

## Bowfin-과 Shark-neuropeptide $\gamma$ 의 구조 및 수축효과

김은정 · 서정길 · 김찬희 · 고혜진 · 허민도\* · 문정혜\*\* · 박장수\*\*\* · 박남규<sup>1</sup>

부경대학교 수산과학대학 생물공학과, \*수산생명의학과, \*\*해양식량자원특성화사업단, \*\*\*부산대학교 자연과학대학 화학과

## Structure and Contractile Activity of the Bowfin- and Shark-neuropeptide $\gamma$

Eun Jung KIM, Jung-Kil SEO, Chan-Hee KIM, Hye-Jin GO, Min-Do HUH\*, Jung-Hye MOON\*\*, Jang-Su PARK\*\*\* and Nam Gyu PARK<sup>1</sup>

Department of Biotechnology and Bioengineering, \*Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science,

\*\*Seafood and Marine Resources Development Center, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*\*\*Department of Chemistry, College of National Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

The relationship between structure and contractile activity was studied on the three neuropeptide  $\gamma$  (mammalian-, bowfin-, shark-NP $\gamma$ ) that were synthesized by the solid-phase method. Circular dichroism spectra showed that mammalian-, bowfin- and shark-neuropeptide  $\gamma$  took an unordered structure in buffer solution and artificial liposome. The intestinal motility response was investigated with guinea-pig ileum, rat duodenum and carp intestine. In case of carp intestine, contractile activity was as follows; bowfin-NP $\gamma$  > shark-NP $\gamma$  > mammalian-NP $\gamma$ . On the other hand, the contractile activity of mammalian-neuropeptide  $\gamma$  was more potent than those of bowfin-, shark-neuropeptide  $\gamma$  in the guinea-pig ileum and rat duodenum. These results suggest that NP $\gamma$  show the species-specific activity.

Key words: fish neuropeptide  $\gamma$ , circular dichroism, contractile activity

### 서 론

Tachykinin peptide는 구조적으로 C-말단에 -Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>의 pentapeptide를 공통적으로 가지고 있으며 (Kagstrom et al., 1996), 척추동물과 무척추동물로부터 substance P (SP), neurokinin A (NKA) 및 neurokinin B (NKB)를 비롯하여 다양한 tachykinin peptide가 정제되었다 (Holmgren and Jensen, 1994; Waugh et al., 1993; Ikeda et al., 1993; Conlon et al., 1991; Schoofs et al., 1990). 이들은 생체 내에서 혈관 이완, 평활근수축, 중추신경계에서의 순환기 조절과 분비촉진등의 생리 활성을 가지며 (Zang et al., 1994; Takano et al., 1990; Takano et al., 1985), 이러한 활성들은 특이적인 수용체를 경유하여 나타난다고 알려졌다 (Patacchini and Maggi, 1995). 현재 SP, NKA와 NKB에 감수성이 있는 세종류의 수용체 (각각 NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub>)가 분류되어 각각에 대한 subtype의 존재도 밝혀졌다 (Burcher et al., 1991). 이들 수용체는 guinea-pig 회장에는 주로 NK<sub>1</sub> 수용체가 존재하고, rat 십이지장에는 NK<sub>2</sub> 수용체 그리고 rat mesenteric artery에 NK<sub>3</sub> 수용체가 존재하고 있다. 한편, 포유동물의 소장 (Kage et al., 1988)과 rat의 뇌와 소화 장관 (Takeda et al., 1990)으로부터 새로운 tachykinin인 neuropeptide  $\gamma$  (M-NP $\gamma$ )가 정제되었다. 이 M-NP $\gamma$ 는 21개의 아미노산으로 구성되어 있으며, C말단이 아미드화된 펩타이드로 일차 구조는 다음과 같다: H-Ser-Gly-Ala-Pro-Gln-Thr-Val-Pro-Leu-Gly-Arg-Lys-Arg-His-Lys-Gly-Glu-Met-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. 또한 goldfish (*Carassius auratus*)의 뇌 (Conlon et al., 1991), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)의 장관 (Jensen et al., 1993)으로부터 포유동물 유래의 M-NP $\gamma$ 와 구조적으로 상

