

붕장어(*Conger myriaster*)의 뇌로부터 Oxytocin-related Peptide, Isotocin의 정제

고혜진·김찬희·김은정·김인혜·안상현·손희영·박진일¹·박희연¹·윤호동¹·박남규*
 부경대학교 수산과학대학 생물공학과, ¹국립수산과학원 생명공학연구단

Purification of Oxytocin-related Peptide, Isotocin from the Brain of Conger Eel *Conger myriaster*

Hye-Jin GO, Chan-Hee KIM, Eun Jung KIM, In Hae KIM, Sang Hyun AN, Hee-Young SOHN, Jin-Il PARK¹, Hee Yun PARK¹, Ho Dong YOON¹ 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

Oxytocin (OT)-related peptide, isotocin was purified from the brain extract of conger eel (*Conger myriaster*) using reverse-phase, ion-exchange and size exclusion high performance liquid chromatography (HPLC). The sequence of the peptide, with a molecular weight of 967.30 Da, was determined as Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH₂, where the Cys between 1st and 6th residues made an intramolecular disulfide bridge by the automated amino acid sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. The sequence was confirmed by identical elution with the purified and synthetic peptide using the HPLC system. As a result of homology investigation, the primary structure of this peptide was the same as that of OT-superfamily member, isotocin. The synthetic peptide showed a contractile activity at a minimal effective concentration of 10⁻⁷ M on the intestinal smooth muscle of goldfish (*Carassius auratus*).

Key words: Brain, *Conger myriaster*, Conger eel, Contractile activity, Isotocin

서 론

Vasopressin (VP)/Oxytocin (OT) 그룹은 대부분의 포유류의 뇌하수체 후엽에 존재하는 신경성 펩타이드이며 크게 VP와 OT 그룹으로 나누어진다(Table 1). 이들은 9개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 1번과 6번 잔기의 Cys이 disulfide bond로 결합된 cyclic구조를 지닌다. 또한 이들은 3, 4 및 8번 위치에서 서로 다른 아미노산으로 치환되어 있으며 C말단이 아마이드화 되어있다(Acher et al., 1995). 이들 VP와 OT는 구조적으로는 매우 유사하나 각각의 다른 생리적 기능을 지닌다. 척추동물에 있어서 VP는 항 이뇨작용, 혈압조절 및 삼투조절활성을 가지고 있는 반면, OT는 자궁수축, 유즙분비, 혈관 평활근 조절활성을 가지고 있다(Acher et al., 1995; Gimpl et al., 2001). Radioimmunoassay (RIA)법, 면역조직화학방법 및 HPLC를 이용한 정제법 등에 의해 척추동물 뿐만 아니라 연체동물의 독, 갑각류, 두족류, 절지동물 그리고 곤충류의 신경계 조직 및 환형동물 등 무척추동물로부터 VP/OT 그룹이 광범위하게 존재하고 있음이 확인되었다(Chauvet et al., 1983; Cruz et al., 1987; Nielsen et al., 1994; Noteborn et al., 1987; Oumi et al., 1994;

Pevet et al., 1980; Proux et al., 1987; Reich, 1992; Salzet et al., 1993; Takuwa-Kuroda et al., 2003).

Isotocin (IT)은 [Arg⁸]-vasotocin (AVT)와 마찬가지로 비 포유류에 있어서 포유류 OT의 대응물로서 OT의 4번째 잔기인 Gln이 Ser으로, 8번째 잔기인 Leu이 Ile으로 치환되어 있는 형태이다. AVT는 어류에 있어서 이뇨작용, 삼투조절, 혈압조절에 관여하나(Conklin et al., 1999; Guibolini and Lahlou, 1987; Le Mevel et al., 1993; Sawyer, 1967; Wame, 2002), IT의 경우 AVT에 비해 그 활성이 명확히 알려져 있지 않다. IT는 면역조직학적 방법에 의해 금붕어, 무지개송어 및 넙치 등 많은 경골어류로부터 그 존재가 확인되었다(Cumming et al., 1982; Goossens et al., 1977). 또한 뱀장어목에 속하는 뱀장어 (*Anguilla anguilla*)의 hypophysis와 preoptic nucleus로부터 크로마토기법에 의해 분리, 측정되었다(Holder, 1969). 최근 본 연구실에서 같은 목에 속하는 붕장어(*Conger myriaster*)의 뇌로부터 AVT가 정제된 바 있으나(Go et al., 2005), 지금까지 IT의 정제에 관한 연구는 없다.

