

별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 새로운 평활근 이완활성 펩타이드의 정제

김은정 · 김찬희 · 고혜진 · 김인혜 · 안상현 · 손희영 · 박희연¹
윤호동¹ · 장영채² · 홍용기 · 박남규*
부경대학교 수산과학대학 생물공학과, ¹국립수산과학원 생명공학연구단,
²대구가톨릭대학교 의과대학

Purification and Characterization of a Novel Neuropeptide with a Smooth Muscle-Relaxing Activity from the Starfish, *Asterina pectinifera*

Eun Jung KIM, Chan-Hee KIM, Hye-Jin GO, In Hae KIM, Sang Hyun AN, Hee-Young SOHN, Hee Yeon PARK¹, Ho Dong YOON¹, Young-Chae CHANG², Yong-Ki HONG and Nam Gyu PARK*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Biotechnology Research, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-900, Korea

²Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

A novel neuropeptide with a relaxing activity on the dorsal retractor muscle (DRM) was isolated from the whole body extract of the starfish, *Asterina pectinifera*. The peptide was purified by gel-filtration, ion-exchange and C₁₈ reversed-phase HPLC. The complete amino acid sequence of this peptide, which was determined by automated Edman degradation and MALDI-TOF mass, was Phe-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Tyr-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp. A comparison of the amino acid sequence with those of other known neuropeptides revealed that the asteripectin was a novel neuropeptide with smooth muscle-relaxing activity on the starfish DRM. This peptide showed threshold response to relaxing activity on the DRM at 10⁻¹⁰ M and the maximal relaxing effect was 120±7.0% at 10⁻⁵ M. The relaxing activity of this peptide on the starfish DRM increased in a dose-dependent manner.

Key words: *Asterina pectinifera*, Dorsal retractor muscle, Relaxing activity, Starfish

서 론

구조적으로 가로무늬를 가지고 있지 않은 포유류 평활근은 내장의 여러 장기 및 순환기 계통의 관벽을 구성하며, 내용물의 수송, 분해, 배출 및 보존과 유지 등의 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 평활근은 포유동물에서 뿐만 아니라 진화상 하등한 연체동물에서도 횡문이 없고 filaments와 dense body를 포함하고 있는 catch muscle fiber로서 존재함이 보고된 바 있다(Twarog, 1967). 이러한 이유에서 포유동물뿐만 아니라 연체동물을 이용한 신경성 펩타이드의 평활근 조절에 관한 다양한 연구결과가 진행되고 있으며, 주로 연체동물의 catch relaxing peptide를 중심으로 이루어지고 있다. 그러나, 연체동물보다 척추동물과 진화상 더 밀접한 종으로 인식되고 있는 극피동물의 근육생리는 연체동물의 근육계보다 척추동물의 근육계와 유사할 것으로 생각되어지지만, 이들을 이용한 연구는 미비한 실정이다(Elphick and Melarange, 2001). 극피동물의 근육계 중 해삼의 longitudinal muscle band와 불가사리

dorsal retractor muscle (DRM)은 body wall 진피에 존재하는 작은 근육들과 연결되어 해삼과 불가사리가 수축상태에서 딱딱함을 유지하거나, 이동시 몸의 부드러움을 유지함에 있어 결정적인 역할을 한다는 것이 보고되었다(Motokawa, 1984).

최근 극피동물인 해삼(*Holothuria glaberrima*)으로부터 해삼의 rectum과 longitudinal muscle band에 대해 평활근 이완활성을 나타내는 GFSKLYFamide, SGYSVLYFamide가 발견되었다(Diaz-Miranda et al., 1995). 이들 물질은 immunoreactivity 기법에 의해 해삼의 몸 전체에 넓게 분포하고 있음이 밝혀졌다(Diaz-Miranda et al., 1995). 또한, 다른 종인 해삼(*Stichopus japonicus*)의 longitudinal muscle과 body wall로부터도 해삼의 longitudinal muscle에 수축활성을 갖는 NGIWYamide와 intestine으로부터 이완활성을 유발하는 GYSPFMamide 및 FKSPFMamide가 보고되어졌다(Iwakoshi et al., 1995). 한편, 북대서양에 서식하는 불가사리인 *Asterias rubens*, *Asterias forbesi*의 radial nerve cords로부터 FMRamide 관련 peptide인 S1과 S2가 정제되었고(Elphick et al., 1991), 이들은 기존의 알려진 신경성 펩타이드와 다른 SALMamide로 명명되었다.