동성이 높은 NP $\gamma$  관련 물질이 정제되어 그들의 일차구조가 밝혀졌다. 최근에 Ku et al. (1997)은 M-NP $\gamma$ , trout-NP $\gamma$  (T-NP $\gamma$ ) 및 goldfish-NP $\gamma$  (G-NP $\gamma$ )의 구조와 평활근 수축 활성에 관한 연구에 대해 보고하였다. CD 연구에 의하면 M-NP $\gamma$ 와 T-NP $\gamma$ 는 완충액과 인공지질막 상태에서 random구조를 취하였다. 그러나 G-NP $\gamma$ 는 완충액상에서 random구조를 가지나, 중성 및 산성인지질 존재하에서 각각 7% 및 12%의  $\alpha$ -helix와 random형태가 혼합된 구조를 형성하였다. 또한 guinea-pig의 회장과 rat의 십이지장에 대한 수축 활성은 M-NP $\gamma$ 가 어류 유래의 T-NP $\gamma$ 와 G-NP $\gamma$ 보다 높았으나, carp intestine에 대한 수축 활성은 어류 유래의 G-NP $\gamma$ 와 T-NP $\gamma$ 가 M-NP $\gamma$ 보다 높았다. Goldfish와 rainbow trout에서 뿐만 아니라 bowfin (*Amia calva*, B-NP $\gamma$ )의 위 (Waugh et al., 1995b)와 hammerhead shark (*Sphyrna lewini*, S-NP $\gamma$ )의 장관 (Waugh et al., 1995a)으로부터도 NP $\gamma$ 가 정제되었다. 그러나 이들 B-NP $\gamma$ 와 S-NP $\gamma$ 의 구조와 활성의 상관관계에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 CD spectra를 사용하여 완충액, 중성 및 산성지질하에서 이들 NP $\gamma$ 들의 이차구조를 조사하고, 아울러 합성 펩타이드의 실험동물에 대한 평활근 수축 효과를 조사함으로써 활성과 구조와의 상관관계를 알아보려고 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 일반시약

펩타이드 합성에 사용한 Fmoc-아미노산 유도체와 Fmoc-NH-SAL-resin, DMF, Piperidine, HOBT, DIPCI 및 TFA는 Watanabe

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

Chemical Industries, LTD., Hiroshima에서 구입하였다. 1,2-Ethanedithiol, *m*-cresol과 thioanisole은 Wako Pure Chemical Industries, Osaka에서 구입하였으며, egg-yolk phosphatidylcholine (EYPC)와 egg-yolk phosphatidylglycerol (EYPG)는 Sigma Chemical Co., St. Louis에서 구입하였다.

## 2. 실험동물

*Carp* (*Cyprinus carpio*)는 부경대학교 부속 양어장에서 분양 받은 평균 체중 600~800 g의 암수를 사용하였다. 평균 수온 20°C의 순환여과식 수조에서 10일 이상 순치 한 후 실험에 사용하였다. 또 다른 실험에서는 체중 250~300 g의 male Albino Hartly계 guinea-pig와 male Sprague Dawley계 rat을 사용하였다. 사육은 명암 12 시간 주기로 실온 24 ± 2°C의 동물 사육실에서 행하였다.

## 3. Neuropeptide $\gamma$ 의 합성 및 정제

M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 는 Milligen 9050 Peptide Synthesizer를 사용하여 이전의 방법과 동일하게 Fmoc-법에 따라 합성하였으며 (Ku et al., 1997), 이들의 일차 구조는 Table 1에 나타내었다.

분자량은 JEOL SX-102A의 Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS)에 의해 결정하였으며, M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 의 분자량은 각각 다음과 같다: M-NP $\gamma$ ; base peak, 2320.7, C<sub>99</sub>H<sub>159</sub>O<sub>29</sub>N<sub>34</sub>S, 2321.1, B-NP $\gamma$ ; base peak, 2495.6, C<sub>109</sub>H<sub>183</sub>N<sub>35</sub>O<sub>28</sub>S<sub>2</sub>, 2496.5, S-NP $\gamma$ ; base peak, 2517.6, C<sub>109</sub>H<sub>183</sub>N<sub>35</sub>O<sub>28</sub>S<sub>2</sub>, 2518.5.

## 4. Liposome의 조제

Small unilamellar vesicles (SUVs)는 이전의 연구방법과 동일하게 조제하였다 (Park et al., 1992). SUVs는 각각 중성 및 산성 지질로서 EYPC, EYPC-EYPG (3:1)로 조성된 지질로 만들었다.

## 5. Circular dichroism (CD) spectra

CD spectra는 1 mm path length의 quartz cell을 사용하는 JASCO J-600 spectropolarimeter로 이전의 방법과 동일하게 측정하였다 (Park et al., 1992).

## 6. 평활근 제조

### 1) Carp (*C. carpio*) intestine

실험어의 중추신경을 절단하여 복부를 절개한 후 gastrointestinal tract을 적출하였다. 절취 장관은 각각 1.5 cm 길이로 단편을 내어, 모세혈관 및 adipose 등을 제거한 후, longitudinal muscle strips을 실험에 사용하였다. 사용한 Ringer solution의 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 100.8, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1,

MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, Glucose 11.1.

이 용액은 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 혼합가스로 포화시킨 후 20°C로 일정하게 유지하였다.

### 2) Guinea-pig의 회장

Male Albino Hartly guinea-pig을 decapitation하여 복부를 절개한 후 맹장에 인접한 회장을 절취하여 longitudinal muscle strips을 만들었다. 이 조직에 사용한 Krebs's buffer의 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 127.0, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 1.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, Glucose 10.0. 이 용액은 37°C로 일정하게 유지시키고 반응조 내에 조직을 고정시켰다.