본 연구에서는 붕장어(*C. myriaster*)의 뇌 추출물로부터 금붕어 장관 평활근을 이용한 bioassay법을 이용하여 isotocin을 분리·정제하였으며, 이 펩타이드의 구조 및 생리활성을 연구하였다.

*Corresponding author: ngpark@pknu.ac.kr

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용된 붕장어(*Conger myriaster*, 체장 30-50 cm)는 2004년 5월에 부산 부전시장에서 구입하였다. 살아있는 상태에서 MS-222로 마취한 붕장어로부터 뇌를 적출하여 즉시 액체질소로 동결시킨 후, 실험시작 전까지 -70℃ 냉동고에서 보관하였다.

시약

HPLC용 CH₃CN 및 H₂O는 Tedia Co. (Ohio, USA), IT와 AVT는 Sigma Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다.

붕장어의 뇌로부터 추출물 조제

냉동 보관한 217마리의 붕장어 뇌를 300 mL의 끓는 물에 15분간 가열하였다. 초산 15 mL를 첨가하여 블렌더(Waring Heavy Duty Laboratory Blender, New Hartford, CT, USA)로 균질화한 뒤, 4℃에서 24시간 동안 정치하였다. 추출액을 4℃에서 원심분리(20,000×g, 50 min)하여 상층액을 모아서 감압 농축하였다. 시료와 Ethanol을 1:3 (vol/vol)의 비율로 농축된 시료에 ethanol을 첨가하였다. 4℃에서 원심분리(20,000×g, 50 min)하여 침전물을 제거한 후, 얻어진 상층액을 Sep-Pak C18 cartridge column (20 mL, Waters, MA, USA)에 적용하여 흡착시켰다. Column에 결합한 물질(retained material, RM)을 0.1% TFA를 포함한 10% methanol (RM 10), 60% methanol (RM 60), 100% methanol (RM 100)로 각각 용출시켜 분리하였다. 각각의 용출액 RM 10, RM 60 그리고 RM 100의 1/1000에 해당하는 양을 사용하여 금붕어 장관평활근에 대해 수축활성을 측정하였다.

평활근 수축활성펩타이드의 분리 및 정제

금붕어 장관 평활근에 대해 수축활성을 나타낸 RM 60을 6단계의 HPLC과정을 사용하여 평활근 수축활성 펩타이드를 분리하였다. 각각의 분리단계에서 얻은 분획들은 금붕어 장관을 사용하여 수축활성을 측정하였다.

첫 단계로 RM 60은 역상 HPLC column인 CAPCELL PAK C18 (4.6×250 mm, Shiseido, Japan)을 이용하여 부분 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다: A-용매; 0.1% TFA 수용액 (pH 2.2), B-용매; 0.1% TFA를 포함한 100% CH₃CN (pH 2.2), B-용매의 농도구배; 0 → 70% (70 min), 유속; 1.0 mL/min, 분획량; 2.0 mL/분획, 파장; 220 nm, 온도; 40℃.

