# 공 학 석 사 학 위 논 문

오징어 (*Todarodes pacificus*)와 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)로부터 신경성 펩타이드의 정제 및 cDNA 연구

2006년 2월

부경대학교대학원

생 물 공 학 과

안 상 현

# 공 학 석 사 학 위 논 문

# 오징어 (*Todarodes pacificus*)와 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)로부터 신경성 펩타이드의 정제 및 cDNA 연구

# 지도교수 박남규

# 이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

## 2006년 2월

부경대학교대학원

# 생 물 공 학 과

## 안 상 현

# 안상현의 공학석사 학위논문을 인준함

2006년 2월

주	심	이학박사	0	형	호 (인)
위	원	이학박사	김	인	수 (인)
위	원	이학박사	박	남	규 (인)

Part I. 오징어 (*Todarodes pacificus*) 내장 추출물과 아가미 추출물의 생리활성 측정 목 차

표 (Table) 목록 ······	IV
그림 (Figure) 목록 ······	IV
초록 (Abstract) ······	VI

I.서 론······	1
Ⅱ. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
1.1. 실험동물	5
1.2. 시약 및 재료	5
2. 실험방법	5
2.1. 추출	5
2.1.1. 오징어 내장으로부터 시료의 추출	5
2.1.1.1. 오징어 내장 (7 마리)로부터 시료의 추출	6
2.1.1.2. 오징어 내장 (150 마리)로부터 시료의 추출	6
2.1.2. 오징어 아가미로부터 시료의 추출	7
2.2. 근 수축 및 이완활성 측정	7
2.2.1. 근 수축활성 측정	7
2.2.1.1. 조직의 표본제작	7
2.2.1.1.1. 오징어	7
2.2.1.1.2. 달팽이	8
2.2.1.1.3. 가리비	8
2.2.1.1.4. 먹장어 intestine	9
2.2.1.1.5. 붕장어 장관의 longitudinal muscle	9

2.2.1.2. 수축활성의 측정	• 9
2.2.1.2.1. 오징어 gill, heart, rectum, intestine, esophagus에 대한	ŀ
수축활성 측정	• 9
2.2.1.2.2. 달팽이 crop에 대한 활성 측정	10
2.2.1.2.3. 가리비 rectum에 대한 수축활성 측정	10
2.2.1.2.4. 먹장어 장관에 대한 수축활성 측정	11
2.2.1.2.5. 붕장어 장관의 longitudinal muscle에 대한 수축활성 측경	정
	11
2.2.2. 근 이완활성 측정	11
2.2.2.1. 조직의 표본제작	11
2.2.2.1.1. 담치 ABRM	11
2.2.2.1.2. 달팽이	12
2.2.2.2. 이완활성의 측정	12
2.2.2.2.1. 담치 ABRM에 대한 이완활성 측정	12
2.2.2.2.2. 담치 ABRM에 대한 phasic contraction 측정	13
2.2.2.2.3. 달팽이 penial retractor muscle에 대한 이완활성 측정	
	13
2.3. 오징어 추출물의 HPLC profile	13
2.3.1. 오징어 내장 추출물의 HPLC profile	13
2.3.2. 오징어 아가미 추출물의 HPLC profile	14
Ⅲ. 결과 및 토론	19
1. 오징어 내장 추출물의 생리활성 측정	19
1.1. 7마리 오징어의 예비 실험 내장 추출물의 생리활성 측정	19
1.1.1. 수축활성 측정	19
1.1.2. 이완활성 측정	20

1.2. 150마리 오징어의 내장 추출물의 생리활성 측정	20
1.2.1. 수축활성 측정	21
2. 오징어 아가미 추출물의 생리활성 측정	· 21
2.1. 수축활성 측정	21
2.2. 이완활성 측정	22
3. 오징어 내장 추출물로부터 신경성 펩타이드의 분리·정제	22
4. 오징어 아가미 추출물로부터 신경성 펩타이드의 분리·정제	23
Ⅳ. 참고문헌	33

# List of Tables

Table 1.	. The classification of neuropeptides	3
Table 2.	. Amino acid sequences of neuropeptide from several molluscs	
		ł

# List of Figures

Fig. 1. Summarized procedures for the extraction of squid's visceral
tissue (7 EA)
Fig. 2. Summarized procedures for the extraction of squid's visceral
tissue (150 EA)
Fig. 3. Summarized procedures for the extraction of squid's gill
(2 EA)
Fig. 4. Squid (Todarodes pacificus) (A), scallop (Patinopecten
<i>yessoensis</i> ) (B), mussel ( <i>Mytilus edulis</i> ) (C), snail ( <i>Achatina</i>
<i>fulica</i> ) (D) and physiography system (E)
Fig. 5. Typical tracing illustrating the relaxing response of squid's
visceral tissue extracts, <i>Todarodes pacificus</i>
Fig. 6. Typical tracing illustrating the relaxing and contractile response
of squid's visceral tissue extracts, Todarodes pacificus
Fig 7 Typical tracing illustrating the relaxing and contractile response

Fig.	10.	1st	reverse-	-phase	HPLC	profile	of	visceral	tissue	extracts.	
		•••••									· 30

#### Purification of neuropeptide from the squid, Todarodes pacificus

Sang Hyun An

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

#### Abstract

To purify the neuropeptides from the visceral and gill tissue extracts of squid, *Todarodes pacificus*, we used the tissue of squid several organ, snail, scallop, mussel, hagfish, conger eel as the bioassay system.

The acetic acid extracts of the squid visceral and gill tissue were forced through the Sep-Pak  $C_{18}$  cartridge, devided by flow-through (F.T.), 0 % methanol-elute (D.W.), 60 % methanol-elute (RM60), 100 % methanol-elute (RM100). The activity was estimated by concentration of 1/50. Among of them, the RM60 had high contractile or relaxing activity on the most of tissues.

The RM60 of visceral tissue extracts had the best contractile activity on the squid esophagus. On the other hand, RM100 of visceral tissue extracts had the best contractile activity on the snail crop.

In the case of gill tissue extracts, RM60 had a reasonable relaxing activity on the mussel ABRM and contractile activity on conger eel longitudinal muscle only.

At present, purification of RM60 of the visceral and gill of squid, using reverse high performance liquid chromatography (HPLC) column is in progress.

# Ⅰ.서 론

신경성 펩타이드는 신호전달물질로서 신경계에서 신호전달 및 조절역할 을 하며, acetylcholine (ACh)과 같은 비펩타이드성 transmitter와 함께 방출 된다고 알려져 있다 (Elliott and Barchas, 1979; Krieger, 1983). 이들은 평 활근의 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 종 들간의 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 방해를 받게 되면 이완작용이 나타나게 된다 (Adelstein *et al.*, 1982). 구조적으로 가로무늬를 가지고 있지 않는 포유류 평활근은 내장의 여러 장기 및 순환기 계통의 관벽 을 구성하며, 내용물의 수송, 분해, 배출 및 보존과 유지등의 기능에 관여하 는 것으로 알려져 있다. 이러한 평활근은 포유동물에서 뿐만 아니라 진화상 하등한 연체동물에서도 횡문이 없고 filaments와 dense body를 포함하고 있 는 catch muscle fiber로서 존재함이 보고된 바 있다 (Twarog, 1967). 이러 한 이유에서 포유동물뿐만 아니라 연체동물을 이용한 신경성 펩타이드의 평 활근 조절에 관한 다양한 연구결과가 진행되고 있으며, 주로 catch relaxing 에 관여하는 peptide를 중심으로 이루어지고 있다 (Table 2). 대표적으로 진 주담치의 pedal ganglia로부터 ACh자극에 의한 anterior byssus retractor muscle (ABRM)의 catch tension에 대하여 이완활성을 가진 FMRFamide (FMRFa)의 분리가 보고되었고 (Kobayashi and Muneoka, 1990), ABRM으 로부터도 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 전 기적 자극에 의한 ABRM의 수축활성을 억제시키는 WWamide가 보고되었다 (Minakata *et al.*, 1993). Leeches (*Hirudo nipponia*)의 whole body 추출물 로부터 leech intestine에 대하여 수축활성을 나타내지만, vagina에서는 이완 활성을 보이는 leech excitatory peptide와 지렁이 (*Eisenia*)의 gut 및 whole body로부터 earthworm excitatory peptide (EEP)-1과 EEP-2가 발견되었다 (Minakata *et al.*, 1997).

오징어 (*Todarodes pacificus*)에서는 hepatopancreas로부터 trypsin inhibitor가 정제되었고 (Kishimura *et al.*, 2001), 마찬가지로 cathepsin D가 정제되어 cloning 되었다 (Komai *et al.*, 2004). 또한 오징어로부터 major allergen이 분리되었고 (Miyazawa *et al.*, 1996), mantle muscle에서 tropomyosin과 homology가 있는 28-KDa의 단백질을 정제하여 cloning한 보고가 있다 (Miura-Yokota *et al.*, 2005).

또한 오징어로부터 diisopropyl-fluorophosphatase도 정제되었다 (Wang *et al.*, 1993).

그러나 오징어로부터 신경성 펩타이드에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 오징어의 내장과 아가미를 이용하여 생리활성물질을 추출하고 생리활성을 측정하고자 하였다. 이러한 활성을 측정하기 위해 bioassay system으로서 오징어, 달팽이, 가리비, 담치, 먹장어, 붕장어의 장 관 및 근육들을 사용하여 근수축 및 이완작용을 조사하였다. 또한 현재 이들 중 활성을 나타내는 물질을 HPLC를 사용하여 분리·정제 중이다.

#### Table 1. The classification of neuropeptides

# Hypothalamic releasing peptides Ga Thyrotropin releasing hormone Vas Gonaadotropin releasing hormone Che Somatostatin Ga Corticotrpin releasing hormone Sut Growth hormone releasing hormone Net Ins Neurohypophyseal peptides Glu Vasopressin Sec Oxytocin Mo Adrenocyte stimulating hormone Growth Prolactine N Luteinizing homone E Growth hormone E

# Thyrotropin

# Opioid peptides

β-Endotropin Enkephalin Dynorphin

#### Gastrointestinal peptides

Vasoactive intestinal peptide Cholecytokinin Gastrin Substance P Neurokinin A Insulin Glucagon Secretin Motilin Pancreatic polypeptide Galanin

## Growth factors

Nerve growth factor Epidermal growth factor Fibroblast growth factor

## Others

Angiotensin II Bradykinin Calcitonin Neuropeptide Y Neurotensin

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

Table 2. Amino acid sequences of neuropeptide from several molluscs

# Ⅱ. 재료 및 방법

#### 1. 재료

#### 1.1. 실험동물

실험에 사용한 오징어 (*Todarodes pacificus*, 150마리, 체장 30 ~ 40 cm)는 2004년 12월에 해운대 시장 (동해안산)에서 100 마리분을 구입하였 고, 김수암 교수님방에서 50 마리를 공급받았다. 살아있는 오징어를 해부하 여 visceral tissue, gill, brain, skin으로 분류하여 즉시 액체질소에 얼린 후 실험 전까지 -70 ℃에서 보관하였다가 실험에 사용하였다.

#### 1.2. 시약 및 재료

시료의 여과를 위한 Millex-LCR13 (0.5 ㎞), Ultrafree-MC (0.45 ㎞), Syringe filter (0.44 ㎞)와 Sep-Pak Vac C<sub>18</sub> cartridge는 Waters사 (Waters associates, Miliford, MA, USA)에서, HPLC-grade의 water (H<sub>2</sub>O) 및 acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN)은 TEDIA사 (Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모 든 시약은 특급을 사용하였다.

#### 2. 실험방법

#### 2.1. 추출

#### 2.1.1. 오징어 내장으로부터 시료의 추출

Fig. 1은 예비실험으로 오징어 7 마리분의 visceral tisssue를 추출한 모 식도이고, Fig. 2는 Fig. 1의 추출과정에 사용된 방법과 유사하게 150 마리 분에 대한 추출 모식도이다.

- 5 -

#### 2.1.1.1. 오징어 내장 (7 마리)로부터 시료의 추출

오징어 내장 (7 마리)를 400 ㎡의 1차 증류수를 사용하여 10분간 끓였 다. 식힌 후 5 % 초산을 넣고 조직을 파쇄하여 4 ℃에서 50분 동안 10,000 x g로 원심분리를 하였다. 침전물은 다시 5 % 초산용액을 넣고 homogenizer로 추출하여 처음과 같은 조건으로 원심분리하였다. 두 번에 걸 쳐 얻어진 상층액은 농축시킨 다음, 시료:ethanol = 1:4 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 -20 ℃의 냉동고에 보관 후, 4 ℃에서 50분 동안 20,000 x g로 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 원심분리한 상층액은 부 분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge에 주입하였다. 먼저 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge를 0.1 % TFA가 포함된 100 % methanol로 활성화 시킨 후, 0.1 % TFA가 포함된 H<sub>2</sub>O로 충분히 평형화하였다. 충분히 평형화 된 다음 시료를 주입하여 0.1 % TFA가 포함된 H<sub>2</sub>O (D.W.), 60 % methanol (RM60)과 100 % methanol (RM100)로 물질들을 각각 용출시켰다 (Fig. 1).

#### 2.1.1.2. 오징어 내장 (150 마리)로부터 시료의 추출

오징어 내장 (150 마리)를 6 ℓ의 1차 증류수를 사용하여 10분간 끓였다. 식힌 후 5 % 초산을 넣고 조직을 파쇄하여 4 ℃에서 50분 동안 10,000 x g 로 원심분리를 하였다. 침전물은 다시 5 % 초산용액을 넣고 homogenizer로 추출하여 처음과 같은 조건으로 원심분리하였다. 두 번에 걸쳐 얻어진 상층 액은 농축시킨 다음, 시료:ethanol = 1:4 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 -20 ℃의 냉동고에 보관 후, 4 ℃에서 45분 동안 10,000 x g로 원심분리하 여 침전물을 제거하였다. 그리고 상층액은 ethanol 및 NaCl을 시료 (1 L):ethanol (8 L):NaCl (15 g)의 비율로 첨가하여 -20 ℃의 냉동고에 보관 후, 4 ℃에서 50분 동안 12,000 x g로 원심분리를 행하여 상층액을 농축하 였다. 농축한 상층액에 시료:acetone = 1:6 (v/v)의 비율로 acetone을 첨가 하여 물층만 분리하여 농축하였고, 다시 시료:ethanol = 1:12 (v/v)의 비율로 ethanol을 첨가하여 -20 ℃의 냉동고에 보관 후, 4 ℃에서 50분 동안 12,000 x g로 원심분리를 행하여 상층액을 농축하였다. 그리고 상층액은 ethanol 및 acetonitrile을 시료 (1 L):ethanol (1 L):acetonitrile (1 L)의 비율 로 첨가하여 -20 ℃의 냉동고에 보관 후, 4 ℃에서 50분 동안 20,000 x g 로 원심분리를 행하여 상층액을 농축하였다. 농축한 시료에 총 농도가 0.1 N HCIOI 되도록 1 N HCI을 첨가하고, 4 ℃ 냉장실에 보관 후, 4 ℃로 50분간 20,000 x g로 원심분리를 행하였다. 원심분리한 상층액은 부분적으로 물질 을 분리하기 위해 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge에 주입하였고, 위와 같은 방법으로 시행하였다 (Fig. 2).

