

## 곰장어 내장으로부터 평활근 수축활성 펩타이드의 정제

김은정 · 서정길 · 김찬희 · 고혜진 · 김인혜 · 김창훈\* · 박남규  
부경대학교 수산과학대학 생물공학과, \*양식학과

### 서론

척추 및 무척추동물의 생체내에는 조절제어 및 정보전달의 역할을 담당하고 있는 내인성의 생리활성 펩타이드인 신경성 펩타이드를 비롯한 수많은 호르몬 펩타이드가 존재하며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

현재까지의 연구는 주로 무척추동물과 어류 및 양서류를 비롯한 척추동물을 대상으로 진행되어 왔으며, 원구류를 이용한 새로운 생리활성 펩타이드의 정제와 특성에 관한 연구는 수행되어 있지 않은 상태이다. 특히 원구류인 곰장어는 식용으로 널리 사용되고 있으나, 내장은 대부분 폐기 처분하고 있다. 이러한 폐기물인 곰장어 내장을 이용한 생리활성 펩타이드의 정제와 특성에 관한 연구는 국내외적으로 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 원구류인 곰장어의 내장을 이용하여 평활근에 대한 수축활성을 지니는 수축성 펩타이드를 HPLC를 이용하여 정제하고 이들의 활성 메커니즘을 규명하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 곰장어내장으로부터 생리활성펩타이드 추출 및 정제

동결된 떡장어 피부를 에탄올 추출액 (70% ethanol+0.01 M PMSF)으로 4 °C에서 48 시간 추출하여 조직을 파쇄한 후 원심분리와 농축의 과정을 거쳤다. 이후 NaCl 및 HCl을 처리하여 고분자물질을 제거하였으며, 이들을 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge (20 ml, Waters)에 apply하여 0, 10, 60, 100 % methanol을 이용하여 분리하였다. 분리된 D. W., RM 10, RM 60과 RM 100의 평활근에 대한 수축활성을 조사한 후 RM 60을 이용하여 HPLC를 행하였다. Bioassay를 통하여 활성을 나타내는 부분을 모아 역상 HPLC 및 이온교환수지 HPLC를 반복적으로 수행함으로써 정제하였다.

#### 2. Bioassay System

## 2. Bioassay System

곰장어 내장을 신속히 절취한 후, petridish 상에서 1cm 정도의 단편으로 잘라 반응조에 건다. 이때 아랫부분은 지지대에 고정시키고 윗부분은 transducer와 연결한다. 실험 시작 전에 장력을 1 g 가한 후, 이미 수축물질로 알려져 있는 carbachol ( $5 \times 10^{-7}M$ )을 이용하여 실험조직의 수축력을 확인한다. 충분한 washing을 거친 후 HPLC 분획들을 투여한다. 모든 실험과정은 생리식염수하에서 진행되었다. 이때 사용한 생리식염수 조성은 다음과 같다 (mM), NaCl 445, KCl 10,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  10,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  55, Glucose 10, 0.5 M Tris-HCl 완충액 (pH 7.8) 20 ml.

## 3. 구조결정

Edman 분해법과 MARDI-TOF Mass를 이용하였다.

## 결과 및 요약

Sep-pak  $C_{18}$  cartridge를 통해 분리된 60% methanol 용출액은 곰장어 장관에 대해서 수축활성을 나타냈으며, 순차적인 역상 및 이온교환 HPLC를 통해 최종적으로 0.1% TFA를 포함하는 17% acetonitrile의 isocratic한 용출에서 곰장어 장관에 수축활성을 나타내는 순수한 peak를 얻을 수 있었다. 일차구조 분석결과 Gly-Thr-Ala-Gly-Ile-Gly-Pro-Phe-Arg (875.821 Da)임을 알았다. 이들은 곰장어 장관에 대해 농도-의존적인 수축반응을 나타내었다.

## 참고문헌

- Ohishi, T., K. Iguchi, T. Mochizuki, M. Hoshino, Y-H. Ji, Y. Futai, and N. Yanaihar. 1997. *Biomedica Res.*, 18(1), 87~93.
- Veelaert, D., G. Baggerman, R. Derua, E. Waelkens, T. Meeusen, V.G. Water, A.D. Loof, and L. Schoofs. 1999. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 266, 237~242.
- Johnsen, A.H., H. Duve, M. Davey, M. Hall and A. Thorpe. 2000. *Eur. J. Biochem.*, 267, 1153~1160.
- Conlon, J.M. and U. Aronsson. 1997. *Peptides*, 18(3), 361~365.
- Crim, J.W., A. Urano, and A Gorbman. 1979. *Endocrinol.*, 37(3), 294~305.
- Nozaki, M. and A. Gorbman. 1983. *Cell Tissue Res.*, 229(3), 541~550.
- Erhart, G., G. Jirikowski, C. Pilgrim and M. Ando. 1985. *Basic Appl. Histochem.*, 29, 289~296.
- Wicht, H. and R.G. Northcutt. 1992. *Cell Tissue Res.*, 270, 443~449.
- Suzuki, N. 1995. *Zool. Sci.*, 12(5), 607~610.