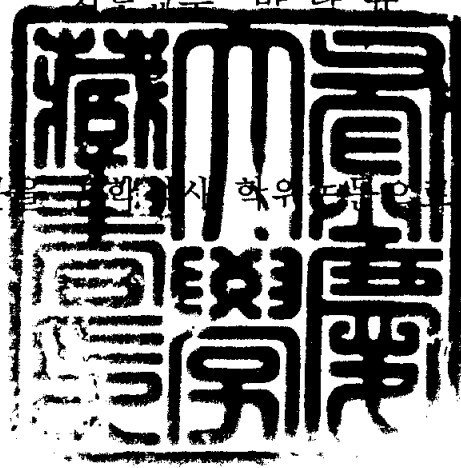


공학석사 학위논문

메기 (*Silurus asotus*) 장관으로부터  
생리활성 펩타이드의 탐색 및 정제

지도교수 반 나 규

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

문 호 성

# 문호성의 공학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 일

주 심 이학박사 홍 용 기



위 원 이학박사 문 병 기



위 원 이학박사 박 남 규



# 목 차

## Abstract

### I. 서론

### II. 재료 및 방법

1. preparation
2. 생리활성물질의 정제
3. Bioassay
  - 3.1 Rat (*Sprague-Dawley*) duodenum에 대한 수축활성
  - 3.2 향어 (*Cyprinus carpio*)의 intestine에 대한 수축활성
  - 3.3 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*)의 intestine에 대한 수축활성
  - 3.4 금붕어 (*Carassius auratus*)의 intestine에 대한 수축활성

### III. 결과 및 토론

1. 메기 intestine 추출물의 생리활성검색
  - 1.1 Rat (*Sprague-Dawley*)의 duodenum에 대한 수축 활성
  - 1.2 향어 (*Cyprinus carpio*)의 intestine에 대한 수축 활성
  - 1.3 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*)의 intestine에 대한 수축 활성
  - 1.4 금붕어 (*Carassius auratus*)의 intestine에 대한 수축 활성
2. 메기 intestine으로부터 neuropeptide의 정제

### IV. 요약

### V. 감사의 말씀

### VI. 참고문헌

# Screening and purification of bioactive peptide from catfish, *Silurus osotus*

Ho Sung Moon

Department of Biotechnology and Bioengineering  
Graduate School  
Pukyong National University

## Abstract

A search for contractile activity in the intestine of catfish, *Silurus osotus* was conducted. The acetic acid extracts of the catfish intestine was forced through Sep-Pak C18 cartridge. The retained materials were eluted with distilled water (DW), 10% methanol (RM10), 60% methanol (RM60) and 100% methanol (RM100). To measure the contractile activity of the extracts, the duodenum of rat and the intestine of fishes were used. In all species tested, RM60 and DW had stronger contractile activities than RM10 and RM100. Comparing the result of the contractile activity of RM60 on smooth muscle of all species used, the rank order of effectiveness was goldfish > carp > tilapia > rat.

Therefore, these results suggest that catfish extracts react more strongly in goldfish intestine than other intestines and are potential source for the discovery of novel neuropeptides. Because RM60 have shown relatively potent contractile activity in all species tested, further work on purification of the contractile peptide from RM60 is now in progress using C18 and ion-exchange high performance liquid chromatography.

Key words : contractile activity, HPLC

## I. 서론

오래 전부터 천연자원으로부터 유래된 여러 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 특히 생체 내 존재하는 생리활성물질중 펩타이드성 물질은 그 정도가 미량으로 분포하고 있으나 합성에 의한 대량생산이 가능하다. 또한 이들은 고분자의 단백질보다 합성이 용이하고 생체기능개선등 그 응용면이 광범위하며, 합성물을 이용한 구조와 활성간의 관계 및 그들의 작용메커니즘을 규명함으로써 신물질 개발 가능성의 여지가 무궁무진하다고 할 수 있다 (1, 2). 이와 같은 이유로 최근 이러한 생체조절기능에 대한 관심이 증대됨에 따라 생체내에 존재하는 생리활성 펩타이드에 관한 연구가 활발히 진행되어오고 있다.

현재까지의 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 육상에 존재하는 생물종 특히 포유류에서 그 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 그 구조와 특성이 밝혀졌다 (3-7).

최근들어 육상과는 다른 특이한 생태계의 구성과 그의 생물종들의 다양성으로 인해 해양생물의 성분과 기능성물질에 대한 관심이 증대되고 있으며, 또한 이러한 해양 생물체로부터 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되어(8-14) 그 구조 및 특성에 대해 보고되었다.

어류 유래의 neuropeptide는 연골어류인 dogfish (*Scyliorhinus canicula*) intestine으로부터 Scyliorhinin I 과 Scyliorhinin II가 처음으로 정제되었다 (8). Scyliorhinin I 은 leptodactylid frog (*Physalaemus fuscomaculatus*)의 피부로부터 정제된 Physalaemin과 유사한 일차구조를 지니며 (6), Scyliorhinin II 는 rhacophorid frog (*Hylambates macularus*)의 피부로부터 정제된 [Glu2, Pro5]-kassinin과 유사한 일차구조를 가졌다 (6). 이후

cod 와 trout의 brain으로부터 포유류로부터 유래된 Substance P 와 Neurokinin A와 상동성이 높은 신경성 펩타이드가 정제되었다 (9,15). 그리고 FMRFamide, FLRLamide, GDPFLRFamide와 SDPFLRFamide를 포함한 RFamide계통의 펩타이드들이 대합조개 및 말미잘로부터 분리 정제되었으며(10-12) 이러한 펩타이드들이 신경세포의 활성을 조절한다고 보고되어진바 있다(13,14).