#### 2.1.2. 오징어 아가미로부터 시료의 추출

오징어 아가미 (2 마리)를 50 ml의 1차 증류수를 사용하여 10분간 끓였 다. 식힌 후 5 % 초산을 넣고 조직을 파쇄하여 4 ℃에서 40분 동안 20,000 x g로 원심분리를 하였다. 원심분리한 상층액은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge에 주입하였고 위와 같은 방법으로 시행하였다 (Fig. 3).

#### 2.2. 근 수축 및 이완활성 측정

#### 2.2.1. 근 수축활성 측정

2.2.1.1. 조직의 표본제작

2.2.1.1.1. 오징어

오징어 추출물의 생리활성을 측정하기 위해 오징어 다리를 해부하여 입과 연결된 esophagus를 2 cm를 떼어냈고, 오징어를 반으로 잘라 항문과 연결된 rectum을 2 cm 잘라냈다. 그리고 양쪽으로 보이는 두 개의 아가미 위쪽에 위 치한 아가미 심장을 적출하였고, stomach 밑 부분의 식도와 연결된 intestine을 1 cm로 떼어내었다. 각 단편들은 1 cm 정도로 만들어 2 ml 반응조에 고정시키 고 위쪽은 transducer에 연결시켰다. 모든 과정은 55 mM Mg<sup>2+</sup> artificial sea water (인공해수, ASW)하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 55, Glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH 7.8) 10.

#### 2.2.1.1.2. 달팽이

달팽이의 껍질을 벗긴 다음, 가슴을 절개하여 crop의 윗부분과 아랫부분에 서 약 0.5 cm 떨어진 부분에서 3 ~ 4 cm의 크기로 재빨리 적출하였고, 적출한 crop은 10 ~ 15 mm의 단편으로 만들었고, penial retractor muscle은 10 ~ 15 mm의 길이로 면실로 위, 아래쪽을 묶은 후 적출하여 아래쪽을 2 ml 반응조 에 고정시키고 위쪽은 transducer에 연결시켰다. Ringer 용액의 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 120, KCl 4, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.9, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 18, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.2 and Glucose 10.

#### 2.2.1.1.3. 가리비

오징어 추출물의 생리활성을 측정하기 위해 가리비를 반으로 가르고 중앙 의 adductor muscle에 둘러진 rectum을 2 cm를 떼어냈고, 1 cm 정도의 단편 으로 만들어 2 ml 반응조에 고정시키고 위쪽은 transducer에 연결시켰다. 모든 과정은 55 mM Mg<sup>2+</sup> artificial sea water (인공해수, ASW)하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 55, Glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH 7.8) 10.

#### 2.2.1.1.4. 먹장어 intestine

장관의 표본을 만들기 위해 배측부를 항문 쪽으로 절개하였다. 그 후 식도 로부터 3 ~ 4 cm 떨어진 부위를 2 ~ 3 cm 길이로 재빨리 적출하였다. 절취한 장관의 결체조직을 제거하고, 5 mm정도의 장관 단편을 만들어 2 ml 반응조에 고정시켰다. 모든 과정은 55 mM Mg<sup>2+</sup> artificial sea water (인공해수, ASW)하 에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 55, Glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH 7.8) 10.

#### 2.2.1.1.5. 붕장어 장관의 longitudinal muscle

불장어 장관의 longitudinal muscle을 만들기 위해 붕장어의 중추신경을 절단하여 배측부를 절개하였다. 그 후 위에 인접부위로부터 1 cm정도 떨어 진 부위의 장관을 2 ~ 3 cm정도 재빨리 적출하였다. 면봉으로 장내 분비물 을 가볍게 제거한 후 유리봉을 끼워 mass로 칼집을 낸 뒤 면봉으로 가볍게 밀어내면서 longitudinal muscle strips을 만들었다. 이 모든 과정은 Kreb's bicarbonate ringer solution 하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 118.5, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.9, Alanine 5, and Glucose 5. 이 용액은 95 % O<sub>2</sub>와 5 % CO<sub>2</sub>로 20분간 포화 시킨 후 pH 7.4를 맞추었고, 실온에서 적용되었다.

#### 2.2.1.2. 수축활성의 측정

2.2.1.2.1. 오징어 gill heart, rectum, intestine, esophagus에 대한 수축 활성 측정

준비된 단편들의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1 g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 60분간 평형

화시켰다 (Fig. 4E).

수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화시킨 후 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10<sup>-5</sup> M ACh을 투여하여 활성화시켰 다. 이후 준비된 추출분획은 7마리분의 경우는 전체의 1/50농도로 투여하였고, 150 마리분은 전체의 1/1000농도로 투여 하였다. HPLC 정제단계에서 150 마리 분의 RM60으로부터 얻은 분획은 1/100농도로 하였다. 시료들은 주입한 후 수축 활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.2.1.2.2. 달팽이 crop에 대한 수축활성 측정

준비된 단편의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1 g 의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 60분간 평형화시켰다 (Fig. 4E).

Crop에 대한 수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면 서 안정화시킨 후 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10<sup>-5</sup> M ACh을 투여하 여 활성화시켰다. 이후 준비된 추출분획은 전체의 1/50농도로 투여하였다 시료 들은 주입한 후 수축활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.2.1.2.3. 가리비 rectum에 대한 수축활성 측정

준비된 단편의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1 g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 60분간 평형화시켰다 (Fig. 4E).

수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화시킨 후 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10<sup>-5</sup> M ACh을 투여하여 활성화시켰 다. 이후 준비된 추출분획은 전체의 1/50농도로 투여하였고, HPLC 정제단계에 서 얻은 분획은 1/50농도로 하였다. 시료들은 주입한 후 수축활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.2.1.2.4. 먹장어 장관에 대한 수축활성 측정

준비된 장관의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1.5 g 의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 60분간 평형화시켰다 (Fig. 4E).

수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화시킨 후 5 x 10<sup>-7</sup> M carbachol (CCh)을 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화시켰다. 이후 준비된 추출분획은 전체의 1/50농도로 투여하였다. 시료들은 주입한 후 수 축활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.2.1.2.5. 붕장어 장관의 longitudinal muscle에 대한 수축활성 측정

준비된 장관의 아래쪽은 2 ml 반응조의 지지대에 longitudinal muscle을 고정시킨 후, 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 resting tension 1.5 g이 되도록 60분간 평형화시킨다. 이후 활성측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입하면서 안정화시킨 후 1 x 10<sup>-5</sup> M CCh을 30분 간격으로 3회 투 여하여 활성화시켰다. 이후 준비된 추출분획은 전체의 1/50농도로 투여하였다. 시료들은 주입한 후 수축활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.2.2. 근 이완활성 측정

2.2.2.1. 조직의 표본제작

2.2.2.1.1. 담치 ABRM

오징어 추출물의 생리활성을 측정하기 위해 담치의 posterior adductor muscle을 절단한 뒤, ABRM의 위, 아래쪽을 면실을 묶어 1 cm 정도의 단편으 로 만들어 아래쪽을 2 ml 반응조에 고정시키고 위쪽은 transducer에 연결시켰 다. 모든 과정은 55 mM Mg<sup>2+</sup> artificial sea water (인공해수, ASW)하에서 행하 였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10, MgCl<sub>2</sub>· 6H<sub>2</sub>O 55, Glucose 10 and 0.5M Tris-HCl (pH 7.8) 10.

#### 2.2.2.1.2. 달팽이

달팽이의 껍질을 벗긴 다음, 가슴을 절개하여 crop의 윗부분과 아랫부분에 서 약 0.5 cm 떨어진 부분에서 3 ~ 4 cm의 크기로 재빨리 적출하였고, 적출한 crop은 10 ~ 15 mm의 단편으로 만들었고, penial retractor muscle은 10 ~ 15 mm의 길이로 면실로 위, 아래쪽을 묶은 후 적출하여 아래쪽을 2 ml 반응조 에 고정시키고 위쪽은 transducer에 연결시켰다. Ringer 용액의 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 120, KCl 4, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.9, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 18, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.2 and Glucose 10.

#### 2.2.2.2. 이완활성의 측정

#### 2.2.2.1. 담치 ABRM에 대한 이완활성 측정

준비된 단편의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1 g의 장력을 준 뒤, 15 분 간격으로 완충액을 교체하면서 60 분간 평형화시켰다 (Fig. 4E).

이완 활성의 측정은 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10<sup>-5</sup> M ACh을 투여하여 활성화 시켰고, 15분후 10<sup>-5</sup> M의 ACh을 투여하여 근육을 수축시 켰다. 이후 준비된 추출분획은 전체의 1/50농도로 투여하였다. 시료들은 주입한 후 이완활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.2.2.2. 담치 ABRM에 대한 phasic contraction 측정

준비된 단편의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 5 g의 장력을 주었으며, 반복적인 자극 (23 V, 3 msec, 50 Hz)을 주어 control 값을 얻었다. 이후 전기 자극을 10분 간격으로 주었으며, 각 시료 용액은 전기 자극 8 분전에 적용하였다 (Fig. 4E).

#### 2.2.2.3. 달팽이 penial retractor muscle에 대한 이완활성 측정

준비된 단편의 아래쪽은 2 ml의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1 g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 60분간 평형화시켰다 (Fig. 4E).

Penial retractor muscle에 대한 이완 활성의 측정은 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10<sup>-6</sup> M ACh을 투여하여 활성화 시켰고, 15분후 10<sup>-5</sup> M의 ACh을 투여하여 근육을 수축시켰다. 이후 준비된 추출분획은 전체의 1/50농도로 투여하 였다. 시료들은 주입한 후 이완활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다.

#### 2.3. 오징어 추출물의 HPLC profile

#### 2.3.1. 오징어 내장 추출물의 HPLC profile

Fig. 5D에 나타나듯이 오징어 7마리 내장 추출물 중 오징어 esophagus 에 대해 1/50농도에서 RM60이 가장 큰 활성을 보였다. 150마리 내장 추출 물의 경우에 있어서도 1/1000농도에서 큰 활성을 보였다. 이 활성이 가장 큰 RM60은 정제를 위해 역상 HPLC column (Vydac 218TP510 Protein & peptide C<sub>18</sub>, 9.2 × 250 mm, 5µm, USA)을 사용 하였고, A용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O (pH 2.2)와 B용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 100 % acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) (pH 2.2)을 이용하여 B용매 gradient로 분리·정제하였 다. 분리조건은 다음과 같다: gradient, 0 → 60 % B (120분); 유속, 3.0 ml/min; 온도, 40 ℃; fraction volume, 6.0 ml (Fig. 10).

#### 2.3.2. 오징어 아가미 추출물의 HPLC profile

Fig. 9B에 나타나듯이 오징어 아가미 추출물 중 담치 (*Mytilus edulis*)의 anterior byssus retractor muscle (ABRM)에 대한 활성을 나타낸 RM60은 역상 HPLC column (Vydac 218TP54 Protein & peptide C<sub>18</sub>, 4.6 × 250 mm, 5µm, USA)을 사용 하였고, A용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O (pH 2.2)와 B용매로는 0.1 % TFA를 포함하는 100 % acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) (pH 2.2)을 이용하여 B용매 gradient로 분리·정제하였다. 분리조건은 다음과 같다: gradient, 5 → 45 % B (40분); 유속, 1.0 ml/min; 온도, 40 °C (Fig. 11). Squid visceral tissue (7 EA) + 1° H<sub>2</sub>O 400 ml  $\downarrow$ Boiling (100 ℃, 10 min) Ţ 5 % acetic acid ↓Homogenizer Centrifuge (10,000  $\times$  g, 50 min, 4 °C) Ţ pellet + 5 % acetic acid Centrifuge (10,000  $\times$  g, 50 min, 4 °C) Ţ Concentration of supernatant Ţ Sample:ethanol = 1:4 ↓Overnight Centrifuge (20,000  $\times$  g, 50 min, 4 °C) Ţ Concentration of supernatant Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge RM60 F.T D.W. RM100



Squid visceral tissue (150 EA) + 1° H<sub>2</sub>O 6 L ↓Boiling (100 °C, 10 min) 5 % acetic acid ↓Homogenizer Centrifuge (10,000  $\times$  g, 50 min, 4 °C) ↓Concentration of supernatant Sample: ethanol = 1:4Centrifuge (10,000  $\times$  g, 45 min, 4 °C) ↓Concentration of supernatant Sample: ethanol = 1:8 + NaCl (15 g/1 L) Centrifuge (12,000 × g, 50 min, 4 ℃) Sample: acetone = 5:4↓Concentration of water phase Sample: ethanol = 1:12Centrifuge (12,000  $\times$  g, 50 min, 4 °C) ↓ Concentration of supernatant Sample:ethanol:acetonitrile = 1:1:1  $\downarrow$  (20,000 × g, 50 min, 4 °C) ↓ Concentration of supernatant Added 1 N HCI (final conc. 0.1 N HCI)  $\downarrow$  (20,000 × g, 50 min, 4 °C) ↓ Concentration of supernatant Sample: ether = 1:3↓Concentration of water phase Sample:methanol:acetonitrile = 1:1:2  $\downarrow$  (20,000 × g, 50 min, 4 °C) ↓ Concentration of supernatant Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge F.T. D.W. **RM60** RM100





Fig. 3. Summarized procedures for the extraction of squid's gill (2 EA).





Fig. 4. Squid (*Todarodes pacificus*) (A), scallop (*Patinopecten yessoensis*) (B), mussel (*Mytilus edulis*) (C), snail (*Achatina fulica*) (D) and physiography system (E).

# Ⅲ. 결과 및 토론

#### 1. 오징어 내장 추출물의 생리활성 측정

오징어 7마리와 150마리의 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge를 사용하여 분리된 4가 지 분획인, D.W., RM60, RM100, F.T. 을 활성 측정에 사용하였다. 수축활성은 오징어 4가지 조직과 가리비 rectum, 그리고 달팽이 crop을 사용하였다. 이완 활성은 달팽이 penial retractor muscle과 담치의 ABRM을 사용하였다. 생리활 성 측정에 사용한 모든 양은 1/50농도로 측정하였다.

