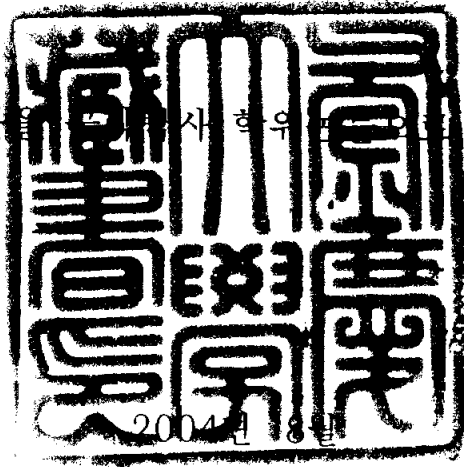


공학박사 학위논문

별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터
새로운 신경성 펩타이드들의
분리·정제 및 생리활성

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함.



부경대학교 대학원

생물공학과

김 은 정

김은정의 공학박사 학위논문을 인준함

2004년 6월 24일

주 심 의학박사 변 대 석 

부 심 약학박사 정 준 기 

위 원 이학박사 윤 호 동 

위 원 이학박사 김 형 락 

위 원 이학박사 박 남 규 

목 차

표 (Table) 목록	IV
그림 (Figure) 목록	V
초록 (Abstract)	XI
 I. 서 론	 1
II. 재료 및 방법	8
1. 재료	8
1.1. 실험동물	8
1.2. 시약 및 재료	8
1.3. 실험약물	8
2. 실험방법	9
2.1. 불가사리로부터 시료의 추출	9
2.2. 불가사리 DRM에 대한 이완활성 물질의 정제	10
2.2.1. 불가사리 추출물 RM60으로부터 SF-I의 정제	11
2.2.2. 불가사리 추출물 RM60으로부터 SF-II의 정제	12
2.2.3. 불가사리 추출물 RM60으로부터 SF-III의 정제	26
2.3. 천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열결정	32
2.3.1. 분자량 측정	32
2.3.2. 아미노산 서열결정	32
2.3.3. 합성물의 비교	32
2.4. 펩타이드 유도체의 합성 및 정제	32
2.4.1. 펩타이드의 합성	32
2.4.2. 펩타이드-수지의 절단과 탈보호	33
2.4.3. 합성 펩타이드의 정제	33
2.5. Circular dichroism (CD) 스펙트럼의 측정	39

2.5.1. 리포솜의 제조	39
2.5.2. CD 스펙트럼의 측정	39
2.6. 생리활성 측정	39
2.6.1. 조직의 표본제작	39
2.6.1.1. 불가사리 DRM 및 tube foot (TF)	39
2.6.1.2. 불가사리 cardiac stomach (CS)	40
2.6.1.3. Rat aorta 및 atrium	40
2.6.2. 이완활성의 측정	40
2.6.2.1. 불가사리 DRM에서의 이완활성 측정	40
2.6.2.2. 불가사리 CS에서의 이완활성 측정	41
2.6.2.3. 불가사리 TF에서의 이완활성 측정	41
2.6.2.4. Rat aorta 및 atrium에서의 활성 측정	41
2.6.3. 통계처리	41
III. 결 과	43
1. 불가사리로부터 이완성 펩타이드의 추출	43
2. 불가사리 DRM에 대한 이완성 펩타이드의 정제	43
2.1. SF-I의 정제	43
2.2. SF-II의 정제	44
2.3. SF-III의 정제	44
3. 정제한 이완성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산의 서열결정	45
3.1. 천연 SF-I과 합성 SF-I의 동일성 비교	45
4. SF-I의 CD 스펙트럼	46
5. SF-I의 유도체 합성, 분자량 측정 및 머무름시간 비교	47
6. SF-I 및 그 유도체들의 이완활성 측정	48
6.1. 불가사리 DRM에서의 이완활성	48
6.1.1. SF-I과 SF-I amide의 이완활성	48
6.1.2. SF-I과 그 유도체들의 이완활성	56
6.1.2.1. SF-I과 N-말단 유도체들의 이완활성	56

6.1.2.2. SF-I과 C-말단 유도체들의 이완활성	56
6.1.2.3. 최소 잔기 유도체의 이완활성	56
6.1.2.4. SF-I과 SF-I(5-14)에 대한 Ala-치환 유도체들의 이완활성 ...	56
6.2. 극파동물유래의 신경성 펩타이드와 이완활성의 비교	59
6.2.1. 불가사리 DRM에서의 이완활성	59
6.2.2. 불가사리 CS에서의 이완활성	59
6.2.3. 불가사리 TF에서의 이완활성	60
6.2.4. 아무르불가사리 DRM에서의 이완활성	60
7. 불가사리 DRM에서 SF-I의 이완활성 메카니즘	75
7.1. NO synthase inhibitor인 L-NAME의 효과	75
7.2. G-protein activator인 mastoparan의 효과	75
7.3. Adenylate cyclase activator인 forskolin과 inhibitor인 MDL-12,330-HCl 의 효과	76
7.4. 무스카린성 수용체 inhibitor인 atropine의 효과	76
7.5. Na ⁺ -channel 차단제인 tetrodotoxin의 효과	77
7.6. Ganglionic blocking agent인 hexamethanum chloride의 효과	77
IV. 토 론	85
1. 불가사리로부터 이완성 펩타이드의 분리-정제	85
2. SF-I과 그 유도체들의 구조와 활성	88
2.1. SF-I과 N-말단 및 C-말단 유도체의 구조와 활성	88
2.2. SF-I과 SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체의 구조와 활성	90
3. 여러가지 불가사리 조직에 대한 SF-I의 이완활성 측정	93
4. 불가사리 DRM에서 SF-I의 작용기작	95
V. 요 약	107
VI. 참 고 문 헌	109
감사의 글	117

List of Tables

Table 1. Amino acid sequences of neuropeptides	5
Table 2. Amino acid sequences of neuropeptide from several molluscs	6
Table 3. The amino acid sequences of identified members of the echinoderm SALMF amide family	7
Table 4. Procedure for solid-phase peptide synthesis	34
Table 5. The amino acid sequences of peptide used in this study	35
Table 6. Purification condition of synthetic SF-I and its analogs	37
Table 7. Molecular weight and amino acid sequences of purified peptide from starfish, <i>Asterina pectinifera</i>	49
Table 8. Molecular weight, Hydrophobicity, Hydrophobic moment and Retention time of SF-I, N- and C-terminal analogs	53
Table 9. Molecular weight, Hydrophobicity, Hydrophobic moment and Retention time of Ala-substituted SF-I and SF-I(5-14)	54
Table 10. Prediction of secondary structure of the peptide by Chou and Fasman prediction method	55
Table 11. The Threshold concentration (TC), ED ₅₀ and E _{max} of SF-I and its analog induced relaxation in the starfish DRM	62
Table 12. Neuropeptides with Asp at C-terminus	99
Table 13. The effects of drugs on the SF-I relaxing activity	105

List of Figures

- Fig. 1. Typical tracing illustrating the relaxing response of starfish extracts, *Asterina pectinifera*. Each down arrow represents the sample applied to the starfish DRM. The precontraction was induced ACh, 5×10^{-7} M. 13
- Fig. 2. Summarized procedures for the purification of SF-I~III. C₁₈ HPLC, C₁₈ reverse-phase HPLC. AX HPLC, anion-exchange HPLC. CX HPLC, cation-exchange HPLC. SX HPLC, size-exclusion HPLC. 14
- Fig. 3. CM52 cation exchange chromatography of starfish extracts RM60. The RM60 was loaded onto CM52 (2.5 × 300 mm) column and eluted with a gradient of ammonium acetate (dotted line) at flow rate of 2.75 mL/min (pH 5.0). The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 15
- Fig. 4. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction B in Fig. 3. The active fraction B in Fig. 3 was loaded onto Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 3.0 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 16
- Fig. 5. Anion exchange HPLC profile of the active fraction B-I in Fig. 4. The active fraction B-I in Fig. 4 was loaded onto DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 17
- Fig. 6. Reverse-Phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 5. The active fractions in Fig. 5 were pooled and loaded onto Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 1.0 mL/min. The black bar represents relaxing active peak on the starfish DRM. 18
- Fig. 7. Reverse-Phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 6. The active fraction in Fig. 6 was pooled and loaded on to Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active peak on the starfish DRM. 19

- Fig. 8. Final purification of the active fraction in Fig. 7. The active fraction was loaded onto a Hypersil BDS C_{18} (2×125 mm) and eluted with isocratically 20 % CH_3CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A), and the bioassay with the starfish DRM (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 8A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C). 20
- Fig. 9. Anion-exchange HPLC profile of the active fraction B-II in Fig. 4. The active fraction B-II in Fig. 4 was pooled and loaded onto DEAE-5PW (7.5×75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 21
- Fig. 10. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 9. The active fraction in Fig. 9 was loaded onto Hypersil-BDS C_{18} (2×125 mm) column and eluted with a linear gradient of CH_3CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active peak on the starfish DRM. 22
- Fig. 11. Anion-exchange HPLC profile of the active fraction in Fig. 10. The active fraction in Fig. 10 was pooled and loaded onto DEAE-5PW (7.5×75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 23
- Fig. 12. Reverse-phase HPLC chromatography of the active fraction in Fig. 11. The active fraction in Fig. 11 was pooled and loaded onto Hypersil-BDS C_{18} (2×125 mm) column and eluted with isocratically 23 % CH_3CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 24
- Fig. 13. Final purification of the active fraction in Fig. 12. The active fraction in Fig 12 was loaded onto a Superdex Peptide HR 10/30 (10×300 mm) and eluted with isocratically 30 % CH_3CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A). The bioassay with the starfish DRM (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 13A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C). 25
- Fig. 14. Reverse-Phase HPLC profile of the active fraction A in Fig. 3. The fraction A in Fig. 3 was pooled and loaded onto Vydac C_{18} (9.2×250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH_3CN (dotted line) in

- 0.1 % TFA at flow rate of 3.0 mL/min. The black bar represents relaxing active fraction on the starfish DRM. 27
- Fig. 15. Anion-exchange HPLC chromatography of the active fraction in Fig. 14. The active fraction in Fig. 14 was pooled and loaded onto DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM. 28
- Fig. 16. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 15. The active fraction in Fig. 15 was pooled and loaded onto Hypersil BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fraction on the starfish DRM. 29
- Fig. 17. Cation exchange HPLC profile of the active fraction in Fig. 16. The active fraction in Fig. 16 was loaded onto SP-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.0) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fraction on the starfish DRM. 30
- Fig. 18. Final purification of the active fraction in Fig. 17. The active fraction in Fig. 17 was loaded onto a Hypersil BDS C₁₈ (2 × 125 mm) and eluted with isocratically 25 % CH₃CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A), and the bioassay with the starfish DRM (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 18A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C). 31
- Fig. 19. Vertical section through madreporite (A), horizontal section (B) and physiography system (C) to measure the relaxing effect on the DRM. 42
- Fig. 20. HPLC co-elution of SF-I-OH (OH type) and SF-I-NH₂ (amide type) in reverse-phase HPLC. Peptides were loaded onto a Vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column and eluted isocratically 22 % CH₃CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 0.5 mL/min. 50
- Fig. 21. Comparison of retention time on reverse-phase HPLC between native (N) and synthetic (S) SF-I. Peptides were loaded onto a Vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column and eluted isocratically 22 % CH₃CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 0.5 mL/min. The mixture of the two peptides was co-eluted as a single u. v.-absorbance peak (N+S). 51
- Fig. 22. CD spectra of SF-I in 20 mM TES buffer (●), EYPC (○), EYPC:EYPG

- (3:1) liposome (▼) and 50 % TFE (▽) at 25 °C. Peptide and lipid concentration were 50 µM and 2 mM, respectively. 52
- Fig. 23. Typical tracings illustrating the relaxing response of starfish *Asterina pectinifera* DRM (A), CS (B) and TF (C) to SF-I. The Carb. represents carbachol. 61
- Fig. 24. Concentration response curves to SF-I (n=18) and SF-I amide (n=9) induced relaxation in starfish DRM : SF-I (●) and SF-I amide (○). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M. 64
- Fig. 25. Concentration response curves to SF-I N-terminal analogs induced relaxation in starfish DRM (n≥2) : SF-I (●), SF-I(2-16) (○), SF-I(3-16) (▼), SF-I(4-16) (▽), SF-I(5-16) (■), SF-I(6-16) (□) and SF-I(7-16) (◆). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M. 65
- Fig. 26. Concentration response curves to SF-I N-terminal analogs induced relaxation in starfish DRM (n≥2) : SF-I (●), SF-I(8-16) (○), SF-I(9-16) (▼), SF-I(10-16) (▽), SF-I(11-16) (■), SF-I(12-16) (□) and SF-I(13-16) (◆). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M. 66
- Fig. 27. Concentration response curves to SF-I C-terminal analogs induced relaxation in starfish DRM (n≥2) : SF-I (●), SF-I(1-15) (○), SF-I(1-14) (▼), SF-I(1-13) (▽), SF-I(1-12) (■) and SF-I(5-14) (□). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M. 67
- Fig. 28. Concentration response curves to SF-I (●) and SF-I(5-14) (○) induced relaxation in starfish DRM (n≥2). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M. 68
- Fig. 29. Concentration response curves to SF-I analogs induced relaxation in starfish DRM (n≥2) : SF-I (●), [Ala¹]SF-I (○), [Ala²]SF-I (▼), [Ala³]SF-I (▽), [Ala⁴]SF-I (■), [Ala⁵]SF-I (□), [Ala⁷]SF-I (◆) and [Ala⁸]SF-I (◇). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M. 69
- Fig. 30. Concentration response curves to SF-I analogs induced relaxation in starfish DRM (n≥2) : SF-I (●), [Ala⁹]SF-I (○), [Ala¹⁰]SF-I (▼), [Ala¹¹]SF-I (▽), [Ala¹³]SF-I (■), [Ala¹⁴]SF-I (□), [Ala¹⁵]SF-I (◆) and [Ala¹⁶]SF-I (◇). Relaxing effects expressed as % the maximal response to

ACh, 1×10^{-6} M.	70
Fig. 31. Concentration response curves to SF-I analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$) : SF-I(5-14) (●), [Ala ⁵]SF-I(5-14) (○), [Ala ⁷]SF-I(5-14) (▼), [Ala ⁸]SF-I(5-14) (▽), [Ala ⁹]SF-I(5-14) (■), [Ala ¹⁰]SF-I(5-14) (□), [Ala ¹¹]SF-I(5-14) (◆), [Ala ¹³]SF-I(5-14) (◇) and [Ala ¹⁴]SF-I(5-14) (▲). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	71
Fig. 32. Concentration response curves to various neuropeptide induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$) : SF-I (●), S1 (○), S2 (▼), FLRF(▽) and FMRFa (□). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	72
Fig. 33. Graphs comparing the mean relaxation response ($\pm$ s. e.) of CS preparation to SF-I and S1 ($n=3$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to CCh, 1×10^{-5} M.	73
Fig. 34. Graphs comparing the mean relaxation response ($\pm$ s. e.) of TF preparation to SF-I, S1 and S2 ($n \geq 2$). Relaxing effects expressed as percentage of the response to SF-I.	73
Fig. 35. Concentration response curves to SF-I and S1 induced relaxation in starfish <i>Asterias amurensis</i> DRM ($n \geq 3$) : SF-I (●) and S1 (○). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	74
Fig. 36. Effect of N ^G -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of L-NAME (1×10^{-5} M, ○) and L-NAME (1×10^{-4} M, ▼) in the starfish DRM ($n=4$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	78
Fig. 37. Effect of mastoparan on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of mastoparan (1×10^{-6} M, ○) and mastoparan (1×10^{-5} M, ▼) in the starfish DRM ($n=2$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	79
Fig. 38. Effect of forskolin on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of forskolin (1×10^{-5} M, ○) in the starfish DRM ($n=5$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	80
Fig. 39. Effect of MDL-12,330 on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of MDL-12,330 (10^{-5} M, ○) in the starfish DRM ($n=3$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	81

Fig. 40. Effect of atropine on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of 10^{-5} M atropine (1×10^{-5} M, ○) in the starfish DRM (n=2). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	82
Fig. 41. Effect of tetrodotoxin on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of 1×10^{-7} M TTX (○), 1×10^{-6} M TTX (▼) and 1×10^{-5} M TTX (▽) in the starfish DRM (n≥2). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	83
Fig. 42. Effect of hexamethonium on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of 1×10^{-5} M hexamethonium (○), 1×10^{-4} M hexamethonium (▼) and 1×10^{-3} M hexamethonium (▽) in the starfish DRM (n≥2). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	84
Fig. 43. The relaxant effects of SF-I and N-terminal analogs (10^{-6} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	100
Fig. 44. The relaxant effects of SF-I and C-terminal analogs (10^{-5} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	101
Fig. 45. The relaxant effects of SF-I and its analogs (10^{-6} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	102
Fig. 46. The maximal relaxant effects of SF-I(5-14) and its analogs (10^{-4} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	103
Fig. 47. Graphs comparing the mean relaxation response ($\pm$ s.e.) of SF-I and S1 on the <i>Asterina pectinifera</i> DRM (SF-I, ● and S1, ■) and <i>Asterias amurensis</i> (SF-I, ○ and S1, □). The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.	104
Fig. 48. The proposal mechanisms of SF-I on starfish DRM	106

Purification and characterization of novel neuropeptides
from the starfish, *Asterina pectinifera*

Eun Jung Kim

*Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate School.
Pukyong National University*

Abstract

Three novel neuropeptides, named SF-I, SF-II and SF-III with relaxing activity on the dorsal retractor muscle (DRM) were isolated from the whole body extract of starfish, *Asterina pectinifera* and characterized on biochemical properties. SF-I, SF-II and SF-III were purified by gel-filtration, ion-exchange and C₁₈ reversed-phased high performance liquid chromatography. The primary structure of SF-I, SF-II and SF-III were determined by a combination of an automated amino acid sequencing and MALDI-TOF mass spectra. The results of primary structure of SF-I and partial primary structure of SF-II and SF-III were as follows: SF-I, F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D; SF-II, G-A-I-X-K-D-P-Y-M-D-I-M-S-L-R-E-S-N-Y-X; SF-III, S-G-T-G-X-T-Q-F-S-G-R-A-Q-L-K-V-G-Q-D-A-L-S-X-V-L-A-D-S-N-X. Comparison of the amino acid sequence with those of other known neuropeptides revealed the SF-I, SF-II and SF-III were novel peptides having relaxing activity on the starfish DRM.

SF-I was synthesized by the solid phase method. To compare the homology between native and synthetic SF-I, synthetic peptide was compared the retention time on HPLC and molecular weight with that of native SF-I. From these results, the C-terminal portion of SF-I turned out to be not -NH₂ type

but -OH type. SF-I showed threshold response at 10^{-10} M and the maximal relaxing effect ($E_{\max}$) was 120 ± 7.0 % at 10^{-5} M. The relaxing activity of SF-I on the starfish DRM increased dose-dependently, suggesting that its activity is mediated by receptor present in the muscle. Circular dichroism (CD) spectra and Chou-Fasman's prediction results suggested that the secondary structure of SF-I took unordered structure.

In order to investigate the structural-activity relationship, various analogs of SF-I were synthesized by solid phase method. They are analogs which is deleted one by one the amino acid residues in N- and C-terminus and Ala-substituted for each amino acid residue of SF-I. All the synthetic peptides containing SF-I were measured relaxing activity on starfish DRM. The results when comparing N- and C-terminus analogs with DRM showed that Phe¹ in N-terminal and Asp¹⁶ in C-terminal played an important role in receptor-affinity. In addition, SF-I(5-14) was minimum sequence required in showing the relaxing activity, but it was >100 orders of magnitude less potent than the native peptide. Also, the relaxing activity of Ala-substituted analogs in starfish DRM suggested that Pro⁹, Leu¹⁰ and Phe¹⁴ in SF-I played important role in showing the relaxing activity.

On the other hand, the relaxing response of SF-I, S1 and S2 were investigated with starfish DRM, cardiac stomach (CS) and tube foot (TF). S1 and S2 are neuropeptides which are purified from starfish *Asterias rubens*. In starfish DRM, relaxing potency was as follow: SF-I (120 ± 7.0 %) $\gg$ S1 (45.2 ± 2.4 %) > S2 (15 %) > FMLRa > FMRFa. The potency of starfish CS was as follows: SF-I > S1, but S2 didn't affect. In case of TF, the relaxing activity when tested at a concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ was as follow; SF-I > S2. On the contrary, S1 didn't show relaxing activity but showed the contractile activity.

Significantly, these data indicated that SF-I functioned as general muscle relaxants in starfish, but varied in its relative importance in different organ systems. In starfish *Asterias amurensis* DRM, relaxing potency was also as follow : SF-I>S1. Comparing the result of activity in the DRM of two different species. SF-I showed higher activity in *Asterina pectinifera* than *Asterias amurensis*. But S1 showed more or less higher activity in *Asterias amurensis* than *Asterina pectinifera*. The change of relaxing activity between *Asterina pectinifera* DRM and *Asterias amurensis* DRM suggested that SF-I showed the species-specific activity.

To investigate the mechanism of SF-I cause muscle relaxation in starfish DRM, various signal transductional drugs were used. Some changes in pretreatment MDL-12,330 (adenylate cyclase inhibitor), forskolin (adenylate cyclase activator), TTX (Na⁺-channel blocker) and hexamethonium (ganglionic antagonist) were observed when compared with control. The contractile activity of acetylcholine was also depressed by verapamil (Ca²⁺-channel blocker), NPC-15,437 (Proteinkinase C inhibitor), phenoxybenzamine (Calmodulin antagonist) and SF-I. These results suggested that SF-I was controlled by cAMP, Na⁺-channel, Ca²⁺-channel, Proteinkinase C, Calmodulin and neuron. However, the mechanisms by which SF-I causes muscle relaxation in starfish remain unknown. Furthermore, other signalling pathways may need to be investigated.

1. 서론

신경성 펩타이드는 신호전달물질로서 신경계에서 신호전달 및 조절 역할을 하며, acetylcholine (ACh)과 같은 비펩타이드성 transmitter와 함께 방출된다고 알려져 있다 (Elliott and Barchas, 1979; Krieger, 1983). 이들은 평활근의 운동조절, 혈관의 수축 및 이완, 통증전달 및 혈압 조절등의 역할을 담당하고 있으며 (Zadina *et al.*, 1986), oxytocine/vasopressin family, growth hormone releasing factor family와 substance P (SP)/tachykinin family (Table 1)등이 척추동물 및 무척추동물에서 광범위하게 분리되어 종들간의 상관관계와 진화과정에 관한 정보를 제공하고 있다 (Hoyle, 1998).

신경성 펩타이드의 기능에 있어 평활근 수축 및 이완운동 조절은 myosin과 actin의 결합에 의해 조절된다. Myosin light-chain kinase가 myosin regulatory light chain을 인산화시켜 myosin이 actin과 결합되도록 하여 수축작용을 나타내는 반면, myosin과 actin의 결합이 방해받게 되면 이완작용이 나타나게 된다 (Adelstein *et al.*, 1982). 구조적으로 가로무늬를 가지고 있지 않는 포유류 평활근은 내장의 여러 장기 및 순환기 계통의 관벽을 구성하며, 내용물의 수송, 분해, 배출 및 보존과 유지 등의 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 평활근은 포유동물에서 뿐만 아니라 진화상 하등한 연체동물에서도 횡문이 없고 filaments와 dense body를 포함하고 있는 catch muscle fiber로서 존재함이 보고된 바 있다 (Twarog, 1967). 이러한 이유에서 포유동물뿐만 아니라 연체동물을 이용한 신경성 펩타이드의 평활근 조절에 관한 다양한 연구결과가 진행되고 있으며, 주로 연체동물의 catch relaxing peptide를 중심으로 이루어지고 있다 (Table 2). 대표적으로 진주담치의 pedal ganglia로부터 ACh 자극에 의한 anterior byssus retractor muscle (ABRM)의 catch tension에 대하여 이완활성을 가진 FMRFamide (FMRFa)의 분리가 보고되었고 (Kobayashi and Muneoka, 1990), ABRM으로부터 전기자극에 의한 ABRM의 수축력을 증가시키는 small cardioactive peptide (Fujisawa *et al.*, 1993) 및 *Mytilus* inhibitory peptide가 정제되었다 (Fujisawa *et al.*, 1991). 또한, 달팽이 (*Achatina fulica*) 신경총으로부터 전기적 자극에 의한 ABRM의 수축활성을 억제시키는 WWamide가 보고되었고

(Minakata *et al.*, 1993), leeches (*Hirudo nipponia*)의 whole body 추출물로부터 leech intestine에 대하여 수축활성을 나타내지만 vagina에서는 이완활성을 보이는 leech excitatory peptide와 지렁이 (*Eisenia*)의 gut 및 whole body로부터 earthworm excitatory peptide (EEP)-1과 EEP-2가 발견되었다 (Minakata *et al.*, 1997).

그러나, 연체동물보다 척추동물과 진화상 더 밀접한 종으로 인식되고 있는 극피동물의 근육생리는 연체동물의 근육계보다 척추동물의 근육계와 유사할 것으로 생각되어 지지만, 극피동물을 이용한 연구는 미비한 실정이다 (Elphick and Melarange, 2001). 특히 이들 극피동물의 근육계 중 해상의 longitudinal muscle band와 불가사리 dorsal retractor muscle (DRM)은 body wall 진피에 존재하는 작은 근육들과 연결되어 해상과 불가사리가 수축상태에서 딱딱함을 유지하거나, 이동시 몸의 부드러움을 유지함에 있어 결정적인 역할을 함에 보고되어져 있으나 (Motokawa, 1984), 이들의 생리화학적 연구는 거의 이루어지지 않았다 (Elphick and Melarange, 2001). 최근 극피동물의 추출물을 사용하여 *in vitro*상에서 이완을 유발하는 물질들이 screening되었으나 (Elphick and Melarange, 2001), 극피동물에 있어 신경전달물질에 관한 연구는 ACh, catecholamine과 GABA와 같은 기본적인 신경전달물질들의 활성 연구에 제한되어 있다 (Bacq, 1935; Beauvallet, 1938; Garcia-Arraras *et al.*, 1991). 그러나, 1992년 Diaz-Miranda등에 의해 해상 (*Holothuria glaberrima*)으로부터 해상의 rectum과 longitudinal muscle band에서 ACh에 의해 유발된 수축에 대해 이완활성을 나타내는 GFSKLYFa, SGYSVLYFa가 보고된 바 있으며, immunoreactivity 기법을 이용한 연구결과 이들 물질이 해상의 몸 전체에 넓게 분포하고 있음이 밝혀졌다 (Diaz-Miranda *et al.*, 1995a). 또한, 해상 (*Stichopus japonicus*)의 longitudinal muscle과 body wall로부터 해상의 longitudinal muscle에 수축활성을 갖는 NGIWYa와 intestine으로부터 이완활성을 유발하는 GYSPFMFa 및 FKSPFMFa가 보고되어졌다 (Iwakoshi *et al.*, 1995). 뿐만 아니라, 북대서양 (North Atlantic)에 존재하는 불가사리종인 *Asterias rubens*, *Asterias forbesi*의 radial nerve cords로부터 radioimmunoassay (RIA) 기법에 의하여 FMRFa 관련 peptide인 S1과 S2가 정제되었다 (Elphick *et al.*, 1991a). 이들은 기존의 알려진 신경성 펩타이드와 다른

SALMFamide로 명명되었고 (Table 3), 극피동물의 종에 있어서 특이적으로 규명된 최초의 신경성 펩타이드였다 (Elphick and Melarange, 2001). S1과 S2는 불가사리의 cardiac stomach (CS), tube foot (TF) 및 DRM에서 이완 활성을 보였으며, 특히 CS의 이완현상은 stomach이 밖으로 뒤집혀 나와 feeding하는 동안에 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌다 (Melarange and Elphick, 2003). 또한, S1과 S2는 면역조직학적 연구 결과로부터 불가사리의 몸과 neuromuscular organ에 넓게 존재하고 있으며 (Moore and Thorndyke, 1993; Newman *et al.*, 1995a와 b), NO (Nitric oxide)와 SALMFamide가 *in vivo*상에서 CS의 이완활성에 있어 neuronal control을 매개할지도 모른다는 연구가 보고된 바 있다 (Elphick and Melarange, 2001). 그러나, 신경성 펩타이드가 근육생리에 있어 중요한 역할을 수행하며 다양한 기능을 가진다는 것이 보고되었으나, 극피동물에 있어 신경성 펩타이드에 관한 연구는 극히 제한적이다 (Diaz-Miranda and Garcia-Ararras, 1995b).

한편, 해상과 불가사리에서 분리·정제된 신경성 펩타이드들은 C-말단이 보존된 SALMFa를 취하고 있었으며 (Table 3), 이러한 구조가 활성을 나타냄에 있어 어떠한 영향을 미치는가에 대한 구조와 활성간의 상관관계에 관한 연구는 전무한 실정이다. 또한, 생체의 거의 모든 생리현상에 관여하는 신경성 펩타이드는 주로 효소, 수용체 또는 유전자등의 생물 거대분자와 결합하여 그들의 기능을 조절한다고 알려져 있다. 이들의 간단한 변형은 펩타이드의 구조적 특성에 큰 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라, 생리활성의 변화를 초래한다 (Ro *et al.*, 1995). 최근 cane toad의 소장에서 SP의 잔기의 아미노산이 치환되거나 제거됨에 따라 수축활성 증가 혹은 감소되었음이 보고된 바 있다 (Liu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000). 또한, mosquito (*Culex salinarius*)에서 분리된 tachykinin (Cus-TK)의 잔기를 Ala로 치환하여 microscopic Ca^{2+} imaging의 방법으로 활성을 측정한 결과 Phe⁵와 Arg⁹이 각각 Ala로 치환된 유도체의 경우 활성이 사라져 Cus-TK가 평활근 수축등의 생리활성을 나타내는데 있어 이들 잔기가 중요한 역할을 함이 보고되었다 (Torfs *et al.*, 2002). 따라서, 어떤 펩타이드가 생리활성을 보이기 위해 요구되는 구조를 결정하고, 그 구조를 안정화시키거나 또는 그 구조의 변화를 최소로 하는 방향으로 화학적 변형을 유도하여 구조와 활

성간의 상관관계에 관한 연구를 수행한다면 흥미로울 것이라 생각된다. 그러므로 현재까지 연구가 미비한 극피동물로부터 새로운 신경성 펩타이드를 분리·정제하고, 이들의 구조와 활성간의 상관관계를 연구하고자 하였다.

본 연구에서는 극피동물인 불가사리 *Asterina pectinifera* DRM에 대한 이완활성을 지표로 하여 불가사리에 존재하는 이완활성을 나타내는 3종류의 SF-I, SF-II 및 SF-III를 분리·정제하였으나, SF-II와 SF-III의 일차구조를 완전히 밝히지 못하였다. 따라서, 본 논문에서는 완전한 일차구조가 규명된 SF-I의 2차구조를 조사하기 위하여 CD spectra를 측정하였으며, N-말단 및 C-말단의 유도체 합성을 통해 활성을 나타내는 최소구조를 규명하고자 한다. 또한, SF-I의 잔기를 Ala로 치환한 유도체를 합성하여 이완활성을 나타내는데 있어 중요한 역할을 하는 잔기 및 구조-활성간의 상관관계를 밝히고, SF-I과 *Asterias rubens*로부터 정제된 S1, S2의 이완활성을 불가사리의 DRM, CS 및 TF을 사용하여 비교하고자 한다. 아울러 다양한 signal transduction 경로에 관여하는 약물을 사용하여 불가사리 DRM에 있어 SF-I의 이완 메카니즘을 규명하고자 한다.

Table 1. Amino acid sequence of neuropeptides

Species	Sequence	References
Growth hormone-releasing factor		
<i>Homo sapiens</i> (human)	1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 YADAIFTNSYRKVLGQLSQARKLLQDIMSRRQQGESNQERGARLa	Rivier <i>et al.</i> , 1982
<i>Sus scrofa domestica</i> (pig)	YADAIFTNSYRKVLGQLSQARKLLQDIMSRRQQGERNQEQGARVRLa	Bohlen <i>et al.</i> , 1983
<i>Ovis aries</i> (sheep)	YADAIFTNSYRKVLGQLSQARKLLQDIMSRRQQGERNQEQGAKVRLa	Esch <i>et al.</i> , 1984
<i>Cyprinus carpio</i> (carp)	HADGMFNKAYRKALGQLSARKYLHTLMAKRVGGGSMIEDDNEPLS	Campbell <i>et al.</i> , 1992
<i>Chelyosoma productum</i> (sea squirt)	HSDGIFTKDYRKYLGLRAQKFLQWLM	McRory and Sherwood, 1997
Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)		
Mammalian	1 5 10 15 20 25 HSDAVFTDNYTRLRKMAVKKYLNSILNa	Carlquist <i>et al.</i> , 1979
<i>Gadus morhua</i> (cod)	HSDAVFTDNYSRFRKMAAKKYLNSVLa	Thwaites <i>et al.</i> , 1989
<i>Scyliorhinus canicula</i> (dogfish)	HSDAVFTDNYSRIRKMAVKKYINSLLa	Dimaline <i>et al.</i> , 1988
Substance P		
<i>Homo sapiens</i> (human)	1 5 10 RPPKQQFFGLMa	Chang <i>et al.</i> , 1971
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)	RPPKQQFFGLMa	Conlon <i>et al.</i> , 1988
<i>Amia calva</i> (bowfin)	KPRPHQFFGLMa	Jensen and Conlon, 1992
<i>Petromyzon marinus</i> (sea lamprey)	RKKHQKEFVLMa	Waugh <i>et al.</i> , 1995

* Table 1 was modified from Hoyle, 1998.

Table 2. Amino acid sequences of neuropeptide from several molluscs

Animals (sources)	Peptide name	Amino acid sequence	References
Mytilus (pedal ganglia)	- FMRFa	¹ Ala-Met-Pro-Met-Leu-Arg-Leu-amide ⁵	Hirata et al., 1987
Mytilus (muscle)	Opioid	¹ Try-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe-amide ⁵	Kobayashi and Muneoka, 1990
Mytilus (ABRM)	SCPs	¹ Ala-Pro-Asn-Phe-Leu-Ala-Tyr-Pro-Arg-Leu-amide ¹⁰	Muneoka and Matsuura, 1985
Snail (ganglia)	WW-1 WW-2 WW-3	¹ Trp-Lys-Glu-Met-Ser-Val-Trp-amide ⁵ Trp-Arg-Glu-Met-Ser-Val-Trp-amide Trp-Lys-Glu-Met-Ser-Val-Trp-amide	Minakata et al., 1993 Minakata et al., 1993 Minakata et al., 1993
Leech (whole body)	LEP	¹ Ala-Lys-Cys-Glu-Gly-Trp-Ala-Ile-His-Ser-Cys-Leu ¹⁰ -Gly-Gly-Asn-amide ¹⁵	Minakata et al., 1997
Earthworm (gut)	EEP-1	¹ Ala-Pro-Lys-Cys-Ser-Gly-Arg-Trp-Ala-Ile-His-Ser ¹⁰ -Cys-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly ¹⁵	Oumi et al., 1995

Table 3. The amino acid sequences of the echinoderm SALMF amide family

Peptide name (species)	Sequence	References
S1 (Asteroidea)	¹ Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Leu-Met-Phe-amide ⁵	Elphick <i>et al.</i> , 1991b,c
S2 (Asteroidea)	¹ Ser-Gly-Pro-Tyr-Ser-Phe-Asn-Ser-Gly-Leu-Tyr-Phe-amide ¹⁰ ⁵	Elphick <i>et al.</i> , 1991b,c
GFSKLYFa (Holothuroidea)	¹ Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Tyr-Phe-amide ⁵	Diaz Miranda <i>et al.</i> , 1992
SGTSVLYFa (Holothuroidea)	¹ Ser-Gly-Tyr-Ser-Val-Leu-Tyr-Phe-amide ⁵	Diaz Miranda <i>et al.</i> , 1992
GYSPFMFa (Holothuroidea)	¹ Ser-Gly-Tyr-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide ⁵	Ohtani <i>et al.</i> , 1999
FKSPFMFa (Holothuroidea)	¹ Phe-Lys-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide ⁵	Ohtani <i>et al.</i> , 1999

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 실험동물

실험에 사용한 별불가사리 (*Asterina pectinifera*, 450마리, 체장 8 ~ 15 cm)는 2002년 8월에 경북 포항 호미곶에서 채집하였다. 살아있는 상태의 별불가사리를 즉시 실험에 사용하였다. 본 연구에서 중-특이적 반응을 관찰하기 위해 사용한 *Asterias amurensis*를 제외한 모든 불가사리는 별불가사리인 *Asterina pectinifera*를 사용하였다.

