



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

별 불가사리 (*Asterina pectinifera*)
촉수로부터 항균성 펩타이드와
근수축 펩타이드의 정제 및 특성



2011년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 혜 림

공 학 석 사 학 위 논 문

별 불가사리 (*Asterina pectinifera*)
촉수로부터 항균성 펩타이드와
근수축 펩타이드의 정제 및 특성

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학석사 학위청구논문으로 제출함

2011년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 혜 림

김혜림의 공학석사 학위논문을 인준함

2011 년 2 월 25 일



주 심 농학·이학박사 홍 용 기 (인)

위 원 이학박사 이 형 호 (인)

위 원 이학박사 박 남 규 (인)

목 차

<Part I >

별 불가사리 (*Asterina pectinifera*) 측수로부터 항균성 펩타이드의 정제 및 특성

List of Tables	III
List of Figures	IV
Abstract	X
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
1.1. 실험동물	4
1.2. 시약 및 재료	4
2. 실험방법	4
2.1. 추출	4
2.1.1. 별 불가사리 측수조직으로부터 항균성 물질의 추출	4
2.2. 항균활성 측정	5
2.2.1. 균주 Stock 제조	5
2.2.2. 배지의 제조	5
2.2.3. 항균활성 측정	6
2.3. 측수조직 추출물 (RM 60)로부터 항균활성 펩타이드의 정제	6
2.4. 천연 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정	9
2.4.1. 분자량 측정	9
2.4.2. 아미노산 서열결정	9
2.4.3. Disulfide bond 유무 확인	9
2.5. cDNA cloning	9
2.5.1. Total RNA 추출	9
2.5.2. Reverse transcription	10
2.5.3. Primers design	10

2.5.4. 3' RACE cDNA cloning	11
2.5.5. Ligation of PCR products and transformation	12
2.5.6. Colony PCR	12
2.5.7. Preparation of plasmid DNA	13
2.5.8. Sequencing analysis	13
2.6. 펩타이드의 2차 구조 예측	13
 III. 결과	14
1. 별 불가사리 측수조직 추출물의 항균활성 측정	14
2. 측수조직 추출물 (RM 60)로부터 항균활성 펩타이드의 정제	14
3. 정제한 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정	14
3.1 불가사리 측수 유래의 항균성 펩타이드 SFTA	14
3.2 Disulfide bond 유무 확인	15
4. 3' Rapid Amplification cDNA ends (3' RACE-PCR)	15
5. SFTA의 2차 구조 예측	26
 IV. 토 론	29
 V. 참 고 문 헌	36

List of Tables

Table 1. Antimicrobial peptides from marine organisms	3
Table 2. Amino acid sequence and molecular weight of SFTA isolated from the tubefeet of starfish, <i>Asterina pectinifera</i>	21
Table 3. Primers for 3'RACE of SFTA	27
Table 4. Prediction of secondary structure from the amino acid sequence of SFTA	28
Table 5. Secondary structure model of SFTA	35



List of Figures

- Fig. 1. Starfish (*Asterina pectinifera*). Starfish has very strong reproduction power and whole body can grow up to new individuals. They gives serious damage to starfish, scallop, and shellfish farm. 7
- Fig. 2. Summarized procedures for the purification of SFTA from the tubefeet of starfish (*Asterina pectinifera*). CX HPLC; cation-exchange HPLC, C₁₈ HPLC; C₁₈ reverse-phase HPLC. 8
- Fig. 3. Antimicrobial activity of Sep-pak fractions against *B.subtilis* KCTC 1021 and *E.coli* D31..... 16
- Fig. 4. The 1st cation-exchange HPLC profile of starfish tubefeet extract RM 60 on a TSK-gel SP-5PW column. RM 60 was eluted with a linear gradient of 0 M 1 M NaCl in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) for 100 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the antimicrobial activity on the *B. subtilis* KCTC 1021.17
- Fig. 5. The 2nd reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 10% → 10% (10 min) → 60% (50 min) CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the antimicrobial activity on the *B. subtilis* KCTC 1021.18
- Fig. 6. The Final purification of SFTA on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted isocratically with 23% CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fraction with the antimicrobial activity on *B. subtilis* KCTC 1021. 19
- Fig. 7. Molecular weight of SFTA by MALDI-TOF. 20

Fig. 8. Comparisons between HPLC profiles of the native STFA (A), and SFTA treated with DTT (B). Two type of peptide were injected to a reverse-phase Capcell-PAK C₁₈ column and eluted with a linear gradient of 5% → 65% ANC in 0.1% TFA (pH 2.2) for 30 min at a flow rate of 1.0 ml/min. 22

Fig. 9. Diagram of primer composition for the SFTA cDNA cloning..... 23

Fig. 10. 3' RACE PCR products from cDNA of starfish tubefeet, *Asterina pectinifera* (A) and sequencing result (B). (A) Lane 1: Bioneer 100bp plus DNA ladder, Lane 2: SFTA-1 primer-related PCR product from *A. petinifera* cDNA, Lane 3: SFTA-2 primer-related PCR product from *A. pectinifera* cDNA, Lane 4: control..... 24

Fig. 11. pGEM-T Easy vector map..... 25

Fig. 12. Primary structure and calculated molecular weight of SFTA and cleavage site of enzyme. Compared results of Edman degradation and 3' RACE sequencing (A), calculated molecular weight of two type SFTA (B), metalloprotease's substrate and cleavage site (C). 33

Fig. 13. Comparison of SFM-II and SFTA primary sequence. SFM-II was isolated from the muscle of starfish, *Asterina pectinifera* 34

<Part II>

별 불가사리 (*Asterina pectinifera*) 의 촉수로부터 평활근 수축활성을 지닌 신경성 펩타이드의 정제 및 특성

List of Table	VIII
List of Figures	VIII
Abstract	XII

I. 서론	39
-------	----

II. 재료 및 방법	41
-------------	----

1. 재료	41
-------	----

1.1. 실험동물	41
-----------	----

1.2. 시약 및 재료	41
--------------	----

2. 실험방법	41
---------	----

2.1. 추출	41
---------	----

2.1.1. 별 불가사리 촉수조직으로부터 평활근 수축 물질의 추출	41
--------------------------------------	----

2.2. 평활근 수축활성 측정	42
------------------	----

2.2.1. 조직의 표본제작	42
-----------------	----

2.2.1.1 불가사리 dorsal retractor muscle (DRM)	42
--	----

2.2.2. 수축활성의 측정	42
-----------------	----

2.2.2.1. 불가사리 DRM 에 대한 수축활성 측정	42
--------------------------------	----

2.3. 촉수조직 추출물 (RM 60)로부터 평활근 수축활성 펩타이드의 정제	45
--	----

2.4. 천연펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정	47
-------------------------------	----

2.4.1. 분자량 측정	47
---------------	----

2.4.2. 아미노산 서열결정	47
------------------	----

III. 결과 및 토론	48
--------------	----

1. 별 불가사리 촉수조직 추출물의 평활근 수축활성 측정	48
---------------------------------	----

2. 촉수조직 추출물 (RM 60)로부터 평활근 수축활성 펩타이드의 정제	48
--	----

3. 정제한 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정	49
-------------------------------	----

3.1. 불가사리 촉수 유래의 평활근 수축성 펩타이드	49
IV. 참 고 문 헌	58
감사의 글	61



List of Table

Table 1. Molecular of SFTN partial primary structure.	57
--	----

List of Figures

Fig. 1. Basic structure of a tubefeet.	43
Fig. 2. Physiography system to measure the contractile effect on the smooth muscle.	44
Fig. 3. Summarized procedures for the purification of SFTN from the tubefeet of Starfish (<i>A. pectinifera</i>)	46
Fig. 4. Traces illustrating the contractions induced by starfish tubefeet extract in the DRM of the Starfish. Each arrow represents the sample applied to the DRM.	50
Fig. 5. The 1st reversed-phase HPLC profile of starfish tubefeet extract RM60 on a Vydac C ₄ column. RM60 was eluted with a linear gradient of 10% → 65% CH ₃ CH in 0.1 % TFA (pH 2.2) for 40 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the contractile activity on the DRM of starfish. fraction was applied at the time indicated by an arrow.	51
Fig. 6. The 2nd gel-filtration HPLC profile of bioactive peptide on a Superdex peptide HR 10/30 column. Active fractions were eluted with a 30% isocratic CH ₃ CH in 0.1% TFA (pH 2.2) for 40 min at a flow rate of 0.5 ml/min. The down arrow shows the fraction with the contractile activity on the DRM of the starfish. fraction was applied at the time indicated by an arrow.	52

Fig. 7. The 3rd reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 10% → 60% CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) for 50 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the contractile activity on the DRM of the starfish. fraction was applied at the time indicated by up arrow. 53

Fig. 8. The Final purification of bioactive peptide on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted isocratically with 29% CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fraction with the contractile activity on the DRM of starfish. The purified peptide was applied at the time indicated by up arrow. 54

Fig. 9. Molecular weight of SFTN by MALDI-TOF. 55

Fig. 10. Superdex peptide HR 10/30 standard. A: SFIII (3655 Da.) B: SFII (2306 Da.) C: Vasopresin (1056 Da.) D: PALAL (about 484 Da.)56

Part I

Purification of a novel antimicrobial peptide from the tubefeet of starfish, *Asterina pectinifera*

Hye Rim Kim

*Department of Biotechnology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

A novel antimicrobial material was isolated from the acidified tubefeet extract of starfish, *Asterina pectinifera*. To purify the antimicrobial peptide, the acidified extract was partially purified with Sep-Pak C₁₈ solid phase extraction cartridges using stepwise gradient while increasing the percent of acetonitrile (10%, 60% and 100%) containing 0.1% TFA. Antimicrobial activity was recovered in the 60% acetonitrile fraction and this fraction was further purified by cation-exchange and C₁₈ reversed-phase high performance liquid chromatography. The purified material exhibited potent antimicrobial activity against gram-positive bacteria including *B.subtilis*.

For the characterization of the purified peptide, the molecular weight and amino acid sequence analysis were performed by MALDI-TOF MS and Edman degradation. The molecular weight and primary sequence of this material turned out to be a 3715 Da and GKARNAYFNXDDXGNPGXIXKLVRGKKSTLN. Comparison of the amino acid sequence with those of other known antimicrobial peptides revealed this peptide turned out to be a new one. We have named it starfish tubefeet antimicrobial peptide (SFTA).

To determine the correct primary structure and cDNA sequence of SFTA, cDNA cloning was performed by RACE-PCR. The 2nd PCR product size was identified to be about 900bp and cDNA was cloned with recombinant expression vector pGEM-T easy and expressed in *E. coli*. DH5 α . As a result of cDNA work, the amino acid sequence of SFTA was identified as follows: GKARNAYFNCDDEWGNPGCICKLVRGKKSTLNCL. In comparisons of the result of Edman degradation with 3' RACE-PCR result, the residues in positions at 10, 19, and 21 from N-terminal of SFTA were determined to Cys and the residue in position at 14 was determined to Trp. In addition, the residues of Cys³³ and Leu³⁴ were also

identified.

Based on the these results, the calculated molecular weight of residues until positions 33 and 34 from N-terminal were 3715 and 3828 Da, respectively. Therefore, the primary structure of SFTA turned out to be a "GKKRNAYFNCDDE-WGNPGCICKLVRGKKSTLNC". However, it is unclear as to whether C-terminal of SFTA exists as a free OH or NH₂. In addition, to confirm the presence of an enzyme which have a cleavage site between Cys³³ and Leu³⁴ in starfish, further studies will be needed. In order to figure out the modification of C-terminus, we are currently in process of peptide synthesis. Furthermore 5'RACE-PCR cDNA work is also in process to investigate the prepro-sequence of SFTA.



1. 서론

면역체계는 침입자에 관계없이 1차 방어 역할을 담당하는 선천면역 (innate immunity)과 침입자에 대해 특이적인 반응을 담당하는 적응면역 (adaptive immunity)으로 나눌 수 있다 (Hancock and Diamond, 2000). 선천면역에는 lectin, pro-phenoloxidase activating factor, Phagocytosis, antimicrobial peptide (AMP) 등이 있으며 이들은 외부로부터 체내에 비자기 물질들이 침입하면 1차적으로 그것을 없애는 역할을 담당하고 (Seo, 2005), 적응면역에는 B림프구와 T림프구가 있어 외부로부터 항원을 인식하면 항체를 생성하여 면역반응을 일으킨다. 이 중 선천면역 시스템에 속해있는 AMP는 병원균이 자기 방어를 위한 내성을 지니기 어렵게 하는 성질이 있어, 슈퍼박테리아를 사멸시키기 위한 물질 탐색 연구에 있어 가장 주목받고 있는 물질이다 (Hancock and Chapple, 1999). 식물이나 육상 생물에 대한 AMP 연구는 활발히 진행 중이지만, 해양 무척추 동물로부터의 연구는 미흡한 실정이다. 실제로 해양 무척추 동물의 대부분은 외부침입에 대한 방어수단으로서 innate immune system에 대부분 의존하고 있기 때문에 AMP의 역할이 중요하게 작용하고 있다.

보통 항균 펩타이드는 피부조직이나 점액에 다량 분포하고 있다. Table 1에 나타난 대표적인 해양생물 유래의 AMP로 hagfish (*Myxine glutinosa*)의 mucus에서 Myxinidin (MacKinnon et al., 2009), catfish (*Parasilurus asotus*)의 mucosal layer에서 Parasin I (Park et al., 1998), winter flounder (*Pleuronectes americanus*)의 skin mucus로부터 pleurocidin (Cole et al., 1997), loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)로부터 misgurin (Park et al., 1997), polychaeta (*Arenicola marina*)의 coelomocyte로부터 Arenicin과 같은 항균 펩타이드들이 발견되었다 (Ovchinnikova et al., 2004).

또한 해양생물의 무척추 동물에서 발견된 대표적인 항균활성 펩타이드는, 홍합 (*Mytilus galloprovincialis*)의 혈액세포에서 myticin (Mitta et al., 1999)이, 새우 (*Penaeus vannamei*)의 hemolymph에서 Pro이 풍부한 penaeidins (Destoumie et al., 1997), 굴(*Crassostrea virginica*)의 gill로부터 defensin (Seo et al., 2005), 투구게 (*Tachypleus tridentatus*)의 hemocyte로부터 tachyplesin (Nakamura et al., 1988)이 정제되었다. 극피동물인 별 불가사리(*Asterina pectinifera*) gonad로부터는 Histone H2A 단백질이 보고되어 있지만 (Martinage et al., 1983), 아직까지 불가사리로부터 항균성 펩타이드에 대한 보고는 전무한 실정이다.

불가사리류 (Asteroidea)는 모두 자유생활을 하는 해산저서동물로 저서 생태계 내에 서식하는 초대형저서동물 (megabenthos)의 생체량 중 약 70%이상을 차지하는 중요한

분류군이다 (Billett et al., 1991). 또한 불가사리류는 해양의 저서무척추동물 중에서 가장 상위의 포식자이며 '핵심 종 (keystone species)'으로서 조간대와 조하대의 우점종인 담치류 (Mytilidae)를 비롯한 많은 대형 저서동물을 포식하여 이들의 밀도와 분포를 제한하는 저서생태계내의 조절자 역할도 수행한다. 불가사리는 뛰어난 생명력과 포식력으로 양식장을 중심으로 하여 해양 생태계 파괴의 주범으로 전락하여 활용방안을 모색해야 하는 단계이다 (Dayton., 1977).

만약 불가사리에서 새로운 항균 활성 펩타이드가 정제된다면 인간과 다른 생물체에 피해를 주고 있는 불가사리를 새로운 방법으로 이용할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 생각된다.

불가사리는 여러 가지 기관으로 이루어져 있으며 대표적으로 body, gonad, liver, stomach, muscle, tube feet으로 나누어진다 (Fig. 1). 그 중 tube feet, 즉 촉수는 불가사리의 움직임을 조절하고 먹이를 잡는 역할을 담당한다. 이러한 역할을 수행할 때 촉수(관족) 끝에서 sticky한 mucus가 분비되기 때문에 다른 해양생물들과 마찬가지로 촉수에도 항균 펩타이드가 존재할 것이라 생각되어진다. 또한 불가사리는 살아있는 먹이는 물론 죽은 먹이도 먹는 식성 때문에 먹이 자체로 인한 외부 미생물에 대한 오염 가능성이 높다. 따라서 촉수가 이와 가장 일차적으로 접촉하는 부위인 만큼 면역에 관련되는 물질이 존재할 것이라 예측하여 본 연구에서는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대한 항균활성을 지표로 하여 불가사리 촉수에 존재하는 항균 펩타이드를 분리·정제하고자 하였다.

Table 1. Antimicrobial peptides from marine organisms

Species	Structure	Name
Hagfish (<i>Myxine glutinosa</i>)	12AAs, β -sheet	Myxinidin
Catfish (<i>Parasilurus asotus</i>)	19AAs, random coil	Parasin I
Winter Flounder (<i>Pleuronectes americanus</i>)	25AAs, α -helix	Pleurocidin
Loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	21AAs, α -helix	Misgurin
Polychaeta (<i>Arenicola marina</i>)	21AAs, β -sheet	Arenicin

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1 실험동물

실험에 사용한 별 불가사리 (*Asterina pectinifera*, 50마리) (Fig. 1) 는 부산 청사포에서 썰물 때 직접 채집하여 순환되는 해수 수조에서 일정한 수온을 유지하여 추출직 전까지 정치시켜 두었다. 살아있는 상태의 불가사리로부터 촉수조직을 분리한 후, 액체 질소로 급속 동결시켜서 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

1.2. 시약 및 재료

시료의 여과를 위한 Millex-LCR₁₃ ($0.5\ \mu\text{m}$), Ultrafree-MC ($0.45\ \mu\text{m}$), Syringe filter ($0.45\ \mu\text{m}$)와 Sep-Pak C₁₈ cartridge는 Waters사 (Milford, MA, USA)에서 구입하였다. 항균활성 측정에 사용한 Tryptic soy broth (TSB)와 Lactose-Boullion (LB)는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서, Agarose (Low EEO Agar)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC-grade의 water (H_2O) 및 acetonitrile (CH_3CH)은 TEDIA사 (Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다. 또한 cDNA 실험에 사용된 strain은 *E. coli* DH5 α MCR (NIH; Bethesda, MD, USA)이며, 부경대학교 이형호 교수님 연구실에서 분양받았다. 그리고 발현 vector로는 pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 추출

2.1.1. 별 불가사리 촉수조직으로부터 항균활성 물질의 추출

불가사리 촉수조직 (50마리)을 조직의 4배 volume에 해당하는 1% acetic acid를 첨가하여 100°C 에서 5 분 동안 끓인 후 냉각시켰다. 호모게나이저 (IKA[®] T10 basic ULTRA-TURRAX, USA)로 조직을 파쇄 하여 4°C 에서 40 분 동안 10,000 rpm로 원심 분리를 하였다. 얻어진 상층 액 (304 ml)은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 약 20 ml씩 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 주입하였다. 우선 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 0.1% TFA가 포함된 100% acetonitrile (CH_3CH)로 활성화시킨 후, 0.1% TFA가 포함된 H_2O 로

충분히 평형화하였다. 충분히 평형화가 된 cartridge에 시료를 주입하여 0.1% TFA가 포함된 H₂O (D.W), 10% CH₃CH (retained materials; RM 10) 및 60% CH₃CH (RM 60)과 100% CH₃CH (RM 100)로 물질들을 각각 용출시켜 분리한 후 항균활성 측정 및 항균 물질의 정제에 사용하였다.