#### 1.1. 7마리 오징어의 예비 실험 내장 추출물의 생리활성 측정

#### 1.1.1 수축활성 측정

먼저, Fig.1에 나타낸 것처럼 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge를 사용하여 분리된 4 가지 분획인, D.W., RM60, RM100, F.T.을 사용하였다. 이를 사용하여 오징어 의 4가지 조직 (gill heart, rectum, intestine, esophagus)에 대해 생리활성을 측정하였다 (Fig. 5). 먼저, 각 조직에 대해 10<sup>-5</sup> M의 ACh에 대한 반응을 살펴 보았다. 그러나, 사용한 오징어 4가지 조직에 대해 10<sup>-5</sup> M의 ACh은 전혀 반응 을 보이지 않았다. 일반적으로 ACh는 평활근 조직을 수축시키는 물질로 알려져 있지만 이들 조직에 대해 활성을 나타내지 않는 것으로 미루어 보아, 아마도 이 들 4가지 조직은 ACh에 대해 작용을 하는 수용체가 결여되어 있는 것 같다. 그 러나 내장 추출물에 대해서는 다음과 같이 반응을 나타내었다.

Gill heart의 경우 D.W. 와 F.T.에서 미세한 수축정도를 나타내었고, RM60에서 큰 수축활성을 보였으며, RM100에서는 아무런 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 5A).

Rectum의 경우 활성을 보이지 않았고, RM60에서 큰 수축활성을 보였으며, D.W., RM100, F.T.에서 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 5B). Intestine의 경우 대체로 반응이 약했으며, D.W.의 경우 조금 수축하였고, RM60, RM100, F.T.는 어떠한 반응도 보이지 않았다 (Fig. 5C).

Esophagus의 경우에는 4가지 조직 중 RM60에서 가장 큰 활성을 보였고, D.W.는 약간 수축하였으며, RM100, F.T.는 반응을 보이지 않았다 (Fig. 5D).

그리고 가리비의 rectum에 대한 수축활성을 측정해 보았다. 가리비의 rectum에 대해서는 RM60에서만 강한 활성을 나타냈고, D.W., RM100, F.T.에 는 반응을 보이지 않았다 (Fig. 7C).

또한 달팽이 crop에 대해 수축활성 측정해 보았다. 달팽이 crop의 경우는 RM100, D.W., F.T.순으로 수축활성을 나타났고, RM60의 경우에는 이완되는 경향을 보였다 (Fig. 6B).

#### 1.1.2. 이완활성 측정

모든 이완활성의 측정은 10<sup>-5</sup> M ACh로 최대로 수축시킨 후 각 시료의 이완 활성을 측정하였다. 달팽이 penial retractor muscle과 담치의 ABRM을 사용하 였다.

달팽이 penial retractor muscle에 대해 ACh로 최대로 수축시킨 후 이완활 성을 측정해본 결과, RM60, D.W., RM100, F.T.순으로 이완활성이 크게 나타났 다 (Fig.6A).

담치의 ABRM에 대해 이완활성을 측정하고 phasic contraction을 알아보았 다. 이완활성을 측정한 결과, RM60, D.W., F.T.순으로 ABRM이 이완되었으나, RM100에는 반응이 없었다 (Fig. 7A).

한편 ABRM에 대해 phasic contraction을 측정해 본 결과, D.W.에서는 phasic contraction이 조금 줄어들었고, RM60에서 확연히 줄어드는 경향을 보 였다. 그러나 RM100에서는 오히려 늘어난 반면, F.T.의 경우는 phasic contraction이 소멸되었다 (Fig. 7B).

#### 1.2. 150마리 오징어의 내장 추출물의 생리활성 측정

위의 결과 (Fig. 5 ~ 7)를 토대로 하여 정제를 위해 visceral tissue 150마리 분을 사용하여, Fig.2의 과정으로 추출하였다. 따라서 D.W., RM60, RM100, F.T.을 활성이 컸던 오징어의 rectum과 esophagus에 대한 생리활성을 측정하 였다 (Fig. 8).

#### 1.2.1. 수축활성 측정

오징어 esophagus 와 rectum은 모두10<sup>-5</sup> M ACh에 대해 전혀 반응을 보이 지 않았고, 시료는 1/1000농도로 측정하였다 (Fig. 8).

오징어 esophagus에 대해 수축활성을 측정한 결과, esophagus에는 D.W. 와 RM100은 반응을 보이지 않았고, RM60에서 가장 큰 수축활성을 보였으며, F.T.는 phasic contraction만이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 8A).

오징어 rectum에 대해 수축활성 측정한 결과, rectum은 D.W.와 RM60, F.T.가 phasic contraction만이 증가하였고, RM100은 아무런 반응이 없었다 (Fig. 8B).

#### 2. 오징어 아가미 추출물의 생리활성 측정

오징어 2마리 아가미 추출물로부터 Fig. 3의 추출과정으로, Sep-Pak C<sub>18</sub>을 거쳐 나온 D.W., RM60, RM100, F.T.를 가리비 rectum, 담치 ABRM, 먹장어 intestine, 붕장어 장관의 longitudinal muscle, 오징어 esophagus에 대해 활성 을 측정 하였다 (Fig. 9).

#### 2.1. 수축활성 측정

먼저 가리비 rectum에 대한 수축활성을 측정한 결과, 가리비 rectum에 대해서 D.W., RM60, RM100, F.T. 모두 아무 반응이 없었다 (Fig. 9A).

먹장어 intestine에 대해서는 D.W.와 RM60에서만 수축활성을 나타냈고 D.W.의 경우가 RM60보다 큰 활성을 보였다. 그러나 RM100과 F.T.는 반응이 없었다 (Fig. 9C).

붕장어 장관의 longitudinal muscle에 대한 수축활성을 측정한 결과, RM60 에서만 강한 수축활성을 보였고, D.W., RM100, F.T.은 아무런 반응이 없었다 (Fig. 9D).

오징어 esophagus에 대한 수축활성을 측정한 결과, 오징어 esophagus에 대해서는 RM60에서 아주 미세한 활성이 나타났고, D.W., RM100, F.T.은 아무 런 반응이 없었다 (Fig. 9E).

#### 2.2. 이완활성 측정

모든 이완활성의 측정은 10<sup>-5</sup> M ACh로 최대로 수축시킨 후 각 시료의 이완 활성을 측정하였으며, 담치의 ABRM을 사용하여 이완활성을 측정하였다.

담치 ABRM을 ACh로 최대로 수축시킨 후 이완활성을 측정해 본 결과, RM60에서만 이완활성을 보였고, D.W., RM100, F.T.은 아무런 반응이 없었다 (Fig. 9B).

#### 3. 오징어 내장 추출물로부터 신경성 펩타이드의 분리·정제

RM60은 특히 오징어의 rectum과 esophagus에 대해 강한 수축활성을 나 타내었다 (Fig. 5A, D). 또한 이들 RM60으로부터 neuropeptide를 정제하기 위 해 bioassay system으로 rectum과 esophagus을 사용하였다 (Fig. 8). 이때 사 용되었던 시료의 농도는 1/1000이었다.

오징어 내장 추출물은 오징어 esophagus에 대한 활성을 강하게 나타내었 지만 (Fig. 8A), rectum에서는 예비실험과는 달리 수축 활성을 보이지 않았다 (Fig. 8B). 아마도 rectum이 먹물관과 달라붙어 있어 조직을 떼어내는 과정에서 조직의 수용체를 포함한 부분이 손상이 입었을 가능성이 있었다. 또는 예비실험 때인 여름과는 달리 정제를 하려고 한 시기가 겨울이어서, 활성을 확인할 때, 계절의 영향을 받아, 조직이 변화되어, 활성이 다르게 나타난 것 같다.

활성이 가장 큰 RM60은 정제를 위해 역상 HPLC column (Vydac 218TP510 Protein & peptide C<sub>18</sub>, 9.2 × 250 mm, 5μm, USA)을 사용 하였다 (Fig. 10).

RM60에서 1/1000로 오징어 esophagus에 강한 활성을 나타내었지만 (Fig. 8A), 1단계 HPLC과정을 거친 분획들을 사용하여 반응을 본 결과, 농도를 1/100까지 높여서 측정하였지만 오징어 esophagus에 반응을 전혀 나타내지 않았다.

아마도 이러한 결과는 오징어 rectum의 경우와 같이 예비실험 때와는 다른 계절의 영향을 받아서 조직의 변화로 인해 활성의 변화가 유발된 것 같다. Esophagus에 대해서 반응을 알 수가 없었기 때문에 Fig. 7C에서 나타난 것처 럼 ACh에 반응을 나타낸 가리비 rectum을 사용하여 활성을 측정하였다 (Fig. 10). 가리비 rectum에서 각 분획들의 활성을 측정한 결과, 분획 21-22 (Fig. 10 의 black bar)에서 수축활성을 보였다 (Fig. 10). 그 이후 정제하였지만 활성을 나타내지 않았다.

#### 4. 오징어 아가미 추출물로부터 신경성 펩타이드의 분리·정제

Fig. 9는 오징어 아가미추출물의 활성 결과이다. 추출물 농도를 전부 1/50 로 하여 평활근의 수축 및 이완활성을 측정해 본 결과, Fig. 9B에서 나타나듯이 담치 ABRM에 대해 큰 이완 활성을 나타내었기 때문에 bioassay system으로 담치 ABRM를 사용하였다. 특히, RM60이 다른 추출물보다 활성이 보다 강하기 때문에 RM60을 사용하여 neuropeptide를 정제하고자 하였다 (Fig. 9B). 이때 사용한 시료의 농도는 각각 1/100과 1/50이다. Fig. 11은 담치 ABRM에 대한 활성을 나타낸 RM60을 사용하여 역상 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다.

현재 담치의 ABRM에 대하여 각 분획의 1/20농도에 대한 활성을 확인하고 있다.



Fig. 5. Typical tracing illustrating the relaxing response of squid's visceral tissue extracts, *Todarodes pacificus*. Each down arrow represents the sample applied to the Squid organ. The precontraction was induced by ACh, 10<sup>-5</sup> M.



Fig. 6. Typical tracing illustrating the relaxing and contractile response of squid's visceral tissue extracts, *Todarodes pacificus*. Each down arrow represents the sample applied to the snail organ. The precontraction was induced by ACh, 10<sup>-5</sup> M.


**Fig. 7. Typical tracing illustrating the relaxing and contractile response of squid's visceral tissue extracts,** *Todarodes pacificus.* Each down arrow represents the sample applied to the shellfish organ. The precontraction was induced by ACh, 10<sup>-5</sup> M.



**Fig. 8. Typical tracing illustrating the contractile response of squid's visceral tissue extracts,** *Todarodes pacificus.* Each down arrow represents the sample applied to the Squid organ. The precontraction was induced by ACh, 10<sup>-5</sup> M.



Fig. 9. Typical tracing illustrating the relaxing and contractile response of squid's gill extracts, *Todarodes pacificus*. Each down arrow represents the sample applied to the shellfish, fish and squid organ. The precontraction was induced by ACh, 10<sup>-5</sup> M.



Fig. 10. 1st reverse-phase HPLC profile of visceral tissue extracts. RM 60 of visceral extracts was loaded onto Vydac  $C_{18}$  (9.2 × 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH<sub>3</sub>CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 3.0 ml/min. The black bar represents contractile active fractions on the scallop rectum.



Fig. 11. 1st reverse-phase HPLC profile of gill extracts. RM60 of gill extracts was loaded onto Vydac  $C_{18}$  (4.6 × 250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH<sub>3</sub>CN (dotted line) in 0.1 % TFA at flow rate of 1.0 ml/min.

#### 국 문 초 록

오징어 (*Todarodes pacificus*)의 내장 및 아가미 추출물로부터 신경성 펩타이드를 정제하고자 하였다. 생리활성을 측정하기 위해서 오징어 several organ, 달팽이, 가리 비, 담치, 먹장어 및 붕장어의 조직을 bioassay system으로 사용하였다. 오징어 2마리 조직의 초산 추출물들을 각각 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge로 D.W., RM60, RM100, F.T.로 분리하여 1/50농도로 활성을 측정하였다. 이들을 사용하여 평활근 수축 및 이완활성을 측정한 결과, 대부분의 조직에 대해 RM60에서 높은 반응을 나타냈다.

사용한 오징어 조직 중에서 내장 추출물 RM60은 esophagus에서 가장 큰 수축활 성을 보였다. 그러나 달팽이 crop에 대해서는 RM100에서 가장 큰 수축활성이 나타났 다.

아가미 추출물의 경우도 마찬가지로 RM60에서 가장 큰 활성을 보였지만, 담치 ABRM에 대해 강한 이완활성과 붕장어 longitudinal muscle에 대해서만 강한 수축활성 을 보였다.

현재 오징어 내장 및 아가미 추출물 모두에서 높은 활성이 있는 RM60은 역상 HPLC column을 사용하여 정제 진행 중에 있다.

### Ⅳ. 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.
- Elliott, G. R. and Barchas, J. D. Neuroregulators: neurotransmitters and neuromodulators. (1979) *Behav. Brain Res.*, **2**, 423–424.
- 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.
- 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.
- Hirata, T., Kubota, I., Takabatake, I., Kawahara, A., Shimamoto, N. and Muneoka, Y. Catch-relaxating peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. (1987) *Brain Res.*, **422**, 374-376.
- Hoyle, C. H. V. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. (1998) *Regul. Pept.*, **73**, 1-33.
- Kim, E. J. Purification and characterization of novel neuropeptides from the starfish, *Asterina pectinifera.* (2004) Ph. D. Dissertation in Pukyong National University.
- Kishimura, H., Saeki, H. and Hayashi, K. Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes*

pacificus). (2001) Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 130(1), 117-23.

- Kobayashi, M. and Muneoka, Y. Structure and action of molluscan neuropeptide. (1990) *Zool. Sci.*, **7**, 801-814.
- Komai, T., Kawabata, C., Amano, M., Lee, B. R. and Ichishima, E. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). (2004) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **137**(3), 373–82.
- Krieger, D. T. Brain peptide: What, Where, and Why? (1983) *Science*, **222**, 975-985.
- Minakata, H., Fujita, T., Kawano, T., Nagahama, T., Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Muneoka, Y. and Nomoto, K. The leech excitatory peptide, a number 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.
- Miura-Yokota, Y., Matsubara, Y., Ebihara, T., Koyama, Y., Ogawa-Goto, K., Isobe, N., Hattori, S. and Irie, S. Cloning and nucleotide sequence of a novel 28-kDa protein from the mantle muscle of the squid *Todarodes pacificus* with homology to tropomyosin. (2005) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 141(1), 3-12.

- Miyazawa, H., Fukamachi, H., Inagaki, Y., Reese, G., Daul, C., B., Lehrer, S., B., Inouye, S. and Sakaguchi, M. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). (1996) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**(5 Pt 1), 948-53.
- 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.
- 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.
- Twarog, B. M. The regulation of catch in molluscan muscle. (1967) *J. Gen. Physiol.*, **50**, 157-169.
- Wang, F., Xiao, M. and Mu, S. Purification and properties of a diisopropyl-fluorophosphatase from squid *Todarodes pacificus* steenstrup. (1993) *J. Biochem. Toxicol.*, 8(3), 161-6.
- 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.

Part II.