### 3) Rat의 십이지장

Male Sprague Dawley rat을 decapitation하여 복부를 절개한 후 위장 아래 유문 괄약근으로부터 십이지장을 절취하였다. Guinea-pig의 회장과 동일한 방법으로 longitudinal muscle strips을 만들어 37°C로 유지되는 반응조에 조직을 고정시켰다. 이 장관조직에 사용한 Krebs's buffer의 조성은 다음과 같다: (mM), NaCl 118.7, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.8, Glucose 10.1.

## 7. 장관수축활성 측정

Longitudinal muscle strip를 반응조에 건 후, 90분 동안 안정화 시켜, resting tension이 1.0 g이 되도록 하였다. 이때 15분 간격으로 완충액을 교체해 주었고, 약물을 투여하기 전에 carbachol (5 × 10<sup>-7</sup> M)로 장관을 활성화시켰다. 이후 합성한 peptide성 약물을 농도-의존적으로 투여하였고, carbachol (5 × 10<sup>-7</sup> M)에 의한 수축 반응을 100%로 하여 상대적 수치로 나타냈으며, ED<sub>50</sub> (최고 수축의 50%를 나타낼 때의 농도) 및 E<sub>max</sub> (최고 수축 %)으로써 각각의 반응을 비교하였다.

## 결 과

### 1. CD 연구결과

합성한 3종류의 NP $\gamma$ 들의 이차구조를 알아보기 위해 TES 완충액, 중성지질 및 산성지질 하에서 CD spectra를 측정하였다 (Fig. 1). 완충액조건하에서 M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 는 200 nm에서 negative maximum을 지나는 전형적인 random한 구조를 취하였다 (Fig. 1A). 중성 및 산성지질 조건하에서도 여전히 모든 NP $\gamma$ 들이 random한 구조를 형성하였다 (Fig. 1B and 1C). 이들 3종류의 물질들은 측정한 모든 조건하에서 불규칙적인 구조를 나타냈지만 CD spectra상에서 약간의 차이를 보였다. 그러나 이러한 변화는 CD 결과만으로는 해석이 불충분하였다.

Table 1. The primary structure of neuropeptide  $\gamma$

|               |   |
|---------------|---|
| M-NP $\gamma$ | Ser-Gly-Ala-Pro-Gln-Thr-Val-Pro-Leu-Gly-Arg-Lys-Arg-His-Lys-Gly-Glu-Met-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>     |
| B-NP $\gamma$ | Ser-Gly-Ala-Pro-Gln-Thr-Val-Pro-Leu-Gly-Arg-Lys-Arg-His-Lys-Gly-Glu-Met-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>     |
| S-NP $\gamma$ | Ala-Ser-Gly-Pro-Thr-Gln-Ala-Gly-Ile-Val-Gly-Arg-Lys-Arg-Gln-Lys-Gly-Glu-Met-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub> |

The common sequences were expressed as bold-face.

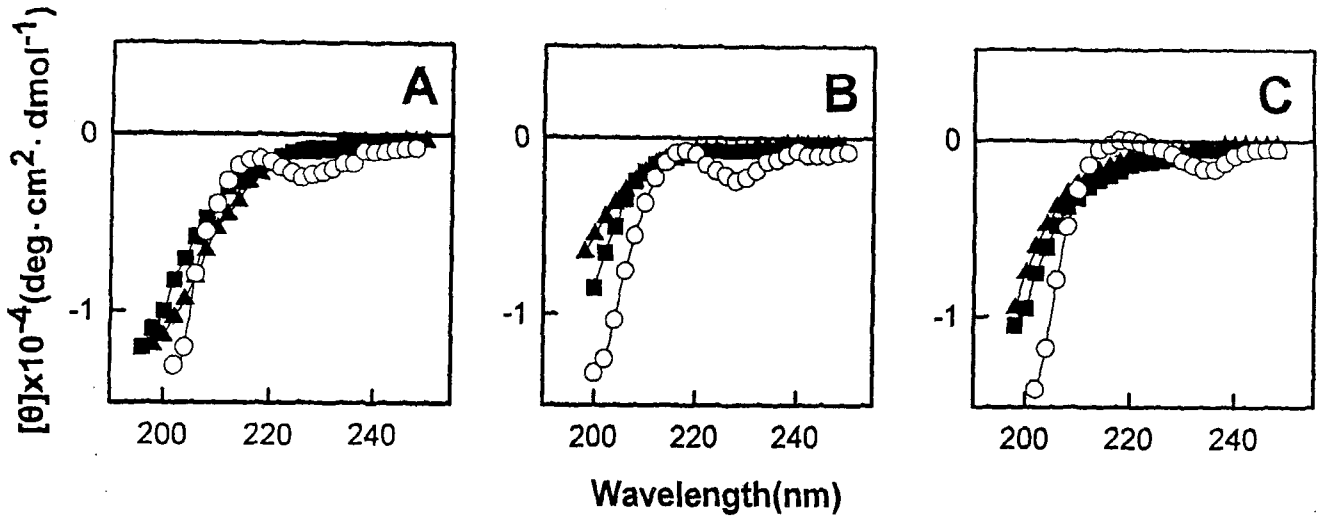


Fig. 1. CD spectra of M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  and S-NP $\gamma$  in TES buffer (A), in the presence of EYPC liposome (B) and EYPC:EYPG (3:1) liposome (C) : M-NP $\gamma$ (○), B-NP $\gamma$ (▲) and S-NP $\gamma$ (■).

