붕장어(*Conger myriaster*)의 피부로부터 평활근 수축작용을 지닌 신경성 펩타이드의 정제

고혜진 · 박남규*

부경대학교 생물공학과

Purification of Neuropeptide with the Contractile Activity on the Smooth Muscle from the Skin of Conger Eel *Conger myriaster*

Hye-Jin Go and Nam Gyu Park*

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

A novel neuropeptide was isolated from the skin of the conger eel *Conger myriaster* using hagfish *Eptatretus burgeri* intestine as a bioassay system. The sequence of the purified peptide was analyzed using automated amino acid sequencing and MALDI-TOF mass spectrophotometry. The molecular ion peak in the MALDI-TOF mass spectrum of the peptide was at m/z 962.89 ($M+H$)⁺. The sequence of the peptide was determined to be L-P-M-L-E-T-Q-M, and was tentatively named comyrin. To investigate the complete primary structure of comyrin, comyrin-OH and comyrin-NH₂ were synthesized and the chemical and pharmacological properties of the synthetic peptides were compared with those of the native peptide. However, the elution time of synthetic peptides did not match that of the native peptide on the reverse-phase HPLC chromatogram. In addition, the synthetic peptides did not cause contractile activity in the intestinal smooth muscle of the hagfish. Based on these results, one possible reason for this disagreement may be the presence of a D-amino acid in comyrin.

Key words: Neuropeptide, Conger eel, Hagfish intestine

서론

Neuropeptide (신경성 펩타이드)는 뉴런으로부터 분비되어지는 signalling molecule로 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, 통증 전달 및 혈압조절 등의 역할을 담당하고 있는 neuromodulator 및 neurotransmitter이다(Brown, 1994; Shuttleworth et al., 1995; Zadina et al., 1986). 이들은 신경조직에만 국한되지 않고, endocrine cell에서도 종종 동일하거나 유사한 분자들이 발현되어지며, 호르몬으로 작용되는 곳으로 분비되어진다(Holmgren et al., 2001; Solcia et al., 1989). 연체동물인 낙지의 타액선으로부터 eledosin이 발견된 이후(Erspamer and Anastasi, 1962), 무척추동물 및 척추동물에 이르기까지 다양

한 생물의 조직으로부터 신경성 펩타이드들이 발견되었으며(Krieger, 1986), 특히 substance P와 neurokinin A (Jensen et al., 1992; Waugh et al., 1993b; Waugh et al., 1994), Neuropeptide γ (Conlon et al., 1991; Wang et al., 1999), urotensin I (Lederis et al., 1983) 및 urotensin II (Waugh et al., 1993a), Gonadotropin-releasing hormones (Sherwood et al., 1986) 과 bradykinin-related peptide (Conlon et al., 1996; Li et al., 1988; Platzack and Conlon, 1997) 등이 다양한 종류의 어류로부터 정제되었다. 또한 연골어류(*Triakis scyllia*) 및 American eel (*Anguilla rostrata*)로부터 angiotensin I (Takei et al., 1993; Khosla et al., 1985), 칠성장어인 *Lampetra fluviatilis* 와 *Petromyzon marinus*로부터도 angiotensin I, melanotropins 및 ACTH가 발견되었다(Rankin et al., 2004; Tahahashi et al., 1995). 한편, 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 위 및 식도로부터 칼슘조절 물질인 calcitonin (Otani et al., 1976)이 발

Article history;

Received 8 March 2012; Revised 19 June 2012; Accepted 3 August 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 33. 629. 5867 Fax: +82. 33. 629. 5863

E-mail address: ngpark@pknu.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(4) 358-366, August 2012

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0358>

pISSN:0374-8111

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

견되었을 뿐만 아니라 최근에 열대어(*Danio rerio*)의 피부 추출물에서 tachykinin-related peptide (Mi et al., 2010), 먹장어의 피부 추출물에서 bradykinin-related peptide (Shin et al., 2003) 및 미국산 메기(*Ictalurus punctatus*)의 dorsal 피부로부터 melanization stimulating factor (MSF)가 발견되었다 (Johnson et al., 1992).