## 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)로부터 정제된 신경성 펩타이드, SF-II의 cDNA 연구

표 (Table) 목록	·
그림 (Figure) 목록 ······	·
초록 (Abstract) ······	۰IV
Ⅰ.서 론	•• 1
Ⅱ. 재료 및 방법	6
1. 재료	• 6
1.1. Strains 및 plasmid ······	• 6
2. 실험방법	• 6
2.1. RNA 추출 ······	• 6
2.2. Reverse transcription	• 7
2.3. 3' RACE cDNA cloning for the complete coding sequence	
of SF-II ·····	• 7
2.4. cDNA full sequence of starfish, Asterina pectinifera	10
2.4.1. Dephophorylating RNA	10
2.4.2. Removing the mRNA cap structure	11
2.4.3. Ligating the RNA oligo to the decapped mRNA	11
2.4.4. Reverse transcribing mRNA	12
2.5. 5' RACE cDNA cloning for the complete coding sequence	
of SF-II ·····	12
2.6. Ligation of PCR products	14
2.7. Competent cell 제조와 transformation	15
2.8. Preparation of plasmid DNA	16
2.9. Sequencing analysis	17

목 차

2.10. Homology search	17
2.11. Tissue type expression	17
Ⅲ. 결과 및 토론	24
1. 3' rapid amplification cDNA ends (3' RACE)	24
2. 5' rapid amplification cDNA ends (5' RACE)	25
3. Full sequence of SF-II from starfish (Asterina pectinifera)	27
4. SF-II tissue type expression	29
Ⅳ. 참고문헌	40
V. 감사의 글 ·····	44

## List of Tables

Table	З.	Mole	cular	weight	and	amin	0 8	acid	seque	ences	of	purified
		peptio	des fr	om sta	rfish, 🗡	Asterir	na p	ectin	ifera. ·		•••••	4
Table	4.	The	N-te	rminal	seque	nces	of	som	e eu	karyoti	C S	secretory
		prepr	oteins				•••••				•••••	

## List of Figures

Fig. 12. Amino acid sequence of SF-II isolated from starfish, Asterina
pectinifera (A), the molecular weight was determined by
MALDI-TOF Mass spectra (B)5
Fig. 13. Primers for 3' RACE and 5' RACE including GeneRacer™
primers
Fig. 14. Primers for tissue type expression
Fig. 15. Several steps of making GeneRacer™ RNA oligo ligated cDNA
full sequence using GeneRacer™ Kit
Fig. 16. pGEM-T Easy vector map (Promega, Madison, WI, USA).
Fig. 17. 3' RACE PCR products from Asterina pectinifera cDNA (A) and
sequencing result (B)
Fig. 18. 5' RACE PCR products from Asterina pectinifera cDNA (A) and
sequencing result (B)
Fig. 19. Nucleotide sequence of SF-II cDNA with the amino acid
sequence for the prepropeptide
Fig. 20. Diagram of SF-II cDNA full sequence
Fig. 21. SF-II tissue type expression

#### cDNA cloning of neuropeptide, SF-II from the starfish, Asterina pectinifera

Sang Hyun An

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

#### Abstract

A novel neuropeptide, named SF-II with relaxing activity on the dorsal retractor muscle (DRM) was isolated from the whole body extract of starfish, *Asterina pectinifera*. The primary structure of SF-II was as follow:

G-A-I-X-K-D-P-Y-M-D-I-M-S-L-R-E-S-N-Y-X

However 4th and 20th amino acid residues of SF-II were not determined by amino acid sequencing. We had cDNA cloning study to investigate the unknown residues of SF-II. For the research of cDNA of SF-II, degenerate primer was made from known SF-II amino acid sequence. 3' RACE (rapid amplification cDNA ends) and 5' RACE was produced and used by pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector and *E. coli* (DH5 $\alpha$ MCR). To investigate the tissue type expression, RNA was extracted from 5 tissues (stomach, liver, gonad, DRM, tube foot) and did reverse transcription.

Based on the results of 3' RACE and 5' RACE, 5' UTR (untranslational region) was 138bp, 3' UTR was 199bp and open reading frame (ORF) was 240bp, which encoding 80 amino acids. In ORF, 20 amino acids of N-terminal region was signal peptide. This gene included 3 sites of KR or RR. By these sites, except for signal peptide, it was devided into 4 sections; from 21th to 32th, from 35th to 46th, from 49th to 68th and from 69th amino acid to stop codon.

Above all, the region corresponding to the SF-II was from 49th to 68th amino acid. From these results, 4th and 20th amino acid of SF-II were Cys. Thus, the complete primary structure of SF-II was as follow:

Tissue type expression of SF-II was strongly expressed on gonad and DRM, but was a little expressed on stomach, liver and tube foot. Ⅰ.서 론

신경성 펩타이드는 신호전달물질로서 신경계에서 신호전달 및 조절 역할을 하며, acetylcholine (ACh)과 같은 비펩타이드성 transmitter와 함께 방출된 다고 알려져 있다 (Elliott and Barchas, 1979; Krieger, 1983). 이들은 평활 근의 운동조절, 혈관의 수축 및 이완, 통증전달 및 혈압 조절등의 역할을 담 당하고 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 종 들간의 상관관계와 진화과정에 관한 정보를 제공하고 있다 (Hoyle, 1998). 최근 극피동물의 추출물을 사용하여 *in vitro*상에서 이완을 유발하는 물질들 이 screening되었으나 (Elphick and Melarange, 2001), 극피동물에 있어 신 경전달물질에 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 의 해 해삼 (Holothuria glaberrima)으로부터 해삼의 rectum과 longitudinal muscle band에서 ACh에 의해 유발된 수축에 대해 이완활성을 나타내는 GFSKLYFa, SGYSVLYFa가 보고된 바 있으며, immunoreactivity 기법을 이 용한 연구결과 이들 물질이 해삼의 몸 전체에 넓게 분포하고 있음이 밝혀졌 다 (Diaz-Miranda et al., 1995a). 또한, 해삼 (Stichopus japonicus)의 longitudinal muscle과 body wall로부터 해삼의 longitudinal muscle에 수축 활성을 갖는 NGIWYa와 intestine으로부터 이완활성을 유발하는 GYSPFMFa 및 FKSPFMFa가 보고되어졌다 (Iwakoshi *et al.*, 1995). 뿐만 아니라, 북대 서양 (North Atlantic)에 존재하는 다른 불가사리종인 Asterias rubens, *Asterias forbesi*의 radial nerve cords로부터 radioimmunoassav (RIA) 기법

에 의하여 FMRFa 관련 peptide인 S1과 S2가 정제되었다 (Elphick *et al.*, 1991a). 또한 별불가사리 (*Asterina pectinifera)*의 pyloric ceca로부터 phospholipase A2가 분리되어 cloning되었다 (Kishimura H *et al.*, 2000).

또한 같은 종으로부터 alpha-N-acetylgalactosamine-specific lectin (Kakiuchi M *et al.*, 2002)과 cyclin B (Miyake Y *et al.*, 2001)의 cloning된 예 밖에 없다.

그러나 불가사리를 이용하여 신경성 펩타이드의 정제 및 cloning에 관한 연 구는 아직 미비한 실정이다.

불가사리는 극피동물이며 불가사리강에 속하는 것으로 빗살판 불가사리류 (Ctenodiscus), 작은 불가사리류 (Leptychaster), 검은 띠 불가사리류 (Luidia), 헛불가사리류 (Pseudarchaster), 애기불가사리류 (Henricia), 햇님 불가사리류 (Solaster), 입방불가사리류 (Pteraster), 문어불가사리류 (Plazaster), 일본불가리류 (Distolasterias), 아팰불가사리류 (Aphelasterias), 아무르불가사리류 (Asterias)등이 있는데, 특히, 우리나라에는 별불가사리로 불리는 종인 *Asterina pectinifera*가 많다.

이전에 본 연구실에서는 별불가사리로부터 dorsal retractor muscle에 대해 이완활성을 지닌 SF-I, SF-II, SF-III을 정제하였다 (Kim, 2004). Table 3은 SF-I, SF-II, SF-III의 아미노산 서열을 나타내고 있다. SF-I의 분자량은 1601.72 Da이고, 아미노산 잔기는 16개로 구성되어 있다. SF-II 및 SF-III의 분자량은 각각 2306.95 Da와 3655.0 Da이다. SF-II의 경우, 분자량 측정과 아미노산 서열 결과, 20개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다고 추정되어 진 다. 또한, Table 3에 나타낸 바와 같이, 계산된 분자량 값이 2309 Da으로 실제의 분자량인 2306.95보다 2만큼 부족하므로 결정되지 않은 잔기인 4번 째 및 20번째는 각각 Cys 잔기라고 예측되어진다. 이는 2개의 Cys이 disulfied bond를 형성한다면 수소분자 두 개가 빠지게 되어, 2만큼 부족한, 측정된 분자량 값과 일치하게 된다. 한편, SF-III의 경우에 있어서도, C-말 단부위의 아미노산 서열이 완전히 결정되지 않았다. 따라서 본연구실에서는 우선 SF-II를 대상으로 아직까지 완전하게 결정되지 않은 4번째와 20번째의 아미노산 잔기를 알아보기 위해 cDNA연구를 하고자 하였다. 또한 이들 SF-II의 tissue type expression 연구도 아울러 행하였다.

	Amino acid sequence	Mass spectrum		
Peptides	(pmole)	Observed	Calculated	
		(M+H)'	(M)	
SF- I	1 5 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	<sup>1</sup> Gly-Ala-IIe-Xaa-Lys-Asp-Pro-Tyr-Met-Asp-IIe-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) (26) (28) (26) (33 (15) (21) -Leu-Ser-Xaa-Val-Leu-Ala-Asp-Ser-Asn-Xaa (20) (8) (14) (14) (12) (8) (5) (4)	3655.0	_	

Table 3. Molecular weight and amino acid sequences of purified peptides from starfish, Asterina pectinifera.

\* This table was from Kim, et al. (2005)

Α.

Amino acid sequence of SF-II						
1	5	10	15	20		
Gly-Ala-IIe-Xaa-Lys-Asp-Pro-Tyr-Met-Asp-IIe-Met-Ser-Leu-Arg-Glu-Ser-Asn-Tyr-Xaa						

В.



Fig. 12. Amino acid sequence of SF-II isolated from starfish, *Asterina pectinifera* (A). The molecular weight was determined by MALDI-TOF Mass spectra (B).

### Ⅱ. 재료 및 방법

#### 1. 재료

#### 1.1. Strains 및 plasmid

본 실험에 사용된 strain은 *E. coli* DH5α MCR (NIH; Bethesda, MD, USA)이며, 이형호 교수님방에서 분양받았다. 그리고 사용한 vector는 pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Madison, WI, USA, Fig. 16)이다.

#### 2. 실험 방법

#### 2.1. RNA 추출

VERSAGENE<sup>™</sup> total RNA purification (from up to 40 mg) kit (Gentra systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다.

0.5 M tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)가 4 µl 첨가된 400 µl Lysis buffer에 별불가사리 whole body 40 mg를 넣고 homogenization하였 다. 이를 Preclear column에 넣고 4,000 rpm에서 1분간 centrifugation하였 다. Column을 통과한 lysate는 Purification column에 넣고 14,000 rpm에서 1 분간 centrifugation하였다. Purification column을 새 튜브로 옮기고 800 µl의 Wash I solution을 넣고 14,000 rpm에서 1분간 centrifugation하였다. Column 을 빠져나온 액은 버리고 200 µl의 Wash II solution을 넣고 14,000 rpm에서 1 분간 centrifugation하였다. Column을 빠져나온 액은 버리고 다시 Wash II solution을 200 µl 넣고 14,000 rpm에서 2분간 centrifugation하였다. Column 에 결합된 RNA를 elution하기 위해서 Elution buffer 100 µl를 넣고 14,000 rpm 에서 1분간 centrifugation하였다. 이후 RNA는 -70 ℃에 보관하였다.

#### 2.2. Reverse transcription

추출한 total RNA로부터 cDNA를 만들기 위해서, M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였다. 3' Rapid amplification cDNA ends (3' RACE)를 하기 위해서 adaptor에 3' primer와 3' nested primer 서열이 있는 GeneRacer Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 GeneRacer™Oligo dT Primer를 사용하 였다. GeneRacer™Oligo dT Primer서열은 다음과 같다:

5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>24</sub>-3'.

## 2.3. 3' RACE cDNA cloning for the complete coding sequence of SF-II

SF-II의 cloning을 하기 위해서 알고 있는 서열 (Fig. 12)의 아미노산을 이용하여 forward primer인 degenerate primer SF-II-1, SF-II-2 및 SF-II-3를 작성하였다. 각 primer는 SF-II서열 내에서 작성하였으며. SF-II-1 primer는 5 ~ 11 amino acid residue, SF-II-2 primer는 7 ~ 12 amino acid residue, SF-II-3 primer는 8 ~ 14 amino acid residue로부터 작성하였다.

사용한 3종류의 primer들은 다음과 같다: SF-II-1 primer; 5'-AARGAYCCNTAYATGGAYA-3' (19mer) SF-II-2 primer; 5'-CCNTAYATGGAYATHATG-3' (18mer) SF-II-3 primer; 5'-YATGGAYATHATGWSNYT-3' (18mer).

또한 reverse primer로 사용된 GeneRacer<sup>™</sup> 3'Primer는 GeneRacer<sup>™</sup> Oligo dT Primer서열 내의 첫 번째부터 25번째까지로부터 만들어졌고, GeneRacer<sup>™</sup> 3'Nested Primer는 GeneRacer<sup>™</sup>Oligo dT Primer서열 내의 14번째부터 36번째까지로부터 만들어졌다 (Fig. 13). 사용된 GeneRacer<sup>™</sup> Primer는 다음과 같다:

GeneRacer<sup>™</sup> 3' Primer;

5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3' (25mer) GeneRacer<sup>™</sup> 3' Nested Primer;

5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3' (23mer)

1차 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 하기 위해서 재료 및 방법 2.2에서 얻은 total RNA로부터 reverse transcription하여 만든 cDNA를 사용 하였다. 반응액 조성은 1 µl의 template, 2 µl의 10 µM GeneRacer™ 3' Primer, 2 µl의 10 µM SF-II-1 primer, 5 µl의 10 × reaction buffer, 3 µl 의 2.5 mM dNTPs 및 1 µl의 Taq DNA polymerase (1 unit/µl, Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였고, 최종 volume이 50 µl가 되도록 D.W.를 넣었 다. PCR 조건은 다음과 같다:

1차 PCR 조건은 94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 42 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃ 에서 1분 동안 extention 반응을 15 cycle하였다. 또 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 45 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃에서 1분 동 안 extention 반응을 20 cycle하였고, 끝으로 최종 extention을 위해서 72 ℃에서 7분 동안 반응하였다.

