

## Synthesis and Biological Activities of Myomodulin E and its Analogs

Hye-Jin Go<sup>1</sup>, Jung-Kil Seo<sup>1</sup>, Hae Jeom Seo<sup>1</sup>, Min Jeong Lee<sup>1</sup>, Tae Hyun Park<sup>2</sup>, Gun Do Kim<sup>3</sup> and Nam Gyu Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Fisheries Science College, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>2</sup>West Vancouver Secondary School, 1750 Mathers Ave. West Vancouver, BC V7V 2G7, Canada

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Natural Science College, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received December 21, 2011 / Revised January 25, 2012 / Accepted January 25, 2012

Previous work has characterized myomodulin A (MMA, PMSMLRLamide) and myomodulin E (MME, GLQMLRLamide) purified from the central nervous systems of the sea hare, *Aplysia kurodai*, using the anterior byssus retractor muscle (ABRM) of the mussel, *Mytilus edulis*. The amino acid sequences of MMA and MME were the same as those of the myomodulin family peptide found in other mollusks. In this study, we synthesized MME, its derivatives, and other neuropeptides to investigate the relationship between the structure and biological activity of MME. The primary structures of MME's derivatives, Des[Gly<sup>1</sup>]-MME, Des[Gly<sup>1</sup>,Leu<sup>2</sup>]-MME, and Des[Gly<sup>1</sup>,Leu<sup>2</sup>,Gln<sup>3</sup>]-MME, were LQMLRLamide, QMLRLamide, and MLRLamide, respectively. MMA and synthetic peptides were tested on ABRM in *M. edulis* as well as muscle preparations in *Achatina fulica*. MME displayed an inhibitory effect on phasic contraction of the ABRM at  $1 \times 10^{-9}$  M or higher. MME also had a relaxing effect on the catch-tension of AMRM at  $1 \times 10^{-8}$  M. Both MMA and its analogs stimulated a contractile response on the crop and relaxed the catch-relaxing response on the penial retractor muscle of *A. fulica*. These results suggest that MME and its analogs have modulatory effects on various muscles of mollusks. This study has also laid the groundwork for future neural and circuit modulation studies during animal behavioral changes.

**Key words** : Myomodulin E, phasic contraction, penial retractor muscle, anterior byssus retractor muscle

### 서 론

복잡한 신경계로 구성된 척추동물보다 단순화된 신경계를 지닌 무척추동물의 신경전달물질에 관한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 연체동물인 군소, 오징어 및 달팽이 등은 단순한 신경계를 가지는 동시에 신경전달물질을 많이 가지고 있는 크다란 뉴런을 가지고 있기 때문에 이들로부터 신경성 펩타이드의 정제에 관한 연구 및 이들 물질의 면역조직학적 분포에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[38]. 또한 이들 무척추동물의 생체 내에 존재하는 신경네트워크가 원활하게 움직이기 위해서 이들이 합성해서 분비하는 신경성 펩타이드의 조절 작용이 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[2,12]. 이들 신경성 펩타이드들 중의 하나인 myomodulins (MMs)에 대한 정제 및 다양한 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[7,8,11,48]. MMs중에서는 MMA가 군소(*Aplysia californica*)로부터 처음 발견되었으며[8,9], 그 후 계속해서 MMB와 MMC 및 MME가 정제되었다[9,10,32]. 또한 동일한 종의 accessory radula closer (ARC) muscle로부터 6종류의 MMA -

MMF가 정제되었고[3], 3종류의 MMG - MMI는 cDNA 연구에 의해 구조가 밝혀졌다[29,31]. 또한 최근에 다른 종류의 군소 (*Aplysia kurodai*)의 중추신경계로부터도 MMA 및 MME가 발견되었다[21]. 비록 MMs는 C-말단에 MLRLamide의 공통 영역을 포함하는 동시에 7-8 잔기의 아미노산으로 구성되어 있지만, N-말단 영역에서 다른 아미노산들이 치환되어 있다. 모든 MMs들은  $1 \times 10^{-8}$  M에서 군소의 ARC muscle에 대해 수축을 활성화시켰지만, 7가지 MMs (MMA 및 MMD - MMI)는 저농도에서 수축을 저해하였다[51]. 또한 MM은 *Lymnaea*의 penis retractor muscle의 수축 및 전기적으로 유도된 수축의 이완 속도를 활성화시키는 작용을 지닌다[27,48]. MM계통에 속하는 물질들은 군소 이외의 연체동물인 이매패류, 복족류 및 환형동물에서도 발견되었다[4,14,18,20,26,43,44,47,50]. 면역조직학적 연구에 의하면 MMs들은 군소의 다양한 조직들에서 반응을 나타내었으며[30], 다른 동물들의 신경조직에서도 반응을 나타내었다[5,46,49].