또한 경골어류인 일본 붕어의 brain으로부터 C-말단에 RFamide를 가지는 C-RFamide를 분리 하였으며 이는 어류, 병아리, 메추리, rat의 내장 근육에 대해 자극 효과를 가진다고 보고되었다(16).

따라서 본 연구에서는 열악한 조건의 서식환경을 가지며, 한국의 전통적 보양식품으로 알려진 한국산 메기의 추출물을 이용하여 여러 가지 평활근에 대한 활성 유무를 조사하고, 이들을 토대로 새로운 neuropeptide를 정제하고자 한다.

**Table 1. The classification of neuropeptides**

|                                          |                                  |
|------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Hypothalamic releasing peptides</b>   | <b>Gastrointestinal peptides</b> |
| Thyrotropin releasing hormone            | Vasoactive intestinal peptides   |
| Gonadotropin releasing hormone           | Cholecystokinin                  |
| Somatostatin                             | Gastrin                          |
| Corticotropin releasing hormone          | Substance P                      |
| Growth hormone                           | Neurokinin A                     |
|                                          | Neuropeptides K                  |
| <b>Neurohypophyseal peptides</b>         | Insulin                          |
| Vasopressin                              | Glucagon                         |
| Oxytocin                                 | Secretin                         |
|                                          | Motilin                          |
| <b>Adenohypophyseal peptides</b>         | Pancreatic polypeptides          |
| Adrenocorticotrophic hormone             | Galanin                          |
| $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone |                                  |
| Prolactin                                | <b>Growth factors</b>            |
| Luteinizing hormone                      | Nerve growth factor              |
| Growth hormone                           | Epidermal growth factor          |
| Thyrotropin                              | Fibroblast growth factor         |
|                                          | Endothelial growth factor        |
| <b>Opioid peptides</b>                   |                                  |
| $\beta$ -Endorphin                       | <b>Others</b>                    |
| Enkephalin                               | Angiotensin II                   |
| Dynorphin                                | Bombesin                         |
| Neo-endorphin                            | Bretykinin                       |
|                                          | Calcitonin                       |
|                                          | Carnosine                        |
|                                          | Delta sleep-inducing peptide     |
|                                          | Neuropeptide Y                   |
|                                          | Neurotensin                      |
|                                          | Thymosin                         |
|                                          | Atrial natriuretic factor        |

**Table 2. Categories of bioactive peptide derived from fish**

| Sequence                      |                                                    |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| Somatostatin                  |                                                    |
| Goldfish                      | SVESSNHLPARERKAGCKNFWKGFSTC                        |
| Catfish                       | DNTVTSKPLNCMIVYFWKSRTAC                            |
| Vasoactive intestinal peptide |                                                    |
| Goldfish                      | HSDAVFTDNYSRIRKQMAVKKYINSLLA-NH <sub>2</sub>       |
| Dogfish                       | HSDAVFTDNYSRYRKQMAAKKYLNSNLA-NH <sub>2</sub>       |
| RF-amide                      |                                                    |
| Crucian carp                  | SPEIDPFWTVGRCTVRPIGRF-NH <sub>2</sub>              |
| Neuropeptide Y                |                                                    |
| Tuna                          | PPKPENPGEDAPPEELAKYYTALRHYNLITRQRY-NH <sub>2</sub> |
| Substance P                   |                                                    |
| Cod                           | KPRPQQFFGLM                                        |
| Trout                         | KPRPHQFFGLM                                        |
| Neurokinin A                  |                                                    |
| Cod                           | HKINSFVGLM                                         |
| Trout                         | HKINSFVGLM                                         |



## II. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 60마리의 메기 (*Silurus asotus*)는 민락동 해변시장에서 구입하였다. 실험에 사용할 intestine은 적출한 즉시 액체질소로 동시킨 후 실험시작 직전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

### 1. Preparation

#### 1. 메기 intestine로부터 crude sample 의 추출

60마리분의 메기 intestine을 액체질소를 첨가하며 잘게 부순 뒤 물 1ℓ를 첨가하여 약  $80^{\circ}\text{C}$  정도에서 10분간 끓였다. 냉각시킨 뒤 5% acetic acid solution 이 되도록 acetic acid를 첨가하여 조직을 파쇄한 후 원심분리 ( $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 행하였다. 원심분리 후 상층액을 모아서 rotary evaporator를 이용하여 농축하였다 (첫번째 초산추출물). pellet은 따로 모아서 5% acetic acid solution을 다시 첨가하여 homogenizer (Polytron kinematicia. AG)로 homogenization 한 후 원심분리 ( $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 행한 뒤 상층액만 받아서 농축하였다 (두번째 초산추출물). 나머지 pellet을 같은 방법으로 세 번째 초산추출물을 얻었다.

#### 1.1 첫 번째 초산 추출물

첫 번째 초산추출물 300ml을 원심분리 ( $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 행한 뒤 100ml까지 농축하여 sample : ethanol = 1 : 3의 비율

로 ethanol을 첨가하여 하룻동안  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다. 보관된 sample은 다시 원심분리( $12,000 \times g$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ , 45min)를 하고 25ml까지 농축한 후 ethanol (125ml), NaCl (250mg)을 첨가한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 시켰다.