2차 nested PCR을 하기 위해서 2 µl의 1차 PCR product, 2 µl의 10 µ M GeneRacer™ 3' Nested Primer, 2 µl의 10 µM SF-II-2 primer, 5 µl의 10 × reaction buffer, 3 µl의 2.5 mM dNTPs 및 1 µl의 Taq DNA polymerase (1 unit/µl, Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였고, 최종 volume 이 50 µl가 되도록 D.W.를 넣었다. PCR 조건은 다음과 같다: 2차 PCR 조건은 94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 50 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃ 에서 1분 동안 extention 반응을 30 cycle하였고, 끝으로 최종 extention을 위해서 72 ℃에서 7분 동안 반응하였다.

3차 nested PCR을 하기 위해서 2 µl의 2차 PCR product, 2 µl의 10 µ M GeneRacer™ 3' Nested Primer, 2 µl의 10 µM SF-II-3 primer, 5 µl의 10 × reaction buffer, 3 µl의 2.5 mM dNTPs 및 1 µl의 Taq DNA polymerase (1 unit/µl, Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였고, 최종 volume 이 50 µl가 되도록 D.W.를 넣었다. PCR 조건은 다음과 같다:

3차 PCR 조건은 94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 50 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃ 에서 1분 동안 extention 반응을 30 cycle하였고, 모든 PCR 조건에서 extension time은 1분당 1 Kb의 길이를 기준으로 정하였고, 불가사리의 경 우도 1 Kb의 길이를 넘지 않을 것이라고 생각되어 extension time을 1분으 로 하였다. 그리고 최종 extention을 위해서 72 ℃에서 7분 동안 반응하였 다. PCR 후 size 확인을 위해 전기영동을 하였다 (Fig. 16A). 모든 전기영동 은 0.8 % agarose gel을 사용하였고, 이때 gel은 1 × Tris acetate EDTA (TAE) buffer를 사용하여 만들었고, 이 buffer는 loading buffer로도 사용하 였다. 6 × DNA loading dye를 사용하여 DNA와 mixing하여 gel의 홈에 넣 었는데, 이것은 agarose의 well에 DNA를 넣어줄 때 DNA용액을 무겁게 하여 agarose의 홈으로 가라앉히는 역할을 하며, 또한 그 성분에 전기영동되는 속도가 다른 두개의 염색시약인 bromophenol blue와 xylene cyanol FF가 들어 있어 DNA와 같이 전기영동되며 DNA의 전기영동된 정도를 알 수 있게 하는 역할을 한다. 그래서 두 염색 시약이 gel plate의 두 간격이 차이가 날 때까지 약 17분간 전기영동 하였다 (Fig. 17A).

- 9 -

#### 2.4. cDNA full sequence of starfish, Asterina pectinifera

Starfish cDNA full을 만들기 위해 4단계의 과정을 행하였다. 먼저 RNA 의 5'phosphate를 제거하기 위해 Calf Intestinal Phosphatase (CIP)를 이용 하였고 (Fig. 15A), mRNA의 5'cap structure를 제거하기 위해 Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP)를 이용하였다 (Fig. 15B). T<sub>4</sub> ligase를 사용하 여 decapped mRNA의 5'끝에 GeneRacer™ RNA Oligo를 ligation 시켰으며 (Fig. 15C), 사용한 GeneRacer™ RNA Oligo Sequence는 다음과 같다: 5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3' 마지막으로, GeneRacer™Oligo dT Primer 와 SF-II의 GSP인 SF-II 5'-1 primer를 사용하여 두 종류로 reverse transcription하였다 (Fig. 15D).

#### 2.4.1. Dephophorylating RNA

Starfish cDNA full을 만들기 위한 첫 번째 단계로 RNA의 5'phosphate 를 제거하기 위해 CIP를 사용하였다. 우선 5 μI의 RNA, 1 μI의 10 × CIP reaction buffer, 1 µl의 RNaseOUT<sup>™</sup> (40 U/µl), 1 µl의 CIP (10 U/µl) 그리 고 멸균한 diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water (DEPC water)로 total volume을 10 µl로 맞추었다. 이 mixture를 50 ℃에서 1시간 동안 incubation시켰고, mixture를 phenol/chloroform extraction과 ethanol precipitation하였다. 이 방법은 이후 3단계에서도 동일하게 적용하였다. 10 μl 의 mixture에 90 山의 DEPC water를 넣어 100 山의 volume으로 만든 뒤, 동 phenol/chloroform을 넣고 뭌 량의 30초간 mix하였다. 층과 phenol/chloroform의 두 층으로 분리되면, 위층인 물 층만 새 튜브로 옮겼다. 여기에 2 µl의 10 mg/ml mussel glycogen, 10 µl의 3 M sodium acetate (pH5.2)를 넣고 mix한 후, 220 µl의 95 % ethanol을 넣고 -20 ℃에서

overnight시켰다. RNA를 pellet으로 보이게 하기 위해서 4 ℃, 14,000 rpm에 서 20분간 centrifugation하였다. Pellet은 건드리지 않고 상층액만 조심스럽게 제거하고, 500 µl의 75 % ethanol을 넣었다. Invert하여 mix한 후, 4 ℃, 14,000 rpm에서 2분간 centrifugation하였고, ethanol을 완전히 제거한 후, 2분 간 air dry시켰다. 여기에 7 µl의 DEPC water를 넣어 녹였다 (Fig. 15A).

#### 2.4.2. Removing the mRNA cap structure

Starfish cDNA full을 만들기 위한 두 번째 단계로 full-length mRNA로 부터 5'cap structure를 제거하기 위해 TAP를 사용하였다. 우선 7 µl의 dephophorylated RNA, 1 µl의 10 × TAP reaction buffer, 1 µl의 RNaseOUT<sup>™</sup> (40 U/µl) 및 1 µl의 TAP (10 U/µl)로 total volume은 10 µl 이었다. 이 mixture를 37 ℃에서 1시간 동안 incubation시켰고, phenol/chloroform extraction과 ethanol로 precipitation하였다. 마지막으로 7 µl의 DEPC water를 넣어 녹였다 (Fig. 15B).

#### 2.4.3. Ligating the RNA oligo to the decapped mRNA

Starfish cDNA full을 만들기 위한 세 번째 단계로 T₄ ligase를 사용하여 mRNA의 5'끝에 GeneRacer™ RNA Oligo를 ligation시켰다. 7 µl의 dephophorylation 및 decapping 된 mRNA에 prealiquote되어 lysophilize되어 있는 GeneRacer™ RNA Oligo (0.25 µg)를 넣고 65 ℃에서 5분간 incubation하여 RNA secondary structure를 풀어주었다. 이 반응은 65 ℃에 서 행하기 때문에 용액이 증발되어 1 µl가 줄어들 가능성이 있다. Ice에 2분 간 둔 후, 1 µl의 10 × ligase reaction buffer, 1 µl의 10 mM ATP, 1 µl의 RNaseOUT<sup>™</sup> (40 U/µl), 1 µl의 T₄ RNA ligase (5 U/µl)를 첨가하여 total volume을 10 µl로 하였다. 이 mixture를 37 ℃에서 1시간 동안 incubation

시켰고, phenol/chloroform extraction과 ethanol로 precipitation하였다. 마지 막으로 10 µl의 DEPC water를 넣어 녹였다 (Fig. 15C).

#### 2.4.4. Reverse transcribing mRNA

Starfish cDNA full을 만들기 위한 마지막 단계로 GeneRacer™ RNA Oligo가 연결되고, decapped된 full-length mRNA를 GeneRacer™Oligo dT Primer 와 SF-II의 GSP인 SF-II 5'-1 primer를 사용하여 두 종류로 RT하였 다. 우선 10 µl의 ligated RNA를 5 µl씩 두 개의 0.2 ml tube에 나누었고, 각각에 reaction mixture를 만들었다. 이 mixture에 한 쪽에는 1 µl의 GeneRacer™Oligo dT Primer를 넣고, 다른 한쪽에는 SF-II 5'-1 primer를 넣었다. 그리고 1 µI의 dNTP (10mM each)를 넣고 65 ℃에서 5분간 incubation하여 RNA secondary structure를 풀어주었다. 이 반응은 65 ℃에 서 행하기 때문에 용액이 증발되어 1 µI가 줄어들 가능성이 있다. Ice에 2분 간 둔 후, 각각의 튜브에 4 μl의 5 × First strand buffer, 2 μl의 dithiothreitol (DTT), 1 µI의 RNaseOUT<sup>™</sup> (40 U/µI), 1 µI의 Superscript<sup>™</sup>II RT (200 U/µl) 및 DEPC water를 첨가하여 total volume을 20 µl로 하였다. 이 mixture를 42 ℃에서 50분 동안 incubation한 후,70 ℃에서 15분 동안 불활성화시켰다. Ice에 2분간 둔 후, 1 µl의 RNase H (2 U/µl)를 넣고, 37 ℃ 에서 20분 동안 incubation시킨 후, -20 ℃에 사용 전까지 보관하였다 (Fig. 15D).

# 2.5. 5' RACE cDNA cloning for the complete coding sequence of SF-II

5' RACE를 하기 위해서 3' RACE에서 나온 결과를 이용하였다. 5' RACE reverse primer 로 사용하기 위해 Fig. 16에 표시한 부분인 gene specific primer (GSP)를 작성하였다.

SF-II 5'-1 primer;

#### 5'-AATGCCTCTCTCCTCTTACG-3' (20mer)

SF-II 5'-2 primer;

5'-CAGTAGTTGGATTCTCTAAG-3' (20mer)

Forward primer로 사용된 GeneRacer™ 5' Primer와 GeneRacer™ 5' Nested Primer는 GeneRacer™ RNA Oligo Sequence내의 첫 번째부터 23 번째까지 및 15번째부터 40번째까지를 사용하여 만들었다 (Fig. 13). 사용된 GeneRacer<sup>™</sup> Primer는 다음과 같다:

GeneRacer<sup>™</sup> 5' Primer;

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (23mer)

GeneRacer<sup>™</sup> 5' Nested Primer;

5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (26mer)

1차 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 하기 위해서 재료 및 방법 2.4에서 설명한 것처럼 GeneRacer<sup>™</sup> RNA Oligo Sequence가 연결된 full-length cDNA를 사용하였고, GeneRacer<sup>™</sup>Oligo dT Primer 와 SF-II의 GSP인 SF-II 5'-1 primer를 사용한 두 종류의 template를 사용하여 PCR 하 였다. 반응액 조성은 1 µl의 template, 2 µl의 10 µM GeneRacer<sup>™</sup> 3' Primer, 2 µl의 10 µM SF-II-1 primer, 5 µl의 10 × reaction buffer, 3 µl 의 2.5 mM dNTPs 및 1 µl의 Taq DNA polymerase (1 unit/µl, Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였고, 최종 volume이 50 µl가 되도록 D.W.를 넣었 다. PCR 조건은 다음과 같다:

1차 PCR 조건은 94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서

- 13 -

30초 동안 denaturation 반응, 45 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃ 에서 1분 동안 extention 반응을 15 cycle하였다. 또 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 48 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃에서 1분 동 안 extention 반응을 20 cycle하였고, 끝으로 최종 extention을 위해서 72 ℃에서 7분 동안 반응하였다.

2차 nested PCR을 하기 위해서 2 µl의 1차 PCR product, 2 µl의 10 µ M GeneRacer™ 3' Nested Primer, 2 µl의 10 µM SF-II-2 primer, 5 µl의 10 × reaction buffer, 3 µl의 2.5 mM dNTPs 및 1 µl의 Taq DNA polymerase (1 unit/µl, Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였고, 최종 volume 이 50 µl가 되도록 D.W.를 넣었다. 2차 PCR 조건은 다음과 같다:

94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 47 ℃에서 30초 동안 annealing 반응, 72 ℃에서 50초 동안 extention 반응을 30 cycle하였고, 1차 PCR의 경우에는 extension time을 1분으로 하였지만, 전기영동 결과 500bp를 넘지 않았기 때문에, 2차 PCR의 경우에는 50초로 정하였다. 그리고 최종 extention을 위해서 72 ℃에 서 7분 동안 반응하였다. PCR 후 size 확인을 위해 0.8 % agarose gel 전 기영동을 하였다 (Fig. 18A).

#### 2.6. Ligation of PCR products

PCR products를 정제하기 위해서 PCR DNA Purification Kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR product (50 μl)에 PB buffer를 5 volume (250 μl)넣어서 pipetting하여 mixing한 후, binding column tube에 넣고 14,000 rpm에서 10초간 centrifugation하였다. 액은 버리고 binding column은 새 튜브로 옮긴 후 500 μl의 Washing buffer를 넣고 5분간 방치한 후, 14,000 rpm에서 10초간 centrifugation하였다. 빠져나온 액은 버리고 다시 250 μl의 Washing buffer를 넣고 14,000 rpm에서 1분간 centrifugation하였다. 빠져나온 액은 버리고 다시 14,000 rpm에서 1분간 centrifugation하고, column은 새 튜 브로 옮긴 후, clean bench에서 10분간 말렸다. Elution을 하기 위해서 Elution buffer나 D.W.를 사용하였으며, 회수율을 높이기 위해서 50 ℃로 예열된 D.W. 를 사용하였다. 50 ℃로 예열된 35 µl의 D.W.를 column 중앙에 loading하고 5 분간 반응시간을 준 후, 14,000 rpm에서 1분간 centrifugation하였다.

3.5 µl의 purified PCR product를 TA vectors (pGEM<sup>®</sup>-T Easy; Promega, Madison, WI, USA, Fig. 16)와 ligation한 뒤, mixture는 4 ~ 16 ℃에서 30분 or overnight시켰다.

#### 2.7. Competent cell 제조와 transformation

Bacterial strains으로 *E. coli* DH5α MCR (NIH; Bethesda, MD, USA)를 사용하였고, *E.coli* 는 Luria-Bertani (LB) broth에서 37 ℃에서 incubation하 였다. 그 조성은 다음과 같다: 1 % Bacto-tryptone, 1 % NaCl, 0.5 % yeast extract.

LB agar plate에 자란 *E. coli* DH5α colony를 LB medium 3 ml에 접종 한 후 overnight하여 incubation하였다. 이 자란 균의 1 ml을 250 ml의 LB medium에 다시 접종한 후, 18 ℃에서 O.D.600 이 0.6이 될 때까지 shaking incubator에서 배양하였다. 배양액을 멸균된 50 ml conical tube에 나누어 넣고 ice에 10분간 놓아둔 후, 3,000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심분리하였 다. 상층액은 버리고, 미리 차게 해 둔 80 ml의 transformation buffe (TB) 로 부드럽게 부유시킨 후 ice에 10분간 놓아두었다. TB의 성분은 10 mM PIPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl이며, KOH로 pH 6.7로 맞추었다. 그리고 MnCl<sub>2</sub>를 첨가하여 0.45 µm filter로 filteration 하였다. 다 시 3,000 rpm, 4 ℃에서 10분간 원심분리한 후 20 ml의 TB에 부유시키고 DMSO를 7 % (V/V)만큼 가하였다. 그리고 ice에 10분간 놓아두고, 미리 차 게 해 둔 micro tube에 300 µl씩 분주하였다. 그리고 사용할 때까지 -70 ℃ deep freezer에 보관하였다.