연체동물은 MMs 계열의 펩타이드 이외에도 다양한 생리활성 펩타이드들을 포함하고 있다. Price와 Greenberg 등[41]은 *Aplysia* 및 대합조개(*Macrocallysta nimbosa*)로부터 FMRFamide를 정제하였다. Kobayashi와 Muneoka 등[23]은 이매패류인 *Mytilus edulis*의 anterior byssus retractor muscle (ABRM), *Fusinus ferrugineus* 및 *Achatina fulica*로부터도

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5867, Fax : +82-51-629-5863

E-mail : ngpark@pknu.ac.kr

FMRFamide를 단리하였다. FMRFamide는 ABRM에서 저농도에서 acetylcholine에 의한 catch-tension을 이완시켰지만, 고농도에서는 수축반응을 나타내었다[39]. 또한 저농도에서 FMRFamide는 전기자극 또는 acetylcholine에 대한 수축활성 반응을 증가시켰다[35]. 유사하게 FMRFamide는 *Limax maximus*의 penis의 근육에 대해 수축활성과 억제반응을 동시에 보였다[24]. Aplysia로부터 정제된 다른 신경성 펩타이드로는 small cardioactive peptides (SCPs) 및 buccalins이 있다. SCP<sub>A</sub>와 SCP<sub>B</sub>는 *Aplysia*의 신경계와 내장에서 정제되었으며, 11개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드이다[28,33]. SCP<sub>A</sub> 및 SCP<sub>B</sub>의 아미노산 서열은 각각 ARPGYLAFPRMamide와 MNYLAFPRMamide이다. 이들은 *Mytilus*의 ABRM에서 반복적인 전기자극에 대한 phasic contraction을 증가시켰다[34,36]. SCP<sub>B</sub>는 *Limax maximus*의 penis에 대해 고농도에서는 수축을 억제하는 활성을 보였지만, 저농도에서는 penis의 근육에 대해 수축반응을 증대시켰다. 그러나 소낭(crop)에 대해서는 수축 반응만 나타냈다[24]. 한편, *Mytilus*의 ABRM과 pedal ganglia, 그리고 *Achatina fulica*와 *Helix pomatia*의 신경 절로부터 약 30종류의 Mytilus inhibitory peptide (MIP) 관련 펩타이드가 정제되었다[13,16]. 이들은 약 6-15개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, C-말단부분에 -Pro-Xaa-Phe-Val-NH<sub>2</sub>가 공통으로 존재하는 특징을 가지고 있다. 이들 영역이 ABRM의 반복적인 전기자극에 의한 phasic contraction을 저해한다고 알려져 있다. MIP는 또한 *Mytilus*의 ABRM뿐만 아니라 다른 연체동물의 근육과 신경의 작용도 저해하는 활성을 나타낸다[17].

지금까지 다양한 종류의 MMs들이 정제되었지만 구조-활성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 MME의 구조-활성에 관한 상관관계를 알아보기 위해서 MME의 유도체와 FMRFamide, SCP<sub>B</sub> 및 MIP를 합성하여 진주담치의 ABRM, 아프리카 큰 달팽이의 penial retractor muscle과 소낭에 대해 수축과 이완 반응을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 일반 시약

시료의 여과를 위한 Millex-LCR13 (0.5 µm), ULTRAFREE-MC (0.45 µm), Syringe filter (0.44 µm) 및 Sep-Pak Vac C<sub>18</sub> cartridge는 Waters사(Waters associates, Milford, MA, USA)에서, 정제에 사용한 Sephadex G-25 (fine)는 Pharmacia (LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)에서, 그리고 펩타이드들을 합성하기 위해 Fmoc-NH-PAL Resin (0.55 mmol/g) 및 Fmoc-amino acid는 Advanced Chem Tech (Louisville KY, USA)에서 구입하였다. Diisopropylcarbodiimide (DIPCI) 및 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) 및 piperidine은 Watanabe 화학회사(Hiroshima, Japan)에서, trifluoroacetic acid (TFA), 1,2-ethanedithiol (EDT), *m*-cresol은 Wako (Osaka, Japan)에

서 구입하였다. 또한 thioanisole은 Aldrich (Milwaukee, USA)에서 *N,N*-dimethylformamide (DMF) 및 HPLC-grade용 H<sub>2</sub>O와 CH<sub>3</sub>CN은 TEDIA (Ohio, USA)에서 각각 구입하였으며, 그 밖의 시약은 특급품을 사용하였다.

### 펩타이드의 합성 및 정제

박 등[40]에 의해 보고된 Fmoc-법을 사용하여 고상법으로 펩타이드를 합성하였다. 합성 펩타이드에 연결되어 있는 resin과 side chain의 보호기를 제거하기 위해서 절단시약인 TFA (5 ml) : *m*-cresol (0.6 ml) : thioanisole (1.7 ml) : EDT (0.9 ml)을 사용하여 실온에서 90 분간 반응을 시켰다. 반응 후, resin을 여과한 다음 펩타이드 용액을 진공 농축하였으며 계속해서 농축액에 차가운 에테르를 첨가하여 peptide를 결정화시켰다. 합성 펩타이드들은 µ-Bondapak C<sub>18</sub> (7.8×300 mm) column을 사용하여 다음과 같은 조건으로 정제하였다: A용매; 0.1% TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O, B용매; 0.1% TFA를 포함하는 CH<sub>3</sub>CN, B용매의 gradient: 5→65% (40 min), 유속; 2.0 ml/min, 파장; 220 nm. 부분 정제된 합성 펩타이드들은 isocratic 용출방법을 사용하여 Spherisorb ODS2 C<sub>18</sub> (4.0×125 mm) column으로 최종적으로 정제하였다.

### 합성 펩타이드들의 분자량 측정

MALDI-TOF-MASS Spectrometer (Voyager-DE<sup>TM</sup> PRO, Perseptive Biosystems사, U.S.A.)를 이용하여 합성 펩타이드들의 분자량을 측정하였다.