1.2. 시약 및 재료

시료의 여과를 위한 Millex-LCR13 (0.5 μm), Ultrafree-MC (0.45 μm), Syringe filter (0.44 μm)와 Sep-Pak Vac C₁₈ cartridge는 Waters사 (Waters associates, Milford, MA, USA)에서 구입하였고, 정제에 사용한 preswollen CM52는 Whatman (England)로부터 구입하였다. 그리고 펩타이드들을 합성하기 위해 Fmoc-NH-PAL-Resin (0.55 mmol/g), Fmoc-amino acid Wang Resin, Fmoc-amino acid 및 1-hydroxybenzotriazole (HOBT)는 Advanced ChemTech사 (Louisville KY, USA)에서 구입을 하였다. *N,N*-Diisopropylcarbodiimide (DIPCI)는 Watanabe 화학회사 (Hiroshima, Japan)로부터 구입하였다. Piperidine, trifluoroacetic acid (TFA), *m*-cresol, 1,2-ethanedithiol (EDT) 및 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, EYPC (egg-yolk phosphatidylcholine)와 EYPG (egg-yolk phosphatidylglycerol)는 Sigma사 (St. Louis)에서 구입하였다. 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

1.3. 실험약물

이완활성 측정시 precontractile 약물로서 acetylcholine (ACh) 및 carbachol

(CCh)을 사용하였으며, NO synthase의 경쟁적 저해제로 N^G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME)을 이용하였다. 또한, adenylate cyclase inhibitor인 MDL-12,330·HCl, adenylate cyclase의 activator인 forskolin, G-protein activator인 mastoparan, cholinergic receptor 중 비특이적 무스카린성 수용체 inhibitor인 atropine, 선택적 Na⁺ channel blocker인 tetrodotoxin (TTX), 선택적 protein kinase C inhibitor인 NPC-15,437·2HCl, Ca²⁺ channel modulator인 (±) verapamil·HCl를 사용하였다. 또한, calmodulin antagonist인 phenoxybenzamine·HCl과 ganglionic blocking agent인 hexamethonium chloride를 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 불가사리로부터 시료의 추출

살아있는 불가사리 (450마리)를 70 % methanol 용액에 넣어 중탕법으로 65 °C에서 5분간 끓였다. 이후 5 % 초산을 넣고 조직을 파쇄하여 4 °C에서 40분 동안 10,000 x g로 원심분리를 하였다. 침전물은 다시 한번 70 % methanol 용액을 가한 후, 5 % 초산용액을 넣고 homogenizer로 추출하여 처음과 같은 조건으로 원심분리하였다. 이때의 침전물에 대하여 위의 과정을 1회 더 반복하였다. 상층액은 농축시킨 다음, 시료:ethanol = 2:9 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 -20 °C의 냉동고에 보관 후 4 °C에서 40분 동안 10,000 x g로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 그리고 상층액은 다시 농축하여 시료:ethanol = 1:10 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 4 °C에서 40분 동안 10,000 x g로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액은 다시 한번 더 시료:ethanol = 3:10 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 4 °C에서 40분 동안 10,000 x g로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 이 단계를 거친 상층액은 ethanol 및 NaCl을 시료 (1 L):ethanol (8 L):NaCl (11 g)의 비율로 첨가한 후, 4 °C에서 40분 동안 10,000 x g로 원심분리를 행하였고 얻어진 상층액은 농축하였다. 농축한 상층액에 총 농도가 0.1 N HCl이 되도록 1 N HCl을 첨가하고, 4 °C로 50분간 20,000 x g로 원심분리를 행하였다.

원심분리한 상층액은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 주입하였다. 먼저 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 0.1 % TFA가 포함된 100 % methanol

로 활성화시킨 후, 0.1 % TFA가 포함된 H₂O로 충분히 평형화하였다. 충분히 평형화된 다음 시료를 주입하여 0.1 % TFA가 포함된 H₂O (D.W.), 10 % methanol (retained materials; RM10) 및 60 % methanol (RM60)과 100 % methanol (RM100)로 물질들을 각각 용출시켜 불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정에 사용하였다 (Fig. 1).

2.2. 불가사리 DRM에 대한 이완활성 물질의 정제

Fig. 2에 나타나듯이 불가사리 추출물 중 DRM에 대한 이완활성을 가장 강하게 나타낸 RM60은 cation exchange column (CM52, 2.5 × 30 cm), 3종류의 역상 HPLC column (Vydac 218TP510 Protein & peptide C₁₈, 9.2 × 250 mm, 5µm, USA; Hypersil-BDS C₁₈, 2 × 125 mm, 5 µm, HP, USA; Capcellpak C₁₈, 4.6 × 250 mm, 5 µm, Shiseido, Japan), 양이온 교환 HPLC column (TSK-gel SP-5PW, 7.5 × 75 mm, Tosoh, Japan), 음이온 교환 HPLC column (TSK-gel DEAE-5PW, 7.5 × 75 mm, Tosoh, Japan) 및 size exclusion HPLC column (Superdex Peptide HR 10/30, 10 × 300 mm, Pharmacia, Sweden)을 교대 반복적으로 사용하여 정제하였다 (Fig. 2).

이온교환 HPLC를 제외한 모든 역상 HPLC 정제단계에서 A용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2)와 B용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 100 % acetonitrile (CH₃CN) (pH 2.2)을 이용하여 B용매 gradient로 분리·정제하였다. 또한 size exclusion HPLC는 0.1 % TFA를 포함하는 30 % CH₃CN을 사용하여 물질을 용출시켰다. 정제에 사용한 흡수파장은 220 nm, 254 nm 및 280 nm였고, 정제단계에서 얻어진 분획들은 불가사리 DRM에 대하여 이완활성 측정에 사용되었다. 활성 분획은 계속해서 다음 단계의 정제과정에 사용하였고, 하나의 순수한 물질이 얻어질 때까지 HPLC를 이용한 정제과정을 반복하였다.

불가사리 추출물 RM60 (Fig. 1)을 먼저 CM52 (2.5 × 30 cm)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 분리를 행하였다 : gradient, 20 mM → 1.5 M ammonium acetate (pH 5.0, 6시간); 유속, 2.75 mL/min (Fig. 3). 첫단계의 분리에서 fraction 40-45 (Fig. 3의 A region)과 fraction 49-50 (Fig. 3의 B region)에서 활성을 나타내었으며,

각 활성분획은 다음 정제 단계에 적용되었다.

CM52의 활성 분획 (Fig. 3 의 B region)은 두 번째 정제과정으로 역상 HPLC column (Vydac protein & peptide C₁₈, 9.2 × 250 mm)을 이용하였으며, 분리조건은 다음과 같다: gradient, 0 → 100 % B (200분); 유속, 3.0 mL/min; 온도, 40 °C; fraction volume, 4.0 mL. 불가사리 DRM에서 각 분획들의 이완활성을 측정한 결과 fraction 25-26 (Fig. 4의 B-I region)과 fraction 28-31 (Fig. 4의 B-II region)에서 이완활성을 보였다 (Fig. 4). 활성을 나타낸 두 분획들은 각각의 정제 단계를 수행하였다.

2.2.1. 불가사리 추출물 RM60으로부터 SF-I의 정제

Fraction 25-26 (Fig. 4의 B-I region)은 세 번째 단계로 TSK-gel DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A 용매, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 9.2); gradient, 0 → 0.5 M B용매 (100 min), 유속: 0.5 mL/min, 온도: 40 °C (Fig. 5); fraction volume, 1.0 mL. 음이온 교환수지 HPLC를 수행한 후, 불가사리의 DRM에 대한 이완활성을 측정한 결과 fraction 13-14 (Fig. 5의 black bar region)이 활성을 나타냈다. 이 분획들은 농축 후 네 번째 과정으로 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm) column을 이용하여 다시 분리하였으며, 분리조건은 다음과 같다: gradient, 15 → 30 % B (60분); 유속, 1.0 mL/min; 온도, 40 °C. 그 결과 22 % CH₃CN에 해당되는 Fig. 6의 black bar region에서 활성 분획을 얻었다. 이 활성분획은 다섯 번째 역상 HPLC 단계로 네 번째 역상 column과 성질이 다른 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm)을 이용하였다. 이때, B용매의 gradient, 15 → 30 %로 60분 동안 0.5 mL/min의 유속으로 40 °C에서 분리하였으며, 20 % CH₃CN에 해당되는 Fig. 7의 black bar region에서 이완활성 분획을 얻었다 (Fig. 7). 이후 분자량 크기에 따른 분리를 행하기 위하여 size exclusion column인 Superdex Peptide HR 10/30 (10 × 300 mm)를 이용하여 HPLC를 행하였고 (data not shown). 이때 얻어진 활성 peak를 최종적으로 20 % CH₃CN의 isocratic 조건에서 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column을 이용하여 정제하였다. 그 결과, 16.1분

의 머무름시간을 갖는 하나의 순수한 물질을 정제하였고, 정제된 물질은 starfish 추출물로부터 정제되었으므로 편의상 SF-I이라 명명하였다 (Fig. 8).

2.2.2. 불가사리 추출물 RM60으로부터 SF-II의 정제

Fig. 4의 B-II region에 해당되는 fraction 28-31은 세 번째 단계로 TSK-gel DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A 용매, 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 9.2); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 9.2); B 용매의 gradient, 0 → 0.5 M (100 min), 유속: 0.5 mL/min, 온도: 40 °C; fraction volume, 1.0 mL. (Fig. 9). 분리된 분획들을 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 측정한 결과 fraction 14 (Fig. 9의 black bar region)가 활성을 나타냈으며, 이 분획은 농축 후 네 번째 과정으로 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column을 사용하여 다시 분리하였으며, 분리조건은 다음과 같다. B용매의 gradient, 15 → 35 % (60분); 유속, 0.5 mL/min; 온도, 40 °C. 그 결과 23 % CH₃CN에 해당되는 Fig. 10의 black bar region에서 활성 분획을 얻었다. 이 활성 분획은 다섯 번째 단계로 TSK-gel DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A 용매, 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 9.2); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 9.2); B 용매의 gradient, 0 → 0.5 M (100 min), 유속: 0.5 mL/min, 온도: 40 °C. 음이온 교환 HPLC를 수행한 결과, Fig. 11의 black bar region에서 이완활성을 나타냈으며, 이 분획은 여섯 번째 역상 HPLC로 23 % CH₃CN의 isocratic 조건으로 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column을 이용하여 분리하였으며, Fig. 12의 black bar region에서 이완활성을 나타냈다. 이후 분자량 크기에 의하여 분리하기 위해 Superdex Peptide HR 10/30 (10 × 300 mm)를 이용하였고 (Fig. 13A), 얻어진 활성 peak는 최종적으로 23 % CH₃CN의 isocratic 조건에서 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column을 이용하여 정제되었다. 그 결과, 16.7분의 머무름시간을 갖는 하나의 순수한 물질을 정제 하였고 (data not shown), 이 물질을 SF-II로 명명하였다 (Fig. 9).

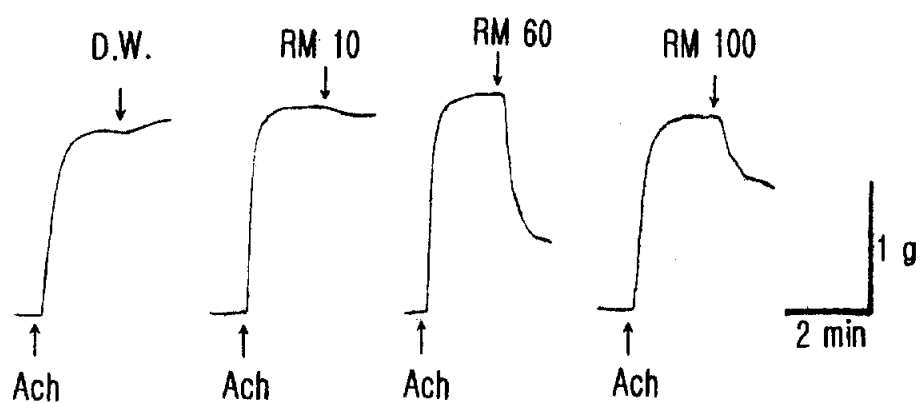


Fig. 1. Typical tracing illustrating the relaxing response of starfish extracts, *Asterina pectinifera*. Each down arrow represents the sample applied to the starfish DRM. The precontraction was induced ACh, 5×10^{-7} M.

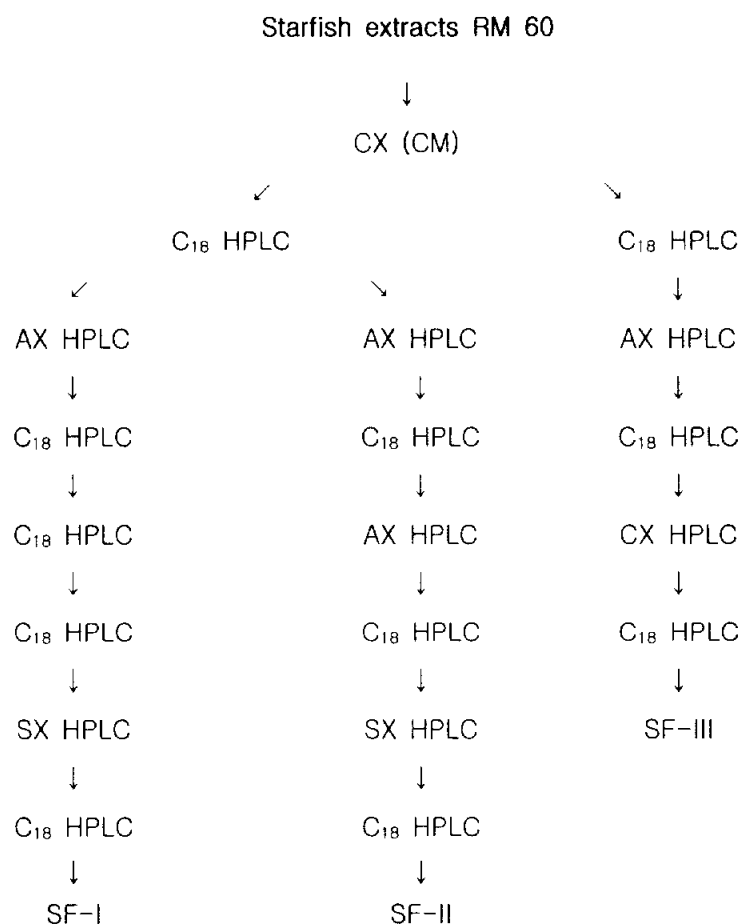


Fig. 2. Summarized procedures for the purification of SF-I~III. C₁₈ HPLC, C₁₈ reverse-phase HPLC. AX HPLC, anion-exchange HPLC. CX HPLC, cation-exchange HPLC. SX HPLC, size-exclusion HPLC.

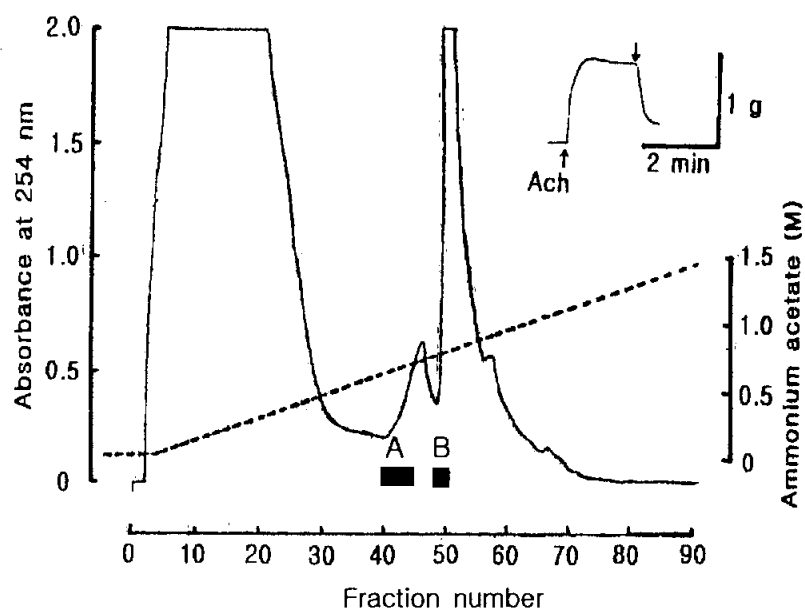


Fig. 3. CM52 cation exchange chromatography of starfish extracts RM60. The RM60 was loaded onto CM52 (2.5 × 300 mm) column and eluted with a gradient of ammonium acetate (dotted line) at flow rate of 2.75 mL/min (pH 5.0). The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

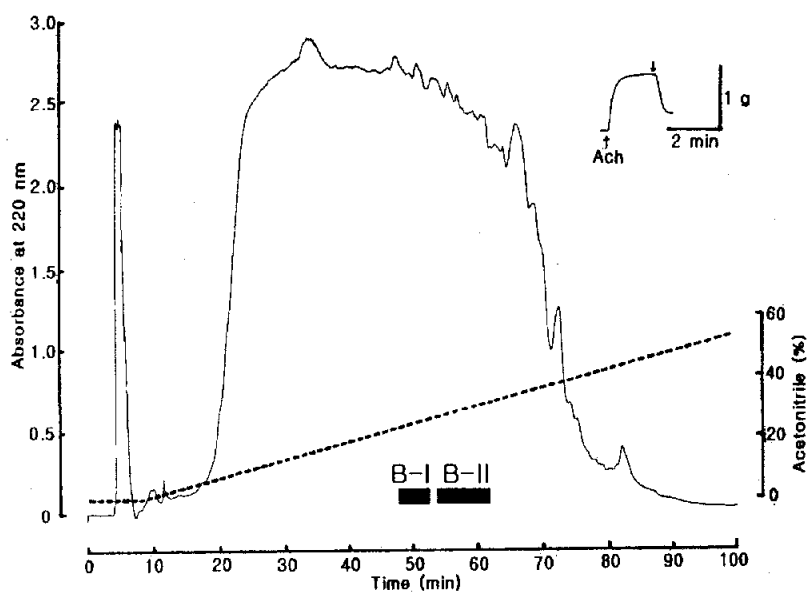


Fig. 4. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction B in Fig. 3. The active fraction B in Fig. 3 was loaded onto Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 3.0 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

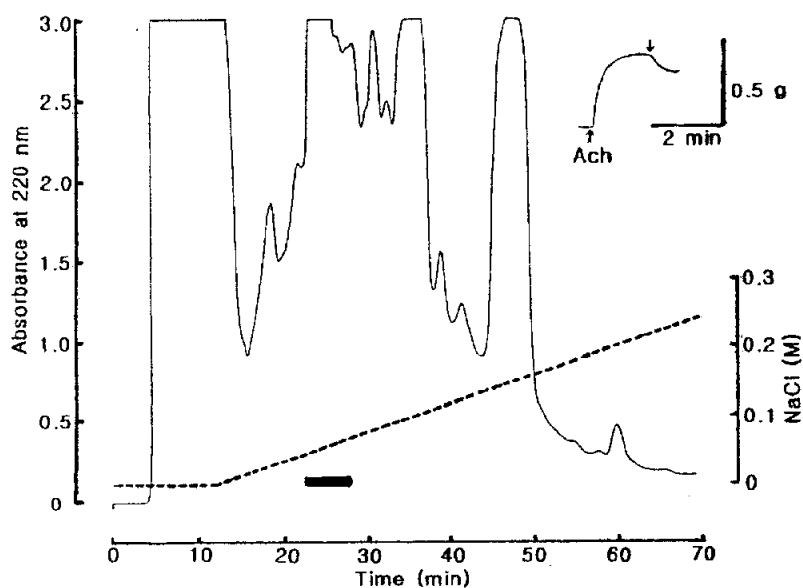


Fig. 5. Anion exchange HPLC profile of the active fraction B-I in Fig. 4. The active fraction B-I in Fig. 4 was loaded onto DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

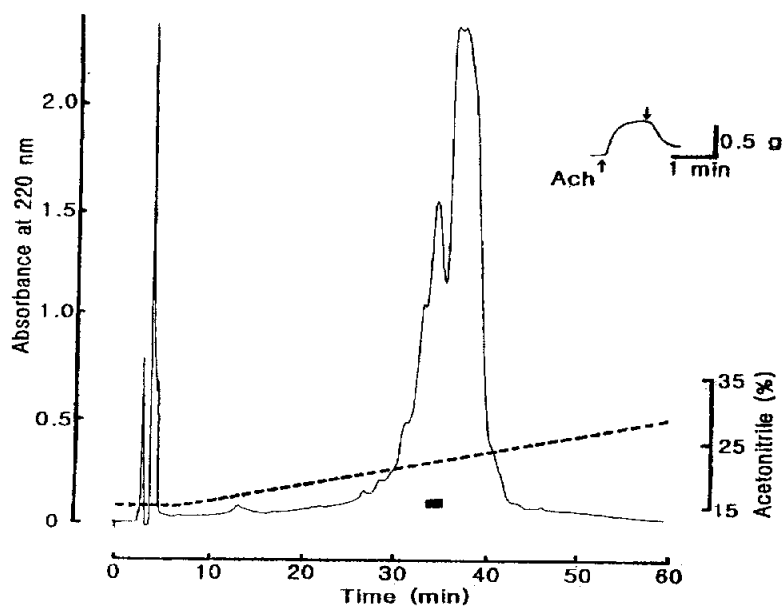


Fig. 6. Reverse-Phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 5. The active fractions in Fig. 5 were pooled and loaded onto Capcellpak C_{18} (4.6×250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH_3CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 1.0 mL/min. The black bar represents relaxing active peak on the starfish DRM.

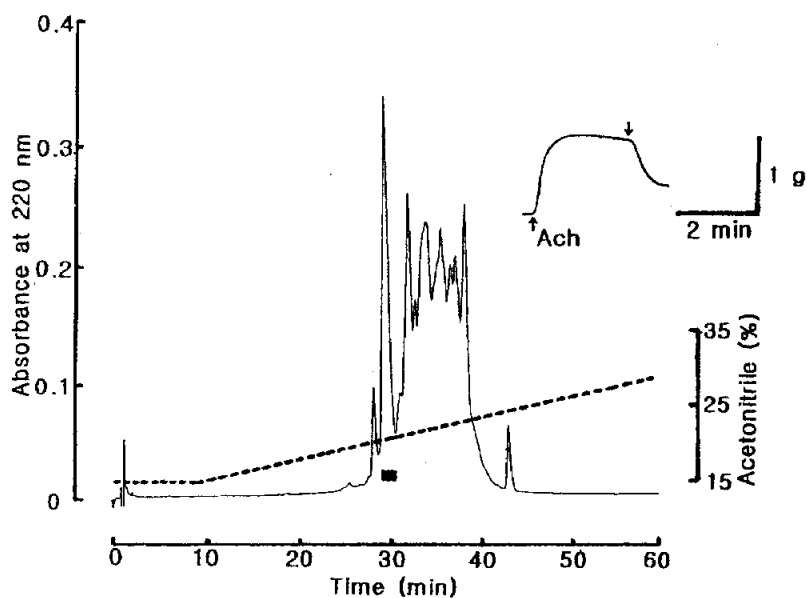


Fig. 7. Reverse-Phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 6. The active fraction in Fig. 6 was pooled and loaded on to Hypersil-BDS C_{18} (2×125 mm) column and eluted with a linear gradient of CH_3CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active peak on the starfish DRM.

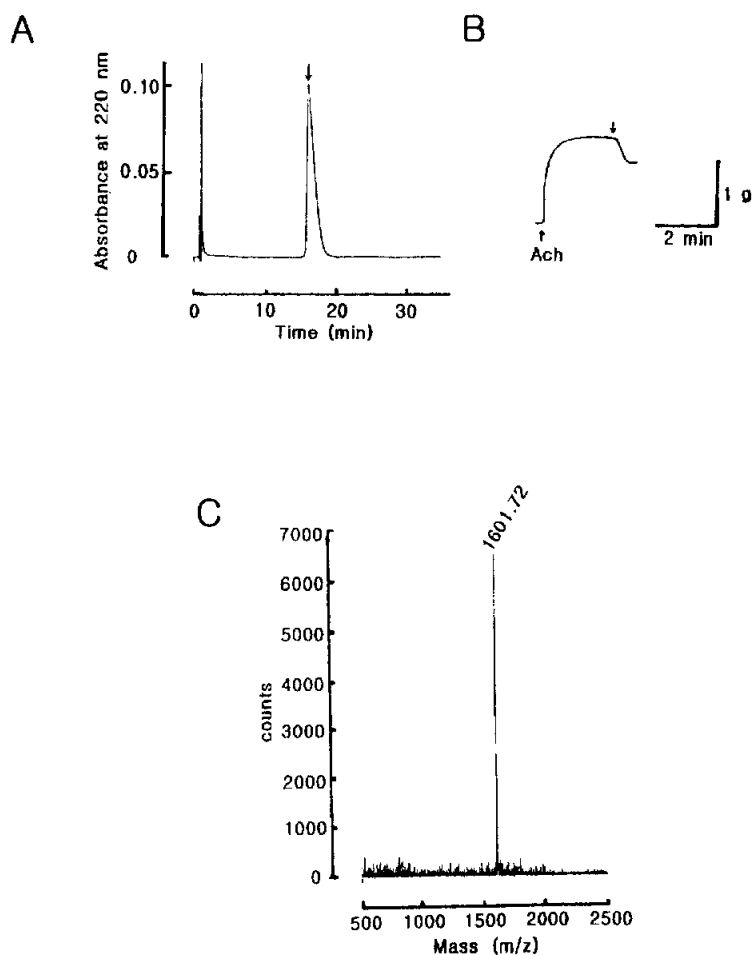


Fig. 8. Final purification of the active fraction in Fig. 7. The active fraction was loaded onto a Hypersil BDS C₁₈ (2 × 125 mm) and eluted with isocratically 20 % CH₃CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A), and the bioassay with the starfish DRM (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 8A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C).

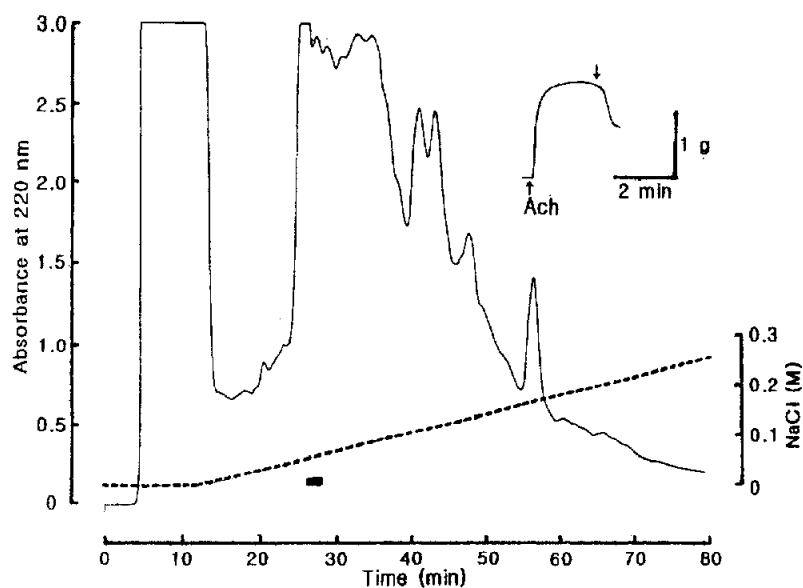


Fig. 9. Anion-exchange HPLC profile of the active fraction B-II in Fig. 4. The active fraction B-II in Fig. 4 was pooled and loaded onto DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

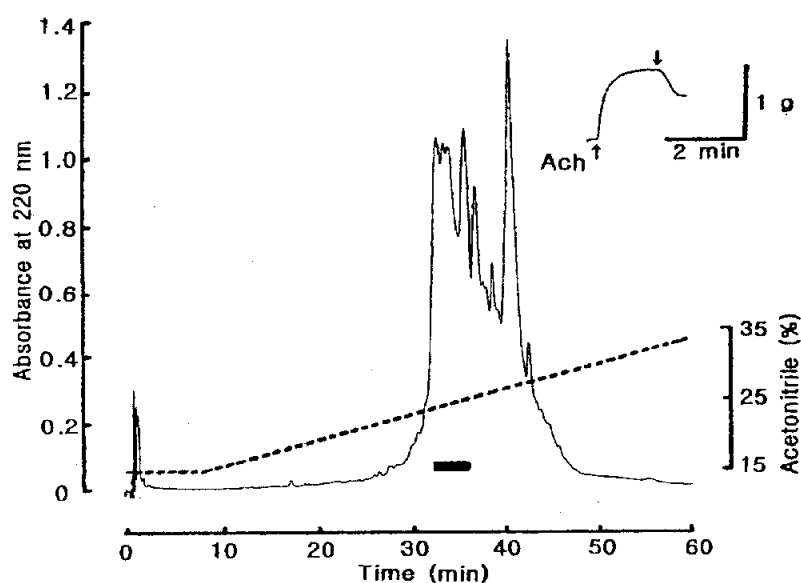


Fig. 10. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 9. The active fraction in Fig. 9 was loaded onto Hypersil-BDS C_{18} (2×125 mm) column and eluted with a linear gradient of CH_3CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active peak on the starfish DRM.

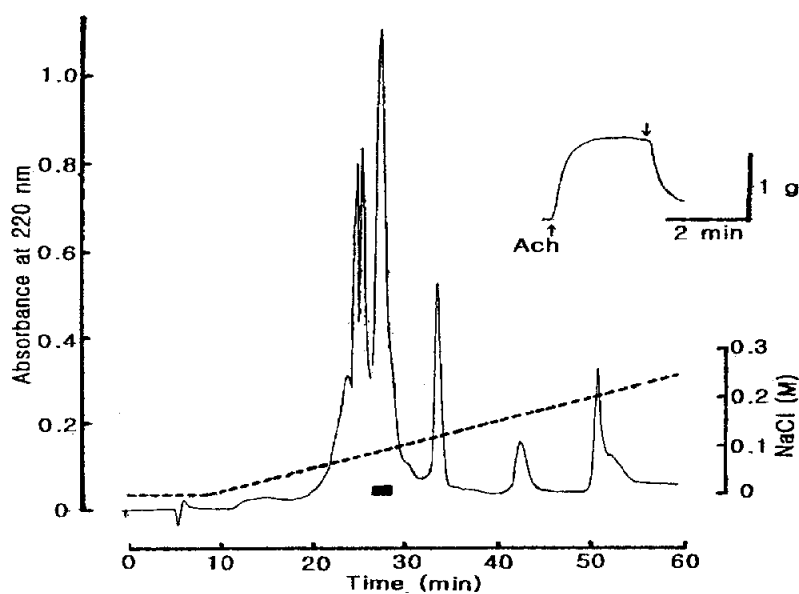


Fig. 11. Anion-exchange HPLC profile of the active fraction in Fig. 10. The active fraction in Fig. 10 was pooled and loaded onto DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

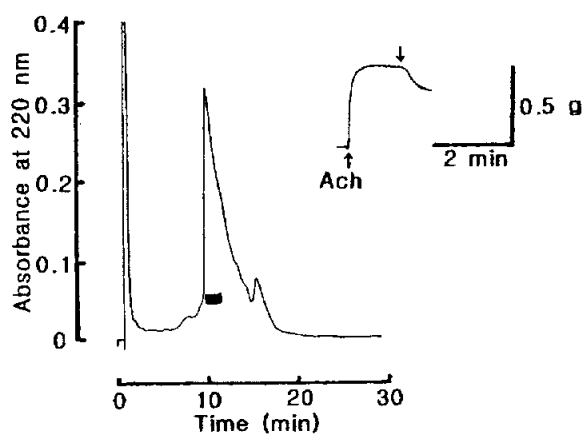


Fig. 12. Reverse-phase HPLC chromatography of the active fraction in Fig. 11. The active fraction in Fig. 11 was pooled and loaded onto Hypersil BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column and eluted with isocratically 23 % CH₃CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

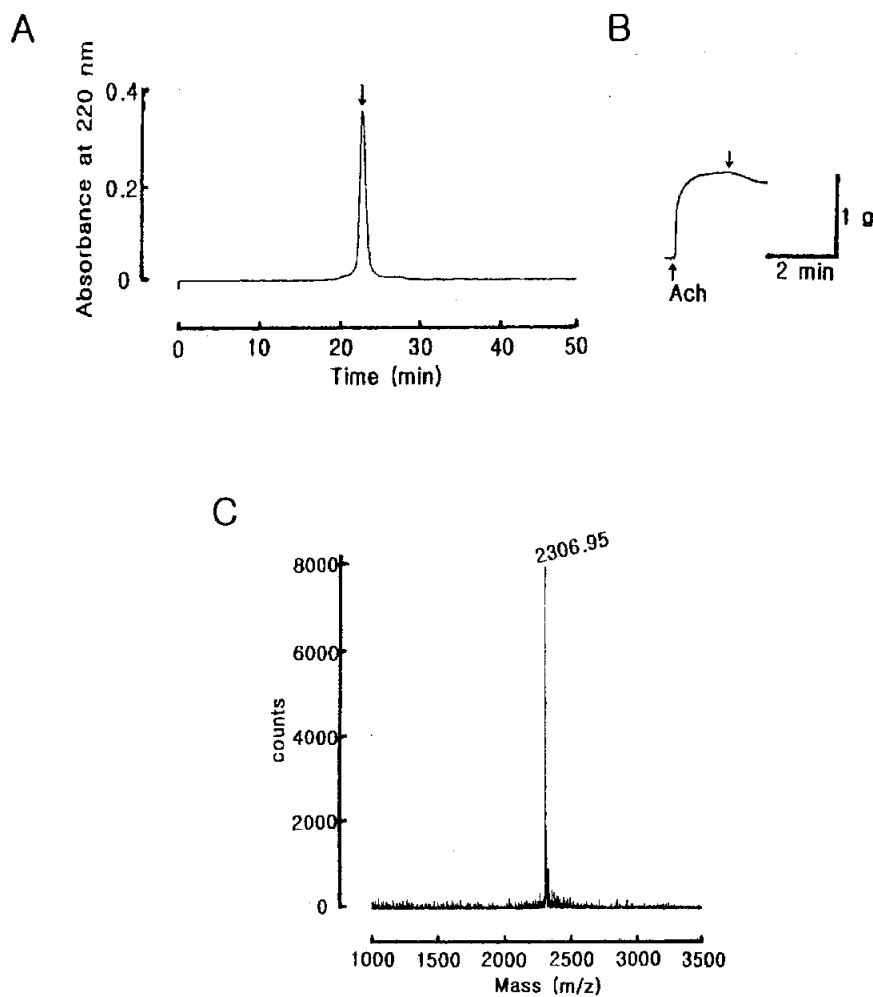


Fig. 13. Final purification of the active fraction in Fig. 12. The active fraction in Fig. 12 was loaded onto a Superdex Peptide HR 10/30 (10 × 300 mm) and eluted with isocratically 30 % CH_3CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A). The bioassay with the starfish DRM (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 13A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C).