반응을 나타낸 분획 16-20번을 TSKgel DEAE-5PW (7.5×75 mm, Tosoh, Japan)를 이용하여 다음의 분리조건으로 정제하였다: A-용매; 10 mM Tris-HCl (pH 9.7), B-용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 9.7), B-용매 농도구배; 0 → 50% (50 min), 유속; 1.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40℃. 세 번째 정제단계로 전단계의 활성분획 2-4번을 CAPCELL PAK C18 column (4.6×250 mm)에 적용시켜 다음과 같은 조건으로 분리하였다: B-용매의 농도구배; 10 → 40% CH₃CN (90 min), 유속; 1.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40℃. 계속해서 활성을 나타

낸 분획 55번을 Superdex peptide HR 10/30 (10×300 mm, Pharmacia, Sweden)에 주입하여 0.5 mL/min의 유속으로 30% CH₃CN (pH 2.2)의 등용매조건으로 분리하였다. 네 번째 단계의 활성분획 11번을 218TP54 protein & peptide C18 (4.6×250 mm, Grace Vydac, USA) column에 적용시켜 첫 번째 HPLC 분리과정과 같은 용매를 이용하여 다음조건으로 분리하였다: B-용매 농도구배; 15 → 30% CH₃CN (75 min), 유속; 0.5 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40℃. 마지막으로 다섯 번째 단계의 활성분획 21번을 218TP54 protein & peptide C18 (4.6×250 mm) column을 이용하여 0.5 mL/min의 유속으로 0.1% TFA를 포함한 17% CH₃CN (pH 2.2)의 등용매 조건으로 정제하였다 (Fig. 1).

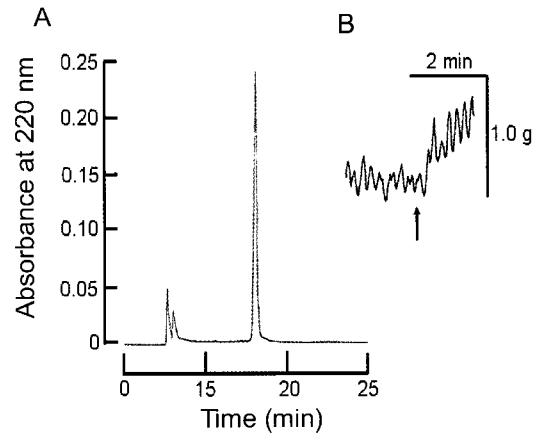


Fig. 1. Final purification of isotocin by HPLC using Vydac C₁₈ 218TP54 column. The active peak was eluted isocratically with 17% CH₃CN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min (A). The bioactivity of purified substance on a goldfish, *Carassius auratus*, intestine (B). The arrow represents the sample applied to the isolated intestine.

펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열결정

정제한 펩타이드의 1차구조를 결정하기 위해 한국기초과학 지원연구원의 protein sequencer (Procise® cLC Sequencing System, Model 492 cLC, Applied Biosystems, USA)를 이용하였다. 또한 펩타이드의 분자량은 부경대학교 공동실험실습관의 MALDI-TOF-MASS Spectrometer (Voyager-DE™ PRO, Perseptive Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였다.

금붕어 장관에 대한 수축활성측정

금붕어 장관표본을 만들기 위해 먼저 중추신경을 절단하여 복부를 절개한 후, 장관을 약 2.0-3.0 cm 길이로 적출하여 결체 조직 등을 제거하였다. 장관의 길이가 약 1 cm가 되도록 하여 아래쪽 말단을 반응조의 지지봉에 고정하고 다른 한 쪽 끝을 isometric transducer (NEC-Sanci, Tokyo, Japan)에 연결하였다. 연결한 장관에 1.0 g의 장력을 준 뒤, 실온에서 60분 동안 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 안정화시켰다. 사용한 완충액의 조성은 다음과 같다: 2.5 mM Tris-HCl (pH 7.8), 110 mM

NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM glucose.

활성측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입하면서 Sep-Pak C18 추출물 및 각각의 HPLC 정제단계에서 얻은 분획들을 반응조에 주입하여 physiograph로 기록하였다.