2. 장관수축활성

M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 에 대한 장관수축반응을 알아보기 위하여 guinea-pig의 회장과 rat의 십이지장 및 carp의 장관을 사용하여 활성 측정을 하였다. 이들의 장관에 대한 B-NP $\gamma$ 의 전형적인 수축양상은 Fig. 2에 나타내었다. B-NP $\gamma$ 는  $10^{-10}$  M에서  $10^{-6}$  M 까지 투여되었고, 수축 반응은 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 M-NP $\gamma$ 와 S-NP $\gamma$ 의 경우에 있어서도 B-NP $\gamma$ 와 유사하게 농도 의존적 반응을 보였다 (data not shown). 이러한 반응 결과는 carbachol의 최대 반응을 100 %로 하여 상대적인 수축 % 로서 나타내었는데, guinea-pig의 회장에 대한 NP $\gamma$ 들의 농도 의존 곡선은 Fig. 3에 나타내었다.

Guinea-pig의 회장에서 B-NP $\gamma$ 와 S-NP $\gamma$ 가  $10^{-10}$  M에서 12.5%, 18.1%의 수축 활성을 나타냈으며, M-NP $\gamma$ 는  $10^{-9}$  M에서 28.14%

의 수축 활성을 나타내기 시작하여 농도가 증가함에 따라 NP $\gamma$ 의 수축 반응은 증가하였다.

Guinea-pig의 회장에 대한 NP $\gamma$ 들의 ED<sub>50</sub>값의 비교에 의한 효력은 M-NP $\gamma$ >B-NP $\gamma$ >S-NP $\gamma$ 의 순이었으나, 현저한 차이는 보이지 않았다 (Fig. 3).

Fig. 4는 rat 십이지장에 대한 NP $\gamma$ 들의 농도 의존 곡선이다. M-NP $\gamma$ 는  $10^{-10}$  M에서 약 4.4%의 역치값을 나타냈으며, B-NP $\gamma$ 와 S-NP $\gamma$ 는  $10^{-8}$  M에서 각각 47.4%와 71.3%의 역치값을 나타냈다.

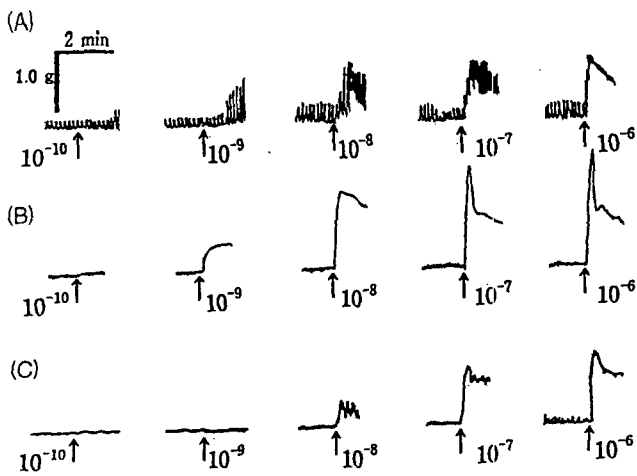


Fig. 2. Typical tracings illustrating the contractile response of the carp intestine (A), guinea-pig ileum (B) and rat duodenum (C) to B-NP $\gamma$ . Each arrow represents the B-NP $\gamma$  applied to the smooth muscles. The unit is molarity.

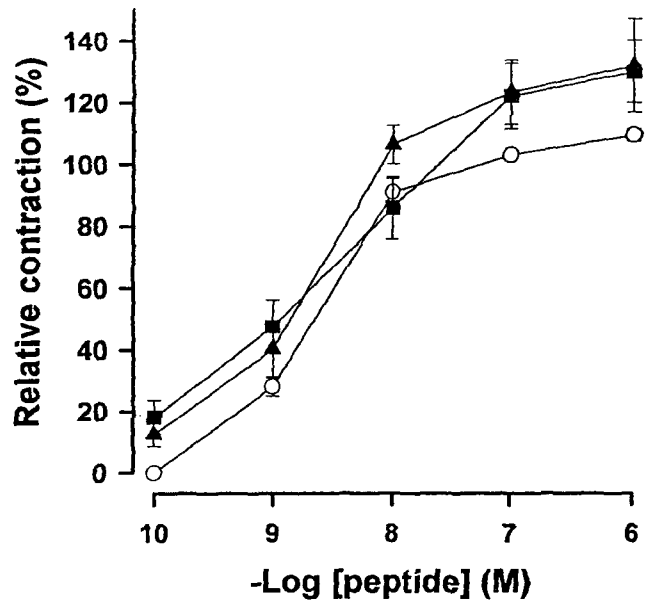


Fig. 3. Concentration response curves to NP $\gamma$  series induced contraction in the guinea-pig ileum : M-NP $\gamma$ (○), B-NP $\gamma$ (▲) and S-NP $\gamma$ (■). Contractile effects were expressed as % the maximal response to carbachol,  $5 \times 10^{-7}$ M. Each point represents the mean  $\pm$  s. e. for 4 experiments.