보관된 sample은 다시 원심분리 ( $18,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 행하고 15ml까지 농축한 후 sample : D.W(0.1%TFA) = 1 : 1의 비율로 첨가하였고 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-pak C18 cartridge에 주입하였다. 우선 Sep-pak C18 cartridge를 100% methanol로 활성화 시킨 후  $\text{H}_2\text{O}$ 로 충분히 세정하였다. 충분히 평형화가 된 다음 시료를 주입하여 0% methanol (DW), 10% methanol (RM10), 60% methanol (RM60) 및 100% methanol (RM100)로 물질들을 용출시켜 동결건조 하였다.

## 1.2 두 번째 초산추출물

두 번째 초산 추출물 800ml을 원심분리 ( $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 행한뒤 100ml까지 농축시켜 sample : ethanol = 1 : 2의 비율로 ethanol을 첨가한 뒤 다시 원심분리 ( $20,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 하고 30ml까지 농축하였다. 농축된 sample은 sample : D.W(0.1%TFA) = 1 : 1의 비율로 D.W.를 첨가하고 첫 번째 추출물과 같이 Sep-pak C18 cartridge에 주입하였다.

## 1.3 세 번째 초산 추출물

세 번째 초산 추출물 800ml을 원심분리 ( $8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)를 행한뒤 100ml까지 농축시켜 sample : ethanol = 1 : 2의 비율로 ethanol을 첨가한 뒤 다시 원심분리 ( $12,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 60min)

를 하고 75ml까지 농축하였다. 농축된 sample은 ethanol 175ml, NaCl 750mg을 첨가한 후 -20℃에서 overnight시켰다. overnight 시킨 sample은 다시 원심분리 (20,000 × g, 4℃, 60min)를 하고 상층액을 25ml까지 농축시킨후 sample : D.W.(0.1%TFA) = 1 : 1의 비율로 D.W.를 첨가하고 첫 번째 추출물과 같이 Sep-pak C18 cartridge에 주입하였다.

## 2. 생리활성물질의 정제

Sep-pak C18 cartridge elution 단계에서 얻어진 메기 intestine 추출물은 역상 HPLC로 정제를 하였다. 메기 intestine의 RM 60은  $\mu$ Bondapak C18 column (3.9×300mm, Waters)을 이용하여 정제를 하였다. 이동상으로는 A용매는 0.1%TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O(pH 2.2)를 B용매로는 0.1%TFA를 포함하는 CH<sub>3</sub>CN(pH2.2)을 이용하였으며 0→60%(B용매)까지 유속 1ml/min의 조건으로 흡광도 220nm에서 120분간 분리를 행하였다.

역상 HPLC활성을 나타낸 분획은 cation-exchange HPLC (TSKgel SP-5PW, Tosho) column에 적용하여 분리하였다. A용매로는 10mM phosphate 완충액(pH 7.2)과 B용매로 10mM phosphate 완충액(pH7.2)을 포함하는 1.0M NaCl 용액을 사용하여 0 → 1.0M의 B용매 liner gradient로 걸어서 유속은 0.5ml/min, 흡광도 220nm에서 100분간 분리하였다.

### 3. Bioassay

#### 3.1 Rat (*Sprague-Dawley*) duodenum에 대한 수축활성

230 - 250 g 의 rat (male, *Sprague-Dawley*)을 decapitation한 후 복부를 절개하여 위장 아래의 유문부로부터 연결된 duodenum을 약 5 cm 길이로 잘라낸다. 적출한 십이지장의 결체조직을 제거한 후 면실로 5 - 10 mm 정도의 길이로 양끝을 묶은 후 아래쪽 말단은 37°C로 일정하게 유지시킨 organ bath의 지지대에 고정시켰고 다른 한쪽 끝은 isomeric transducer에 연결하였다. 연결된 장관에 2 g의 tension을 준 뒤, 15분 간격으로 buffer를 갈아주면서 평형화시켜 baseline을 구한 뒤 수축제로 알려진  $5 \times 10^{-5}$ M의 cabachol을 이용하여 활성화시킨 후 buffer로 완전히 세척하여 충분히 안정화한 후 추출물의 수축활성을 측정하였다. 실험에 사용한 Buffer의 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 118.7, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  24.8, glucose 10.1. Buffer는 95%의  $\text{O}_2$ 와 5%의  $\text{CO}_2$ 로 30분간 포화시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 3.2 향어 (*Cyprinus carpio*)의 intestine에 대한 수축활성

400 - 800 g 향어의 중추신경을 절단하여 복부를 절개한 후 식도에서 1 cm 떨어진 부위의 intestine을 4-5 cm 정도의 크기로 적출하였다. 절취 장관은 모세혈관 및 adipose tissue등을 제거하고 면실로 약 1.5 cm 크기로 양끝을 묶은 후 organ bath에 고정시켰다. 사용한 Buffer의 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 100.8, KCl 2.5,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.1,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25, glucose 11.1. 이 Buffer는 95%의  $\text{O}_2$ 와 5%의  $\text{CO}_2$ 로 30분간 포

화시킨후 실험에 사용하였다.