또한 합성물의 농도 의존적 약리활성측정을 행하였으며, 각각의 활성 정도는 acetylcholine (ACh) 5×10⁻⁷ M에 대한 수축 반응을 100%로 하여 상대적 수치로 나타냈다. 통계적 처리는 student's t-test로서 하였다. 모든 반응은 means±S.E.로 표시하였다.

결과 및 고찰

장관 평활근에 대한 수축활성

봉장어 뇌 추출물로부터 부분 정제한 RM 10, RM 60, RM 100을 사용하여 장관 평활근에 대한 수축활성을 측정하였다. 그 결과, RM 60에서는 금붕어 장관 평활근에 대해 높은 수축활성을 나타냈으며, RM 10과 RM 100은 수축활성을 나타내지 않았다(테이타 제시 없음). 따라서 RM 60을 사용하여 수축활성을 가진 펩타이드를 정제하였다.

펩타이드의 정제

장관 평활근에 대해 수축활성을 나타낸 RM 60은 역상 column, 이온교환 column 그리고 겔여과 column을 사용한 6단계의 정제과정을 거쳐 하나의 순수한 펩타이드를 정제하였다. 마지막 단계로서 활성물질을 218TP54 protein & peptide C18 column에 적용시켜 0.1% TFA를 포함한 17% CH₃CN용매를 사용하여 유속 0.5 mL/min의 조건하에서 하나의 순수한 물질을 정제하였으며(Fig. 1A), 정제된 물질은 장관 평활근에 대해 수축활성을 보였다(Fig. 1B).

정제한 펩타이드의 일차구조

봉장어의 뇌로부터 정제한 순수한 물질의 구조를 조사하기 위해 아미노산의 서열과 분자량을 측정하였다. 물질의 일차구조는 Xaa-Tyr-Ile-Ser-Asn-Xaa-Pro-Ile-Gly으로 N-말단쪽의 1번 잔기와 6번 잔기가 검출되지 않았다. 또한 이 물질의 분자량을 측정된 결과 *m/z* 967.30 (M+H)⁺이었다. 위의 일차구조로부터 2개의 Xaa를 제외한 아미노산의 분자량의 합은 761.83 Da으로 정제한 물질의 분자량과 205.47 Da의 차이가 있었다. 1개의 Cys의 잔기량은 103.1 Da이며, 2개의 Cys는 206.2 Da이다. 또한 두 Cys이 disulfide bond를 형성한다면 H₂에 해당하는 분자량 2가 감소하여 Cys-Cys의 분자량은 204.2 Da이다. 따라서 이 값은 정제물질의 분자량(967.30 Da)에서 2개의 Xaa를 제외한 분자량(761.83 Da)을 뺀 값과 유사하였다. 또한 이전 연구에 의하면 Cys을 포함한 peptide를 구조분석 시, 첫 번째 Cys은 크로마토그래피 상에 나타나지 않는 반면, 두 번째 Cys 검출에 있어서는 두개의 특정 peak인 PTH-dehydroalanine과 PTH-Cys이 PTH-Arg의 검출시간대와 아주 근접한 시간대에 검출되어진다고 보고된 바 있다(Oumi et al., 1994). 따라서, 1과 6번 위치의 규명되지 않은 잔기는 disulfide bond에 의해

연결된 Cys으로 생각되어진다.

또한 지금까지 알려진 수축활성 펩타이드들과의 상동성(homology)을 조사한 결과, 경골어류의 뇌하수체호르몬인 isotocin (IT)과 같았다. 따라서 정제된 펩타이드의 일차구조는 Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly으로 추정되어진다.