붕장어(*Conger Myriaster*)는 뱀장어(Anguilliformes)목에 해당하는 붕장어과(Congridae) 경골어류로서, 우리나라 전 연안, 일본의 홋카이도 및 동중국해 등지에서 연중 어획되고 있어, 우리나라에서 일 년 내내 즐겨먹는 대표적인 생선중의 하나로, 일반적으로 아나고로 알려져 있다. 현재 이들 붕장어의 피부점액으로부터 불가사리(*Asterina pectinifera*)의 embryonic development를 저해하는 galactose-specific agglutinins (Kamiya et al., 1988) 그리고 sugar-binding protein인 lectin이 정제되었다(Shiomi, et al., 1989; Muramoto and Kamiya, 1992; Tsutsui et al., 2007). 그러나 붕장어 피부에 존재하는 분자량이 적은 신경성 펩타이드에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 붕장어의 피부조직으로부터 먹장어 장관에 대해 수축활성을 지닌 새로운 신경성 펩타이드인 comyrin을 정제하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 붕장어(*Conger myriaster*, 500마리, 체장 30-50 cm)는 부산광역시 부전시장에서 구입하였다. 마취한 상태의 붕장어로부터 피부조직을 분리한 후, 액체질소로 급속 동결시켜서 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

시약 및 재료

Sep-Pak C₁₈ cartridge는 Waters사(Miliford, MA, USA)에서 구입하였다. HPLC용 H₂O 및 acetonitrile (CH₃CN)은 TEDIA사(Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

붕장어 피부로부터 평활근 수축성 펩타이드의 추출

동결 보관된 붕장어 피부조직(7.0 kg)을 끓는 물에 10분간 끓인 후 냉각시켰다. 5% 초산을 첨가한 후 블렌더(Multi Blender Mill, Nihonseiki Kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)로 조직을 파쇄하여 시료를 실온에서 20분 동안 10,000×g으로 원심분리를 하였다. 침전물은 다시 한 번 5% 초산용액을 넣고 homogenizer (PT10-35, Kinematica AG, Switzerland)로 추출하여 처음과 같은 조건으로 원심 분리하였다. 상층액은 처음 분리한 상층액과 함께 농축시킨 다음 시료:에탄올 = 1:4 (v/v)의 비율로 에탄올을 농축시료에 첨가하여 -20℃의 냉동실에 하루 동안 보관

Fig. 1. Typical tracing illustrating the contraction response of the conger eel *Conger myriaster* skin extracts. Each down arrow represents the sample applied to the hagfish intestine (A) and rat duodenum (B). The pre-contraction was induced by Ach, 5×10^{-7} M.

한 후, 4℃에서 20분 동안 10,000×g로 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 농축한 상층액에 에탄올과 NaCl을 시료(0.15 L) : 에탄올(0.3 L) : NaCl (0.03 mg)의 비율로 첨가한 후, 4℃에서 30분 동안 25,000×g로 원심분리를 하여 상층액을 농축하였다. 농축액에 최종 농도가 0.1 N HCl이 되도록 1 N HCl을 첨가한 뒤, 4℃로 30분 동안 25,000×g로 원심분리를 행하였다. 얻어진 상층액을 농축하여 시료:ether = 1:3 (v/v)의 비율로 ether를 첨가한 뒤 ether층을 분리하여 지용성물질을 제거한 뒤 남은 시료를 농축하였다. 다음 단계로 농축된 시료에 시료:에탄올 = 1:3(v/v)의 비율로 에탄올을 첨가하여, 4℃로 30분 동안 30,000×g로 농축하였다.

농축액은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 주입하였다. 우선 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 0.1% TFA가 포함된 100% methanol로 활성화시킨 후, 0.1% TFA가 포함된 H₂O로 충분히 평형화하였다. 충분히 평형화가 된 cartridge에 시료를 주입하여 0.1% TFA가 포함된 H₂O (D.W.), 10% methanol (retained materials; RM10) 및 60% methanol (RM60)과 100% methanol (RM100)로 물질들을 각각 용출시켜 분리한 후 각 분획의 1/1000에 해당하는 양을 사용하여 먹장어와 Rat의 장관 평활근에 대한 수축활성 측정에서 사용하였다(Fig. 1).

붕장어 피부조직 추출물(RM 60)로부터 평활근 수축성 펩타이드의 정제

동결 건조한 붕장어 피부추출물 RM 60을 5% 초산에 녹여 동일 용매로 평형화 되어있는 Sephadex G-25 column (2.6×110 cm, fine, Pharmacia, Sweden)에 주입하여 흡광도 254 nm에서 1.0 mL/min의 유속으로 15 mL씩 분획하여 분리하였다 (Fig. 2). 각 단계에서 분리한 분획들로부터 1/900에 해당하는

Fig. 2. Gel-filtration profile of the conger eel *Conger myriaster* skin extract (RM 60). The RM 60 was loaded onto Sephadex G-25 (2.6×110 cm) open column and eluted with 5% acetic acid at a flow rate of 1.0 mL/min. The black bar represents fractions with contractile activity on the hagfish intestine.