재료 및 방법 2.6에서 ligation한 mixture를 200 µl의 competent *E. coli* DH5α MCR과 섞어 ice에서 30분 동안 두었다. 그리고 42 ℃에서 30초 간 heat-shocked 시키고, ice에 2분 동안 두었다가 이 mixture를 800 ul의 LB broth를 넣고 shaking incubator에 37 ℃에서 1시간 동안 incubation시켰다. 도 말하기 위해서 14,000 rpm에서 15초간 원심분리하였다. 도말하는 균 농도를 위해서 상층액을 약 600 µl 정도 버린 후, 나머지 중에서 200 µl로 침전물을 부유시키고. 이를 100 ua/ml의 ampicillin, X-gal 및 Isopropyl-B -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)가 포함된 LB agar plate에 도말하고, 접종 된 plate를 37 ℃에서 overnight동안 incubation하여 형질전환 시킨 colony를 얻었다. 이 colony는 LB broth에 최종 종도가 100 µg/ml이 되도록 ampicillin을 첨가하여 ampicillin LB (ALB)에 접종하여 37 ℃에서 16시간 동안 shaking incubation하였다.

#### 2.8. Preparation of plasmid DNA

Plasmid DNA는 *E.coli*로부터 AccuPrep<sup>®</sup> Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 추출하였다. 5 ~ 7 ml의 bacterial culture를 14,000 rpm에서 1분간 centrifuge하여 균을 모았다. 모은 cell에 250 µl의 Cell Resuspension Solution 및 250 µl의 Cell Lysis Solution을 넣고 약 1 ~ 5분간 incubation한 뒤, 350 µl의 Neutralization Solution을 넣고 즉시 14,000 rpm에 서 10분간 centrifugation하였다. 상층액을 silica column tube에 넣고 다시 14,000 rpm에서 1분간 centrifugation하였다. Silica column에 부착되어 있는 plasmid DNA를 용출하기 위해서 washing buffer로 washing 한 뒤, 100 µl의 Elution Buffer를 사용하였다.

#### 2.9. Sequencing analysis

Plasmid DNA는 pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector 내에 있는 T7 promoter를 사용하여 BioDye Terminator Cyclic Sequencing 반응으로 PCR한 후 Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzers를 이용하여 염기서열을 분석했다.

#### 2.10. Homology search

DNAsis software (Hitachi software)를 사용하였으며, NCBI BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 다른 sequence와의 similarity 또는 homology search를 하였고, BioEdit software. (Tom Hall, North Carolina State University, Department of Microbiology)를 사용하여 Sequence를 align시켜보았다.

#### 2.11. Tissue type expression

SF-II가 불가사리 어느 조직에서 expression 되는가를 알아보기 위해서 불 가사리에 존재하는 5가지 조직 (Stomach, Liver, Gonad, DRM, Tube foot)을 사용하여 VERSAGENE total RNA purification kit (Gentra systems, USA)로 각각 RNA를 추출하였다. 이때 RNA는 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio가 1.6 ~ 1.80 되게 정량 하여 동일한 양을 RT하였다. RT를 하기위한 primer로 dT-20mer (Thymine만 20개 연결된 것)와 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Seoul, Korea) 를 사용하였다. 사용된 SF-II Forward primer는 전체 577bp중 139bp(ATG) 부터 162bp까지이고, SF-II Reverse primer는 517bp부터 540bp까지로 다 음과 같다 (Fig. 14):

SF-II Forward primer;

5'-ATGAAGTCGATCACGCTGACTCTG-3' (24mer)

SF-II Reverse primer;

5'-CTTCCTCACGTGCCATAACATTCA-3' (24mer) control로서는 β-actin을 사용하였다.

β-actin Forward primer:

5'-CCCAAAGCCAACAGRGARAAGATGAC-3' (26mer)  $\beta$ -actin Reverse primer:

5'-GACATCCGTAAGGAYCTGTAYGCCAAC-3' (27mer)

β-actin의 tissue type expression PCR을 하기 위해서 1 μ의 first-strand cDNA, 5 μ의 10 × G-Taq reaction buffer, 3 μ의 2.5 mM dNTPs, 2 μ의 10 pM β-actin forward와 2 μ의 10pM β-actin reverse primer 및 0.5 μ의 G-Taq DNA polymerase (2.5 units/μl, Labopass, Seoul, Korea)를 사용하였고, 최종 volume이 50 μ가 되도록 D.W.를 넣었 다. PCR 조건은 94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서 30 초 동안 denaturation 반응, 54 ℃에서 1분 동안 annealing 반응, 72 ℃에서 1분 동안 extention 반응을 40 cycle하였고, 끝으로 최종 extention을 위해서 72 ℃에서 7분 동안 반응하였다.

SF-II의 tissue type expression PCR을 하기 위해서 1 µI의 first-strand cDNA, 5 µI의 10 × LA Taq reaction buffer, 8 µI의 2.5 mM dNTPs, 5 µI 의 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µI의 10 pM SF-II forward, 2 µI의 10 pM SF-II reverse primer 및 0.5 µI의 LA Taq DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan)을 사용하였고, 최종 volume이 50 µI가 되도록 D.W.를 넣었다. PCR 조건은 94 ℃에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 ℃에서 30초 동안 denaturation 반응, 60 ℃에서 1분 동안 annealing 반응, 72 ℃에서 1분 동 안 extention 반응을 40 cycle하였고, 끝으로 최종 extention을 위해서 72 ℃에서 7분 동안 반응하였다.

각 조직별로 발현된 SF-II의 상대적인 양은 먼저 Ethidium bromide (EtBr)로 염색된 β-actin의 강도와 비교하였고, 통계적 처리는 student's t-test로 하였고, softerware 및 densitometric signals는 Bio1D image analysis system software (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA)를 사용하였다 (Fig. 21).

	Sequence		Tm
3 RACE Primer			(°C)
GeneRacer™	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'		76.0
3' Primer			76.0
GeneRacer™	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'		72.0
3' Nested Primer			12.0
SF-II-1 primer			110
(5 ~ 11)	J ANGATCONTATATGGATA J	15	44.5
SF-II-2 primer	5'-CCNTAYATGGAYATHATG-3'		41 0
(7 ~ 12)			41.0
SF-II-3 primer	5'-YATGGAYATHATGWSNYT-3'		110
(8 ~ 14)			44.0

E' DACE Drimor	Sequence		Tm
5 RACE PHILIEI			(°C)
GeneRacer™	5'-0000100000000000000000000000000000000	00	74.0
5' Primer	5 -CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3		74.0
GeneRacer™	5'-6646467646466467644664674-3'	26	78.0
5' Nested Primer	5 -GGACACIGACAIGGACIGAAGGAGIA-3		70.0
SF-II 5'-1 primer	5'-44100010101001011400-3'	20	58 5
(5 ~ 11)	5 AATGEETETETETETETETETETETET	20	50.5
SF-II 5'-2 primer	5'-CACTACTICCATTCTCTAAC-3'	20	18.0
(7 ~ 12)	5 -CAGTAGTIGGATICICIAAG-3		40.9

Fig. 13. Primers for 3' RACE and 5' RACE including GeneRacer™ primers.

[		-	Ŧ
Drimor	Sequence		Im
Primer			(°C)
β-actin		26	65.0
Forward primer	5 -CCCAAAGCCAACAGRGARAAGATGAC-5		05.0
β−actin	5'-640410061446642016142600440-3'	27	50 0
Reverse primer	5 -GACATCCGTAAGGATCTGTATGCCAAC-3		55.0
SF-II Forward		24	67 G
primer	5 -ATGAAGTEGATEAEGETGAETETG-5	24	07.0
SF-II Reverse		04	677
primer	5 -CIICCICACGIGCCAIAACAIICA-3		07.7

Fig. 14. Primers for tissue type expression.
A mRNA m/G-p-p-p	3° polyA tal AAAAAAA
Truncated mRNA POL	AAAAAA
Non-mRNA PO4	
Truncated mRNA	3' polyA tail AAAAAAAA
Non-mRNA	
С. 5 01 01 04	AAAAAAA 3 poivA tail
RNA Ligase	
	3' polyA tail
First-strand cDNA	
Forward GSP pi EFor	rimer ward GSP nested primer
	TTTTTTT-(NNNNNNN)
Hinst-strand CDNA	GeneRacer" 3' Nested Primer GeneRacer" 3' Primer
GeneRacer* 5' Primer GeneRacer* 5' Nested Primer	
J	TTTTTTT-(N)36
First-strand cDNA	I everse GSP primer B exited primer

Fig. 15. Several steps of making GeneRacer<sup>™</sup> RNA oligo ligated cDNA full sequence using GeneRacer<sup>™</sup> Kit.



Fig. 16. pGEM-T Easy vector map (Promega, Madison, WI, USA).

## Ⅲ. 결과 및 토론

### 1. 3' rapid amplification cDNA ends (3' RACE)

SF-II의 cDNA cloning을 하기 위해서 알고 있는 아미노산 서열로부터 degenerate primer를 작성하였다 (Fig. 13). SF-II-1는 SF-II의 5 ~ 11까지 의 amino acid residue, SF-II-2 primer는 7 ~ 12까지의 amino acid residue, SF-II-3 primer는 8 ~ 14까지의 amino acid residue로부터 작성하 였다. Reverse primer로 사용한 GeneRacer<sup>™</sup> 3' Primer는 GeneRacer<sup>™</sup> Oligo dT Primer의 첫 번째부터 25번째까지이고, GeneRacer<sup>™</sup> 3' Nested Primer는 GeneRacer<sup>™</sup>Oligo dT Primer의 14번째부터 36번째까지이며 사용 된 primer들은 재료 및 방법의 2.3.과 Fig. 13에 자세히 나타내었다.

재료 및 방법 2.2.에서 설명한 것처럼 starfish mRNA를 RT한 template 로부터 SF-II의 degenerate primer (SF-II-1 ~ 3)로 2번의 nested PCR을 하였다. PCR시, 1차 PCR은 annealing temperature를 42 ℃와 45℃의 두 온도로 하였고, cycle도 15 및 20 cycles로 나누어서 PCR하였다. 이는 낮은 온도인 42 ℃에서 45 ℃로 높여주어 PCR 함으로서 15 cycles에는 42 ℃에 서 random하게 증폭시키기 위함이고, 20 cycles에는 42 ℃에서 45 ℃로 온 도를 높여주어 specificity를 높이면서 많은 밴드를 얻고자 하였다. 2차 및 3 차 PCR은 온도를 50 ℃로 하였고, 1차 PCR의 45 ℃보다 높여서 band의 specificity를 높였다. Tm은 double strand DNA가 single strand DNA로 되 는 온도변화에 있어서 그 중간값을 말하는데 보통 annealing temperature는 Tm에 5 ℃를 뺀 값으로 정한다. Tm을 구하는 간단한 공식도 있지만, 주변 의 salt에 영향을 받을 수 있으므로 보정한 공식을 이용하였고, 다음과 같다.

Tm = 81.5 + 16.6 \* (log10([Na+] + [K+])) + 0.41 \* (%GC) - 675/N ※ Na+: 나트륨이온의 농도, K+: 칼륨이온의 농도, N: 염기서열의 수 그러나 degenerate primer의 경우 Tm값이 정확하다고 보기 힘들기 때문 에 온도 설정에는 관여하지 않았다.

PCR후, band의 size를 알아보기 위해서 0.8 % agarose gel를 사용하여 전기영동을 하였다. Size marker는 Bioneer사의 25/100bp DNA ladder를 사 용하였다. 전기영동 결과, 1차 PCR band는 smear하게 나왔고, 2차 및 3차 PCR band는 약 400bp정도로 추정하였다 (Fig. 17A). 이 band의 nucleotide sequence를 알아보기 위해 sequencing한 결과, 277bp임이 밝 혀졌다 (Fig. 17B).

277bp중에서 3' untranslational region (UTR)은 199bp이었고, SF-II의 20번째 잔기는 Cys이었다 (Fig. 12A). 이 결과를 토대로 N-말단의 정확한 아미노산 서열을 알아보기 위해 gene specific primer를 작성하여, 5' RACE 를 하였다 (Fig. 17). Gene specific primer를 작성 시, 3'primer로 쓰인 부 분은 증폭된 서열이 아닌, primer가 붙은 부분으로 정확하지 못한 서열이다. 그래서 이 부분을 제외하고, 나머지 서열에서 Tm값을 알아보고, 이외에도 이형호 교수님방의 OMIGA, Primier primer, AhnHyb라는 primer design 프 로그램을 이용하여 primer의 GC 조성, primer dimer여부, 2차구조 형성 여 부 및 hair-pin구조들을 알아보고, 이를 고려하여 primer를 작성하였다.

### 2. 5' rapid amplification cDNA ends (5' RACE)

N-말단의 정확한 아미노산 서열을 알아보기 위해 gene specific primer (GSP)를 작성하여, 5'RACE를 하였다 (Fig. 17). 5'RACE를 하기 위해서 3'RACE에서 나온 결과로부터 5'RACE reverse primer 로서 GSP를 작성하 였으며, 그 서열은 다음과 같다:

SF-II 5'-1 primer;

5'-AATGCCTCTCTCCTCTTACG-3' (20mer)

SF-II 5'-2 primer;

#### 5'-CAGTAGTTGGATTCTCTAAG-3' (20mer)

Forward primer로 사용된 GeneRacer™ 5' Primer와 GeneRacer™ 5' Nested Primer는 GeneRacer™ RNA Oligo Sequence의 각각 첫 번째부터 23번째와 15번째부터 40번째까지이며 사용된 primer들은 재료 및 방법의 2.5.과 Fig. 13.에 자세히 나타내었다.

재료 및 방법 2.4에서 설명한 것처럼 GeneRacer™ RNA Oligo가 연결된 starfish cDNA full length는 GeneRacer™Oligo dT Primer 와 SF-II 5'-1 primer를 사용하여 두 종류의 template를 사용하였다. 이 두 종류의 template로부터 SF-II의 GSP (SF-II 5'-1, 2 primer)로 nested PCR을 하였 다. PCR 조건은 재료 및 방법의 2.4.에 나타내었다. PCR을 할 때, SF-II 5'-1 primer의 Tm값은 58.5 ℃이고, SF-II 5'-2 primer의 Tm값은 48.9 ℃ 였다. SF-II 5'-1 primer의 Tm값 보다 nested PCR을 하는 SF-II 5'-2 primer의 Tm이 낮았기 때문에 1차 PCR시 annealing temperature를 Tm=58.5 ℃에 비해 많이 낮추어서 45 ℃와 48 ℃로 cycle을 나누어서 PCR 하였다. 2차 PCR시에는 annealing temperature를 47 ℃로 설정하였고, 1차 PCR의 경우에는 extension time을 1분으로 하였지만, 전기영동 결과 500bp 를 넘지 않았기 때문에, 2차 PCR의 경우에는 50초로 정하였다. PCR 후 size 확인을 위해 0.8 % agarose gel 전기영동을 하였다 (Fig. 18A). Size marker는 Bioneer사의 100bp plus DNA ladder를 사용하였다. 그 결과, 두 template 모두 1차 및 2차에서 같은 band의 양상을 보였다. 1차 PCR band 는 smear하게 나왔고, 2차 PCR band는 약 400bp정도로 추정되었다 (Fig. 18A). 이 band의 nucleotide sequence를 알아보기 위해 sequencing한 결

과, 336bp임이 밝혀졌다 (Fig. 18B). 336bp중에서 5'UTR은 138bp이었고, SF-II의 4번째 잔기는 Cys이었다 (Fig. 12A). 이 결과를 3'RACE와 비교하 여 완전한 SF-II의 cDNA full sequence를 밝혀내었다 (Fig. 19).