천연물과 합성물과의 동일성 비교

구입한 합성 IT를 사용하여 천연 펩타이드와의 동일성을 확인하기 위해서 역상 및 양이온 교환 HPLC에 적용시켜 retention time (RT)을 비교하였다. Fig. 2A에 나타내듯이 먼저 천연물(N)과 합성물(S) 및 천연물/합성물의 혼합물(N+S)을 각각 218TP54 protein & peptide C18 column에 적용한 결과, 동일한 RT (16 min)에서 하나의 peak로 용출되었다. 또한 Fig. 2B에서와 같이 천연물(N), 합성물(S) 및 천연물/합성물의 혼합물(N+S)을 TSKgel DEAE-5PW에 적용시켜 동일성을 비교한 결과, 역상 column에서와 마찬가지로 천연물(N)과 합성물(S)이 그리고 천연물/합성물의 혼합물(N+S)이 모두 동일한 시간대의 RT (12 min)에서 하나의 peak로 용출되었다.

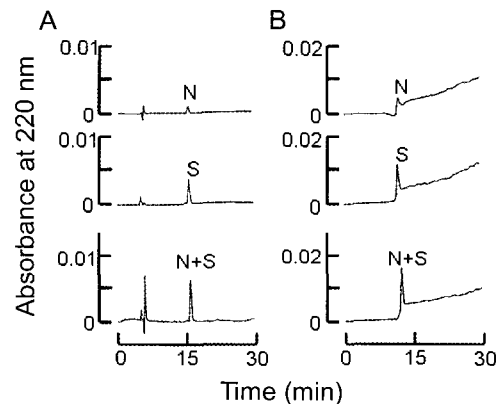


Fig. 2. A comparison between HPLC profiles of the native (N) and synthetic IT (S). N and S were injected to a C₁₈ reverse-phase (218TP54 protein & peptide C₁₈) column and eluted with isocratically 17% CH₃CN in 0.1% TFA (pH 2.2) (A). N and S were injected to anion-exchange column (DEAE-5PW) and eluted with 0-0.3 M NaCl in 10 mM Tris-HCl (pH 9.7) (B). N+S represents a mixture of the native and synthetic peptide.

따라서 천연물의 일차구조는 1번과 6번 잔기의 Cys이 disulfide bond를 가지며, C-말단이 아마이드화된 Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH₂인, IT와 동일물질인 것으로 판명되었다.

IT와 AVT의 평활근 수축활성 비교

금붕어 장관에서의 IT 및 AVT의 수축활성을 비교하기 위해, 펩타이드를 10⁻¹² M에서 10⁻⁵ M까지 농도 의존적으로 투여하였으며, 이들은 농도 의존적으로 활성이 증가하였다(Fig. 3). 또한, IT의 경우 10⁻⁷ M에서 8.47%의 역치값을 나타냈으나, 10⁻⁵ M에서 36.35±8.08%의 수축활성을 나타내었으며, ED₅₀값

Table 1. The primary structure of the vasopressin/oxytocin superfamily. The Cys residues form internal disulfide bonds. Residues at positions 1, 5, 6, 7 and 9 are common to all members.

	Amino acid sequence	Source	Reference
Vasopressin-related peptide			
[Arg ⁸]-vasopressin	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	Mammals	Acher et al. (1953)
Lys-vasopressin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂	Mammals	Hurpet et al. (1980)
[Arg ⁸]-vasotocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	Non-mammalian vertebrates	Go et al. (2005)
Arg-conopressin	Cys-Ile-Ile-Arg-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	Mollusc (<i>C. striatus</i>)	Cruz et al. (1987)
Diuretic hormone	Cys-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	Insect (<i>Locusta migratoria</i>)	Proux et al. (1987)
Oxytocin-related peptide			
Oxytocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂	Mammals	Amico et al. (1988)
Mesotocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂	Mammals, birds, amphibians, lungfishes	Hoyle (1998)
Glumitocin	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Gln-Gly-NH ₂	Cartilaginous fishes (rays)	Acher et al. (1965)
Valitocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Val-Gly-NH ₂	Cartilaginous fishes (sharks)	Heller et al. (1961)
Cephalotocin	Cys-Tyr-Phe-Arg-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂	<i>Octopus vulgaris</i>	Reich (1992)
Isotocin	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂	Bony fish (<i>Conger myriaster</i>)	The present study