### 3.3 티라피아 (*Sarotherodon niloticus*)의 intestine에 대한 수축활성

400 - 800 g 티라피아의 중추신경을 절단하여 복부를 절개한 후 식도에서 1 cm떨어진 부위의 intestine을 4 - 5 cm 정도의 크기로 적출하였다. 절취 장관은 모세혈관 및 adipose tissue등을 제거하고 면실로 약 1.5 cm 크기로 양끝을 묶은 후 organ bath에 고정시켰다 사용한 Buffer의 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 100.8, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 11.1. 이 Buffer는 95%의 O<sub>2</sub>와 5%의 CO<sub>2</sub>로 30분간 포화시킨후 실험에 사용하였다.

### 3.4 금붕어 (*Carassius auratus*)의 intestine에 대한 수축활성

체장 15 - 20 cm 크기의 금붕어의 중추신경을 절단하여 복부를 절개한 후 식도에서 1 cm떨어진 부위의 intestine을 4 - 5 cm 정도의 크기로 적출하였다. 절취 장관은 모세혈관 및 adipose tissue등을 제거하고 면실로 약 1.5 cm 크기로 양끝을 묶은 후 organ bath에 고정시켰다 사용한 Buffer의 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 100.8, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 11.1. 이 Buffer는 95%의 O<sub>2</sub>와 5%의 CO<sub>2</sub>로 30분간 포화시킨후 실험에 사용하였다

