Phosphate buffer (pH 6.0); B용매 1.0 M NaCl 을 포함하는 10 mM Phosphate buffer (pH 6.0); gradient, 0.2 ~ 0.4 M NaCl (40 min); 유속, 1.0 ml/min; 온도, 40 ℃. 각 분획들을 오징어 식도 평활

- 7 -

근에 대해 수축활성을 측정한 결과, 분획 12번 (9.9 ~ 11.5 min)에서 활성을 나타냈다 (Fig. 8).

다섯 번째 정제과정으로는 CapcellPak C₁₈을 사용하였으며 분리조건은 다음 과 같다: A용매, 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2); B용매 0.1 % TFA를 포 함하는100 % CH₃CN (pH 2.2); gradient, 15 ~ 30 % B (75 min); 유속, 0.5 ml/min; 온도, 40 ℃. 각 분획들을 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성을 측정 한 결과, 분획 18번 (40.4 ~ 41.3 min)에서 활성을 나타냈다 (Fig. 9).

마지막 정제과정으로는 CapcellPak C₁₈을 사용하였으며 분리조건은 다음과 같다: A용매, 0.1 % TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2); B용매 0.1 % TFA를 포함 하는 100 % CH₃CN (pH 2.2); gradient, 21 % B용매 isocratic condition; 유 속, 0.5 ml/min; 온도, 40 ℃. 각 분획들을 오징어 식도 평활근에 대해 수축활 성을 측정한 결과, 분획 5번 (15.1 ~ 16 min)에서 활성을 나타냈다 (Fig. 10).

2.3. 천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열결정2.3.1. 분자량 측정

천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 측정은 부경대학교 공동실험실습관에 있 는 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM PRO spectrometer, Perseptive Biosystems, USA)를 사용하여 측정하였다.

2.3.2. 아미노산 서열 결정

오징어 뇌로부터 정제한 펩타이드들의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 한 국기초과학지원연구원의 Procise[®]cLC Sequencing System Model 492 cLC (Apply Biosystem, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석 하였다.

2.4. 천연 및 합성 펩타이드들의 동일성 비교

2.4.1. 오징어 뇌로부터 정제된 SBTP와 합성물의 비교

정제한 천연물과 합성물의 동일성은 분자량 측정과 역상 HPLC column을 이 용한 머무름시간 (retention time, RT)을 비교함으로써 확인하였다.

2.5. 펩타이드의 합성 및 정제

2.5.1. 펩타이드의 합성

Fmoc-법을 사용하여 고상법으로 펩타이드를 합성하였다 (Merrifield, 1964). C-말단에 amide화된 형태의 펩타이드를 합성하기 위해 Fmoc-NH₂-PAL-resin 을, C-말단이 free한 경우는 Fmoc-amino acid-Wang- resin을 사용하였다.

펩타이드를 합성하기 위해서 우선 DMF로 수지 (resin)를 팽윤 (swelling) 시 킨 후, 20 % piperidine/DMF를 이용하여 수지로부터 Fmoc-보호기를 절단하였 다. DIPCI/HOBt법을 이용하여 결합시키고자 하는 아미노산의 카르복실기를 에 스테르 형태로 활성화시켜, NH₂-PAL-resin 또는 NH₂-amino acid-Wang-resin 과 반응시켰다. 첫 번째 반응이 완료된 수지는 DMF로 세정하고, 다시 20 % piperidine/DMF로 첫 번째로 도입된 아미노산의 Fmoc-기를 절단하였다. 반응 후, DMF로 세정하고 두 번째 아미노산을 DIPCI/HOBt법으로 결합을 시켰다. 이와 같은 과정을 순차적으로 반복하여, 완전한 펩타이드 사슬을 수지에 성장시 켰다.

2.5.1.1. 오징어 뇌 유래의 신경성펩타이드 및 유도체

오징어 뇌로부터 정제되어 일차구조가 밝혀진 펩타이드는 모두 L형 아미노 산으로 합성하였으며, C말단이 amide화되어 있는 SBTP-NH₂ 와 free한 형태인 SBTP-OH 2종류의 펩타이드를 합성하였다. 또한 구조-활성간의 상관관계를 알 아보기 위해 N-말단에서 아미노산이 하나씩 순차적으로 제거된 1DES-SBTP (2-14), 2DES-SBTP (3-14), 3DES-SBTP (4-14)의 N-말단 유도체를 합성하 였다. 또한, C-말단에서 아미노산이 순차적으로 제거된 유도체 14DES-SBTP

- 9 -

(1-13), 13DES-SBTP (1-12), 12DES-SBTP (1-11)를 합성하였다. 이들 합성 유도체들의 일차서열은 Table. 2에 나타내었다.

2.5.2. 펩타이드-수지의 절단과 탈보호

합성 펩타이드에 연결되어 있는 수지와 측쇄 (side chain)의 보호기를 제거 하기 위해서 절단시약 [TFA (5 ml) : m-cresol (0.6 ml) : thioanisole (1.7 ml) : EDT (0.9 ml)]을 사용하여 실온에서 90 분간 반응을 시켰다. 반응 후, 수지를 여과한 다음 펩타이드 용액을 진공 농축하였다. 계속해서 농축액을 15 ml tube에 옮긴 후, 냉각된 에테르를 첨가하여 펩타이드를 결정화하였다. 에테 르혼합액을 원심분리한 뒤, 에테르층에 녹아있는 절단시약을 충분히 제거시켰 다. 건조기에서 남아있는 에테르를 완전히 휘발시킨 뒤, 5 % 초산 용액으로 녹 여 동결건조 시켰다.

2.5.3. 합성 펩타이드의 정제

2.5.3.1. 오징어 뇌 유래의 합성펩타이드 및 유도체

동결 건조한 crude한 합성 펩타이드들은 역상 HPLC로 부분정제를 행하였 다. 오징어 뇌 조직으로부터 정제한 SBTP의 합성 펩타이드는 다음의 분리조건 으로 부분 정제하였다: Column, Vydac C₁₈ (10 × 250 mm); B용매의 gradient, 5 → 65 % (60 min); 유속, 3.0 ml/min. 부분 정제된 합성 펩타이드 는 계속해서 Vydac C₁₈ (4.6 X 250 mm)을 사용하여 14 → 25 % (33 min) CH₃CN의 조건으로 정제하였다.

2.6. 생리활성 측정

2.6.1. 조직의 표본제작

2.6.1.1. 오징어 (Todarodes pacificus) esophagus

오징어 뇌로부터 추출한 crude 물질의 생리활성 측정, HPLC 정제단계에서 얻은 분획들, 및 합성 유도체들의 수축활성을 측정하기 위해 오징어의

-10-

esophagus를 사용하였다. 오징어를 반으로 갈라 뇌 아래에서부터 간의 뒤로 이어지는 식도의 중앙부분을 7 mm로 떼어내어 활성 측정에 사용하였다. 모든 과정은 buffer하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 466, MgCl₂ 54, CaCl₂ 11, KCl 10, NaHCO₃ 3, Na-HEPES 10.