### 실험동물

평활근 수축 및 이완 활성을 측정하기 위해서 아프리카 큰 달팽이(*Achatina fulica*)의 소낭과 penial retractor muscle, 진주담치(*Mytilus edulis*)의 anterior byssus retractor muscle (ABRM)을 사용하였다.

### 진주담치의 ABRM에 대한 조절활성

진주담치의 좌우 패각을 열고, 면실을 이용하여 ABRM을 길이가 약 1 cm가 되도록 윗부분과 아랫부분을 묶은 다음 적출하였다. 적출한 ABRM은 인공해수로 채워진 2 ml의 반응조에 고정시켰다. 인공해수(ASW)의 조성은 다음과 같다: NaCl 445 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 55 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mM, KCl 10 mM. 이 용액은 Tris-HCl 완충액을 이용하여 pH 7.8로 보정하였다. 준비한 ABRM의 아래쪽 부분을 반응조의 지지대에 고정시키고 윗부분을 physiograph (NEC-Sanei, Tokyo, Japan)의 transducer에 연결하여 5 g의 장력을 걸었으며, 반복적인 전기 자극(23V, 3 msec, 50 Hz)을 하여 각 분획에 대해 활성여부를 측정하였다. Phasic contraction은 10분 간격으로 행하였으며, 각 시료 용액은 phasic contraction의 8분 전에 적용하였다. Ach에 의한 catch-tension에서 합성 펩타이드들의 이완활

성을 측정하기 위해 ABRM에 농도 의존적으로 투여하여 그 변화를 관찰하였다.  $10^{-5}$  M의 Ach는 20분 간격으로 2분간 ABRM에 적용시킨 후, 근육은 정상 ASW로 세정하고 반복적인 전기 자극으로 근육을 자극하여 활성화시켰다. 그런 다음 펩타이드를 농도 의존적으로 투여하여 실험하였다. 수축 및 이완활성에 대한 모든 실험은 실온(23°C)에서 행하였다.

#### 달팽이 소낭에 대한 조절 활성

달팽이의 껍질을 벗긴 다음, 가슴을 절개하여 소낭의 윗부분과 아랫부분에서 약 0.5 cm씩 떨어진 부분에서 3-4 cm의 크기로 재빨리 적출하였다. 적출한 소낭은 면실을 이용하여 10-15 mm의 길이로 아래와 위를 묶은 후 실온에서 Ringer용액이 담긴 반응조에 고정시켰다. Ringer 용액의 조성은 다음과 같다: NaCl 120 mM, KCl 4 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.9 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  18 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4.2 mM. 적출한 소낭의 아래쪽을 반응조의 지지대에 고정시키고 위쪽은 isometric transducer에 연결하였다. 이후 2 g의 장력이 주어지도록 1.5시간 동안 안정화시켰다. 이때 15분 간격으로 buffer를 교체해 주면서 95%  $\text{O}_2$ 와 5%  $\text{CO}_2$ 로 혼합된 가스를 지속적으로 제공하였다. 장력 2 g이 유지된 후,  $1 \times 10^{-3}$  M Ach을 15분 간격으로 3회 투여하여 활성화 시켰다. 이후 준비된 peptide성 약물을 non-cumulative 방법으로 농도 의존적으로 투여하였다.

#### 달팽이의 penial retractor muscle의 이완 활성

달팽이의 껍질을 벗긴 다음, 가슴을 절개하고 penial retractor muscle을 면실을 이용하여 10-15 mm의 길이로 아랫부분과 윗부분을 묶은 후 실온에서 Ringer용액이 담긴 반응조에 고정시켰다. 적출한 penial retractor muscle의 아래쪽을 bath의 지지대에 고정시키고 위쪽은 isometric transducer에 연결하였으며, 재료 및 방법의 달팽이 소낭에서와 같은 용액과 방법으로 활성을 측정하였다.

#### 통계처리

ABRM의 반복적인 전기자극에 대한 조절활성은 control에 대한 약물반응의 크기를 %로 나타냈다. 장관수축활성은 Ach

에 의한 수축반응을 100%로 하여 상대적 수치 %로서 나타냈으며, 근육 이완 활성은 Ach에 의한 최대수축에 대한 상대적 이완 %로서 나타냈다. 통계적 처리는 student's t-test로서 했다. 모든 반응 값은 means±s.e.로 표시했다.