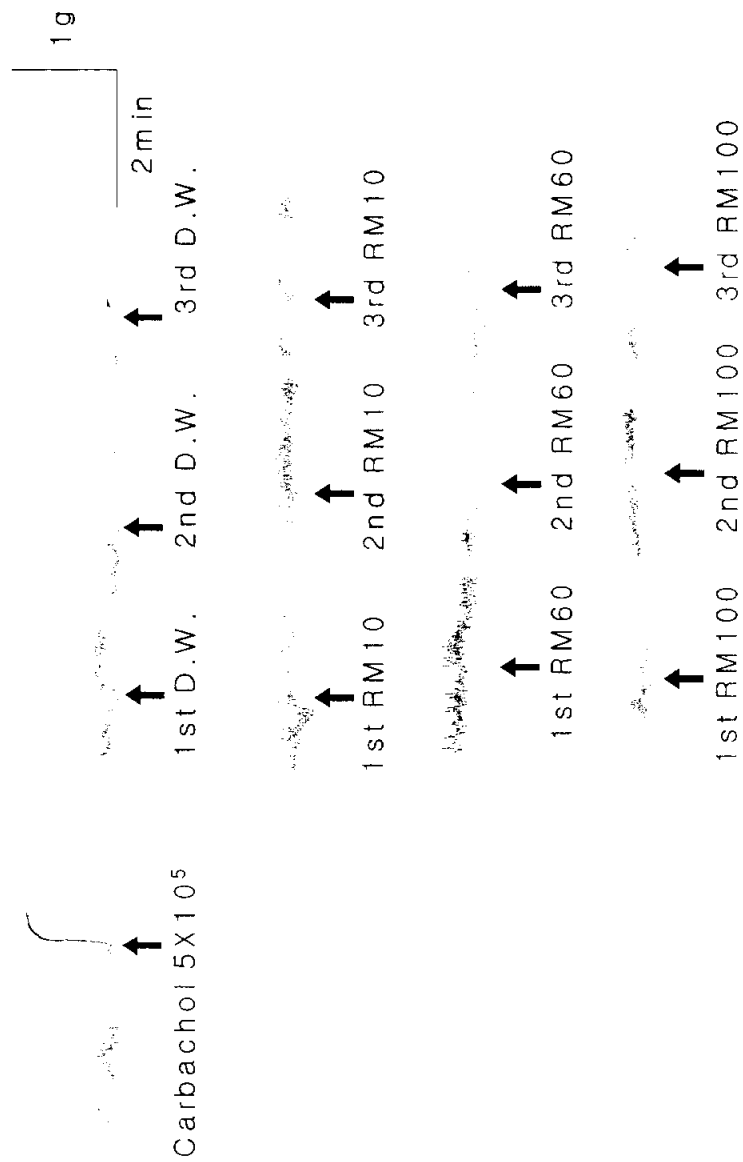


Fig.1 The contractile response of the rat duodenum

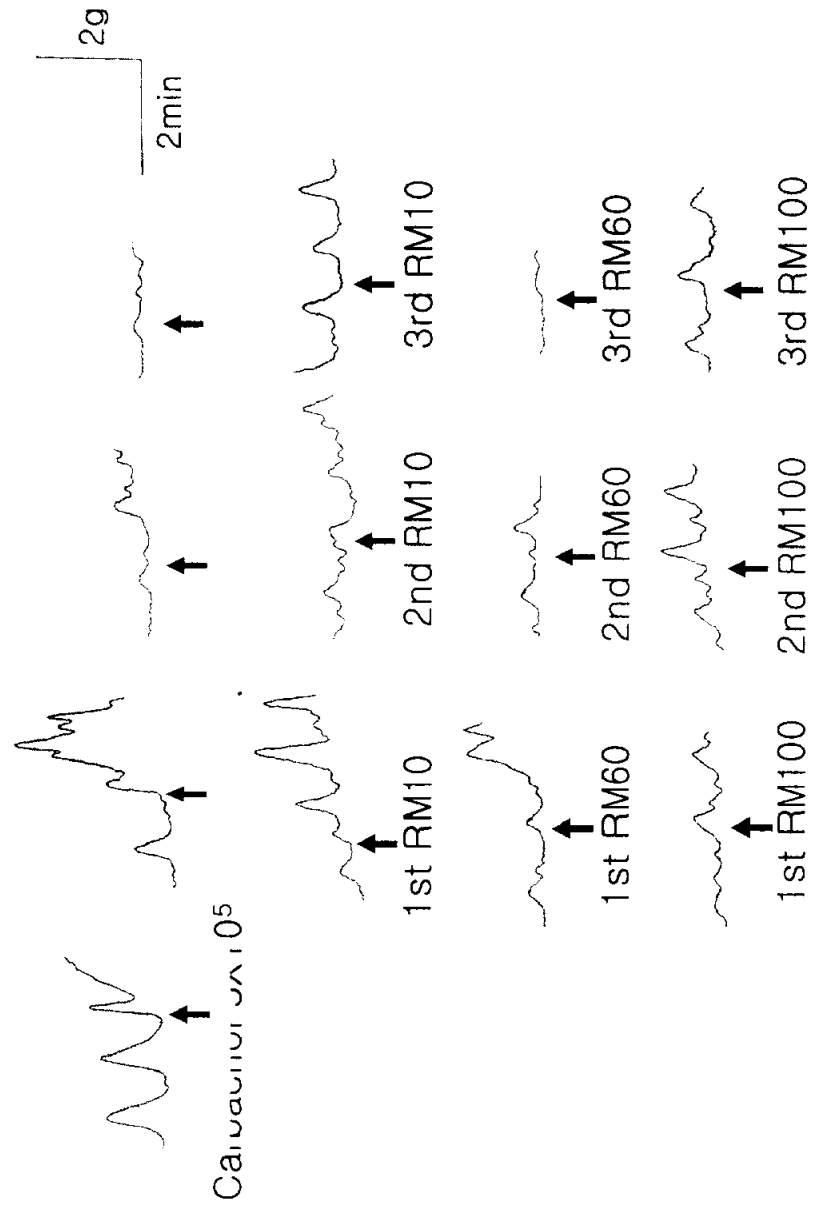


Fig.2 The contractile response of the carp intestine

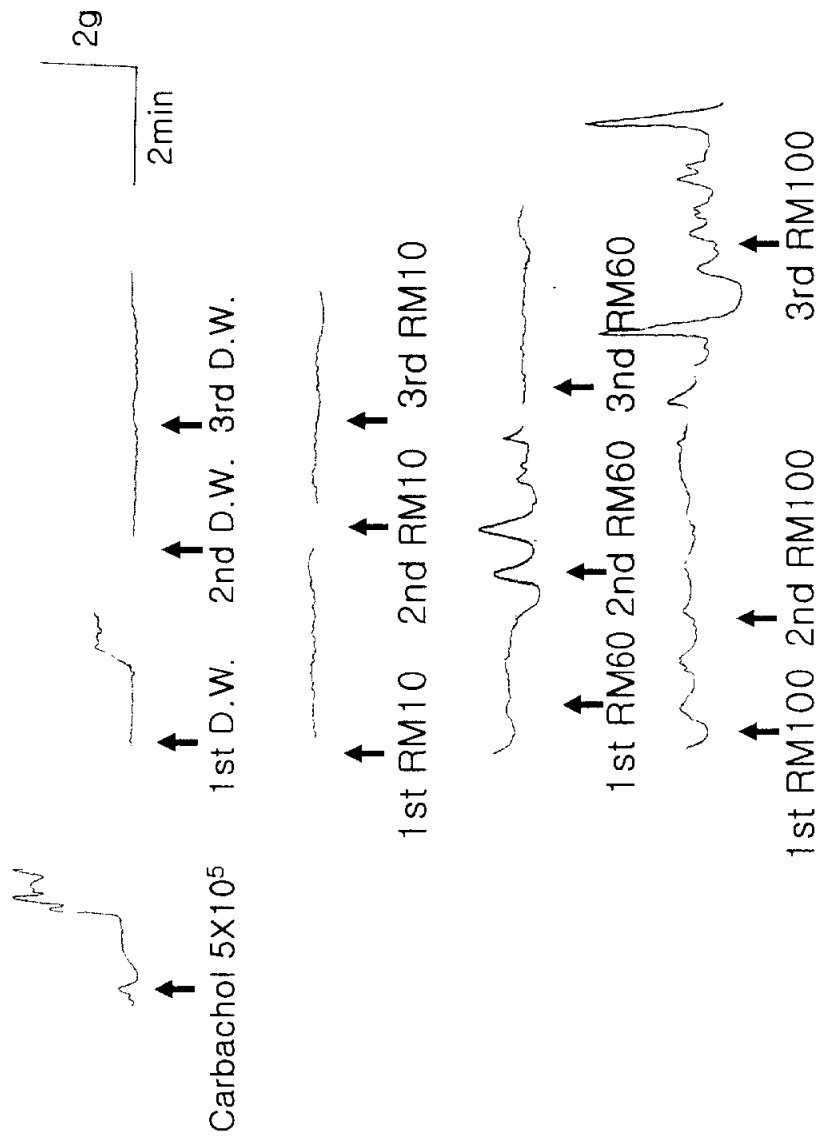


Fig.3 The contractile response of the tilapia intestine



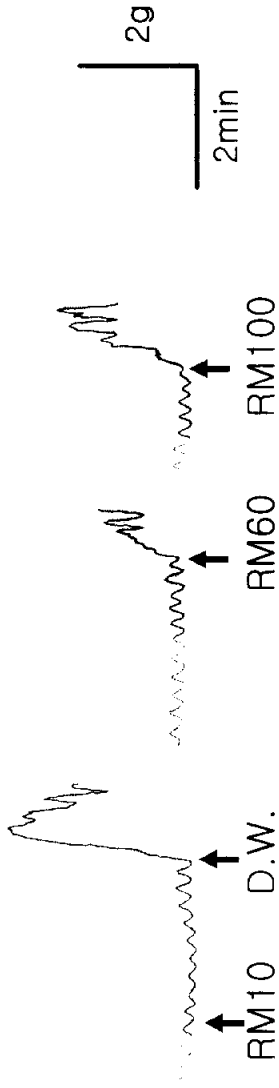


Fig.4 The contractile response of the Gold fish intestine

### III. 결과 및 토론

#### 1. 메기 intestine 추출물의 생리활성검색

한국산 메기 60마리의 intestine을 5% 초산용액으로 추출하고 ethanol과 NaCl등을 첨가하여 당이나 지방같은 거대 분자들을 제거하였다. Sep-pak C18 cartridge로부터 DW, RM10, RM60, RM100 fraction을 얻었고 이를 이용하여 평활근 수축활성을 측정해 보았다. 각각의 추출물의 평활근 수축활성을 알아보기 위해 rat (Sprague-Dawley)의 duodenum, 향어 (*Cyprinus carpio*)의 intestine, 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*)의 intestine, 금붕어 (*Carassius auratus*)의 intestine을 사용하였다. (Fig.1-4)

일반적으로 RM 10의 경우 세로토닌, 카테콜(cathecol)핵을 가진 물질, dipeptide, tripeptide와 같은 물질과 indole ring 또는 imidazole ring을 포함하는 물질이 함유되어 있으며, RM 60은 펩타이드성 물질이 함유되어 있고, RM 100은 크기가 큰 polypeptide와 소수성 펩타이드 및 스테로이드계 물질이 함유되어 있다고 일반적으로 알려져 있다.

##### 1.1 Rat (Sprague-Dawley)의 duodenum에 대한 수축 활성

Rat의 duodenum에 대한 평활근 수축활성을 측정한 결과를 Table 3 에 나타내었다. 실험 결과 RM60에서는 첫 번째, 두 번째, 세 번째 초산 추출물 모두에 활성이 나타났다. DW에서는 첫 번째 와 두 번째 추출물에서 활성이 나타났으며, RM10에서는