*Corresponding author: ngpark@pknu.ac.kr

면역조직학적 연구에 의하면 S1과 S2는 결과로부터 불가사리의 몸과 neuromuscular organ에 넓게 존재하고 있다(Moore and Thorndyke, 1993; Newman et al., 1995a; Newman et al., 1995b). SALMFamide는 *in vivo*상에서 불가사리 cardiac stomach에 대하여 이완활성을 나타냈으며, 혈관 평활근 이완활성을 갖는 물질로 알려진 NO (Nitric oxide) 또한 같은 조직에서 이완활성을 나타냈다(Elphick and Melarange, 2001). Table 1은 현재까지 극피동물로부터 정제된 SALMFamide family를 나타낸다.

따라서, 본 연구에서는 우리나라 연근해에 서식하고 있는 별불가사리 *Asterina pectinifera*를 이용하여 DRM에 대해 이완활성을 지닌 펩타이드를 분리 및 정제하였다. 또한, 이들의 일차구조 및 활성에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 별불가사리(*Asterina pectinifera*, 450마리, 체장 8-15 cm)는 2002년 8월에 경북 포항 호미곶에서 채집하였다. 살아있는 상태의 별불가사리를 즉시 실험에 사용하였다.

시약 및 재료

펩타이드들을 합성하기 위해 Fmoc-NH-PAL-Resin, Fmoc-amino acid Wang Resin, Fmoc-amino acid 및 1-hydroxybenzotriazole는 Advanced ChemTech사(Louisville, KY, USA)에서 구입하였다. *N,N*-Diisopropylcarbodiimide는 Watanabe사(Hiroshima, Japan)로부터 구입하였고, piperidine, trifluoroacetic acid, *m*-cresol, 1,2-ethanedithiol 및 thioanisole은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC-grade의 *N,N*-dimethylformamide, water (H₂O) 및 acetonitrile (CH₃CN)은 TEDIA사(Ohio, USA)에서 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

별불가사리로부터 시료의 추출

살아있는 별불가사리 (450마리)를 70% 메탄올 용액에 넣어 중탕법으로 65℃ 에서 5분간 끓인 후, 5% 초산을 넣고 조직을

파쇄하여 원심분리(4℃, 40분, 10,000×g)를 하였다. 침전물은 다시 한번 70% 메탄올 용액을 가한 후, 5% 초산용액을 넣고 homogenizer로 추출하여 처음과 같은 조건으로 원심분리 하였다. 상층액은 농축시킨 다음, 시료:에탄올=2:9 (v/v)의 비율로 에탄올을 첨가하여 원심분리(4℃, 40분, 10,000×g) 하여 침전물을 제거하였다. 그리고 상층액은 다시 농축하여 시료:에탄올=1:10 (v/v)의 비율로 에탄올을 첨가하여 원심분리(4℃, 40분, 10,000×g)하여 침전물을 제거하였다. 상층액은 다시 한번 더 시료:에탄올=3:10 (v/v)의 비율로 에탄올을 첨가하여 원심분리(4℃, 40분, 10,000×g)하여 침전물을 제거하였다. 이 단계를 거친 상층액은 에탄올 및 NaCl을 시료(1 L):에탄올(8 L):NaCl (11 g)의 비율로 첨가한 후, 4℃에서 40분 동안 10,000×g로 원심분리를 행하였고 얻어진 상층액은 농축하였다. 농축한 상층액에 총 농도가 0.1 N HCl이 되도록 1 N HCl을 첨가하고 원심분리(4℃, 50분, 20,000×g)를 행하였다.

원심 분리한 상층액은 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 주입하여 0.1% TFA가 포함된 H₂O (D.W.), 10% 메탄올(retained materials; RM10) 및 60% 메탄올(RM60)과 100% 메탄올(RM100)로 물질들을 용출시킨 후, 각 분획들은 1/1,000의 농도로 불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정에 사용되었다(Fig. 1).