2.2. 항균활성 측정

2.2.1. 균주 Stock 제조

Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에서 분양받은 gram-positive bacteria인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021 과 gram-negative bacteria인 *Escherichia coli* D31 을 사용하였으며 모든 실험은 clean bench에서 무균상태로 진행하였다.

균체가 들어있는 ampoule을 유리 절단용 칼을 사용하여 ampoule의 중간 부분에 약 5mm scratch를 냈다. 앰플 외부에 70% 알코올을 적신 거즈로 잘 닦은 후 남아 있는 수분과 알코올은 증발시켜 말린 후 앰플을 절단했다. 화염멸균한 후, 1 X LB Broth 0.8ml을 첨가하여 피펫팅 하였다. 그 후 멸균된 백금이를 사용하여 균체를 균일하게 현탁했다. 균체 현탁액을 LB 평판배지에 도말하여 37℃에서 18시간동안 배양시켰다. 배양 후 single colony가 생성된 것을 확인한 후, colony만 살짝 긁어 4ml의 TSB 액체 배지에 계대 배양하여 18시간동안 배양해주었다. 균이 잘 자란 것을 확인 한 뒤, 멸균된 50% glycerol과 균 액을 1:1 비율로 섞어 stock을 만들었다. Stock 들은 모두 -70℃에서 보관하여 사용하였다.

2.2.2. 배지의 제조

항균활성을 측정하기 위해서 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)를 수행하였으며, *B.subtilis* KCTC 1021을 사용하였다. 백금이를 이용하여 *B.subtilis* KCTC 1021의 stock에서 균을 일정량 취하여 3 ml의 TSB에 접종하고 다시 37 °C에서 전 배양하였다. 배양한 *B.subtilis* KCTC 1021은 570 nm에서 optical density 가 0.1 (84%T)이 되도록 DR100 Colorimeter (Product No. 41101-71, BioMerieux, Inc., USA)를 이용하여 희석하였다.

Agarose plate의 조성은 다음과 같다: Underlay agarose; TSB powder 0.015 g, 1.0 M phosphate buffer (PB) (pH 6.57) 1 ml, D.W 48.5 ml, agarose 0.5 g, Overlay agarose; TSB powder 3 g, 1.0M PB 1 ml, D.W 48.5 ml, agarose 0.5 g. 멸균하여 준비한 배지를 42 °C가 되도록 식힌 후, 희석시킨 *B.subtilis* KCTC 1021을 함께 배지에 넣고 잘 섞어주었다. plate에 균액과 함께 섞은 배지를 부은 후 배지가 굳

고 배지 표면의 습기가 제거 될 때까지 기다렸다.

2.2.3. 항균활성 측정

항균 활성을 관찰하기 위해서 배지에 외경이 3 mm 정도가 되는 well을 vacuum을 사용하여 만든 뒤 well에 시료를 주입하였다. 이 때 활성을 보기 위한 시료는 동결건조 후 5 μ l의 0.01 % acetic acid에 녹여 사용하였다. 시료가 배지로 완전히 스며들면 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양하였고, 10 ml의 overlayer agarose를 부은 후 18시간 배양하였다. Well 주위에 생긴 clear zone의 크기로 활성의 정도를 확인하였다.

2.3. 축수조직 추출물 (RM 60)로부터 항균활성 펩타이드의 정제

정제과정에 사용된 HPLC는 Diode array 기능이 장착된 HP 1100 series diode-array detector (Hewlett Packard, USA)를 사용하였다. 최종물질은 총 3단계의 과정을 거쳐 정제되었다 (Fig. 2).

항균활성을 나타낸 RM 60을 첫 번째 단계로 cation-exchange column인 TSK-gel SP-5PW (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)를 사용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다: A 용매; 10 mM PB (pH 6.0), B 용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM PB (pH 6.0), 조건; 0 $\rightarrow$ 100% B (100 min), 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/min, 온도; 실온.

두 번째 단계로, 첫 번째 단계에서 활성을 나타낸 분획들을 Capcell-PAK C₁₈, (4.6 $\times$ 250 mm, Shiseido, Japan) column에 주입하여 정제하였으며 분리조건은 다음과 같다: A 용매; 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함하는 100% acetonitrile (CH₃CH) (pH 2.2), 조건; 10 $\rightarrow$ 10 (10 min) $\rightarrow$ 60% (50 min), 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/min, 온도; 실온.

마지막 단계로, 두 번째 단계에서 활성을 나타낸 분획을 같은 C₁₈ column을 사용하여 24%의 isocratic 조건으로 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/min, 온도; 실온에서 최종 정제를 하였다

정제에 사용한 흡수파장은 220nm, 254nm 및 280nm이었고, 정제단계에서 얻어진 분획들은 *B. subtilis* KCTC 1021에 대해 항균활성을 측정하였다.

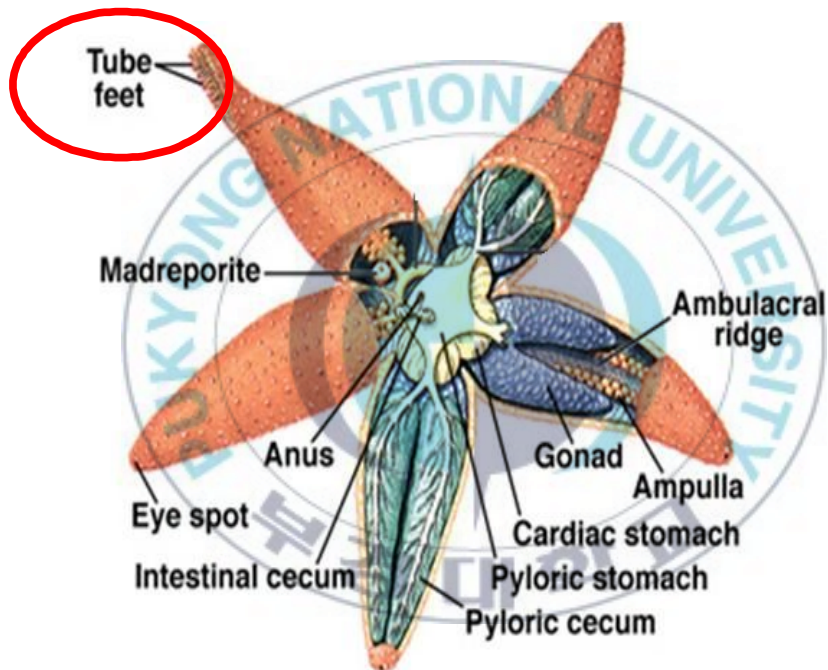


Fig. 1. Starfish (*Asterina pectinifera*). Starfish has very strong reproduction power and whole body can grow up to new individuals. They gives serious damage to starfish, scallop, and shellfish farm.

Starfish, *Asterina pectinifera*

Acidic extract of tubefeet



C₁₈ Sep-Pak cartridge



CX HPLC



C₁₈ HPLC



C₁₈ HPLC



SFTA

Fig. 2. Summarized procedures for the purification of SFTA from the tubefeet of starfish (*Asterina pectinifera*). CX HPLC; cation-exchange HPLC, C₁₈ HPLC; C₁₈ reverse-phase HPLC.

2.4. 천연 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정

2.4.1. 분자량 측정

천연 펩타이드들의 분자량 측정은 부경대학교 공동실험실습관에 있는 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM PRO spectrometer, Perseptive Biosystems, USA)를 사용하여 측정하였다. Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 사용해 측정하였다.

2.4.2. 아미노산 서열결정

별 불가사리 (*A. pectinifera*) 측수로부터 정제한 SFTA의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 한국기초과학지원연구원에 있는 Procise 491 HT protein sequencer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

2.4.3. Disulfide bond 유무 확인

정제한 peptide의 분자 내에 disulfide bond의 유무를 확인하기 위해 dithiothreitol (DTT)를 처리한 peptide와 처리하지 않은 peptide를 각각 준비하였다. 분말상태인 peptide를 9 μ l의 2차 증류수에 녹인 후 1 μ l의 10 mM DTT를 첨가하여 37 °C에서 overnight로 반응시켰다. DTT를 처리하지 않은 peptide는 10 μ l의 2차 증류수에 녹여 DTT를 처리한 물질과 동일하게 37 °C에서 overnight로 반응 시켰다. 반응시킨 물질들을 Capcell-PAK C₁₈ (4.6 mm X 250 mm, 5 μ m, Shiseido, Japan) column에 주입하여 용출되는 peak들의 retention time (RT)을 비교하여 disulfide bond의 유무를 관측하였다. 반응 조건은 다음과 같다: A용매 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2); B용매 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CH (pH 2.2); 조건: 5 ~ 65% CH₃CH (30 min), 유속; 1.0 ml/min, 온도; 실온.

2.5. cDNA cloning

2.5.1. Total RNA 추출

RNA는 TRIzol (Invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였다. 1.5 ml microtube에 50 ~ 100 mg의 조직을 넣고 1 ml의 TRIzol을 넣은 뒤, homogenizer로 조직을 파쇄 시켜 주었다. 실온에서 5 분간 incubation한 후 200 μ l chloroform을 첨가하여 섞은 뒤 실온에서 3 분간 incubation 하였다. 4 °C, 15 분간 13,000 rpm에서 원심분리 한 뒤,

상층 액을 새 tube에 옮겼다. 500 μ l의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 vortex하여 섞어 주고 실온에서 10 분간 incubation 시켜주었다. 그 후, 4 $^{\circ}$ C 10 분간 13,000 rpm에서 원심 분리하여 상층 액은 제거하고 남은 RNA pellet에 75% ethanol 1 ml을 첨가하여 씻어 주었다. 4 $^{\circ}$ C, 5 분간 13,000 rpm에서 원심 분리 한 뒤, 상층 액을 제거한 후 RNA pellet은 5 ~ 10 분간 실온에서 말려주었다. 이후 RNA pellet은 30 μ l의 RNase-free water를 첨가하여 녹였다. 이후 RNA는 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.5.2. Reverse transcription

추출한 total RNA로부터 cDNA를 만들기 위해서, Superscript II reverse transcriptase를 사용하였다. 3' rapid amplification cDNA ends (RACE)를 하기위해서 SMARTTM RACE cDNA amplification kit (clontech, UK)를 이용하여 3'RACE cDNA를 합성하였다. 5 μ l total RNA sample, 1 μ l의 50 pmol 3'-RACE CDS Primer A와 1 μ l의 10 mM dNTPmix를 첨가 한 후 최종 volume이 10 μ l가 되도록 DEPC-Water를 첨가하여 mixture를 만들어 주었다.

사용한 3'- RACE CDS primer A 서열은 다음과 같다:

3'-RACE CDS Primer A (3'-CDS; 12 μ M) :

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30V N-3'

(N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)

Mixture를 65 $^{\circ}$ C에서 5 분간 incubation 해 준 뒤, 2 분간 ice에서 cooling 시켜주었다. 그 후, 10 μ l denatue mixture와 2 μ l의 30 mM MgCl₂를 포함하는 5X first-strand buffer, 1 μ l의 20 mM DTT, 1 μ l의 10 mM dNTP mix, 1 μ l의 40 unit RNase를 첨가하여 섞어준 뒤 42 $^{\circ}$ C에서 2 분간 incubation 했다. 1 μ l의 50 U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA)를 첨가한 뒤 42 $^{\circ}$ C에서 90 분간 반응시킨 뒤, 100 μ l의 Tricine-EDTA buffer를 첨가 후 72 $^{\circ}$ C에서 15 분간 heating 시키고 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

2.5.3. Primers design

SFTA의 cloning을 하기 위해서 알고 있는 아미노산 서열을 이용하여 forward degenerate primer인 SFTA-1, SFTA-2를 작성하였다. Fig. 9에서 나타내듯이 SFTA-1 Primer는 SFTA의 1 ~ 7 amino acid residues, SFTA-2 Primer는 3 ~ 9 amino acid

residues로부터 작성하였으며, 서열은 다음과 같다:

SFTA-1 Primer: 5'-GGNAARAARMGNAAYGCNTAY-3' (21 mer)

SFTA-2 Primer: 5'-AARMGNAAYGCNTAYTTYAAAY-3' (21 mer).

또한 Reverse primer로 사용된 SMART™ Primer는 다음과 같다:

10 X Universal Primer A Mix (UPM) ;

Long (0.4 μ M):

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

Short (2 μ M):

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Nested Universal Primer A (NUP;10 μ M); 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

2.5.4. 3' RACE cDNA cloning

1차 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 하기 위해서 재료 및 방법 1.2에서 얻은 total RNA로부터 reverse transcription하여 만든 cDNA를 사용하였다. 반응액 조성으로는 1 μ l의 template, 1 μ l의 10 μ M SFTA-1 primer, 2.5 μ l의 10 μ M UPM primer, 2.5 μ l의 10X Ex-taq reaction buffer, 2 μ l의 각 2.5 mM dNTP, 0.13 μ l의 5 unit Ex-taq, 15.87 μ l의 D.W를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같다: 1차 PCR 조건은 94 °C에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 °C에서 30초 동안 denaturation 반응, 45 °C에서 1분 동안 annealing 반응, 72 °C에서 1분 동안 extension 반응을 5 cycle을 하였다. 이는 touchdown 방식으로 annealing 온도만 2.5 °C씩 낮추어 42.5 °C 5 cycle , 40 °C 25 cycle하였고, 끝으로 최종 extension을 위해서 72 °C에서 7분 동안 반응하였다.

2차 nested PCR을 하기위해 반응 액 조성은 1 μ l의 template, 1 μ l의 10 μ M SFTA-2 primer, 1 μ l의 10 μ M NUP, 2.5 μ l의 10X Ex-taq reaction buffer, 2 μ l의 각 2.5 mM dNTP, 0.13 μ l 5 unit Ex-taq, 17.37 μ l의 D.W를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같다: 94 °C에서 5분 동안 predenaturation하였고, 94 °C에서 30초 동안

denaturation 반응, 42 °C에서 1분 동안 annealing 반응, 72 °C에서 1분 동안 extension 반응을 35 cycle하였고, 끝으로 최종 extension을 위해서 72 °C에서 7분 동안 반응하였다.

PCR 후 size 확인을 위해 사용한 gel은 1 x Tris acetate EDTA (TAE) buffer를 사용하여 만들었고, 이 buffer는 loading buffer로도 사용하였다. 6 x DNA loading dye를 사용하여 DNA와 mixing하여 gel의 홈에 넣었다. 이것은 agarose의 well에 DNA를 넣어줄 때 DNA용액을 무겁게 하여 agarose의 홈으로 가라앉히는 역할을 한다. 또한 그 성분에 전기영동 되는 속도가 다른 두 개의 염색시약인 bromophenol blue와 xylene cyanol FF가 들어 있어 DNA와 같이 전기영동되며 DNA의 전기영동된 정도를 알 수 있게 하는 역할을 한다. 전기영동시 1.2% agarose gel을 사용하여 약 25분간 전기영동을 하였다

2.5.5. Ligation of PCR products and transformation

PCR product를 0.5 μ l의 TA vectors (pGEM[®] - T Easy ; Promega, Madison, WI, USA, Fig. 11)와 5 μ l의 2 x reaction buffer, 1 μ l의 3 U/ μ l T₄ DNA lagase 및 전체 양이 10 μ l가 되도록 D.W.를 넣고 잘 섞어준 뒤 4 °C에서 overnight 시켜 ligation 하였다.

Transformation을 하기 위한 균주로는 competent cell *E. coli* DH5 α (NIH: Bethesda, MD, USA)를 사용하였다. 200 μ l의 *E. coli* DH5 α 에 5 μ l의 ligation한 mixture (DNA)를 섞고 ice에서 30분 동안 두었다. 그리고 42 °C, 30초간 heat-shock 시키고, ice에서 2분 동안 두었다. 그 후, mixture에 800 μ l의 LB broth를 넣어 섞은 뒤 37 °C에서 1시간 동안 shaking incubation하였다. Plate에 도말하기 위해서 14,000 rpm에서 약 20초간 원심분리 하여 cell을 모은 뒤 200 μ l 배지를 남기고 나머지는 버렸다. 남은 200 μ l 배지를 500 μ l의 100 μ g/ml ampicillin, 300 μ l의 60 μ g/ml XGAL 및 250 μ l의 0.5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside가 포함된 LB agar plate에 도말하고, 37 °C에서 15시간 배양하여 형질전환 시킨 colony를 얻었다. 이 colony는 LB broth에 최종 농도가 100 μ g/ml이 되도록 ampicillin을 첨가한 ampicillin LB (ALB)에 접종하여 37 °C에서 15시간 동안 shaking incubation하였다.

2.5.6. Colony PCR

20 μ l를 기준으로 SFTA-2 : NUP : D.W 가 1 : 1 : 180이 되도록 AccuPowerTM PCR Premix (Bioneer, KOREA)을 사용하여 mixture를 만들어 Colony PCR을 하였다.