첫 번째 초산추출물에서만 활성을 보였다. 그리고 RM100은 활성을 나타내지 않았다. 전체적인 반응의 크기는 크지 않고 최소한의 반응을 나타내는 정도였다.(Fig. 1)

### 1.2 향어 (*Cyprinus carpio*)의 intestine에 대한 수축 활성

향어의 intestine에 대한 평활근 수축활성을 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다. 향어의 intestine에 대해서는 모든 fraction에서 반응을 보였다. RM60에서는 반응의 크기가 작아지지만 세 번째 추출물까지 모두 활성을 나타내었다. DW에서는 첫 번째와 두 번째 추출물까지 활성을 나타내었으며, RM10은 첫 번째 추출물에서만 활성이 나타났다. 그리고 RM100은 첫 번째 추출물에서만 활성을 나타내었지만 다른 fraction에 비해 미약한 반응을 보였다.(Fig. 2)

### 1.3 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*)의 intestine에 대한 수축 활성

틸라피아의 intestine에 대한 평활근 수축활성을 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. 틸라피아의 intestine에 대해서 DW를 제외한 나머지 fraction에서는 거의 반응을 나타내지 않았다. DW의 첫 번째 추출물에서만 강한 활성을 나타내었고 나머지 RM10, RM100에서는 반응을 나타내지 않았다. RM60의 첫 번째 추출물에서는 약한 이완반응을 나타내었다.(Fig. 3)

#### 1.4 금붕어 (*Carassius auratus*)의 intestine에 대한 수축 활성

금붕어의 intestine에 대해서는 RM10을 제외한 모든 부분들에서 강한 활성을 나타내었다.(Fig. 4)

메기의 intestine 추출물을 사용하여 여러 종류의 평활근에 대해 측정한 결과 활성이 뛰어난 순서는 금붕어> 향어> 틸라피아>Rat 순이었다. 메기는 경골어류 중 메기목에 속하는 어류이며 향어와 금붕어는 잉어목에 속한다. 그리고 틸라피아는 경골어류중 농어목에 속하는 어류이다. 메기가 농어목인 틸라피아 보다는 잉어목인 금붕어와 향어에 분류학적으로 더 가깝기 때문에 거리가 먼 틸라피아에서보다 금붕어와 향어에서 더 큰 활성이 나온 것 같다. 따라서 이후의 정제과정에 대한 assay system은 가장 활성이 뛰어난 금붕어의 intestine을 사용하였다.