2.2.3. 불가사리 추출물 RM60으로부터 SF-III의 정제

CM52의 활성 분획 (Fig. 3의 A region)은 두 번째 정제과정으로 Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) column을 사용하였으며, 분리조건은 다음과 같다. B용매의 gradient, 0 → 100 % (200분); 유속, 3.0 mL/min; 온도, 40 °C; fraction volume, 6.0 mL. 분획들의 활성을 측정한 결과 fraction 34-36 (Fig. 14의 black bar region)에서 활성을 나타내었다. 이 분획들은 세 번째 단계로 TSK-gel DEAE-5PW (7.5 × 75 mm) column을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A 용매, 20 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.8); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 20 mM의 Tris-HCl buffer (pH 8.8); B 용매의 gradient, 0 → 0.5 M (100 min), 유속; 0.5 mL/min, 온도; 40 °C. 불가사리의 DRM에 대한 이완활성을 측정한 결과 Fig. 15의 black bar region이 활성을 나타냈으며, 이 분획들은 농축 후 네 번째 과정으로 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column으로 다시 분리하였으며, 분리조건은 다음과 같다. B용매의 gradient, 20 → 40 % (60분); 유속, 0.5 mL/min; 온도, 40 °C. 활성은 26 % CH₃CN에 해당되는 Fig. 16의 black bar region에서 나타났다. 이 활성분획은 다섯 번째 HPLC 정제단계로 TSK-gel SP-5PW (7.5 × 75 mm) column을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A 용매, 10 mM의 phosphate buffer solution (pH 6.0); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 phosphate buffer solution (pH 6.0); B 용매의 gradient, 0 → 0.5 M (100 min); 유속, 0.5 mL/min; 온도, 40 °C. 양이온 교환수지 HPLC를 수행한 후, 불가사리의 DRM에 대한 이완활성을 측정한 결과 Fig. 17의 black bar region이 활성을 나타냈으며, 이 분획들은 농축 후 여섯 번째 과정으로 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm)로 다시 분리하였으며, 분리조건은 다음과 같다. B용매의 gradient, 25 → 30 % (50분); 유속, 0.5 mL/min; 온도, 40 °C (data not shown). 활성을 보였던 분획들은 마지막 단계로 25 % CH₃CN의 isocratic 조건에서 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column을 이용하여 정제하였다. 그 결과, 22.93분의 머무름시간을 갖는 하나의 순수한 물질을 얻었으며 (Fig. 18A), 이 물질을 SF-III로 명명하였다 (Fig. 18).

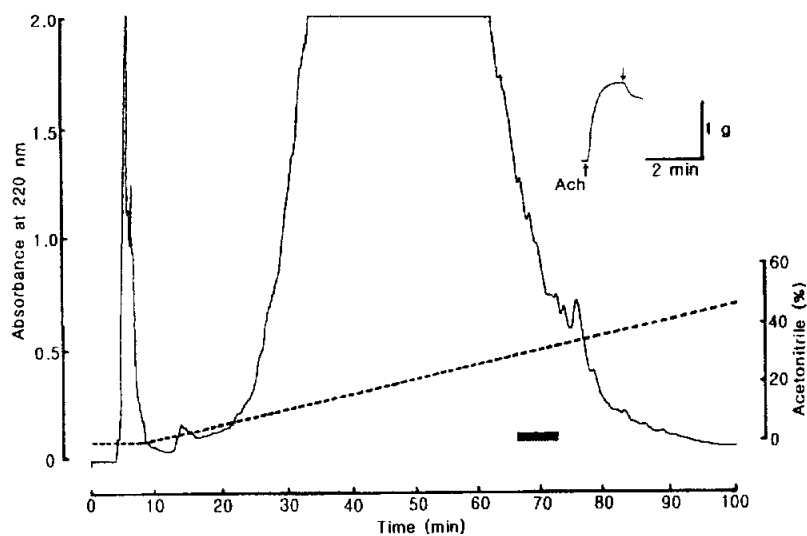


Fig. 14. Reverse-Phase HPLC profile of the active fraction A in Fig. 3. The fraction A in Fig. 3 was pooled and loaded onto Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 3.0 mL/min. The black bar represents relaxing active fraction on the starfish DRM.

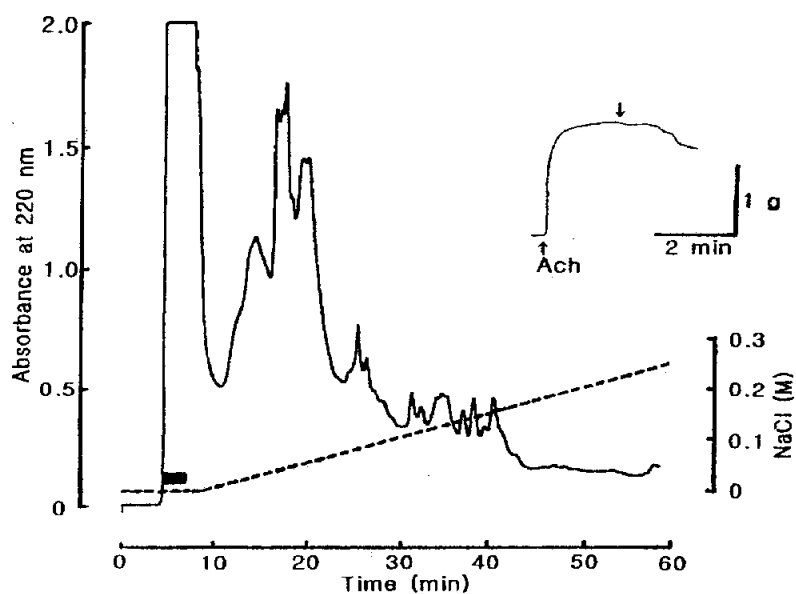


Fig. 15. Anion-exchange HPLC chromatography of the active fraction in Fig. 14. The active fraction in Fig. 14 was pooled and loaded onto DEAE-5PW (7.5 $\times$ 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fractions on the starfish DRM.

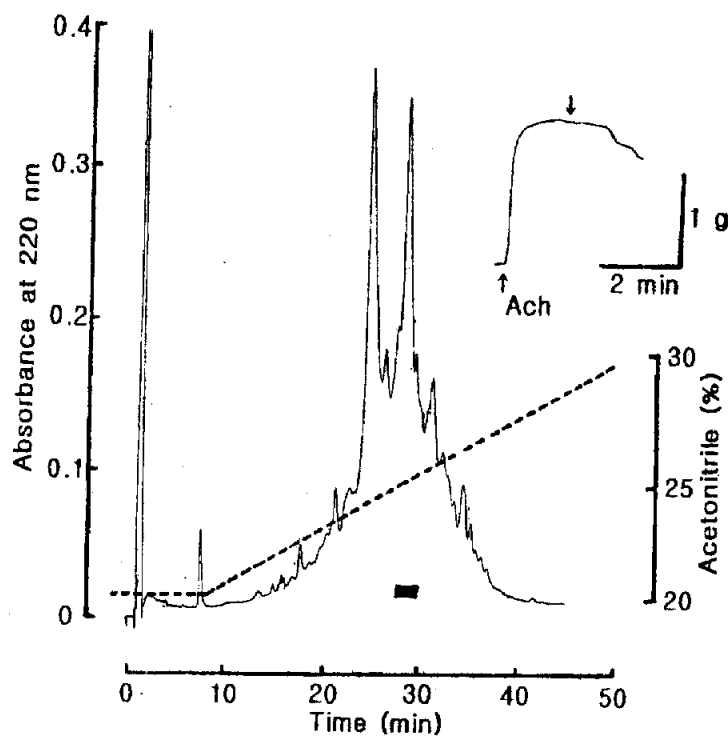


Fig. 16. Reverse-phase HPLC profile of the active fraction in Fig. 15. The active fraction in Fig. 15 was pooled and loaded onto Hypersil BDS C_{18} (2×125 mm) column and eluted with a linear gradient of CH_3CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fraction on the starfish DRM.

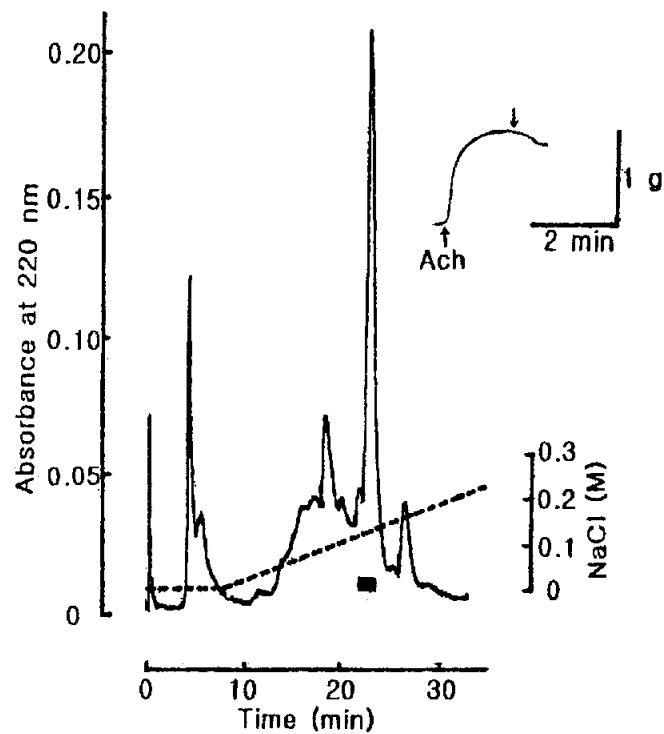


Fig. 17. Cation exchange HPLC profile of the active fraction in Fig. 16. The active fraction in Fig. 16 was loaded onto SP-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.0) at flow rate of 0.5 mL/min. The black bar represents relaxing active fraction on the starfish DRM.

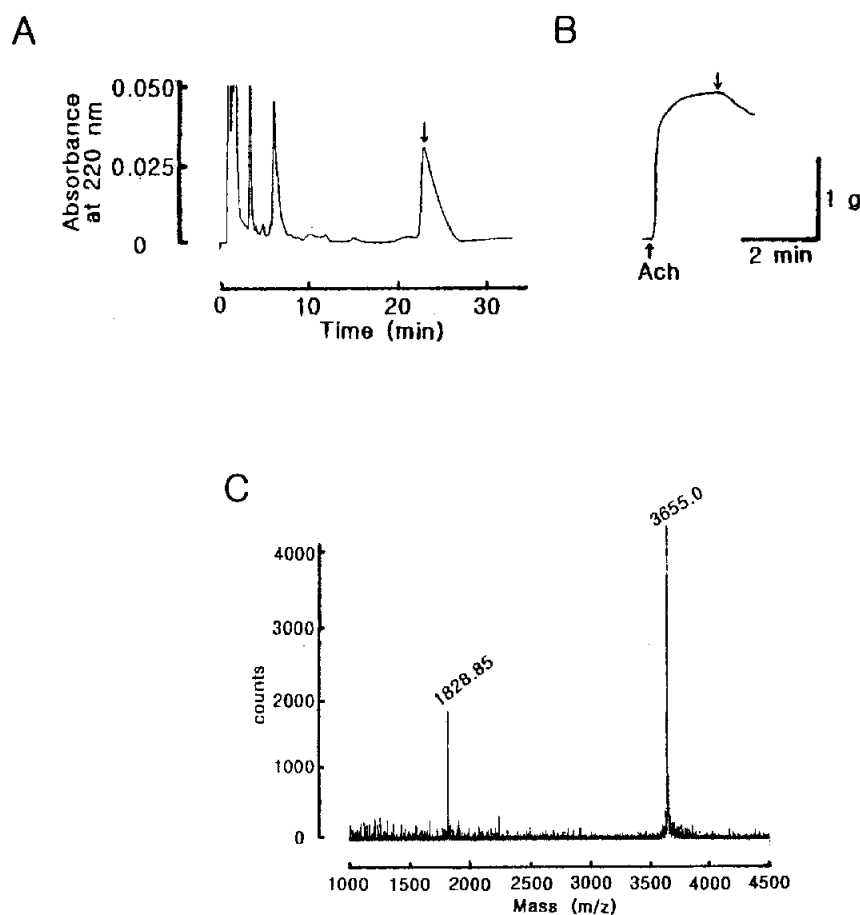


Fig. 18. Final purification of the active fraction in Fig. 17. The active fraction in Fig. 17 was loaded onto a Hypersil BDS C₁₈ (2 × 125 mm) and eluted with isocratically 25 % CH₃CN in 0.1 % TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A), and the bioassay with the starfish DRM (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 18A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C).

2.3. 천연 및 합성펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열결정

2.3.1. 분자량 측정

천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 측정은 부경대학교 공동실험실습관에 있는 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DE™ STR spectrometer, Perseptive Biosystems, U.S.A)를 사용하여 측정하였다.

2.3.2. 아미노산 서열 결정

불가사리로부터 정제한 펩타이드들의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 일본 Fukuoka 대학에 있는 automated protein sequencer PPSQ-21A (Shimadzu, Ltd., Japan)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

2.3.3. 합성물의 비교

정제한 천연물과 합성물의 동일성은 분자량 측정과 역상 (reverse-phase) HPLC column을 이용한 머무름시간 (retention time, RT)을 비교함으로써 확인하였다. 정제한 합성 펩타이드는 Vydac protein & peptide C₁₈ (4.6 × 250 mm) column을 사용하여 22 % CH₃CN의 isocratic 조건으로 비교하였다.

2.4. 펩타이드 유도체의 합성 및 정제

2.4.1. 펩타이드의 합성

Fmoc-법을 사용하여 고상법으로 펩타이드를 합성하였다. Table 4는 펩타이드를 합성하기 위해서 각 아미노산의 축합단계에 필요한 조작과정을 나타낸다. 우선 DMF로 수지 (resin)를 팽윤 (swelling) 시킨 후, 20 % piperidine/DMF를 이용하여 수지로부터 Fmoc-보호기를 절단하였다. DIPCI/HOBT법을 이용하여 결합시키고자 하는 아미노산의 카르복실기를 에스테르 형태로 활성화시켜, NH₂-PAL-resin 또는 NH₂-amino acid-Wang-resin과 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 성장시켰다. 본 연구에서 사용한 합성 펩타이드는 Table 5에 나타내었다. 구조-활성간의 상

관관계를 알아보기 위해 N-말단에서 아미노산이 하나씩 순차적으로 제거된 SF-I(2-16), SF-I(3-16), SF-I(4-16), SF-I(5-16), SF-I(6-16), SF-I(7-16), SF-I(8-16), SF-I(9-16), SF-I(10-16), SF-I(11-16), SF-I(12-16) 및 SF-I(13-16)의 N-말단 유도체를 합성하였다. 또한, C-말단에서 아미노산이 순차적으로 제거된 유도체 SF-I(1-15), SF-I(1-14), SF-I(1-13), SF-I(1-12), SF-I(1-11) 및 SF-I(1-10)를 합성하였고, C-말단과 N-말단의 아미노산 일부가 제거된 유도체, SF-I(5-14)도 합성하였다. 또한, 이완활성을 나타내는 중요 잔기를 알아보기 위하여 SF-I에 있는 각각의 하나의 잔기를 Ala로 치환한 14종류의 SF-I 유도체 및 SF-I(5-14)를 모델로 하여 각각의 잔기를 Ala로 치환한 8종류의 유도체를 합성하였다.

2.4.2. 펩타이드-수지의 절단과 탈보호

합성 펩타이드에 연결되어 있는 수지와 측쇄 (side chain)의 보호기를 제거하기 위해서 절단시약 [TFA (4 mL) : *m*-cresol (0.4 mL) : thioanisole (0.8 mL) : EDT (0.5 mL)]을 사용하여 실온에서 90 분간 반응을 시켰다. 반응 후, 수지를 여과한 다음 펩타이드 용액을 진공농축 하였다. 계속해서 농축액에 차가운 에테르를 첨가하여 펩타이드를 결정화 및 절단시약을 제거 시킨 후, 5 % 초산 용액으로 녹여 농축 후 동결건조 시켰다.

2.4.3. 합성 펩타이드의 정제

불가사리로부터 정제한 SF-I의 합성 펩타이드 및 Table 5에 나타낸 다양한 유도체들은 Vydac 218TP510 Protein & peptide C₁₈ (9.2 × 250 mm)을 사용하여 유속 3.0 mL/min으로 정제하였으며, 각 유도체들의 분리조건은 Table 6에 나타내었다.

Table 4. Procedure for solid-phase peptide synthesis

Step	Reagent	Operation	Mix time (min)
1	DMF	3×Washing	3
2	20 % piperidine/DMF	2×Deprotection 1×Deprotection	3 20
3	DMF	6×Washing	1
4	Fmoc-amino acid HOBt/DMF and DIPCI in DMF	Coupling	90
5	DMF	3×Washing	1

Table 5. The amino acid sequences of peptide used in this study

Peptide	Sequence
SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I amide	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D-NH ₂
N-terminal analogs	
SF-I(2-16)	G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(3-16)	K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(4-16)	G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(5-16)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(6-16)	A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(7-16)	Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(8-16)	D-P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(9-16)	P-L-S-A-G-F-T-D
SF-I(10-16)	L-S-A-G-F-T-D
SF-I(11-16)	S-A-G-F-T-D
SF-I(12-16)	A-G-F-T-D
SF-I(13-16)	G-F-T-D
C-terminal analogs	
SF-I(1-15)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T
SF-I(1-14)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F
SF-I(1-13)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G
SF-I(1-12)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A
SF-I(1-11)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S
SF-I(1-10)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L
SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F

Table 5. Continued

Peptide	Sequence
Ala-substituted	
[Ala ¹]SF-I	A-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ²]SF-I	F-A-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ³]SF-I	F-G-A-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ⁴]SF-I	F-G-K-A-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ⁵]SF-I	F-G-K-G-A-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ⁷]SF-I	F-G-K-G-G-A-A-D-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ⁸]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-A-P-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ⁹]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-A-L-S-A-G-F-T-D
[Ala ¹⁰]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-A-S-A-G-F-T-D
[Ala ¹¹]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-A-A-G-F-T-D
[Ala ¹³]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-A-F-T-D
[Ala ¹⁴]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-A-T-D
[Ala ¹⁵]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-A-D
[Ala ¹⁶]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-A
[Ala ⁵]SF-I(5-14)	A-A-Y-D-P-L-S-A-G-F
[Ala ⁷]SF-I(5-14)	G-A-A-D-P-L-S-A-G-F
[Ala ⁸]SF-I(5-14)	G-A-Y-A-P-L-S-A-G-F
[Ala ⁹]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-A-L-S-A-G-F
[Ala ¹⁰]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-A-S-A-G-F
[Ala ¹¹]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-A-A-G-F
[Ala ¹³]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-S-A-A-F
[Ala ¹⁴]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-A
S1	G-F-N-S-A-L-M-F-NH ₂
S2	S-G-P-Y-S-F-N-S-G-L-T-F-NH ₂
FMRFa	F-M-R-F-NH ₂
FLRFa	F-L-R-F-NH ₂

Table 6. Purification condition of synthetic SF-I and its analogs

Peptide	Gradient (time)	Isocratic condition
SF-I	18 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
SF-I amide	18 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
N-terminal analogs		
SF-I(2-16)	19 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	23 %
SF-I(3-16)	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
SF-I(4-16)	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	24 %
SF-I(5-16)	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
SF-I(6-16)	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
SF-I(7-16)	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	21 %
SF-I(8-16)	18 → 23 % CH ₃ CN (15 min)	18 %
SF-I(9-16)	17 → 22 % CH ₃ CN (15 min)	17 %
SF-I(10-16)	15 → 20 % CH ₃ CN (15 min)	15 %
SF-I(11-16)	10 → 15 % CH ₃ CN (15 min)	10 %
SF-I(12-16)	10 → 15 % CH ₃ CN (15 min)	10 %
SF-I(13-16)	10 → 15 % CH ₃ CN (15 min)	10 %
C-terminal analogs		
SF-I(1-15)	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	25 %
SF-I(1-14)	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	25 %
SF-I(1-13)	18 → 22 % CH ₃ CN (15 min)	19 %
SF-I(1-12)	18 → 22 % CH ₃ CN (15 min)	20 %
SF-I(1-11)	17 → 22 % CH ₃ CN (15 min)	17 %
SF-I(1-10)	17 → 22 % CH ₃ CN (15 min)	17 %
SF-I(5-14)	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	24 %

* SF-I and its analogs were loaded onto Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) at flow rate of 3.0 mL/min.

Table 6. Continued

Peptide	Gradient (time)	isocratic condition
Ala-substituted		
[Ala ¹]SF-I	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	21 %
[Ala ²]SF-I	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	21 %
[Ala ³]SF-I	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	23 %
[Ala ⁴]SF-I	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
[Ala ⁵]SF-I	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
[Ala ⁷]SF-I	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	20 %
[Ala ⁸]SF-I	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	21 %
[Ala ⁹]SF-I	20 → 25 % CH ₃ CN (15 min)	21 %
[Ala ¹⁰]SF-I	17 → 22 % CH ₃ CN (15 min)	17 %
[Ala ¹¹]SF-I	21 → 26 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
[Ala ¹³]SF-I	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	23 %
[Ala ¹⁴]SF-I	18 → 23 % CH ₃ CN (15 min)	18 %
[Ala ¹⁵]SF-I	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	23 %
[Ala ¹⁶]SF-I	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	23 %
[Ala ⁵]SF-I(5-14)	21 → 26 % CH ₃ CN (15 min)	23 %
[Ala ⁷]SF-I(5-14)	21 → 26 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
[Ala ⁸]SF-I(5-14)	21 → 26 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
[Ala ⁹]SF-I(5-14)	21 → 26 % CH ₃ CN (15 min)	22 %
[Ala ¹⁰]SF-I(5-14)	19 → 24 % CH ₃ CN (15 min)	19 %
[Ala ¹¹]SF-I(5-14)	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	24 %
[Ala ¹³]SF-I(5-14)	22 → 27 % CH ₃ CN (15 min)	24 %
[Ala ¹⁴]SF-I(5-14)	19 → 24 % CH ₃ CN (15 min)	19 %

※ SF-I and its analogs were loaded onto Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) at flow rate of 3.0 mL/min.

2.5. Circular dichroism (CD) 스펙트럼의 측정

2.5.1. 리포솜의 제조

Small unilamellar vesicles (SUVs)은 이전의 방법을 이용하여 제조하였다 (Park et al., 1997). SUVs는 각각 중성 및 산성지질로서 EYPC, EYPC:EYPG (3:1)의 조성으로 이루어졌고, 질소 가스로 건조 시켰다. Ultrasonic homogenizer (TAITEC, VP-30s)를 사용하여 10분간 반복하여 교반한 후, 150 mM NaCl이 포함된 20 mM TES 완충액 (pH 7.4) 3 mL를 넣어 수화한 후, CD 스펙트럼 측정에 사용하였다.

2.5.2. CD 스펙트럼의 측정

TES 완충액, EYPC, EYPC:EYPG (3:1) 및 50 % TFE하에서 SF-1의 2차구조를 확인하기 위하여 1 mm pathlength의 quart cell을 사용하여 JASCO J-600 spectro polarimeter로 CD 스펙트럼을 측정하였다. 스펙트럼은 150 mM NaCl이 포함된 20 mM TES 완충액 (pH 7.4) 존재하에서 5×10^{-5} M 펩타이드 농도로 측정하였다. 중성 지질인 EYPC와 산성지질인 EYPC:EYPG (3:1) 리포솜 존재하에서 펩타이드는 2 mM 인지질 리포솜을 포함하는 20 mM TES 완충액 (pH 7.4)에 용해되었다. α -helical contents는 다음의 식으로부터 계산하였다 (Pouny and Shai, 1992).

$$f_h = ([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) \div [\theta]_{222}^{100}$$

$[\theta]_{222}$, 실험적으로 얻어진 평균 residue : $[\theta]_{222}^0$ 와 $[\theta]_{222}^{100}$ 는 각각 222 nm에서 측정한 0 %와 100 % helical 함유량 (2,000과 30,000 deg·cm²·dmol⁻¹)의 값이다.

2.6. 생리활성 측정

불가사리 추출물 및 정제된 SF-1의 생리활성을 측정하기 위해 불가사리의 DRM, CS 및 TF와 rat aorta 및 atrium을 사용하였다.

2.6.1. 조직의 표본제작

2.6.1.1. 불가사리 DRM 및 tube foot (TF)

불가사리의 eye spot을 제거한 후 배면과 복면을 분리하여 배면을 뒤집으면, 5개 팔을 따라 중앙을 가로지르는 DRM을 발견할 수 있다 (Fig. 19B). 이 muscle을 mess로 분리한 후, 20 mm정도의 단편으로 만든다. 또한, 복면의 보대판 (ambulacral plate)과 함께 TF를 한 개씩 절단하여 ampulla쪽을 아래쪽으로 하여 적출한다 (Fig. 19B). 모든

과정은 55 mM Mg^{2+} artificial sea water (인공해수, ASW)하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다 : (mM) NaCl 445, KCl 10, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 55, Glucose 10, and pH 7.8 Tris-HCl 20.

2.6.1.2. 불가사리 cardiac stomach (CS)

불가사리의 배면과 복면을 조심스레 분리한 후, 복면의 중앙에 위치한 5부분의 cardiac stomach 중 한 부분을 면실로 묶는다 (Fig. 19B). 이후 보대판으로부터 해부용 메스와 가위를 이용해 조직에 손상이 가지 않도록 떼어 낸다. 모든 과정을 DRM과 같은 인공해수 (ASW)상에서 행하였다.

2.6.1.3. Rat aorta 및 atrium

Male SD계 rat (230~250 g)을 decapitation하여 복부를 절개한 후 척추를 따라 위치한 aorta를 절취하였다. 절취한 혈관의 결체조직을 제거하고, 2 mm 정도의 혈관 고리를 만들어 5 mL 반응조에 고정시켰다. Rat atrium은 개복 후 조직에 손상이 없도록 심장을 모두 들어낸 상태에서 절취하였다. 모든 조직은 Krebs's buffer하에서 이루어 졌으며, 조성은 다음과 같다 : (mM), NaCl 118.7, KCl 4.7, $CaCl_2$ 1.8, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 24.8 and Glucose 10.1. 이러한 용액은 95 % O_2 와 5 % CO_2 로 20분간 포화시킨 후 37 °C로 유지되는 반응조에 적용되었다.

2.6.2. 이완활성의 측정

2.6.2.1. 불가사리 DRM에서의 이완활성 측정

준비된 각 단편들은 organ bath내의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 isometric transducer에 연결 (Fig. 19C)하여 resting tension이 1 g이 되도록 90분간 평형화 시켰다. 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10^{-6} M ACh을 투여하여 활성화 시켰고, 15분후 10^{-6} M의 ACh을 투여하여 근육을 수축시킨 후, 펩타이드를 농도별로 누적 투여하였다. 작용 메커니즘을 규명하기 위한 signal transduction 약물을 전처리한 후 10분 후에 10^{-6} M의 ACh을 투여하였고 이후 펩타이드를 적용시켰다.

2.6.2.2. 불가사리 CS에서의 이완활성 측정

준비된 stomach는 2 mL 반응조에 DRM과 같은 방법으로 장치되었고, resting tension이 0.5 g이 되도록 60분간 평형화 시켰다. 이후 10^{-5} M CCh을 전처리하여 수축시킨 후, 10^{-4} M 펩타이드를 투여하였다.

2.6.2.3. 불가사리 TF에서의 이완활성 측정

반응조의 지지대에 TF를 고정시킨 후, 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 resting tension 0.5 g이 되도록 60분간 평형화 시킨다. 이후 30 mM high- K^+ ASW를 ASW 대신 반응조에 공급하여 조직을 최대로 수축시킨다. 수축이 안정화 되면 10^{-4} M 펩타이드를 투여 하였다.

2.6.2.4. Rat aorta 및 atrium에서의 활성 측정

준비된 aorta혈관을 force displacement transducer (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)와 5 mL 반응조와 연결된 L-type wire에 걸었다. 반응조에 담겨진 혈관은 1 g 장력이 유지 되도록 90분간 평형화 시켰고, 10분 간격으로 buffer를 교체해 주었다. 1 g tension이 유지되면 50 mM high- K^+ solution으로 3회 활성화 시켰고, 이후 혈관 수축물질인 10^{-6} M의 norepinephrine (NE)를 이용하여 수축시킨 후 peptide를 투여하였다. Atrium은 bio tachometer와 연결된 transducer (Narco F-60, Narco Biosystem Inc., U.S.A.)와 지지대에 연결되었고, 1 g의 장력을 주어 안정화 시켰다. 이후 10^{-5} M의 NE를 이용하여 수축시킨 후 peptide를 투여하였다.

2.6.3. 통계처리

이완활성은 10^{-6} M ACh 및 10^{-5} M CCh의 최대수축에 대한 상대적 이완 %로서 나타났다. 한편, 반응의 크기는 ED_{50} (최고 이완의 50 %를 나타낼 때의 농도) 및 E_{max} (10^{-5} M에서의 이완 %)로서 비교하였다. ED_{50} 값은 least square method로 계산하였으며, 통계적 처리는 student's t-test로서 했다. 모든 반응 값은 means $\pm$ s.e.로 표시하였다.

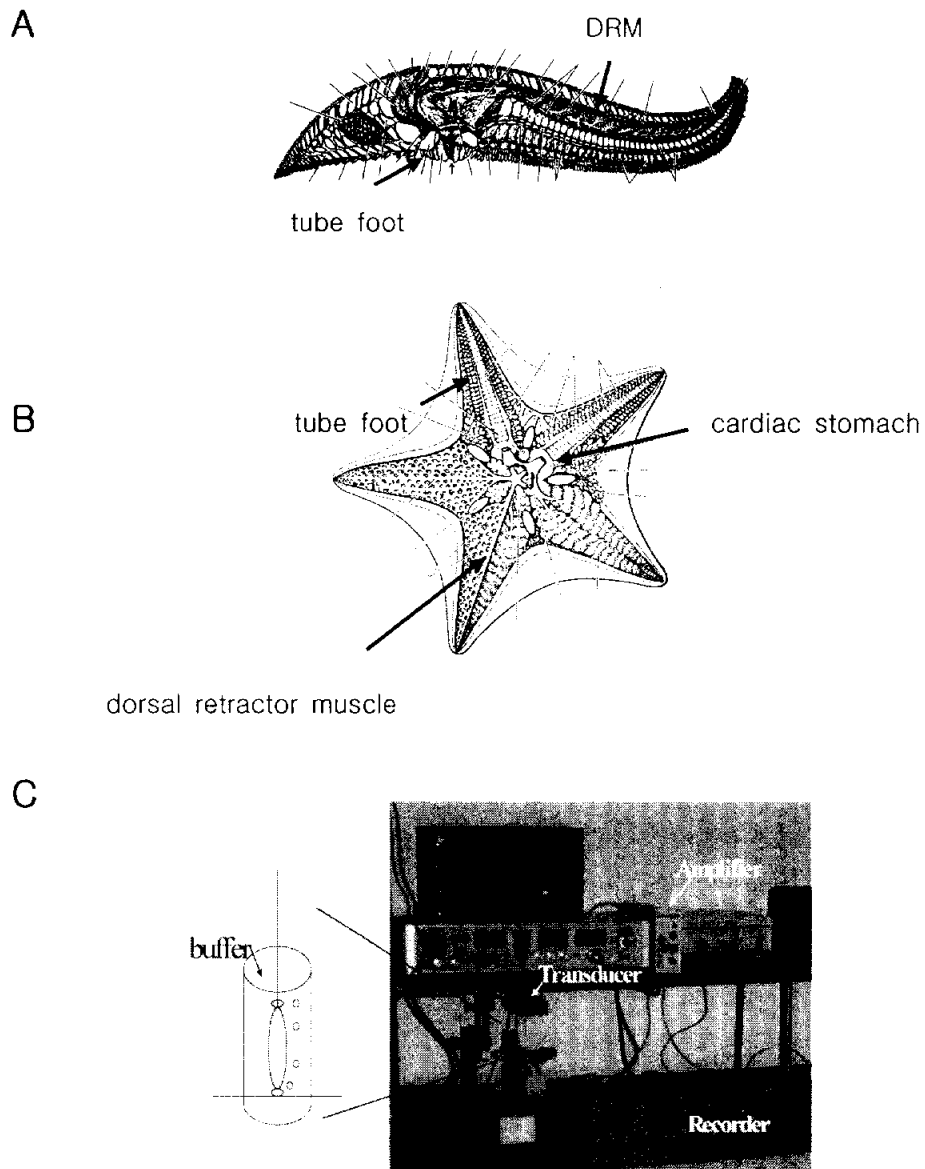


Fig. 19. Vertical section through madreporite (A), horizontal section (B) and physiography system (C) to measure the relaxing effect on the DRM.

III. 결 과

1. 불가사리로부터 이완성 펩타이드의 추출

불가사리 추출물에서 여러 단계의 유기용매, NaCl 및 산의 첨가과정을 거쳐 고분자량의 단백질, 당 및 지방을 제거하였다. 그 후 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 부분정제한 각각의 추출물 (D.W., RM10, RM60, RM100)을 사용하여 starfish DRM에 대해 이완활성을 측정하였다. 그 결과 RM60에서 가장 강한 활성을 나타내었으며, RM10과 RM100에서도 이완활성을 보였다. 반면, D.W.에서는 약간의 수축증가를 보였다 (Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 가장 강한 이완활성을 지닌 RM60을 사용하여 이완성 펩타이드를 정제하였다.

2. 불가사리 DRM에 대한 이완성 펩타이드의 정제

불가사리로부터 추출한 RM60을 정제하기 위해 먼저 양이온 교환수지인 CM52 column (25 × 300 mm)을 사용하였으며, 분리된 분획들은 불가사리 DRM에 대해 이완활성 측정하였다. 그 결과 column에 결합하는 성질을 갖는 Fig. 3의 A region과 B region에서 이완활성을 나타내었고, 이들 분획은 다음 정제 단계에 사용되었다.