Colony PCR의 조건은 94 °C에서 5분 동안 predenaturation 하였고, 94 °C에서 30초 동안 denaturation 반응, 42 °C에서 1분 동안 annealing 반응, 72 °C에서 1분 동안 extension 반응을 25 cycle 하였다. 그리고 최종 extension을 위해서 72 °C에서 7분 동안 반응하였다. PCR product는 전기영동을 하여 band의 size를 확인하였다.

2.5.7. Preparation of plasmid DNA

Plasmid DNA는 LaboPass Plasmid Mini DNA purification Kit (COSMO Genetech, Seoul, Korea)를 사용하여 추출하였다. 이 과정은 실온에서 실시하였으며 원심분리는 14,000 rpm으로 하였다.

16시간 배양한 bacteria culture를 1.5 ml tube에 가득 붓고 2분간 원심분리 하여 cell을 모은 뒤 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA로 구성된 Buffer S1을 250 μ l 넣어 resuspension시켰다. 이 buffer S1은 세포벽은 파괴시키나 삼투압은 유지시켜 세포의 외형은 유지해준다. 그 후 0.2 M NaOH와 1% SDS 로 구성된 Buffer S2를 250 μ l 넣고 4회 정도 invert하여 세포막을 깨고 pH를 높여 염색체 DNA와 plasmid DNA, 단백질을 변성시켰다. Cell suspension이 맑아질 때까지 기다렸다가 5 M의 potassium acetate, glacial acetic acid으로 구성된 Buffer S3을 350 μ l 넣고 6회 정도 invert하여 크기가 큰 염색체 DNA는 엉키게 하였다. 그 후 10분간 원심분리를 한 후에 상층 액만을 취해 spin column tube에 넣고 1분간 원심분리 하였다. Column을 통과한 액은 버리고, washing buffer인 Buffer PW를 700 μ l 넣고 1분간 원심분리 하였다. 통과한 액은 버리고 다시 1분간 원심분리 하였다. Spin column에 부착되어 있는 plasmid DNA를 용출하기 위해서 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)로 구성된 50 μ l의 elution buffer (EB)를 column 중앙에 loading하고 1분간 반응 시간을 준 뒤, 1분간 원심분리 하여 plasmid DNA를 얻었다.

2.5.8. Sequencing analysis

Plasmid DNA는 pGEM-T Easy vector 내에 있는 T7 promoter를 사용하여, COSMO Genetech (Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

2.6. 펩타이드의 2차 구조 예측

별 불가사리(*Asterina pectinifera*) 측수에서 정제한 항균활성 펩타이드의 2차 구조를 알아보기 위해 EMBOSS garnier tool (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/>)을 사용하였다.

III. 결 과

1. 별 불가사리 촉수조직 추출물의 항균활성 측정

불가사리 촉수로부터 새로운 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해서 1% 초산으로 추출한 추출물을 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 0%, 10%, 60% 및 100% CH₃CH으로 용출하였다. 분리된 D.W, RM 10, RM 60, RM 100층은 *B. subtilis* KCTC 1021와 *E. coli* D31 균주에 대해서 각각 항균활성 테스트를 하였다. 그 결과, 두 균주에서 D.W, RM 10 및 RM 60층에서 반응을 나타냈다 (Fig. 3). 그 중 가장 강한 항균활성을 나타낸 RM 60을 사용하여 항균활성 펩타이드를 정제하였다. 또한 *E. coli* D31보다 활성이 뚜렷하게 나타난 *B. subtilis* KCTC 1021을 사용하여 HPLC로 분리한 분획들에 대해 활성을 측정하였다.

2. 촉수조직 추출물 (RM 60)로부터 항균활성 펩타이드의 정제

RM 60을 TSK-gel SP-5PW column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)에 주입한 결과, 약 0.55 M NaCl 농도에서 용출된 분획에서 항균활성을 나타내었다 (Fig. 4). 반응을 나타낸 활성분획을 농축하여 Capcell-PAK C₁₈ column (4.6 × 250 mm, Shiseido, Japan)을 사용하여 정제하였고, 각 분획들의 항균활성을 측정한 결과, 약 32.2 min에 해당하는 peak에서 항균활성을 나타내었다 (Fig. 5). 최종적으로 동일한 C₁₈ column을 사용하여 23% CH₃CH의 isocratic 조건으로 단일 peak를 얻었다 (Fig. 6).

3. 정제한 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정

최종적으로 불가사리 촉수 조직으로부터 정제한 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위해 MALDI-TOF mass spectrometer와 Edman 분해법을 이용하는 아미노산 서열 분석기를 사용하였다.

3.1. 불가사리 촉수 유래의 항균성 펩타이드 SFTA

불가사리 촉수 추출물 RM 60으로부터 정제된 물질의 분자량은 약 3715 Da이며, 첫 번째 잔기인 Gly부터 32번째 잔기인 Asn까지 분석되었다 (Fig. 7). 부분적으로 분석된 이 펩타이드의 일차서열은 다음과 같다:

Gly-Lys-Lys-Arg-Asn-Ala-Tyr-Phe-Asn-X¹⁰-Asp-Asp-Glu-X-Gly-Asn-Pro-Gly-X-Ile²⁰-X-Lys-Leu-Val-Arg-Gly-Lys-Lys-Ser-Thr³⁰-Leu-Asn.

(+) charge를 띄는 염기성 아미노산인 Lys 및 Arg이 7개로 염기성 성질을 지닌 폴리펩타이드이다 (Table. 2). 펩타이드 sequencing의 동일성 (homology)을 Fasta program (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi)을 사용하여 조사한 결과, 이 물질은 기존에 발견된 물질들과 유사성이 없는 새로운 펩타이드로 판명되었다. 편의상 이 물질을 starfish tubefeet antimicrobial peptide (SFTA)로 명명하였다.

3.2. Disulfide bond 유무 측정

SFTA에 DTT를 처리한 것과 처리하지 않은 물질을 Capcell-PAK C₁₈ column을 사용하여 각각 5% → 65% CH₃CH (30 min) 조건에서 분리한 결과, DTT를 처리하지 않은 SFTA는 약 17 min에서 peak가 용출되어 나왔다 (Fig. 8 A). 반면에 DTT를 처리한 SFTA의 경우는 10.1 min 과 12.3 min에서 DTT에 해당하는 peak가 나왔고, Fig. 8 A에는 없었던 약 17.5, 18.5 및 18.8 min에서 DTT에 의해 환원된 새로운 peak가 용출되어 나왔다 (Fig. 8 B). 이러한 결과는 SFTA 내에 disulfide bond가 존재하기 때문에 S-S결합이 환원되어 천연물과 다른 RT를 나타내는 물질이 형성되었음을 의미한다. 그러나 이러한 결과만으로 서열내의 disulfide bond 수를 정확히 예측할 수 없기 때문에 더욱 명확한 결과를 위해 cDNA cloning을 수행하였다.

4. 3'Rapid Amplification cDNA ends (3'RACE-PCR)

SFTA의 cDNA cloning을 하기 위해서 에드만 분해법으로 분석된 아미노산 서열로부터 degenerate primer를 작성하였다 (Fig. 9). SFTA-1 primer는 SFTA의 첫 번째에서 일곱 번째 아미노산 잔기까지, SFTA-2 primer는 세 번째에서 아홉 번째의 아미노산 잔기까지를 이용하여 작성하였으며 실험에 사용된 모든 primer는 table 3에 나타내었다. 이를 통하여 1차와 2차 PCR을 수행하고 Fig.11의 vector를 이용하여 약 900 bp의 2차 PCR product를 얻었다 (Fig. 10A). 이 band의 nucleotide sequence를 알아보기 위해 sequencing한 결과, 870 bp임이 밝혀졌다 (Fig. 10B). Fig. 10의 B는 분석된 염기서열의 결과이며, 밑줄로 표시된 부분은 SFTA-2 primer에 해당하는 부분을 나타내고 있다. 870 bp중에서 3' untranslated region (UTR)은 774 bp이었고, 말단에 poly A tail의 signal부분인 AATAAA과 poly A tail을 확인 할 수 있었다. cDNA 결과를 토대로 Edman 분해법에 의해 분석된 1차 서열과 비교 해 본 결과, 32번째 이후로 2개의 아미노산 잔기가 추가로 분석되어 SFTA는 총 34개의 아미노산으로 구성되어있다는 것을 확인하였으며, 10번, 19번, 21번 잔기의 X는 cystein으로, 14번째 잔기는 tryptophan으로 밝혀졌다 (Fig. 12 A). 이 결과를 토대로 N-말단의 정확한 아미노산 서열을 알아보기 위해 gene specific primer를 작성하여, 5' RACE를 진행 중에 있다.

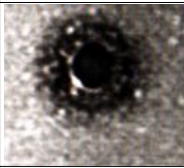
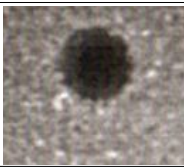
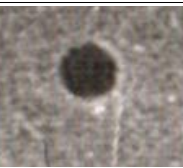
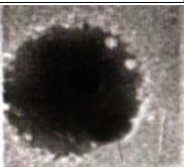
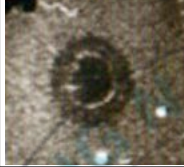
	Crude	D.W	RM 10	RM 60	RM 100
<i>B.subtillis</i> KCTC 1021					
<i>E.coli</i> D31					

Fig. 3. Antimicrobial activity of Sep-pak fractions against *B.subtillis* KCTC 1021 and *E.coli* D31

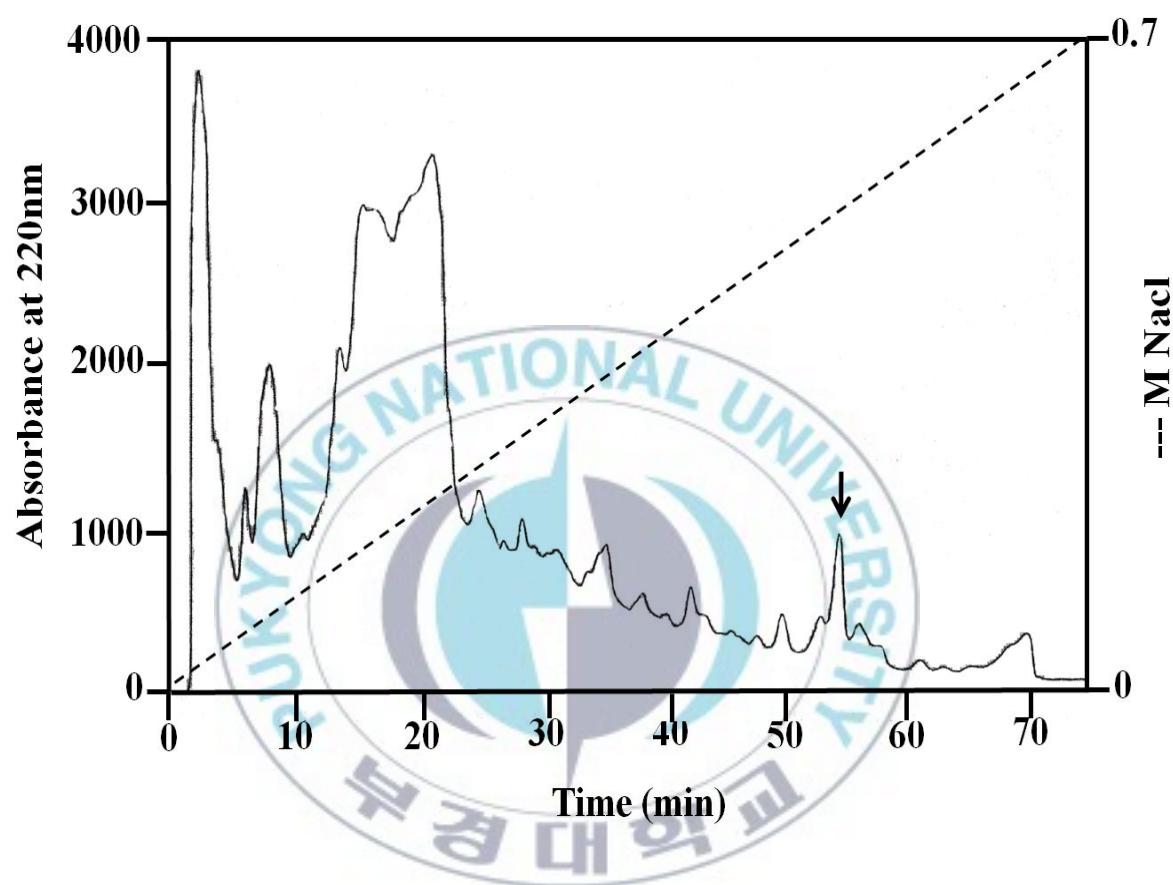


Fig. 4. The 1st cation-exchange HPLC profile of starfish tubefeet extract RM 60 on a TSK-gel SP-5PW column. RM 60 was eluted with a linear gradient of 0 M $\rightarrow$ 1 M NaCl in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) for 100 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The downarrow shows the fractions with the antimicrobial activity on the *B. subtilis* KCTC 1021.

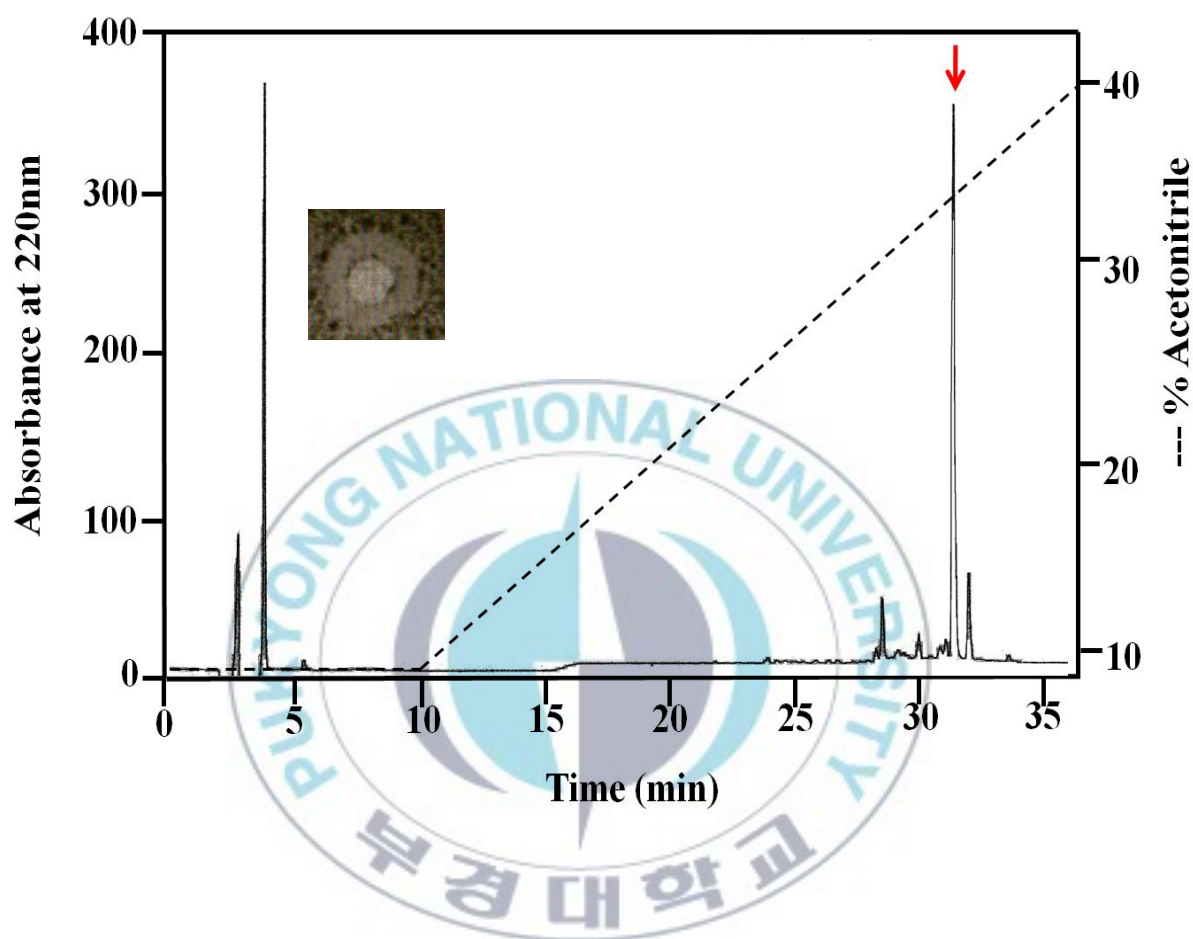


Fig. 5. The 2nd reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 10% → 10% (10 min) → 60% (50 min) ANC in 0.1% TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the antimicrobial activity on the *B. subtilis* KCTC 1021.

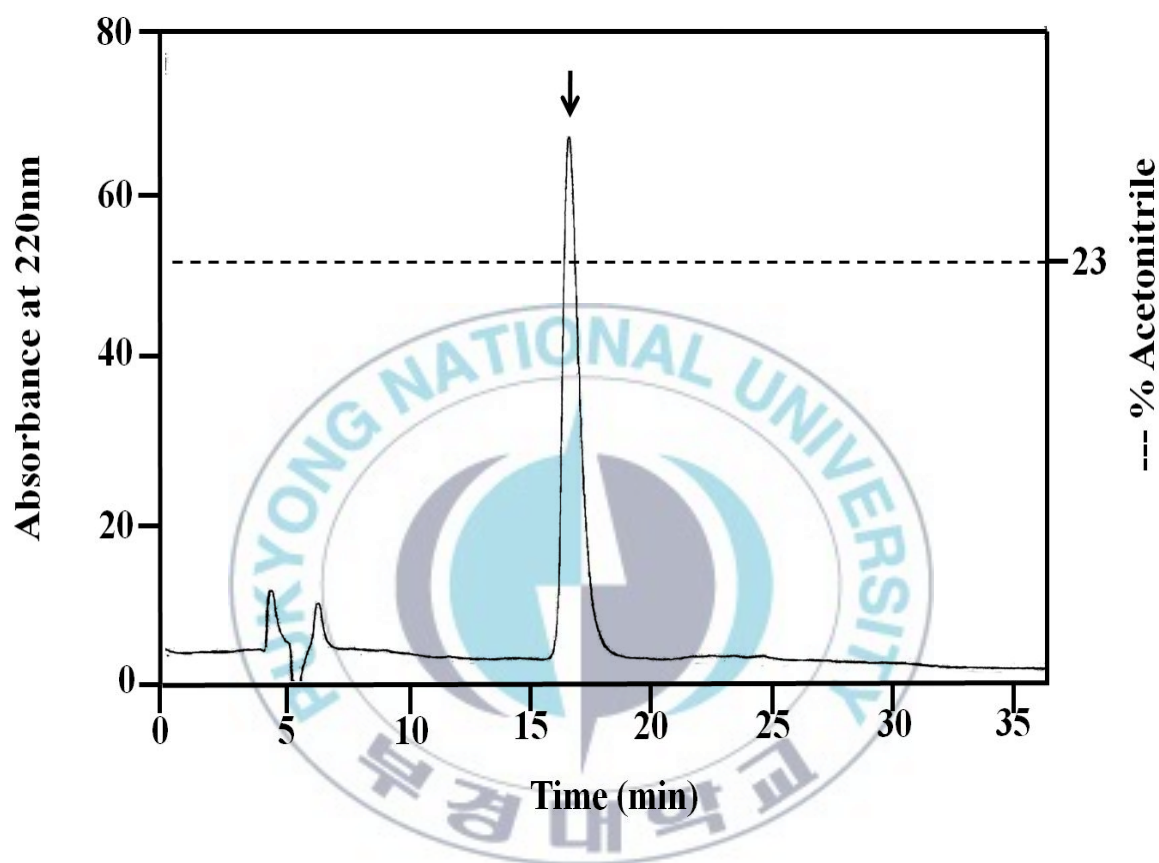


Fig. 6. The Final purification of SFTA on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted isocratically with 23% CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fraction with the antimicrobial activity on *B. subtilis* KCTC 1021.