## 결과 및 고찰

#### Myomodulin E (MME)와 유도체의 합성 및 정제

MME의 구조와 활성간의 상관관계를 알아보기 위해 MME와 N-말단에 존재하는 아미노산을 각각 하나씩 제거한 3가지의 유도체를 합성하였으며, 또한 MME와 활성을 비교하기 위하여 MMA, FMRFamide, SCP<sub>B</sub> 및 MIP를 합성하였다. MMA는 28%로 그리고 MME 및 다른 합성물질들은 27%의 isocratic 조건으로 각각 정제하였다. Table 1에 합성한 물질들의 일차구조, 분자량 및 retention time (RT)을 나타내었다. 또한 합성 펩타이드들의 분자량은 MALDI-TOF-Mass를 이용하여 확인한 결과, 모든 화합물들의 이론값과 측정값은 일치하였다: MME,  $\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{O}_8\text{N}_{12}\text{S}$  829.00,  $(\text{M}+\text{H})^+$  830.50; Des[Gly<sup>1</sup>]-MME,  $\text{C}_{34}\text{H}_{65}\text{O}_7\text{N}_{11}\text{S}$  771.95,  $(\text{M}+\text{H})^+$  773.36; Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME  $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{O}_6\text{N}_{10}\text{S}$  658.80,  $(\text{M}+\text{H})^+$  660.22; Des[Gly<sup>1</sup>, Met<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME,  $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{N}_8\text{S}$  530.67,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  532.03; MMA,  $\text{C}_{36}\text{H}_{67}\text{O}_8\text{N}_{11}\text{S}_2$  846.04,  $(\text{M}+\text{H})^+$  847.41; FMRFamide,  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_8\text{S}$  598.71,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  596.74; MIP,  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{N}_7\text{S}$  635.72,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  636.81; SCP<sub>B</sub>,  $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{O}_{11}\text{N}_{14}\text{S}_2$  1141.33,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  1142.04.

#### 진주담치 ABRM의 전기자극에 의한 phasic contraction 활성

진주담치의 ABRM은 전기자극에 의한 phasic contraction과 catch contraction을 뚜렷하게 나타내고 있기 때문에[36], ABRM의 조절 활성을 알아보기 위해서 본 연구에서 합성한 물질들을 사용하여 농도별로 phasic contraction 활성을 측정하였다. Fig. 1에 MMA 및 MME의 phasic contraction 활성 결과를 나타내었다. MME는  $1 \times 10^{-9}$  M부터 농도가 증가할수록 phasic contraction을 억제하였다. MME와는 대조적으로 MMA는  $1 \times 10^{-7}$  M까지 phasic contraction을 촉진시켰다. 그러

Table 1. Primary structure of MME, its analogues, MMA and other mollusk neuropeptides

Peptides	Sequence	Mass (m/z)	RT (min)
Myomodulin E	Gly-Leu-Gln-Met-Leu-Arg-Leu-amide	830.50	13
Des[Gly <sup>1</sup> ]-MME	Leu-Gln-Met-Leu-Arg-Leu-amide	773.36	10
Des[Gly <sup>1</sup> , Leu <sup>2</sup> ]-MME	Gln-Met-Leu-Arg-Leu-amide	660.22	5.5
Des[Gly <sup>1</sup> , Leu <sup>2</sup> , Gln <sup>3</sup> ]-MME	Met-Leu-Arg-Leu-amide	532.03	4.5
Myomodulin A	Pro-Met-Ser-Met-Leu-Arg-Leu-amide	847.41	10
FMRFamide	Phe-Met-Arg-Phe-amide	596.74	6.6
MIP	Gly-Ser-Pro-Met-Phe-Val-amide	636.81	12.3
SCP <sub>B</sub>	Met-Asn-Tyr-Leu-Ala-Phe-Pro-Arg-Met-amide	1142.04	8.4

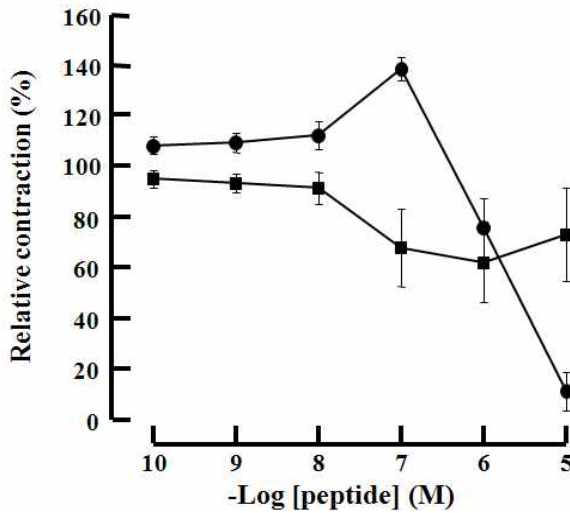


Fig. 1. Concentration response curve to MMA (●) and MME (■) induced effect to the repetitive electrical stimulation (23V, 50Hz, 3msec) on the ABRM of *M. extilis*.

나 흥미롭게도  $1 \times 10^{-6}$  M에서는 phasic contraction을 억제하였으며,  $1 \times 10^{-5}$  M에서는 phasic contraction을 약 90%까지 억제하는 것으로 나타났다. 최근 *Mytilus*의 pedal ganglia로부터 MMA와 유사한 일차구조를 나타내는 catch-relaxing peptide (CARP)가 발견되었는데, CARP도 MMA와 마찬가지로 phasic contraction을 나타내었다[18]. 한편 ABRM의 phasic contraction에서 Ala<sup>2</sup>-MIP, Ser<sup>2</sup>-MIP는 저해활성을 나타내며 [17,19], SCP는 phasic contraction을 증가시킨다고 보고되었다[34].