#### 3. Full sequence of SF-II from starfish (Asterina pectinifera)

Fig. 19은 SF-II의 cDNA 결과를 종합하여 나타낸 것이다. 이 full sequence는 SF-II의 cDNA cloning결과, Untranslational Region (UTR)중에 서 5' UTR은 138bp로 구성되어 있고, 3' UTR은 199bp을 포함하고 있다. 또한 Open Reading Frame (ORF)는 240bp로 80개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 그 중 20개의 아미노산이 signal peptide에 해당되는 부위였다. 이 gene는 3군데에 KR 또는 RR의 부위를 포함하는데, signal peptide를 제외 하면 21번째부터 32번째 (S-I), 35번째부터 46번째 (S-II), 49번째부터 68번 째 (S-III) 및 69번째부터 종결코돈까지 (S-IV) 4부위로 나뉜다 (Fig. 20). 그 중에서 SF-II는 S-III에 해당되며 SF-II의 4번째와 20번째에 존재하는 아미노 산은 Cys으로 판명되었다. 따라서 정제된 peptide의 완전한 서열은

Gly Ala Ile Cys Lys Asp Pro Tyr Met Asp Ile Met Ser Leu Arg Glu Ser Asn Tyr Cys

이다 (Fig. 19). 또한 SF-II의 분자량을 측정해 본 결과, 2306.95 Da이었다. 따라서 본 연구실의 Kim (2004)의 결과, peptide sequencing에서 나오지 않 은 4번째 및 20번째 아미노산 두 개가 cysteine으로 판명되었으며, 이들 잔 기간의 disulfide bond를 형성한다는 것을 알 수 있었다.

그리고 signal peptide를 알아보기 위해서 다음과 같은 program을 사용하여 분석하였으며 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP), 이 program은 진 핵에서 유래된 neural networks (NN)와 hiddenMarkor models (HMN)을 토

- 27 -

대로 한 것이다.

Table 4는 지금까지 알려진 eukaryotic secretory preproteins 중 10종류 에 해당하는 N-terminal sequences를 나타낸다. Table 4에 나타낸 것처럼 여러 단백질들은 signal peptide를 소유하고 있고, 특히 이런 단백질은 분비 단백질이며, 이는 단백질을 합성하는 ribosome에 따라 다르다. Cytosol 내에 free한 형태로 존재하는 ribosome들은 soluble 및 mitochondrial protein들 을 만들고, Endoplasmic Reticulum (ER)에 ribosome이 붙은 형태인 Rough Endoplasmic Reticulum (RER)에서는 trans-membrane proteins, lysosomal proteins 및 secretory proteins을 만든다.

일반적으로 이러한 signal peptide들은 몇 가지 특징을 가지고 있다. signal peptide는 signal peptidase cleavage site로부터 앞으로 약 4 ~ 10 잔기에 Pro이나 Gly이 있고, N말단 부근에 basic amino acid (Lys 또는 Arg)을 소유하고 있다. 중간영역에는 hydrophobic region이 있다. 또한 signal peptide는 signal peptidase cleavage site가 Ala으로 끝나는 경우가 많다 (Watson, 1984, Table 4). 단백질이 합성되어 막 속으로 움직일 때, 먼 저 signal peptide의 N말단에 있는 basic amino acid는 biomembrane에 존 재하는 acidic phospholipid와 정전기적인 상호작용을 하고, 이것이 방아쇠 역할을 하여 hydrophobic region이 phospholipid의 acyl chain 부분과 상호 작용하여 단백질이 막 속으로 삽입되며, 이때 signal peptide는 signal peptidase에 의해 잘리게 된다. Table 4에 나타낸 preprotein들처럼 SF-II의 signal peptide의 경우도 N말단의 두 번째 위치에 basic amino acid인 Lys 을 소유하고 있으며, 중간영역 (6번째부터 18번째 amino acid까지)에는 hydrophobic region을 포함하고 있다. 또한 signal peptidase cleavage site 가 Ala인 점을 미루어 불가사리도 포유동물처럼 유사한 단백질의 합성경로를 지니는 것 같다 (Fig. 19).

또한 정제된 SF-III의 앞부분과 뒷부분이 Lys - Arg 및 Arg - Arg의 dibasic amino acids으로 이루어져 있는 것으로 보아, dibasic amino acid 를 인식하는 dibasic peptidase에 의해 절단되어 SF-II가 생리활성을 나타내 는 것 같다 (Fig. 20).

이러한 현상은 proopiomelanocortin, pre-procholecystokinin, 및 proinsulin과 같이 prooxytocin endocrine aland에서 분비되는 prohormone들처럼 dibasic amino acid를 인식하는 효소의 processing에 의 해 효율적으로 여러 hormone을 생산하여 다양한 생리활성을 나타내는 것과 유사하다 (Khachaturian et al., 1985). 따라서 고등동물과 마찬가지로 극피 동물인 불가사리의 경우에 있어서도 효율적인 단백질 및 펩타이드를 생산하 기 위해서 효소들에 의해 processing된다는 것을 나타내고 있다. 그리고 미 지의 영역인 S-I, S-II, S-IV 중에서 S-I과 S-II는 합성하였다. 이들을 사용 하여 SF-II와 마찬가지로 불가사리의 dorsal retractor muscle에 대해 이완반 응을 측정하였지만 S-I과 S-II는 DRM에 대해 이완반응을 나타내지 않았다.

#### 4. SF-II tissue type expression

SF-II가 불가사리의 어떤 조직에서 expression 되는가를 알아보기 위해서 불가사리 5가지 조직 (stomach, liver, gonad, DRM, tube foot)을 사용하였으 며, VERSAGENE total RNA purification kit (Gentra systems, USA)로 각각 RNA를 추출하였다. 이때 RNA는 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio가 1.6 ~ 1.8이 되게 정량하여 동일한 양을 Reverse Transcription (RT)하였다. RT하기 위해서 primer로 dT-20mer와 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용 하였다.

사용한 SF-II Forward primer는 전체 577bp중 139bp (ATG)부터 162bp 까지이고, SF-II Reverse primer는 517bp부터 540bp까지로 다음과 같다: SF-II Forward primer:

5'-ATGAAGTCGATCACGCTGACTCTG-3' (24mer)

SF-II Reverse primer:

5'-CTTCCTCACGTGCCATAACATTCA-3' (24mer)

control로는 β-actin의 forward 와 reverse primer를 사용하였다. 사용한 primer들과 β-actin 및 SF-II의 PCR 과정은 재료 및 방법 2.11.과 Fig. 14 에 상세히 나타내었다.

PCR을 하기 위한 조건으로 β-actin의 경우는 일반적인 G-Taq DNA polymerase (Labopass, Seoul, Korea)를 사용하였다. Annealing temperature를 설정할 때, β-actin의 forward primer의 Tm값은 65 ℃였고, reverse primer의 Tm값은 59 ℃였다. 이들 중 Tm값이 더 낮은 β-actin reverse primer의 Tm= 59 ℃에 5 ℃를 뺀 54 ℃로 설정하였다 (Fig. 14).

SF-II의 PCR의 경우는 G-Taq DNA polymerase (Labopass, Seoul, Korea)을 사용하였지만 band가 나타나지 않아서, 다른 종류의 LA Taq DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan)을 사용하였다. Annealing temperature 를 설정할 때, SF-II의 forward 와 reverse primer 모두 Tm값이 약 68 ℃였 다. 이 경우는 band를 잡기가 계속 어려웠으므로 annealing temperature인 68 ℃에서 5 ℃를 뺀 값보다 더 낮게 하여 60 ℃로 설정하였다 (Fig. 14). 각 조직별로 SF-II의 상대적인 발현양은 먼저 Ethidium bromide (EtBr)로 염 색된 β-actin의 강도와 비교하였고, 통계적 처리는 student's t-test로서 했 다 (Fig. 21).

발현 control로서는 β-actin을 사용하였다. PCR이후 발현량을 알아보기 위해서 1.2 % agarose gel에 전기영동한 결과, 불가사리의 gonad와 DRM에 서 강한 발현을 보였지만 다른 조직에서는 약한 발현을 보였다 (Fig. 21). DRM은 불가사리 몸의 작은 뼈 조각 같은 골편들에 붙어있는 근육이다. 그리고 이 골편 바로 아래는 캐치결합조직이라는 단단하기가 변하는 결합조 직이 있다. 이 결합조직의 굳기가 변해서 불가사리의 경우 몸이 딱딱해지는 것이다. 결합 조직 내에는 칼슘이온을 포함하는 세포들이 있다. 단단해질 때 에는 칼슘이 밖으로 방출되어 글루코오스아미노글리칸같은 세포 외 고분자물 질 사이를 연결하여 단단해질 것이라 예상 된다 (Motokawa T., 1993). 생장 시에는 캐치결합조직을 느슨하게 하여 골편끼리 겹치치 않게 한다거나, 필요 한 경우나 포식자에 잡힐 경우 몸의 일부가 잘리면, 재생이 일어나기도 한 다. 이를 미루어 볼 때 DRM은 캐치결합조직과 연결 되어 근육을 움직여 몸 을 펴거나 움츠려서 고정이 되는 자세를 취할 수 있는 것 같다.

Gonad는 sexual production에 관여한다. 불가사리는 본래 자웅이체이나 자웅동체인 것도 있다. 5개의 gonad를 가지고 있으며, 난생을 하는데 알을 방사상으로 분할한다고 알려져 있다.

Tube-foot은 각 팔의 2 줄로 있으며, 이는 수압에 의해 움직이는 기관으 로 첫 번째로 이동과 운동에 관여한다. 하나의 팔을 앞 쪽으로 뻗쳐 tube-foot을 사용하여 흡반을 바닥에 붙이고 흡반의 중심부에 진공을 생기게 하여 분비한 점액과 함께 바닥 면에 흡착시켜 tube-foot을 후방으로 흔들며 전진한다. 두 번째로 water vascular system에 관여한다. Tube-foot의 끝부 분은 logitudinal muscle로 된 podium이란 부위와 병낭 (ampulla)이 있다. podium이 수축을 하면 ampullar가 느슨해져서 fluid를 밖으로 보내고, 반대 로 podium이 이완을 하면 ampullar가 수축하여 fluid가 안으로 들어오게 된 다.

Stomach 및 liver은 digestive system이다. 불가사리는 육식성으로 이매 패류등의 연체동물과 어류를 먹을 때, 팔로 먹이를 둘러싸고 입 쪽을 눌러 stomach를 밖으로 내어 싸서 소화시키면서 흡수하는 체외소화를 한다고 알 려져 있다 (Richard C. B. and Gary J. B., 2003).

SF-II의 조직 발현 실험결과, SF-II가 특히 DRM에 강하게 발현되는 것 으로 미루어 보아 생체 내에서 prohormone으로 합성된 후 효소에 의해 processing되어진 SF-II가 캐치결합조직과 연결되어 근육을 움직여 몸을 펴 거나 움츠려서 고정이 되는 자세를 취하는 생리활성을 나타내는 것 같다.

그리고 DRM와 gonad에도 강하게 발현되었는데 이러한 결과는 SF-II가 DRM에 대해 강한 이완활성을 나타내는 것과 일치하며 (Kim, 2004), 불가사 리가 생체 내의 gonad에서 알을 방사상으로 분할하는데 관여한다고 생각되 어진다. 또한 SF-II는 DRM 및 gonad보다는 약하지만 tube-foot에서도 발현 되었다. 따라서 SF-II는 tube foot에 대해서도 이동 및 운동 그리고 water vascular system에 podium의 이완에 관여 한다고 생각되어진다. 결론적으로 SF-II가 DRM, gonad, tube foot에 대해서 발현 되는 것으로 미루어 보아 근육 수축 및 이완작용에 활성을 나타내어 자기자신의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다고 생각되어 진다. 한편 stomach 및 liver에 대해서도 약한 발현 을 보였는데 이는 SF-II가 명확하지는 않지만, digestive system에도 관여한 다고 생각되어 진다.



Β.

ACA AGA TGG CGA CCA TAG CAA CCG GGT GTG CGC CTG CGC GGG ACA CAT TTT TTC TAC ACT ACC ATA ATA TAG TGT TAT GAG ACA GTG CTA CAT TCG GGT TCG TCA CGT TGA ATG TTA TGG CAC GTG AGG AAG TAT CTT TTT TTT TCA TTC TTG AAA AAA AAA AAA AAA A 3'

Fig. 17. 3' RACE PCR products from *Asterina pectinifera* cDNA (A) and sequencing result (B): (A) Lane 1: Bioneer 25/100bp DNA ladder, Lane 2: SF-II-1 primer-related PCR products from *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 3: SF-II-2 primer-related PCR products from *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 4: SF-II-3 primer-related PCR products from *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 4: SF-II-3 primer-related PCR products from *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 3: VTR. SF-II-5 primers were underlined.



Β.

5' ACA GAT TAT TAC TTG GGC CAA AAA ACC AGA CGA GAC GTA CAC GAA GTG AGC GCC AAA AAA ACC TTT GCA AGA GAA GCC AAC AGT CGC CAA TTT TTC GTT TGG GTT AAG ATC GGC AAG ACC CCG CCC CCG CTC AAC AAA TTC AAG ATG AAG TCG AAC ACG CTG ACT CTG Met Lys Ser IIe Thr Leu Thr Leu
TTC TCT GTC CTG ATG ATT GTG TGC CTA GTG ACG GCC ATC GAC ATA AAT AGG GAA Phe Ser Val Leu Met IIe Val Cys Leu Val Thr Ala IIe Asp IIe Asn Arg Glu
CAA CGC GAA ATG GAT TTC AAG AGG CTC GCC GAC ATT ATG GAA TCG TTC CGT GAG GIn Arg Glu Met Asp Phe Lys Arg Leu Ala Asp IIe Met Glu Ser Phe Arg Glu
TTG GAC AAG AGG GGA GCG ATC TGC AAG GAC CCG TAC ATG GAC ATT ATG AGC CTT Leu Asp Lys Arg Gly Ala IIe Cys Lys Asp Pro Tyr Met Asp IIe Met Ser Leu
AGA GAA TCC AAC
AGA GAA TCC AAC
SF II
Arg Glu Ser Asn 3'

Fig. 18. 5' RACE PCR products from *Asterina pectinifera* cDNA (A) and sequencing result (B): (A) Lane 1: Bioneer 100bp plus DNA ladder, Lane 2: SF-II 5' primer-related PCR products from full length *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 3: SF-II 5'-nested primer-related PCR products from full length *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 3: SF-II 5'-nested primer-related PCR products from full length *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 4: SF-II 5' primer-related PCR products from gene specific *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 5: SF-II 5'-nested primer-related primer-related PCR products from gene specific *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 5: SF-II 5'-nested primer-related primer-related PCR products from gene specific *Asterina pectinifera* cDNA, Lane 5: SF-II 5'-nested primer-related PCR products from gene specific *Asterina pectinifera* cDNA.(B) The sequencing result was 336bp including 138bp as a 5' UTR. SF-II was indicated by box.