별불가사리 DRM에 대한 이완활성 물질의 정제

별불가사리 추출물 RM60을 먼저 CM52 (2.5×30 cm)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 분리를 행하였다: gradient, 20 mM→1.5 M ammonium acetate (pH 5.0, 6시간); 유속, 2.75 mL/min; fraction vol., 11 mL/4 min. 첫단계의 분리에서 fraction 49-50에서 활성을 나타내었으며, 이 분획들은 두 번째 정제과정으로 역상 HPLC column (Vydac protein & peptide C₁₈, 9.2×250 mm)을 이용하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A 용매, 0.1% TFA 수용액(pH 2.2); B 용매, 0.1% TFA를 포함한 100% CH₃CN (pH 2.2); gradient, 0→100% B용매(200분); 유속, 3.0 mL/min; 온도, 40℃; fraction volume, 4.0 mL. 불가사리 DRM을 사용하여 각 분획들의 이완활성을 측정된 결과, fraction 25-26에서 이완활성을 보였다. Fraction 25-26은 세 번째 단계로

Table 1. The amino acid sequences of the echinoderm SALMF amide family

Peptide name (species)	Sequence
S1 (Asteroidea)	1 Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Leu-Met-Phe-amide 5
S2 (Asteroidea)	1 Ser-Gly-Pro-Tyr-Ser-Phe-Asn-Ser-Gly-Leu-Tyr-Phe-amide 5 10
GFSKLYFa (Holothuroidea)	1 Gly-Phe-Ser-Lys-Leu-Tyr-Phe-amide 5
SGTSVLYFa (Holothuroidea)	1 Ser-Gly-Tyr-Ser-Val-Leu-Tyr-Phe-amide 5
GYSPFMFa (Holothuroidea)	1 Ser-Gly-Tyr-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide 5
FKSPFMFa (Holothuroidea)	1 Phe-Lys-Ser-Pro-Phe-Met-Phe-amide 5

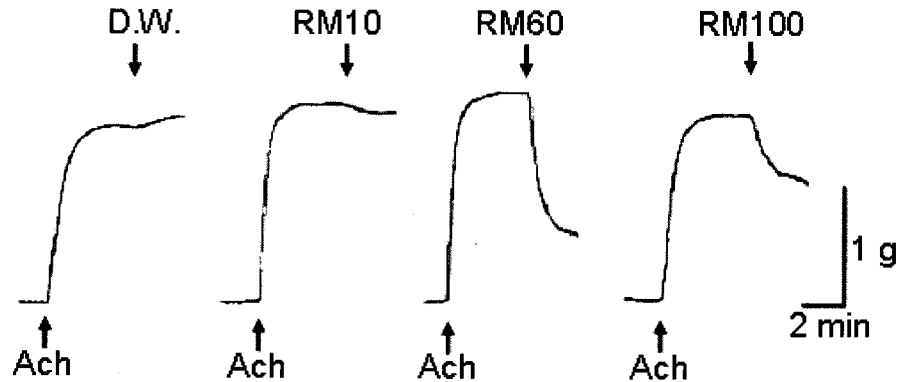


Fig. 1. Typical tracing illustrating the relaxing response of starfish extracts, *Asterina pectinifera*. Each down arrow represents the sample applied to the starfish DRM. The precontraction was induced Ach, 5×10^{-7} M:

TSK-gel DEAE-5PW (7.5×75 mm) column을 사용하여 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A용매, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2); B 용매, 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 9.2); gradient, 0→0.5 M B용매(100 min); 유속, 0.5 mL/min; 온도, 40°C; fraction volume, 1.0 mL. 음이온 교환수지 HPLC를 수행한 후, 불가사리의 DRM에 대한 이완 활성을 측정된 결과 fraction 13-14이 활성을 나타냈다. 이 분획들은 농축 후 네 번째 과정으로 Capcellpak C₁₈ (4.6×250 mm) column을 이용하여 다시 분리하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A용매, 0.1% TFA 수용액(pH 2.2); B용매, 0.1% TFA를 포함한 100% CH₃CN (pH 2.2); gradient, 15→30% B용매(60분); 유속, 1.0 mL/min; 온도, 40°C. 그 결과 22% CH₃CN에 해당되는 활성 분획을 얻었다. 이 활성분획은 다섯 번째 역상 HPLC 단계로 네 번째 역상 column과 성질이 다른 Hypersil-BDS C₁₈ (2×125 mm) column을 이용하였다. 이때, B용매의 gradient, 15→30%로 60분 동안 0.5 mL/min의 유속으로 40°C에서 분리하였으며, 20% CH₃CN에 해당되는 이완활성 분획을 얻었다. 계속해서 분자량 크기에 따른 분리를 행하기 위하여 Superdex Peptide HR 10/30 (10×300 mm)를 이용하여 HPLC를 행하였고, 이때 얻어진 활성 peak를 최종적으로 20% CH₃CN의 등용매 (isocratic) 조건에서 Hypersil-BDS C₁₈ column을 이용하여 정제하였다. 그 결과, 16.1분의 머무름시간을 갖는 하나의 순수한 물질을 정제하였다.

분자량 측정

천연 및 합성 펩타이드들의 분자량 측정은 부경대학교 공동 실험실습관에 있는 MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DE™ PRO, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

아미노산 서열 결정

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

펩타이드의 합성 및 정제

펩타이드는 이전의 방법과 동일한 Fmoc-법에 따라 합성하였다(Park et al., 1997).

합성물의 비교

정제한 천연물과 합성물의 동일성은 분자량 측정과 역상 HPLC column을 이용한 머무름시간을 비교함으로써 확인하였다. 정제한 합성 펩타이드는 Vydac protein & peptide C₁₈ (4.6×250 mm) column을 사용하여 22% CH₃CN의 등용매 조건으로 비교하였다.

별불가사리 DRM에 대한 이완활성 측정

별불가사리의 eye spot을 제거한 후 배면과 복면을 분리하여 5개 팔을 따라 중앙을 가로지르는 DRM을 mess로 분리하여 20 mm 정도의 단편으로 만들었다. 준비된 각 단편들은 반응조 내의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 isometric transducer (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)에 연결하여 resting tension이 1 g이 되도록 90분간 평형화 시켰다. 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10^{-6} M의 acetylcholine (Ach)을 투여하여 활성화 시켰고, 15분 후 10^{-6} M의 Ach을 투여하여 근육을 수축시킨 후, 펩타이드를 농도별로 누적 투여하였다. 모든 과정은 artificial sea water (ASW)하에서 행하였으며, 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 445, KCl 10, CaCl₂·2H₂O 10, MgCl₂·6H₂O 55, Glucose 10, and pH 7.8 Tris-HCl 20.

통계처리

이완활성은 10^{-6} M Ach의 최대수축에 대한 상대적 이완 %로서 나타냈다. 한편, 반응의 크기는 ED₅₀ (최고 이완의 50%를 나타낼 때의 농도) 및 E_{max} (10^{-5} M에서의 이완 %)로서 비교하였다. ED₅₀값은 least square method로 계산하였으며, 통계적 처리는 student's t-test로서 했다. 모든 반응 값은 means±s.e.로 표시하였다.