진주담치 ABRM의 catch-tension relaxation 활성화

현재까지 ABRM에 있어서 신경조절에 관여하는 신경전달 물질로 Ach과 serotonin이 보고되어있다[15,36,45]. 이들 두 물질 이외에 여러 가지 아민류, dopamine과 octopamine 그리고 신경성 펩타이드인 FMRFamide, CARP, MIPs도 ABRM의 조절에 관여한다고 알려져 있다. 따라서 ABRM에  $1 \times 10^{-5}$  M의 Ach을 투여하여 평활근을 최대한 수축시킨 catch-tension 상태를 만드는 것이 가능하다. 이러한 ABRM의 평활근 이완 작용을 조사하기 위해서 다양한 합성물들을 농도 의존적으로 투여하였다. Fig. 2는 ABRM의 catch-tension 상태에서 MME 및 유도체들을 농도별로 누적 투여하여 이완 활성을 측정 한 것이다. 그 결과, MME는  $1 \times 10^{-8}$  M부터 활성이 확인되었고, 농도가 증가함에 따라 이완활성도 함께 증가되었다. Des[Gly<sup>1</sup>]-MME와 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME의 활성은 MME에 비해 현저하게 감소하였지만  $1 \times 10^{-5}$  M에서 이완반응을 유지하였다. 그러나 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME는 활성이 완전히 소실되었다. 이들 물질들의 최대활성의 세기는 다음과 같다: MME > Des[Gly<sup>1</sup>]-MME > Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME > Des[Gly<sup>1</sup>,

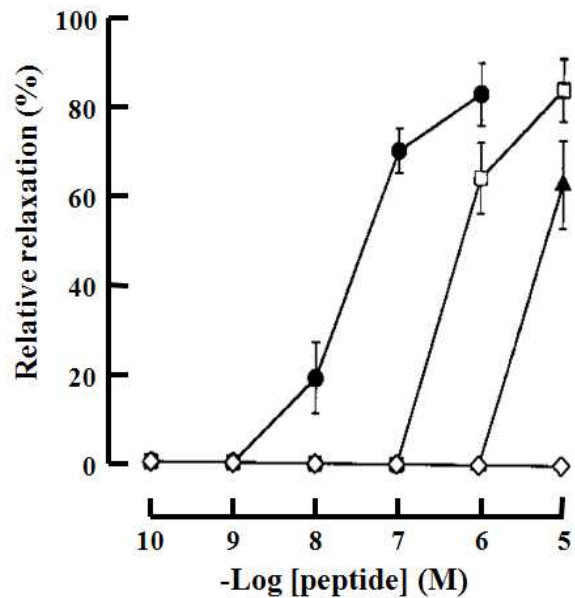


Fig. 2. The dose-dependent curve of MME and its analogs on the ABRM of *M. extilis*. MME (●), Des[Gly<sup>1</sup>]-MME (□), Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME (▲), and Des[Gly<sup>1</sup>, Met<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME (◇).

Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME. 한편, MME, Des[Gly<sup>1</sup>]-MME 및 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME의 ED<sub>50</sub>은 각각  $5.8 \times 10^{-8}$  M,  $6.6 \times 10^{-7}$  M 및  $5.3 \times 10^{-6}$  M이다. MME의 N-말단에 존재하는 아미노산을 1개 혹은 2개 이상 제거한 경우, MME보다 각각 약 9배 및 110배 활성이 감소하였다. Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME는 MME에 비해 약 1,000배 이상에 해당하는 활성의 감소를 초래하였다. 이러한 N-말단에서 존재하는 아미노산을 제거함으로써 활성의 감소 효과는 FMRFamide의 RFamide [22], MIP의 FVamide [13]에서도 나타났다. 예를 들면, MIP의 N-말단 2개의 아미노산을 제거한 PMFVamide는 MIP보다 활성이 10배 감소하였고, MFVamide는 MIP보다 3,000-10,000배 활성이 감소하였으며, FVamide는 활성이 100,000배 감소하였다. 따라서 MME가 ABRM의 Ach에 의한 catch-tension의 이완 활성을 위해서 QMLRLamide가 최소한으로 필요한 부분이며, ABRM의 이완 활성에 N-말단의 영역이 관여하는 것으로 생각된다.

Fig. 3은 MMA, MME, FMRFamide 및 MIP에 대한 catch-tension 활성을 나타낸다. MME, MMA와 MIP는 이완 작용을 나타내었으며 이들의 ED<sub>50</sub> 값은 각각  $5.8 \times 10^{-8}$  M,  $6.6 \times 10^{-7}$  M 및  $5.0 \times 10^{-6}$  M 이었다. Hirata 등[17]은 MIP관련 펩타이드가  $1 \times 10^{-7}$  M에서 ABRM의 수축을 저해하지만, catch-tension에 있어서는 이완활성을 나타내지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서 MIP는 저농도에서 반응을 나타내지 않았지만,  $1 \times 10^{-6}$  M 이후부터 catch-tension에 대해 이완반응을 나타내었다. 아마도 이러한 이유는 활성 측정에 이용된 MIP의 농도 차이 때문인 것으로 생각된다. FMRFamide는

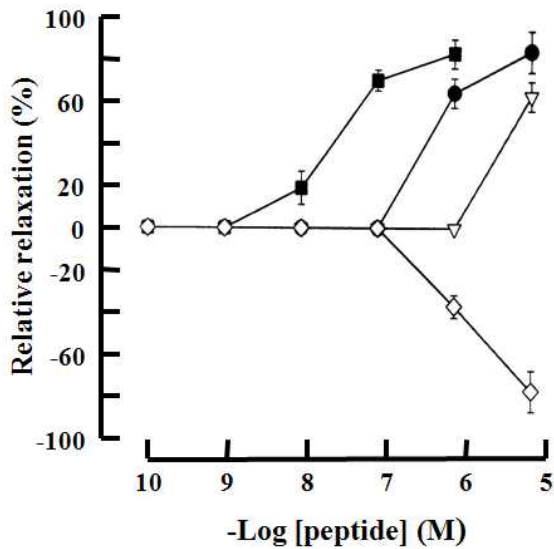


Fig. 3. The dose-dependent curves of MMA, MME and other mollusks neuropeptide on catch-relaxing responses ( $n=4$ ) with the ABRM of *M. extilis*, of the MMA (●), MME (■), FMRFamide (◇), and MIP (▽).