2.6.1.2. 낙지 (Callistoctopus minor) esophagus

오징어 뇌 추출물 및 천연물의 생리활성을 측정하기 위해 낙지 esophagus 를 사용하였다. 낙지의 양쪽 눈사이를 반으로 갈라 뇌 아래를 지나가는 esophagus를 7 mm정도의 단편으로 만들었다. 모든 과정은 buffer하에서 행하 였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 460, KCl 10, MgCl₂ 55, CaCl₂ 11, glucose 10 and 0.5M Na-HEPES (pH 7.6) 10.

2.6.1.3. 바다고둥 (Neptunea cumingii)) esophagus

오징어 뇌 추출물 및 천연물의 생리활성을 측정하기 위해 바다고둥의 esophagus을 사용하였다. 바다고둥의 껍질을 벗긴 다음 몸체를 절개하여 crop 에서 0.5 cm 떨어진 곳에서 esophagus을 적출한다. 적출한 esophagus은 7 mm 정도의 단편으로 만들었다. 모든 과정은 buffer하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl₂ 10, MgCl₂ 55 glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH7.8) 5

2.6.1.4. 달팽이 (Achatina fulica) crop

오징어 뇌 추출물 및 천연물의 생리활성을 측정하기 위해 달팽이의 crop을 사용하였다. 달팽이의 껍질을 벗긴 다음, 가슴을 절개하여 crop의 윗부분과 아 랫부분에서 약 0.5 cm 떨어진 부분에서 2 cm의 크기로 재빨리 적출하였고, 적 출한 crop은 7 mm의 단편으로 만들었다. 모든 과정은 buffer하에서 행하였으 며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 120, CaCl₂ 0.9, KCl 4, NaHCO₃ 18, MgSO₄ 2.5, NaH₂PO₄ 4.2 and Glucose 10.

- 11 -

2.6.1.5. 지렁이 (Marphysa sanguinea) crop-gizzard

오징어 뇌 추출물 및 천연물의 생리활성을 측정하기 위해 지렁이 crop-gizzard을 사용하였다. 지렁이를 고정시킨 후 꼬리 쪽부터 반으로 절개 한 후 식도아래에 위치한 crop-gizzard를 1.5 cm의 크기로 적출한다. 적출한 조직은 7 mm정도의 단편으로 만들었다. 모든 과정은 buffer하에서 행하였으 며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl₂ 10, MgCl₂ 55 glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH7.8) 5

2.6.1.6. 귀뚜라미 (Verlarifictorus aspersus) crop

오징어 뇌 추출물 및 천연물의 생리활성을 측정하기 위해 귀뚜라미 crop을 사용하였다. 귀뚜라미의 배 쪽을 메스를 이용하여 절개한 후 식도아래에 위치한 crop을 적출한다. 적출한 crop은 결제 조직을 제거한 후 7 mm정도의 단편으 로 만들었다. 모든 과정은 buffer하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 128.34, KCl 4.69, CaCl₂ 1.89, glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH7.8) 5

2.6.1.7. 불가사리 (*Asterina pectinifera*) dorsal retractor muscle (DRM) 과 Cardiac stomach (CS)

오징어 뇌 추출물 및 천연물의 생리활성을 측정하기 위해 불가사리 dorsal retractor muscle (DRM)과 Cardiac stomach (CS)을 사용하였다. 불가사리의 eye spot을 제거한 후 배면과 복면을 분리하여 배면을 뒤집으면 5개의 팔을 따라 DRM이 분포하고 있다. 이 muscle을 mess 로 분리한 후, 1 cm정도의 단편으로 만든다. CS는 불가사리 분리 후 복면의 중앙에 위치한 5부분의 CS 의 한 부분을 면실로 묶는다. 이후 해부용 메스와 가위를 이용해 조직에 손상 이 가지 않도록 떼어낸다. 모든 과정은 buffer하에서 행하였으며, 조성은 다 음과 같다: (mM) NaCl 445, CaCl₂ 10, KCl 10, NaHCO₃ 18, MgCl₂ 55, Glucose 10 and 0.5 M Tris-HCl (pH 7.8) 10.

2.6.1.8. Rat (Sprague-Dawley) duodenum과 aorta

230 - 250 g의 rat을 decapitation하여 복부를 절개한 후, 위로부터 1 cm 정도 떨어진 부위의 duodenum을 2 - 3 cm을 재빨리 적출한다. 적출한 duodenum의 결체조직을 제거한 후 5 mm정도의 단편을 만든다. 모든 과정은 buffer하에서 이루어졌으며, 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 100, KCl 2.0, CaCl₂ 3.0, MgCl₂ 3.0, NaHCO₃ 24, and Glucose 5.6. 이들 용액은 95 % O₂와 5 % CO₂로 20분간 포화시킨 후 37 ℃로 유지되는 반응조에 적용되었다.

또한 척추를 따라 위치한 aorta는 2 cm의 크기로 적출한다. 적출한 혈관의 결 체조직을 제거하고, 2 mm정도의 혈관 고리를 만들어 5 ml 반응조에 고정시켰 다. 모든 과정은 buffer하에서 이루어졌으며, 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.8, and Glucose 10.1. 이들 용액은 95 % O₂와 5 % CO₂로 20분간 포화시킨 후 37 ℃로 유지되는 반응조에 적용되었다.

2.6.2. 수축활성의 측정

2.6.2.1. 오징어 (T. pacificus) esophagus에 대한 수축활성의 측정 준비된 식도의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NECSanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1.5g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충용액을 교체하면서 60분간 평형화 시켰다. 수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화시킨 후 10⁻⁵ M carbachol을 15분 간격으로 3회 투여하여 조직을 활성 화 시켰다. 이후 준비된 추출분획 및 HPLC정제 단계에서 얻은 분획들을 투여 하였다. 시료들은 주입한 후 수축활성을 측정하여 physiography상에 기록하였 다.

2.6.2.2. 낙지 (Cminor) esophagus에 대한 수축활성의 측정

준비된 낙지의 식도를 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1.5 g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충용액을 교체하면서 60분간 평형화 시켰다. 수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화시킨 후 10⁻⁵ M carbachol을 15분 간격으로 3회 투여하여 조직을 활성 화 시켰다. 이후 준비된 샘플을 투여하였다. 시료를 주입한 후 수축활성을 측정 하여 physiography상에 기록하였다.

2.6.2.3. 바다고둥 (*N. cumingii*) esophagus, 달팽이 (*A. fulica*), 귀뚜라미 (*V. aspersus*) crop, 지렁이 (*M. sanguinea*) crop-gizzard, 불가사 리 (*A. pectinifera*)의 DRM과 CS에 대한 수축활성 측정

준비된 장관들의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1.5 g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충용액을 교체하면서 60분간 평형화 시켰다. 수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화시킨 후 10⁻⁵ M acetylcholine (Ach) 을 15분 간격으로 3회 투여하여 조직을 활성화 시켰다. 이후 준비된 샘플을 투여하였다. 시료를 주입한 후 수축활성을 측정하여 physiography상에 기록하였다.

2.6.2.4. Rat (Sprague-Dawley) duodenum과 aorta에 대한 활성 측정

준비된 duodenum의 아래쪽은 organ bath내의 지지대에 고정시키고, 위쪽 은 isometric transducer (Narco F-60, Narco Biosystem Inc., USA)에 연결하 여 resting tension이 1.0 g이 되도록 90분간 평형화 시켰다. 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10⁻⁵ M의 Ach을 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화시켰다.