양을 취하여 먹장어 장관 평활근에 대해 수축활성을 측정하여 나타난 활성분획들을 농축한 후, TSK-gel SP-5PW column (7.5×75 mm, Tosoh, Japan)에 적용하여 A 용매로 10 mM의 phosphate buffer (PBS) (pH 6.0)와 B 용매로서 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 PBS (pH 6.0)을 사용하여 0→1.0 M B 용매 농도구배로 200분간 1.0 mL/min의 유속으로 분리하였다. 첫 번째 단계의 양이온교환 HPLC에서 얻어진 활성분획은 Fig. 3에서 나타낸 것과 같이 계속해서 여러 단계의 역상 HPLC와 이온교환 HPLC를 사용하여 교차적인 반복 정제하였다.

최종적으로 Superdex Peptide HR 10/30 column (10×300 mm, Pharmacia, Sweden)을 이용하여 0.1% TFA를 포함하는 30% CH₃CN의 isocratic 조건으로 분리하여 하나의 순수한 물질로 정제하였다(Fig. 8A). HPLC 정제단계에서 사용한 UV 파장은 모두 220 nm이었고 온도는 40 °C이었다.

Fig. 3. The flowcharts of HPLC purification steps of conger eel *Conger myriaster* skin extract.

천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열결정

천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 측정은 부경대학교 공동실험실습관에 있는 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DE™ PRO spectrometer, Perseptive Biosystems, USA)를 사용하여 측정하였다. 정제된 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 한국기초과학지원연구원의 Procise® cLC Sequencing System Model 492 cLC (Apply Biosystem, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

펩타이드의 합성 및 정제

Fmoc-법을 사용하여 고상법으로 펩타이드를 합성하였다. C-말단에 amide화된 형태의 펩타이드를 합성하기 위해 Fmoc-NH₂-PAL-resin을, C-말단이 free한 경우는 Fmoc-amino acid-Wang-resin을 사용하였다(Shin et al., 2003). 정제된 펩타이드는 모두 L형 아미노산으로 합성하였으며, C말단이 amide화되어 있는 comyrin-NH₂와 free한 형태인 comyrin-OH의 펩타이드들을 합성하였다. 또한 HPLC를 사용하여 합성 펩타이드들은 다음의 분리조건으로 부분 정제하였다: Capcellpak C₁₈ (10×250 mm); B용매의 gradient, 5→65% (60 min); 유속, 2.0 mL/min. 최종적으로 218TP5415 protein C4 column을 사용하여 15% CH₃CN의 isocratic 조건으로 정제하였다.

천연 및 합성 펩타이드들의 동일성 비교

정제된 천연물과 합성물의 동일성은 분자량 측정과 역상 및 이온 HPLC column을 이용한 머무름시간(retention time, RT) 및 평활근에 대한 수축활성을 비교함으로써 확인하였다. 천연물과 합성물인 comyrin-OH, comyrin-NH₂를 214TP5415 protein C₄ column을 사용하여 비교하였다.

먹장어 장관

장관의 표본을 만들기 위해 배측부를 항문쪽으로 절개하였다. 그 후 식도로부터 3-4 cm 떨어진 부위를 2-3 cm 길이로 재빨리 적출하였다. 절취한 장관의 결체조직을 제거하고, 5 mm 정도의 장관 단편을 만들어 2 mL 반응조에 고정시켰다. 모든 과정은 55 mM Mg²⁺ artificial sea water (인공해수, ASW)하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl₂·2H₂O 10, MgCl₂·6H₂O 55, Glucose 10, Tris-HCl (pH 7.8) 20. 준비된 장관은 아래쪽은 2 mL의 반응조에 고정시키고 위쪽은 physiography system (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 isometric transducer에 연결하여 1.5 g의 장력을 준 뒤, 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 60분간 평형화시켰다. 수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입시켜 주면서 안정화 시킨 후 5×10⁻⁷ M의 carbachol (CCh)을 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화시켰다. 이후 준비된 추출분획 및 HPLC 정제단계에서 얻은 분획들을 투여하여 활성을

physiograph상에 기록하였다.

Rat duodenum과 aorta

230-250 g의 rat (male, *Sprague-Dawley*)을 decapitation하여 복부를 절개한 후, 위로부터 1 cm정도 떨어진 부위의 duodenum을 2-3 cm를 재빨리 적출하였다. 적출한 십이지장의 결체조직을 제거한 후 5 mm 정도의 단편을 만들었다. 모든 과정은 Krebs's buffer하에서 이루어졌으며, 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.8, Glucose 10.1.