2.1. SF-I의 정제

Fig. 3의 B region은 두 번째 정제단계로 Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) column에 적용되었고, Fig. 4의 B-I region과 B-II region에서 이완활성을 보였다. Fig. 4의 B-I region은 세 번째 단계로 음이온 교환수지인 DEAE column에 적용되었고, 0.05 M NaCl에서 용출된 분획에서 활성을 나타내었다 (Fig. 5). Column에 결합하는 성질로 미루어 보아 활성을 나타내는 분획에는 아마도 산성아미노산을 포함하는 것으로 생각되어진다. 계속해서 이 분획은 네 번째 단계로 두 번째 단계와 다른 성질의 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm) column을 이용하였다 (Fig. 6). 이때 0.25 %/min의 농도 구배를 주었으며, 22 % CH₃CN에서 이완활성을 지닌 분획을 얻었다. 이 활성 분획은 다른 성질의 C₁₈ column인 Hypersil BDS column에 네 번째 단계와 같은

조건으로 적용되었고, 20 % CH₃CN에서 활성 분획을 얻었다 (Fig. 7). 계속해서 분자량 크기에 의한 분리를 하기 위해 size exclusion column에 적용하였다. 그 결과 머무름시간 24분에서 단일 peak로 용출되었고, 최종적으로 Hypersil BDS (2 × 125 mm) column에서 20 % CH₃CN의 isocratic조건으로 머무름시간 16.1분인 단일 peak를 얻었다. MADLI-TOF mass를 사용하여 물질의 분자량을 측정한 결과 1601.72 Da이라는 것이 확인되었다 (Fig. 8).

2.2. SF-II의 정제

Fig. 4의 B-II region을 정제하기 위해 세 번째 단계로 DEAE (7.5 × 75 mm) column을 사용하였다. 그 결과, column에 흡착되어 0.07 M NaCl에서 용출되는 분획에서 활성을 나타냈다 (Fig. 9). 이 활성 분획은 네 번째 정제과정으로 Hypersil-BDS C₁₈ (2 × 125 mm) column에 1 %/3 min의 조건으로 적용되었으며, 23 % CH₃CN에서 활성 분획을 얻었다 (Fig. 10). 이후 다시 동일한 DEAE column으로 분리하였으며 (Fig. 11), 계속해서 이 분획을 역상 column인 Hypersil BDS C₁₈에 23 % CH₃CN의 isocratic 조건으로 적용하였으나, HPLC profile에서 단일물질이 아닌 것으로 나타났다 (Fig. 12). 따라서 활성을 나타낸 main peak를 size exclusion column에 적용하여 머무름시간 23분에서 단일물질로 분리하였다 (Fig. 13A). 최종적으로 이 peak는 다시 Hypersil BDS column에 23 % CH₃CN의 isocratic조건으로 적용되었고, 머무름시간 16.7분을 갖는 순수한 물질로 분리할 수 있었다 (data not shown). 이 물질의 분자량을 측정한 결과 2306.95 Da이었다 (Fig. 13C).

2.3. SF-III의 정제

결과 2에서 나타낸 CM 52의 Fig. 3의 A region을 정제하기 위해서 두 번째 단계로 Vydac C₁₈ (9.2 × 250 mm) column을 사용하였다. 그 결과 30 % CH₃CN에서 활성 분획을 얻었으며 (Fig. 14), 이 분획들은 세 번째 단계인 DEAE (7.5 × 75 mm) column에 적용되었으나, column에 흡착되지 않고 용출된 부분에서 활성이 나타났다 (Fig. 15). 이러한 결과는 활성분획의 물질들이 산성아미노산보다 염기성 아미노산을 많이 포함하고 있을지도 모른다는 것을 의미한다. 또한, column에 흡착된 대부분의 분획들이 활성이 없다는 것은 활성을 가지지 않은 물질들이 제거되어 효과적으로 분

리되었다는 것을 의미한다. 계속해서 활성을 지닌 분획은 네 번째 역상 column인 Hypersil BDS C₁₈에 1 %/3min으로 적용되었으며, 26 % CH₃CN에 용출된 분획에서 이완 활성을 나타내었다 (Fig. 16). 이 활성 분획은 음이온 교환수지 column에 흡착이 되지 않았으므로, 다섯 번째 단계에서는 양이온 교환수지 column인 SP (7.5 × 75 mm) column을 사용하였다 (Fig. 17). 그 결과, column에 흡착되어 0.06 M NaCl에서 용출된 분획에서 이완 활성을 나타내었다. 이 분획을 Hypersil BDS C₁₈ column에 0.1 %/min의 조건으로 적용하여, 하나의 peak를 얻었다 (data not shown). 이 peak는 최종적으로 25 % CH₃CN의 isocratic 조건에서 머무름시간 22.93분을 가진 단일 물질로 분리되었으며, 분자량은 MALDI-TOF mass 측정 결과 3655 Da이었다 (Fig. 18).

3. 정제한 이완활성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열 결정

최종적으로 정제한 SF-I, SF-II 및 SF-III의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위하여 MALDI-TOF mass spectrometer와 Edman 분해법을 이용한 아미노산 분석기를 사용하였다. Table 7은 이들 펩타이드의 아미노산 서열 및 분자량을 나타내고 있다. SF-I은 방향족 아미노산 Phe, Tyr과 charge를 갖는 3개의 아미노산, 4개의 Gly, 1개의 Pro 및 Ser과 Thr과 같은 극성아미노산등을 함유한 16개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 1601.72 (M+H)⁺이었다. 측정된 펩타이드의 분자량은 이론적 계산치인 1602.61 Da과 매우 잘 일치하였다. SF-II는 분자량이 2306.95 Da으로 측정되었고, 방향족 아미노산인 Tyr을 2개를 가졌으며, (+) charge를 갖는 Lys과 Arg과 (-) charge를 가진 Glu를 포함하는 20개 이상의 아미노산으로 이루어진 펩타이드라는 것을 알 수 있었다. 또한, SF-III는 방향족 아미노산 Phe 1개와 (+) charge를 갖는 Lys과 Arg, (-) charge의 Asp를 포함하는 30개 이상의 아미노산으로 구성되어 있었으며, 분자량은 측정결과 3655.09 Da이었다. 그러나, 정제한 양의 부족으로 SF-II와 SF-III의 아미노산 서열 분석은 완전하게 이루어지지 않았다.

3.1. 천연 SF-I과 합성 SF-I의 동일성 비교

C-말단 modification 여부를 알아보기 위해 C-말단이 아미드화된 SF-I (SF-I

amide)과 C-말단이 modification되지 않은 OH-형태 (SF-I)을 합성하였다. 이들은 Vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column을 이용하여 22 % CH₃CN의 isocratic 조건에서 분리되었다. 그 결과 SF-I amide가 머무름시간 14.985분, SF-I이 머무름시간 15.751분에서 용출되었다 (Fig. 20). 또한, 천연물 SF-I (N)과 합성물 SF-I (S)을 동량으로 위와 같은 조건으로 HPLC상에 주입하였고, 이들은 Fig. 21에서 나타내는 바와 같이 N은 16.003분, S는 16.002분, N과 S의 혼합물은 동일한 머무름시간에서 함께 용출되었다. 한편, 합성한 SF-I amide와 천연물을 혼합시킨 경우는 단일 peak를 나타내지 않고, Fig. 20과 같이 2개의 peak로 분리되었다 (data not shown). 이러한 결과들로부터 천연물 SF-I이 합성물 OH-type과 같은 물질임을 알 수 있었으며, 완전한 SF-I의 일차구조는 다음과 같이 판명되었다 : Phe-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Tyr-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp.

4. SF-I의 CD 스펙트럼

SF-I의 2차구조를 확인하기 위하여 TES 완충액, EYPC, EYPC:EYPG (3:1) 및 50 % TFE 조건하에서 CD 스펙트럼을 측정하였다. Fig. 22는 SF-I의 CD 스펙트럼을 나타낸다. TES 완충액하에서 SF-I은 203 nm 부근에서 negative maximum 값을 가지는 스펙트럼을 나타내었다. 전형적인 random구조는 198 nm 부근에서 negative maximum 값을 갖는 스펙트럼의 특성을 지니지만, SF-I의 경우에 있어서는 스펙트럼이 right shift되어 있으며, 225 nm 부근에서 negative maximum을 나타내는 것으로 보아 단순한 random구조가 아닌 다른 특정구조를 부분적으로 함유하는 것으로 생각된다. 한편, 중성 및 산성 인공 지질막하에서의 스펙트럼은 TES 완충액하에서의 스펙트럼과 다른 형태를 나타냈다. 또한, α-helix 유도용매로 알려진 50 % TFE하에서의 스펙트럼은 다른 용매에서와는 달리 double minimum을 지니는 α-helix와 유사한 형태를 나타냈지만, α-helix의 함유량은 5 %에 지나지 않았다. 이것은 TFE조건하에서, SF-I은 대부분이 random한 구조를 취하나 약간의 helix를 동반함을 나타낸다. 또한, Chou-Fasman의 2차구조 예측법에 의하면, SF-I은 Table 9에 나타낸 바와 같이 β-turn과 random coil을 취하였다. 따라서 CD 스펙트럼과 2차구조 예측법에 의한 결과로부터 SF-I은 random구조와 turn구조뿐만 아니라 다른 특정구조가 혼합된 구조를

취하는 것으로 생각된다. 또한, 완충액 및 인공지질막하에서 CD 스펙트럼의 변화가 생긴 것으로 보아 수용체와 결합시 약간의 구조변화를 일으킴을 짐작하게 한다.

5. SF-I의 유도체 합성, 분자량 측정 및 머무름시간 비교

SF-I의 구조와 활성간의 상관관계를 알아보기 위해, SF-I을 모델로 하여 12종류의 N-말단 유도체와 6종류의 C-말단 유도체 및 N-말단과 C-말단의 잔기가 제거된 SF-I(5-14)를 합성하였다 (Table 5). Table 8은 최종 정제한 유도체들의 분자량 측정치, 머무름시간, 소수성도 및 소수성 모멘트를 나타낸다. 머무름시간은 Vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column을 사용하여 10 - 35 % CH₃CN (25 min)의 조건에서 측정하였고, SF-I의 N-말단 및 C-말단 유도체는 잔기가 제거됨에 따라 머무름시간이 빨라졌다. 그리고, N-말단 유도체인 SF-I(2-16)과 SF-I(3-16)의 소수성도는 각각 0.09이며, 머무름시간이 25.43분과 25.57분으로 거의 유사하였으며, C-말단 유도체 중 소수성도가 각각 -0.11로 같은 SF-I(1-12)와 SF-I(1-10)의 머무름시간 또한 유사하였다.

SF-I과 SF-I(5-14)를 모델로 하여 각각에 있는 하나의 잔기를 Ala으로 치환된 유도체를 합성하였고 (Table 5), 이들 유도체들의 머무름시간을 측정하여 소수성 및 소수성 모멘트와의 연관관계를 조사하였다 (Table 9). Ala-치환 유도체들의 머무름시간은 Vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column을 이용하여 22 % isocratic조건에서 측정되었다. 대부분 SF-I의 Ala-치환 유도체의 경우, SF-I의 머무름시간과 큰 차이가 없었으나, [Ala¹⁰]SF-I과 [Ala¹⁴]SF-I은 SF-I 보다 8분 이상 빠른 머무름시간을 가졌다. 또한, Ala-치환 유도체 중에서 [Ala⁹]SF-I과 [Ala¹³]SF-I은 -0.11의 동일한 소수성도 및 소수성 모멘트를 가지지만, 머무름시간에 있어서 10분 이상 차이를 보였다. 대부분의 SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체의 경우는 SF-I(5-14)보다 5분이상 늦게 용출되었으나, [Ala¹⁴]SF-I(5-14)는 SF-I과 유사한 머무름시간을 가졌다. 또한, -0.48의 동일한 소수성도를 가진 [Ala⁵]SF-I(5-14), [Ala⁹]SF-I(5-14) 및 [Ala¹³]SF-I(5-14)은 소수성 모멘트에서 차이를 나타내었지만, 이러한 소수성 모멘트의 차이와 머무름시간은 규칙성이 없는 것으로 나타났다. 이것은 소수성도와 머무름시간은 규칙성을 나타내지 않는다는 것을 의미하며, 소수성도의 변화와 잔기수의 감소 및 치환되는 아미노

산의 주위환경의 변화등으로 머무름시간이 이동되는 것으로 생각된다.

한편, SF-I과 유도체들의 2차구조를 알아보기 위해서 Chou-Fasman의 2차구조 예측법을 이용하였다 (Table 10). N-말단과 C-말단의 잔기가 제거된 유도체들은 모두 random coil과 β -turn구조를 취하였으며, 아미노산 제거에 따른 유도체들 역시 구조에 큰 변화가 없었다. 또한, SF-I의 각 아미노산을 Ala으로 치환한 펩타이드의 경우 역시 SF-I과 유사한 구조를 나타냈다. 그러나, [Ala⁹]SF-I은 9번째에서 14번째 잔기에서 helix를 포함한 turn구조를 나타냈다. 그리고, [Ala¹⁵]SF-I은 12번째 잔기에서 15번째 잔기에 약한 helix를 포함한 turn구조를 가진다는 것이 예측되었다. SF-I(5-14)의 각 아미노산 잔기를 Ala으로 치환한 유도체 역시 [Ala⁹]SF-I(5-14), [Ala¹¹]SF-I(5-14) 및 [Ala¹³]SF-I(5-14)에서도 9번째에서 14번째 잔기까지 helix를 포함한 turn구조가 예측되었다.

6. SF-I 및 그 유도체들의 이완활성 측정

합성한 SF-I과 그 유도체들의 이완활성을 조사하기 위해 극파동물인 불가사리 DRM, CS 및 TF를 이용하였다. Fig. 23은 이들의 전형적인 이완양상을 나타낸다.

6.1. 불가사리 DRM에서의 이완활성

DRM에서 SF-I과 유도체들의 이완활성을 조사하기 위해, 10^{-6} M의 ACh를 전처리하여 수축시킨 후, 펩타이드를 10^{-10} M에서 10^{-5} M까지 누적 투여하였다. Fig. 23A는 DRM의 전형적인 이완양상을 나타낸다. 이완반응은 농도 의존적으로 증가 하였으며, 이들 결과들은 10^{-6} M ACh의 수축반응을 최대반응 100 %로 하여 상대적 이완 %로서 나타냈고, 이들을 토대로 농도 의존 반응 곡선, E_{max} 및 ED_{50} 값을 결정하였다.

6.1.1. SF-I과 SF-I amide의 이완활성

정제한 SF-I과 C-말단이 아미드화된 SF-I amide의 활성을 비교하기 위하여 불가사리 DRM을 이용하였다. Fig. 24는 이들의 농도 의존곡선을 나타낸다. SF-I과 SF-I amide는 10^{-10} M에서 각각 0.59 % 및 0.66 %의 역치값을 나타냈으며, 약물의 효과 (efficiency)를 나타내는 E_{max} 값은 10^{-5} M에서 120.0 ± 7.0 % 및 134.7 ± 9.6 %였다..

Table 7. Molecular weight and amino acid sequences of purified peptide from starfish, *Asterina pectinifera*

Peptide	Amino acid sequence (pmole)	Mass spectrum	
		Observed (M+H) ⁺	Calculated (M)
SF-I	¹ Phe-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Tyr-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp (452) (298) (363) (258) (241) (268) (235) (143) (152) (147) (26) (80) (64) (80) (23) (9)	1601.72	1602.61
SF-II	¹ Gly-Ala-Ile-Xaa-Lys-Asp-Pro-Tyr-Met-Asp-Ile-Met-Ser-Leu-Arg-Glu-Ser-Asn-Tyr-Xaa (437) (548) (544) (456) (180) (242) (278) (281) (136) (200) (212) (50) (121) (36) (5) (28) (54) (52)	2306.95	-
SF-III	¹ Ser-Gly-Thr-Gly-Xaa-Thr-Gln-Phe-Ser-Gly-Arg-Ala-Gln-Leu-Lys-Val-Gly-Gln-Asp-Ala (56) (117) (65) (89) (41) (60) (74) (21) (41) (3) (34) (38) (31) (25) (28) (26) (33) (15) (21)	3655.0	-
	²⁵ -Leu-Ser-Xaa-Val-Leu-Ala-Asp-Ser-Asn-Xaa (20) (8) (14) (14) (12) (8) (5) (4)		

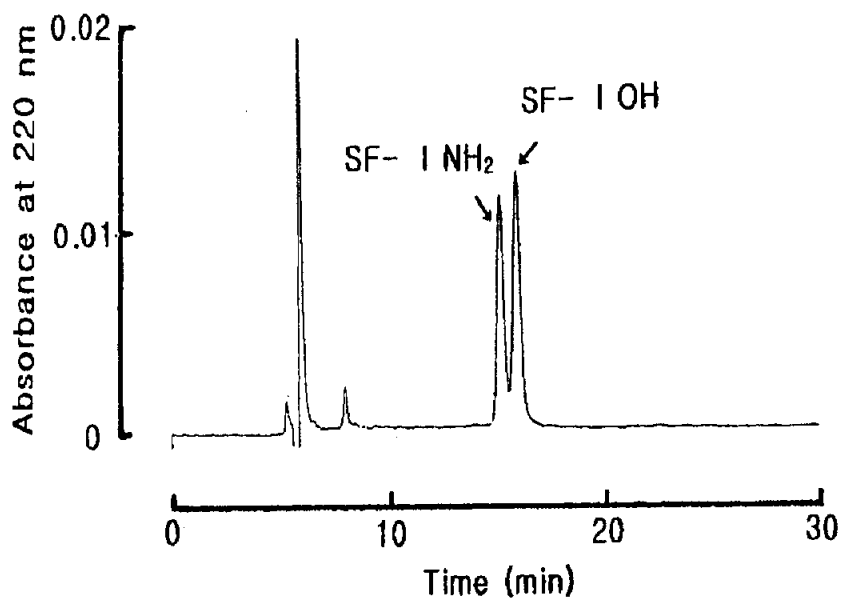


Fig. 20. HPLC co-elution of SF-I-OH (OH type) and SF-I-NH₂ (amide type) in reverse-phase HPLC. Peptides were loaded onto a vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column and eluted isocratically 22 % CH₃CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 0.5 mL/min.

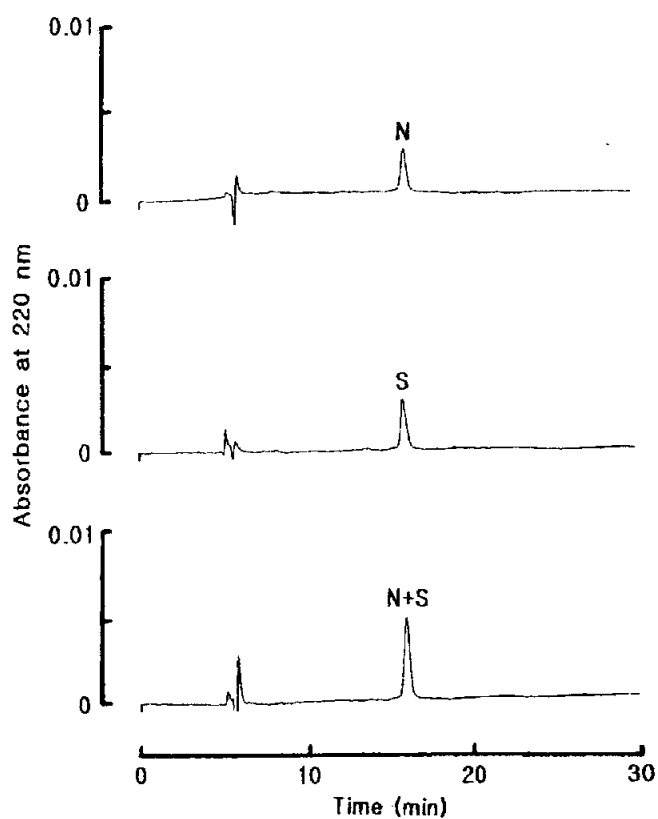


Fig. 21. Comparison of retention time on reverse-phase HPLC between native (N) and synthetic (S) SF-I. Peptides were loaded onto a Vydac C₁₈ (4.6 × 250 mm) column and eluted isocratically 22 % CH₃CN in 0.1 % TFA at a flow rate of 0.5 mL/min. The mixture of the two peptides was co-eluted as a single u. v.-absorbance peak (N+S).

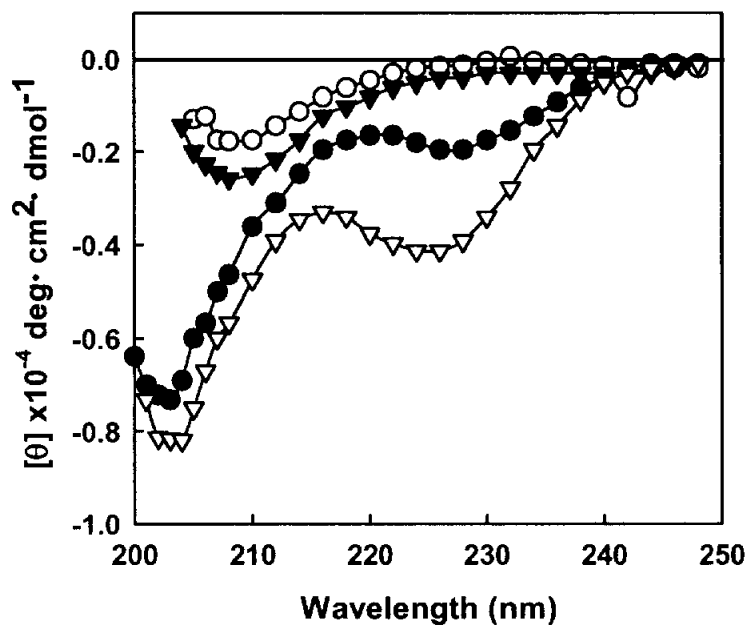


Fig. 22. CD spectra of SF-I in 20 mM TES buffer (●), EYPC (○), EYPC:EYPG (3:1) liposome (▼) and 50 % TFE (▽) at 25 °C. Peptide and lipid concentration were 50 μ M and 2 mM, respectively.

Table 8. Molecular weight, Hydrophobicity, Hydrophobic moment and Retention time of SF-I, N- and C-terminal analogs

Peptide	Mass spectrum		H*	μ	R. T. (min)
	Observed (M+H) ⁺	Calculated (M)			
SF-I	1603.53	1602.61	-0.08	0.32	27.277
SF-I(2-16)	1457.62	1455.44	0.09	0.47	25.430
SF-I(3-16)	1400.52	1398.39	0.09	0.50	25.572
SF-I(4-16)	1272.9	1270.22	-0.13	0.77	26.125
SF-I(5-16)	1215.69	1213.17	-0.14	0.83	26.307
SF-I(6-16)	1159.03	1156.12	-0.15	0.91	26.243
SF-I(7-16)	1087.96	1085.05	-0.12	0.98	25.730
SF-I(8-16)	923.46	921.88	0.12	0.88	22.439
SF-I(9-16)	808.29	806.8	-0.24	0.75	20.144
SF-I(10-16)	711.09	709.69	-0.27	0.86	18.690
SF-I(11-16)	-	596.54	-0.02	0.80	11.562
SF-I(12-16)	-	509.47	-0.08	1.01	11.092
SF-I(13-16)	-	438.4	0.03	1.36	10.962
SF-I(1-15)	1490.12	1487.53	-0.28	0.15	27.906
SF-I(1-14)	1389.28	1386.43	-0.27	0.18	29.174
SF-I(1-13)	1241.89	1239.26	-0.10	0.07	23.207
SF-I(1-12)	1184.61	1182.21	-0.11	0.08	23.768
SF-I(1-11)	1112.46	1111.14	-0.07	0.10	22.739
SF-I(1-10)	1025.43	1024.07	-0.11	0.09	24.166
SF-I(5-14)	999.44	997.52	-0.43	0.79	28.36

※ * H : Hydrophobicity, μ : Hydrophobic moment by Hoop and Wood method, R.T. : Retention time

Table 9. Molecular weight, Hydrophobicity, Hydrophobic moment and Retention time of Ala-substituted SF-I and SF-I(5-14)

Peptide	Mass spectrum		H*	μ	R. T. (min)
	Observed (M+H) ⁺	Calculated (M)			
SF-I	1603.53	1602.61	-0.08	0.32	15.840
[Ala ¹]SF-I	1527.46	1526.51	0.05	0.41	11.247
[Ala ²]SF-I	1617.65	1616.63	-0.11	0.30	15.009
[Ala ³]SF-I	1546.79	1545.51	-0.29	0.52	22.388
[Ala ⁴]SF-I	1617.76	1616.63	-0.11	0.33	17.534
[Ala ⁵]SF-I	1618.81	1616.63	-0.11	0.28	17.395
[Ala ⁷]SF-I	1512.65	1510.51	0.04	0.21	11.521
[Ala ⁸]SF-I	1560.97	1558.60	-0.29	0.30	13.439
[Ala ⁹]SF-I	1578.45	1576.57	-0.11	0.29	12.945
[Ala ¹⁰]SF-I	1562.32	1560.53	0.01	0.27	7.494
[Ala ¹¹]SF-I	1588.19	1582.61	-0.13	0.35	19.687
[Ala ¹³]SF-I	1618.43	1616.63	-0.11	0.31	28.357
[Ala ¹⁴]SF-I	1528.50	1526.51	0.05	0.19	8.065
[Ala ¹⁵]SF-I	1573.60	1572.58	-0.08	0.32	16.998
[Ala ¹⁶]SF-I	1560.70	1558.60	-0.29	0.12	20.900
SF-I(5-14)	999.44	997.52	-0.43	0.79	8.06
[Ala ⁵]SF-I(5-14)	1013.02	1011.01	-0.48	0.74	19.825
[Ala ⁷]SF-I(5-14)	907.08	904.89	-0.25	0.68	12.812
[Ala ⁸]SF-I(5-14)	954.87	952.98	-0.78	0.53	15.089
[Ala ⁹]SF-I(5-14)	972.97	970.95	-0.48	0.77	13.678
[Ala ¹⁰]SF-I(5-14)	956.81	954.91	-0.30	0.66	17.869
[Ala ¹¹]SF-I(5-14)	982.89	980.99	-0.51	0.79	22.829
[Ala ¹³]SF-I(5-14)	1013.08	1011.01	-0.48	0.80	27.563
[Ala ¹⁴]SF-I(5-14)	923.03	920.89	-0.23	0.61	7.515

※ * H : Hydrophobicity, μ : Hydrophobic moment by Hoop and Wood method, R.T. : Retention time

Table 10. Prediction of secondary structure of the peptide by Chou and Fasman prediction method

Peptide	Sequence
SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D C T T T T C C T T T T T T C C
SF-I(2-16)	G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D T T T T C C T T T T T T C C
SF-I(5-16)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D C C C T T T T T T T C C
SF-I(1-14)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F C T T T T C C T T T T T T T
SF-I(1-13)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G C T T T T C C T T T T C C
SF-I(1-12)	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A C T T T T C C T T T T C
[Ala ⁹]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-A-L-S-A-G-F-T-D C T T T T C C T H H T T T T C C h h h h
[Ala ¹⁵]SF-I	F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-A-D C T T T T C C T T T T T T H C h h h h
SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F C C C T T T T T T T
[Ala ⁹]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-A-L-S-A-G-F c c c c H H T T T T h h h h
[Ala ¹⁰]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-A-S-A-G-F C C C T T T T T T T
[Ala ¹¹]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-A-A-G-F C C C T T T T H H H h h
[Ala ¹³]SF-I(5-14)	G-A-Y-D-P-L-S-A-A-F C C C T T T T H H H h h

※ C : Random coil, T : β-turn, H : helix

또한 약물의 효력 (potency)를 나타내는 ED_{50} 값은 SF-I과 SF-I amide가 각각 4.0×10^{-8} M과 3.0×10^{-8} M이었다. SF-I과 SF-I amide의 ED_{50} 및 E_{max} 값이 그다지 차이가 없었기 때문에 C-말단의 형태는 활성을 나타내는데 중요한 역할을 하지 않는 것으로 생각된다. Table 11은 SF-I amide와 SF-I의 활성 측정결과를 나타낸 것이다.

6.1.2. SF-I과 그 유도체들의 이완활성

6.1.2.1. SF-I과 N-말단 유도체들의 이완활성

Fig. 25와 26은 N-말단 유도체들에 대한 농도 의존곡선을 나타내며, 이완활성 결과는 Table 11에 나타내었다. SF-I(2-16)은 10^{-10} M에서 0.35 %의 역치값을 나타내었으나, 10^{-5} M에서 control보다 약 20 % 낮은 96.36 ± 1.92 %의 활성을 나타내었고, ED_{50} 값은 2.1×10^{-7} M이었다. SF-I(2-16)의 활성은 control인 SF-I의 농도 의존곡선과 비교하여 약 10배정도 낮게 나타났다. 또한, SF-I(3-16)과 SF-I(4-16)의 역치값은 10^{-8} M에서 각각 1.7 %와 1.8 %로 나타났으며, 최대반응은 94.4 ± 13.4 %와 87.4 ± 16.0 %, ED_{50} 값은 4.0×10^{-7} M과 2.2×10^{-7} M이었다. 이들의 수용체와의 친화력과 최대 이완반응은 SF-I(2-16)과 유사하게 나타났다. 그러나, 역치반응 농도를 비교해 볼 때 SF-I(2-16)이 SF-I(3-16)과 SF-I(4-16)보다 높은 활성을 지닌다는 것을 알 수 있다. SF-I(5-16)은 10^{-8} M에서 4.58 %의 역치값과 10^{-5} M에서 109.4 ± 6.5 %의 E_{max} 값을 나타내었다. 네 번째 잔기까지 제거된 SF-I(5-16)에서 수용체와의 친화력을 나타내는 ED_{50} 값과 10^{-5} M에서의 최대 이완반응이 SF-I(2-16)과 유사하게 나타났다. 이러한 결과는 N-말단에 있어 Phe^1 이 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 반면, SF-I(6-16)과 SF-I(7-16)은 10^{-5} M에서 최대 이완반응을 각각 86.4 ± 2 %와 73.1 ± 4.7 %로 나타내었지만, SF-I(5-16)에서 나타났던 100 %의 이완활성을 나타내지 못하였다 (Fig. 25). 또한, SF-I(8-16)과 SF-I(10-16)은 10^{-5} M에서 37.1 ± 4.1 %와 19.5 ± 5.2 %의 활성을 나타내었고, SF-I(9-16) 역시 75.96 ± 0.96 %의 활성을 보여 100 %의 최대 이완활성을 유지하지 못하였다. SF-I(11-16)과 SF-I(13-16)은 10^{-5} M에서 각각 8.1 ± 0.6 %와 5.35 ± 5.35 % 역치값을 가졌고, SF-I(12-16)은 10^{-4} M에서 15.4 ± 15.4 %의 역치활성을 보였다. SF-I의 잔기를 제거할수록 역치농도는 대체적으로 높게 나타났고, 활성은 감소하였다 (Fig. 26). N-말단 유도체의 활성의 크기는 다음과 같다 ; SF-I $\gg$ SF-I(2-16), SF-I(3-16), SF-I(4-16), SF-I(5-16) $\gg$

SF-I(6-16), SF-I (7-16), SF-I(9-16) > SF-I (8-16) > SF-I(10-16) ≫ SF-I(11-16), SF-I(12-16), SF-I (13-16).

6.1.2.2. SF-I과 C-말단 유도체들의 이완활성

Fig. 27은 C-말단 유도체들의 농도 의존곡선을 나타내었으며, 이들의 활성 측정 결과는 Table 11에 나타내었다. SF-I(1-15)와 SF-I(1-14)는 10^{-8} M에서 각각 3.26 %와 9.38 %의 역치값을 가졌으며, 10^{-5} M에서 각각 99.78 ± 4.78 %와 105.72 ± 5.72 %의 최대 이완활성을 보였고, ED_{50} 값은 4.0×10^{-6} M과 1.2×10^{-7} M이었다. 이들 두 유도체의 활성은 거의 유사하였으며, SF-I(1-15)는 SF-I보다 100배정도 낮은 ED_{50} 값을 나타냈다. 이는 Asp¹⁶이 C-말단에서 중요한 역할을 함을 나타낸다. 한편, C-말단의 Asp¹⁶이 제거된 유도체와 C-말단으로부터 2개의 아미노산이 제거된 유도체간의 활성 차이는 크지 않았다. Phe¹⁴가 제거된 SF-I(1-13)과 SF-I(1-12)은 10^{-5} M에서 SF-I의 활성보다 현저히 낮은 30.54 ± 1.13 %와 23.9 ± 6.29 %의 활성을 나타내었다. 이러한 결과들은 100 % 최대 이완활성을 나타내는 것에 있어 Phe¹⁴가 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. SF-I(1-11)과 SF-I(1-10)은 각각 10^{-8} M과 10^{-9} M에서 4.2 ± 1.2 %와 0.9 ± 0.9 %의 역치반응을 나타내었고, 10^{-5} M에서 27.3 ± 2.4 %와 25.9 ± 10.1 %의 이완활성을 나타내었다. C-말단 유도체들은 SF-I보다 100배가량 높은 역치농도를 나타냈으며, 특이하게 SF-I(1-13)은 10^{-6} M에서 역치값을 나타냈다. C-말단 유도체의 활성의 세기는 다음과 같다 : SF-I > SF-I(1-15), SF-I(1-14) ≫ SF-I(1-13), SF-I(1-12), SF-I(1-11), SF-I(1-10).

6.1.2.3. 최소 잔기 유도체의 이완활성

6.1.2.1.과 6.1.2.2.의 결과로부터 N-말단 유도체인 SF-I(5-16)와 C-말단 유도체인 SF-I(1-14)이 10^{-5} M에서 SF-I과 유사한 최대 이완활성을 가지고 있었기 때문에 SF-I(5-14)를 최대 활성을 나타내는 최소 잔기로 규정하고 이를 합성하여 이완활성을 조사하였다. Fig. 28은 SF-I과 SF-I(5-14)의 농도 의존곡선을 나타낸다. 활성 측정 결과, SF-I(5-14)는 10^{-8} M에서 4.08 %의 역치값을 보였지만, 10^{-5} M에서의 이완반응은 SF-I의 반응보다 40 %이상 감소하였다 (Table 11). 그러나, 10^{-4} M의 SF-I(5-14)에서 약 100 %의 이완활성을 나타내어 활성효과는 유지되어졌으나, 농도 의존

곡선을 비교하였을 때 SF-I의 이완활성보다 전반적으로 100배정도 낮은 활성을 나타내었다 (Fig. 28).