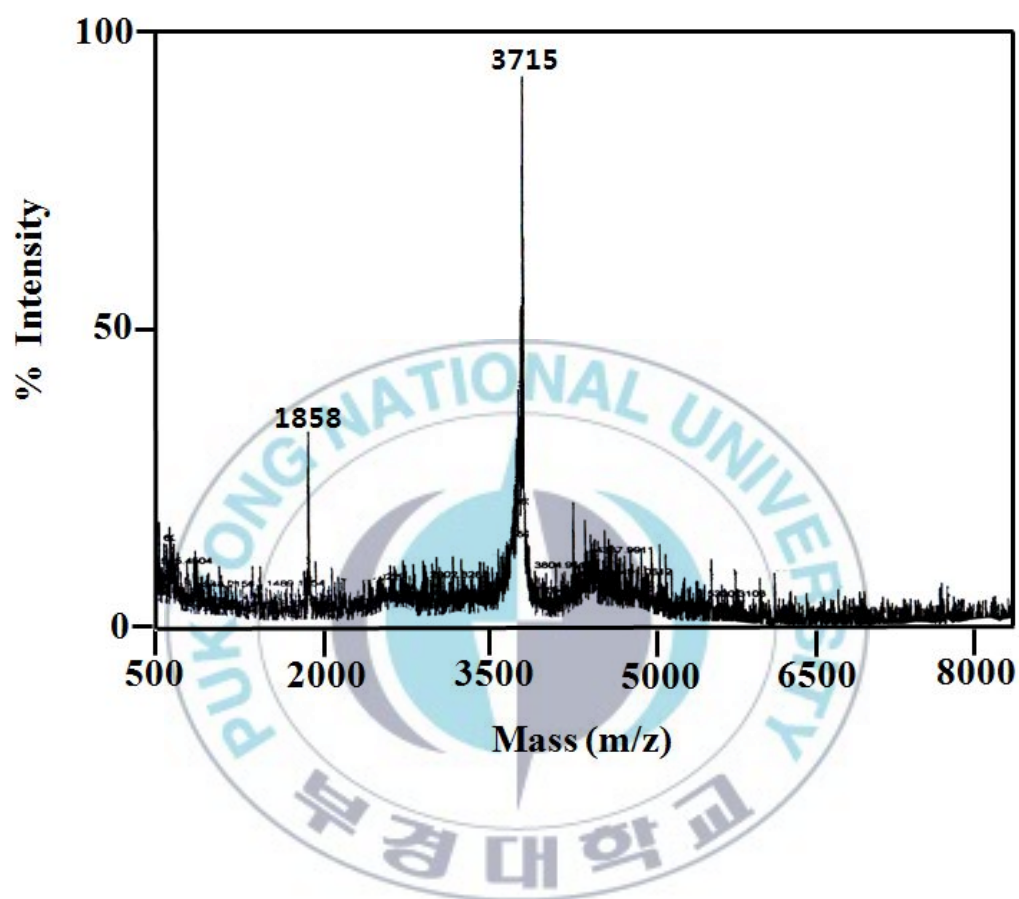


Fig. 7. Molecular weight of SFTA by MALDI-TOF.

Table 2. Amino acid sequence and molecular weight of SFTA isolated from the tube feet of starfish, *Asterina pectinifera*

Peptide	Observed (M+H) ⁺	Calculated (M+H) ⁺
GKKRNAYFNX ⁴⁰ DDEXGNPGXI ²⁰ XKLVRGKKST ³⁰ LN	3715	3533.07

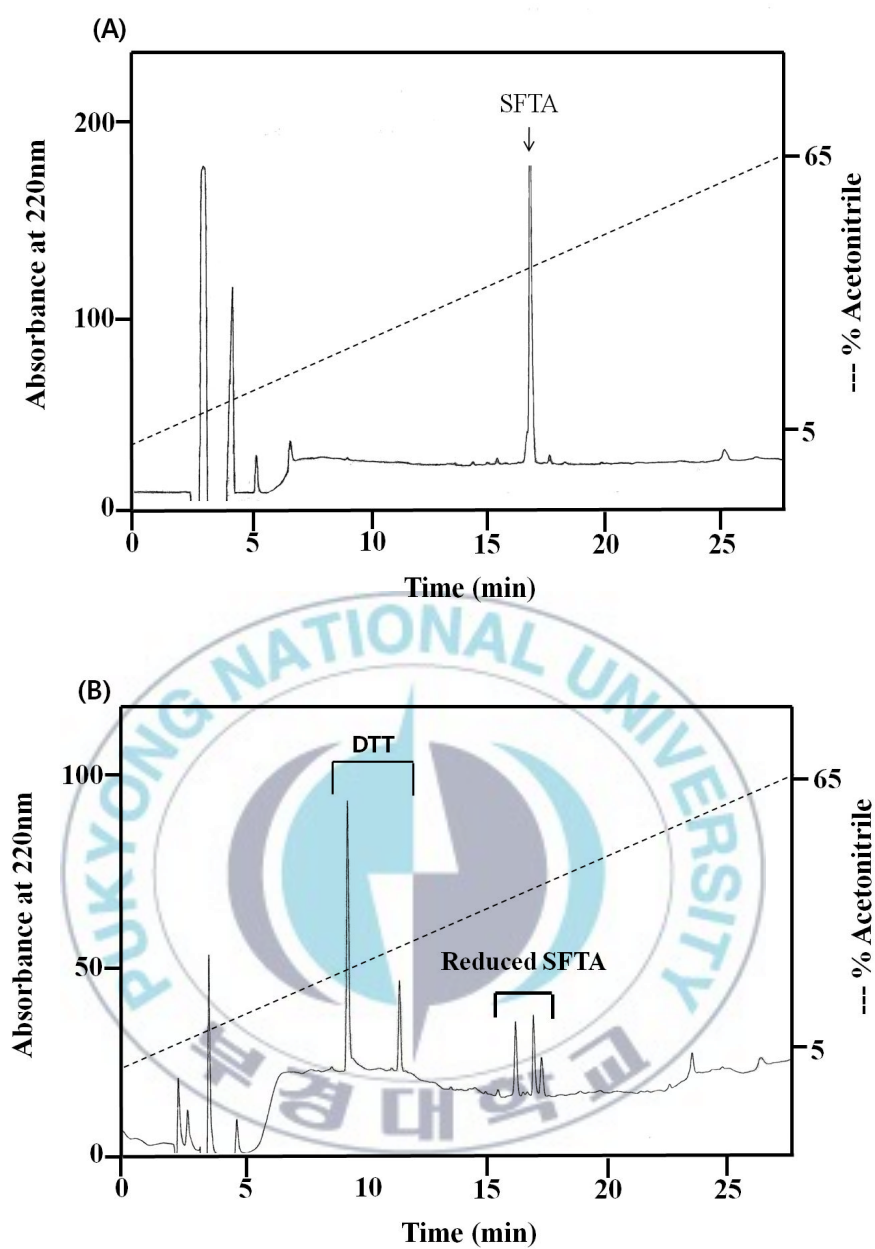


Fig. 8. Comparisons between HPLC profiles of the native SFTA (A), and SFTA treated with DTT (B). Two type of peptide were injected to a reverse-phase Capcell-PAK C₁₈ column and eluted with a linear gradient of 5% → 65% CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) for 30 min at a flow rate of 1.0 ml/min.

10

20

Gly Lys Lys Arg Asn Ala Tyr Phe Asn Xxx Asp Asp Glu Xxx Gly Asn Pro Gly Xxx Ile

GGN AAR AAR MGN AAY GCN TAY TTY AAY NNN GAY GAY GAR NNN GGN AAY CCN GGN NNN ATH

SFTA-1

SFTA-2

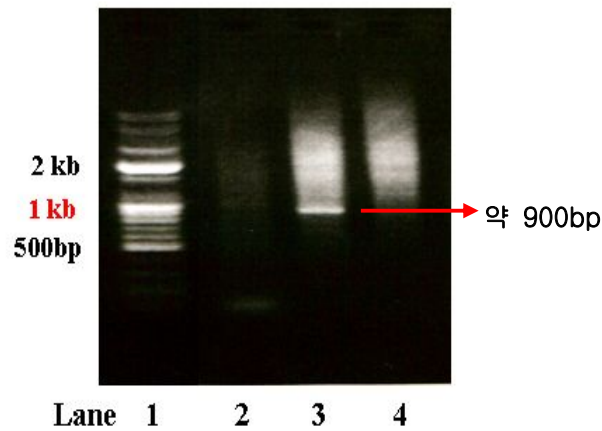
30

Xxx Lys Leu Val Arg Gly Lys Lys Ser Thr Leu Asn

NNN AAR YTN GTN MGN GGN AAR AAR WSN ACN YTN AAY

Fig. 9. Diagram of primer composition for the SFTA cDNA cloning.

(A)



(B)

AAGAGGAATGCTTATTTAACTGTGACGATGAATGGGGCAACCCAGGCTGCATCTGCAAA 60
SFTA-2
 K R N A Y F N C D D E W G N P G C I C
 TTGGTCAGGGGCAAGAAGTCTACCCTCAACTGCCTATAGACTGAGCATGCAGGCAAAGGT 120
 L V R G K K S T L N C L *
 TCGGGCAAGAACTGACTACCACTGAAGGGATTTTAGGACACTGATTACTATCGTTTTACG 180
 ACACGAATATCACAGATGGACTTCCTGTAATGCTTTAATCAATCTAAATAGGCTTTTAGG 240
 CGGGTAGAAAGTAGGCACCTTTGTGGTGCAAACGGCCGTTGGCACACTAAGAAGCGAAGGT 300
 TCCTCGAAATCTGTTCTGTACTTAATACTTTCGTTAGCAGGGGCCCCAGCTAATTATCTTG 360
 TTTCTGCATTCTTACTTTCCTCATTACCGAGAATGTACAGATGAAAAACGACGCACGCAT 420
 TAAATGGCCGTAGAGCAGTAGACAGAATGCCTAGTTATACCTTTGAAGGTCTCTCTCAC 480
 ATGACGTCACCTTCTACAGATTGCCACGCGCATCGGCATTTTGGGCGTCAATTTTTCGTG 540
 ACGCACATCGCCGCTGCGCCGTCGAAGAAAGTTCGAGCAACACGCAGTTGTAATTTTCCA 600
 ACGAAGATGGCGTCCTATGAGAGAGATCTAGAAGATTTTGTGCGAGTGTACTCAATGGCC 660
 GTTGATACACTAACTTAGAAAACCTCCATCATGCGTTCACGTTCTTCCCTTGTAACTCAGC 720
 TTGTTATTAATTTGAATGTAAAACTAAATATGCAATTAACTGCCAGGTTGTTAACG 780
 GGGTTGTGTAAGTACATACGGACGAAAAGCAATAAATAAACTATTCTCATGCAAAAC 840
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 870

Fig. 10. 3' RACE PCR products from cDNA of starfish tubefeet, *Asterina pectinifera* (A) and sequencing result (B). (A) Lane 1: Bioneer 100bp plus DNA ladder, Lane 2: SFTA-1 primer-related PCR product from *A. petinifera* cDNA, Lane 3: SFTA-2 primer-related PCR product from *A. pectinifera* cDNA, Lane 4: control.

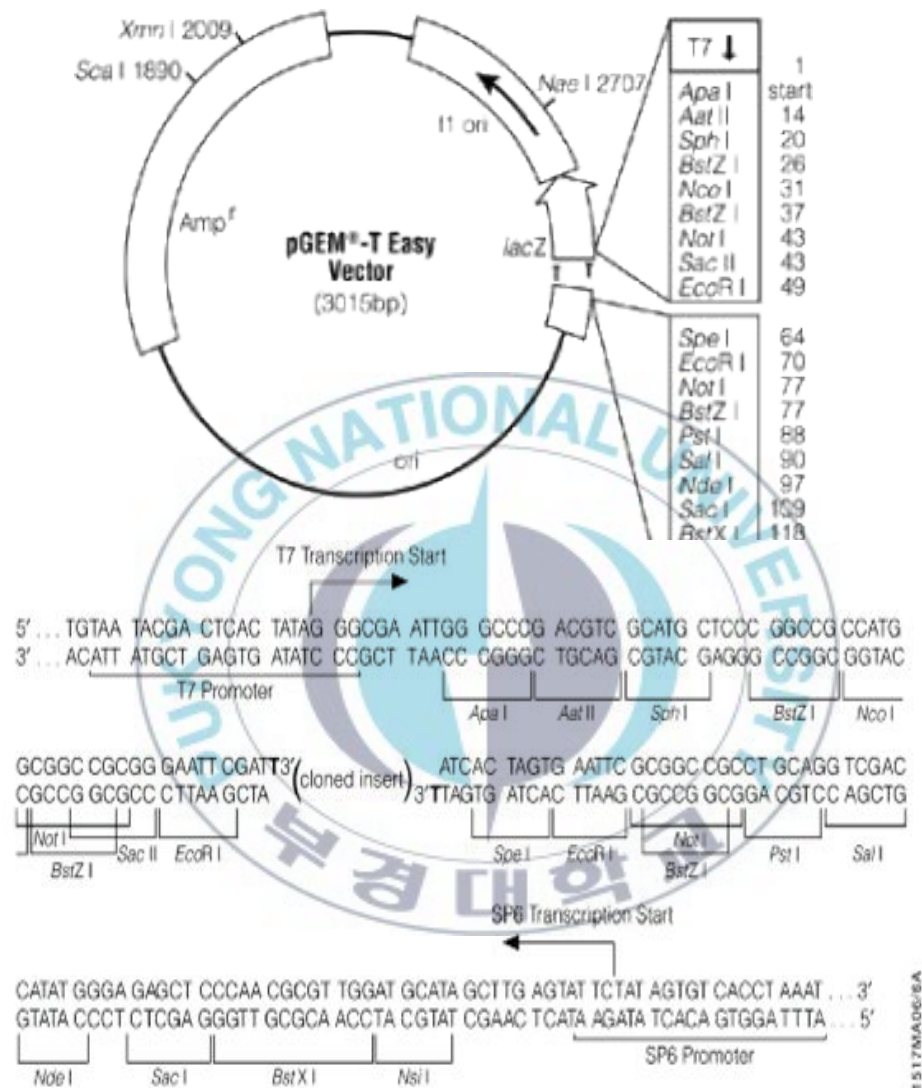


Fig. 11. pGEM-T Easy vector map.

5. SFTA의 2차 구조 예측

불가사리의 촉수로부터 정제한 항균활성 펩타이드는 EMBOSS garnier tool (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS/>)을 사용하여 2차 구조를 예측하였다 (Table 4).

SFTA의 2차 구조를 예측해 본 결과, N-말단 영역에서 turn구조를, 그리고 C-말단에서는 일정한 형태를 나타내지 않았다. SFTA의 1차 구조를 보면 1번째, 15번째, 18번째, 26번째에 Gly이 있고, 17번째에는 Pro이 존재한다. 또한 S-S bond를 가지고 있기 때문에 turn 구조와 β -sheet 구조로 이루어져 있을 것이라고 생각된다.



Table 3. Primers for 3'RACE of SFTA

First strand cDNA synthesis Primer	Sequence	Base (mer)
SMART™ 3'-RACE CDS Primer A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN-3'	57

Forward degenerate primer	Sequence	Base (mer)
SFTA-1 Primer	5'-GGNAARAARMGNAAYGCNTAY-3'	21
SFTA-2 Primer	5'-AARMGNAAYGCNTAYTTYAAY-3'	21

Reverse primer	Sequence	Base (mer)
SMART™ 10X Universal Primer A Mix	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	22
SMART™ Nested Universal Primer A	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	23

sheet, T; turn

sheet, T; turn

sheet, T; turn

IV. 토 론

항균 펩타이드는 세균으로부터 인간에 이르기까지 다양하게 발견되어졌고, 이러한 펩타이드들은 생체방어를 위한 수단으로 비 특이적 면역의 기능을 수행한다고 알려져 있다. 이와 같이 비 특이적 면역의 기능을 수행하는 새로운 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해서 본 연구에서는 불가사리의 촉수를 이용하였다. 서로 다른 분리 특성을 갖는 TSK-gel SP-5PW 및 Capcell-PAK C₁₈ column을 사용하여 정제한 결과, 최종 정제 물질은 기존에 보고된 항균활성 펩타이드와 서열의 유사성 (sequence homology)이 없는 새로운 항균활성 펩타이드였으며, 이 물질을 편의상 정제에 사용한 불가사리 촉수의 영문명을 따서 SFTA 라고 명명 하였다.