이들 용액은 95% O₂와 5% CO₂로 20분간 포화시킨 후 37°C로 유지되는 반응조에 적용되었다. 준비된 duodenum단편의 아래쪽을 반응조 내의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 isometric transducer (Narco F-60, Narco Biosystem Inc., USA)에 연결하여 resting tension이 1.0 g이 되도록 90분간 평형화 시켰다. 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 5×10⁻⁷ M의 Ach을 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화시켰다. 이후 각각 조직추출물로부터 얻은 부분 분획들(D.W., RM 10, RM 60, RM 100)을 투여하였다. 시료들을 주입한 후 수축활성을 physiograph상에 기록하였다.

결과 및 고찰

붕장어 피부로부터 평활근 수축성물질의 추출

붕장어 피부의 추출물은 여러 단계에 걸쳐 유기용매, NaCl 및 산을 첨가하여 다당, 고분자량의 단백질 및 지방을 제거하였다. 그 후 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 D.W., RM 10, RM 60, RM 100의 4개 분획으로 부분 정제하여 이들을 각각 먹장어 장관 및 rat duodenum에 대해 수축활성을 측정하였다. 그 결과, D.W. 및 RM10은 먹장어 장관에 대해 약한 반응을 보였지만, 특히 RM 60층은 강한 수축활성을 나타내었다(Fig. 1A). 그러나 rat duodenum에 대해서는 반응을 나타내지 않았다(Fig. 1B). 따라서 먹장어 장관에 대해 가장 강한 수축활성을 나타낸 RM 60을 사용하여 수축성 펩타이드를 정제하였다.

붕장어 피부 추출물(RM 60)의 정제

RM 60을 먼저 Sephadex G-25 column을 사용하여 분리한 결과, 분획 28-48에서 먹장어 장관 평활근에 대해 수축활성을 나타내었으며(Fig. 2의 black bar region), 이 활성분획은 양이온 column의 0-0.05 M NaCl에서 수축활성을 나타냈다(Fig. 4A의 black bar). 계속해서 역상 column을 이용하여 분리한 결과 약 10-19% CH₃CN에서 활성을 나타내었다(Fig. 4B). 이 활성분획은 양이온 column에서 강하게 결합되지 않았기 때문에 음이온 column과 친화성 column을 이용하여 분리하였다(Fig. 5A 및 Fig. 5B의 black bar). 활성분획의 효과적인 분리를 위해 이들은 여러 단계를 거쳐(Fig. 6 - 7), 최종적으로 Su-

Fig. 4. Cation-exchange and reverse phase HPLC profile. The active fractions in Fig. 2 were loaded onto SP-5PW (7.5×75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.0 ml/min (A). The active fractions in Fig. 3A were loaded onto 218TP510 protein & peptide C₁₈ (9.2×250 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1 % TFA at a flow rate of 2.0 ml/min (B). The black bars represent fractions with contractile activity on the hagfish *Conger myriaster* intestine.

perdex Peptide HR 10/30 column을 이용하여 30% CH₃CN의 isocratic 조건으로 약 26분에서 순수한 활성 peak를 정제하였다(Fig. 8A).

정제한 펩타이드들의 분자량 및 아미노산서열 결정

정제한 물질의 분자량은 962.89 (M+H)⁺이었고(Fig. 8C), 이 물질의 일차구조는 Leu-Pro-Met-Leu-Glu-Thr-Gln-Met으로 8개의 아미노산 잔기로 구성된 octapeptide였다(Table 1). 피부조직 추출물(RM 60)로부터 정제된 물질은 조직명을 따라 comyrin으로 편의상 명명하였다. 또한 지금까지 알려진 모든 수축활성 펩타이드들과의 상동성(homology)을 조사하기 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) protein-protein network BLAST Data Bank를 이용하여 검색하였다. 그러나 comyrin은 지금까지 발견된

Fig. 5. Anion-exchange and affinity HPLC profile. The active fractions in Fig. 3B were loaded onto DEAE-5PW (7.5×75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2) at a flow rate of 1.0 ml/min (A). The active fractions in Fig. 4A were loaded onto Heparin-5PW (7.5×75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.1) at a flow rate of 1.0 ml/min (B). The black bars represent fractions with contractile activity on the hagfish *Conger myriaster* intestine.

신경성 펩타이드들과 전혀 상동성이 없는 새로운 평활근 수축성 펩타이드로 밝혀졌다.