Ach의 catch-tension 상태에서, 농도에 따라 이완 혹은 수축 활성을 나타낸다고 알려져 있다[36]. 그러나 본 연구에서 FMRFamide는 저농도에서 아무런 활성을 나타내지 않았으며,  $1 \times 10^{-7}$  M 보다 높은 농도에서 catch-tension의 수축을 더 증가시켰다. 이전의 보고에 의하면 CARP는 근육의 post-synaptic site에 작용하여 catch-tension relaxing 활성을 나타내었다[17]. ABRM에 의한 MME의 catch-tension 이완 활성은 CARP가 근육의 postsynaptic site에 작용하여 catch-tension relaxing 활성을 나타낸 것과 유사한 작용에 의해 일어난 것으로 생각된다.

#### 달팽이 소낭에 대한 수축 활성

달팽이(*A. fulica*)의 소낭에 대한 MME 및 유도체들의 수축 활성에 대한 농도반응 곡선을 나타내었다(Fig. 4). MME는  $1 \times 10^{-8}$  M부터 약간의 수축활성을 나타내기 시작하였고,  $1 \times 10^{-7}$  M에서 더 높은 농도로 갈수록 수축활성이 증가하였다. *A. fulica*의 소화기관인 소낭에 대해 수축반응이 있는 것으로 보아 MME는 소화 작용에 관여하는 신경성 펩타이드라 생각된다. Des[Gly<sup>1</sup>]-MME는 활성이 대부분 유지되었지만, Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME 및 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME는 활성이 완전히 소실되었다. MME와 그 유도체들간의 활성의 세기는 다음과 같다: MME > Des[Gly<sup>1</sup>]-MME >> Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME, Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME. MME는 N-말단에서 2개의 잔기를 제거한 유도체에서 활성이 크게 감소하였지만 첫 번째 잔기만을 제거한 유도체의 경우 활성이 유지되었다. 이러한 결과는 달팽이 소낭의 수축 활성에 있어서 MME의 첫 번째 잔기

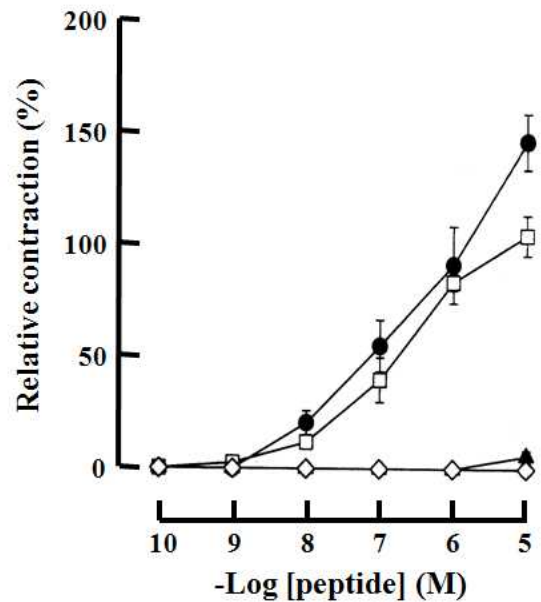


Fig. 4. The dose-dependent curve of MME and its analogs of contractile effects ( $n=4$ ) with the crop from the African giant snail, *A. fulica*, MME (●), Des[Gly<sup>1</sup>]-MME (□), Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME (▲) and Des[Gly<sup>1</sup>, Met<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME (◇).

인 Gly은 반드시 필요한 잔기가 아니며 두 번째 잔기인 Leu이 활성 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 제시한다.

Fig. 5는 MMA, MME, FMRFamide, MIP, 및 SCP<sub>B</sub>를 사용하여 소낭에 대한 수축 활성을 나타낸 것이다. MME와 SCP<sub>B</sub>의 활성은  $1 \times 10^{-7}$  M까지 다른 펩타이드보다 높은 활성을 나타내었다. 그러나 MME는 농도 증가와 함께 활성이 증가하여 사용한 물질들 중 최대 수축활성을 나타내었지만, SCP<sub>B</sub>는  $1 \times 10^{-6}$  M 이후 활성이 증가하지 않았다. SCP<sub>B</sub>는 또한 *Limax maximus*의 feeding motor program 및 소낭에 활성을 나타낸다고 보고되었다[24,42]. 한편, MMA와 FMRFamide는  $1 \times 10^{-7}$  M까지 낮은 활성을 보였지만, 농도증가와 함께 활성도 증가하였다. 그러나 이전의 연구들에 의하면, FMRFamide는 연체동물들의 소낭들에 대해 활성을 감소시키는 작용[1,25]과 먹이 행동 및 소화에 대한 저해 활성을 나타내었다[6,37]. 특히, MIP는 *A. fulica*와 *Euhadra congenita hiconis*의 소낭에서 spontaneous activity를 저해한다고 보고되었지만[13,19], 본 연구에서 MIP는 고농도에서도 조차 전혀 활성을 나타내지 않았다. 합성 펩타이드들의 ED<sub>50</sub>과 E<sub>max</sub>값을 Table 2에 나타내었다. MMA, MME, FMRFamide 및 SCP<sub>B</sub>의 ED<sub>50</sub>값은 각각  $8.0 \times 10^{-7}$  M,  $5.0 \times 10^{-7}$  M,  $7.4 \times 10^{-7}$  M 및  $5.8 \times 10^{-8}$  M이었다. 또한 이들 펩타이드들의 최대수축 활성의 세기는 다음과 같다: MME > MMA > FMRF > SCP >> MIP. 이러한 물질들은 군소의 섭식행동 때 발생하는 신경의 전기적 수축반응에 대해 조절제로서 작용하는 것으로 생각된다.