6.1.2.4. SF-I과 SF-I(5-14)에 대한 Ala-치환 유도체들의 이완활성

Fig. 29-31은 SF-I과 SF-I(5-14)의 각 아미노산을 Ala으로 치환한 유도체들의 농도 의존곡선을 나타낸다. 또한, Table 11은 이들의 역치반응농도, ED_{50} 값 및 E_{max} 값을 나타낸다. $[Ala^1]SF-I$ 과 $[Ala^2]SF-I$ 은 각각 10^{-9} M과 10^{-10} M에서 0.7 %와 1.8 %의 역치값을 가졌고, 10^{-5} M에서 E_{max} 값은 142.1 ± 11.3 %와 116.6 ± 3.4 %이었다. $[Ala^3]SF-I$, $[Ala^4]SF-I$ 및 $[Ala^5]SF-I$ 은 10^{-10} M에서 각각 2.1 %, 1.5 %와 2.9 %의 역치활성을 보였고, 10^{-5} M에서 최대 이완반응 E_{max} 값은 104.2 ± 4.2 %, 123.3 ± 3.2 %와 101.4 ± 4.5 %이었다. $[Ala^7]SF-I$ 과 $[Ala^8]SF-I$ 은 10^{-10} M에서 각각 1.7 %와 1.0 %의 역치반응을 나타냈었으며, 10^{-5} M에서 E_{max} 값은 111.8 ± 11.9 %와 124.28 ± 3.3 %이었다. $[Ala^9]SF-I$ 과 $[Ala^{10}]SF-I$ 은 10^{-9} M에서 각각 1.4 %와 1.7 %의 역치값을 가졌고, E_{max} 값은 101.7 ± 6.9 %와 64.9 ± 7.1 %이었다. $[Ala^{11}]SF-I$ 과 $[Ala^{13}]SF-I$ 은 10^{-10} M에서 7.4 %와 7.2 %의 역치활성을 보였고, E_{max} 값은 102.8 ± 2.8 %와 111.11 ± 11.11 %이었다. $[Ala^{14}]SF-I$ 과 $[Ala^{15}]SF-I$ 은 각각 10^{-9} M과 10^{-10} M에서 3.3 %와 0.2 %의 역치값을 가졌고, E_{max} 값은 48.3 ± 1.7 %와 106.3 ± 1.97 %이었다. $[Ala^{16}]SF-I$ 은 10^{-8} M에서 11.7 %의 역치반응이 나타났고, E_{max} 값은 108.1 ± 0.98 %이었다 (Fig. 29과 30). 각 유도체는 대부분 ED_{50} 값이 서로 유사하게 나타났으며, SF-I의 ED_{50} 값 보다 5-10배정도 낮게 나타났다. 유도체중에서 특히, $[Ala^{10}]SF-I$ 과 $[Ala^{14}]SF-I$ 의 이완활성은 SF-I보다 현저히 낮게 나타났는데, 이는 SF-I이 이완활성을 나타내는데 있어 Leu^{10} 과 Phe^{14} 가 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

한편, SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체인 $[Ala^5]SF-I(5-14)$ 와 $[Ala^{11}]SF-I(5-14)$ 은 10^{-4} M에서 각각 84.74 ± 6.17 %와 84.16 ± 5.59 %의 이완활성을 나타냈다. $[Ala^7]SF-I(5-14)$ 과 $[Ala^9]SF-I(5-14)$ 은 10^{-4} M에서 SF-I(5-14)보다 40 %이상 감소된 58.48 ± 9.67 % 및 49.35 ± 8.26 %의 이완활성을 보였다. 또한, $[Ala^{10}]SF-I(5-14)$, $[Ala^{13}]SF-I(5-14)$ 및 $[Ala^{14}]SF-I(5-14)$ 은 10^{-4} M에서 18.31 ± 2.52 %, 24.29 ± 4.29 % 및 34.32 ± 12.9 %의 낮은 활성을 나타내었지만, $[Ala^8]SF-I(5-14)$ 은

10^{-4} M에서 전혀 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 31). SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체들은 대부분 SF-I(5-14)보다 활성이 감소하였고, 특히 [Ala⁸]SF-I(5-14), [Ala¹⁰]SF-I(5-14)과 [Ala¹³]SF-I (5-14)의 경우 현저한 감소를 나타내었다. 이러한 결과들은 SF-I(5-14)잔기 중에서 Tyr⁷ 및 Pro⁹이 이완활성을 유지하는데 있어 필요한 잔기인 것 같지만 결정적인 역할은 하지 않는다는 것을 의미한다. 또한, Asp⁸, Leu¹⁰, Gly¹³, Phe¹⁴ 잔기들이 SF-I (5-14)가 활성을 나타내는데 결정적인 역할을 한다는 것을 나타낸다.

6.2. 극피동물유래의 신경성 펩타이드와 이완활성의 비교

6.2.1. 불가사리 DRM에서의 이완활성

S1, S2, FMRFa, FLRFa 및 SF-I의 이완활성을 비교하기 위하여 불가사리 DRM을 사용하였다. Fig. 32는 이들의 농도 의존곡선을 나타낸다. SF-I은 10^{-10} M에서 0.59 %의 역치값을 가졌고, 10^{-5} M에서 120.0 ± 7.0 %의 최대 이완활성을 나타내었다. SF-I의 ED₅₀값은 4.0×10^{-8} M이었다. 또한, S1의 경우 10^{-10} M에서 2.4 %의 역치값을 나타냈으나, 10^{-5} M에서 45.2 ± 2.4 %의 이완활성을 나타내었다. 이것은 S1의 이완활성이 SF-I보다 현저히 낮다는 것을 의미한다. 또한, S2는 10^{-7} M에서 2.6 %의 역치값을 나타내었으며, 10^{-5} M에서 15 %정도의 이완활성을 보여 S1보다도 낮은 활성을 가졌다. FLRFa는 10^{-5} M에서 4.3 %의 역치를 보였으며, 10^{-4} M에서조차도 23.2 ± 13.2 %정도의 매우 낮은 활성을 나타냈다. 또한, FMRFa는 10^{-5} M 농도이하에서는 이완활성을 보이지 않았고, 10^{-4} M에서 14.63 ± 8.42 %의 역치반응을 나타내었다. 따라서, 이들 신경성 펩타이드의 활성의 크기는 SF-I $\gg$ S1 > S2 > FLRFa > FMRFa 순이었다.

6.2.2. 불가사리 CS에서의 이완활성

CS에서의 S1, S2, FLRFa, FMRFa 및 SF-I의 이완활성을 조사하기 위하여 10^{-5} M의 CCh를 이용하여 수축을 시킨 후, 펩타이드를 투여하였다. Fig. 23B는 CS의 전형적인 이완양상을 나타낸다. 각 펩타이드는 10^{-4} M의 단일 농도로만 투여 하였고, 이들의 반응은 CCh의 수축반응을 최대반응 100 %로 하여 상대적 이완 %로서 나타

났다 (Fig. 33). SF-I은 44.6 ± 5.7 %의 이완활성을 나타냈으며, S1은 21.2 ± 3.8 %의 활성을 보였다. 그러나, S2, FLRFa 및 FMRFa는 이완활성을 나타내지 않았다.

6.2.3. 불가사리 TF에서의 이완활성

TF에서의 이완활성을 조사하기 위하여 30 mM high- K^+ ASW를 사용하여 수축시킨 후, S1, S2, FLRFa 및 SF-I를 투여하였다. Fig. 23C는 이들의 전형적인 이완양상을 나타낸다. 펩타이드는 10^{-4} M만을 투여 하였고, 이들의 반응은 SF-I의 이완반응 크기를 100 %로 하여 상대적 %로서 나타내었으며, 이들의 결과는 Fig. 34에 나타났다. S2는 10^{-4} M에서 58.35 ± 8.35 %의 이완활성을 나타내었으나, S1의 경우는 169.93 ± 8.66 %의 수축활성을 나타내었다. 그러나, FLRFa와 FMRFa는 활성을 보이지 않았다.

6.2.4. 아무르불가사리 DRM에서의 이완활성

SF-I과 S1의 불가사리 종에 따른 이완활성을 비교하기 위하여, 본 연구에서 사용된 *Asterina pectinifera*와 다른 속인 아무르불가사리 *Asterias amurensis*의 DRM을 사용하였다. Fig. 23A에서 나타난 것과 같이 *Asterina pectinifera* DRM과 유사한 형태로 이완활성을 나타냈다 (data not shown). 펩타이드는 10^{-10} M에서 10^{-5} M까지 누적 투여하였고, ACh의 수축반응에 대한 상대적 이완 %로서 나타냈다. Fig. 35는 SF-I과 S1의 농도 의존곡선을 나타낸다. SF-I과 S1은 10^{-10} M에서 각각 1.4 ± 1.4 %와 2.6 ± 2.6 %의 역치값을 가졌으며, 10^{-5} M에서 82.1 ± 1.94 %와 62.3 ± 4.4 %의 이완활성을 나타내었다. 이들의 농도 의존 곡선을 비교한 결과, SF-I이 S1보다 높은 활성을 나타냈다.

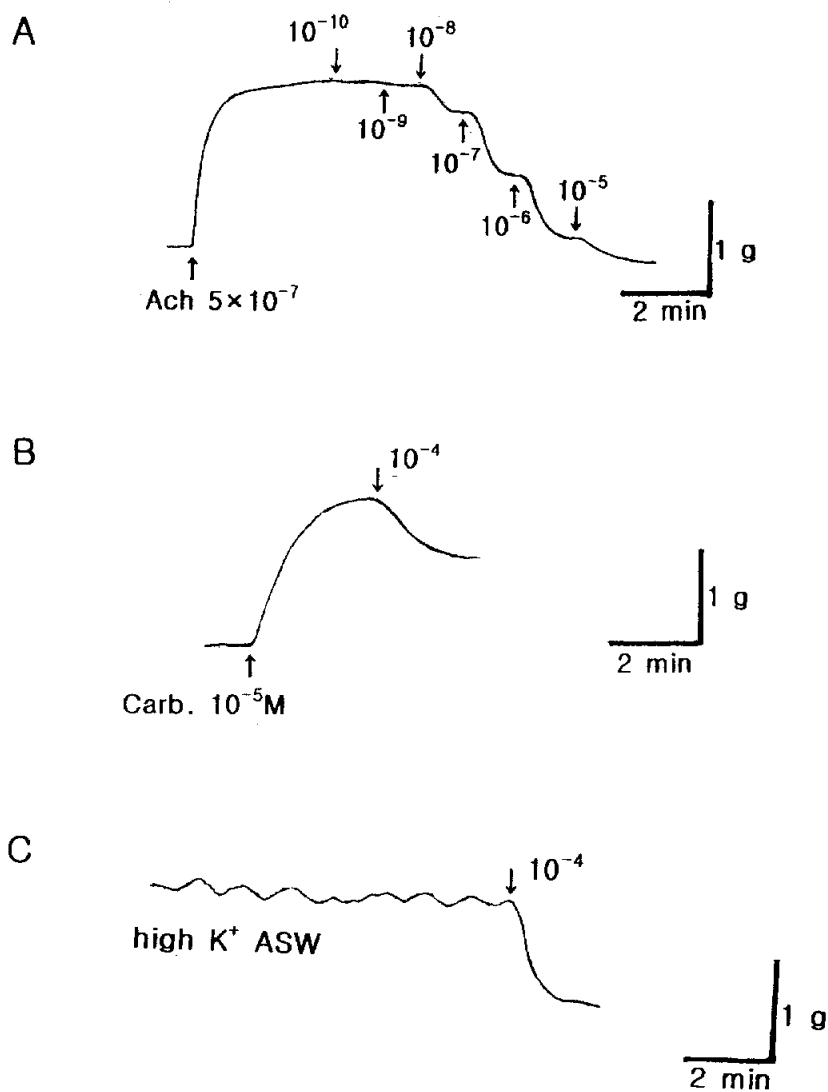


Fig. 23. Typical tracings illustrating the relaxing response of starfish *Asterina pectinifera* DRM (A), CS (B) and TF (C) to SF-I. The Carb. represents carbachol.

Table 11. The Threshold concentration (TC), ED₅₀ and E_{max} of SF-I and its analogs induced relaxation in the starfish DRM

	DRM		
	TC (M)	ED ₅₀ (M)	E _{max} (%)
SF-I	10 ⁻¹⁰	4.0×10 ⁻⁸	120.02±7.00
SF-I amide	10 ⁻¹⁰	3.0×10 ⁻⁸	134.69±9.57
N-terminal analogs			
SF-I (2-16)	10 ⁻¹⁰	2.1×10 ⁻⁷	96.36±1.90
SF-I (3-16)	10 ⁻⁸	4.0×10 ⁻⁷	94.39±19.40
SF-I (4-16)	10 ⁻⁸	2.2×10 ⁻⁷	87.44±16.00
SF-I (5-16)	10 ⁻⁸	4.1×10 ⁻⁷	109.40±6.53
SF-I (6-16)	10 ⁻⁹	1.1×10 ⁻⁶	86.42±2.04
SF-I (7-16)	10 ⁻⁹	–	73.10±4.68
SF-I (8-16)	10 ⁻⁸	–	37.1±4.08
SF-I (9-16)	10 ⁻⁹	–	75.96±0.96
SF-I (10-16)	10 ⁻⁸	–	19.5±5.17
SF-I (11-16)	10 ⁻⁵	–	8.1±0.6
SF-I (12-16)	10 ⁻⁴	–	0
SF-I (13-16)	10 ⁻⁵	–	5.35±5.35
C-terminal analogs			
SF-I (1-15)	10 ⁻⁸	4.0×10 ⁻⁶	99.78±4.80
SF-I (1-14)	10 ⁻⁸	1.2×10 ⁻⁷	105.72±5.70
SF-I (1-13)	10 ⁻⁶	–	30.54±1.10
SF-I (1-12)	10 ⁻⁸	–	23.90±6.30
SF-I (1-11)	10 ⁻⁸	–	27.29±2.44
SF-I (1-10)	10 ⁻⁹	–	25.89±10.01

Table 11. Continued

	DRM		
	TC (M)	ED ₅₀ (M)	E _{max} (%)
SF-I	10 ⁻¹⁰	4.0×10 ⁻⁸	120.02±7.00
[Ala ¹]SF-I	10 ⁻⁹	2.2×10 ⁻⁷	142.1±11.28
[Ala ²]SF-I	10 ⁻¹⁰	1.3×10 ⁻⁷	116.58±3.42
[Ala ³]SF-I	10 ⁻¹⁰	7.0×10 ⁻⁸	104.17±4.17
[Ala ⁴]SF-I	10 ⁻¹⁰	4.8×10 ⁻⁸	123.32±9.03
[Ala ⁵]SF-I	10 ⁻¹⁰	5.1×10 ⁻⁸	101.38±4.5
[Ala ⁷]SF-I	10 ⁻¹⁰	1.0×10 ⁻⁷	111.82±11.92
[Ala ⁸]SF-I	10 ⁻¹⁰	2.8×10 ⁻⁷	124.28±13.27
[Ala ⁹]SF-I	10 ⁻⁹	3.1×10 ⁻⁷	101.72±6.98
[Ala ¹⁰]SF-I	10 ⁻⁹	—	64.89±7.06
[Ala ¹¹]SF-I	10 ⁻¹⁰	3.1×10 ⁻⁸	102.83±2.83
[Ala ¹³]SF-I	10 ⁻¹⁰	2.2×10 ⁻⁸	111.11±11.11
[Ala ¹⁴]SF-I	10 ⁻⁹	—	48.34±1.67
[Ala ¹⁵]SF-I	10 ⁻¹⁰	7.0×10 ⁻⁷	106.33±1.97
[Ala ¹⁶]SF-I	10 ⁻⁸	1.7×10 ⁻⁷	108.12±0.98
SF-I(5-14)	10 ⁻⁸	1.3×10 ⁻⁶	64.45±9.3
[Ala ⁵]SF-I(5-14)	10 ⁻⁶	—	37.83±1.47
[Ala ⁷]SF-I(5-14)	10 ⁻⁶	—	12.38±1.27
[Ala ⁸]SF-I(5-14)	NA*	—	0
[Ala ⁹]SF-I(5-14)	10 ⁻⁶	—	14.1±9.73
[Ala ¹⁰]SF-I(5-14)	10 ⁻⁵	—	4.72±0.55
[Ala ¹¹]SF-I(5-14)	10 ⁻⁶	—	14.56±6.97
[Ala ¹³]SF-I(5-14)	10 ⁻⁴	—	0
[Ala ¹⁴]SF-I(5-14)	10 ⁻⁵	—	11.31±2.98
S1	10 ⁻⁹	—	45.24±2.38
S2	10 ⁻⁷	—	15.71±0.08
FMRFa	10 ⁻⁴	—	—
FLRFa	10 ⁻⁵	—	23.18±13.18

* * NA : no activity

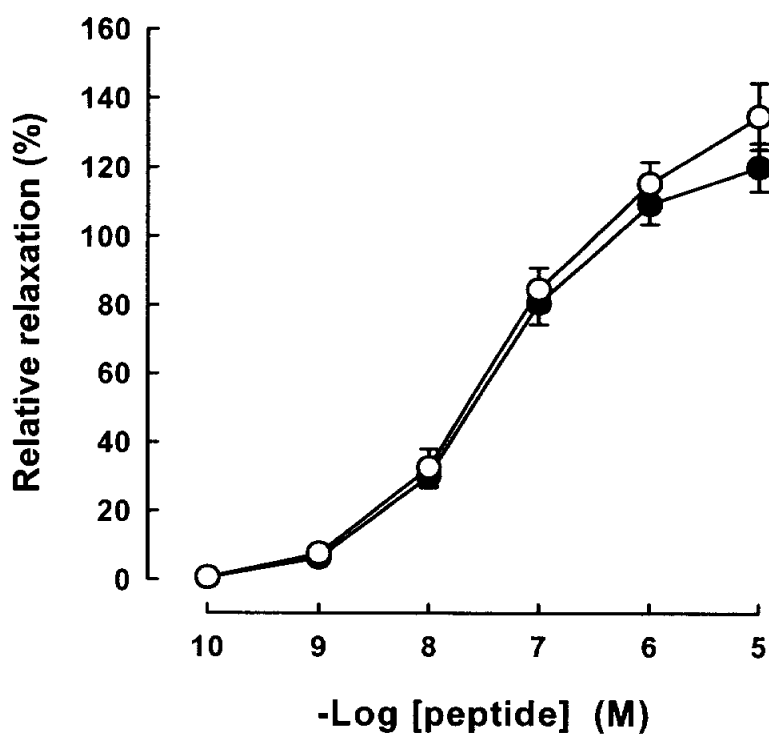


Fig. 24. Concentration response curves to SF-I (n=18) and SF-I amide (n=9) induced relaxation in starfish DRM : SF-I (●) and SF-I amide (○). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

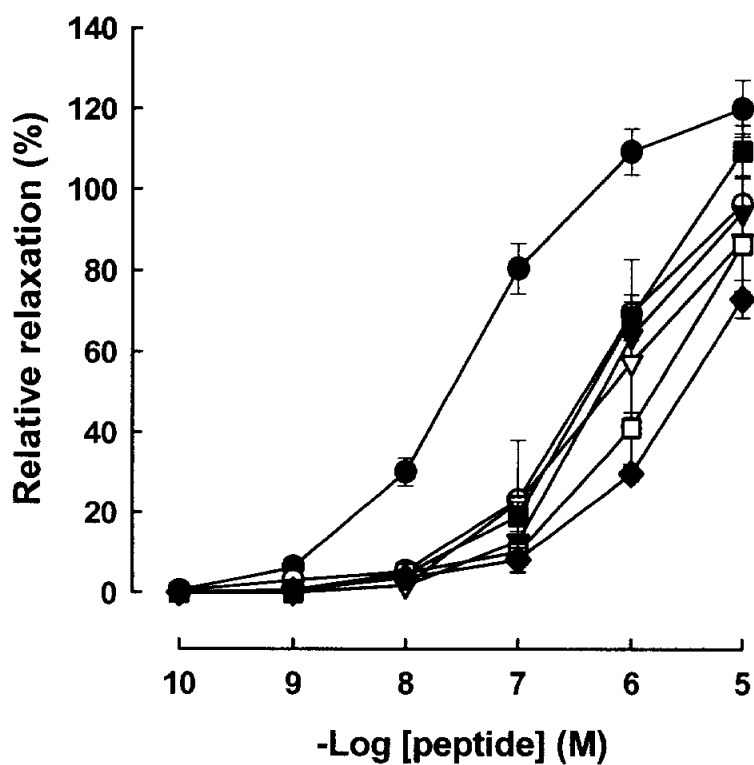


Fig. 25. Concentration response curves to SF-I N-terminal analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$): SF-I (●), SF-I(2-16) (○), SF-I(3-16) (▼), SF-I(4-16) (▽), SF-I(5-16) (■), SF-I(6-16) (□) and SF-I(7-16) (◆). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

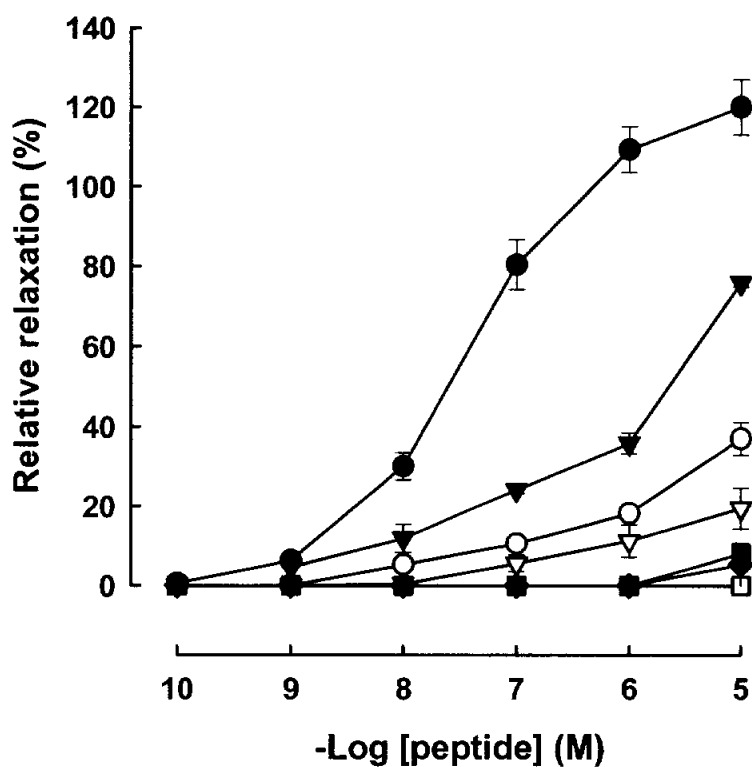


Fig. 26. Concentration response curves to SF-I N-terminal analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$) : SF-I (●), SF-I(8-16) (○), SF-I(9-16) (▼), SF-I(10-16) (▽), SF-I(11-16) (■), SF-I(12-16) (□) and SF-I(13-16) (◆). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

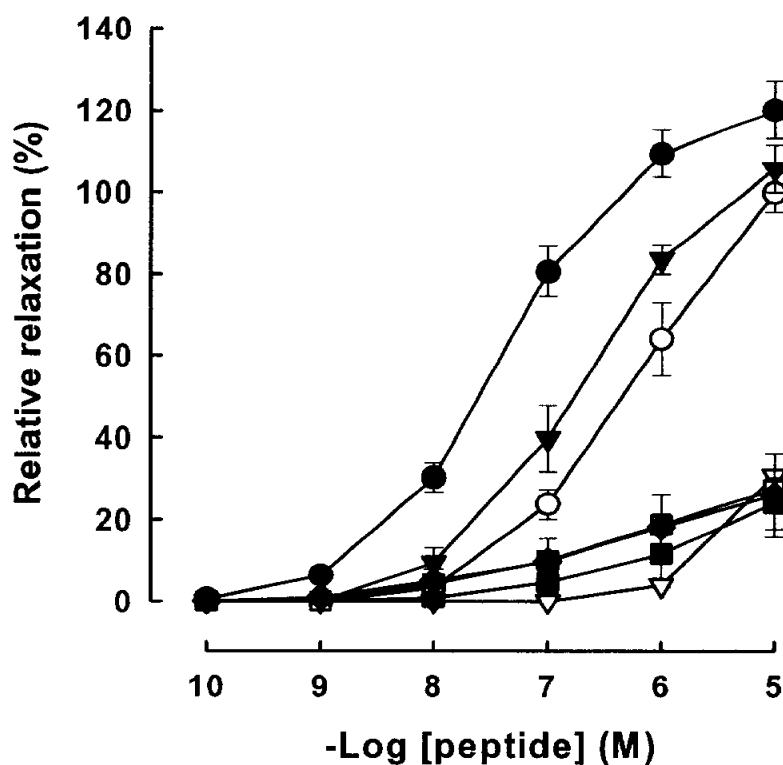


Fig. 27. Concentration response curves to SF-I C-terminal analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$) : SF-I (●), SF-I (1-15) (○), SF-I(1-14) (▼), SF-I(1-13) (▽), SF-I(1-12) (■) and SF-I(5-14) (□). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

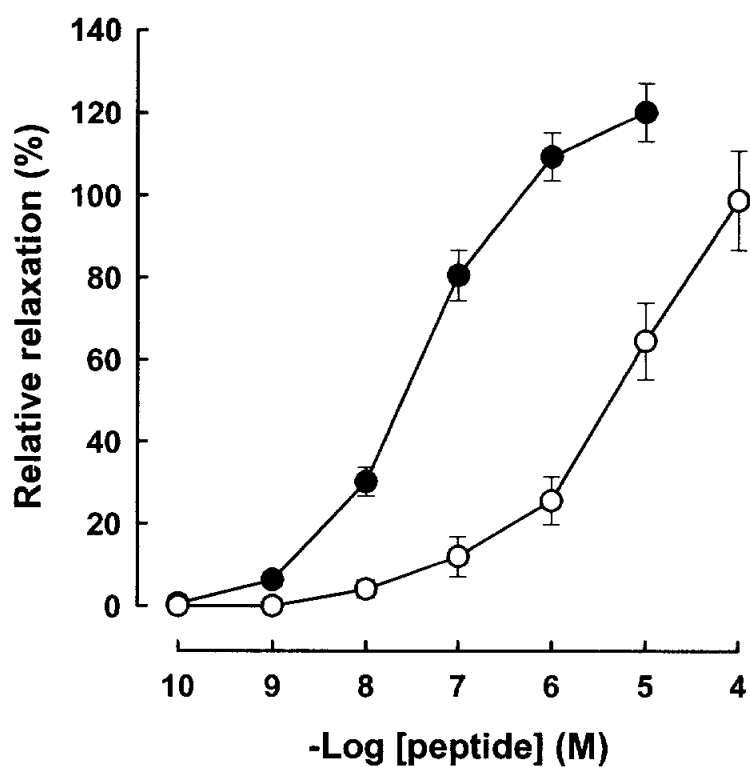


Fig. 28. Concentration response curves to SF-I (●) and SF-I (5-14) (○) induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

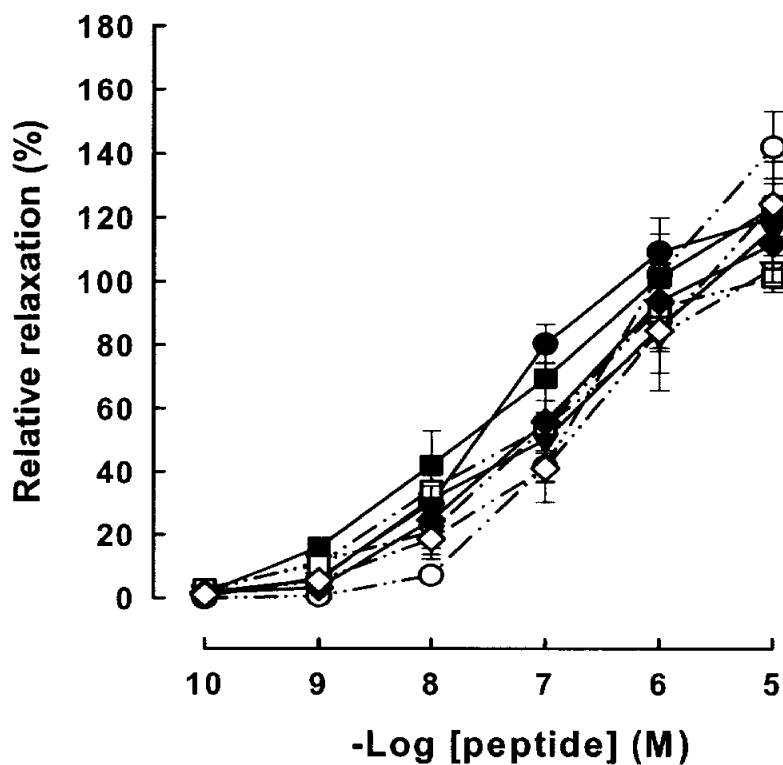


Fig. 29. Concentration response curves to SF-I analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$): SF-I (●), [Ala¹]SF-I (○), [Ala²]SF-I (▼), [Ala³]SF-I (▽), [Ala⁴]SF-I (■), [Ala⁵]SF-I (□), [Ala⁷]SF-I (◆) and [Ala⁸]SF-I (◇). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

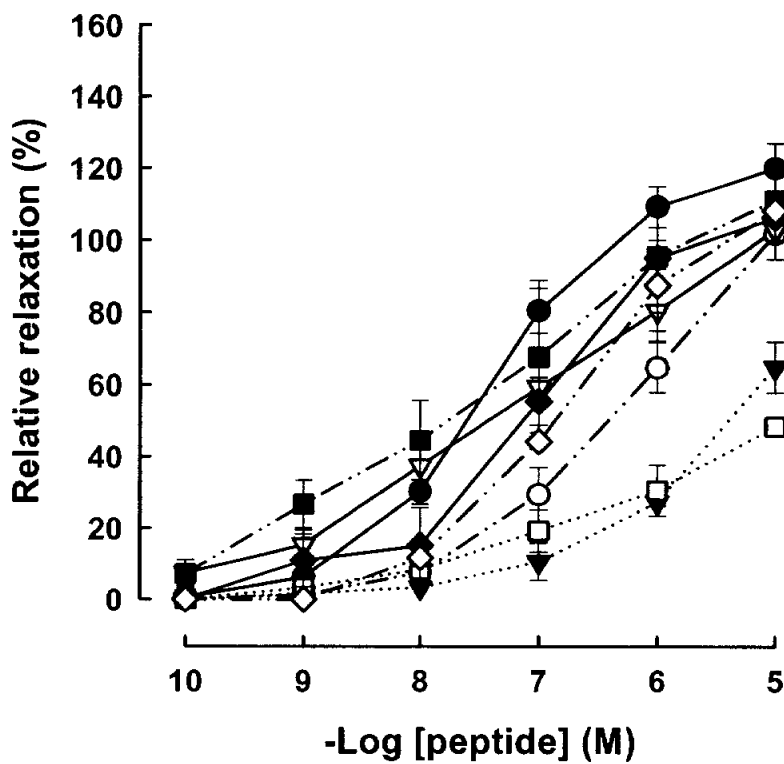


Fig. 30. Concentration response curves to SF-I analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$): SF-I (●), [Ala⁹]SF-I (○), [Ala¹⁰]SF-I (▼), [Ala¹¹]SF-I (▽), [Ala¹³]SF-I (■), [Ala¹⁴]SF-I (□), [Ala¹⁵]SF-I (◆) and [Ala¹⁶]SF-I (◇). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

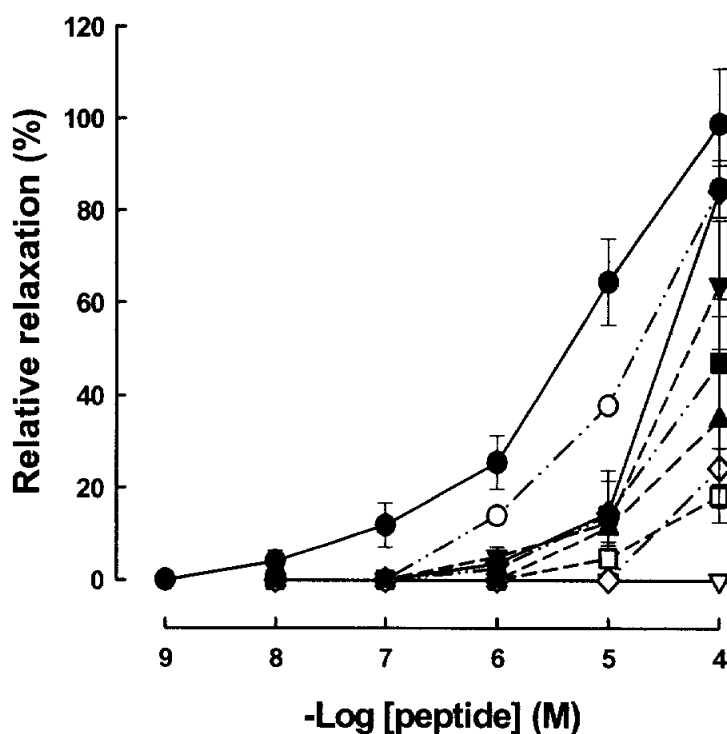


Fig. 31. Concentration response curves to SF-I analogs induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$): SF-I(5-14) (●), [Ala⁵]SF-I(5-14) (○), [Ala⁷]SF-I(5-14) (▼), [Ala⁸]SF-I(5-14) (▽), [Ala⁹]SF-I(5-14) (■), [Ala¹⁰]SF-I(5-14) (□), [Ala¹¹]SF-I(5-14) (◆), [Ala¹³]SF-I(5-14) (◇) and [Ala¹⁴]SF-I(5-14) (▲). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

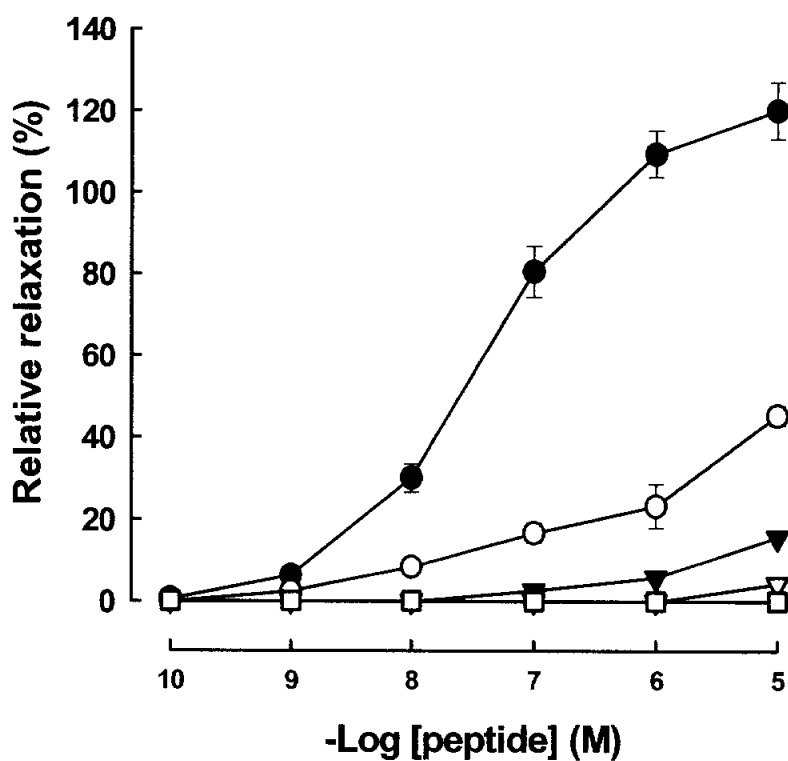


Fig. 32. Concentration response curves to various neuropeptide induced relaxation in starfish DRM ($n \geq 2$): SF-I (●), S1 (○), S2 (▼), FLRF(▽) and FMRFa (□). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

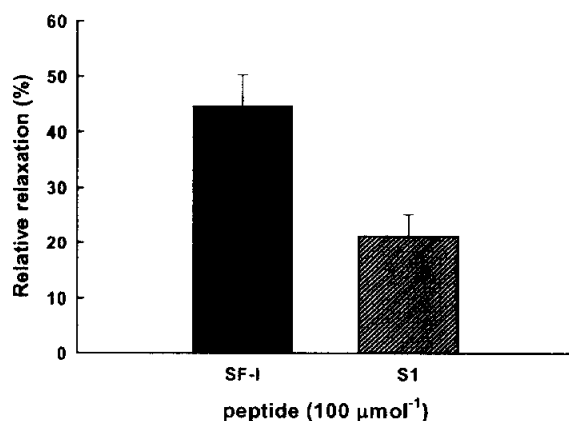


Fig. 33. Graphs comparing the mean relaxation response ($\pm$ s. e.) of CS preparation to SF-I and S1 (n=3). Relaxing effects expressed as % the maximal response to CCh, 1×10^{-5} M.