혈관이완 실험을 위해 준비된 aorta는 force displacement transducer와 5 ml 반응조와 연결된 L-type wire에 걸었다. 반응조에 담겨진 혈관은 1 g 장력 이 유지되도록 90분간 평형화 시켰고, 15분 간격으로 buffer를 교체해 주었다.

- 14 -

1 g tension이 유지되면 50 mM high-K+ solution으로 3회 활성화시킨 후, 혈 관 수축물질인 10⁻⁶ M의 norepinephrine (NE)를 이용하여 수축시킨 후 시료를 투여하였다.

2.6.3. 통계처리

수축활성은 10⁻⁵ M의 CCh의 최대수축에 대한 상대적 수축 %로서 나타냈 다. 활성의 크기는 역치농도 및 E_{max} (10⁻⁶ M에서의 수축 %)로서 비교하였다. 통계적 처리는 student's t-test로서 했다. 모든 반응 값은 means ± s.e.로 표 시하였다.







Fig. 2. Summarized procedures for the purification of neuropeptide from the brain of the squid, *Todarodes pacificus*.

Name	Primary structure													
SBTP	G	F	Κ	D	Ν	V	S	Ν	R	I	А	Н	G	F
SBTP-OH	G	F	Κ	D	Ν	V	S	Ν	R	Ι	А	Η	G	F
N-terminal analogs														
1DES-SBTP		F	Κ	D	Ν	V	S	Ν	R	Ι	А	Н	G	F
2DES-SBTP			Κ	D	Ν	V	S	Ν	R	Ι	А	Н	G	F
3DES-SBTP				D	Ν	V	S	Ν	R	Ι	А	Н	G	F
C-terminal analogs														
14DES-SBTP	G	F	K	D	Ν	V	S	Ν	R	1	А	Н	G	
13DES-SBTP	G	F	K	D	Ν	V	S	Ν	R	J)	A	H		
12DES-SBTP	G	F	K	D	Ν	V	S	Ν	R	Y	Α	1		
ONKVO	1	1 101						0		I		Enoir	Inci	

Table 2. The amino acid sequences of SBTP analogs.



Fig. 3. Physiography system to measure the contractile effect on the smooth muscle.



Ⅲ. 결 과

1. 오징어 뇌로부터 평활근 수축성물질의 추출

오징어 뇌로부터 여러 가지 단계에 걸쳐 유기용매, NaCl 및 산을 첨가하여 다당, 고분자량의 단백질 및 지방을 제거하였다. 그 후 Sep-Pak C₁₈ cartridge 를 이용하여 부분정제한 각각의 추출물 (D.W., RM10, RM60, RM100)을 각각 오징어 식도에 대해 수축활성을 측정하였다. 그 결과, RM60에서 오징어장관에 대해 가장 강한 수축활성을 나타냈으며, D.W.와 RM10에서는 RM60보다 약한 수축활성을 나타내었다. 따라서 오징어 장관에 대해 가장 강한 수축활성을 나타 낸 RM60을 사용하여 수축성 펩타이드를 정제하였다.

2. 평활근 수축성 펩타이드의 정제

2.1. 오징어 뇌 추출물 RM60의 정제

부분 정제된 RM60을 먼저 CapcellPak C₁₈ (4.6 mm X 250 mm, 5 um, Shiseido, Japan)로 분리한 결과, 분획 32 - 33번에서 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성을 나타내었다 (Fig. 5). 이 활성분획을 농축하여 두 번째 정제단 계로 0.25 M NaCl/2 min의 농도구배로 하여 SP-5PW (7.5 mm × 75 mm) column에 적용시켰으며, 0.27 ~ 0.32 M의 NaCl에 해당하는 부분에서 용출된 분획에서 수축활성을 나타냈다 (Fig. 6). 계속해서 세 번째 단계로 동일한 CapcellPak C₁₈에 적용하여 1 %/3 min의 농도구배를 적용하여 분리한 결과 약 15.9 ~ 16.1 %의 CH₃CN에서 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성을 나타내 었다 (Fig. 7). 네 번째 정제단계로 Tskgel SP-5PW column에 다시 적용하여 0.01 M NaCl/2 min의 농도구배를 적용하여 분리한 결과 약 0.02 ~ 0.03 M NaCl에서 오징어 식도에 대한 수축활성을 나타내었다 (Fig. 8). 계속해서 다섯 번째 정제단계로 이 활성분획을 CapcellPak C₁₈ 에 1 %/5 min의 농도구배를

- 20 -

적용하여 21.4 ~ 21.6 %의 CH₃CN에서 오징어 식도 평활근에 대해 수축활성 을 나타내었다 (Fig. 9). 최종적으로 21 %의 CH₃CN isocratic 조건으로 단일 peak를 얻었다 (Fig. 10).

3. 정제한 펩타이드들의 분자량 및 아미노산서열 결정

최종적으로 오징어 뇌 조직으로부터 정제한 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위해 MALDI-TOF mass와 Edman 분해법을 이용하는 아미노 산 서열 분석기를 사용하였다.

3.1. 오징어 뇌 유래의 평활근 수축성 펩타이드

오징어 뇌 추출물 RM60으로부터 정제된 물질의 분자량과 일차서열을 분석 한 결과, 분자량은 약 1561 Da이며, 14개의 아미노산 잔기로 구성된 tetradecapeptide였다 (Fig.11). 일차서열은 다음과 같다:Gly-Phe-Lys-Asp-Asn-Val-Ser-Asn-Arg-Ile-Ala-His-Gly-Phe.

SBTP와 지금까지 알려진 모든 수축활성 펩타이드들과의 상동성 (homology)을 조사한 결과, SBTP는 연체동물 및 환형동물에서 평활근에 대해 수축활성을 나타내는 Myoactive tetradecapeptide (MATP)와 유사하였다. 그러 나 이 펩타이드는 오징어 뇌에서는 처음으로 발견된 MATP-related peptide이 다. 이 peptide는 편의상 squid brain tetradecapeptide, SBTP라 명명하였다.





Fig. 5. The 1st reversed-phase HPLC profile of squid brain extract RM60 a Capcell PAK C₁₈ column. RM60 was eluted with a linear gradient of 5 %~ 65 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 60 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The black bar shows the fractions with the contractile activity on the esophagus of squid. Aliquot (1/800) of the obtained fraction was applied at the time indicated by an arrow.



Fig. 6. The 2nd reversed-phase HPLC profile of bloactive peptide on a TSKgel SP-5PW column. Active fractions were eluted with a linear gradient of 0 ~ 0.6 M NaCl in 10 mM PBS (pH 6.0) for 60 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The black bar shows the fraction with the contractile activity on the esophagus of the squid. Aliquot (1/600) of the obtained fraction was applied at the time indicated by an arrow.



Fig. 7. The 3rd reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a CapcellPAK C₁₈ column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 13 %~30 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 51min at a flow rate of 1.0 ml/min. The downarrow shows the fractions with the contractile activity on the esophagus of the squid. Aliquot (1/600) of the obtained fraction was applied at the time indicated by uparrow.