정제된 SFTA는 3715 Da으로 분자량 값이 측정되었고, 에드만 분해법에 의해 X로 읽힌 잔기를 포함하여 총 32개의 아미노산까지 분석되었다. 에드만 분해법의 특성상 분석물질의 농도부족, modified amino acid의 존재 또는 물질 서열 내에 cysteine이 존재할 경우 잔기가 잘 읽히지 않아 X로 분석되는 경우가 있다. 따라서 SFTA의 분석된 서열 내에 X를 cysteine으로 가정하고 분자량을 계산해 본 결과, 약 3533.1 Da으로 측정된 천연물 분자량인 3715 Da과 일치하지 않았다. 분자량 값이 다른 이유로 우선 X부분이 cysteine이 아닌 다른 잔기일 가능성이 있고, 두 번째는 에드만 분해법에 의해 일부 아미노산 잔기가 다른 잔기들로 잘못 분석되었을 가능성이 있다. 마지막으로 32개의 아미노산 이외에 추가로 아미노산이 더 존재할 가능성이 있다. 첫 번째 가능성을 알아보기 위해 SFTA에 disulfide bond를 환원시키는 DTT를 처리하여 RT의 변화를 조사하였다. 그 결과, main peak 하나가 2~3개로 나뉘어졌고, RT 또한 이동하여 서열 내에 적어도 1개 이상의 disulfide bond가 존재 할 것이라고 예측되어졌다 (Fig. 8). 그러나 이 결과만으로는 X잔기가 cysteine인지의 여부와 다른 잔기가 잘못 분석되었는지의 여부를 확인할 수 없기 때문에 SFTA의 완전한 일차서열을 알아보기 위해 cDNA work을 수행하였다. 그 결과, 에드만 분해법에 의하여 분석된 서열 중 10번, 19 및 21번 잔기의 X는 cysteine으로, 14번째 잔기는 Trp으로 밝혀졌다 (Fig. 12A). 또한 에드만 분해법에 의해 검출되지 않은 33번, 34번 잔기가 추가로 발견되었다. 이 결과들을 종합하여 34개의 잔기로 이루어진 펩타이드의 분자량은 3828.4 Da으로 측정된 천연물 SFTA의 분자량 값과 일치하지 않았다. 그러나 N-말단으로부터 33번째 잔기 cysteine까지의 분자량 값은 3715.2 Da으로 천연물에서 발견된 분자량 값과 일치하였다 (Fig.

12B). 따라서 SFTA의 1차 서열은 GKRNAYFNCDDWGNPGCICKLVRGKKSTLNC 일 것이라 예상된다. 그러나 아직 C-말단이 free-OH로 존재하는지 아니면 -NH₂형태로 존재하는지는 알 수 없다.

cDNA cloning 결과에서 33번째 잔기인 Cys 이후에 34번째 잔기로 Leu이 검출되었기 때문에 실제로 생체 내에서 합성된 것은 34개의 잔기로 구성된 폴리펩타이드일 것으로 예상된다. 그러나 SFTA를 정제한 결과 측정된 분자량 값은 33번째 잔기까지에 해당하는 값이었다. 이러한 차이점은 크게 두 가지 이유로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째로 추출 과정에서 pH나 온도의 영향에 의해 matrupeptide에 존재하는 Leu이 잘려 Cys까지의 펩타이드가 추출되었을 가능성이 있을 수 있다. 두 번째로 33번째 잔기인 Cys와 34번째 잔기인 Leu사이를 자르는 enzyme에 의해 잘려서 33개로 구성된 폴리펩타이드가 최종적으로 생성되었을 가능성이 있다.

Metalloprotease는 protease의 한 종류로 metal과 관련되어 가수분해 메커니즘을 수행하는 enzyme이며 주로 zinc-dependent와 cobalt를 필요로 하는 경우가 많다. 이는 metalloexopeptidases와 metalloendopeptidases로 나누어지며 이 중 metalloendopeptidases에는 ADAM proteins과 matrix metalloproteinasesmetal이 포함되어 있는데 collagen과 gelatin을 가수분해 한다고 알려져 있다. 이러한 metalloprotease 종류 중에서 Ser과 Leu의 아미노산 사이를 자르는 경우도 있고 (Gogola., 2002), Leu과 Ile의 사이를 자르는 경우도 있다 (Sires., 1993). 또한 기질 내에서 Cys-Leu과 Ser-Leu과 같은 cleavage site가 존재하는 경우도 이들의 peptide bond를 자른다고 하는 보고도 있다 (Moncrief et al., 1995). 따라서 SFTA의 경우도 생체내에서 존재하는 metalloprotease에 의해 서열 내에 Cys와 Leu사이가 잘려서 Cys까지가 1차 서열 결과로 분석되었을 것으로 추측된다 (Fig. 12C).

SFTA의 완전한 1차 서열의 S-S bond를 기준으로 2차 구조를 예측해 보았다. Table 5에서 나타내듯이, Cys (C)의 위치에 따라서 C¹⁰-C¹⁹, C²¹-C³³ 결합형태 (A type)와 C¹⁰-C²¹, C¹⁹-C³³ 결합형태 (B type)와 그리고 C¹⁰-C³³, C¹⁹-C²¹ 결합형태 (C type)로 형성 가능하다. A type은 C¹⁹-I-C²¹을 기준으로 양쪽에 크게 두 부분의 날개 모양으로 2차구조가 형성되어 있다. 또한 A type의 11번, 12번 및 13번째 잔기에는 음전하를 띄는 아미노산들이 있고, 22번, 25번, 27번 및 28번째 잔기에는 양전하를 띄는 아미노산들이 존재한다. 만약 C¹⁹-V-C²¹을 기준으로 2개의 ring으로 형성된 β -sheet 구조가 폴더모양으로 접힌다면, 양전하 아미노산과 음전하 아미노산 사이에 salt bridge가 형성되어 안정한 지지대가 형성될 것이다. B type은 C¹⁹-I-C²¹을 기준으로

C¹⁰과 C³³까지가 연결되어 있어 전체적으로 가장 안정한 형태를 취할 것으로 추측된다. 마지막으로 C type은 s-s bond가 turn을 형성하는 부위에 위치하고 있어서 전체적으로 flexible한 형태를 나타내어 가장 불안정한 형태를 나타낸다. 따라서 가상의 2차 구조 model의 결과를 보았을 때, SFTA의 2차 구조는 A 및 B type이 C type보다 안정한 형태로 존재할 가능성이 높다.

지금까지 발견된 일반적인 항균성 펩타이드들은 α -helix, β -sheet, random coil을 포함한 불규칙적인 구조를 취한다고 알려져 있다. SFTA의 경우에도 helix breaker로 알려진 Gly 및 Pro (Picotti et al., 2004)이 1, 15, 18 및 26번째 위치와 17번째 위치에 각각 존재한다. 2차 구조 예측 프로그램을 통해 SFTA는 예상한 바와 마찬가지로 β -sheet 및 turn구조를 우선적으로 취할 것으로 생각되어진다. 또한 SFTA의 net charge는 +4이고 PI값은 9.13으로 basic한 성질을 가지고 있어 bacteria의 membrane의 - charge와 SFTA의 + charge가 이온결합을 통하여 서로 결합할 것으로 예측되며, 이온결합 이후 항균활성 mechanism중에 Barrel-stave 또는 Carpet-like의 방법으로 bacteria를 사멸시킬 수 있을 것이라 예상된다.

현재 밝혀진 일차 서열을 바탕으로 기존에 알려진 항균성 펩타이드와 동일성을 조사한 결과, SFTA는 다른 물질들과 상동성을 나타내지 않았다. 그러나 최근 본 연구실에서 같은 불가사리 종의 조직, DRM을 포함하는 perivisceral coelom과 gill로부터 정제한 SFM-II와의 서열을 비교분석 해본 결과, 약 80% 이상의 잔기가 유사하다는 것을 발견하였다(Fig. 13). 특히 이들 펩타이드 서열의 중간영역이 유사한 특징을 지니고 있는데 아마도 이 영역은 이들 펩타이드들에 있어서 보존영역일 것이라 생각되며, 또한 이를 기준으로 양 옆의 부분은 variable한 부분으로 예측되어진다. 그러나 이들 펩타이드간에 앞쪽 variable한 부분에 GRK 또는 GKK와 같은 유사한 부분이 존재하고 보존영역에서도 마찬가지로 2개의 아미노산 잔기가 다르지만 E와 D는 같은 산성 아미노산, F와 W는 또한 방향족 아미노산으로 같은 종류에 속하여 사실상 유사성이 매우 높다고 생각되어진다. 이 두 아미노산의 3'RACE 결과에 따른 codon을 비교해 본 결과, 산성 아미노산 E는 GAA, D는 GAC로 하나의 codon이 다르다. 이러한 one point mutation은 두 물질 간에 있어서 아미노산 서열 간에 있어서의 유사성보다도 genomic 상에 있어서 더 높은 유사성을 나타내 준다고 볼 수 있다. 또한 SFTA와 SFM-II는 Cys들의 위치도 같은 곳에 있기 때문에 S-S bond의 형태뿐만 아니라 동일한 β -sheet 구조를 취할 것이라 생각된다.

두 펩타이드의 활성을 비교해보면, SFTA의 crude와 Sep-pak fraction들은 gram-positive는 물론 gram-negative bacteria에도 활성을 나타내었지만, SFM-II의 crude와 Sep-pak fraction들은 gram-negative bacteria에 대해 약한 활성을 나타냈고 -positive bacteria에 보다 강한 활성을 나타내었다. 또한 최종 정제된 SFTA는 *B.subtilis* KCTC 1021와 *E.coli* D31에는 활성이 약했지만 *shigella sonnei*에 약 37.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 높은 활성을 보였다. 한편 정제된 SFM-II는 *B.subtilis* KCTC 1021와 *candida albicans*에 비교적 강한 활성을 나타냈지만, *shigella sonnei*에 대해서는 SFTA보다 약한 활성을 나타냈다. 이들 펩타이드들이 서로 다른 균주에 대해 항균활성이 다른 점으로 미루어 보아 이 두 개의 펩타이드는 불가사리 면역계 내에서 균주별로 specific하게 서로 상호 보완하여 작용을 할 가능성이 있을 것이라 생각된다. 이러한 SFM-II와 SFTA의 활성차이는 N-terminal 말단 영역에 존재하는 + charge 부분의 차이에 의해 발생가능하다고 예측된다. SFM-II는 N-말단에서 2번째, 5번째, 및 9번째 잔기에 Arg이 존재하고 3번째와 6번째에 Lys이 존재하여 +5의 charge를 가진다. 한편 SFTA의 N-말단에는 2번째와 3번째에 Lys이 존재하고 4번째에 Arg이 존재하여 +3의 charge를 띈다. 이러한 차이가 bacteria의 membrane에 분포하고 있는 음전하와 펩타이드에 존재하고 있는 양전하가 서로 정전기적인 상호작용 후, 항균 활성 차이가 나타나는 요인이 될 지도 모른다.

이 두 펩타이드에 대한 자세한 항균활성 차이 및 메커니즘 차이, 상승반응의 유무는 앞으로 진행할 예정이며 SFTA의 5'RACE work도 진행하여 signal 및 ORF 부분 등 완벽한 gene서열도 밝힐 예정이다.

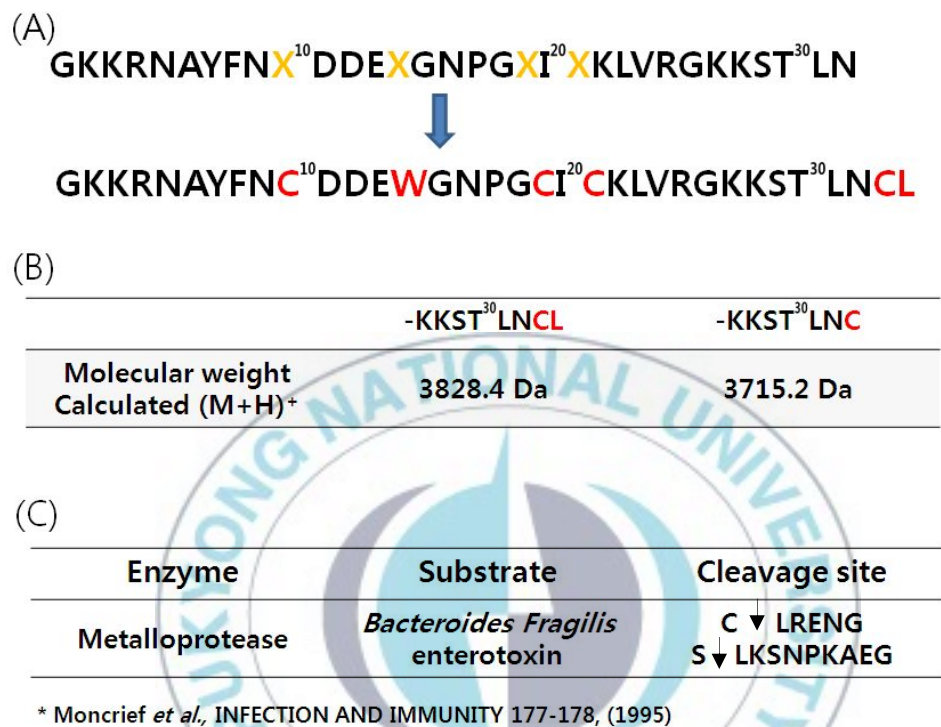


Fig. 12. Primary structure and calculated molecular weight of SFTA and cleavage site of enzyme. Compared results of Edman degradation and 3' RACE sequencing (A), calculated molecular weight of two type SFTA (B), metalloprotease's substrate and cleavage site (C).



Fig.13. Comparison of SFM-II and SFTA primary sequence. SFM-II was isolated from the muscle of starfish, *Asterina pectinifera*



Table 5. Secondary structure model of SFTA

		Secondary structure model
Type 1	$ \begin{array}{c} R-C^{10} \text{ --- } C^{19} \text{ I } C^{21} \text{ --- } C^{33} \\ \text{---} \quad \quad \quad \text{---} \end{array} $	
Type 2	$ \begin{array}{c} R-C^{10} \text{ --- } C^{19} \text{ I } C^{21} \text{ --- } C^{33} \\ \text{---} \quad \quad \quad \text{---} \end{array} $	
Type 3	$ \begin{array}{c} R-C^{10} \text{ --- } C^{19} \text{ I } C^{21} \text{ --- } C^{33} \\ \text{---} \quad \quad \quad \text{---} \end{array} $	

* R = GKKNAYFN

V. 참 고 문 헌

- Billett, D.S.M., 1991. Deep-sea holothurians. *Oceanography and Marine Biology*, 29, 259–317.
- Cole, A.M., Weis, P. and Diamond, G., 1997. Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *J. Biol. Chem.* 272, 12008–12013.
- Dayton, P.K., Rosenthal, R.J., Mahen, L.C. and Antezana, T., 1977. Population structure and foraging biology of the predaceous chilean asteroid *Meyenaster gelatinosus* and the escape biology of its prey. *Mar. Biol.* 39, 361–370.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., VanDorsselaer, A., Rodriguez, J. and Bachere, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Biol. Chem.* 272, 28398–28406.
- Gogola, T.V., Crawford, H.C., Fingleton, B. and Matrisian, L.M., 2002. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human fas ligand. *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 155–161.
- Hancock, R.E.W. and Chapple, D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1317–1323.
- Hancock, R.E.W. and Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8, 402–410.
- Martínage, A., Belaiche, D., Dupressoir, T. and Sautière, P., 1983. Primary Structure of Histone H2A from Gonads of the Starfish *Asterias rubens*. *Eur. J. Biochem.* 130, 465–472.
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. and Roch, P., 1999. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel,

Mytilus galloprovincialis. Eur. J. Biochem. 265, 71–78

Moncrief, J.S., Obiso, R., Barroso, L.A., Kling, J.J., Wright, R.L., Tssell, R.L.V., Lyerly, D.M. and Wilkins, T.D., 1995. The enterotoxin of bacteroides fragilis is a metalloprotease. Infect. Immun., 175–181.

Nakamura, T., Furunake, H., Myyata, T., Tokunaga, T., Muta, T. and Iwanaga, S., 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptides from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J. Biol. Chem. 263, 16709–16713.

Ovchinnikova, T.V., Aleshina, G.M., Balandin, S.V., Krasnosdembskaya, A.D., Markelov, M.L., Frolova, E.I., Leonova, Y.F., Tagaev, A.A., Krasnod embsky, E.G. and Kokryakov, V.N., 2004. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. FEBS Letters. 577, 209–214.

Park, C.B., Lee, J.H., Park, I.Y., Kim, M.S. and Kim, S.C., 1997. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. FEBS Lett. 411, 173–178.

Park, I.Y., Park, C.B., Kim, M.S. and Kim, S.C., 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. FEBS Lett. 437, 258–262.

Picotti, P., Marabotti, A., Negro, A., Musi, V., Spolaore, B., Zamboni, M. and Fontana, A., 2004. Modulation of the structural integrity of helix F in apomyoglobin by single amino acid replacements. Protein sci, 13, 1572–1585.

Seo, J.K., Crawford, J.M., Stone, K.L. and Noga, E.J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 338, 1998–2004.

Sires, U.I., Griffin¹, G.L., Broekelmann¹, T.S., Mecham, R.P., Murphy, G., Chung,

A.E., Welgus, H.G. and Senior, R.M., 1993. Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 25, 2069–2074.

Subramanian, S., Ross, N.W., and MacKinnon, S.L., 2009. Myxinidin, A Novel Antimicrobial Peptide from the Epidermal Mucus of Hagfish, *Myxine glutinosa* L. Mar. Biotechnol. 11, 748–757.



<Part II>

Purification and characterization of a novel neuropeptide from the tubefeet of starfish, *Asterina pectinifera*

Hye Rim Kim

Department of Biotechnology

Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea.

Abstract

A novel neuropeptide, named starfish tubefeet neuropeptide (SFTN) with contractile activity on the dorsal retractor muscle (DRM) of starfish was isolated from the acidified tubefeet extract of starfish, *Asterina pectinifera*.

To purify the contractile peptide, the acidified extract was partially purified with Sep-pak C₁₈ solid-phase extraction cartridges using stepwise gradient with increasing the percent of acetonitrile (10%, 60%, 100%) containing 0.1% TFA. The contractile activity was recovered in the 60% acetonitrile fraction. This fraction was further separated by C₄ reversed phase, gel-filtration and C₁₈ reversed phase HPLC and a contractile active peptide was purified to homogeneity.