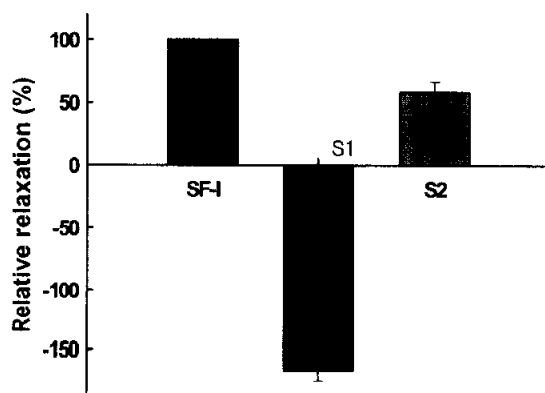


Fig. 34. Graphs comparing the mean relaxation response ($\pm$ s. e.) of TF preparation to SF-I, S1 and S2 (n $\geq$ 2). Relaxing effects expressed as percentage of the response to SF-I.

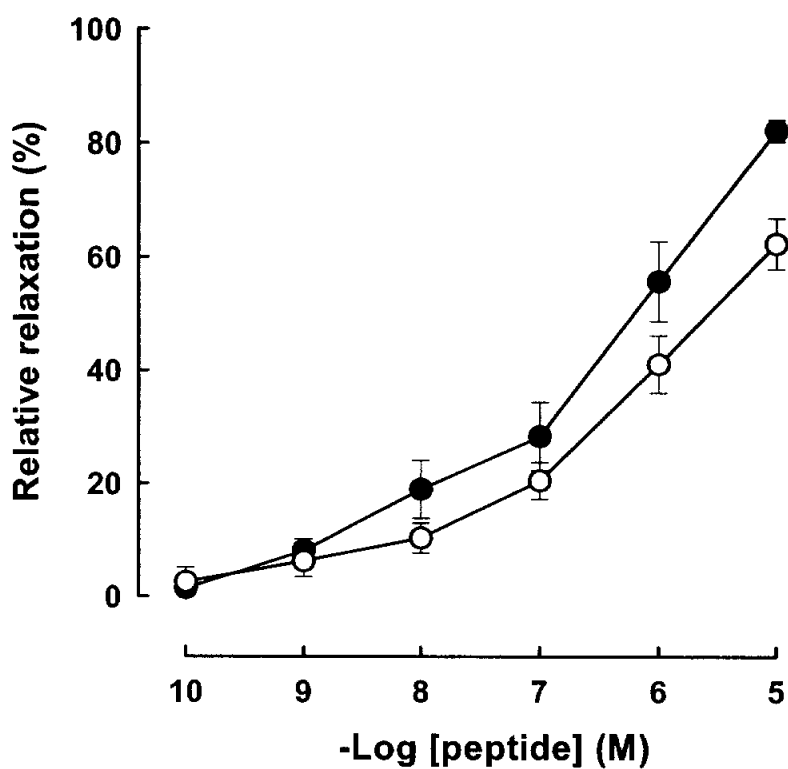


Fig. 35. Concentration response curves to SF-I and S1 induced relaxation in starfish *Asterias amurensis* DRM ($n \geq 3$) : SF-I (●) and S1 (○). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

7. 불가사리 DRM에서 SF-I의 이완활성 메카니즘

포유류에서 평활근의 수축과 이완은 calmodulin, cAMP, diacylglycerol 및 NO-cGMP등을 매개로하여 조절되고 세포내의 Na^+ 과 Ca^{2+} 이온의 농도도 신호전달 체계에 있어 영향을 미친다고 알려져 있다. 포유류 평활근에서 이미 알려진 메카니즘을 토대로하여 현재까지 보고된 바 없는 불가사리 DRM에서 SF-I의 이완활성 메카니즘을 조사하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 SF-I의 활성이 NO-cGMP 경로의 경유 여부, 이온통로 수용체 경유 여부, 제 2전령물질인 cAMP 및 Ca^{2+} 관련 여부, 무스카린성 수용체 경유 여부 및 외원성 신경계의 영향을 조사하였다.

7.1. NO synthase inhibitor인 L-NAME의 효과

SF-I에 의한 이완활성이 NO와 관련된 경로를 경유하여 조절되는지 확인하기 위하여 NO synthase inhibitor인 L-NAME를 사용하였다. 10^{-5} M과 10^{-4} M의 L-NAME를 각각 10분전에 반응조에 전처리한 후, 10^{-6} M ACh를 투여하여 수축시킨 다음 SF-I을 누적 투여하였다. Fig. 36는 control과 L-NAME의 전처리에 따른 SF-I의 이완활성을 농도 의존곡선으로 나타낸 것이다. 10^{-5} M의 L-NAME를 전처리하였을 때, SF-I의 이완활성은 10^{-10} M에서 0.58 ± 0.35 %의 역치값을 가졌고, 10^{-5} M에서 108.1 ± 5.14 %의 최대 이완활성을 보였다. ED_{50} 값은 2.0×10^{-8} M이었다. 10^{-4} M의 L-NAME를 전처리했을 때, SF-I의 이완활성은 10^{-10} M에서 2.7 ± 0.5 %의 역치값을 가졌다. 10^{-5} M에서 100.3 ± 3.9 %의 최대 이완활성을 나타냈으며, ED_{50} 값은 2.3×10^{-8} M이었다. 이러한 결과들은 L-NAME이 SF-I의 이완활성에 거의 영향을 나타내지 않는 것을 의미한다.

7.2. G-protein activator인 mastoparan의 효과

SF-I에 의한 이완활성이 G-protein을 경유하여 나타나는지 여부를 확인하기 위하여 mastoparan을 10^{-6} M과 10^{-5} M 농도로 각각 10분전에 반응조에 전처리한 후, 10^{-6} M의 ACh로 수축시킨 후 SF-I을 누적 투여하였다 (Fig. 37). 10^{-6} M의 mastoparan을 전처리한 경우 SF-I의 이완활성은 10^{-10} M에서 4.97 ± 0.8 %의 역치값을 가졌으며, 10^{-5} M에서 116.8 ± 14 %의 최대 이완활성을 보였다. 뿐만 아니라, 10^{-5}

M의 mastoparan을 전처리하였을 때 SF-I의 이완활성은 10^{-10} M에서 5.56 %의 역치값을 가졌으며, 10^{-5} M에서 100 %의 최대 이완활성이 나타났다. 10^{-6} M과 10^{-5} M의 mastoparan을 각각 전처리한 후 SF-I 이완활성은 control과 유사하였다. 이것은 G-protein activator인 mastoparan이 SF-I의 이완활성에 거의 영향을 나타내지 않는 것을 의미한다.

7.3. Adenyl cyclase activator인 forskolin과 inhibitor인

MDL-12,330-HCl의 효과

SF-I의 이완활성이 cAMP 관련 경로를 경유하여 나타나는지 조사하기 위하여 adenyl cyclase activator인 forskolin과 adenyl cyclase inhibitor인 MDL-12,330을 사용하였다. 먼저 forskolin을 10^{-5} M의 농도로 10분전에 전처리하고, 10^{-6} M의 ACh를 투여한 후 SF-I을 누적 투여하였다 (Fig. 38). 10^{-10} M의 SF-I에 의해 5.0 ± 1.5 %의 이완활성이 나타났으며, 10^{-6} M의 SF-I에서는 55.6 ± 2.4 %의 높은 이완활성을 보였다. 그러나, 고농도인 10^{-5} M의 SF-I에서는 control보다 낮은 103.2 ± 1.4 %의 이완활성을 나타냈으며, ED_{50} 값은 9.0×10^{-9} M이었다. 또한, MDL-12,330을 10^{-5} M의 농도로 10분전에 전처리한 후, forskolin과 같은 방법으로 이완활성을 측정하였다 (Fig. 39). 그 결과 10^{-10} M의 SF-I에서 1.7 ± 1.7 %, 10^{-9} M의 SF-I에서 9.2 ± 3.3 %의 활성을 보여 control과 유사한 이완활성을 보였다. 그러나, 고농도인 10^{-6} M 및 10^{-5} M의 SF-I에서 각각 94.2 ± 4.2 % 및 106.7 ± 3.6 %의 이완활성을 나타내었지만, 10^{-5} M에서 control인 SF-I보다는 약 20 % 감소되었다. 따라서, forskolin과 MDL-12,330의 전처리로 인해 SF-I에 의한 이완활성 양상이 다소 변화되었으며, 이것은 불가사리 DRM에서 SF-I의 이완활성이 cAMP에 의해 조절되어질지 모른다는 것을 의미한다.

7.4. 무스카린성 수용체 inhibitor인 atropine의 효과

포유류에서 ACh는 무스카린성 수용체의 흥분에 의해 위장관 및 방광의 수축을 유발한다고 알려져 있다. 따라서, 불가사리 DRM에서 ACh의 수축활성과 SF-I의 이완활성이 무스카린성 수용체를 경유하여 일어나는지 알아보기 위해 무스카린성 수용체의 길항제인 atropine을 사용하였다 (Fig. 40). 10^{-5} M의 atropine을 전처리한 후 SF-I의

이완활성은 10^{-9} M에서 6.9 ± 2.2 %의 역치값을 가졌으며, 10^{-5} M에서 110.3 ± 7.9 %의 최대 이완활성을 보였다. 즉, atropine을 전처리한 후 SF-I의 이완활성은 control과 유사하였고, 이러한 결과는 불가사리 DRM에 있어 ACh과 SF-I이 무스카린성 수용체를 경유하지 않는다는 것을 의미한다.

7.5. Na^+ -channel 차단제인 tetrodotoxin의 효과

SF-I에 의한 이완활성이 ion-channel을 경유하여 조절되는지 확인하기 위하여 Na^+ -channel 차단제인 TTX를 10분전에 10^{-7} M, 10^{-6} M 및 10^{-5} M의 농도로 각각 전처리한 후, SF-I을 누적 투여하였다 (Fig. 41). 10^{-7} M의 TTX를 전처리한 결과 10^{-10} M에서 0.72 ± 0.72 %의 역치값을 가졌다. 또한, 10^{-5} M에서 104.0 ± 5.5 %의 최대 이완활성을 보였으며, ED_{50} 값은 5.0×10^{-8} M이었다. 10^{-6} M과 10^{-5} M의 TTX를 전처리한 경우, 10^{-10} M의 SF-I에서 각각 4.4 %와 4.2 %의 역치값을 보였고, 10^{-7} M의 SF-I에서 49.52 %와 51.24 %의 이완활성을 나타내어 TTX를 전처리하지 않은 control보다 약 20 %정도 낮은 활성을 나타냈다. 이는 10^{-7} M과 10^{-6} M의 TTX하에서 SF-I의 이완활성이 억제된다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 불가사리 DRM에서 SF-I의 이완활성이 Na^+ -channel에 의하여 조절되어진다는 것을 나타낸다.

7.6. Ganglionic blocking agent인 hexamethonium chloride의 효과

SF-I에 의한 외원성 신경계의 영향을 조사하기 위하여 ganglionic 차단제인 hexamethonium chloride를 10^{-5} M, 10^{-4} M 및 10^{-3} M의 농도로 10분전에 각각 전처리한 후, 10^{-6} M의 ACh으로 수축시킨 후 SF-I을 누적 투여하여 이완활성을 측정하였다 (Fig. 42). 그 결과, 10^{-5} M과 10^{-4} M의 hexamethonium에 의해 농도 의존적으로 저해되었지만, 10^{-3} M의 hexamethonium에서는 이완활성에 대한 저해효과가 나타나지 않았다. 그러나, 고농도인 10^{-5} M의 SF-I에서의 이완활성은 hexamethonium을 전처리하지 않은 control보다 약 20 %정도 억제되어 나타났다. 따라서, 불가사리 DRM에 대해 10^{-5} M과 10^{-4} M의 hexamethonium을 전처리하였을 때, SF-I의 이완활성이 저해되었다는 것은 SF-I의 이완활성이 neuron을 매개로 나타날지 모른다는 것을 제시한다.

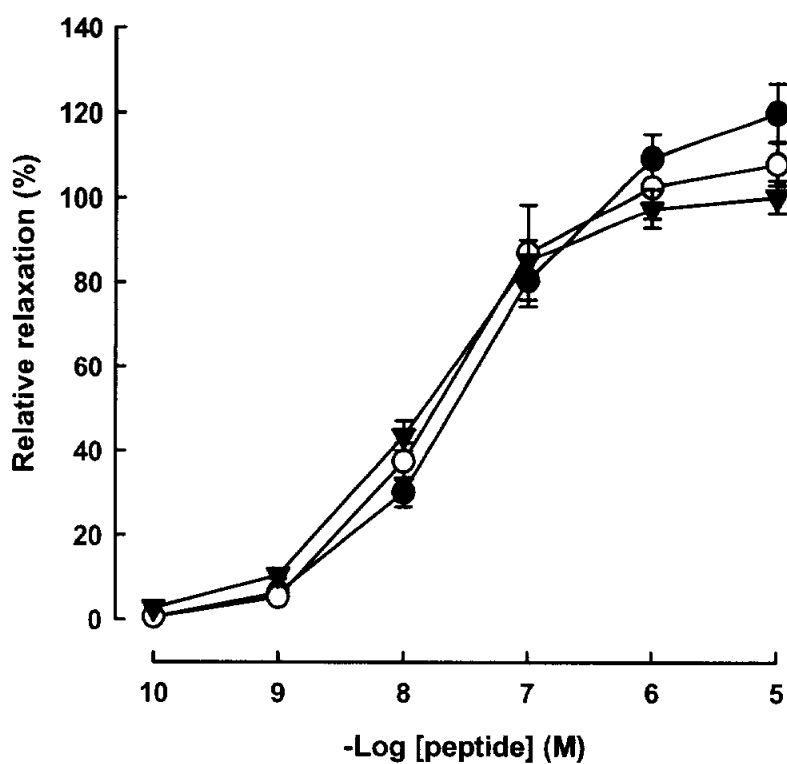


Fig. 36. Effect of N^G -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of L-NAME (1×10^{-5} M, ○) and L-NAME (1×10^{-4} M, ▼) in the starfish DRM ($n=4$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

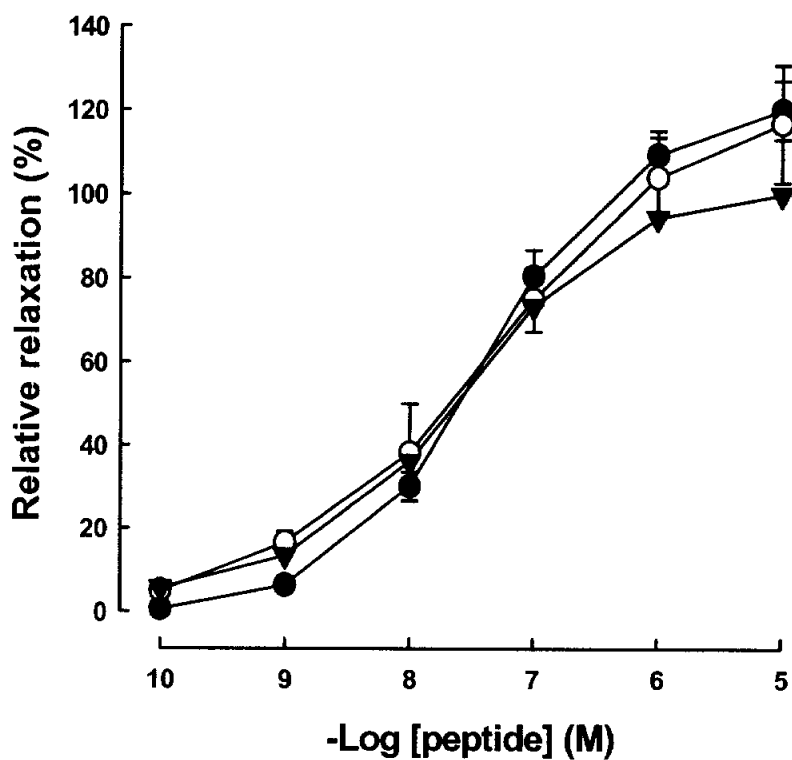


Fig. 37. Effect of mastoparan on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of mastoparan (1×10^{-6} M, ○) and mastoparan (1×10^{-5} M, ▼) in the starfish DRM ($n=2$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

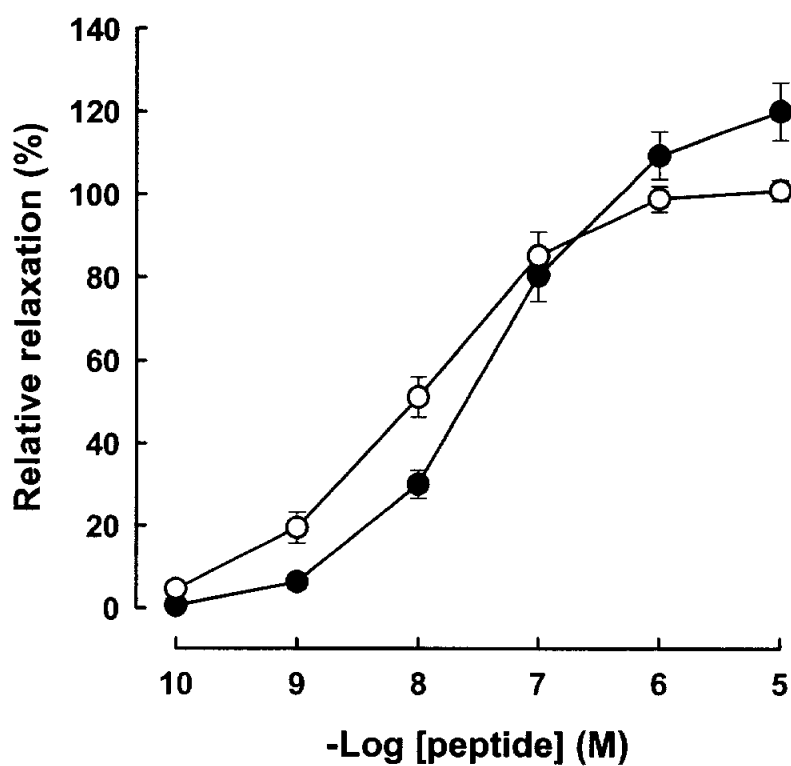


Fig. 38. Effect of forskolin on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of forskolin (1×10^{-5} M, ○) in the starfish DRM (n=5). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

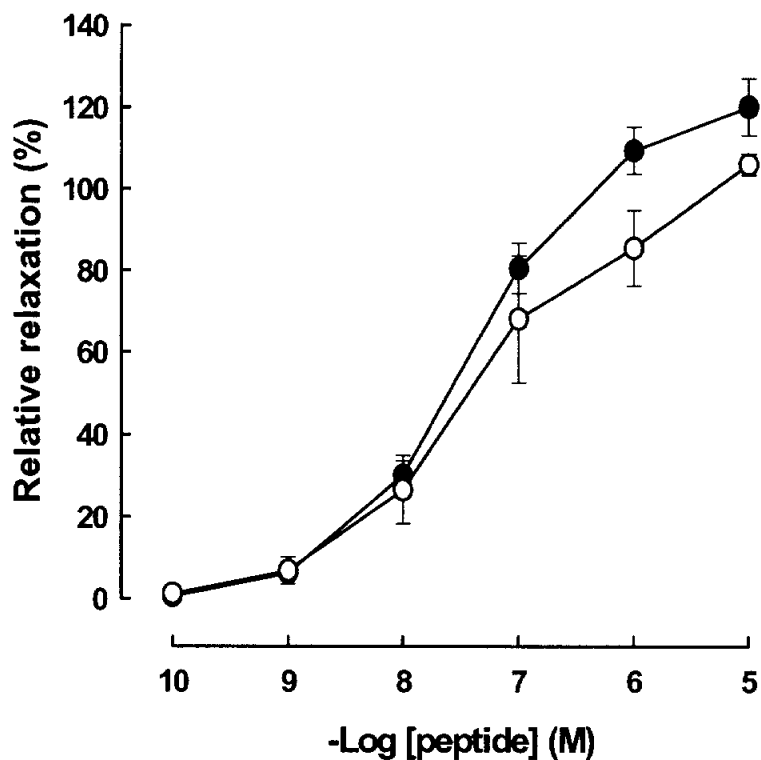


Fig. 39. Effect of MDL-12,330 on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of MDL-12,330 (10^{-5} M, ○) in the starfish DRM (n=3). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

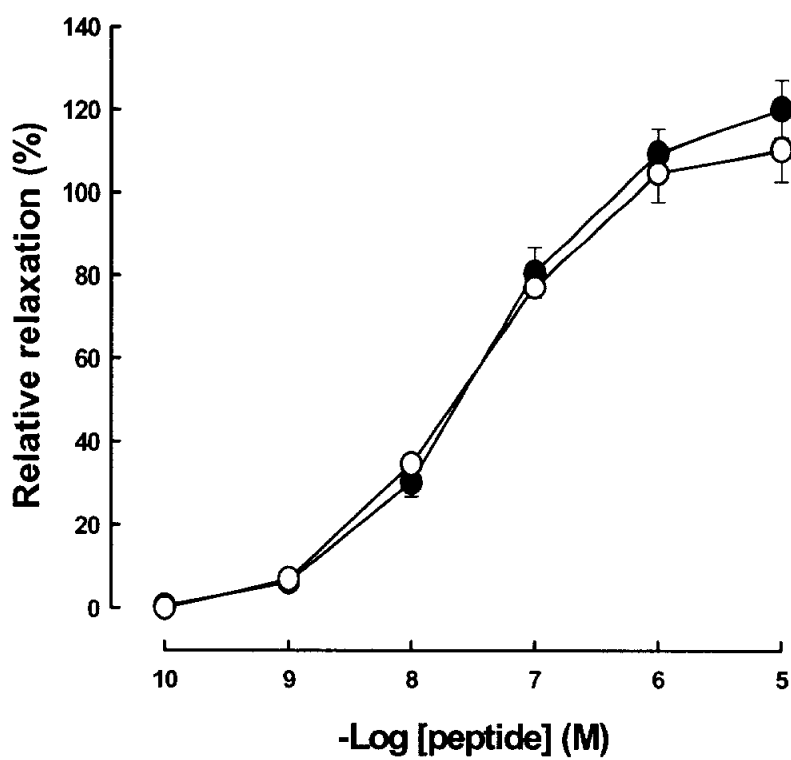


Fig. 40. Effect of atropine on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of 10^{-5} M atropine (1×10^{-5} M, ○) in the starfish DRM ($n=2$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

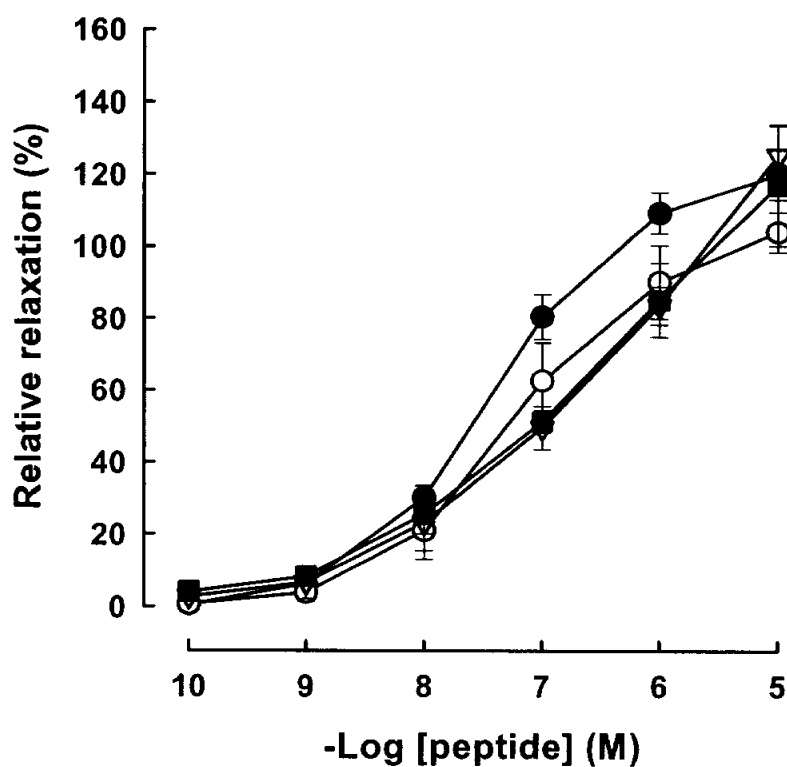


Fig. 41. Effect of tetrodotoxin on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of 1×10^{-7} M TTX (○), 1×10^{-6} M TTX (▼) and 1×10^{-5} M TTX (▽) in the starfish DRM ($n \geq 2$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

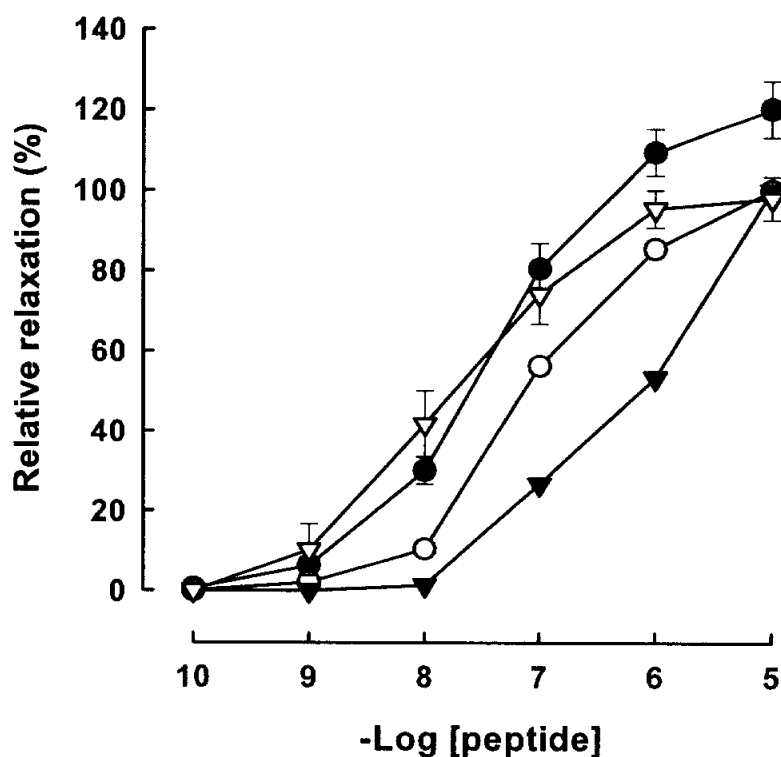


Fig. 42. Effect of hexamethonium on relaxation induced by SF-I (●, control), pretreatment of 1×10^{-5} M hexamethonium (○), 1×10^{-4} M hexamethonium (▼) and 1×10^{-3} M hexamethonium (▽) in the starfish DRM ($n \geq 2$). Relaxing effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

IV. 토 론

1. 불가사리로부터 이완성 펩타이드의 분리·정제

불가사리 whole body 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 저분자 친수성을 나타내는 물질이, RM60과 RM100층에는 펩타이드와 소수성 물질들이 포함되어 있다. 부분 정제된 분획들의 불가사리 DRM에 대한 활성을 측정한 결과, 불가사리 D.W.층의 경우 catecholamine등의 물질에 의해 근육의 수축활성을 증가시키는 활성을 나타낸 것으로 생각된다. RM60과 RM100층은 이들 분획에 함유된 펩타이드와 다른 여러 물질들의 영향으로 이완활성을 나타내었는데, RM60의 이완활성이 RM100보다 크게 나타났다. 그러나, RM10의 경우 이완활성이 상대적으로 낮았다 (Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 가장 큰 이완활성을 나타낸 RM60을 이용하여 이완성 물질을 정제하였으며, RM100을 이용한 연구는 이후에 수행할 예정이다.

불가사리 RM60층으로부터 서로 다른 분리 특성을 갖는 이온교환, 역상 및 분자량 column을 교차 반복적으로 사용하여 3가지의 이완성 펩타이드를 정제하였으며, 각각 SF-I, SF-II 및 SF-III로 명명하였다. Table 7은 정제한 펩타이드들의 일차구조를 나타낸다. SF-I은 방향족 아미노산 및 (+) charge를 갖는 아미노산들을 함유한 16개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 1601.72 (M+H)⁺이었다. SF-I의 C-말단 형태를 알아보기 위해 amide 형태 (SF-I amide)와 OH 형태 (SF-I)를 합성하여 co-elution한 결과, 천연 SF-I의 C-말단이 어떠한 수식도 없는 free한 OH 형태임이 판명되었다 (Fig. 20과 21). 따라서, SF-I의 완전한 일차구조는 분자량, sequencer 및 머무름시간 비교에 의해 다음과 같다: Phe-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Tyr-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp. SF-I의 일차구조를 바탕으로 기존에 알려진 신경성 펩타이드와 동일성을 조사한 결과, SF-I은 다른 물질들과 상동성을 갖지 않는 새로운 물질이라는 것이 밝혀졌다. Table 3에 나타내듯이 극피동물로부터 정제된 S1 및 S2를 비롯한 신경성 펩타이드들의 경우, FMRFa를 모체로 한 항체를 작성하여 RIA기

법으로 정제하였기 때문에 FMRFa와 유사한 C말단을 지닌다. 그러나, 본 연구에서는 RIA기법이 아닌 bioassay법을 이용하였기 때문에 이전에 보고된 바 없는 새로운 SF-I을 정제할 수 있었다고 생각한다. 이러한 직접적인 활성 측정법인 bioassay법을 이용하여 먹장어의 body와 intestine으로부터 4종류의 새로운 신경성 펩타이드인 burgerkinin을 본 연구실에서 정제하였고 (Kim., 2004), 이외에도 여러 종류의 펩타이드들을 정제해 오고 있다 (unpublished data).

SF-I의 일차구조를 살펴보면 4개의 Gly 잔기를 가지고 있다. 이러한 특징은 *Aplysia*로부터 유래된 bucalin (Kobayashi and Muneoka, 1990)과 Table 2에 나타난 EEP (Oumi *et al.*, 1995) 및 LEP (Minakata *et al.*, 1997; Matsushima *et al.*, 2002)와 같이 하등동물로부터 유래된 신경성 펩타이드에 Gly이 다량 함유되어 있다는 연구결과와 비교하면 흥미롭다. 뿐만 아니라 일차구조 내에서 일부 Gly이 -Gly-Gly-의 형태로 존재하는 특징도 일치하였다. 또한, Table 2 및 3에서 나타난 물질들을 포함하여 현재까지 보고된 수많은 신경성 펩타이드들은 C-말단에서 Phe, Leu, Met, Arg 등이 많이 발견되고 있으나, SF-I은 이들 특징과는 달리 Asp를 마지막 잔기로 가지고 있다. Table 12는 지금까지 발견된 신경성 펩타이드 중 SF-I과 마찬가지로 C-말단에 Asp를 소유하고 있는 물질들을 나타낸다. C-말단의 마지막 잔기가 Asp인 펩타이드로는 Proopiomelanocortin gene에서 유래된 멜라닌 세포억제 호르몬인 β -Melanocyte-stimulating hormone (β -MSH, Balse-Srinivasan *et al.*, 2003)과 γ -lipotropin (γ -LPH, Graf *et al.*, 1977), 장수말벌 (*Vespa mandaria*)로부터 발견된 vespakinin-M (Kishimura *et al.*, 1976)이 알려졌다. 또한, 다양한 동물로부터 보고되어진 gulcagon like-peptide (GLP, Hoyle, 1998), south american frog (*Phyllomedusa secretes*)의 피부에서 유래된 deltorphin A (Amiche *et al.*, 1998) 및 달팽이 (*Achatina fulica*)의 Achatina (Kamatani *et al.*, 1989)가 알려져 있다.

C-말단이 Asp인 이러한 신경성 펩타이드 중 β -MSH는 피부의 색소침착, steroid 생성의 조절, 신경의 재생 및 세포성장에 관여할 뿐만 아니라 (Balse-Srinivasan *et al.*, 2003), 배뇨항진 기능 또한 가진다고 알려져 있고 (Valentin *et al.*, 1993), γ -LPH는 지방분해의 역할이 보고된 바 있다 (Graf *et al.*, 1977). Vespakinin-M은 bradykinin관련 신경성 펩타이드로서 평활근 수축 및 혈압강하 작용을 하며

(Kishimura *et al.*, 1976). 인슐린과 반대작용을 하는 GLP 중에서 GLP-1은 cAMP를 자극하여 glucagon분해를 촉진시키는 역할이 있어 당뇨병 환자의 혈당조절제로서 이용되고 있다. 특히, GLP-1은 rat artery와 같은 평활근에 대해 이완작용을 가진다고 알려져 있다 (Richter *et al.*, 1993).

또한, 강력한 intestinal growth factor로 알려진 GLP-2는 상피세포의 증식을 유도하는 활성을 지니고 있으며 (Drucker *et al.*, 1996), C-말단에 SF-I과 같은 Thr-Asp를 가지고 있다. Table 12에 나타난 여러 신경성 펩타이드의 C-말단에 존재하는 Asp가 활성에 있어 어떠한 영향을 미치는지는 모른다. 그러나, SF-I이 이들 펩타이드에서 나타나는 평활근 이완활성과 혈관이완 활성을 갖는 것으로 보아, C-말단의 Asp가 이들 활성 발현에 중요한 역할을 할 것이라 생각된다. SF-I을 이용하여 C-말단에 Asp를 지닌 펩타이드들이 갖는 색소 침착, 상피세포 증식 및 배뇨 조절등의 기능을 조사해본다면 흥미로울 것이라 생각된다. 또한, deltorphin A에 있어서 (-) charge를 갖는 Asp가 특정 수용체와 결합에 결정적인 영향을 미친다는 연구결과 (Negri *et al.*, 2000)와 연관지어 볼 때, SF-I의 C말단 Asp와 8번째 잔기인 Asp가 수용체와 친화력에 영향을 미칠지 모르는 중요한 잔기라고 생각된다.

Table 2와 3에 제시된 펩타이드들을 포함한 많은 신경성 펩타이드 뿐만 아니라 항균성 펩타이드에서 C-말단이 amide형태로 존재하며, C-말단의 수식이 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 그러나, SF-I과 SF-I amide의 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 조사한 결과 이완활성이 거의 유사하게 나타났기 때문에 (Fig. 24), SF-I은 DRM에서 이완활성을 나타낼 때 C-말단의 수식이 중요하게 작용하지 않음을 의미한다. 이것은 VIP-OH와 VIP-amide의 활성을 측정하였을 때 큰 변화가 없었기 때문에, 활성을 나타내는데 있어 VIP의 C-말단의 형태가 중요하게 작용하지 않는다는 보고 (Fahrenkruga *et al.*, 1989)와 유사성을 지닌다.