Fig. 8. The 4th reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide a TSKgel SP-5PW column. Active fractions were eluted with a linear gradient of 0.2 ~ 0.4 M NaCl in 10 mM PBS (pH 6.0) for 40 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The downarrow shows the fraction with the contractile activity on the esophagus of the squid. Aliquot (1/500) of the obtained fraction was applied at the time indicated by an arrow.



Fig. 9. The 5th reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a CapcellPak C_{18} column. Active fraction eluted with a linear gradient of 15 % ~ 30 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 75 min at a flow rate of 0.5 ml/min. The downarrow shows the fractions with the contractile activity on the esophagus of squid. Aliquot (1/400) of the obtained fraction was applied at the time indicated by uparrow.



Fig. 10. The Final purification of bioactive peptide on a CapcellPAK C₁₈ column. Active fraction was eluted isocratically with 21 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) at a flow rate of 0.5 ml/min. The downarrow shows the fraction with the contractile activity on the mid-esophagus of squid. Aliquot (1/10) of the purified peptide was applied at the time indicated by uparrow.



Fig. 11. Determination of molecular weight of by MALDI-TOF. Molecular weight was 1561.2 Da.

3.2. 천연물과 합성물의 동일성 비교

3.2.1. 천연물 SBTP와 합성물과의 동일성 비교

오징어의 뇌로부터 정제된 천연물, SBTP의 C-말단 modification 여부를 알 아보기 위해 C-말단이 free한 형태 (SBTP-OH)와 C-말단이 amide화된 형태 (SBTP-NH₂)를 합성하였다. 천연물, SBTP와 합성 SBTP-NH₂ 및 SBTP-OH의 동일성을 알아보기 위해, 천연물과 합성물들을 CapcellPak C₁₈ (4.6 mm X 250 mm)을 사용하여 B용매의 gradient, 5 → 65 % (30 min) CH₃CN의 조건 으로 적용한 결과, 합성물 SBTP-NH₂가 정제된 천연물과 같은 머무름 시간을 가지고 용출되었다 (Fig.12).

4. SBTP-NH2의 유도체 합성 및 분자량 측정

SBTP의 구조와 활성간의 상관관계를 알아보기 위해, SBTP를 모델로 하여 각각 3종류의 N-말단 유도체, 3종류의 C-말단 유도체를 합성하였다. 분자량 측정은 MALDI-TOF mass를 이용해 측정하였고, Table 3은 최종 정제한 유도체들의 분자량 측정치를 나타낸다.



Fig. 12. Comparisons between HPLC profiles of the native SBTP (N), synthetic SBTP-NH₂ (S1), and synthetic SBTP-OH (S2). N, S1, and S2 were injected to a reverse-phase Capcell Pak C₁₈ column and eluted with a linear gradient of 5 % ~ 65 % CH₃CN in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 30min at a flow rate of 1.0 ml/min. N+S1 and N+S2 represent a mixture of the native and synthetic peptides.

	Molecular weight							
Peptides	Observed $(M+H)^+$	Calculated (M)						
SBTP-NH ₂	1560	1559						
SBTP-OH	1560	1559						
N-terminal analogs								
1DES-SBTP	1357	1357						
2DES-SBTP	1229	1229						
3DES-SBTP	1113	1114						
C-terminal analogs	NATIONA	Lin						
14DES-SBTP	1413	1415						
13DES-SBTP	1356	1358						
12DES-SBTP	1118	1220						
AUG		SITI						

Table 3. Molecular of SBTP, SBTP-OH, N- and C-terminal deleted analogs.

5. 평활근 수축활성 측정

5.1. SBTP-NH2 및 SBTP-OH 간의 수축활성 비교

오징어 뇌로부터 정제된 SBTP (SBTP-NH₂) 및 SBTP-OH을 사용하여 오징어 식도 평활근에 대한 수축활성을 비교하였다. 두 펩타이드의 수축활성을 비교하기 위해 10⁻⁵ M의 carbachol를 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화시킨 뒤, 펩타 이드를 10⁻¹⁰ M에서 10⁻⁶ M까지 농도 의존적으로 투여하였다. 처음 활성화를 위해 넣어준 carbachol의 평균 활성도를 100 %의 기준으로 하여 SBTP 및 그 유도체들의 활성정도를 수치로 계산하였다.

SBTP는 10⁻⁹ M에서 1.11 %의 역치값을 가졌으며, 10⁻⁶ M에서 166.39 ± 26.09 %의 최대 수축활성을 나타내었다. 반면 SBTP-OH는 10⁻⁶ M에서 30.29 ± 6.06 %의 최대 수축활성을 나타내었다 (Fig.13).





Fig.13. Concentration response curves to SBTP-NH₂, SBTP-OH induced contraction on the isolated esophagus of the squid. The percentage of relative contraction were calculated by 10⁻⁵ M carbachol (100 %). (SBTP-NH₂: ●, SBTP-OH: ○)

5.2. SBTP 및 그 유도체들의 오징어 (T. pacificus) esophagus에

대한 수축활성비교

오징어 식도에서의 SBTP-NH₂ 및 3종류의 N-말단 유도체, 3종류의 C-말단 유도체의 수축활성을 비교하기 위해 10⁻⁵ M의 carbachol를 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화시킨 뒤, 펩타이드를 10⁻¹⁰ M에서 10⁻⁶ M 까지 농도 의존적으 로 투여하였다. 이들 중 SBTP와 첫 번째 N-말단잔기를 자른 1DES SBTP에서 만 농도의존적인 활성을 보였고, 그 외 나머지 합성물에서는 모두 반응이 나타 나지 않았다. Fig.14는 이들의 농도 의존곡선을 나타낸다. carbachol에 의한 수 축활성을 100 %의 기준으로 하여 SBTP 및 그 유도체들의 활성정도를 수치로 계산하였다. SBTP는 10⁻⁹ M에서 1.11 %의 역치값을 가지고, 10⁻⁶ M에서 166.39 ± 26.09 %의 최대 수축활성을 나타내었다. 1DES-SBTP는 5x10⁻⁹ M 에서 26.62 %의 역치값을 가지고, 10⁻⁶ M에서 152.84 ± 12.46 %의 최대 수 축활성을 나타내었다. 반면에 2DES-SBTP와 14DES-SBTP는 활성이 완전히 소 실되었다. 따라서, 오징어 장관 평활근에 대한 이들 신경성 펩타이드들의 수축 활성의 크기는 SBTP> 1DES-SBTP > 2DES-SBTP와 14DES-SBTP 순이었 다.



Fig. 14. Concentration response curves to SBTP, analogs of SBTP induced contraction on the isolated esophagus of the squid. The percentage of relative contraction were calculated by 10⁻⁵ M carbachol (100 %). (SBTP: ●, 1DES-SBTP: □, 2DES-SBTP: ○, 14DES SBTP: ▼)

5.3. SBTP의 다른 종의 동물의 평활근에 대한 활성비교

SBTP의 다른 종의 평활근에 대한 수축활성 비교를 위해 낙지, 바다고둥의 esophagus, 달팽이, 귀뚜라미의 crop, 갯지렁이의 crop-gizzard, 불가사리의 DRM과 CS, Rat의 duodenum이 사용되었다. 또한 SBTP의 혈관 이완 활성을 알아보기 위하여 Rat aorta를 사용하였다.