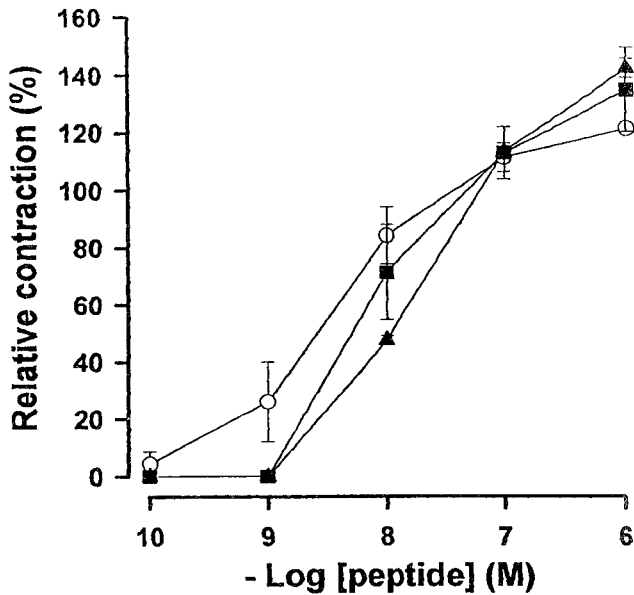


Fig. 4. Concentration response curves to NP $\gamma$  series induced contraction in the rat duodenum: M-NP $\gamma$  (○), B-NP $\gamma$  (▲) and S-NP $\gamma$  (■). Contractile effects were expressed as % the maximal response to carbachol,  $5 \times 10^{-7}$  M. Each point represents the mean  $\pm$  s. e. for 4 experiments.

ED<sub>50</sub>값의 비교에 의한 효력은 M-NP $\gamma$ >S-NP $\gamma$ >B-NP $\gamma$ 순이었고, M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 의 E<sub>max</sub> 값은 각각  $121 \pm 1.5\%$ ,  $142 \pm 3.3\%$  및  $135 \pm 14.6\%$ 를 나타냈다.

Carp intestine에 있어서 NP $\gamma$ 들에 의해 유도되는 농도 의존 곡선은 Fig. 5에 나타내었다. M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$ 와 S-NP $\gamma$ 는  $10^{-9}$  M에서 역치값을 나타냈고, ED<sub>50</sub>값의 비교에 의한 효력 B-NP $\gamma$ >M-NP $\gamma$ >S-NP $\gamma$ 의 순이었다. 각 장관 조직에 대한 ED<sub>50</sub>값과 E<sub>max</sub>값은 Table 2에 나타내었다. ED<sub>50</sub>값으로 비교했을 때, guinea-pig 및 rat에서는 M-NP $\gamma$ 가 각각  $2.1 \times 10^{-9}$  M과  $3.9 \times 10^{-9}$  M로 가장 효과적이었다. 한편 E<sub>max</sub>의 경우는 각 조직에 대해서 현저한 차이를 보이지 않았다.

## 고 찰

SP, NKA와 NKB 및 NP $\gamma$ 를 포함하는 tachykinin peptide는 생체 내에 존재하며 혈관 이완, 평활근 수축과 염증-면역반응 등의 활성을 지니고 있다고 알려져있다 (Uchida et al., 1987; Minamino et al., 1984). 최근 이러한 생리 활성 펩타이드의 구조-활성간의 상관관계를 알아보기 위해 이들 펩타이드와 그들 수용체와의 상호작용에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다 (Siligardi et al., 1994; Woolley and Deber, 1987; Erne et al., 1986). SP는 완충액 조건하에서 random한 구조를 취하지만, trifluoroethanol (TFE) 또는 인공지질 존재하에서 부분적으로  $\alpha$ -helix구조를 취한다고 보고되었다 (Williams and Weaver, 1990; Woolley and Deber, 1987). 또한 Ku et al. (1997)의 CD 결과에 의하면, G-NP $\gamma$ 는 완충액상태에서 random구조를 취하지만 중성과 산성 인공지질막하

에서는 각각 7%와 12%의  $\alpha$ -helix를 포함하고 있는 구조를 취한다고 보고되었다. 이러한 결과들은 생리 활성 펩타이드에 존재하는 양전하와 인공지질막에 존재하는 음전하간의 정전기적인 상호작용에 의해 부분적으로 구조의 변이를 일으키는 것을 제시한다. 본 연구에서 사용된 어류 유래의 NP $\gamma$ 인 B-NP $\gamma$ 와 S-NP $\gamma$ 의 이차구조를 알아보기 위해 CD spectra를 사용하여 조사하였고 (Fig. 1), 표준 물질로서 M-NP $\gamma$ 를 사용하였다. 완충액 조건하에서 M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 는 random구조를 취했고 (Fig. 1A), 중성 및 산성지질막 조건하에서도 이들 NP $\gamma$ 들은 random구조를 형성하였다 (Fig. 1B and 1C).