결과 및 고찰

별불가사리로부터 이완성 펩타이드의 추출

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

별불가사리 DRM에 대한 이완성 펩타이드의 정제

별불가사리로부터 추출한 RM60을 정제하기 위해 먼저 양이온 교환수지인 CM52 column (25×300 mm)을 사용하였으며, 분리된 분획들은 불가사리 DRM에 대해 이완활성 측정하였다. 그 결과 column에 결합하는 성질을 갖는 fraction 49-50번에서 이완활성을 나타냈고, 이들 분획은 다음 정제 단계에 사용되었다. 이 분획들은 두 번째 정제단계로 Vydac C₁₈ (9.2×250 mm) column에 적용되었고, fraction 24-26에서 이완활성을 보였다. 이들은 세 번째 단계로 음이온 교환수지인 DEAE column에 적용되었고, 0.05 M NaCl에서 용출된 분획에서 활성을 나타내었다. 양이온 및 음이온 column에 결합하는 성질로 미루어 보아 활성을 나타내는 분획에는 아마도 산성 및 염기성 아미노산을 포함하는 것으로 생각되어진다. 계속해서 이 분획은 네 번째 단계로 두 번째 단계와 다른 성질의 Capcellpak C₁₈ (4.6×250 mm) column을 이용하였다. 이때 0.25%/min의 농도 구배를 주었으며, 22% CH₃CN에서 이완활성을 지닌 분획을 얻었다. 이 활성 분획은 다른 성질의 C₁₈ column인 Hypersil BDS column에 네 번째 단계와 같은 조건으로 적용되었고, 20% CH₃CN에서 활성 분획을 얻었다. 계속해서 분자량 크기에 의한 분리를 하기 위해 size exclusion column에 적용하였다. 그 결과 머무름시간 24분에서 단일 peak로 용출되었고, 최종적으로 Hypersil BDS (2 × 125 mm) column에서 20% CH₃CN의 등용매조건으로 머무름시간 16.1분인 단일 peak를 얻었다(Fig. 2).

정제한 이완활성 펩타이드들의 분자량 및 아미노산 서열 결정

최종적으로 정제한 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위하여 MALDI-TOF mass spectrometer와 Edman 분해법을 이용한 아미노산 분석기를 사용하였다. 이 펩타이드는 방향족 아미노산 Phe, Tyr과 charge를 갖는 3개의 아미노산, 4개의 Gly, 1개의 Pro 및 Ser과 Thr과 같은 극성아미노산들을 함유한 16개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 1,601.7 (M+H)⁺이었다. 측정된 펩타이드의 분자량은 이론적 계산치인 1,602.6 Da과 매우 잘 일치하였다.

한편, C-말단 modification 여부를 알아보기 위해 C-말단이 아미드화된 형태와 C-말단이 modification되지 않은 OH-형태를 합성하였다. 천연물(N)과 C-말단이 free한 합성물(S)을 동

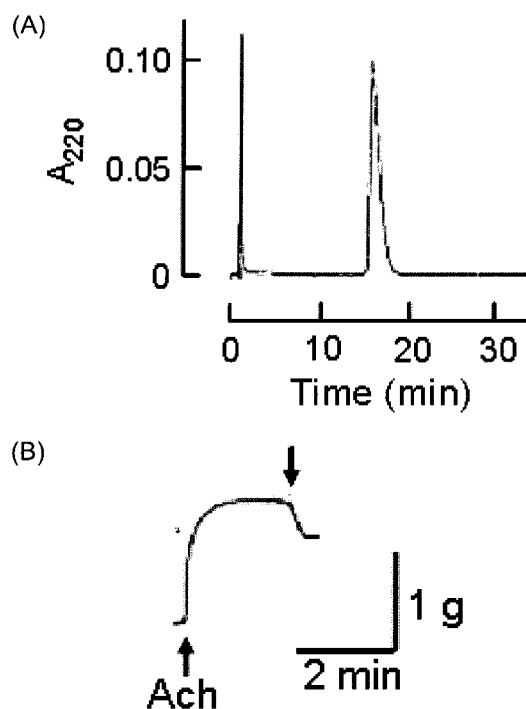


Fig. 2. Final purification of peptide. The active fraction was loaded onto a Hypersil BDS C₁₈ (2×125 mm) and eluted with isocratically 20% CH₃CN in 0.1% TFA at flow rate of 0.5 mL/min (A), and the bioassay with the starfish DRM (B).

량으로 하여 HPLC상에 주입하였고, N과 S의 혼합물은 동일한 머무름시간에서 함께 용출되었다(data not shown). 한편, C-말단이 아미드화된 합성 펩타이드와 천연물을 혼합시킨 경우는 단일 peak를 나타내지 않고, 2개의 peak로 분리되었다(data not shown). 이러한 결과들로부터 천연물이 합성물 OH-type과 같은 물질임을 알 수 있었으며, 완전한 일차구조는 다음과 같이 판명되었다: Phe-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Tyr-Asp-Pro-Leu-Ser-Ala-Gly-Phe-Thr-Asp.