수축활성을 비교하기 위하여 각 조직에 따라 10⁻⁵ M carbachol 또는 10⁻⁵ M Acethylcholine을 이용해 조직을 미리 활성화 시킨 후 SBTP를 10⁻¹⁰ M에서 10⁻⁶ M까지 의존적으로 투여하였다.

그 결과 낙지와 바다고둥의 esophagus 경우 모두 5 x 10⁻⁸ M에서 역치값을 나타내었고 달팽이와 귀뚜라미의 crop에서는 5 x 10⁻⁸ M, 갯지렁이의 crop-gizzard에서는 10⁻⁷ M의 역치 값을 나타내었다 (Fig.15). 반면에 불가사리 의 DRM과 CS에서는 반응이 나타나지 않았다 (data not shown).

또한 포유류인 Rat의 duodenum에 대해서는 수축활성이 나타나지 않았지만, Rat의 aorta에 대해서는 혈관 수축물질인 10⁻⁶ M의 norepinephrine (NE)에 의 한 수축반응을 100 %로 보았을 때 SBTP는 10⁻⁶ M에서 9.67 ± 1.34 % 의 혈 관 이완 활성을 나타냈다 (data not shown).



Fig. 15. Typical tracing illustrating the contractile response of SBTP-NH₂ on the various tissues of invertebrates. The peptide was applied at the time indicated by arrows. (A: the esophagus of *Octopus minor*, B: the esophagus of *Neptunea cumingii*, C: the crop of *Achatina fulica*, D: the crop of *Verlarifictorus aspersus*, E: the crop-gizzard of *Marphysa sanguinea*)

Ⅳ.토 론

오징어 brain 추출물을 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 4개의 분획으로 부분 정제하였다. 일반적으로 D.W.층은 Ach 및 catecholamine등과 같은 amine류를 많이 포함하고 있으며, RM10층에는 serotonin, dipeptide와 같은 저 분자 친수성을 나타내는 물질이, RM60과 RM 100층에는 펩타이드와 소수성 물 질들이 포함되어 있다. 오징어 식도 평활근을 사용하여 부분 정제된 4개의 분 획들에 대해 활성을 측정한 결과, D.W., RM10 및 RM60에서도 수축반응이 관 찰되었다. D.W.층의 경우는 아마도 Ach 및 catecholamine등의 물질에 의해 또 한 수축활성이 일어났다고 생각되어진다. RM10은 약한 수축반응을 나타냈지만, RM60층은 강한 수축활성을 나타내었다. 본 연구에서는 가장 큰 수축활성을 나 타낸 RM60을 이용하여 평활근 수축성물질을 정제하였다.

오징어 brain RM60층은 서로 다른 분리 특성을 갖는 이온교환, 역상 및 분 자량 column을 교차 반복적으로 사용하였으며 bioassay system으로는 오징어 의 esophagus 조직을 사용하여 수축성 펩타이드를 정제하였다. 그리고 정제한 peptide는 MALDI-TOF mass와 Edman 분해법을 사용하여 1차 서열을 밝혔 다. 정제한 peptide는 방향족 아미노산 및 (+) charge를 갖는 아미노산을 함유 한 14개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 1561.2 (M+H)⁺이다. 정제 한 peptide의 C-말단 형태를 알아보기 위해 amide 형태와 OH형태를 합성하여 coelution한 결과 정제된 peptide의 C-말단이 amide화 되어있는 형태임이 밝 혀졌다. 따라서 정제된 peptide의 안전한 1차 구조는 GFKDNVSNRIAHGF-NH₂ 이다. 정제된 peptide는 무척추동물에서 분리된 myoactive tetradecapeptide (MATP)와 유사도가 높은 것으로 밝혀졌고 두족류로부터 처음 분리된 MATPrelated peptide이다. 이 물질은 Squid brain tetradecapeptide이라는 뜻으로 편의상 SBTP라 명명하였다.

MATP는 복족류인 *Fusinus ferrugineus*와 *Achatina fulica*의 신경절로부터 *Fusinus* MATP와 *Achatina* MATP₁, *Achatina* MATP₂가 최초로 발견되었으며

- 39 -

(Otha *et al.*, 1990), 이후 환형동물인 *Eisenia foetida*와 *Pheretima vittuta*의 gut 및 whole body에서 ETP와 PTP가 정제되었다 (Ukena *et al.*, 1995). 또한 절지동물인 *Manduca sexta*와 *Locusta migratoria*에서 Allatotropin (Paemen *et al.*, 1991)과 Lom-AG-MT1 (Veenstra *et al.*, 1994)가 발견되었다. 이들 MATP 및 MATP-related peptide (MATP-RP)는 13~14개의 아미노산으로 이루 어져 있으며, 연체동물, 환형동물, 절지동물의 평활근에 강한 수축활성을 나타 낸다.

SBTP와 표1에 나타낸 MATP-related peptide와의 유사도를 비교해보면 *Fusinus* MATP (71 %) > ETP (64 %) > PTP (57 %) > Lom-AG-MT1 (57 %) > *Lymnaea* MATP (50 %) > *Achatina* MATP1 (44 %)로 오징어 유래의 SBTP는 *Fusinus ferrugineus*의 MATP와 가장 유사도가 높다. 그러나 같은 연 체동물임에도 *Lymnaea* MATP, *Achatina* MATP1와는 유사도가 낮은 것을 알 수 있다. 같은 연체동물이지만 *Fusinus ferrugineus*는 오징어와 같은 해양생물 이고, *Lymnaea stagnails와 Achatina fulica*는 민물에 서식하는 육상생물이다. 이러한 서식환경의 차이가 일차구조의 다양한 변화를 가져온 것이라 생각된다. 한편 지렁이에서 발견한 ETP, PTP와 메뚜기에서 발견한 Lom-AG-MT1은 SBTP와 57 % ~ 64 %의 유사도로 *Lymnaea* MATP와 *Achatina* MATP1보다 더 높은 유사도를 나타냈다.

MATP-RP의 일차구조서열은 모든 종의 N-말단과 C-말단에 공통적으로 보 존되어 있는 영역과 종마다 다른 아미노산으로 구성된 중간 영역으로 나누어 볼 수 있다 (Table 1). 우선 보존된 N-말단영역은 첫 번째에서 세 번째 아미노 산 잔기, Gly-Phe-(Arg/Lys)이고 C-말단의 경우는 C-말단으로부터 첫 번째와 두 번째 잔기인, (Phe/Tyr)-Gly과 amide화된 C-말단이다. 이와 같이 모든 MATP에 존재하는 보존된 영역들은 생리활성을 나타내는데 중요한 역할을 하고 있다고 생각되어진다. 이들 MATP-RP의 중간 영역은 환형동물, 연체동물, 절지 동물의 다른 종간에 있어서 구성하는 아미노산 서열이 매우 가변적이지만, 같은 종안에서는 서로 매우 높은 유사성을 지닌다. 예를 들면 같은 환형동물에서 발 견한 EEP와 PTP는 서로 2개의 아미노산 잔기만이 다르지만, 환형동물에서 발

- 40 -

견된 EEP와 연체동물에서 발견된 *Achatina* MATP₁의 경우는 총 14개의 아미노 산 중 6개의 아미노산 잔기가 다른 것을 알 수 있다. 이 사실로 미루어 보아 중간영역에 존재하는 아미노산의 다양성은 종간의 특이성에 영향을 받은 것으 로 생각된다.