For the characterization of the purified peptide, the molecular weight and amino acid sequence analysis were performed by MALDI-TOF MS and Edman degradation. The molecular weight and partial primary sequence of this material turned out to be 3465 Da and GNAXXKGTXHEIPPGGNNPYYAVLXGEXNT. Comparison of the amino acid sequence with that of known neuropeptides revealed that the SFTN is a novel peptide having contractile activity on the starfish DRM. To confirm the primary structure, cDNA work is in process.

1. 서론

신경전달물질은 일반적으로 아미노산계, 아민계 그리고 펩타이드계의 물질들로 나누어진다. 그 중 펩타이드 계는 세포 사이에 신호를 전달하는 신경계 내 분자들과 같이 신호전달 및 조절 역할을 하며, acetylcholine (ACh)과 같은 비 펩타이드성 transmitter와 함께 방출되어 생리적 조절에 연관되어있다고 알려져 있다 (Barchas et al., 1985)

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

이러한 신경성 peptide들에 대한 연구는 척추동물과 무척추동물에서 활발히 진행되고 있다. 그 중 무척추동물의 중추신경계는 그 system이 비교적 간단하고 이해하기 쉽기 때문에 최근 많은 연구가 이루어지는 대상중의 하나이다. 무척추동물 중 특히 연체동물에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있으나 무척추동물의 근육계보다 척추동물의 근육계와 유사할 것이라 생각되어지는 극피동물을 이용한 연구는 비교적 미비한 실정이다 (Elphick and Melarange, 2001). 극피동물에 있어 신경전달물질에 관한 연구는 ACh, catecholamine과 GABA와 같은 대표적인 신경전달물질들의 활성 연구에 제한되어 있다 (Bacq, 1935; Beauvallet, 1938; Garcia-Arraras et al., 1991).

1992년 해삼 (*Holothuria glaberrima*)의 rectum과 longitudinal muscle band에서 ACh에 의해 유발된 수축작용에 대해 이완활성을 나타내는 GFSKLYFamide, SGYSV-LYFamide가 보고된 바 있으며, immunoreactivity 기법을 이용한 연구결과 이들 물질이 해삼의 몸 전체에 넓게 분포하고 있음이 밝혀졌다 (Diaz-Miranda et al., 1995a). 또한, 해삼 (*Stichopus japonicus*)의 longitudinal muscle과 body wall로부터 해삼의 longitudinal muscle에 수축활성을 갖는 NGIWYamide와 intestine으로부터 이완활성을 유발하는 GYSPFMFamide 및 FKSPFMFamide가 보고되어졌다 (Iwakoshi et al., 1995). 뿐만 아니라, 불가사리 (*Asterina pectinifera*)의 radial nerve cords로부터 gonad-stimulating substance (GSS) (Chaet et al., 1959)와 불가사리 (*Asterina rubens*와 *Asterina forbesi*)의 radial nerve cord로부터 cardiac stomach (CS), tube

foot 및 apical muscle에 대해 근육 이완 활성을 가지는 SALMFamides인 GFNSAL-MFamide (S1)과 SGPYSFNSGLTFamide (S2)가 발견되었으며 이들은 극피동물의 종에 있어서 특이적으로 규명된 최초의 신경성 펩타이드였다 (Elphick et al., 1991). 면역조직학적 연구 결과로부터 S1과 S2는 radial nerve cord 와 tube foot ectoneural nerve plexus에 넓게 존재하고 있으며 (Moore and Thorndyke, 1993; Newman et al., 1995a와 b), 특히 CS의 이완현상은 stomach이 밖으로 뒤집혀 나와 feeding에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Melarange et al., 1999). 또한 Nitric oxide와 SALMFamide가 *in vivo*상에서 CS의 이완활성에 있어 neuronal control을 매개할지도 모른다는 연구가 보고된 바 있다 (Elphick and Melarange, 2001).

극피동물에는 대표적으로 불가사리류, 해삼류, 성게류 등이 속해 있으며 이들 중 불가사리는 전형적으로 5개의 팔을 가진 편평한 별모양으로 존재한다. 불가사리의 5개의 팔에 모두 존재하는 촉수는 움직임과, 먹이잡이를 담당하는 기관이다. 움직임은 하나의 팔을 앞쪽으로 뻗쳐 촉수를 사용하여 몸을 진행방향으로 눌러 진행함으로써 이루어진다. 진행방향으로 뻗친 촉수는 흡반을 바닥 쪽에 붙이고 흡반의 중심부에 진공을 생기게 하여 분비한 점액과 함께 바닥면에 흡착시켜 촉수를 후방으로 흔들며 전진한다. 이와 같은 촉수의 움직임은 water vascular system과 연관되어 있어 수압에 의해 ampulla가 받는 압력이 증가하면 ampulla muscle이 수축되어 촉수가 늘어나게 되고, ampulla muscle이 이완되면 촉수는 짧아짐의 원리로 조절되어 진다 (Fig. 1).

이와 같은 촉수의 운동성을 기반으로 보았을 때 근육의 움직임과 연관되어 있는 신경성 펩타이드가 존재 할 것이라 예측하여 본 연구에서는 극피동물인 별 불가사리 (*Asterina pectinifera*) DRM에 대한 수축활성을 지표로 하여 불가사리 촉수로부터 신경성 펩타이드를 분리·정제 하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1 실험동물

실험에 사용한 별 불가사리 (*Asterina pectinifera*, 100마리)는 부산 청사포에서 직접 채집하여 해수 순환되는 수조에서 일정한 수온을 유지하여 추출직전까지 정치시켜 두었다. 살아있는 상태의 불가사리로부터 촉수조직을 분리한 후, 액체질소로 급속 동결시켜서 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 보관하였다.

1.2. 시약 및 재료

시료의 여과를 위한 Millex-LCR₁₃ ($0.5\ \mu\text{m}$), Ultrafree-MC ($0.45\ \mu\text{m}$), Syringe filter ($0.44\ \mu\text{m}$)와 Sep-Pak C₁₈ cartridge는 Waters사 (Milford, MA, USA)에서 구입하였다. HPLC-grade의 water (H_2O) 및 acetonitrile (CH_3CH)은 TEDIA사 (Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 추출

2.1.1. 별 불가사리 촉수조직으로부터 평활근 수축 물질의 추출

불가사리 촉수조직 (100마리)을 조직의 4배 volume에 해당하는 1% acetic acid를 첨가하여 100°C 에서 5 분 동안 끓인 후 냉각시켰다. 호모게나이저 (IKA[®] T10 basic ULTRA-TURRAX, USA)로 조직을 파쇄 하여 4°C 에서 40분 동안 10,000 rpm로 원심 분리를 하였다. 얻어진 상층 액 (608 ml)은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 약 20 ml씩 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 주입하였다. 우선 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 0.1% TFA가 포함된 100% CH_3CH 로 활성화시킨 후, 0.1% TFA가 포함된 H_2O 로 충분히 평형화 하였다. 충분히 평형화가 된 cartridge에 시료를 주입하여 0.1% TFA가 포함된 H_2O (D. W), 10% CH_3CH (retained materials; RM 10) 및 60% CH_3CH (RM 60)과 100% CH_3CH (RM 100)로 물질들을 각각 용출시켜 분리한 후 근수축 활성 측정에 사용하였다.

2.2. 평활근 수축활성 측정

별 불가사리 측수의 조직추출물 및 정제과정에서 얻은 분획 물들의 생리활성을 측정하기 위해 별 불가사리 DRM을 사용하였다.

2.2.1. 조직의 표본제작

2.2.1.1 불가사리 dorsal retractor muscle (DRM)

불가사리 측수조직추출물 및 HPLC 정제단계에서 얻은 분획의 수축활성을 측정하기 위해 불가사리 DRM을 사용하였다. 불가사리의 eye spot을 제거한 후 배면과 복면을 분리하여 배면을 뒤집으면, 5개 팔을 따라 중앙을 가로지르는 DRM이 있다. 이 muscle을 mess로 분리한 후, 20 mm정도의 단편으로 만들었다. 모든 과정은 55 mM ASW buffer 하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 55, Glucose 10, and Tris-HCl (pH 7.8) 10.

2.2.2. 수축활성의 측정

2.2.2.1. 불가사리 DRM 에 대한 수축활성 측정

준비된 DRM을 반응조의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 resting tension이 1.0 g이 되도록 30 분간 평형화시켰다. 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10^{-5} M의 Ach을 투여하여 근육을 활성화시켰다. 이후 준비된 각 HPLC 정제단계에서 얻은 분획을 투여하였다. 시료들은 주입한 후 수축활성을 측정하여 physiograph상에 기록하였다(Fig. 2).

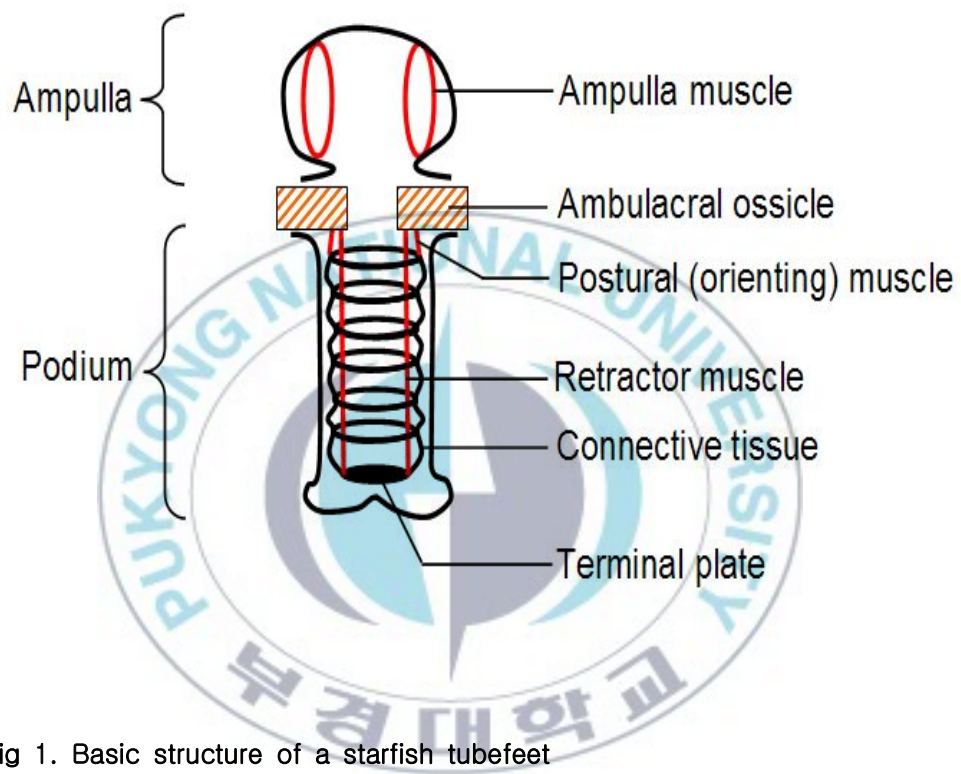


Fig 1. Basic structure of a starfish tubefoot

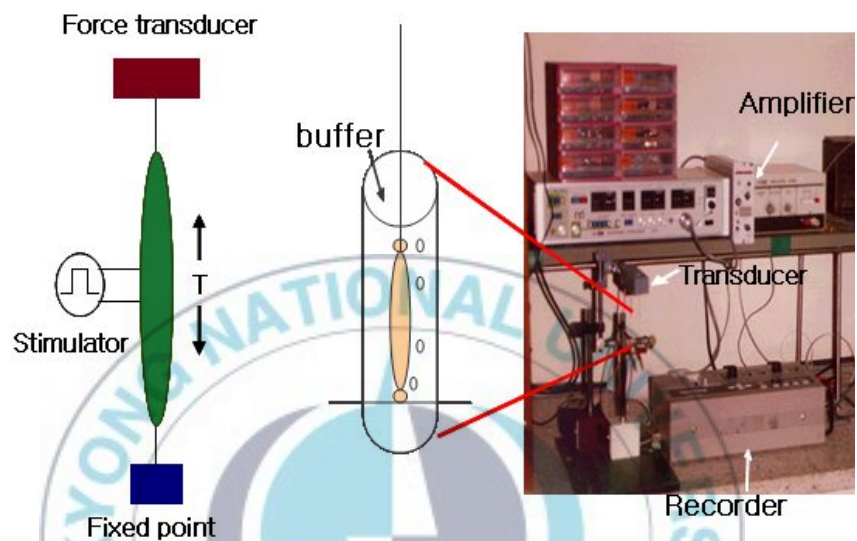


Fig. 2. Physiography system to measure the contractile effect on the smooth muscle.

2.3. 측수조직 추출물 (RM 60)로부터 평활근 수축활성 펩타이드의 정제

정제과정은 총 4단계로 역상 column과 gel column을 사용하여 최종 정제하였다 (Fig. 3). 정제과정에 사용된 HPLC는 3파장(220, 254 및 280 nm)이 동시에 측정 가능한 HP 1100 series diode-array detector (Hewlett Packard, USA)을 사용하였다.

평활근 수축 활성을 나타낸 RM 60을 첫 번째로 Vydac C4 (4.6 mm X 150 mm, Tosoh, Japan)를 사용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다: A 용매; 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함하는 100% acetonitrile (CH₃CH) (pH 2.2), 조건; 10 → 65% (40 min), 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/min, 온도; 실온

두 번째 단계로, 첫 번째 단계에서 활성을 나타낸 분획들을 겔 여과 column (Superdex peptide HR 10/30, 10 × 300 mm, Pharmacia, Sweden) 에 주입하여 정제하였으며 분리조건은 다음과 같다: A 용매; 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CH (pH 2.2), B용매 30%의 isocratic 조건으로 용출, 파장; 220 nm, 유속; 0.5 ml/min, 온도; 실온

세 번째 단계로, 두 번째 단계에서 활성을 나타낸 분획을 Capcell-PAK C₁₈, (4.6 × 250 mm, Shiseido, Japan) column을 사용하여 정제하였으며 분리조건은 다음과 같다: A 용매; 0.1% TFA를 포함하는 H₂O (pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CH (pH 2.2), 조건; 20 → 60% (50 min), 파장; 220 nm, 유속; 1.0 ml/min, 온도; 실온

마지막 단계로, 세 번째 단계에서 활성을 나타낸 분획을 동일 C₁₈ column으로 29% CH₃CH isocratic 조건에서 최종 정제하였다

Starfish, *Asterina pectinifera*

Tubefeet extracts



C₁₈ cartridge



RM60



CX HPLC



Gel HPLC



C₁₈ HPLC



C₁₈ HPLC



SFTN

Fig. 3. Summarized procedures for the purification of SFTN from the tubefeet of Starfish (*A. pectinifera*)

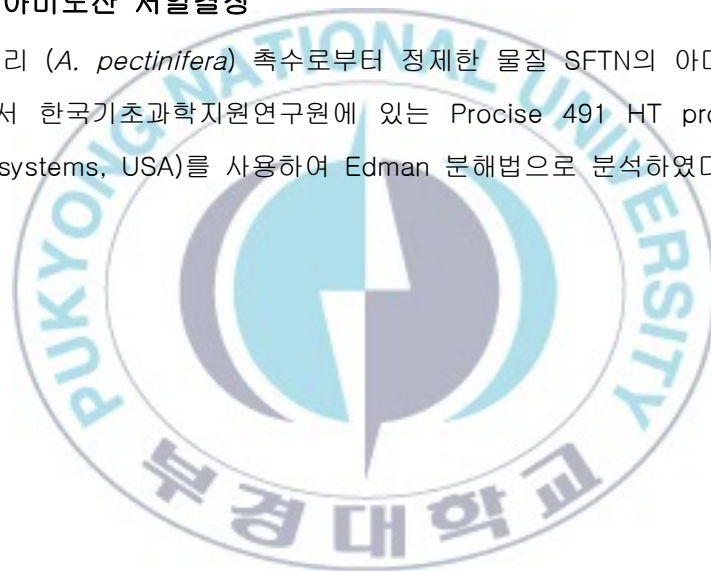
2.4. 천연펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정

2.4.1. 분자량 측정

천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 측정은 부경대학교 공동실험실습관에 있는 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DETM PRO spectrometer, Perseptive Biosystems, USA)를 사용하여 측정하였다. Matrix는 α -cyano-4-hydroxycinamic acid 를 사용해 측정하였다.

2.4.2. 아미노산 서열결정

별 불가사리 (*A. pectinifera*) 측수로부터 정제한 물질 SFTN의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 한국기초과학지원연구원에 있는 Procise 491 HT protein sequencer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.



III. 결과 및 토론

1. 별 불가사리 촉수조직 추출물의 평활근 수축활성 측정

불가사리 촉수로부터 새로운 평활근 수축성 펩타이드를 정제하기 위해서 1% 초산으로 추출한 추출물을 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 0%, 10%, 60% 및 100% CH₃CH으로 추출을 한 후, 각각 불가사리 DRM에 대해 수축활성을 측정하였다 (Fig. 4).

이때의 추출물은 5마리 분량으로 활성을 측정하였고 Sep-pak fraction (20 ml) 들은 추출물의 1/10 분량으로 활성을 측정하였다. 그 결과, 10%와 60%에 수축활성이 나타났고 D.W 층에도 약간의 활성을 보였다. 그러나 일반적으로 D.W 층은 ACh 및 catecholamine등과 같은 amine류를 많이 포함하고 있으며, RM 10 층은 serotonin, dipeptide와 같은 저분자 친수성을 나타내는 물질이, RM 60과 RM 100에는 펩타이드와 소수성 물질들이 포함되어 있다고 알려져 있다. 따라서 불가사리 활성이 약하게 나타난 D.W 층의 경우 amine류의 물질에 의해 근육의 수축활성을 증가시키는 활성을 나타낸 것으로 생각되며, RM 10의 활성은 저분자 친수성을 나타내는 물질에 의한 활성이, RM 60은 펩타이드성의 물질에 대한 활성일 것이라 생각된다. 따라서 RM 60을 이용하여 다음 정제과정을 진행하였다.