한편, SF-II는 분자량이 2306.95 Da으로 측정되었고, 방향족 아미노산인 Tyr 2개를 가졌으며, 산성 및 염기성 아미노산을 포함한 20개 이상의 아미노산으로 이루어진 펩타이드임을 알 수 있었다. SF-III는 방향족 아미노산인 Phe 1개와 (+) charge를 갖는 Lys과 Arg, (-) charge의 Asp를 포함하는 30개 이상의 아미노산으로 구성되어 있었으며, 분자량은 측정결과 3655.09 Da이었다. 또한, Table 7에 나타난 바와 같이

SF-II는 4번째와 20번째 잔기가 완전히 결정되지 않았는데, 만약 이 두 잔기가 Cys이고 disulfide bond를 형성한다고 가정하였을 때, 분자량의 측정값과 계산값이 거의 일치하였다. 이는 SF-II에서 결정되지 않은 두 잔기가 Cys이라는 것을 예측할 수 있게 하고, 현재 4번째와 20번째 잔기를 Cys으로 하여 SF-II를 합성 중에 있다. SF-III는 정제된 천연물의 양이 아미노산 서열 분석을 행하기에 충분하지 않았으므로 이들의 일차구조는 완전히 결정할 수 없었다. 따라서, SF-II와 SF-III의 완전한 일차구조를 규명하기 위하여 cDNA 연구는 현재 진행 중이다.

2. SF-I과 그 유도체들의 구조와 활성

불가사리 DRM에서 SF-I이 이완활성을 나타내는 최소영역 및 중요 잔기를 조사하기 위하여 N-말단 및 C-말단 유도체와 각각의 아미노산 잔기를 Ala로 치환한 유도체를 합성하였고 (Table 5), Chou-Fasman법에 의해 2차구조를 예측하여 (Table 10) 구조와 활성간의 상관관계를 조사하였다.

2.1. SF-I과 N-말단 및 C-말단 유도체의 구조와 활성

일차구조가 밝혀진 SF-I의 2차구조를 확인하기 위하여 CD 스펙트럼 (Fig. 22)과 Chou-Fasman법에 의한 2차구조 예측 결과 (Table 10), SF-I은 특정구조를 취하지 않는 unordered한 구조로 나타났다. CD 스펙트럼의 측정 결과, 중성과 산성지질막에서는 SF-I의 스펙트럼의 변화가 거의 나타나지 않았다. 중성지질막하에서는 Tyr, Phe와 같은 아미노산이 소수성 상호작용을 하며, 산성지질막하에서는 Asp, Thr, Ser등이 친수성 상호작용을 하여 펩타이드의 구조가 중성 및 산성지질막하에서 변화되는 경우가 알려져 있지만, 이들 용매에서 SF-I의 구조의 변화가 없다는 것은 소수성 및 친수성 상호작용이 그다지 중요하게 작용하지 않음을 의미한다. 그러나, TES 완충액과 인공지질막하에서 스펙트럼의 차이를 보였기 때문에 친수성 및 소수성 상호작용이외의 다른 요인이 작용한 결과로 생각된다. 이는 SF-I이 α -helix와 β -sheet와 같은 특정구조를 취하지는 않으나 수용체와 결합시 약간의 구조변화를 일으킨다는 것을 의미할지도 모른다.

N-말단으로부터 순차적으로 하나씩 잔기를 제거한 유도체 역시 SF-I와 거의 유사한 구조를 나타냈고, 이들 유도체는 Table 8에서 나타낸 바와 같이 잔기가 제거됨에 따라 머무름시간이 빠르게 나타났고, 소수성도가 0.09로 같은 SF-I(2-16)과 SF-I(3-16)의 머무름시간은 유사하게 나타났다. 그러나, 소수성도와 소수성 모멘트는 유도체들의 머무름시간과 반드시 일치하지는 않았다. 이것은 random한 구조를 갖는 SF-I을 모델로 한 유도체를 사용하여 α -helix 구조를 모델로 평가된 소수성도 및 소수성 모멘트값을 머무름시간과 비교하였을 때, 이들이 일치하지 않을 것이라는 예측과 일치하였다. Fig. 43는 10^{-6} M에서 N-말단 유도체들의 DRM에 대한 이완활성을 나타낸다. SF-I(2-16), SF-I(3-16), SF-I(4-16) 및 SF-I(5-16)은 control보다 약 40 % 감소된 60 % 가량의 이완활성을 나타냈고, 이들의 10^{-6} M에서의 활성은 거의 유사하였다. 이러한 결과는 Phe¹이 이완활성을 나타내는데 있어 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 반면, SF-I(6-16), SF-I(7-16), SF-I(8-16), SF-I(9-16) 및 SF-I(10-16)은 10^{-6} M에서 40 % 이하의 활성을 나타냈고, SF-I과 비교해서 ED₅₀값도 50 배 이상 증가하였다. 이와 같이 Gly⁵가 제거된 후 유도체의 활성이 급격히 감소하는 것으로 보아 SF-I에서 N-말단 5번째 이후의 잔기가 최대 이완활성을 나타내는 것에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다. 이는 *Musca domestica* kinin 신경성 펩타이드의 N-말단 유도체 중 N-말단으로부터 8개의 아미노산이 제거된 유도체에서 최대반응을 보여 N-말단의 8번째 잔기까지는 최대반응을 나타내는 것에 중요한 영향을 미치지 않음이 보고된 이전의 연구에 의하여 뒷받침된다 (Coast *et al.*, 2002).

한편, 2차구조 예측법에 의한 SF-I의 C-말단 유도체들의 구조는 아미노산이 제거됨에 따라, C-말단 후미부의 Asp⁸에서 Phe¹⁴까지의 잔기들이 갖는 β -turn구조의 함량이 변화되었다 (Table 10). 그리고, 머무름시간 역시 잔기가 제거될수록 빨라졌고, 소수성도가 같은 유도체의 경우 유사한 머무름시간을 나타내었다 (Table 8). Fig. 44은 10^{-5} M에서 C-말단 유도체들의 DRM에 대한 이완활성을 나타낸다. SF-I(1-15)과 SF-I(1-14)는 control보다 20 %가량 감소된 활성을 나타내었으나, 이들 두 유도체의 이완활성은 거의 유사하였다. 이것은 C-말단의 Asp¹⁶가 SF-I이 이완활성을 나타내는데 있어 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 또한, SF-I(1-13), SF-I(1-12), SF-I(1-11) 및 SF-I(1-10)의 활성이 40 % 이하의 현저히 낮은 활성을 나타낸 결과는,

Phe¹⁴의 제거로 인한 것이므로 DRM에서 최대 이완활성을 나타내는데 있어서 Phe¹⁴가 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

그리고, C-말단 유도체의 구조와 활성을 연관지어볼 때, Table 10에 나타내듯이 C-말단의 후마부의 β -turn 부위가 감소된 SF-I(1-13), SF-I(1-12)에서 최대활성이 현저히 감소하는 것으로 보아 C-말단의 turn구조가 활성화에 있어 어떤 영향을 주는 것으로 생각되어진다. 이러한 현상은 연체동물에서 분리된 FMRFa관련 신경성 펩타이드들의 구조와 활성의 상관관계를 조사한 경우에 있어서도, 펩타이드에서 turn구조의 양이 펩타이드와 수용체의 결합 친화력에 영향을 줄 수 있다는 이전의 연구와 관련지을 수 있다 (Edlson *et al.*, 1999). 또한, C-말단이 순차적으로 제거된 [¹²⁵I] VIP 유도체를 사용하여 rat lung에서 활성 측정을 한 결과, C-말단이 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있는데 (Onoue *et al.*, 2004a), 본 연구 결과, SF-I의 C-말단 유도체들의 잔기가 3개 제거된 유도체들의 경우, 수용체와의 친화력 및 최대 이완활성이 현저히 감소되어 나타나는 것으로 보아 불가사리 DRM에서 이완활성을 나타냄에 있어 C-말단이 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

따라서, N-말단 및 C-말단 유도체의 연구결과들은 이완활성을 나타내는데 있어서 N-말단의 Phe¹, Gly⁵와 C-말단의 Asp¹⁶, Phe¹⁴가 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 또한, 이전의 연구결과 (Coast *et al.*, 2002; Onoue *et al.*, 2004b)와 본 연구결과로부터 불가사리 DRM에서 이완활성을 나타내는 SF-I의 최소 필요 잔기는 SF-I(5-14)인 것으로 생각된다.

2.2. SF-I과 SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체의 구조와 활성

SF-I에서 활성을 나타내는 중요 잔기를 조사하기 위하여 SF-I의 Ala-치환 유도체를 합성하였고 (Table 5), Chou-Fasman법을 이용하여 2차구조를 예측하였다. 대부분의 유도체들은 SF-I과 유사한 random 구조를 가졌으나, Pro→Ala로 치환된 [Ala⁹] SF-I의 경우, 9번 잔기에서 14번 잔기까지 helix 구조를 포함한 turn구조를 지닌다고 예측되었다. 이러한 결과는 SF-I과 비교해 구조적 변화가 있다는 것을 나타내며 (Table 10), 아마도 이러한 변화는 α -helix breaker로 작용한 Pro를 α -helix maker로 작용하는 Ala으로 치환한 결과인 것 같다.

또한, 머무름시간을 비교한 결과, SF-I의 Ala-치환 유도체는 대부분의 경우 SF-I과 유사한 머무름시간을 나타내었으나, [Ala¹⁰]SF-I과 [Ala¹⁴]SF-I은 SF-I보다 빠른 머무름시간을 가졌다 (Table 9). 이들 두 유도체의 머무름시간이 빠른 이유는 소수성인 Leu과 Phe을 덜 소수성인 Ala로 치환했기 때문으로 생각된다. 그러나, Phe¹을 Ala으로 치환한 유도체의 경우, Phe¹⁴를 Ala으로 치환한 경우보다 머무름시간의 변화가 적었다. 이것은 펩타이드 내부에 있는 잔기가 말단에 위치한 잔기보다 머무름시간에 영향을 많이 미친다는 것을 의미한다.

Fig. 45는 10⁻⁶ M에서 SF-I의 Ala-치환 유도체의 DRM에 대한 농도 의존곡선을 나타낸다. 대부분의 경우 유사한 이완활성을 나타냈으나, [Ala⁹]SF-I은 60 %의 이완활성을, [Ala¹⁰]SF-I과 [Ala¹⁴]SF-I은 30 %가량의 이완활성을 나타냈다. 이러한 결과는 SF-I에서 Pro⁹, Leu¹⁰과 Phe¹⁴가 이완활성을 나타냄에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 특히 Diaz-Miranda와 Garcia-Arraras (1995)에 의하면 FLRFa는 해삼의 intestine과 longitudinal muscle band에서 해삼유래의 신경성 펩타이드인 GFSKLYFa와 유사한 이완활성을 보였으나, FMRFa는 반응을 나타내지 않아 잔기 중 Leu의 중요성이 보고된 바 있는데, 이것은 본 연구결과 Leu¹⁰의 중요성을 뒷받침한다. 또한, Phe의 경우 insectatachykinin (TK)인 Cus-TK의 Phe⁵→Ala으로 치환하였을 때 유도체의 활성이 감소되었다고 보고된 바 있다 (Torfs *et al.*, 2002).

한편, SF-I(5-14)의 구조는 SF-I과 거의 유사한 형태로 예측되었고 C-말단의 β -turn구조는 잘 보존되어 있었다. 불가사리 DRM에 대한 이완활성을 조사한 결과 역치값은 SF-I보다 100배 높은 농도에서 나타내었고, 10⁻⁵ M에서의 이완반응은 SF-I의 반응보다 40 %이상 감소되었다. 비록, 고농도인 10⁻⁴ M에서 약 100 %의 이완활성을 보였지만 약물의 최대반응은 유지되었다. 따라서, 최대반응을 나타내기 위한 최소 잔기로 규명된 SF-I(5-14)를 모체로 하여, 활성을 나타내는데 있어서 중요한 잔기를 예측하기 위해 Ala-치환 유도체를 합성하였다. SF-I(5-14)와 SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체들의 2차구조를 비교해 보면 대부분 유사한 구조를 나타내었다 (data not shown). 그러나 [Ala⁹]SF-I(5-14), [Ala¹¹]SF-I(5-14) 및 [Ala¹³]SF-I(5-14)은 9번에서 14번 잔기까지 helix를 포함한 turn구조를 나타냈으며 (Table 10), 유도체의 대부분은 SF-I(5-14)보다 늦은 머무름시간을 나타내었다 (Table 9). 또한, 불가사리 DRM

에서의 이완활성 측정결과, 대부분의 Ala-치환 유도체의 활성이 SF-I(5-14)보다 감소하였다. 특히, [Ala¹⁰]SF-I(5-14) 및 [Ala¹³]SF-I(5-14)들은 10⁻⁴ M에서도 25 % 미만의 이완활성을 나타내었고, [Ala⁸]SF-I(5-14)의 활성은 나타나지 않았다 (Fig. 46).

또한, SF-I(1-15), [Ala⁸]SF-I(5-14) 및 [Ala⁸]SF-I의 연구결과, Asp가 하나 존재하는 SF-I(1-15)와 [Ala⁸]SF-I는 SF-I보다 낮은 이완활성을 나타냈으나 고농도에서 100 %의 이완활성을 유지하였다. 그러나, Asp가 하나도 존재하지 않는 [Ala⁸]SF-I(5-14)에서는 이완활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 (-) charge를 갖는 Asp가 수용체와의 결합에 있어 결정적인 역할을 할지도 모른다는 것을 나타낸다. 이전의 연구에서 neurokinin A (4-10)의 유도체중 Asp⁴→Ala로 치환하였을 때, NK2 수용체에 대한 친화력이 감소되어 Asp의 중요성이 보고된 바 있다 (Warner *et al.*, 2001).

또한, C-말단의 [Ala⁹]SF-I(5-14)와 [Ala¹³]SF-I(5-14)의 9번에서 14번 잔기까지의 구조가 helix를 포함한 turn구조로 변환된 경우, 활성이 감소한 것으로 보아 C-말단의 turn구조가 SF-I이 이완활성을 나타냄에 있어 중요한 작용을 한다고 생각되어진다. 그러나, turn구조 내부에 Leu이 존재하지 않는 [Ala¹⁰]SF-I(5-14)의 경우, SF-I(5-14)와 유사한 구조를 형성하고 있으나, isobutyl ((CH₃)₂CHCH₂-)기를 결가지로 갖는 Leu이 methyl (CH₃-)기를 Ala로 치환함으로써 활성이 감소하였다. 이는 Leu의 isobutyl기가 수용체와 결합하는데 있어 구조적으로 반드시 필요하며 수용체와의 친화력 차이를 유발하는 것으로 생각된다. 따라서, 불가사리 DRM에서 SF-I이 이완활성을 나타내는데 있어 Leu이 결정적인 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 이러한 SF-I(5-14)의 Ala-치환 유도체 연구 결과들로 미루어 보아, SF-I(5-14)의 잔기 중 Asp⁸, Leu¹⁰ 및 Gly¹³이 이완활성을 나타내는데 있어 중요한 잔기임을 제시한다.

결론적으로 SF-I의 N-말단과 C-말단 유도체 및 Ala-치환 유도체의 연구결과들을 종합해보면 SF-I이 불가사리 DRM에서 이완활성을 나타냄에 있어 Phe¹, Pro⁹, Leu¹⁰, Gly¹³, Phe¹⁴, Asp¹⁶이 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

3. 여러 가지 조직에 대한 SF-I의 이완활성측정

SF-I과 극피동물 및 연체동물유래의 신경성 펩타이드들과의 이완활성을 비교하기 위하여 불가사리 DRM, CS 및 TF를 사용하였다. 비교물질로서 불가사리 유래의 이완물질인 S1과 S2 (Elphick *et al.*, 1991a) 및 연체동물 유래의 FMRFa와 FLRFa (Diaz-Miranda and Garcia-Arraras, 1995a)를 사용하였다. 불가사리 DRM에 ACh를 전처리한 후, SF-I을 포함한 5종의 펩타이드를 농도별로 누적 투여하였고, 농도 의존적으로 이완활성이 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 32). 이는 이전의 연구에서 sea cucumber *Holothuria glaberrima*로부터 분리된 GFSKLYFa가 longitudinal muscle band에서 농도 의존적인 이완활성을 보여 수용체를 경유함을 보인 결과와 일치한다 (Diaz-Miranda and Garcia-Arraras, 1995b). 따라서, 본 연구에서 사용한 불가사리 DRM의 경우에 있어서도 SF-I이 수용체를 경유하여 이완활성을 나타낼 것이라 예측된다. 불가사리 *Asterina pectinifera* DRM에서 이들의 이완활성은 SF-I > S1 > S2 > FLRFa의 순으로 나타났다. 이들 중 SF-I의 활성이 가장 두드러지게 나타났고, S1의 이완활성이 S2보다 10^{-5} M에서 3배정도 크게 나타났다. 그러나, 이러한 결과는 불가사리 *Asterina pectinifera* DRM을 이용하여 실험한 것으로, *Asterias rubens* DRM에서 S2가 S1의 약 3배 이상의 이완활성을 보인 것 (Melarange and Elphick, 2003)과 상반된 결과로 나타났다. 또한, 연체동물유래인 FMRFa와 FLRFa는 불가사리 DRM에서 저농도에서 거의 활성을 나타내지 못하였다. 이는 FMRFa와 FLRFa가 연체동물문 유래의 신경성 펩타이드이기 때문에 극피동물문인 불가사리에 감수성이 낮아진 것으로 생각된다. 그러나, 10^{-4} M의 고농도에서 FLRFa는 FMRFa보다 높은 활성을 나타냈다. 이것은 해상의 intestine에서 FMRFa는 이완활성을 나타내지 못한 반면, FLRFa는 이완활성을 보인 연구 (Diaz-Miranda and Garcia-Arraras, 1995a)와 비교해 볼때, 극피동물의 조직에 있어 FMRFa보다 FLRFa가 더 효과적이라는 것을 의미한다.

또한, CS에서의 S1, S2 및 SF-I의 이완활성을 조사하기 위하여 10^{-5} M의 ACh를 이용하였으나 수축반응이 지속적으로 유지되지 않았기 때문에 (data not shown), ACh과 같은 수용체를 경유하나 acetylcholinesterase와 같은 분해효소의 영향을 거의 받지 않는 10^{-5} M의 CCh을 전처리한 후 펩타이드를 투여하였다 (Fig. 33). 이완활성은 SF-I > S1의 순으로 나타났고, S2의 경우 이완활성이 나타나지 않았다. 또한, TF

는 ACh에 대하여 수축반응을 거의 보이지 않았는데, 이것은 TF에 ACh 수용체의 분포가 많지 않다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 30 mM high- K^+ ASW를 사용하여 TF 조직을 최대한 수축시킨 후, 10^{-4} M의 펩타이드를 투여하였다. SF-I과 S2는 이완활성을 나타냈으며, SF-I이 S2보다 2배 크게 나타났다. 그러나, 특이하게도 S1은 이완활성을 나타내지 않고 수축활성을 보였다 (Fig. 34). 이러한 결과는 불가사리 *Asterias rubens*에서 S1과 S2가 이완활성을 나타냈으며, S2의 활성이 S1보다 약 2배정도 크게 나타난 연구 (Melarange and Elphick, 2003)와 상반된 결과라 하겠다. 아마도 이러한 연구결과의 차이는 서로 다른 불가사리 종의 사용 및 실험조건의 차이로 인해 발생할지도 모른다. SF-I의 이완 활성은 DRM에서 더욱 강하게 나타났으며, 이러한 현상은 SF-I이 불가사리 몸체의 단단함 (catch) 및 부드러움 (mutable)의 조절역할을 하고 있는 DRM에 특이적으로 반응한다는 것을 의미한다. 한편, CS와 TF에서 FMRFa와 FLRFa는 이완활성을 나타내지 않았는데, 이것은 불가사리의 CS와 TF에 이들의 특이적인 수용체의 분포가 적다는 것을 나타낸다. 이러한 결과로부터 SF-I은 불가사리에서 DRM, CS 및 TF와 같은 다양한 조직에서 폭넓은 이완제로서의 역할을 할 수 있다는 것 뿐만아니라, 각 조직에 대해 이완제로서의 기여도가 다르다는 것을 제시한다.

한편, 다른종의 DRM에 대해서 이완반응을 조사하기 위해 아무르불가사리 *Asterias amurensis*을 사용하였고, 이완활성의 세기는 SF-I> S1순으로 나타났다. Fig. 47은 *Asterina pectinifera* DRM과 *Asterias amurensis* DRM에서 SF-I과 S1의 이완활성을 농도 의존곡선으로 비교하기 위해 편의상 하나의 그래프로 나타낸 것이다. S1의 경우 *Asterina pectinifera* DRM에서보다 10^{-5} M에서 20 %이상 증가된 반응을 나타냈는데, 아마도 S1이 *Asterias rubens*에서 분리되어졌기 때문에 다른 속인 *Asterina pectinifera*에서 보다 동일 속인 *Asterias amurensis*에서 활성을 높게 나타냈다고 생각된다. 또한, SF-I이 S1보다 높은 이완활성을 나타냈지만, 두 종의 DRM에 대한 결과를 비교해 살펴보면, *Asterina pectinifera* DRM에서보다 *Asterias amurensis* DRM에서 이완활성이 낮게 나타났다. 이상과 같이 다른 종들에서 펩타이드들이 활성의 차이를 가진다는 것은 종들간에 특이적인 수용체 및 그들의 subtype이 존재한다는 것을 의미하며, 종-특이적인 활성을 나타낸다는 것을 제시한다.

또한, SF-I의 포유류 조직에 대한 활성을 알아보기 위하여 rat aorta 및 atrium을 사용하였다. 그 결과 rat aorta에 약 10^{-10} M ~ 10^{-8} M 범위 내에서 29.1 ± 19.4 %의 이완활성을 나타내었다. 그러나 혈관 조직의 상태와 위치에 따라 그 활성의 변화가 크게 나타났으며, 활성을 나타내는 농도 또한 일정하지 않았다 (data not shown). 또한, SF-I은 rat atrium에서 아무런 영향을 주지 않았다. Rat aorta와 atrium에서의 이러한 결과는 SF-I이 혈압을 조절하는 활성을 가질지 모름을 제시하고, 혈압조절 기능에 있어 심박수에는 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 현재 SF-I의 rat에 대한 혈압조절 기능을 알아보기 위해 연구 진행 중이다.

4. 불가사리 DRM에서 SF-I의 작용기작

척추동물에서 평활근 이완은 신경성 펩타이드와 NO를 포함한 neuronal signalling molecules의 다양성에 의해 조절 되어진다 (Elphick and Melarange, 2001). 특히 극피동물에서 근육이완의 생리는 진화상 척추동물과 더 밀접하기 때문에 매우 흥미롭다. 극피동물 중에는 해상의 longitudinal muscle bands와 불가사리의 DRM과 같은 body wall에 연계된 근육과 더불어 body wall 진피에는 작은 근육들과 불가사리의 body wall에 있는 석회질의 소골에 연결되어 있는 근육들이 존재한다 (O'Neill, 1989). 이들 근육의 수축과 이완상태는 불가사리가 body wall을 딱딱하게 유지하거나 유연하게 만들도록 도와준다. 그러나, 그들의 역할에 관한 약리학적 연구는 전무하다. 그러므로, ACh에 의해 수축된 DRM의 이완 활성이 어떠한 경로를 통해 일어나는지 이미 밝혀진 척추동물의 이완활성 메카니즘을 바탕으로 다양한 signal transduction 약물을 이용하여 조사하였다. Table 13은 본 연구에서 사용한 약물들의 전처리한 후의 SF-I의 활성 연구결과를 나타낸다.

이전의 연구에서 진주당치 ABRM의 catch tension에 대하여 cAMP level을 감소시키는 약물인 nicotinic acid을 처리하였을 때 serotonin에 의한 이완활성이 감소하여 (Cole and Twarog, 1972), catch tension의 이완활성에 cAMP가 관여함이 제시된 바 있다. 따라서 본 연구에서 SF-I의 이완활성에 cAMP의 관여여부를 조사하기 위하여 forskolin (adenylate cyclase activator)과 MDL-12,330 (adenylate cyclase inhibitor)을 사용하였다. Forskolin에 의해 SF-I은 10^{-10} M ~ 10^{-8} M인 저농도에서

이완활성이 증가되었고 (Fig. 38), MDL-12,330에 의해 10^{-6} M ~ 10^{-5} M의 고농도 SF-I에서 이완활성이 억제되었다 (Fig. 39). 이러한 결과들은 SF-I이 불가사리 DRM에 대하여 이완활성을 나타냄에 있어 cAMP가 일부 관여할지 모름을 제시한다.

게다가 high- K^{+} 에 의하여 수축된 guinea-pig taenia coli에 Na^{+} 가 없는 완충액으로 교체하였을 때 이완이 되지 않고 수축된 상태로 그대로 유지되었으며, 7 mM이상의 Na^{+} 를 첨가시 이완되었다는 보고는 (Ma and Bose, 1977), Na^{+} 이 근육의 이완에 있어 영향을 미침을 의미한다. 그러므로, SF-I의 이완활성에 Na^{+} 의 관여를 알아보기 위하여 농도별로 TTX를 전처리한 후 SF-I의 이완활성 변화를 측정하였다. 그 결과 다소 활성이 억제되었으나 농도-의존적이지는 않았다 (Fig. 41). 이러한 결과들은 Na^{+} 가 SF-I의 이완활성에 영향을 미침을 제안하며, *Astropecten scoparius*라는 불가사리의 조직에서 TTX의 존재가 보고 (Lin and Hwang, 2001)된 바 있어 TTX가 불가사리 내에서 조절물질로서의 가능성을 제시한다.

또한, 불가사리의 DRM에 대해 Ca^{2+} -channel의 차단제인 Verapamil (10^{-4} M), PKC (proteinkinase C)의 저해제인 NPC-15,437 (10^{-5} M), calmodulin antagonist인 phenoxybenzamine (10^{-6} M)을 전처리한 후 ACh에 의한 수축반응이 급격히 감소하였데 (data not shown), 이는 DRM에서 ACh의 수축반응에 Ca^{2+} 이온, PKC 및 calmodulin의 관여를 제시한다. 또한, 10^{-4} M의 SF-I을 전처리하였을 때, 10^{-6} M ACh의 수축반응이 control보다 40 %가량 감소하는 것 (data not shown)으로 보아 SF-I의 활성 기작에 이들 Ca^{2+} , PKC 및 calmodulin이 관여함을 추정할 수 있다.

이전의 연구에 의하면 불가사리 *Asterias rubens* DRM은 cGMP-dependent와 cGMP-independent 경로를 통하여 NO를 매개로 이완활성을 나타낸다고 보고되었다 (Boeckxstaens and Pelckmans, 1997). 그러므로 본 연구에서도 SF-I의 이완활성에 NO-cGMP의 관여여부를 알아보고자 NO synthase inhibitor인 L-NAME를 사용하였다. L-NAME를 농도별로 전처리한 결과, SF-I의 이완활성이 control과 큰 차이가 없었고 (Fig. 36), 이는 SF-I의 이완활성에 NO-cGMP가 매개되지 않음을 의미한다. Melarange와 Elphick (2003)에 의하면 불가사리 *Asterias rubens* DRM에서 cyclic nucleotide phosphodiesterase 저해제인 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)을 투여시 cGMP와 cAMP가 2 ~ 3배 증가하였다. 그러나, IBMX와 S1과 S2를 동시에 처

리하였을 때는 이완활성의 증가를 보이지 않아 S1과 S2의 이완활성에 cGMP가 관여하지 않는다는 연구결과와 일치하였다.

또한, DRM에서 외원성 신경계의 영향을 조사하기 위하여 hexamethonium을 농도별로 전처리한 결과, SF-I의 이완활성이 hexamethonium을 처리하지 않은 control보다 낮아졌다 (Fig. 42). 이러한 결과로부터 SF-I이 이완활성을 나타냄에 있어 신경계를 경유할지도 모른다는 것을 알 수 있었고, 이것은 S1과 S2가 신경계에 고농도로 존재하고 있음이 밝혀진 결과 (Elphick *et al.*, 1995)와 연관하여 보면 SF-I이 신경계에 존재하면서 신경을 매개로 이완활성을 나타낼지 모른다는 것을 제시한다.

Fig. 48은 본 연구에서 약물활성을 측정한 결과를 토대로 불가사리 DRM에서의 가상적인 이완 메커니즘을 나타낸 것이다. SF-I이 수용체에 결합한 후, 세포내의 cAMP의 증가에 의해 근육이 이완되고, Na^+ 이온의 농도변화에 의해 이완이 조절될 뿐만 아니라, Ca^{2+} 와 PKC에 의해 수축이 억제되는 것으로 생각된다. NO는 G-protein과 매개하여 세포내 cGMP의 양을 증가시켜 이완활성을 나타낸다고 알려져 있으나, 본 연구에서 L-NAME과 mastoparan을 전처리한 결과 SF-I은 NO-cGMP경로를 경유하지 않는 것으로 생각된다. 그 외의 연구 결과들은 포유류의 평활근 근육 수축에 있어 주된 작용을 하는 calmodulin 또한 불가사리 DRM에서 근육 수축 및 이완에 관여하고 이러한 이완 작용은 신경계를 경유하여 나타날지 모른다는 것을 나타낸다. 그러나, 본 연구에서 사용한 약물들은 주로 포유류 조직에 대한 메커니즘 연구에 사용되는 것으로 이러한 약물들이 불가사리에서도 포유류 조직에서와 같은 기능을 가질지는 의문이다. 따라서, 불가사리 DRM에서 이완활성을 나타내는 SF-I의 자세한 메커니즘은 여전히 명확하지 않으며, 정확한 메커니즘 규명을 하기 위해서는 신호전달체계에 관여하는 다른 여러 약물들에 대한 연구가 필요하다.

일반적으로 신경성 펩타이드는 생체내의 여러 조직 및 세포에서 다양한 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 본 연구에서 정제된 SF-I은 불가사리의 DRM, CS 및 TF에서 이완활성을 나타냈을 뿐만 아니라, rat aorta에 대해 이완활성을 나타냈다. 이러한 것은 SF-I이 다양한 활성을 가질 가능성을 제시하는 것으로, 신경성 펩타이드들이 나타내는 기능을 측정할 수 있는 다양한 생리활성 측정법에 적용시켜 SF-I의 기능을 측정

해 볼 필요가 있다고 생각된다. 그 결과로서 다른 유용한 생리활성 및 기능을 나타낸다면, 이는 바다의 해적생물로 여겨져 폐기처분되는 불가사리로부터 고부가가치 물질을 개발하는 것과 동시에 신약개발에 있어 선도물질로서 기여하는 연구가 될 것이라 생각된다.

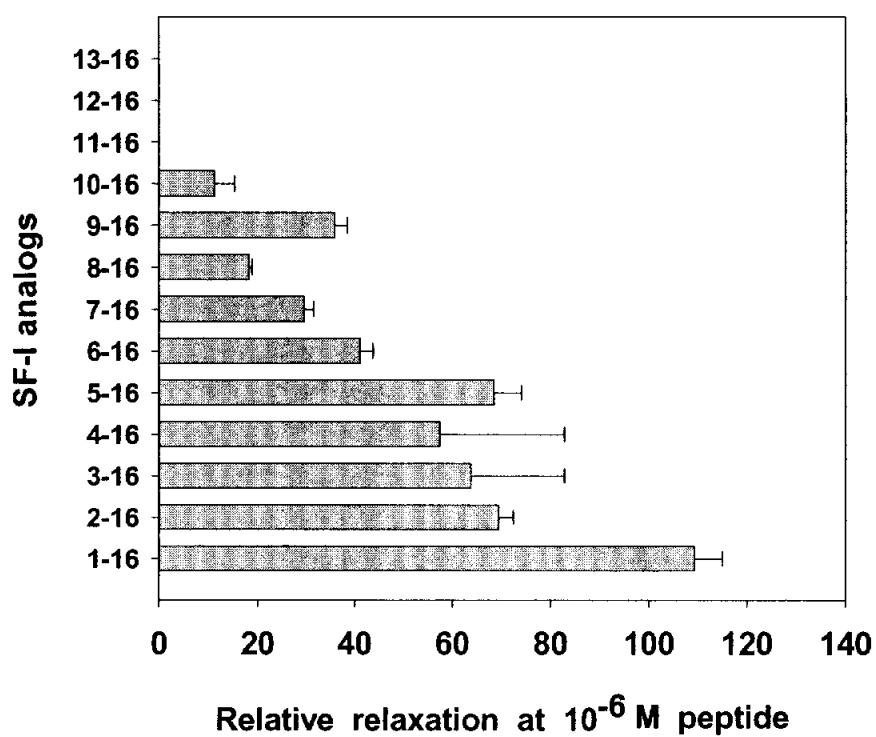


Fig. 43. The relaxant effects of SF-I and N-terminal analogs (10^{-6} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

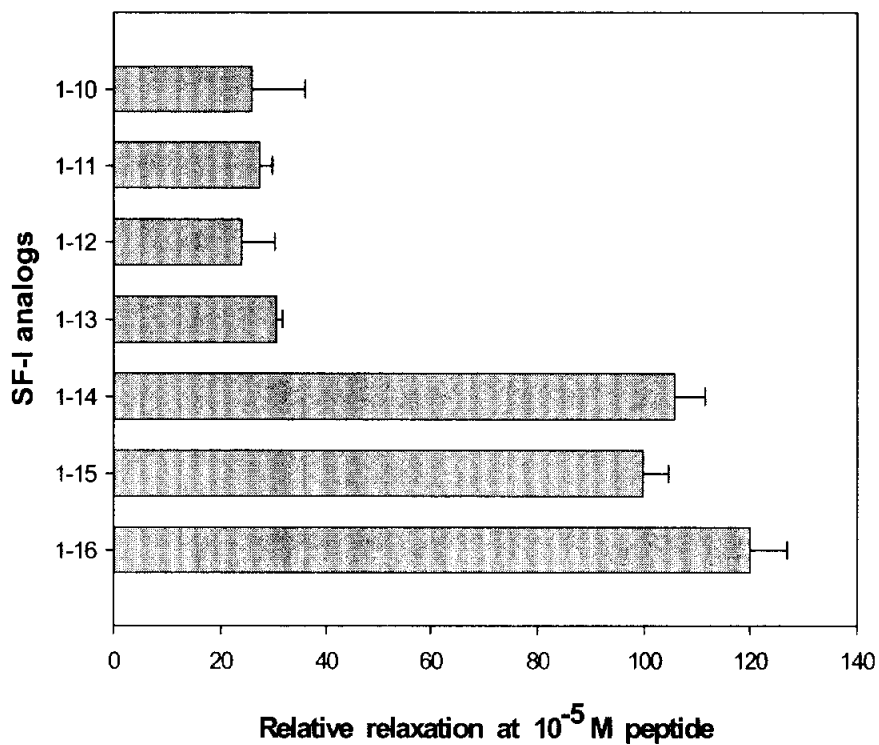


Fig. 44. The relaxant effects of SF-I and C-terminal analogs (10⁻⁵ M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1 × 10⁻⁶ M.