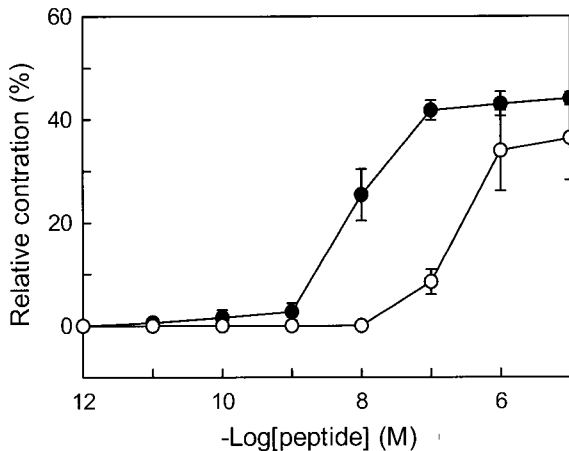


Fig. 3. Concentration response curves to neurohypophysial hormones induced contraction in the goldfish intestine (n ≥ 12): AVT (●), IT (○). Contractile effects expressed as % the maximal response to Ach, 5 × 10⁻⁷ M.

은 3.89 × 10⁻⁷ M이다. AVT는 10⁻¹⁰ M에서 1.54%의 역치값을 가졌고, 10⁻⁵ M에서 44 ± 1.26%의 최대 수축활성을 나타내었다. AVT의 ED₅₀ 값은 9.17 × 10⁻⁹ M이었다. 이는 IT의 수축활성이 AVT보다 현저히 낮다는 것을 의미한다.

이전의 연구에 있어서도, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)의 아가미동맥을 이용한 평활근 및 장관의 longitudinal muscle에 대한 AVT와 IT의 활성 또한 IT가 AVT보다 현저히 낮은 활성을 나타내었다(Conklin et al., 1999). 따라서, IT에 비해 AVT가 어류장관 평활근에 대한 높은 효과로 나타내는 것으로 보아 어류 장관 내 AVT와 특이적 결합을 하는 receptor가 더 많이 존재할 것이라 추정되어진다.

사 사

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었습니다(과제번호 KRF-2004-002-F00011).

참 고 문 헌

Acher, R. and J. Chauvet. 1953. La Structure de la vasopressine de boeuf. *Biochem. Biophys. Acta*, 12, 487-488.

Acher, R., J. Chauvet, M.T. Chauvet and D. Crepy. 1965. Phylogeny of neurohypophysial peptides: Isolation of a new hormone, glumitocin (Ser⁴, Gln⁸-oxytocin) present in a cartilaginous fish, the ray (*Raja clavata*). *Biochem. Biophys. Acta*, 107, 393-396.

Acher, R. and J. Chauvet. 1995. The neurohypophysial endocrine regulatory cascade: precursors, mediators, receptors and effectors. *Front. Neuroendocrinol.*, 16, 237-289.

Amico, J.A., F.M. Finn and J. Haldar. 1988. Oxytocin and vasopressin are present in human and rat pancreas. *Am. J. Med. Sci.*, 296, 303-307.

Chauvet, M.T., D. Hurpet, J. Chauvet and R. Acher. 1983. Identification of mesotocin, lysine vasopressin, and phenypressin in the eastern gray kangaroo (*Macropus giganteus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 49, 63-72.

Conklin, D.J., M.P. Smith and K.R. Olson. 1999. Pharmacological characterization of arginine vasotocin vascular smooth muscle receptors in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 114, 36-46.

Cruz, L.J., V. de Santos, G.C. Zafaralla, C.A. Ramilo, R. Zeikus, W.R. Gray and B.M. Olivera. 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus striatus* venoms. *J. Biol. Chem.*, 262, 15821-15824.

Cumming, R., T.A. Reaves, Jr. and J.N. Hayward. 1982.