2. 촉수조직 추출물 (RM 60)로부터 평활근 수축활성 펩타이드의 정제

평활근 수축 활성을 나타낸 RM 60을 정제하기 위해 첫 번째로 Vydac C4 column (4.6 mm X 150 mm)를 사용하였으며, 분리된 분획들은 불가사리 DRM에 대해 수축활성을 측정하였고 약 29.6 min에서 용출된 peak에서 가장 큰 main 활성을 보였다 (Fig. 5). 계속해서 이 분획은 다른 성질의 gel filtration column 인 Superdex peptide HR 10/30 (10 × 300 mm)을 이용하여 정제하였다 (Fig. 6). RT와 분자량 크기와의 상관관계를 대략적으로 알아보기 위해 본 실험실에서 분자량을 이미 알고 있는 물질을 혼합하여 injection 하였다 (Fig. 10). SF-III (3655 Da)는 21 min, SF-II (2306 Da)는 23 min, Vasopressin (1056 Da) 28 min, PALAL (484 Da)는 33 min에서 peak가 검출되었다. Fig. 6에서 용출된 활성물질도 약 23 min에서 나타났기 때문에 이때의 용출 시간으로 보아 수축물질의 분자량은 약 2000~3600 Da 사이의 크기일 것이라 생각되어진다. 세 번째 단계로 이 활성 분획은 Capcell-PAK C₁₈, (4.6 × 250 mm) column을 사용하여 약 39 min에 해당되는 활성 peak를 정제하였다 (Fig. 7). 최종적으로

29%의 CH₃CN isocratic 조건으로 머무름 시간 21 min에 해당하는 단일 peak를 얻었다 (Fig. 8).

3. 정제된 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정

최종적으로 불가사리 촉수 조직으로부터 정제된 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위해 MALDI-TOF mass와 Edman 분해법을 이용하는 아미노산 서열 분석기를 사용하였다.

3.1. 불가사리 촉수 유래의 평활근 수축성 펩타이드

불가사리 촉수 추출물 RM60으로부터 정제된 물질의 분자량은 약 3465 Da이며 (Fig. 9), 아미노산 서열 분석에 의해 30개의 아미노산 잔기까지 분석되었다. 이 펩타이드의 부분적인 일차서열은 다음과 같다:

Gly-Asn-Ala-X-X-Lys-Gly-Thr-X-His¹⁰-Glu-Ile-Pro-Pro-Gly-Gly-Asn-Asn-Pro-Tyr²⁰-Tyr-Ala-Val-Leu-X-Gly-Glu-X-Asn-Thr³⁰.

펩타이드 sequencing의 동일성 (homology)을 fasta program을 통해 조사한 결과, 이 물질은 기존에 발견된 물질들과 유사성이 없는 새로운 펩타이드로 판명되었다. 또한 편의상 이 물질은 starfish tubefeet neuropeptide (SFTN)이라 명명하였다.

Edman 분해법에 의해 분석된 1차 서열 결과에 의하면 4번째, 5번째, 9번째, 25번째 및 28번째 잔기는 unknown 아미노산인 X로 분석되었다. 이러한 X 잔기는 일반적으로 서열 내에 disulfide bond를 형성하는 Cys가 존재하거나 또는 물질의 양이 부족한 경우 아미노산의 잔기의 판별이 불가능하게 된다. 서열 내에 X로 검출된 잔기가 Cys이라고 가정을 하고 분자량을 계산해 본 결과, 3086.5 Da으로 SFTN의 천연물 분자량 값인 3465 Da과 일치하지 않았다 (Table 1). 따라서 정확한 아미노산 서열을 알아보기 위해 현재 cDNA work을 수행 중에 있다.

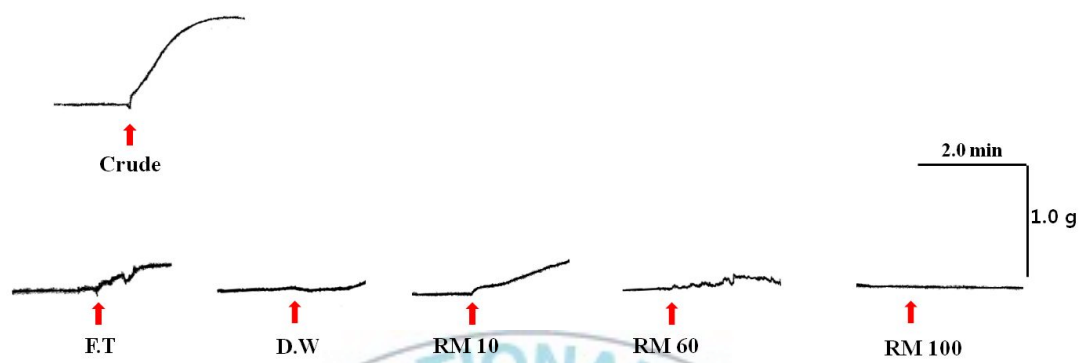


Fig. 4. Traces illustrating the contractions induced by starfish tubefeet extract in the DRM of the starfish. Each arrow represents the sample applied to the DRM.

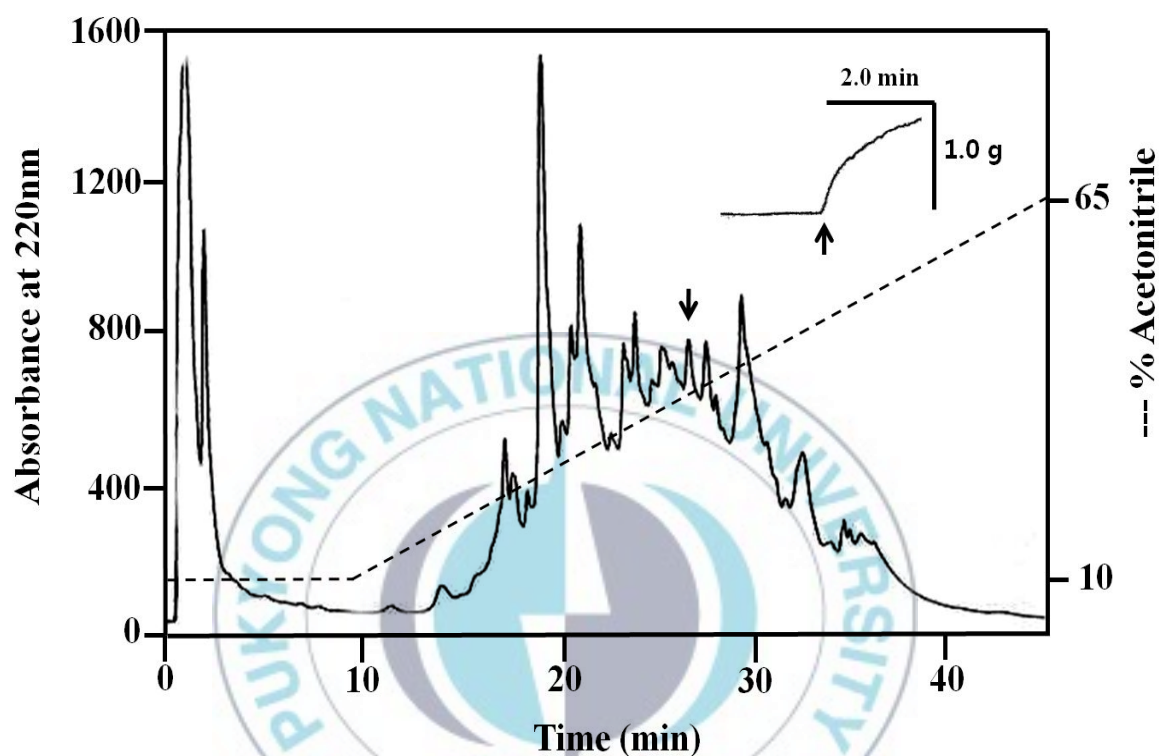


Fig. 5. The 1st reversed-phase HPLC profile of starfish tubefeet extract RM60 on a Vydac C₄ column. RM 60 was eluted with a linear gradient of 10%~ 65 % CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) for 40 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the contractile activity on the DRM of starfish. fraction was applied at the time indicated by an arrow.

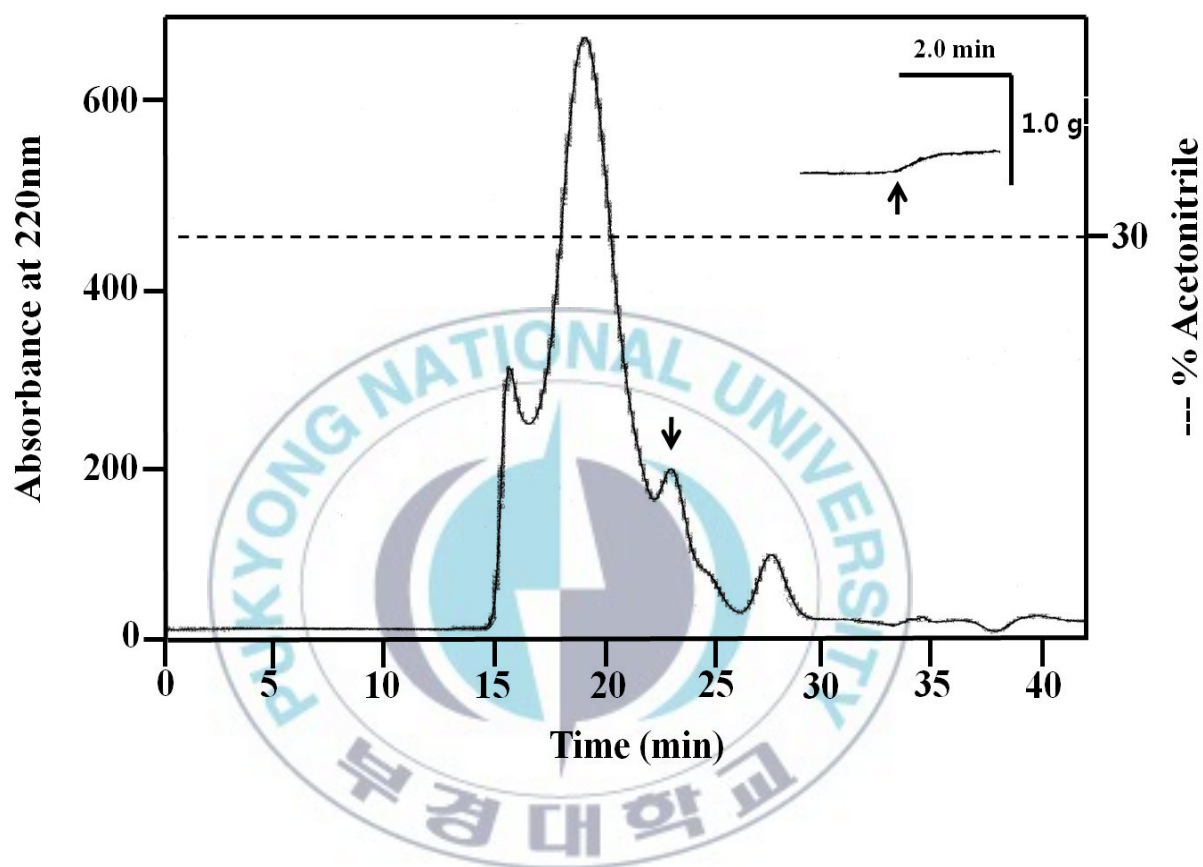


Fig. 6. The 2nd gel-filtration HPLC profile of bioactive peptide on a Superdex peptide HR 10/30 column. Active fractions were eluted with a 30% isocratic CH_3CH in 0.1% TFA (pH 2.2) for 40 min at a flow rate of 0.5 ml/min. The down arrow shows the fraction with the contractile activity on the DRM of the starfish. fraction was applied at the time indicated by an arrow.

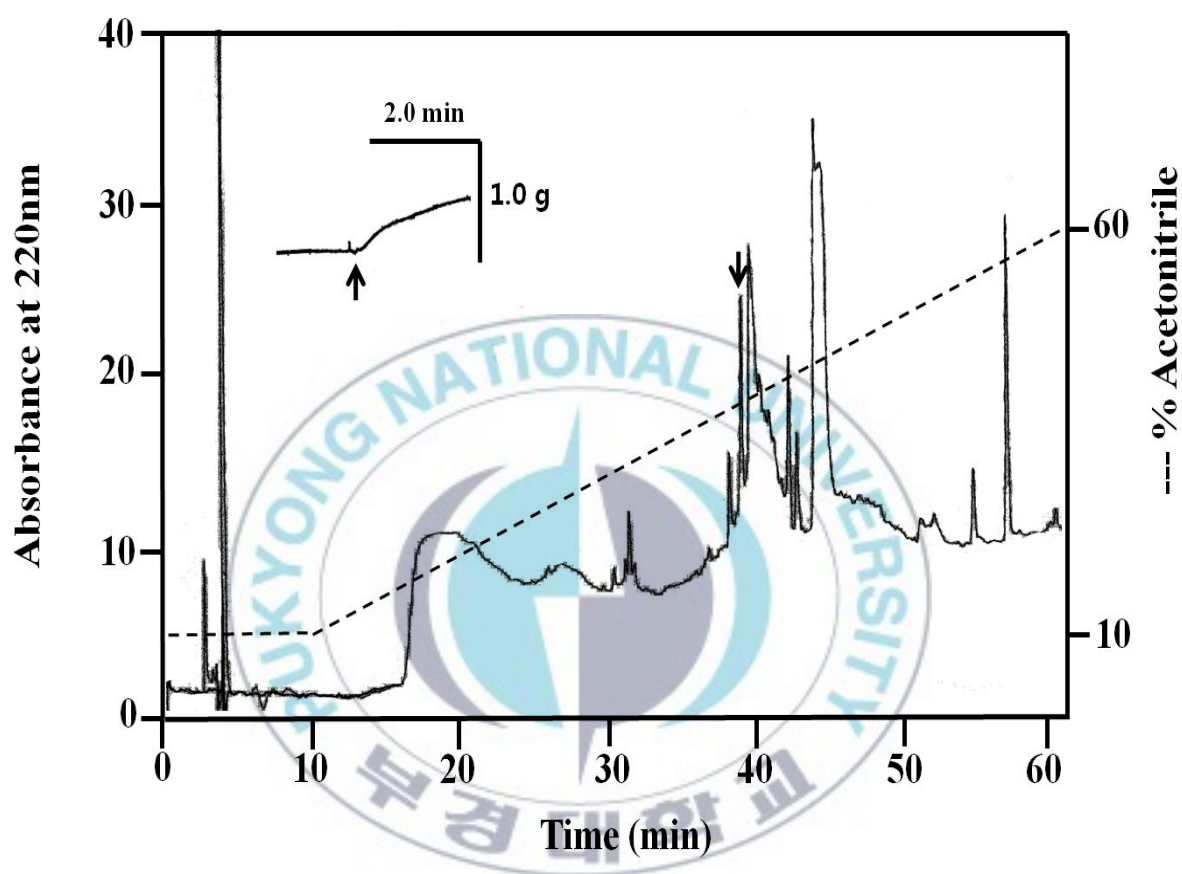


Fig. 7. The 3rd reversed-phase HPLC profile of bioactive peptide on a Capcell-PAK C_{18} column. Active fraction was eluted with a linear gradient of 10% ~ 60% CH_3CH in 0.1% TFA (pH 2.2) for 50 min at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fractions with the contractile activity on the DRM of the starfish. fraction was applied at the time indicated by up arrow.

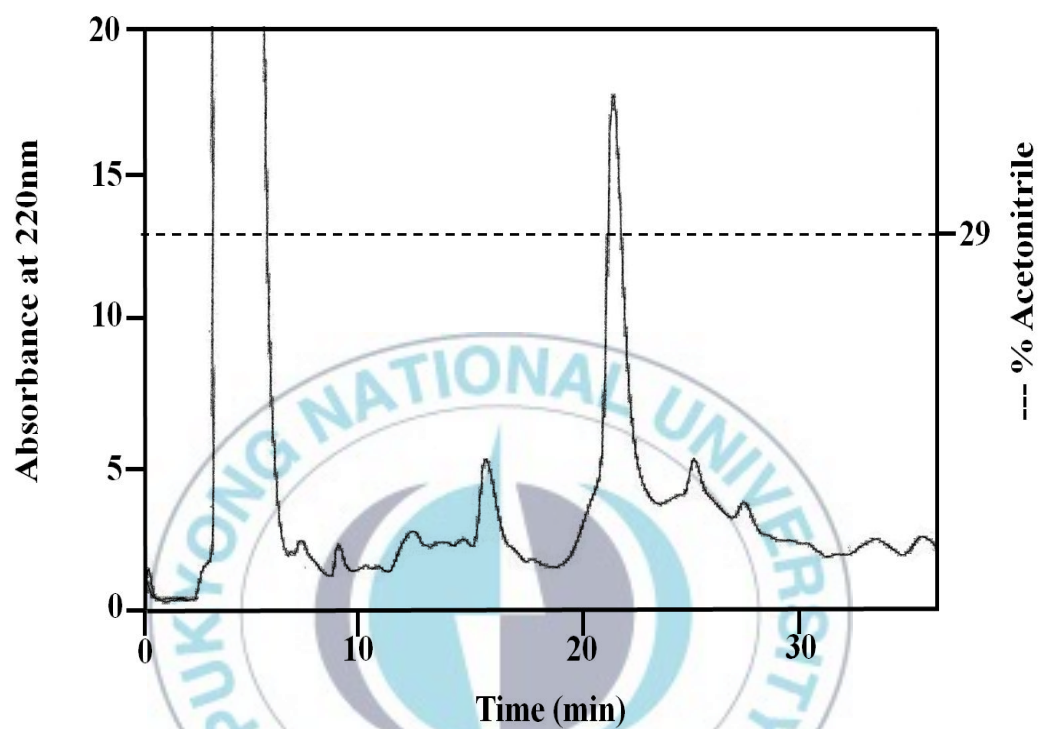


Fig. 8. The Final purification of bioactive peptide on a Capcell-PAK C₁₈ column. Active fraction was eluted isocratically with 29% CH₃CH in 0.1% TFA (pH 2.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The down arrow shows the fraction with the contractile activity on the DRM of starfish. The purified peptide was applied at the time indicated by up arrow.