이들의 이차구조가 완충액 및 인공지질막 존재하에서 뚜렷한 구조의 차이가 나타나지 않는 것으로 미루어 보아 이들 3종류의 NP $\gamma$ 에 포함되어 있는 양전하와 인지질의 음전하간의 정전기적인 상호작용이 구조 변화에 영향을 주지 않는다는 것을 예측할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 3종류의 NP $\gamma$ 는 CD spectra 상에서 약간의 차이를 보였지만 CD 결과만으로는 이러한 구조 변화의 해석이 불가능하였다.

이전의 연구에 의하면, M-NP $\gamma$ 와 T-NP $\gamma$ 는 완충액 및 인공지질막 조건하에서 random구조를 나타낸다는 것이 밝혀졌으나, FT-IR을 이용한 연구에서 중성지질 및 산성지질 조건하에서 M-NP $\gamma$ 가 T-NP $\gamma$ 보다  $\beta$ -구조 및 loop영역을 더 많이 함유하고 있다고 보고되었다 (Ku et al., 1997). 따라서 M-NP $\gamma$ , B-NP $\gamma$  및 S-NP $\gamma$ 의 CD spectra의 약간의 변화는  $\beta$ -구조 및 loop영역의 함유량의 차이에 의해 기인된 것 같다.

또한, NP $\gamma$ 들의 구조와 평활근 수축 활성간의 상관관계를 알아보기 위해 여러 실험동물을 이용하여 장관 수축 활성을 조사하

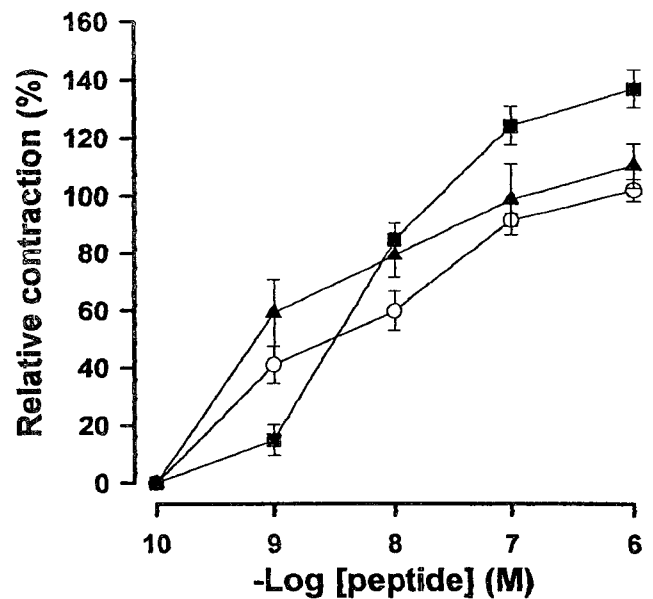


Fig. 5. Concentration response curves to NP $\gamma$  series induced contraction in the carp intestine: H-NP $\gamma$  (○), B-NP $\gamma$  (▲) and S-NP $\gamma$  (■). Contractile effects were expressed as % the maximal response to carbachol,  $5 \times 10^{-7}$  M. Each point represents the mean  $\pm$  s. e. for 4 experiments.

**Table 2.** ED<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> of M-NPγ, B-NPγ and S-NPγ induced contraction in the guinea-pig ileum, rat duodenum and carp intestine. Each value is from 4 experiments.

|       | Guinea-pig ileum     |                  | Rat duodenum         |                  | Carp intestine       |                  |
|-------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
|       | ED <sub>50</sub>     | E <sub>max</sub> | ED <sub>50</sub>     | E <sub>max</sub> | ED <sub>50</sub>     | E <sub>max</sub> |
| M-NPγ | 2.1×10 <sup>-9</sup> | 109<br>(1.89)    | 3.9×10 <sup>-9</sup> | 121<br>(1.5)     | 3.0×10 <sup>-8</sup> | 102<br>(3.7)     |
| B-NPγ | 2.4×10 <sup>-9</sup> | 132<br>(15.1)    | 2.2×10 <sup>-8</sup> | 142<br>(3.3)     | 7.0×10 <sup>-9</sup> | 110<br>(3.3)     |
| S-NPγ | 2.8×10 <sup>-9</sup> | 130<br>(10.1)    | 8.0×10 <sup>-9</sup> | 135<br>(14.6)    | 5.1×10 <sup>-8</sup> | 137<br>(14.6)    |

Number in parentheses are standard error.