천연물과 합성물의 동일성 비교

천연 comyrin과 합성 comyrin-OH 및 comyrin-NH₂의 동일성을 알아보기 위해, 천연물과 합성물들을 218TP5415 protein C₄ (4.6×250 mm) column을 이용하여 15% CH₃CN의 isocratic 조건으로 적용하였다. 그러나 합성물 comyrin-NH₂와 comyrin-OH은 모두 천연물 comyrin과 다른 머무름시간을 가지고 용출되었다(Fig. 9A). 또한 comyrin과 합성물들을 사용하여 먹장어 장관 평활근에 대한 수축활성을 비교하였다. 그 결과, 천연 comyrin의 경우, 장관 평활근에 대해 수축활성을 나타낸 반면, 합성 comyrin-OH와 comyrin-NH₂는 모두 활성을 나타내지 않았다(Fig. 9B). MALDI-TOF mass 분석결과,

Fig. 6. Reverse-phase and cation-exchange HPLC profile. The active fractions in Fig. 4B were loaded onto Nova-Pak C₈ (3.9 × 150 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 ml/min (A). The active fractions in Fig. 5A were loaded onto Heparin-5PW (7.5 × 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.1) at a flow rate of 0.5 ml/min (B). The black bars represent fractions with contractile activity on the hagfish *Conger myriaster* intestine.

천연물과 합성물은 같은 분자량을 나타냈지만(Table 1), 서로 상이한 머무름시간 및 활성을 나타내지 않는 것으로 미루어 보아 합성 comyrin의 -OH 또는 -NH₂ 형태는 천연물과 동일하지 않으며, 천연물과 상이한 구조를 가지고 있음을 의미한다.

일반적으로 neuropeptide들은 생물체에서 L형 아미노산으로 구성된 펩타이드를 생성한다고 알려져 있다. 그러나 최근에 하등동물들로부터 D형 아미노산을 포함하는 많은 펩타이드들이 정제되었다. 양서류인 개구리의 피부로부터 D형 아미노산을 포함하는 neuropeptide인 dermorphin과 deltorphin (Montecucchi et al., 1981; Kreil et al., 1989), 복족류인 달팽이(*Achatina fulica*)의 ganglia와 atria로부터 두 번째 잔기에 각각 D-Phe 및 D-Asn을 포함하는 achatin-I 및 fulicin (Kamatani et al., 1989; Fujimoto et al., 1991; Ohta et al., 1991), 군소(*Aplysia crudai*)의 심장으로부터 cardioexcitatory pep-

Fig. 7. Reverse-phase HPLC profiles. The active fractions in Fig. 5B were loaded onto 218TP5415 protein C₄ (4.6 × 150 mm) column and eluted with a linear gradient of CH₃CN (dotted line) in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min (A). The active fraction in Fig. 6A was loaded onto 218TP5415 protein C₄ (4.6 × 150 mm) column and eluted with isocratically 15% CH₃CN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 ml/min. The down arrows represent fraction with contractile activity on the hagfish *Conger myriaster* intestine.

tide인 NdWFamide가 정제되었다(Morishita, 1997). 또한 연체동물인 bivalve mollusc (*Mytilus edulis*)로부터 2번째 잔기에 D-Leu를 함유한 Mytilus-FFRFamide (Fujisawa et al., 1992) 및 문어(*Octopus minor*)의 뇌로부터 Ocp-1, 4가 정제되었다(Iwakoshi et al., 2000). 갑각류와 곤충으로부터도 D형 아미노산을 포함하는 펩타이드들이 발견되었다. 미국산 lobster (*Homarus americanus*)의 sinus gland와 Mexican crayfish (*Procambarus bouvieri*)의 eyespot으로부터 D-Phe를 포함하는 crustacean hyperglycemic hormone (CHH) related peptide (Soyez et al., 1994; Yasuda et al., 1994; Aguilar et al., 1995) 및 곤충류인 거미(*Agelenopsis aperta*)의 독으로부터 ω-Agatoxin-IVB와 ω-Agatoxin-TK가 정제되었다(Adams et al., 1993; Teramoto et al., 1993; Heck et al., 1994; Kuwada et al., 1994). 현재까지 보고된 D형 아미노산을 함유한

Fig. 8. Final purification of the active fraction. The active fraction in Fig. 6B was loaded onto a Superdex Peptide HR 10/30 (10×300 mm) and eluted with isocratically 30% CH₃CN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 ml/min (A) and the purified peak showed contractile activity on the hagfish intestine (B). The molecular weight of single peak (down arrow) of Fig. 7A was determined by MALDI-TOF Mass spectra (C).

neuropeptide들은 4-10개의 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드로서 이들 내에 존재하는 D형 아미노산은 N-말단으로부터 2번째 위치 또는 C-말단에 근접한 위치에서 많이 발견되었다. 특히, Ser, Ala, Phe, Asn, Leu, Trp 등이 D형 아미노산 형태로 많이 발견되지만, 일정한 규칙성은 없다. 또한 이들 D형 펩타이드들은 L/D형 아미노산 포함여부에 따라 HPLC상의 머무름시간과 생리활성간의 차이를 나타낸다. 예를 들면, 군소 (*Aplysia crudai*)의 심장으로부터 발견된 NdWFamide의 경