MATP-RP는 연체, 환형, 절지동물로부터 발견되었지만 아직까지 구조-활성 상관관계에 대한 연구는 보고된 바 없다. MATP-RP의 구조-활성 상관관계를 자세히 알아보기 위하여 SBTP의 N-말단 및 C-말단의 아미노산을 하나씩 제거 한 유도체를 합성하였다. 합성물질들에 대한 활성측정을 위해 오징어의 esophagus를 사용하였다. 먼저, 첫 번째 잔기 Gly을 제거한 1DES-SBTP는 SBTP보다 약 30 %의 활성이 감소되었지만 여전히 현저할만한 활성은 유지되 었다. 이러한 결과로부터 Gly은 활성을 나타내는데 비교적 중요한 잔기가 아닌 것을 알 수 있다.반면에 첫 번째 잔기인 Gly과 두 번째 잔기인 Phe까지를 제거 한 2DES-SBTP의 경우는 활성이 완전히 소실되었다. 이러한 현상으로부터 첫 번째 잔기인 Gly보다는 두 번째 잔기인 Phe이 활성을 나타내는데 결정적인 역 할을 하는 아미노산이라는 것을 알 수 있다. 한편 C-말단 유도체의 경우, 놀랍 게도 C-말단에서 첫 번째 잔기인 Phe만을 제거한, 14DES-SBTP에서 활성이 완전히 소실되었다. 한편, SBTP-OH는 SBTP-NH2보다 약 60 %가 감소한 활성 을 나타냈다. 이들 결과를 종합적으로 살펴보면, SBTP의 최소 활성영역은 N-말단으로부터 두 번째 잔기인 Phe과 열네번째 잔기인, Phe까지이다. 또한 C-말단의 amide화 역시 SBTP가 오징어 식도에 대한 수축활성을 나타내는데 있 어서 매우 중요한 역할을 하고 있는 것 같다고 생각된다.

Achatina MATP₁, Achatina MATP₂ 및 Fusinus MATP는 Achatina fulica의 penial retractor muscle과 radular retractor muscle에서 각각 수축활성을 나타 냈다(Ohta *et al.*, 1990). ETP와 PTP의 경우는 지렁이 (*Pheretima vittuta*)의 crop-gizzard와 펄조개 (*Anodonta woodiana*)의 rectum, 귀뚜라미 (*Gryllus bimaculatus*)의 crop에서 각각 수축활성을 나타냈다 (Ukena *et al.*, 1995). Allatotropin은 juvenile hormone의 분비를 촉진시키는 활성을 나타냈으며, Lom-AG-MT₁은 메뚜기 (*Locusta migratoria*)와 바퀴벌레 (*Leucophaea*

- 41 -

maderae)의 수정관과 hindgut에 대해 수축활성을 나타냈다 (Veenstra *et al.,* 1994, Paemen *et al.*, 1991).

SBTP는 오징어 (*Todarodes pacificus*)의 esopahgus에서 10⁻⁹ M의 최저농 도반응을 나타냈다. 낙지 (Callistoctopus minor)의 esopahgus에서 SBTP는 5 x 10⁻⁹ M에서 최저반응농도를 보였다. 낙지의 경우 최저반응농도가 오징어와 비슷하게 나왔는데 이것은 낙지가 오징어와 같은 두족류이기 때문이라 생각된 다. 아직까지 낙지로부터는 MATP-RP가 발견되지 않았지만, 이러한 결과로 미 루어 보아 낙지의 생체 내에도 MATP가 존재하여 생리활성 발현에 기여하고 있 을 것 이라 생각되어진다. SBTP는 오징어의 조직 이외에도 다양한 종의 평활 근에 대해 수축활성을 나타냈다. SBTP는 바다고둥 (Neptunea cumingii)의 식 도에서 5 x 10⁻⁹ M의 역치값을 나타냈으며, 달팽이 (*Achatina fulica*)의 crop에 서는 10⁻⁸ M에서 역치값을 나타냈다. 또한 지렁이 (Marphysa sanguinea)의 crop-gizzard에서는 10⁻⁷ M에서 역치값을 나타냈으며, 귀뚜라미의 crop에서는 5 x 10⁻⁸ M의 역치값을 나타냈다. 흥미롭게도 바다고둥 (*Neptunea cumingii*)의 식도와 낙지의 식도에 대해 SBTP의 역치값이 유사하다. Table 1에 나타낸 일 차서열의 유사도에 의하면 해양에서 서식하는 고둥의 한 종인 Fusinus ferrugineus에서 발견된 MATP-RP와 SBTP의 일차서열이 가장 유사하기 때문 에 다른 무척추동물의 조직보다 실험에 사용한 바다고둥 (Neptunea cumingii) 의 esophagus에 대해 특히 더욱 민감하게 반응한 것으로 생각된다. 한편, Achatina MATP1는 Achatina fulica의 penial retractor muscle에서 10⁻⁹ M의 역치값을 나타냈고 Fusinus MATP는 Fusinus ferrugineus의 radular retractor muscle에서 10⁻¹⁰ M 의 역치값을 나타냈다 (Ohta *et al.*, 1990). 또한 ETP는 귀뚜라미 (*Gryllus bimaculatus*)의 crop에 대해서 10⁻⁸ M의 역치값을 나 타내었다 (Ukena et al., 1995). 본 연구에서도 SBTP는 이전에 발견된 MATP-RP와 유사하게 달팽이 (Achatina fulica)와 다른 종류의 귀뚜라미 (Verlarifictorus aspersus)의 crop에 대해 각각 10⁻⁸ M과 5 x 10⁻⁸ M에서 수축 반응을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어보아 이들 동물들 조직에 존재하는 receptor와 SBTP가 반응하여 생리활성을 나타내는 것 같다. 또한 SBTP는 낙지

- 42 -

나 바다 고둥의 조직에 대한 활성보다는 달팽이와 귀뚜라미에 대해 다소 반응 의 세기가 낮지만 비교적 높은 역치 값을 나타내었다. 그러나 SBTP는 다른 조 직들과는 달리 지렁이의 crop-gizzard에 대해 수축반응을 나타내기 위해서 10⁻⁷ M에서 역치값을 나타냈다. 한편, ETP는 *E. foetida*와 *P. vittuta*의 crop-gizzard에서 10⁻⁹ M의 역치값을 나타내었다 (Ukena *et al.,* 1995). *E. foetida*와 *P. vittuta*는 육지에 서식하는 지렁이이지만, *Verlarifictorus aspersus* 는 갯벌과 같은 바다육지에 서식하는 지렁이이다. 아마도 이러한 활성의 차이는 이전 실험과 본 연구에서 사용한 조직이 다르기 때문에, 다시 말해서, MATP-RP에 대해 반응하는 receptor가 조직 내에 다르게 분포하고 있기 때문 이라 생각된다.