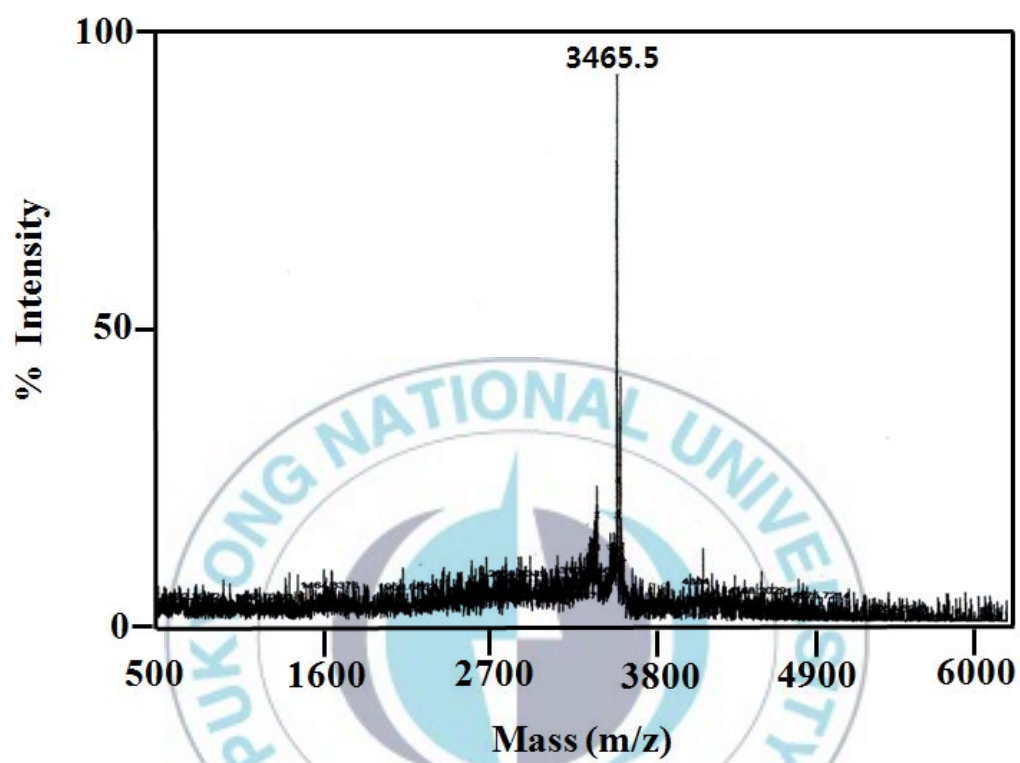


Fig. 9. Molecular weight of SFTN by MALDI-TOF.

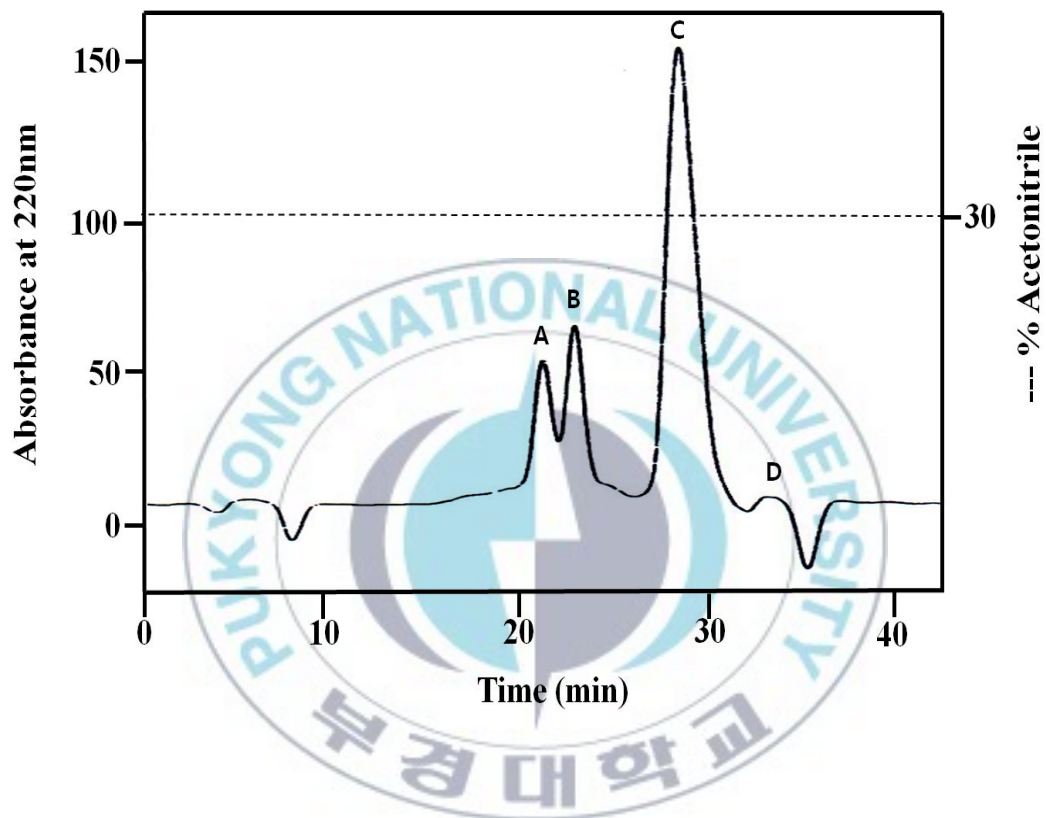


Fig. 10. Superdex peptide HR 10/30 standard chromatogram A: SFIII (about 3655 Da.) B: SFII (about 2306 Da.) C: Vasopresin (1056 Da.) D: PALAL (about 484 Da.)

Table 1. Molecular weight of SFTN partial primary structure.		
Peptide	Molecular weight	
	Observed (M+H) ⁺	Calculated (M+H) ⁺
GNAXXKGT ¹⁰ YH ¹⁰ EPPGGNINPY ²⁰ YAVLXGEXNT ³⁰	3465	3086.45

IV. 참 고 문 헌

- Bacq, Z.M., 1935. Recherches su la physiologie et la pharmacologie du systeme nerveux autonome. XVII. Les esters de la choline dans les extraits de tissue des invertebres. Arch. Int. Physiol. 42, 24-42.
- Barchas, J.D., Evans, M.D.C., Elliott, G.R. and Berger, P.A., 1985. Peptide neuroregulators: the opioid system as a model. Yale J. Bio. Med. 58, 579-596.
- Beauvallet M., 1938. Action de l'acetylcholine sur le tube digestif de quelques invertebres. Compt. Rend. 127, 213-214.
- Brown R.E., 1994. An introduction to neuroendocrinology. ed. Cambridge University Press, London, U.K.
- Chaet, A.B. and McConnaughy, R.A., 1959. Physiologic activity of nerve extracts. Biol. Bull. 117, 407-408.
- Diaz-Miranda, L. and Garcia-Arraras, J.E., 1995a. Pharmacological action of the heptapeptide GFSKLYFamide in the muscle of the sea cucumber *Holothuria glaberrima* (Echinodermata). Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 110, 171-176.
- Diaz-Miranda, L., Blanco, R.E. and Garcia-Arraras, J.E., 1995b. Localization of the heptapeptide GFSKLYFamide in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* (Echinodermata): a light and electron microscopic study. J Comp Neurol. 352, 626-640.
- Elphick, M.R. and Melarange, R., 2001. Neural control of muscle relaxation in echinoderms. J. Exp. Biol. 204, 875-885.
- Elphick, M.R., Price, D.A., Lee, T.D., and Thorndyke, M.C., 1991. The

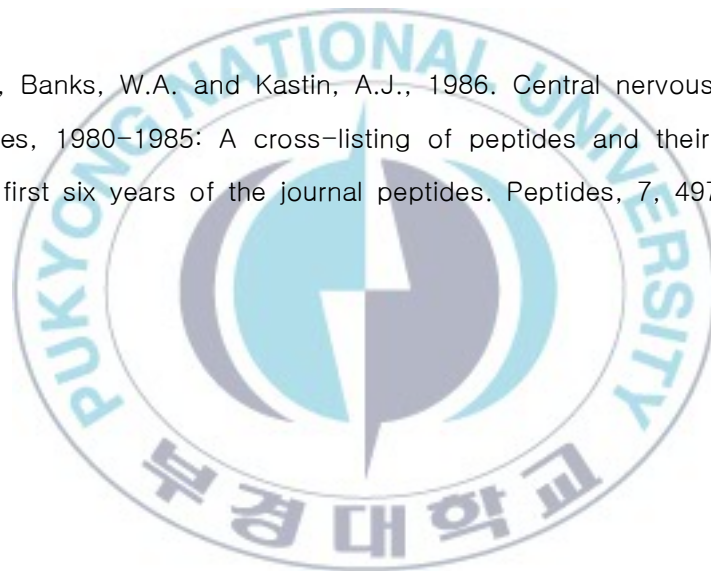
- SALMFamides: a new family of neuropeptides in the starfish *Asterias rubens*. J. Exp. Biol., 198, 2519–2525.
- Garcia-Arraras, J.E., Torres-Avillan, I. and Ortiz-Miranda, S., 1991. Cells in the intestinal system of holothurians (Echinodermata) express cholecystokinin-like immunoreactivity. Gene Comp. Endocr. 83, 233–242.
- Holmgren, S. and Jensen, J., 2001. Evolution of the nervous system: Evolution of vertebrate neuropeptides. Brain Res. Bull., 55(6), 723–735.
- Iwakoshi, E., Ohtani, M., Takahashi, T., Muneoka, Y., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto, K., 1995. Comparative aspects of structure and action of bioactive peptides isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. In peptide Chemistry 1994 (ed. M. Ohno). 261–264, Osaka: Protein Research Foundation.
- Melange, R., Potton, D.J., Thorndyke, M.C. and Elphick, M.R., 1999. SALMFamide neuropeptides cause relaxation and eversion of the cardiac stomach in starfish, Proc. R. Soc. B, 266, 1785–1789.
- Melange, R., and Elphick, M.R., 2003. Comparative analysis of nitric oxide and SALMFamide neuropeptides as general muscle relaxants in starfish. J. Exp. Biol., 206, 893–899.
- Moore, S.J. and Thorndyke, M.C., 1993. Immunocytochemical mapping of the novel echinoderm neuropeptide SALMFamide 1 (S1) in the starfish, *Asterias rubens*. Cell Tissue Res., 274, 602–618.
- Newman, S.J., Elphick, M.R. and Thorndyke, M.C., 1995. 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. Proc. R. Soc. Lond. B, 261, 139–145.

Newman, S.J., Elphick, M.R. and Thorndyke, M.C., 1995. Tissue distribution of the SALMFamide neuropeptides S1 and S2 in the starfish *Asterias rubens* using novel monoclonal and polyclonal antibodies. II. Digestive System. Proc. R. Soc. Lond. B, 261, 187–192.

Shuttleworth, C.W.R. and Keef, K.D., 1995. Role of peptides in enteric neuromuscular transnission. Regul. Pept., 54, 101–120.

Solcia, E., Usellini, L., Buffa, R., Rindi, G., Villani, L., Aguzzi, A. and Silini, E., 1989. Endocrine cell producing regulatory peptides. In. Polak, J. M., ed. Regulatory peptides. Experientia supplementum., 56, 220–246.

Zadina, J.E., Banks, W.A. and Kastin, A.J., 1986. Central nervous system effects of peptides, 1980–1985: A cross-listing of peptides and their central actions from the first six years of the journal peptides. Peptides, 7, 497–537.



감사의 글

제가 학부생으로 실험실에 들어왔을 때부터 지금까지 약 4년의 시간동안 항상 생각의 방향을 올바르게 이끌어주시고 질문사항에 대해 하나하나 정성스레 답변해주시며 새벽에도 온라인상으로 논문에 대한 조언을 아끼지 않으신 지도 교수님 박 남규 교수님께 진심으로 머리 숙여 감사드립니다. 교수님께 배운 지식은 물론 생각하는 자세까지 잊지 않고 꼭 기억하며 살아가겠습니다.

또한 지금까지 많은 가르침과 도움을 주신 훌륭한 생물공학과 홍 용기 교수님, 이 형호 교수님, 공 인수 교수님, 김 중균 교수님, 김 성구 교수님 그리고 정 귀택 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

서 정길 선배님, 선배님과는 실험을 하면서 의견충돌이 일어날 때면 서로의 입장을 이해해보기 위한 대화의 시간도 많이 가졌었고, 실험이야기를 떠나 가족이야기는 물론 개인적인 고민에 대한 이야기까지……. 2년 동안 가장 많은 시간을 함께했었던 것 같습니다. 선배님은 항상 열정적이고 진지하게 실험에 임하셔서 개인적으로 정말 존경합니다. 지금까지 제 실험에 함께 고민해주시고 생각해주시고 많은 것을 가르쳐주셔서 정말 감사드립니다.

고 해진 박사님, 저에게 언니는 실험은 물론 기자재 점검과 정리 등 모든 일을 똑소리 나게 해내시는 카리스마 넘치는 분이십니다. 언니께 꾸지람 듣고 속상했던 적도 있지만 먹을 것이 있으면 조그마한 것이라도 항상 건네주시고, 실험실 일도 많이 가르쳐주시느라 고생하셔서 언니께 감사하다는 말 전해드리고 싶습니다.

문 호성 선배님, 선배님과 함께 한 시간은 많지 않지만 가끔 들어도 친근함이 느껴지는 사투리 때문에 낯설지 않았습니다. 함께 식사 했을 때 해주셨던 재밌는 이야기들은 물론 취업에 대한 진심어린 조언들 정말 기억에 남을 것 같습니다 감사합니다.

2년간의 석사생활동안 가장 많은 시간을 함께 보내 거의 모든 시간을 함께했다고 말해도 과언이 아닌 경은이 에게도 정말 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 이 친구덕분에 저의 기쁜 일은 2배가 될 수 있었고, 나쁜 일은 반으로 줄어 제게 그 어떤 슬럼프가 와도 함께 라서 쉽게 헤쳐 나올 수 있었던 것 같습니다. 경은이 앞날에 항상 행복만이 가득하길 진심으로 바라며 그럴 수 있을 것이라 믿어 의심치 않습니다. 또한 소영이 에게도 정말 고마움을 느낍니다. 힘들 때 전화하면 언제든지 진심으로 고민 상담을 해주고, 기분이 우울한 날에도 소영이를 만나서 함께 있으면 항상 즐겁고 힘이 났었던 것 같습니다. 정말 소중한 내 친구 고맙습니다.

언제나 밝게 웃으며 명랑하게 이야기하고 아직까지 순수함이 묻어나는 귀여운 매력의 소유자 민정아, 석사과정 열심히 하고 잘 할 수 있을 것이라 믿습니다. 아쉽게도 요즘 들어 부쩍 친해져버린 용훈 선배, 진작 좀 친해질 걸 그랬습니다. 보기보다 마음이 여리고 세심하고 자상한 용훈 선배 원하는바 꼭 이루길 바랍니다. 침착하고 어른스럽지만 의외로 유머감각도 있고 재밌는 정화, 무슨 일이든 항상 잘 해내니까 누구보다 훌륭한 실험실 생활을 할 것이라 믿습니다. 교환학생으로 실험실에 처음 와 지금까지 잘 적응 해주고 있는 까를레스, 항상 밝은 모습으로 우리와 함께해줘서 정말 고맙고 기쁩니다. 한국에서 많은 것을 배우고 느끼고 갔으면 좋겠습니다. 실험실 정식 인원은 아니지

만 잠시 함께했었던 보기만 해도 기분 좋아지는 윤정이, 지금은 멋진 곳에서 열심히 일하고 있는 많이 고맙고 그리운 은희 언니, 술만 마시면 미안하다를 연거푸 얘기하는 항상 친근하고 착한 호주에 있는 영길이, 학부시절 전공공부에 흥미를 가질 수 있도록 도와준 오선생 오승준 선배, 장난기 많지만 진지한 조언을 해주었던 기우선배, 같이 학부시절 실험실 생활하면서 이런저런 말썽도 많이 피워 재미있는 기억이 많은 민희, 끝까지 함께하지 못했지만 리더십 있고 정말 많이 챙겨줬었던 지영이 언니에게도 감사의 말씀을 전합니다.

그리고 모르는 것이 있으면 항상 웃으며 상냥하게 답변해주신 지영언니, 대학원 일정에 대해 친절하게 알려주시고 과사무실에 들릴 때 맛있는 것도 챙겨주신 수경언니, 실험실 생활에 대한 조언과 힘이 되는 말을 해주셨던 김무상 박사님께도 정말 감사드립니다.

09학번 석사 동기인 더 깊은 학문의 길을 선택한 파이팅 넘치는 유리, 늘 재밌고 유쾌한 지숙이 언니, 눈 보며 거짓말 잘 못하지만 그래도 시도하는 장난기 많은 석주선배, 언제나 당당하고 꾸밈없는 아람이, 가장 영특하고 지도력도 갖추고 있어 훗날 가장 성공자의 모습을 갖추고 있을 것이라 기대되는 승준 선배에게 많은 도움을 받아 감사드립니다.

만날 때마다 다시 고등학생으로 돌아간 것만 같은 즐거움을 선사하는 미인계 친구들, 스카웃 된 멋진 여자 여달이 소연이, 가장 적성에 맞는 일을 열심히 하고 있는 봉어 지예, 멋진 포트폴리오에 털털한 시나 신아까지 석사생활동안 학교 밖에서 정말 많은 도움이 되었습니다.

마지막으로, 군대에서 열심히 나라 지키고 있는 하나밖에 없는 착한동생 일균이. 일균이는 살면서 제가 꼭 지킬 것입니다. 아침 일찍 출근하시지만 주무시기 전에 저녁 늦게 들어오는 딸을 꼭 챙기시고, 맛있는 음식은 꼭 집에 포장해 오시며 주말마다 늘 흥겨운 트로트로 노래실력을 뽐내곤 하는 자상한 아빠, 따뜻한 밥은 챙겨먹었는지 잠은 잘 잤는지 밖에서 무슨 일은 없었는지 언제나 자신보다 자식을 먼저 생각하시는 엄마, 부모님 덕분에 큰딸인 저에게 언제나 부족함 없이 아낌없는 배움을 지원해주셔서 무사히 공부를 마칠 수 있었고, 제가 얼마나 행복한 사람인지를 매일 느끼며 살아갈 수 있었습니다. 정말 사랑합니다, 감사합니다. 끝으로 이 논문을 소중한 가족에게 바칩니다.