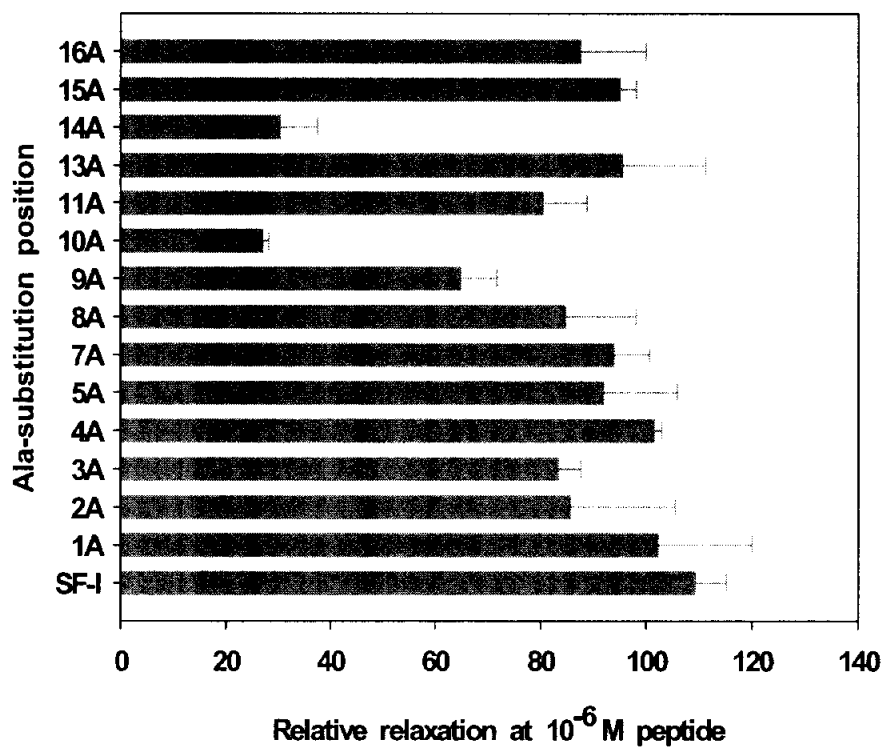


Fig. 45. The relaxant effects of SF-I and its analogs (10^{-6} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

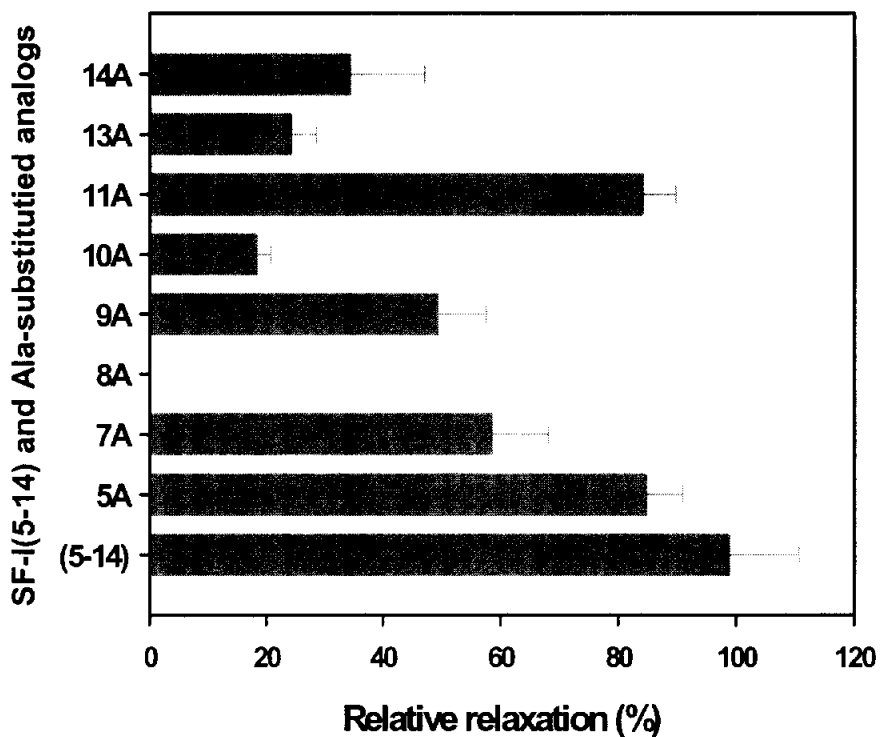


Fig. 46. The maximal relaxant effects of SF-I(5-14) and its analogs (10^{-4} M) in the starfish DRM. The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

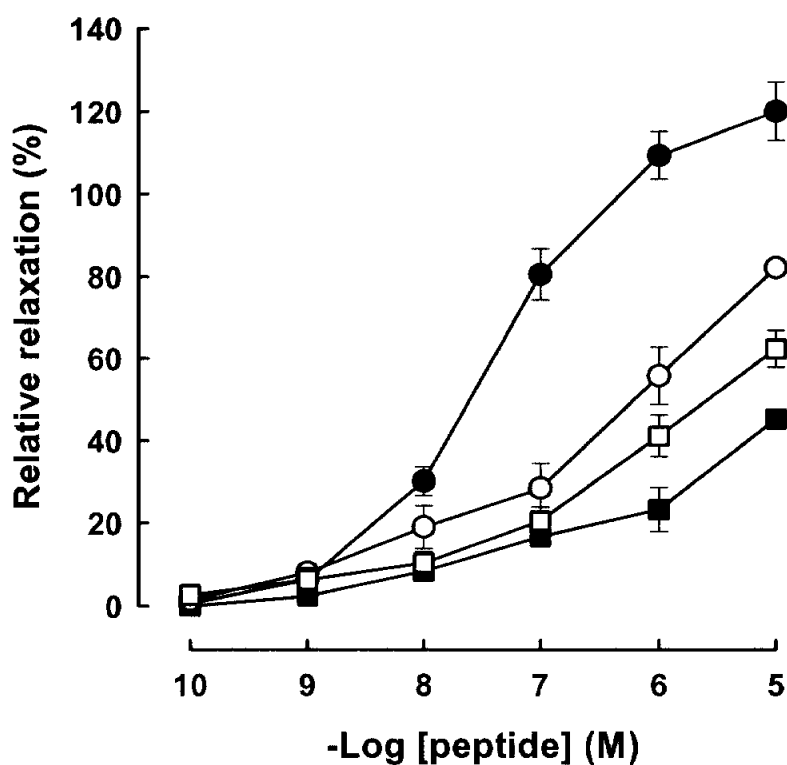


Fig. 47. Graphs comparing the mean relaxation response ($\pm$ s. e.) of SF-I and S1 on the *Asterina pectinifera* DRM (SF-I, ● and S1, ■) and *Asterias amurensis* (SF-I, ○ and S1, □). The relaxant effects expressed as % the maximal response to ACh, 1×10^{-6} M.

Table. 13 The effects of drugs on the SF-I relaxing activity

Drug	Conc.(M)	ED ₅₀ (M)	E _{max} (%)
Control		4.0×10^{-8}	120±7
Forskolin	10^{-5}	9.0×10^{-9}	103±1
MDL-12,330	10^{-5}	4.3×10^{-8}	107±4
TTX	10^{-7}	5.0×10^{-8}	104±6
	10^{-6}	1.0×10^{-5}	125±8
	10^{-5}	1.5×10^{-6}	117±17
Atropine	10^{-5}	2.9×10^{-8}	110±8
Mastoparan	10^{-6}	3.1×10^{-8}	117±14
	10^{-5}	2.0×10^{-8}	100
L-NAME	10^{-5}	2.0×10^{-8}	108±5
	10^{-4}	2.3×10^{-8}	100±4
Hexamethonium	10^{-5}	6.2×10^{-8}	100
	10^{-4}	6.0×10^{-7}	100
	10^{-3}	1.8×10^{-8}	98±5

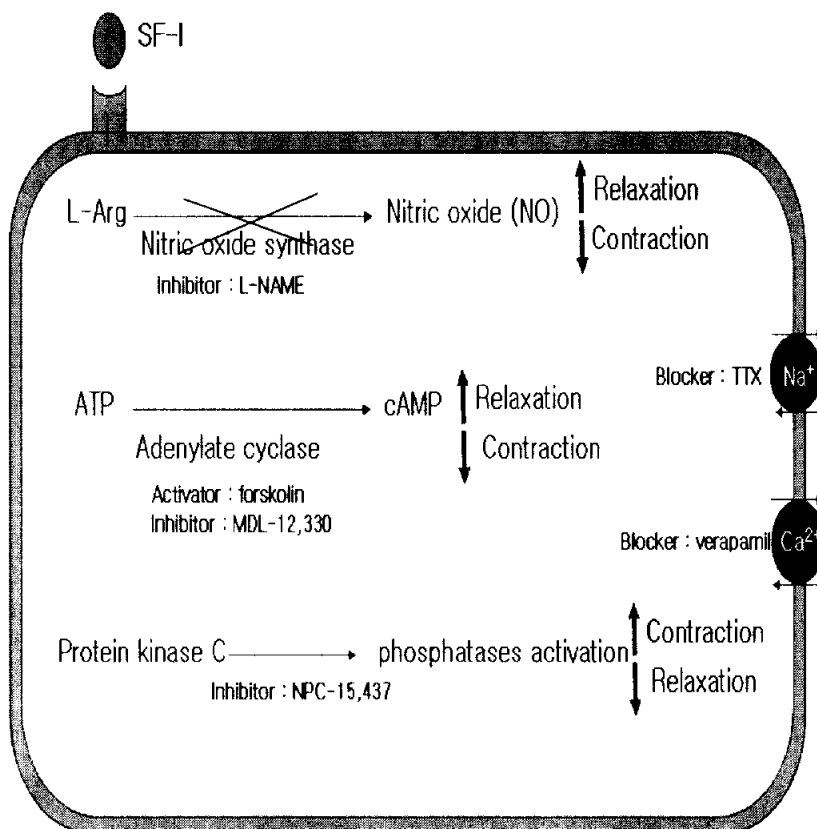


Fig. 48. The proposal mechanisms of SF-I on starfish DRM

V. 요약

불가사리 (*Asterina pectinifera*)로부터 SF-I, SF-II 및 SF-III로 명명한 3개의 새로운 이완활성 펩타이드를 정제하였으며, 그 특성을 조사하였다. 이들 펩타이드들은 6~8단계의 gel-filtration, ion-exchange 및 C_{18} reverse-phase HPLC를 이용하여 순수하게 정제하였다. 정제한 SF-I의 완전한 일차구조 및 SF-II 및 SF-III의 부분적인 일차구조는 automated amino acid sequencer 및 MALDI-TOF mass에 의하여 다음과 같이 결정되었다 : SF-I, F-G-K-G-G-A-Y-D-P-L-S-A-G-F-T-D; SF-II, G-A-I-X-K-D-P-Y-M-D-I-M-S-L-R-E-S-N-Y-X; SF-III, S-G-T-G-X-T-Q-F-S-G-R-A-Q-L-K-V-G-Q-D-A-L-S-X-V-L-A-D-S-N-X. 이들 펩타이드와 기존에 알려진 펩타이드와의 동일성을 조사한 결과 새로운 이완성 펩타이드로 확인되었다.

정제한 3개의 펩타이드 중 완전한 구조가 결정된 SF-I을 고상법을 이용하여 합성하였고, 천연물과의 동일성을 비교하기 위하여 천연물과 합성 SF-I의 분자량 측정 및 HPLC 상의 머무름시간을 비교하였다. 그 결과 SF-I의 C-말단이 free한 OH 형태임을 알 수 있었다. 불가사리 DRM에서 SF-I의 이완활성은 농도-의존적으로 증가 되었으며, 이러한 결과는 SF-I이 수용체를 경유하여 이완활성을 보임을 제시한다. 10^{-10} M 에서 0.6 %의 역치반응을 나타내었고, 10^{-5} M에서 120.0 ± 7.0 %의 최대 이완반응을 보였다. 또한, SF-I의 2차구조를 예측하기 위하여 CD 스펙트럼의 측정 및 Chou-Fasman 예측법을 사용한 결과 SF-I은 unordered한 형태를 나타내었다.

한편, 구조와 활성간의 상관관계를 알아보기 위하여 SF-I의 N-말단과 C-말단의 아미노산을 하나씩 순차적으로 제거한 유도체를 합성하였다. 불가사리 DRM에서 N-말단 및 C-말단 유도체의 이완활성을 비교한 결과 N-말단의 Phe¹과 C-말단의 Asp¹⁶가 이완활성을 나타냄에 있어 중요한 역할을 하였다. 또한, SF-I과 모든 유도체의 불가사리 DRM에서의 활성을 비교한 결과, SF-I(5-14)가 DRM에 대한 100 %의 이완활성을 나타냄에 있어 최소 필요잔기임을 알 수 있었으나, SF-I보다 100배이상 효력이 낮았다. 또한, SF-I과 SF-I(5-14)의 잔기를 Ala로 치환한 유도체를 합성하여 이완활성을 나타냄에

있어 중요한 잔기를 조사하고자 하였다. 그 결과 Asp⁸, Pro⁹, Leu¹⁰, Gly¹³ 및 Phe¹⁴ 잔기가 이완활성을 나타냄에 있어 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

불가사리 *Asterina pectinifera*의 DRM, cardiac stomach 및 tube foot에서 SF-I의 활성을 조사하기 위하여 비교물질로서 기존에 알려진 불가사리 *Asterias rubens* 유래의 이완성 펩타이드인 S1과 S2, 이들의 모체인 FMRFa와 FLRFa를 이용하였다. 이들의 활성은 불가사리 *Asterina pectinifera*의 DRM, cardiac stomach (CS) 및 tube foot (TF)에서 조사되었다. 먼저, DRM에서 활성의 크기는 SF-I (120.0 ± 7.0 %) $\gg$ S1 (45.2 ± 2.4 %) > S2 (15 %) > FMLFa > FMRFa의 순으로 나타났다. CS에서는 SF-I > S1순으로 활성을 나타내었으며, S2는 이완활성을 보이지 않았다. 또한, TF에서의 활성은 10^{-4} M의 동일농도 하에서 비교하였다. 그 결과 SF-I의 이완활성이 S2보다 2배 높게 나타났고, S1은 수축활성을 보였다. 이러한 결과들은 SF-I이 불가사리 근육에 있어 폭넓은 이완제로서 기능을 함을 제시하고, 각 근육계에 따라 기여도가 다르다는 것을 의미한다. 뿐만아니라, 아무르불가사리 (*Asterias amurensis*)의 DRM에서 SF-I > S1순으로 이완활성을 나타내었으며, 다른종인 *Asterina pectinifera* DRM과 *Asterias amurensis* DRM에서의 활성 비교시 SF-I의 이완활성이 *Asterina pectinifera* 에서보다 낮게 나타났다. 이러한 결과는 SF-I이 이완활성을 나타냄에 있어 종-특이적일지 모름을 제시한다.

또한, DRM에 대한 SF-I의 이완활성 메커니즘을 규명하기 위하여 여러 가지 signal transductional drugs을 사용하였다. 그 결과 MDL-12,330 (adenylate cyclase inhibitor), forskolin (adenylate cyclase activator), TTX (Na⁺-channel blocker), hexamethonium (ganglionic antaagonist)가 SF-I의 이완활성에 영향을 주었고, NPC-15,437 (Proteinkinase C inhibitor), verapamil (Ca²⁺-channel inhibitor), phenoxybenzamine (Calmodulin antagonist)과 SF-I은 ACh의 수축반응을 감소 혹은 소멸시켰다. 이러한 결과는 SF-I이 cAMP, Na⁺-channel, Ca²⁺-channel, Protein kinase C, calmodulin과 neuron을 통하여 SF-I의 이완활성이 조절될지도 모른다는 것을 제시한다.

VI. 참 고 문 헌

- Adelstein, R. S., Sellers, J. R., Conti, M. A., Pato, M. D., and Lanerolle, P. D.: Regulation of smooth muscle contractile proteins by calmodulin and cyclic AMP. (1982) *Fed. Proc.*, **41**, 2873-2878.
- Amiche, M., Delfour, A., and Nicolas, P.: Opioid peptides from frog skin. (1998) *EXS.*, **85**, 57-71.
- Bacq, Z. M.: Recherches su la physiologie et la pharmacologie du systeme nerveux autonome. XVII. Les esters de la choline dans les extraits de tissue des invertebres. (1935) *Arch. Int. Physiol.*, **42**, 24-42.
- Balse-Srinivasan, P., Grieco, P., Trivedi, D., and Hruby, V.: Structure-activity relationships of novel cyclic α -MSH/ β -MSH hybrid analogues that lead to potent and selective ligands for the human MC3R and human MC5R. (2003) *J. Med. Chem.*, **46**, 3728-3733.
- Beauvallet M.: Action de l'acetylcholine sur le tube digestif de quelques invertebres. (1938) *Compt. Rend.*, **127**, 213-214.
- Boeckstaens, G. E., and Pelckmans, P. A.: Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. (1997) *Comp. Biochem. Physiol.*, **118A**, 925-937.
- Bohlen, P., Esch, F., Brazeau, P., Ling, N., and Guillemin, R.: Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 726-734.
- Campbell, R. M., and Scanes, C. G.: Evolution of the growth hormone releasing factor (GRE) family of peptides. (1992) *Growth Regul.*, **2**, 175-191.
- Carlquist, M., Mutt, V., and Jornvall, H.: Isolation and characterization of bovine vasoactive intestinal peptide (VIP). (1979) *FEBS Lett.*, **108**, 457-460.
- Chang, M. M., Leeman, S. E., and Niall, H. D.: Amino acid sequence of substance P. (1971) *Nature New Biol.*, **232**, 86-87.
- Coast, G. M., Zabrocki, J., and Nachman, R. J.: Diuretic and myotropic activities of N-terminal truncated analogs of *Musca domestica* kinin

- neuropeptide. (2002) *Peptides*, **23**, 701–708.
- Cole, R. A., and Twarog, B. M.: Relaxation of catch in molluscan smooth muscle–I. Effects of drugs which act on the adenyl cyclase system. (1972) *Comp. Biochem. Physiol.*, **43A**, 321–330.
- Conlon, J. M., Katsoulis, S., Schmidt, W. E., and Thim, L.: [Arg³] substance P and neurokinin A from chicken small intestine. (1988) *Reg. Pept.*, **20**, 171–180.
- Diaz–Miranda, L., Blanco, R. E., and Garcia–Arraras, J. E.: Localization of the heptapeptide GFSKLYFAKLYFamide (Echinodermate) : a light and electron microscopic study. (1995a) *J. Comp. Neurol.*, **352**, 626–640.
- Diaz–Miranda, L., and Garcia–Arraras, J. E.: Pharmacological action of the heptapeptide GFSKLYFamide in the muscle of the sea cucumber *Holothuria glaberrima* (Echinodermata). (1995b) *Comp. Biochem. Physiol.*, **110C**, 171–176.
- Diaz–Miranda, L., Price, D. A., Greenberg, M. J., Lee, T. D., Doble, K. E. and Garcia–Arraras, J. E.: Characterization of two novel neuropeptides from the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. (1992) *Biol. Bull.*, **182**, 241–247.
- Dimaline, R., Young, J., Thwaites, D. T., Lee, C. M., Thorndyke, M.: Amino acid sequence of a biologically active vasoactive intestinal peptide from the elasmobranch *Scylliorhinus canicula*. (1988) *Amm. N. Y. Acad. Sci.*, **527**, 621–623.
- Drucker, D. J., Ehrlich, P., Asa, S. L., Brubaker, P. L.: Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon–like peptide 2. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **23**, 7911–7916.
- Edlson, A. S., Espinoza, E., and Zachariah, C.: Conformational ensembles : the role of neuropeptide structures in receptor binding. (1999) *J. Neuro Sci.*, **19**, 6318–6326.
- Elliott, G. R., and Barchas, J. D.: Neuroregulators : neurotransmitters and neuromodulators. (1979) *Behavioral and Brain Sci.*, **2**, 423–424.
- Elphick, M. R., and Melarange, R.: Neural control of muscle relaxation in

- echinoderms. (2001) *J. Exp. Biol.*, **204**, 875–885.
- Elphick, M. R., Newman, S. J., and Thorndyke, M. C.: Distribution and action of SARMFamide neuropeptides in the starfish *Asterias rubens*. (1995) *J. Exp. Biol.*, **198**, 2519–2525.
- Elphick, M. R., Price, D. A., Lee, T. D., and Thorndyke, M. C.: The SALMFamides : a new family of neuropeptides in the starfish *Asterias rubens*. (1991a) *J. Exp. Biol.*, **198**, 2519–2525.
- Elphick, M. R., Price, D. A., Lee, T. D., and Thorndyke, M. C.: The SALMFamide : a new family of neuropeptides isolated from an echinoderm. (1991b) *Proc. R. Soc. Lond B*, **243**, 121–127.
- Elphick, M. R., Reeve, J. R., Burke, R. D., and Thorndyke, M. C.: Isolation of the neuropeptide SALMFamide-1 from starfish using a new antiserum. (1991c) *Peptides*, **12**, 455–459.
- Esch, R., Bohlen, P., Ling, N., Brazeau, P., and Guillemin, R.: Isolation and characterization of the bovine hypothalamic growth hormone releasing factor. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 4302–4306.
- Fahrenkrug, J., Ottesen, B., and Palleg, C.: Non-amidated forms of VIP (glycine-extended VIP and VIP-free acid) have full bioactivity on smooth muscle. (1989) *Reg. Pept.*, **26**, 235–239.
- Fujisawa, Y., Kubota, I., Nomoto, K., Minakata, H., Yasuda-Kamatani, Y., Ikeda, T., and Muneoka, Y.: A mytilus peptide related to the small cardioactive peptides (SCPs) : structure determination and pharmacological characterization. (1993) *Comp. Biochem. Physiol. C*, **104**, 469–475.
- Fujisawa, Y., Kubota, I., Ikeda, T., Minakata, H., and Muneoka, Y.: A variety of *Mytilus* inhibitory peptides in the ABRM of *Mytilus edulis* : isolation and characterization. (1991) *Comp. Biochem. Physiol. C*, **100**, 525–531.
- Garcia-Arraras, J. E., Torres-Avillan, I., and Ortiz-Miranda, S.: Cells in the intestinal system of holothurians (Echinodermata) express cholecystokinin-like immunoreactivity. (1991) *Gene Comp. Endocr.*, **83**, 233–242.

- Graf, L., Cseh, G., Barat, E., Ronai, A. Z., Szekely, J. I., Kenessey, A., and Bajusz, S.: Structure-function relationships in lipotropins. (1977) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **297**, 63-83.
- Hirata, T., Kubota, I., Takabatake, I., Kawahara, A., Shimamoto, N., and Muneoka, Y.: Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. (1987) *Brain Res.*, **422**, 374-376.
- Hoyle, C. H. V.: Neuropeptide families : evolutionary perspectives. (1998) *Reg. Pept.*, **73**, 1-33.
- Iwakoshi, E., Ohtani, M., Takahashi, T., Muneoka, Y., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto, K.: Comparative aspects of structure and action of bioactive peptides isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. (1995) *In peptide Chemistry 1994* (ed. M. Ohno). pp.261-264, Osaka: Protein Research Foundation.
- Jensen, J., and Conlon, J. M.: Substance P related neurokinin A related peptides from the brain of the cod and trout. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **206**, 659-664.
- Kamatani, Y., Minakata, H., Kenny, P. T. M., Iwashita, T., Watanabe, K., Funase, K., Sun, X. P., Yongsiri, A., Kim, K. H., Novales-Li, P., Novales, E. T., Kanapi, C. G., Takeuchi, H., and Nomoto, K.: Achatin-I, an endogenous neuroexcitatory tetrapeptide from achatina *Fulica Ferussac* containing a D-amino acid residue. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 1015-1020.
- Kim, C.-H.: Purification of novel peptides, burgerkinins with myocontractile activity from the hagfish, *Eptatretus burgeri*. (2004) Ph. D. Dissertation.
- Kishimura, H., Yasuhara, T., Yoshida, H., Nakajima, T.: Vespakinin-M, a novel bradykinin analogue containing hydroxyproline, in the venom of *Vespa mandarinia* Smit (1976) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **24**, 2896-2897.
- Kobayashi, M., and Muneoka, Y.: Structure and action of molluscan neuropeptide. (1990) *Zool. Sci.*, **7**, 801-814.
- Krieger, D. T.: Brain peptide : What, Where, and Why? (1983) *Science*, **222**,

975–985.

- Lin, S.-J., and Hwang, D.-F.: Possible source of tetrodotoxin in the starfish *Astropecten scoparius*. (2001) *Toxicon*, **39**, 573–579.
- Liu, L., Murray, M., and Burcher, E.: Structure–activity studies of bufokinin, substacod P and their C-terminal fragments at bufokinin receptors in the small intestine of the cane toad, *Bufo marinus*. (2002) *Biochem. Pharm.*, **63**, 217–224.
- Liu, L., Shang, F., Perry, M. A., Comis, A., and Burcher, E.: Bufokinin : immunoreactivity, receptor localization and actions in intestine and mesenteric circulation of the toad. (2000) *Peptides*, **21**, 1345–1354.
- Ma, T. S., and Bose, D.: Sodium in smooth muscle relaxation. (1977) *Am. J. Physiol.*, **232**, C59–66.
- Matsushima, O., Takahama, H., Ono, Y., Nagahama, T., Morishita, F., Furukawa, Y., Iwakoshi-Ukena, E., Hisada, M., Takuwa-Kuroda, K., and Minakata, H. : A novel GGNG-related neuropeptide from the polychaete *Perinereis vancaurica*. (2002) *Peptides*, **23**, 1379–1390.
- McRory, J., and Sherwood, N. M.: Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. (1997) *Endocrinol.*, **138**, 2380–2390.
- Melarange, R., and Elphick, M. R.: Comparative analysis of nitric oxide and SALMFamide neuropeptides as general muscle relaxants in starfish. (2003) *J. Exp. Biol.*, **206**, 893–899.
- Minakata, H., Fujita, T., Kawano, T., Nagahama, T., Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Muneoka, Y., and Nomoto, K.: The leech excitatory peptide, a member of the GGNG peptide family : isolation and comparison with the earthworm GGNG peptides. (1997) *FEBS Lett.*, **410**, 437–442.
- Minakata, H., Ikeda, T., Muneoka, Y., Kobayashi, M., and Nomoto, K.: Wwamide-1, -2 and -3 : novel neuromodulatory peptides isolated from ganglia of the African giant snail, *Achatina fulica*. (1993) *FEBS Lett.*, **323**, 104–108.

- Moore, S. J., and Thorndyke, M. C.: Immunocytochemical mapping of the novel echinoderm neuropeptide SALMFamide 1 (S1) in the starfish, *Asterias rubens*. (1993) *Cell Tissue Res.*, **274**, 602–618.
- Motokawa, T.: Connective tissue catch in echinoderms. (1984) *Biol. Rev.*, **59**, 255–270.
- Muneoka, J., and Matsuura, M.: Effects of the molluscan neuropeptide FMRFamide and the related opioid peptide YGGFMRFamide on *Mytilus* muscle. (1985) *Comp. Biochem. Physiol. C*, **18**, 61–70.
- Negri, L., Melchiorri, P., and Lattanzi, R.: Pharmacology of amphibian opiate peptides. (2000) *Peptides*, **21**, 1639–1647.
- Newman, S. J., Elphick, M. R., and Thorndyke, M. C.: Tissue distribution of the SALMFamide neuropeptides S1 and S2 in the starfish *Asterias rubens* using novel monoclonal and polyclonal antibodies. I. Nervous and locomotory system. (1995a) *Proc. R. Soc. Lond. B*, **261**, 139–145.
- Newman, S. J., Elphick, M. R., and Thorndyke, M. C.: Tissue distribution of the SALMFamide neuropeptides S1 and S2 in the starfish *Asterias rubens* using novel monoclonal and polyclonal antibodies. II. Digestive system. (1995b) *Proc. R. Soc. Lond. B*, **216**, 187–192.
- O'Neill, P.: Structure and mechanics of starfish body wall. (1989) *J. Exp. Biol.*, **147**, 53–89.
- Ohtani, M., Iwakoshi, E., Muneoka, Y., Minakata, H., and Nomoto, K.: Isolation and characterization of bioactive peptides from the sea cucumber, *Stichopus japonicus*. (1999) *In peptide science—Present and Future* (ed. Y. Shimonishi), pp 419–420, UK: Kluwer Academic publishers.
- Onoue, S., Ohmori, Y., Matsumoto, A., Yamada, S., Kimura, R., Yajima, T., and Kashimoto, K.: Structure–activity relationship of synthetic truncated analogues of vasoactive intestinal peptide (VIP) : an enhancement in the activity by a substitution with arginine. (2004a) *Life Sci.*, **74**, 1465–1477.
- Onoue, S., Matsumoto, A., Nagano, Y., Ohshima, K., Ohmori, Y., Yamada, S., Kimura, R., Yajima, T., and Kashimoto, K.: α -helical structure in the

- C-terminus of vasoactive intestinal peptide : functional and structural consequences. (2004b) *Eur. J. Pharm.*, **485**, 307–316.
- Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto, K.: The GGNG peptides: novel myoactive peptides isolated from the gut and the whole body of the earthworms. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 1072–1078.
- Park, N. G., Seo, J.-K., Ku, H.-J., Lee, S., Sugihara, G., Kim, K.-H., Park, J.-S., and Kang, S.-W.: Conformation and biological activity of mastoparan B and its analogs I. (1997) *Bull. Korean Chem. Soc.*, **18**, 50–56.
- Richter, G., Feddersen, O., Wagner, U., Barth, P., and Goke, B.: GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. (1993) *Am. J. Physiol.*, **265**, L374–381.
- Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M. O., Vale, W.: Characterization of growth hormone releasing factor from a human pancreatic islet tumour. (1982) *Nature*, **300**, 276–278.
- Ro, S., Zhu, Q., Lew, C.-W., Goodman, M., Darkak, K., Spatola, A. F., Chung, N. N., Schiller, P. W., Malmberg, A. B., Yaksh, T. L., and Burks, T. F.: Highly potent side chain-main chain cyclized dermorphin-deltorphan analogues: An integrated approach including synthesis, bioassays, NMR spectroscopy and molecular modelling. (1995) *J. Pep. Sci.*, **1**, 157–174.
- Thwaites, D. T., Young, J., Thorndyke, M. C., and Dimaline, R.: The isolation and chemical characterization of a novel vasoactive peptide related peptide from a teleost fish, the cod *Gadus morhua*. (1989) *Biochem. Biophys. Acta.*, **999**, 217–220.
- Torfs, H., Akerman, K. E., NACHman, R. J., Oonk, H. B., Detheux, Poels, J., Loy, T. V., Loof, A. D., Meloen, R. H., Vassart, G., Parmentier, M., and Broeck, J. V.: Functional analysis of synthetic insect tachykinin analogs on recombinant neurokinin receptor expressing cell lines. (2002) *Peptides*, **23**, 1999–2005.

- Twarog, B. M.: The regulation of catch in molluscan muscle. (1967) *J. Gen. Physiol.*, **50**, 157-169.
- Valentin, J. P., Wiedemann, E., and Humphreys, M. H.: Natriuretic properties of melanocyte-stimulating hormone. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **22**, S114-118.
- Warner, F. J., Mack, P., Comis, A., Miller, R. C., and Burcher, E.: Structure-activity relationships of neurokinin A(4-10) at the human tachykinin NK₂ receptor : the role of natural residues and their chirality. (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 55-60.
- Waugh, D., Bondareva, V., Rusakov, Y., Bjønning, C., Nielsen, P. E., and Conlon, J. M.: Tachykinins with unusual structural features from a urodele, the amphiuma, an elasmobranch, the hammerhead shark, and an agnathan, the river lamprey. (1995) *Peptides*, **16**, 615-621.
- Zadina, J. E., Banks, W. A., and Kastin, A. J.: 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. (1986) *Peptides*, **7**, 497-537.

감사의 글

오랜 시간동안 끊임없는 관심과 사랑으로 학문의 길을 열어주시고 올바른 학문 탐구의 자세와 가치관을 갖도록 이끌어주신 지도 교수님이신 박 남규 교수님께 진심으로 머리 숙여 감사드립니다. 연구자의 길에 있어서 그 가르치심 깊이 새기도록 하겠습니다.

또한, 부족한 논문을 교람해 주시고 세심한 부분까지 논문의 교정 심사에 많은 노력을 아끼지 않으신 본 대학교 식품생명과학과의 변 대석 교수님과 김 형락 교수님, 수산생명의학과의 정 준기 교수님과 국립수산물과학원에 윤 호동 박사님께 감사를 드립니다. 아울러 학부 때부터 많은 관심과 조언을 아끼지 않으셨던 생물공학과 공 재열 교수님, 홍 용기 교수님, 공 인수 교수님, 이 형호 교수님, 김 중균 교수님 그리고 김 성구 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

학위과정 동안 어렵고 힘든 시간을 함께 동고동락을 같이 했던 선배님들, 후배님들에게 감사를 드립니다. 실험실 생활 처음부터 항상 믿음으로 저를 대해 주었던 서 정길 박사님, 한결같이 옆에 있어줬던 고 혜진 후배님, 배움의 열정이 넘치는 김 인혜 후배님, 항상 나를 웃을 수 있게 해 주었던 안 상현 후배님, 이제 막 실험실생활에 첫발을 내딛은 귀염둥이 막내 김 혜미 후배님께 정말 감사드립니다. 그리고, 처음 실험실에 들어와 아무것도 모르는 저에게 친언니처럼 조언을 아끼지 않으셨던 구 희정 선배님과 김 은희 선배님 그리고 항상 무엇이든 열심히 하시는 차 환옥 선생님께도 진심으로 감사드립니다. 멀리 미국에 홀로 있을 김 무상 박사님과 일본에서 열심히 논문 쓰고 있는 황 지연 선배님께도 감사의 말씀을 전합니다. 지금은 졸업하고 사회생활에 열심히 신 미정 후배님, 문 호성 후배님, 임 미숙 후배님, 하 민정 후배님, 배 윤정 후배님께 감사드리며 즐거웠던 그동안의 일들을 다시 떠올려 봅니다.

잠시나마 실험실 생활을 함께 하며 많은 배려와 관심을 보여 주셨던 서 해점 박사님과 황 은영 박사님께도 감사의 말을 전합니다. 또한, 박사 논문 제출을 위해 같이 고생한 서 정수 동기님, 항상 웃으면서 대해주었던 이 상환 후배님을 비롯한 약리학 실험실원들에게 감사드립니다. 가별 때나 과로울 때나 항상 옆에서 위로와 격려를 아끼지 않으셨던 진 형주 박사님, 정 재환 선배님을 비롯한 생화학 실험실원에게도 감사의 뜻을 전합니다.

대학생활을 같이 하며 많은 이야기를 나누었던 93학번 동기 양 현숙 동기님과 박 현진 동기님, 친구 정희, 인숙, 원지, 수경, 현정에게도 깊은 감사의 뜻을 전합니다.

한결같은 사랑으로 나의 부족한 부분을 채워주며 힘이 되어준 선배이자 남편인 김 찬희님에게 진심으로 고개 숙여 감사의 말을 전하며, 그동안 소홀했던 아내의 자리에서 지금까지 못 해준 많은 것들을 해주고 싶습니다.

그리고, 멀리 서울에서 고생하고 있는 김 관희 도련님, 항상 언니인 나를 걱정하고 챙겨줬던 동생 성률과 제부 윤 성부님, 대구에서 열심히 공부하고 있는 동생 민호에게도 감사의 말을 전합니다.

끝으로 지금까지 따뜻한 진지 한 번 올리지도 못했지만, 예쁜 딸, 예쁜 며느리라고 한 없는 사랑 베풀어 주시고 헌신적으로 뒷바라지 해 주신 저의 사랑하는 어머니, 아버지, 시어머니와 시아버님께 머리 숙여 깊이 감사를 드리며 이 논문을 바칩니다.