였다 (Table. 2). NK<sub>1</sub> 수용체가 우세하게 존재하는 guinea-pig의 회장에서 M-NPγ가 B-NPγ와 S-NPγ보다 우세한 ED<sub>50</sub>값을 보였으나, E<sub>max</sub>값의 경우 B-NPγ가 높게 나타났다. NK<sub>2</sub> 수용체가 다량 존재하는 rat 십이지장의 경우는 M-NPγ가 어류 유래의 B-NPγ와 S-NPγ보다 ED<sub>50</sub>값 및 E<sub>max</sub>값이 높게 나타났다. 한편 M-NPγ에 대한 수축활성은 guinea-pig의 회장과 rat 십이지장 조직에 각각 분포하고 있는 수용체가 다름에도 불구하고 현저한 차이가 없었다. 이러한 결과들은 M-NPγ가 NK<sub>1</sub>수용체와 NK<sub>2</sub>수용체를 경유하여 활성을 나타낸다는 Raman et al. (1994)의 보고와 포유류 장관에 대해 M-NPγ가 T-NPγ 및 G-NPγ보다 활성이 높게 나타난 Ku et al. (1997)의 연구결과와 일치함을 나타낸다. 또한, 이러한 결과들은 M-NPγ가 어류 유래의 NPγ들보다 rat와 guinea-pig의 장관에서 NK<sub>1</sub> 및 NK<sub>2</sub> 수용체에 대해 높은 친화성을 나타냄을 제시한다.

Carp intestine은 NK<sub>1</sub> agonist인 SP에 의해 수축 활성을 나타낸다고 보고되었다 (Kitazawa et al., 1988). 그러나, 포유류 장관에서 NK<sub>1</sub> 수용체가 존재하고 있다고 알려진 guinea-pig의 회장과 비교했을 때 ED<sub>50</sub>값의 증가와 E<sub>max</sub>값의 감소로 활성의 세기가 낮았다. 이것으로 미루어 보아 아마도 carp intestine에 존재하는 NK<sub>1</sub> 수용체는 포유류에 존재하는 수용체와는 다른 subtype으로 존재하는 것 같다.

Carp intestine에 대한 NPγ들의 수축활성의 측정 결과에 의하면, 어류 유래의 NPγ가 M-NPγ에 비해 대체적으로 높은 활성을 보였다. Carp intestine에 대한 어류 유래 NPγ의 활성을 연구한 Ku et al. (1997)의 결과에 의하면 G-NPγ와 T-NPγ의 활성이 M-NPγ보다 높게 나타났다. 즉, 부분적으로 helix구조를 포함하며 carp와 가장 친화상 가까운 goldfish유래의 G-NPγ와 다음으로 친화상 가까운 위치에 있는 T-NPγ가 carp intestine에 대해 높은 수축활성을 나타냈다. 이것으로 미루어 보아, carp와 친화상 가까운 어류일수록 높게 나타남을 알 수 있었다 (Table. 2). 따라서 이러한 결과들은 종-특이적 활성을 나타냄을 제시한다. 본 연구결과와 Ku et al. (1997)의 결과들로 미루어 보아 어류에 존재하는 수용체는 부분적으로 helix구조를 취하는 G-NPγ와 특이적인 반응을 나타내거나 또는 포유류에 존재하는 NK<sub>1</sub> 수용체와는 다른 형태의 subtype에 대해 수축 반응에 관여하는 것 같다.

요 약

Tachykinin peptide의 구조와 생리활성간의 상관관계를 조사하기 위해 고상법으로 합성한 어류 유래의 neuropeptide γ (Mammalian-, Bowfin- 그리고 Shark-neuropeptide γ)를 사용하였다. 이들의 이차 구조를 알아보기 위해 circular dichroism (CD)을 이용하였다. CD 연구 결과에 따르면, mammalian-neuropeptide γ, bowfin-neuropeptide γ와 shark-neuropeptide γ는 완충액과 인공지질막 조건하에서 random구조를 나타내었다. 또한 이들 neuropeptide γ의 장관에 대한 수축 활성을 조사하기 위해 guinea-pig의 회장, rat의 십이지장과 carp intestine을 사용하였다. Carp intestine에서 bowfin-neuropeptide γ > shark-neuropeptide γ > mammalian-neuropeptide γ 순으로 활성이 나타났다. 그러나, guinea-pig 회장과 rat 십이지장에 대해서 mammalian-NPγ의 활성이 어류 유래의 neuropeptide γ들보다 높게 나타났다. 이러한 결과들은 neuropeptide γ가 종-특이적인 활성을 나타냄을 제시한다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비 (수산해양과학)에 의하여 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Burcher, E., C.J. Mussap, D.P. Geraghty, J.M. McClure-Sharp and D. J. Watkins. 1991. Concepts in characterization of tachykinin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 632, 123~136.  
 Conlon, J.M., F. O' Harte, R.E. Peter, O. Kah. 1991. Carassin ; a tachykinin that is structurally related to neuropeptide γ from the brain of the goldfish. *J. Neurochem.*, 56, 1432~1436.  
 Erne, D., K. Rolka and R. Schwyzler. 1986. Membrane structure of substance P : secondary structure of substance P in 2,2,2-trifluoroethanol, methanol and on flat lipid membranes studies by infrared spectroscopy. *Helv. Chem. Acta.*, 69, 1807~1816  
 Holmgren, S. and J. Jensen. 1994. Comparative aspects on the biochemical identity of neurotransmitters of autonomic neurons. In : S. Nissson. ; S. Holmgren, eds. *Comparative physiology and evolution of the autonomic nervous system*. Harwood Academic Publishers GmbH, pp119~167.  
 Ikeda, T., H. Minakata, K. Nomoto, Ichirokubota and Y. Mu-neoka. 1993. Two novel tachykinin-related neuropeptides in the echiuroid worm, *Urechis unicintus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 192.  
 Jensen, J.K., R. Olson and J.M. Conlon. 1993. Primary structures and effects on gastrointestinal motility tachykinins from the rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 265, R803~R810.  
 Kage, R., G.P. McGregor, L. Thim and J.M. Conlon. 1988. Neuropeptide γ : a peptide isolated from rabbit intestine that if derived from γ-preprotachykinin. *J. Neurochem.*, 50, 1412~1417.