Fig. 9. A comparison between HPLC profiles of native comyrin and synthetic peptides on reverse-phase (218TP5415 protein C₄) column (A) and bioactivity on the hagfish intestine (B). The native comyrin (N), synthetic comyrin-NH₂ and comyrin-OH were injected into the reverse-phase HPLC system, respectively. Elution condition: 15% CH₃CN with 0.1% TFA isocratically, 0.5 ml/min.

우, NdWPamide와 L-Trp로 치환한 NWFamide는 HPLC상에서 서로 다른 머무름시간을 가졌으며, NdWFamide가 *aplysia* ventricle에 대해 NWFamide보다 약 1,000배의 높은 수축활성효과를 나타냈다(Morishita et al., 1997). 또한 Ocp-1은 Gly-D-Phe-Gly-Asp로 구성된 tetrapeptide이며, Ocp-2는 Ocp-1의 D-Phe가 L-Phe의 형태로 되어 있는 분자량 및 아미노산이 같은 펩타이드이다(Iwakoshi et al., 2000). 이 Ocp-1과 Ocp-2는 2번째 잔기의 Phe만 각각 D/L형이면서 같은 분자량과 동일한 아미노산 서열을 가지는 물질임에도 불구하고, HPLC상에서 서로 다른 머무름 시간을 나타내며, cardioactivity에 대해 Ocp-1이 Ocp-2보다 10³-10⁴배 이상의 높은 활성을 나타냈다. ω-Agatoxin-related peptide는 voltage-activated channel의 antagonist로서 46번째 잔기가 D-Ser인 48개의 아미노산으로 구성된 peptide로서, 특히, ω-Aga-TK의 경우 D-Ser을 L-Ser로 치환한 유도체에 비해 P-type calcium channel에 대해 80-90배 정도 높은 차단효과를 나타내었다(Heck

Table 1. Molecular weight and amino acid sequences of purified peptides from the conger eel *Conger myriaster*

Peptide	Amino acid sequence	Molecular weight	
		Observed (M+H) ⁺	Calculated (M)
Comyrin	1 5 Leu-Pro-Met-Leu-Glu-Thr-Gln-Met	962.89	961.13

et al., 1994; Kuwada et al., 1994).

따라서, 본 연구에서 정제된 comyrin도 위에서 설명한 펩타이드들과 마찬가지로 구성된 아미노산 중 적어도 하나 또는 그 이상의 D형 아미노산을 함유하고 있다고 생각되어진다. 또한 정제된 comyrin의 경우에도 D형 아미노산으로 많이 발견되는 Leu, Met이 N-, C-말단 및 서열중간위치에 포함되어 있다. 최근에 Asp의 경우도 D-isomerase에 의해 D-Asp로 전환되어 활성을 나타낸다는 보고가 있다(Lüders T et al., 2005). 따라서 이들 잔기들을 중심으로 D형 아미노산으로 치환된 유도체들을 합성하여 활성을 측정할 예정이며, prosequence를 밝히기 위해 일차구조를 기초로 한 cDNA cloning 연구를 진행 중이다.