반면에 불가사리 (Asterina pectinifera)의 dorsal retractor muscle(DRM)과 Cardiac stomach(CS) 에서는 SBTP 10⁻⁶ M에서도 아무런 반응도 나타나지 않 았다. 다른 조직들과는 달리 본 연구에 사용된 불가사리 조직에는 SBTP와 반 응하는 수용체가 존재하지 않는 것 같다. 이러한 결과와 연계해서 불가사리에서 활성이 나타나지 않은 이유는 계통발생학적 요인이 작용한 것 같다. 계통발생학 적 관점으로 보았을 때 불가사리는 후구동물인데 반해 나머지 동물들은 전구동 물로 불가사리의 종간의 위치가 다른 절지동물이나 환형동물보다 멀기 때문이 다. 그러므로 불가사리의 DRM과 CS에는 SBTP와 반응하는 수용체가 존재하지 않을 수도 있을 것이라 여겨진다.

또한 무척추동물이 아닌 포유류인 Rat의 장관 및 혈관에 대한 활성을 조사한 결과 duodenum의 평활근에 대해 영향을 나타내지 않았다. 그러나, aorta에 있 어서는 약한 이완활성을 보였으며, 이러한 결과로 미루어 보아 SBTP가 혈압을 조절하는 활성을 가질지 모름을 제시한다.

지금까지의 결과를 모두 종합해보면 오징어 뇌로부터 발견된 SBTP는 두족류에 서는 처음 발견된 MATP-related peptide이고 오징어의 식도 뿐 만 아니라 다 른 다양한 무척추동물의 평활근에 대해 수축활성을 나타내었다. 오징어 조직 뿐 만 아니라 다른 무척추동물에서도 SBTP가 활성을 나타나는 이유는 MATP의 N-말단 및 C-말단에 보존적 아미노산 잔기 영역을 가지기 때문이라 생각된다.

- 43 -

반면에 활성은 나타나지만 조직에 종류에 따라 활성의 세기가 다른 것은 MATP-RP 일차서열의 가변적인 중간영역 때문이라 추측된다. 가변적 영역은 종의 진화에 따라 다른 아미노산으로 발현되었고 그 결과 종마다 평활근에 작 용하는 수용체에 다르게 작용한 것이라고 여겨진다. 현재는 SBTP가 단백질로 부터 어떻게 발현되는지를 알아보기 위한 cDNA work을 진행하고 있는 중이다.



Ⅵ. 참 고 문 헌

- Bardou I., Maubert E., Leprince J., Chichery R., Cocquerelle C., Launay S., Vivien D., Vaudry H. and Agin V. (2009), Distribution of oxytocin-like and vasopressin-like immunoreactivities within the central nervous system of the cuttlefish, *Sepia officinalis, Cell Tissue Res.*, 336, pp. 249-266
- 2. Brown R.E. (1994), An introduction to neuroendocrinology. *Cambridge University Press, London, U.K.*
- Cottrell G.A., Lin J.W., Llinas R., Price D.A., Sugimori M. and Stanley EF. (1992), FMRFamide-related peptides potentiate transmission at the squid giant synapse, *Exp. Physiol.*, 77, pp. 881-889
- 4. Elpihick M.R. and Melarange R. (2001), Neural control of muscle relaxation in echinoderms, *J. Exp. Biol.*, 204, pp. 875-885
- 5. Elpihick M.R., Newman S.J. and Thorndyke M.C. (1995), Distribution and action of SAMLFamide neuropeptides in the starfish *Asterina rubens, J. Exp. Biol.*, 198, pp. 2519-2525
- Elphick M.R., Reeve J.R., Burke R.D. and Thorndyke M.C. (1991), Isolation of the neuropeptide SALMFamide-1 from starfish using a new antiserum, *Peptides*, 12, pp. 455-459
- Holmgren S. and Jensen J. (2001), Evolution of the nervous system: Evolution of vertebrate neuropeptides, *Brain Res. Bull.*, 55(6), pp. 723-735
- Iwakoshi E., Hisada M. and Minakata H. (2000), Cardioactive peptides isolated from the brain of a Japanese octopus, *Octopus minor*, *Peptides*, 21, pp. 623–630

- Kanda A. and Minakata H. (2006), Isolation and characterization of a novel small cardioactive peptide-related peptide from the brain of Octopus vulgaris, Peptides, 27, pp. 1755-1761
- Kanda A., Iwakoshi-Ukena E., Takuwa-Kuroda K. and Minakata H. (2003), Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*, *Peptides*, 24(1), pp. 35-43
- Leung M. and Stefano G.B. (1984). Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edylis* (Mollisca), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, pp. 955–958
- Lloyd P.E., Mahon A C., Kupfermann I., Cohen J.L., Scheller R.H. and Weiss K.R. (1985), Biochemical and immunocytological localization of molluscan small cardioactive peptides in the nervous system of *Aplysia californica, J. Neurosci.*, 5, pp. 1851–1861
- Melarange R. and Elpihick M.R. (2003), Comparative analysis of nitric oxide and SALMFamide neuropeptides as general muscle relaxants in starfish, J. Exp. Biol., 206, pp. 893-899
- Melarange R., Potton D.J., Thorndyke M.C. and Elphick MR.(1999), SALMFamide neuropeptides cause relaxation and eversion of the cardiac stomach in starfish, *Proc. R. Soc. B*, 266, pp. 1785–1789
- 15. Merrifield R.B. (1964), Solid-phase peptide synthesis. 3. An improved synthesis of bradykinin, *Biochemistry*, 14, 1385-1390.
- Morishita F., Minakata H., Takeshige K., Furukawa Y., Takata T., Matsushima O., Mukai S.T., Saleuddin A.S.M. and Horiguchi T. (2006), Novel excitatory neuropeptides isolated from a prosobranch gastropod, *Thais clavigera*: The molluscan counterpart of the annelidan GGNG peptides, *Peptides*, 27(3), pp. 483-492