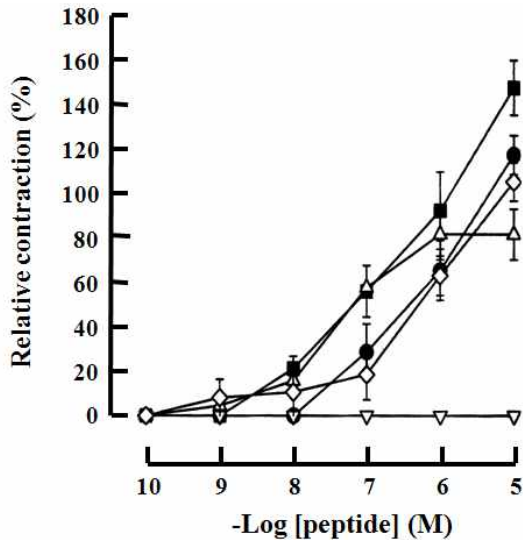


Fig. 5. The dose-dependent curve of MMA, MME and other mollusks neuropeptide of contractile effects (n=4) with the crop from the *A. fulica*, MMA (●), MME (■), FMRFamide (◇), MIP (▽) and SCP<sub>B</sub>(△).

Table 2. ED<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> of MMA, MME, their analogues, FMRFamide, MIP, and SCP<sub>B</sub> induced contraction in the *A. fulica* crop (n=4)

	<i>A. fulica</i> crop	
	ED <sub>50</sub> <sup>*1</sup>	E <sub>max</sub> <sup>*2</sup>
Myomodulin E	5.0×10 <sup>-7</sup> M	146.50 (12.40)
Des[Gly <sup>1</sup> ]-MME	3.0×10 <sup>-7</sup> M	104.00 (4.45)
Des[Gly <sup>1</sup> , Leu <sup>2</sup> ]-MME	4.7×10 <sup>-6</sup> M	4.55 (2.50)
Des[Gly <sup>1</sup> , Leu <sup>2</sup> , Gln <sup>3</sup> ]-MME	-	-
Myomodulin A	8.0×10 <sup>-7</sup> M	116.40 (8.70) <sup>*3</sup>
FMRFamide	7.4×10 <sup>-7</sup> M	104.50 (8.55)
MIP	-	-
SCP <sub>B</sub>	5.8×10 <sup>-8</sup> M	80.96 (11.36)

\*1: 95% confidence limits in brackets

\*2: expressed as % of the maximal response to acetylcholine, 1×10<sup>-5</sup> M

\*3: Number in parentheses are standard error.

-: The activity was not appeared.

달팽이 penial retractor muscle에 대한 이완 활성

Penial retractor muscle을 1×10<sup>-5</sup> M의 Ach으로 catch-tension 상태를 만든 후, MME 및 유도체들을 농도별로 투여하였다(Fig. 6). MME는 penial retractor muscle에 대해 1×10<sup>-8</sup> M부터 이완 활성을 보였으며, 농도증가와 함께 이완 활성이 증가하는 것으로 나타났다. Des[Gly<sup>1</sup>]-MME는 MME의 활성과 거의 차이가 없었지만, Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME는 활성이 감소되었다. 또한, Des[Gly<sup>1</sup>, Met<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME도 활성이 감소하였으나, ED<sub>50</sub> 값인 2.4×10<sup>-6</sup> M에서 약한 활성을 보였다. 이러한 결과는 MME가 penial retractor muscle에 대해 이완활성을 나타내는데 있어서 첫 번째 아미노산인 Gly이 반드시 필요하지

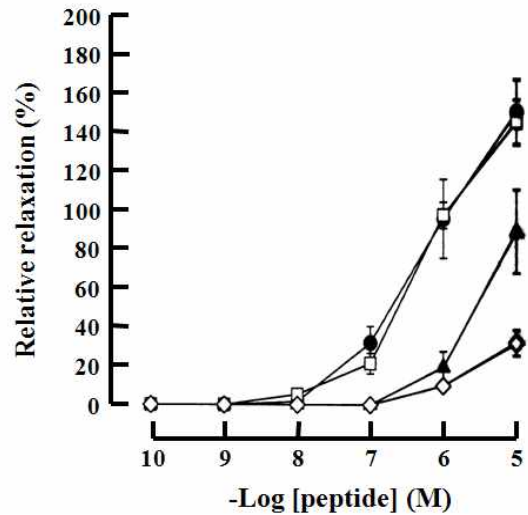


Fig. 6. The dose-dependent curve of MME and its analogs of catch-relaxing (n=4) with the penial retractor muscle from the *A. fulica*, MME (●), Des[Gly<sup>1</sup>]-MME (□), Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME (▲) and Des[Gly<sup>1</sup>, Met<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME (◇).