참고문헌

- Adams ME, Mintz IM, Reily MD, Thanabal V and Bean BP. 1993. Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels. *Mol Pharmacol* 44, 681-688.
- Aguilar MB, Soyey D, Falchetto R, Arnott D, Shabanowitz J, Hunt DF and Huberman A. 1995. Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Maxican crayfish *Procambarus bouvieri*: Presence of a D-amino acid. *Peptides* 16, 1375-1383.
- Brown RE. 1994. An introduction to neuroendocrinology. Cambridge University Press, London, U.K.
- Conlon JM, Le Mevel J-C, Conklin D, Weaver L, Duff DW and Olson KR. 1996. Isolation and cardiovascular activity of a second bradykinin-related peptide ([Arg⁰, Trp⁵, Leu⁸]bradykinin) from trout. *Peptides* 17, 531-537.
- Colon JM, O'Harte F, Peter RE and Kah O. 1991. Carassin: a tachykinin that is a structurally related to neuropeptide-gamma from the brain of the goldfish. *J Neurochem* 56, 1432-1436.
- Ersparmer V and Anastasi A. 1962. Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia* 18, 58-59.
- Fujimoto K, Kubota I, Yasuda-Kamatani Y, Minakata H, Nomoto K, Yoshida M, Harada A, Muneoka Y and Kobayashi M. 1991. Purification of achatin-I from the atria of the African giant snail, *Achatina fulica*, and its possible function. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 847-853.
- Fujisawa Y, Ikeda T, Nomoto K, Yasuda-Kamatani Y, Minakata H, Kenny PT, Kubota I and Muneoka Y. 1992. The FM-RFamide-related decapeptide of *Mytilus* contains a D-amino acid residue. *Comp Biochem Physiol C* 102, 91-95.
- Heck SD, Siok CJ, Krapcho KJ, Kelbaugh PR, Thadeio PF, Welch MJ, Williams RD, Ganong AH, Kelly ME, Lanzetti AJ, Gray WR and Volkmann RA. 1994. Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser⁴⁶ in a calcium-channel toxin. *Science* 266, 1065-1068.
- Holmgren S and Jensen J. 2001. Evolution of the nervous system: Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res Bull* 55, 723-735.
- Iwakoshi E, Hisada M and Minakata H. 2000. Cardioactive peptides isolated from the brain of a Japanese octopus, *Octopus minor*. *Peptides* 21, 623-630.
- Jensen J and Conlon JM. 1992. Substance-P-related and neuropeptide-A-related peptides from the brain of the cod and trout. *Eur J Biochem* 206, 659-664.
- Johnson WC, Samaraweera P, Zuasti A, Law JH and Bagnara JT. 1992. Preliminary biological characterization of a melanization stimulating factor (MSF) from the dorsal skin of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Life Sci* 51, 1229-1236.
- Kamatani Y, Minakata H, Kenny PTM, Iwahita T, Watanabe K, Funase K, Sun XP, Yangsiri A, Kim KH, Novales-Li P, Novales ET, Kanapi CG, Takeuchi H and Nomoto K. 1989. Achatin-I, an endogenous neuroexcitatory tetrapeptide from *Achatina fulica* Ferussac containing a D-amino acid residue. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 1015-1020.
- Kamiya H, Muramoto K and Goto R. 1988. Purification and properties of agglutinins from conger eel, *Conger Myriaster* (Brevoort), skin mucus. *Dev Comp Immunol* 12, 309-318.
- Khosla MC, Nishimura H, Hasegawa Y and Bumpus FM. 1985. Identification and synthesis of [1-asparagine, 5-valine, 9-glycine] angiotensin I produced from plasma of American eel *Anguilla rostrata*. *Gen Comp Endocrinol* 57, 223-233.
- Krieger DT. 1986. An overview of neuropeptides. In: *Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric Disease*. Martin JB and Barchas JD, eds. Raven Press, New York, USA, 1-33.
- Kreil G, Barra D, Simmaco M, Ersparmer V, Ersparmer GF, Negri L, Severini C, Corsi R and Melchiorri P. 1989. Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for δ opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 162, 123-128.
- Kuwada M, Teramoto T, Kumagaye KY, Nakajima K, Watanabe T, Kawai T, Kawakami Y, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y and Katayama K. 1994. Omega-agatoxin-TK containing D-serine at position 46, but not synthetic omega-L-[Ser⁴⁶] agatoxin-TK, exerts blockade of P-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *Mol Pharmacol* 46, 587-593.
- Lederis K, Letter A, McMaster D, Ichikawa T, MacCannell KL, Kobayashi Y, Rivier J, Rivier C, Vale W and Fryer J. 1983. Isolation, analysis of structure, synthesis, and biological actions of urotensin I neuropeptides. *Can J Biochem Cell Biol* 61, 602-614.
- Li Z, Secor SM, Lance VA, Masini MA, Vallarino M and Conlon JM. 1988. Characterization of bradykinin-related peptides generated in the plasma of six sarcopterygian species (African lungfish, amphiuma, coachwhip, bullsnake, gila monster and gray's monitor). *Gen Comp Endocrinol* 112, 108-114.
- Lüders T, Birkemo GA, Nissen-Meyer J, Andersen Ø and Nes IF. 2005. Proline Conformation-Dependent Antimicrobial