**Table 3. The contractile activity of rat duodenum**

| Rat | DW | RM10 | RM60 | RM100 |
|-----|----|------|------|-------|
| 1st | +  | +    | +    | —     |
| 2nd | +  | —    | +    | —     |
| 3rd | —  | —    | ++   | —     |

+++ : strong activity, ++ : weak activity, - : no activity

**Table 4. The contractile activity of carp intestine.**

| 항어  | DW  | RM10 | RM60 | RM100 |
|-----|-----|------|------|-------|
| 1st | +++ | +++  | +++  | +     |
| 2nd | ++  | —    | ++   | —     |
| 3rd | —   | —    | +    | —     |

+++ : strong activity, ++ : weak activity, - : no activity

**Table 5. The contractile activity of *Sarotherodon niloticus***

| 틸라피아 | DW  | RM10 | RM60 | RM100 |
|------|-----|------|------|-------|
| 1st  | +++ | —    | +    | —     |
| 2nd  | —   | —    | —    | —     |
| 3rd  | —   | —    | —    | —     |

+++ : strong activity, + : weak activity, — : no activity

**Table 6. The contractile activity of Gold fish intestine**

| 금붕어 | DW   | RM10 | RM60 | RM100 |
|-----|------|------|------|-------|
| 1st | +++  | —    | +++  | +++   |
| 2nd | N.D. | N.D. | N.D. | N.D.  |
| 3rd | N.D. | N.D. | N.D. | N.D.  |

+++ : strong activity, + : weak activity, — : no activity

N.D. : not determined

## 2. 메기 intestine으로부터 neuropeptide의 정제

메기 intestine으로부터 추출한 물질에 대한 수축활성을 조사한 결과 가장 활성이 뛰어나며, peptide성 물질이 녹아있다고 알려진 RM60을 이용하여 정제과정을 수행하였다. reverse-phase HPLC( $\mu$ Bondapak C18 3.9  $\times$  300mm)column을 이용하여 분리한 결과 37번 fraction에서 수축반응을 확인하였으며, 활성을 나타내는 활성분획을 양이온 교환 column인 SP-5PW(7.5  $\times$  75mm)를 사용하여 분리한 결과 14번 fraction에서 수축활성을 확인하였으며 순수한 하나의 물질을 얻기위해 현재 정제과정중에 있다.