- Morris H.R., Panico M., Karplus A., Lloyd P.E. and Riniker B. (1982), Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia, Nature*, 300, pp. 643-645
- Ohta N., Kanda T., Kubota I., Muneoka Y. and Kobayashi M. (1990), Three novel tetradecapeptides isolated from the ganglia of the molluscs, of Achatina fulica and Fusinus ferruginus, In: Yanaihara, N., ed. Peptide chemistry 1989. Osaka: Protein Research Fonudation, pp. 57-62
- Paemen L., Tips A., Schoofs L., Van Damme J. and De Loof A. (1991), Lom-AG-Myotropin: A novel myotropic peptide from the male accessory glands of *Locusta migratoria*, *Peptides*, 12, pp. 7-10
- 21. Price D.A. and Greenberg M.J. (1977), Structure of a molluscan cardioexcitory neuropeptide, *Science*, 197, pp. 670-671
- Price D.A., Lesser W., Lee T.D., Doble K.E. and Greenberg M.J. (1990), Seven FMRFamide-related and two SCP-related cardioactive peptides from Helix, *J. Exp. Biol.*, 154, pp. 421-437
- Reich G. (1992), A new peptide of the oxytocin/vasopressin family isolated from nerves of the cephalopod Octopus vulgaris, Neuroscience Letters, 134(6), pp. 191–194
- Sanders GD. (1975), The cephalopods. In: Corning WC, Dyal JA, Williams AOD (eds) Invertebrate learning, Vol 3. Plenum, New York, pp. 1–101
- 25. Sanchez M.E., Nuno C.M., Buchanan J. and Augustine G.J.(1990), Contractions of the squid stellate ganglion, *J. Exp. Biol.*, 152, pp. 369-387
- 26. Shuttleworth C.W.R. and Keef K.D. (1995), Role of peptides in enteric

neuromuscular transnission, Regul. Pept., 54, pp. 101-120

- Smart D., Shaw C., Johnston C., Thim L., Halton D. and Buchanan K. (1992), Peptide tyrosine phenylalanine: a novel neuropeptide F-related nonapeptide from the brain of the squid, *Loligo vulgaris, Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, pp. 1616–1623
- Solcia E., Usellini L., Buffa R., Rindi G., Villani L., Aguzzi A. and Silini E. (1989), Endocrine cell producing regulatory peptides, *In. Polak, J. M., ed. Regulatory peptides. (1989) Experientia supplementum., vol. 56, Basel/Boston/Berlin: Birkhäuser Verlag*, pp. 220–246
- 29. Veenstra J.A., Lehman H.K and Davis N.T. (1994), Allatotropin is cardio-acceleratory peptide in *Manduca sexta*, *J. Exp. Biol.*, 188, pp. 347-354
- Ukena K., Oumi I., Matsuhima O., Ikeda T., Fujita T., Minakata H. and Nomoto K. (1995), A Novel Gut Tetradecapeptide Isolated Earthworm, *Eisenia foetida, Peptides*, 16, pp. 995–999
- 31. Zadina J.E., Banks W.A. and Kastin A.J. (1986), Central nervous system effects of peptides, *1980–1985: A cross-listing of peptides and their central actions from the first six years of the journal peptides*, *Peptides*, *7*, pp. 497–537

CH OL M

감사의 글

많이 부족한 저에게 학문의 길을 열어주시고 끊임없는 관심과 사랑으로 올 바르게 이끌어주신 지도 교수님이신 박 남규 교수님께 진심으로 머리 숙여 감 사드립니다. 교수님의 가르치심 깊이 새기도록 하겠습니다.

또한 생물공학과 홍 용기 교수님, 이 형호 교수님, 공 인수 교수님, 김 중균 교수님, 김 성구 교수님 그리고 정 귀택 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

학부생 때부터 멋모르고 실험실 생활을 시작해서 실수도 많이 하고 울고 했던 날들이 엊그제 같습니다. 학부시절부터 지금까지도 잘까먹고 허둥대는 저에게 실험을 가르쳐주시느라 고생하시고, 속이 많이 상하셨을 고 혜진 박사님께 정 말 감사드립니다. 많이 혼나고 힘들기도 했었지만 지금 생각해보면 무척 소중 한 경험이고 시간들입니다. 언니께는 실험 뿐 만이 아닌 더 큰 것들을 많이 배웠습니다. 정말 감사드립니다. 항상 열정적인 모습으로 실험하시고 진정한 탐 구의 자세를 알려주신 서 정길 박사님. 늘 선배님의 예전 생활들을 말씀해주시 면서 크고 넓은 생각을 가져라 말씀해 주셨습니다. 힘이 들 때 선배님의 진심 어린 격려가 정말 큰 도움이 되었습니다. 언제나 곁에서 저의 부족한 점을 메 워 주고 힘이 되어준 너무 사랑하는 혜림이이와 경은이에게도 감사의 말을 전 합니다. 함께 해서 석사생활 잘 마무리 할 수 있었습니다. 남은 석사생활 잘하 고 좋은 결과 많이 있었으면 좋겠습니다. 항상 다정한 용훈이에게도 감사의 말 을 전합니다. 무엇이든지 열심히 해서 좋은 결과 얻길 바랍니다.

그리고 지금은 졸업하신 보고 싶은 희영이 언니와 조교로 계시면서 이것저것 많은 도움을 주신 상현이 언니께도 감사의 말씀전합니다. 또한 어려운 일이 있으면 기꺼이 도와주신 상냥한 생화학 실험실의 지영이 언 니, 똑 부러지는 나영이언니, 실험실 생활에 있어 좋은 조언을 많이 해주신 김 무상 박사님께도 감사드립니다.

그리고 석사생활 동안 많은 실험재료를 구입했던 남천해변시장 광덕상회 이모 님과 광안리 초원횟집의 언제나 유쾌한 사장님께도 감사의 말씀을 드립니다. 많은 도움을 주셔서 실험들을 무사히 마칠 수 있었습니다.

늘 의지가 되고 무슨 이야기든 할 수 있는 든든한 내 수호천사 지숙이, 먼저 석사졸업 후 사회생활을 하고 있어 바쁠 텐데, 언니들 석사생활 힘들다고 맥주 랑 통닭을 사주고 가는 멋진 동생 선영이, 겉으로 보이는 까칠함 속에 누구보

- 49 -

다도 따뜻한 맘을 가지고 있는, 멀리 있어 항상 보고 싶은 혜경이에게도 감사 드립니다. 또한 처음 실험실 생활을 함께했던 항상 닮고 싶은 친구 지영이와 늘 똑소리나는 얼굴만 애기인 민희, 지금은 원하는 길을 가고 있어 행복할 포 근하던 민정이, 그리고 함께 졸업하는 야무진 미란이에게도 감사의 말씀 전합 니다.

그리고 사과같이 상큼한 아람이, 듬직한 석주선배, 승준선배, 항상 열심히 하는 은영, 유리, 무던하고 한결같은 병근, 오며가며 즐겁게 해주던 은정, 지은 모두 좋은 결과 얻으시길 바랍니다.

아직까지 학교 다니냐며 구박하던 1학년 때부터 쭉 좋은 친구인 정환이, 늘 짖 궂게 놀리지만 속이 깊은 상대, 항상 그립고 또 미안한 리나, 민이, 민혜에게도 감사드립니다.

지금은 호주에서 열심히 공부하고 일하느라 바쁜 너무나도 그립고 보고 싶은 빵곰에게도 감사의 인사드립니다. 실험실생활에서 많은 힘이 되었습니다. 또한 저의 진로와 생활에 대해 늘 신경써주시고 걱정해주시는 큰어머니, 큰아 버지, 고모, 고모부께도 감사의 말씀 드립니다. 항상 감사합니다. 마지막으로 집에 가면 늘 짜증만 부리지만 언니처럼 너그럽게 다 받아주고 또 위로해주는, 언제나 고맙고 사랑하는 하나뿐인 내 동생 성희와 어려운 형편에 서도 못난 맏딸 뒷바라지 하시느라 늘 고생이신 사랑하는 아버지, 지금껏 키워 주시느라 고생하신 사랑하는 어머니께 깊이 감사를 드리며 이 논문을 드립니 다.