- Activity of a Proline-Rich Histone H1 N-Terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2399-2406.
- Mi X, Yu H, Jia P, Zhang Z, Zhang L and Liu J. 2010. Two tachykinin-like peptides from skin secretions of *Danio rerio*. *J Pept Sci* 16, 81-84.
- Montecucchi PC, de Castiglione R, Piani S, Gozzini L and Erspamer V. 1981. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 17, 275-283.
- Morishita F, Nakanishi Y, Kaku S, Furukawa Y, Ohta S, Hirata T, Ohtani M, Fujisawa Y, Muneoka Y and Matsushima O. 1997. A novel D-amino-acid-containing Peptide Isolated from *Aplysia* Heart. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 354-358.
- Muramoto K and Kamiya H. 1992. The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. *Biochim Biophys Acta* 1116, 129-136.
- Ohta N, Kubota I, Takao T, Shimonishi Y, Yasuda-Kamatani Y, Minakata H, Nomoto K, Muneoka Y and Kobayashi M. 1991. Fulicin, a novel neuropeptide containing a D-amino acid residue isolated from the ganglia of *Achatina fulica*. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 486-493.
- Otani M, Yamauchi H, Meguro T, Kitazawa S, Watanabe S and Orimo H. 1976. Isolation and characterization of calcitonin from pericardium and esophagus of eel. *J Biochem* 79, 345-352.
- Platzack B and Conlon JM. 1997. Purification, structural characterization and cardiovascular activity of cod bradykinins. *Am J Physiol* 272, 710-717.
- Rankin JC, Watanabe TX, Nakajima K, Broadhead C and Takei Y. 2004. Identification of angiotensin I in a cyclostome, *Lampetra fluviatilis*. *Zoolog Sci* 21, 173-179.
- Sherwood NM, Sower SA, Marshak DR, Fraser BA and Brownstein MJ. 1986. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *J Biol Chem* 261, 4812-4819.
- Shin MJ, Kim EJ, Kim CH, Go HJ, Kim IH, Ryu HS, Huh MD, Chung JK and Park NG. 2003. Purification of a bradykinin-related peptide from the skin of hagfish, *Eptatretus burgeri*. *J Kor Fish Soc* 36, 30-34.
- Shiomi K, Uematsu H, Yamanaka H and Kikuchi T. 1989. Purification and characterization of a galactose-binding lectin from the skin mucus of the conger eel, *Conger myriaster*. *Comp Biochem Physiol B* 92, 255-261.
- Shuttleworth CWR and Keef KD. 1995. Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission. *Regul Pept* 56, 101-120.
- Solcia E, Usellini L, Buffa R, Rindi G, Villani L, Aguzzi A and Silini E. 1989. Endocrine cell producing regulatory peptides. In: *Regulatory peptides (Experientia supplementum)*, Polak JM, ed. Birkhäuser Basel, Berlin, Germany. 220-246.
- Soyez D, van Herp F, Rossier J, Le Caer JP, Tensen CP and Lafont R. 1994. Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. D-amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides. *J Biol Chem* 269, 18295-18298.
- Takahashi A, Amemiya Y, Nozaki M, Sower SA, Joss J, Gorman A and Kawauchi H. 1995. Isolation and characterization of melanotropins from lamprey pituitary glands. *Int J Pept Protein Res* 46, 197-204.
- Takei Y, Hasegawa Y, Watanabe TX, Nakajima K and Hazon N. 1993. A novel angiotensin I isolated from an elasmobranch fish. *J Endocrinol* 139, 281-285.
- Teramoto T, Kuwada M, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y and Katayama K. 1993. A novel peptide from the funnel web spider venom, ω -Aga-TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 134-140.
- Tsutsui S, Iwamoto K, Nakamura O and Watanabe T. 2007. Yeast-binding C-type lectin with opsonic activity from conger eel (*Conger myriaster*) skin mucus. *Mol Immunol* 44, 691-702.
- Wang Y, Barton BA, Nielsen PF and Conlon M. 1999. Tachykinins (substance P and neuropeptide γ) from the brain of the pallid sturgeon, *Scaphirhynchus albus* and the paddlefish, *Polyodon spathula* (Acipenseriformes). *Gen Comp Endocrinol* 116, 21-30.
- Waugh D and Conlon JM. 1993a. Purification and characterization of urotensin II from the brain of a teleost (trout, *Oncorhynchus mykiss*) and an elasmobranch (skate, *Raja rhina*). *Gen Comp Endocrinol* 92, 419-427.
- Waugh D, Sower S, Bjénning C and Conlon JM. 1994. Novel tachykinins from the brain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the skate, *Raja rhina*. *Peptides* 15, 155-161.
- Waugh D, Wang Y, Hazon N, Balment RJ and Conlon JM. 1993b. Primary structure and biological activities of substance-P-related peptides from the brain of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Eur J Biochem* 214, 469-474.
- Yasuda A, Yasuda Y, Fujita T and Naya Y. 1994. Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone from the Crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiplicity of Molecular Forms by Stereo-inversion and Diverse Functions. *Gen Comp Endocrinol* 95, 387-398.
- Zadina JE, Banks WA and Kastin AJ. 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.