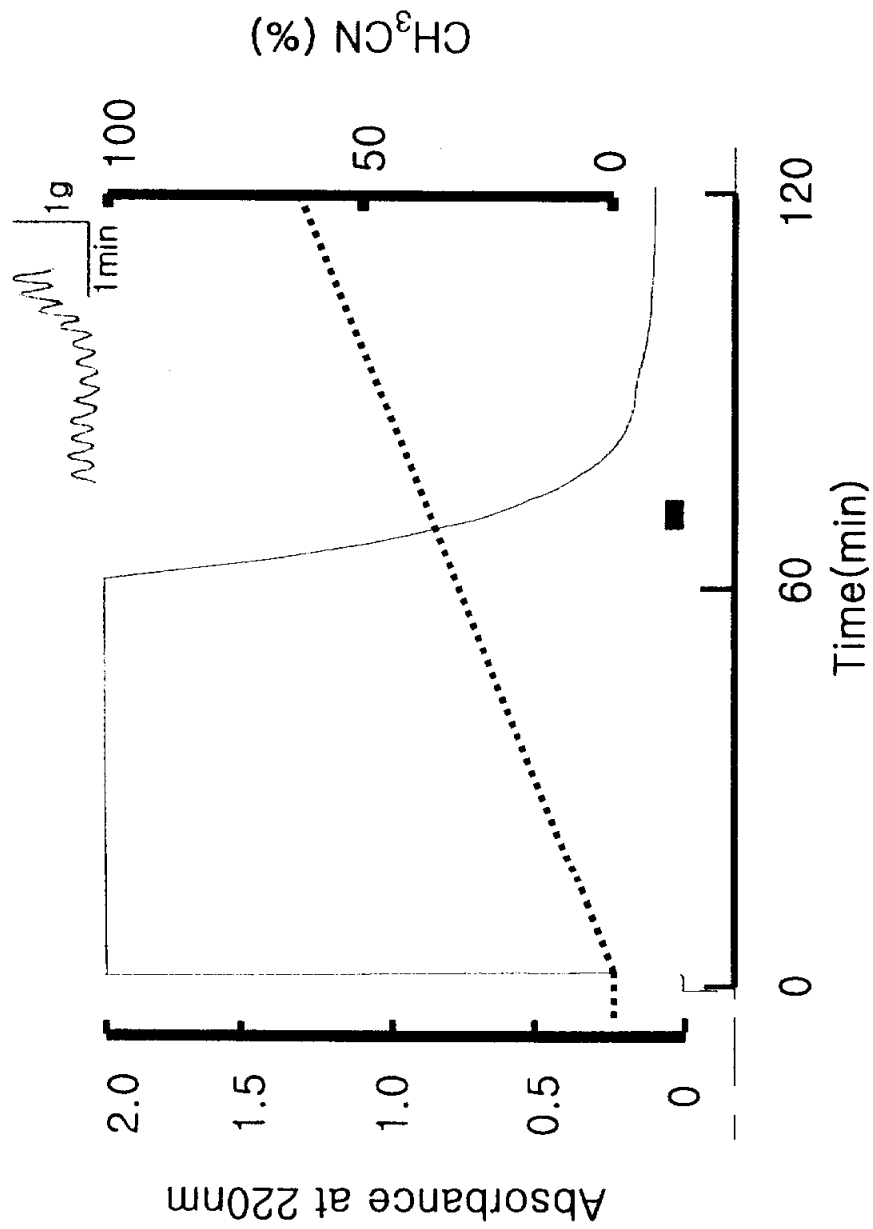


Fig. 5 reverse phase HPLC profile



#### IV. 요약

한국산 메기 (*Silurus asotus*)의 intestine으로부터 새로운 생리활성물질을 정제하고자 하였다. 60마리의 메기 intestine을 5%초산으로 추출하였고, 이 추출물은 Sep-pak C18 cartridge를 이용하여 부분적으로 분리된 DW, RM10, RM60, RM100을 얻었다. 이것을 이용하여 rat (Sprague-Dawley)의 duodenum, 향어 (*Cyprinus carpio*)의 intestine, 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*)의 intestine, 금붕어 (*Carassius auratus*)의 intestine을 대상으로 평활근 수축반응을 살펴보았다. 모든 실험동물에 대해 RM60과 DW의 반응이 크게 나왔으며 RM10과 RM100은 약한 반응을 나타내었다. 실험동물중에서는 금붕어의 반응이 가장 크게 나왔다. 금붕어와 같은 잉어목에 속하는 향어에서도 금붕어와 유사한 반응을 보였다. 틸라피아에서는 그다지 큰 반응을 보이지 않았다. Rat에 대해서는 그 활성의 크기는 크지않고 최소한의 반응만을 나타내었다. 메기가 틸라피아보다 향어나 금붕어에 계통적으로 더 가깝기 때문에 거리가 먼 틸라피아에서는 그 활성이 떨어지는것 같다. 하나의 순수한 물질을 얻기위해 가장 반응이 좋은 RM60을 이용해 정제과정을 수행하였으며, 현재 역상 HPLC, ion-exchange HPLC등을 이용하여 정제과정중에 있다.

## V. 감사의 말씀

논문이 완성되기까지 학문적인 가르침 뿐만 아니라  
인성적으로도 많은 가르침을 주신 박남규 지도교수님께  
진심으로 감사드립니다. 그리고 항상 관심을 가지고  
지켜봐주신 공제열 교수님, 홍용기 교수님, 공인수 교수님,  
이형호 교수님, 김중균 교수님, 김성구 교수님께 감사의  
마음을 전합니다.

학부 때부터 생활의 지침이 되어주신 김찬희 선배님께  
진심으로 감사드리며, 항상 열심히 생활하는 모습을  
보여주신 바이오 메디컬 사이언스 실험실의 김은정  
선배님, 고혜진 선배님, 김인혜 선배님께 깊은 감사를  
드립니다.

졸업동기인 배윤정 후배님과 안상현 후배님께도 고마움을  
전하고 싶습니다.

함께 있으면 언제나 든든한 윤승제 후배님께 감사를  
드리며 생화학 실험원 모두에게 감사드립니다. 멀리  
캐나다에서 열심히 공부하고 계시는 서정길 선배님께도  
감사드립니다.

힘들고 지칠 때 많은 힘이 되어준 영우 형님께 고마움을  
전하며 항상 저를 믿어주시고 뒷바라지 해주신 부모님께  
이 논문을 드립니다.

## VI. 참고문헌

1. Maloy, W. L. and Kari, U. P. (1995) *Biopolymer*, 37, 105-122.
2. Ku, H. J., Seo, J. K., Huh, M. D., Chung, J. K., Park, J. S., Kang, S. W. and Park, N. G. (1997) *J. Korean Fish Soc*, 30, 244-251.
3. Chung, N. S., Basile, S. and Livett, B. G. (1993) *Neuropeptides*, 24, 91-97.
4. Wang, Y. and Conlon, J. M. (1993) *Peptides*, 14, 573-579.
5. Conlon, J. M., Katsonlis, S., Schmidt, W. E. and Thim, L. (1988) *Regul. Pept.*, 20, 111-116.
6. Erspamer, V. (1981) *Trends Neurosci.*, 4, 267-269.
7. Kozawa, H., Hino, J., Minamino, N., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177, 588-595.
8. Conlon, J. M., Deacon, C. F., O' Toole, L. and Thim, L. (1986) *FEBS Lett.*, 200, 111-116.
9. Jensen, J. and Conlon, J. M. (1992) *Eur. J. Biochem.*, 206, 659-664.
10. Price, D. A. and Greenberg, M. J. (1977) *Science*, 197, 670-671.
11. Grimmelikhuijzen, C. J. P. and Graff, D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9817-9821.
12. Nathacker, H. P., Rinehart, K. L., MacFarlane, I. D. and Grimmelikhuijzen, C. J. P. (1991) *Peptides*, 12, 1165-1173.

13. Donkray, G. T., Reeve, J. R., Shiverly, J., Gayton, R. J. and Bornard, C. S. (1983) *Nature*, 305, 328-330.
14. Cattrell, C. A. Davies, N. W. and Green, K. A. (1989) *J. Physiol.*, 356, 315-333.
15. Conlon, J. M., O ' Harte, F., Peter, R. E. and Kah, O. (1991) *J. Neurochem.* 56(4), 1432-1436.
16. Fujimoto, M., Takeshita, K. I., Wang, X., Takabatake, I., Fujisawa, U., Teranishi, H., Othni, M., Muneoka, Y. and Otha, S.(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242, 436-440.