DRM에 대한 이완활성 측정

DRM에서 정제된 펩타이드의 이완활성을 조사하기 위해 합성 펩타이드를 10⁻¹⁰ M에서 10⁻⁵ M까지 누적 투여하였다. 이완반응은 농도 의존적으로 증가 하였으며, 이는 정제된 펩타이드가 DRM에 존재하는 수용체를 경유하여 이완 활성을 나타냄을 의미한다. Fig. 3은 합성 펩타이드들의 농도 의존곡선을 나타낸다. 정제된 펩타이드(OH 형태)와 C-말단이 아미드화된 합성 펩타이드(NH₂ 형태)는 10⁻¹⁰ M에서 각각 0.6% 및 0.7%의 역치값을 나타냈으며, E_{max} 값은 10⁻⁵ M에서 각각 120±7% 및 135±10%였다. 또한 약물의 효력을 나타내는 ED₅₀은 OH 형태와 NH₂ 형태가 각각 4.0×10⁻⁸ M과 3.0×10⁻⁸ M이었으며, 활성을 나타내는 농도-의존 곡선은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 따라서, 본 연구 결과는 정제된 펩타이드가 DRM에서 이완활성을 나타냄에 있어 C-말단의 수식이 중요하게 작용하지 않음을 의미한다.

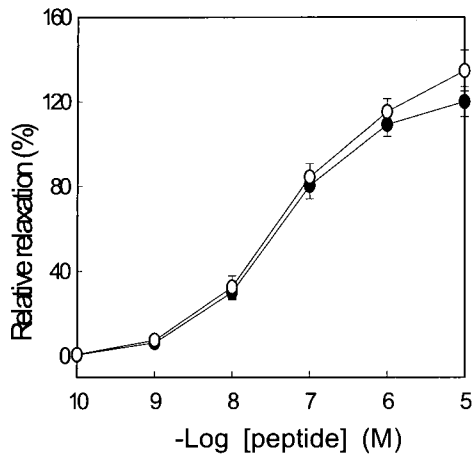


Fig. 3. Concentration response curves to OH type (●, n=18) and NH₂ type (○, n=9) induced relaxation in starfish DRM. Relaxing effects expressed as % the maximal response to Ach, 1×10^{-6} M.

사 사

본 연구는 2004년도 KSGP (Korea Sea Grant Program) 과제에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Diaz-Miranda, L., R.E. Blanco and J.E. Garcia-Arraras. 1995. Localization of the heptapeptide GFSKLYF-AKLYFamide (Echinodermate): A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 352, 626-640.
- Elphick, M.R. and R. Melarange. 2001. Neural control of muscle relaxation in echinoderms. *J. Exp. Biol.*, 204, 875-885.
- Elphick, M.R., D.A. Price, T.D. Lee and M.C. Thorndyke. 1991. The SALMFamides: A new family of neuropeptides in the starfish *Asterias rubens*. *J. Exp. Biol.*, 198, 2519-2525.
- Iwakoshi, E., M. Ohtani, T. Takahashi, Y. Muneoka, T. Ikeda, T. Fujita, H. Minakata and K. Nomoto. 1995. Comparative aspects of structure and action of bioactive peptides isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. In: *Peptide Chemistry*, M. Ohno ed. Osaka: Protein Research Foundation, 1994, pp. 261-264.
- Moore, S.J. and M.C. Thorndyke. 1993. Immunocytochemical mapping of the novel echinoderm neuropeptide SALMFamide 1 (S1) in the starfish, *Asterias rubens*. *Cell Tissue Res.*, 274, 602-618.
- Motokawa, T. 1984. Connective tissue catch in echinoderms. *Biol. Rev.*, 59, 255-270.
- Newman, S.J., M.R. Elphick and M.C. Thorndyke. 1995a. 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., M.R. Elphick and M.C. Thorndyke. 1995b. 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*, 216, 187-192.
- Park, N.G., J.K. Seo, H.J. Ku, S. Lee, G. Sugihara, K.H. Kim, J.S. Park and S.W. Kang. 1997. Conformation and biological activity of mastoparan B and its analogs I. *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 18, 50-56.
- Twarog, B.M. 1967. The regulation of catch in molluscan muscle. *J. Gen. Physiol.*, 50, 157-169.

2005년 4월 30일 접수

2005년 6월 27일 수리