- Ultrastructural immunocytochemical characterization of isotocin, vasotocin and neurophysin neurons in the magnocellular preoptic nucleus of the goldfish. *Cell Tissue Res.*, 223, 685-694.
- Gimpl, G. and F. Fahrenholz. 2001. The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.*, 81, 629-683.
- Go, H.J., C.H. Kim, E.J. Kim, I.H. Kim, H.Y. Park, H.D. Yoon, Y.K. Hong and N.G. Park. 2005. Purification of vasopressin-related peptide, [Arg⁸]-vasotocin, from the brain of conger eel, *Conger myriaster*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, 6-11.
- Goossens, N., K. Dierickx and F. Vandesande. 1977. Immunocytochemical localization of vasotocin and isotocin in the preopticohypophysial neurosecretory system of teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 32, 371-375.
- Guibolini, M.E. and B. Lahlou. 1987. Neurohypophysial peptide inhibition of adenylate cyclase activity in fish gills. *FEBS Lett.*, 220, 98-102.
- Heller, H. and B.T. Pickering. 1961. Neurohypophysial hormones of non-mammalian vertebrates. *J. Physiol.* 155, 419-428.
- Holder, F.C. 1969. Chromatographic separation and determination of oxytocin type hormones (arginine-vasotocin and isotocin) from the hypophysis and preoptic nucleus of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Eels from Alsace (Auenheim and Loire-Atlantic (Grande-Briere)). *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.*, 269, 1304-1307.
- Hoyle, C.H.V. 1998. Neuropeptide families: Evolutionary perspectives. *Regul. Pept.*, 73, 1-33.
- Hurpet, D., M.T. Chauvet, J. Chauvet and R. Acher. 1980. Identification of lysine vasopressin in two Australian marsupials, the red kangaroo and the tammar. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1585-1590.
- Le Mevel, J.C., T.F. Pamantung, D. Mabin and H. Vaudry. 1993. Effects of central and peripheral administration of arginine vasotocin and related neuropeptides on blood pressure and heart rate in the conscious trout. *Brain Res.*, 610, 82-89.
- Nielsen, D.B., J. Dykert, J.E. Rivier and J.M. McIntosh. 1994. Isolation of lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicol.*, 32, 845-848.
- Noteborn, H.P.J.M., J.P.H. Burbach and I. Ebels. 1987. Modified forms of vasopressin and oxytocin in a bovine pineal preparation. *FEBS Lett.*, 216, 200-206.
- Oumi, T., K. Ukena, O. Matsushima, T. Ikeda, T. Fujita, H. Minakata and K. Nomoto. 1994. Annetocin: An oxytocin-related peptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 393-399.
- Pevet, P., A.C. Reinharz and J. Dogterom. 1980. Neurophysins, vasopressin and oxytocin in the bovine pineal gland. *Neurosci. Lett.*, 16, 301-306.
- Proux, J.P., C.A. Miller, J.P. Li, R.L. Carney, A. Girardie, M. Delaage and D.A. Schooley. 1987. Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 180-186.
- Reich, G. 1992. A new peptide of the oxytocin/vasopressin family isolated from nerves of cephalopod *Octopus vulgaris*. *Neurosci. Lett.*, 134, 191-194.
- Salzet, M., P. Bulet, A. Van Dorsselaer, J. Malecha. 1993. Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *Eur. J. Biochem.*, 217, 897-903.
- Sawyer, W. H. 1967. Evolution of antidiuretic hormones and their functions. *Am. J. Med.*, 42, 678-686.
- Takuwa-kuroda, K., E. Iwakoshi-Ukena, A. Kanda and H. Minakata. 2003. Octopus, which owns the most advanced brain in invertebrates, has two members of vasopressin/oxytocin superfamily as in vertebrates. *Regul. Pept.*, 115, 139-149.
- Warne, J. 2002. The role of arginine vasotocin in teleost fish osmoregulation. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 54, 83-95.

2005년 8월 29일 접수
2005년 10월 24일 수리