5' ACA GAT TAT TAC TTG GGC CAA AAA AGC AGA CGA GAC GTA CAC GAA GTG AGC GOC AAA ACC TTT GCA AGA GAA GCC AAC AGT CGC CAA TTT TTC GTT TGG GTT AAG ATC GEC AAG GCC GCC CCG CTC AAC AAA TTC AAG ATG AAG TCG ATC ACG CTG ACT CTG <u>Met Lys Ser IIe Thr Leu Thr Leu</u> TTC TCT GTC CTG ATG ATT GTG TGC CTA GTG ACG GCC ATC GAC ATA AAT AGG GAA <u>Phe Ser Val Leu Met lle Val Cys Leu Val Thr Ala</u> lle Asp lle Asn Arg Glu 10 20 CAA CGC GAA ATG GAT TTC AAG AGG CTC GCC GAC ATT ATG GAA TOG TTC CGT GAG Gin Arg Giu Met Asp Phe Lys Arg Leu Ala Asp Ile Met Giu Ser Phe Arg Giu 30 1 1 40 TTG GAC AAG AGG GGA GOG ATC TGC AAG GAC COG TAC ATG GAC ATT ATG AGC CTT Leu Asp Lys Arg Gly Ala IIe Cys Lys Asp Pro Tyr Met Asp IIe Met Ser Leu 50 60 AGA GAA TOC AAC TAC TGC CGC CGT AAG AGG AGA GAG GCA TTC COC CAA GAG TAA Arg Glu Ser Asn Tyr Cys Arg Arg Lys Arg Glu Ala Phe Pro Gin Glu \*\*\* 70 70 AAC AGC GAG CGA TCT GGG AAG GAG GTG AAC ACA AGA TGG CGA CCA TAG CAA COG GGT GTG CGC CTG CGC GGG ACA CAT TTT TTC TAC ACT ACC ATA ATA TAG TGT TAT GAG ACA GTG CTA CAT TOG GGT TOG TCA CGT TGA ATG TTA TGG CAC GTG AGG AAG TAT CIT TIT TIT TCA TIC TIG AAA AAA AAA AAA AAA A 3'

Fig. 19. Nucleotide sequence of SF-II cDNA with the amino acid sequence for the prepropeptide: signal peptide underlined and SF-II boxed. Arrows indicate to the cleavage site by dibasic peptidase.



Fig. 20. Diagram of SF-II cDNA full sequence: KR and RR indicate the cleavage site by dibasic peptidase.



Fig. 21. SF-II tissue type expression: Lane 1, stomach; lane 2, liver; lane 3, gonad; lane 4, dorsal retractor muscle (DRM); lane 5, tube foot. Expression of a gene encoding the  $\beta$ -actin was used as a control.

Table 4. The N-terminal sequences of some eukaryotic secretory preproteins.

SIGNAL PEPTIDASE CLEAVAGE SITE

	$\downarrow$
Bovine growth hormone	M M A A G P <u>R</u> T S L L A F A L L C L P W T Q V V G A F P
Bovine proalbumen	MKWVTFTSLLLLFSSAYSRGV
Human proinsulin	MALW M RLLPLLALLALW G P D P A A A FVN
Human $\gamma$ -interferon	MKYTSYTLAFQLCIYLGSLGCYC
Human α-fibrinogen	MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADS
Human Ig heavy chain	MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQ
Rat amylase	M <u>K</u> FVLLLSLIIG FC W AQYD
Murine a-fetoprotein	M <u>K</u> W IT P A S L I L L L H F A A S K A L H
Chicken lysozyme	M <u>R</u> SLLILVLCFLPLAALGKVF
Zea maize rein protein 22.1	MATKILALLALLVSATNAFI

The hydrophobic cores (gray) of most signal peptides are preceded by basic amino acid underlined. \* Watson, M. E. E. *Nucleic Acids Res.* 12, 5147-5156 (1984)

### 국 문 초 록

별불가사리 (*Asterina pectinifera*)의 whole body 추출물로부터 불가사리 DRM (dorsal retractor muscle)에 이완활성을 지닌 새로운 신경성 펩타이드, SF-II가 정제되 었다. 아미노산 sequencing 결과 SF-II의 1차 구조는 다음과 같다:

G-A-I-X-K-D-P-Y-M-D-I-M-S-L-R-E-S-N-Y-X

그러나 SF-II의 경우 4번째와 20번째의 아미노산 잔기가 아미노산 서열분석에 의해 결정되지 않았기 때문에 cDNA 연구를 통해 미지의 잔기를 분석하고자 하였다.

SF-II cDNA 연구를 하기 위해서 분석결과 밝혀진 SF-II 일부 아미노산 서열을 이용하여 degenerate primer를 작성한 후, 3' RACE (Rapid amplification cDNA ends)와 5' RACE를 하였다. Cloning을 하기 위해서 pGEM Teasy vector 및 *E.coli* DH5α를 사용하였다. 또한 조직별 발현량을 알아보기 위해서 5가지 조직 (stomach, liver, gonad, DRM, tube foot)에서 각각 RNA를 추출하여 Revese transcription 하였 다.

3' RACE와 5' RACE의 결과를 종합하면 5' UTR (untranslational region)은 138bp, 3' UTR은 199bp이였다. Open Reading Frame (ORF)는 240bp로 80개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 그 중 20개의 아미노산이 Signal peptide에 해당되는 부위였다. 이 유전자는 3군데에 KR 또는 RR의 부위를 포함하고 있다. Signal peptide를 제외하면 21번째부터 32번째, 35번째부터 46번째, 49번째부터 68번째 및 69번째부터 종결코돈까지 4부위로 나뉜다. 그중에서 SF-II는 49번째부터 68번째 아 미노산에 해당되며 SF-II의 4번째와 20번째에 존재하는 아미노산은 Cys으로 판명되 었다. 따라서 SF-II의 완전한 1차구조는 다음과 같다:

G-A-I-C-K-D-P-Y-M-D-I-M-S-L-R-E-S-N-Y-C

또한 SF-II의 조직별 발현부위에 대한 조사 결과, stomach, liver, tube foot에서 는 약하게 발현되었고, gonad와 DRM에서 강한 발현을 보였다.

# Ⅳ. 참 고 문 헌

- Bacq, Z. M. Recherches su la physiologie et la pharmacologie du systeme nerveux autonome. X VII. Les esters de la choline dans les extraits de tissue des invertebres. (1935) *Arch. Int. Physiol.*, **42**, 24-42.
- Beauvallet, M. Action de l'acetylcholine sur le tube digestif de quelques invertebres. (1938) *Compt. Rend.*, **127**, 213-214.
- Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C. and Doree, M. MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. (1995) *EMBO. J.*, **14**(20), 5027-36.
- 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.
- Elphick, M. R. and Melarange, R. Neural control of muscle relaxation in echinoderms. (2001) *J. Exp. Biol.*, **204**, 875-885.
- 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*. (1991) *J. Exp. Biol.*, **198**, 2519–2525.
- 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.

- Gollub, M. and Shaw, L. Isolation and characterization of cytidine-5'-monophosphate-N-acetylneuraminate hydroxylase from the starfish Asterias rubens. (2003) Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 134(1), 89-101.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. (1990) *Gene*, **96**, 23-28.
- 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), 261–264.
- Kakiuchi, M., Okino, N., Sueyoshi, N., Ichinose, S., Omori, A., Yamaguchi, Kawabata. S.. Κ. and Ito. Μ. Purification. characterization. cDNA and cloning of alpha-N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, Asterina pectinifera. (2002) Glycobiology, 12(2), 85-94.
- Khachaturian, H., Lewis, M. E., Haber, S. N., Houghten, R. A., Akil, H. and Watson, S. J. Prodynorphin peptide immunocytochemistry in rhesus monkey brain. (1985) *Peptides*, **6** Suppl 2, 155-66.
- Kim, E. J. Purification and characterization of novel neuropeptides from the starfish, *Asterina pectinifera.* (2004) Ph. D. Dissertation in Pukyong National University.
- Kishimura, H., Ojima, T., Hayashi, K. and Nishita, K. cDNA cloning and sequencing of phospholipase A2 from the pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. (2000) *Comp. Biochem. Physiol. B*

Biochem. Mol. Biol., 126(4), 579-86.

- Kishimura, H., Ojima, T., Hayashi, K. and Nishita, K. Bacterial expression and characterization of starfish phospholipase A(2). (2001) Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol., 128(3), 565-73.
- Kishimura, H., Ojima, T., Tanaka, H., Hayashi, K. and Nishita, K., Amino acid sequence of phospholipase A2 from the pyloric ceca of starfish *Asterina pectinifera*. (2000) *Fisheries Sci.* **66**, 104–109.
- Miyake, Y., Deshimaru, S. and Toraya, T. Revised sequence and expression of cyclin B cDNA from the starfish *Asterina pectinifera*. (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(5), 1119-26.

Motokawa, T. 코끼리의 시간 쥐의시간. (1993) 사계절, 204-229.

- Okabe, H., Noma, A. and Ohno, K. Partial purification and properties of phospholipase A2 from the starfish, *Asterina pectinifera*. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.*, **398**, 149–158.
- Okano-Uchida, T., Okumura, E., Iwashita, M., Yoshida, H., Tachibana, K. and Kishimoto, T. Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. (2003) *EMBO. J.*, 22(20), 5633-42.
- Okano-Uchida, T., Sekiai, T., Lee, K., Okumura, E., Tachibana, K. and Kishimoto, T. In vivo regulation of cyclin A/Cdc2 and cyclin B/Cdc2 through meiotic and early cleavage cycles in starfish. (1998) *Dev. Biol.*, **197**(1), 39-53.

Richard, C. B. and Gary, J. B. Invertebrates. (2003) *SINAUER*, 801-837. Runft, L. L., Carroll, D. J., Gillett, J., Giusti, A. F., O'Neill, F. J. and Foltz, K. R. Identification of a starfish egg PLC-gamma that regulates Ca2+ release at fertilization. (2004) *Dev. Biol.*, **269**(1), 220-36.

Watson, M. E. E. Compilation of published signal sequences. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 5145-5164.

# 감사의 글

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

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

실험실에 학부 2학년때부터 실험실에 들어와서 멋모르고 실수하고 많이 혼나고 울 고 했던 날이 지금도 눈앞에 선합니다. 교수님에 미국에 계시는 동안 유기화학은 정길 선배님이 가르쳐 주셔서 교수님으로 먼저 뵈었고. 실험실에 있는 동안은 항상 부족한 저에게 공부하라고 격려해 주신 점 너무 감사드립니다. 실험실에 들어와서 처음에 찬희 선배님은 훤칠하신 외모에 놀라며, 생리활성물질을 선배님께 배우면서 선배님께 열정 이란 단어를 배웠습니다. 어떤 일이건 열정적이신 모습과 환한 모습은 가슴에 새기겠습 니다. 항상 따뜻하시고, 마음을 먼저 써주신 은정이 언니, 힘들 때나 기쁠 때, 곁에 있어 주신 혜진이 언니, 인정을 가르쳐 주신 인혜 언니, 실험실에 후배로 들어와서 실험 배운 다고 수고하는 희영이 언니, 이제 사회생활을 시작하는 우리 이쁜 막내 혜미, 말썽꾸러 기 훈희에게 감사하다는 말을 전합니다. 우리 실험실 식구들이 계셨기에 지금의 제가 있게 되었던 것 같습니다. 지금은 조교선생님으로 학교에 계시고, 학부 때부터 졸업할 때까지 말도 안 듣는 후배 잘 챙겨 주시는 호성이 선배, 그리고 지금은 졸업은 하셨지만 학부때 많이 도와드리지도 못하고 신경만 쓰이게 해드려서 죄송하기만 한데 지금도 그 때가 그리웁게 하는 사랑하는 윤정이 언니께 정말 감사드립니다. 그리고 대학원 생활의 작고도 큰 위로가 되어준 함께 졸업하는 승제선배께도 감사의 말씀을 전합니다.

또, 대학원 같이 졸업하는 경주, 경숙이, 은민이와 학부 때부터 언니를 잘 이해해주 고 따라준 윤임이, 유미에게 감사의 말을 전합니다.

실험을 가르쳐주시고 discussion도 하신다고 수고하신 상중선배께 정말 감사드리고, 이형호 교수님 방의 상욱 선배와 다른 사람들께도 감사의 말을 전합니다.

정준기 교수님 방의 항상 질책을 아끼지 않으셨던 정수 선배님, 무덤덤한 상환선배, 언제나 열심히 하는 모습과 성실함을 가르쳐주셨고, 조언을 아끼지 않으셨던 성일선배. 같이 고생하고 거의 동거동락한 나영이, 멋진 효진언니, 친절한 혜경이, 특이한 매력이 있는 수진이에게 감사의 말을 전합니다.

학부 때부터 이상하리만큼 인연이 깊은 우리 친구들 상희, 희정이, 희진이와 거의 나의 복사판 희주, 지금은 캘리포니아에서 열심히 공무하고 있는 혜련이, 열심히 사는 지혜에게 감사의 말을 전합니다.

우리 00학번 동기 중에 항상 생각이 깊어서 감동을 주었고, 지금은 광주 과기원에서 열심히 공부하고 있는 지늬와 마음은 항상 같이 있는 창문이에게 깊은 감사를 전합니 다.

그리고 사랑하는 동생 상민이, 옥경이 언니, 큰 고모, 작은 고모, 고모부, 큰 삼촌, 작은 삼촌 숙모께도 감사의 말씀을 전합니다. 지금은 다른 세상에 계신 할아버지, 외할머니, 외할아버지와 손녀 예쁘게 키워주시고 항상 걱정 많으신 이 세상에서 제일 사랑하는 할머니께 정말 감사드립니다. 건강하셨으면 좋겠습니다.

끝으로 지금까지 맏딸 공부시킨다고 고생하시고 말도 안 듣는 딸 때문에 걱정이 많 으신 어머니, 아버지께 머리 숙여 깊이 감사를 드리며 이 논문을 바칩니다.