- Kagstrom, J., S. Holmgem, K.R. Olson, J.M. Conlon and J. Jensen. 1996. Vasoconstrictive effects of native tachykinin in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Peptides*, 17, 39~45.
- Kitazawa, T., A. Kimura, H. Furugashi, K. Temma and H. Kondo. 1988. Contractile response to substance P in isolated smooth muscle strips from the intestinal bulb of the carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Physiol.*, 89C, 277~285.
- Ku, H.J., J.K. Seo, E.H. Kim, M.D. Huh, J.K. Chung, J.S. Park, S.W. Kang and N. G. Park. 1997. Conformation and biological activity of the neuropeptide  $\gamma$ . *J. Korean Fish. Soc.*, 30, 244~251.
- Minamino, N., K. Kangawa, A. Fukuda and H. Matsuo. 1984. Neuro-medin L : A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Neuropeptides*, 4, 157~166.
- Park, N.G., S. Lee, O. Oishi, H. Aoyagi, S. Iwanaga, S. Yamashita and M. Ohno. 1992. Conformation of tachyplestin I from *Tachypleus tridentatus* when interacting with lipid matrices. *Biochemistry*, 31, 12241~12247.
- Patacchini, R. and C.A. Maggi. 1995. Tachykinin receptor and receptor subtypes., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 329, 161~184.
- Raman, M., M.L. Rdal, A. Al-Saffar and P.M. Hellstr. m. 1994. Intestinal motility response to neuropeptide  $\gamma$  *in vitro* and *in vivo* in the rat : comparison with neurokinin 1 and neurokinin 2 receptor agonist. *Acta. Physiol. Scand.*, 151, 497~505.
- Schoofs, L., G. Mark Holman, T.K. Hayes, R.J. Nachman and A. D. Loof. 1990. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS. Lett.*, 261, 397~401.
- Siligardi, G., B. Samori, S. Melandri, M. Visonti and A. F. Drake. 1994. Correlations between biological activities and conformational properties for human, salmon, eel, porcine calcitonins and elcatonin elucidated by CD spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 221, 1117~1125.
- Takano, Y., Y. Takeda, M. Doteuch, K. Inouye and H.-O Kamiya. 1985. Effect of a novel tachykinin, substance K, on salivation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 111, 381~383.
- Takano, Y., A. Nagashima, T. Hagio, K. Tateishi and H.-O Kamiya. 1990. Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Research*, 528, 231~237.
- Takeda, Y., J. Tadedda, B.M. Smart and J.E. Krause. 1990. Regional distribution of neuropeptide  $\gamma$  and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. *Reg. Pept.*, 28, 323~333.
- Uchida, Y., A. Nomura, M. Ohtsuka, S. Hasegawa, K. Goto, S. Kimura, Y. Sugita and Y. Uchiyama. 1987. Neurokinin A as a potent bronchoconstrictor. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136, 718~721.
- Waugh, D., Y. Wang, N. Hazon, R.J. Balment and J.M. Conlon. 1993. Primary structures and biological activities of substance P related peptides from the brain of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Eur. J. Biochem.*, 214, 409~414.
- Waugh, D., V. Bondareva, T. Rusakov, C. Bjenning, P.F. Nielsen and J.M. Conlon. 1995a. Tachkinins with unusually structural features from a urodele, the amphiuma, an elasmobranch, the hammerhead shark, and an agnathan, the river lamprey. *Peptides*, 16, 615~621.
- Waugh, D., K. Groff, B. Platzack, J.M. Conlon. 1995b. Isolation, localization, and cardiovascular activity of tachykinins from the stomach of the bowfin, *Amia calva*. *Am. J. Physiol.*, 269, R565~571.
- Williams, R.W. and J.L. Weaver. 1990. Secondary structure of substance P bound to liposomes in organic solvents and in solution from Raman and CD spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 265, 2505~2513.
- Woolley, G.A. and C.M. Deber. 1987. Peptides in membranes : lipid-induced secondary structure of substance P. *Biopolymers*, 26, S 109~S121.
- Zang, G., Y. Yamamoto, K. Miwa and H. Suzuki. 1994. Vasodilation induced by substance P in guinea-pig carotid arteries. *Am. J. Physiol.*, 266, H1132~H1137.

---

1998년 12월 15일 접수

1999년 3월 15일 수리