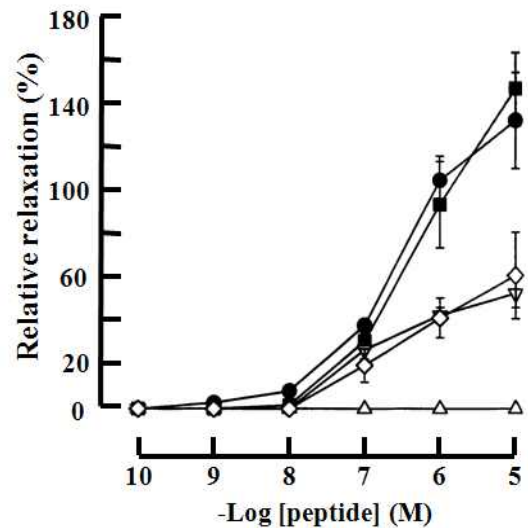


Fig. 7. The dose-dependent curve of MMA, MME and other mollusks neuropeptide of catch-relaxing (n=4) with the penial retractor muscle from the *A. fulica*, MMA (●), MME (■), FMRFamide (◇), MIP (▽) and SCP<sub>B</sub> (△).

않으며, 두 번째 잔기인 Leu이 활성 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 제시한다. 이들의 최대이완활성의 세기는 다음과 같다: MME ≅ Des[Gly<sup>1</sup>]-MME >> Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME > Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME. 다른 합성물질들에 대해서도 각각 농도 별로 이완 활성을 측정하였다(Fig. 7). MMA와 MME는 1×10<sup>-8</sup> M에서 반응을 보이기 시작하여 농도가 증가할수록 강한 이완활성을 보였다. Li 등[27]에 의하면 MMA는 *Lymnaea*에서 전기자극으로 수축된 penial retractor



Table 3. ED<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> of MMA, MME, their analogues, FMRFamide, MIP, and SCP<sub>B</sub> induced contraction in the *A. fulica* penial retractor muscle (n=4)

	<i>A. fulica</i> penial retractor muscle	
	ED <sub>50</sub> <sup>*1</sup>	E <sub>max</sub> <sup>*2</sup>
Myomodulin E	6.5×10 <sup>-7</sup> M	145.30 (16.60)
Des[Gly <sup>1</sup> ]-MME	6.2×10 <sup>-7</sup> M	142.22 (11.20)
Des[Gly <sup>1</sup> , Leu <sup>2</sup> ]-MME	3.5×10 <sup>-6</sup> M	87.90 (21.2)
Des[Gly <sup>1</sup> , Leu <sup>2</sup> , Gln <sup>3</sup> ]-MME	2.4×10 <sup>-6</sup> M	31.55 (6.55)
Myomodulin A	4.0×10 <sup>-7</sup> M	133.40 (22.30) <sup>*3</sup>
FMRFamide	5.4×10 <sup>-7</sup> M	61.77 (19.58)
MIP	1.0×10 <sup>-7</sup> M	53.55 (6.45)
SCP <sub>B</sub>	-	-

\*1: 95% confidence limits in brackets

\*2: expressed as % of the maximal response to acetylcholine, 1×10<sup>-5</sup> M

\*3: Number in parentheses are standard error.

-: The activity was not appeared.

muscle에 대해서도 이완반응을 나타내었다. 한편 FMRFamide는 *L. maximus*의 penis 근육에 활성을 나타내며[24], MIP는 *A. fulica*의 penial retractor muscle에 있어서 twitch contraction에 대해 저해 활성을 나타낸다고 보고되었다[16]. Penial retractor muscle에 강한 반응을 나타내는 MMA 및 MME와는 다르게 FMRFamide와 MIP는 낮은 활성을 나타냈다. 그러나 SCP<sub>B</sub>는 penial retractor muscle에 대해 이완 활성을 나타내지 않았다. Krajniak 등[24]에 의하면 SCP<sub>B</sub>는 Ach으로 수축시킨 *Limax maximus*의 penis에 대해 이완작용을 나타내었다. 이러한 SCP<sub>B</sub>에 대한 결과의 차이점은 아마도 실험에 사용한 *A. fulica*와 *L. maximus*가 다른 종류의 달팽이이기 때문에 이들 penial retractor muscle에 대해 서로 다른 반응이 나타난 것으로 생각된다. 합성물질들의 ED<sub>50</sub>값과 E<sub>max</sub> 값은 Table 3에 나타내었다. MME와 Des[Gly<sup>1</sup>]-MME의 최대이완활성 및 ED<sub>50</sub> 활성값은 거의 유사하였다. 따라서 MME의 첫 번째 잔기인 Pro는 수용체 결합에 있어서 중요한 역할을 하지 않는 것으로 생각된다. N-말단의 2개의 잔기들을 제거한 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>]-MME는 현저하게 활성이 감소되었다. 따라서 이완활성을 유지하기 위해서는 반드시 N-말단의 2번째 아미노산인 Met이 필요하다는 것을 의미한다. 한편 MME는 MMA보다 최대이완활성의 세기는 약간 높을 뿐만 아니라 ED<sub>50</sub> 활성값도 MMA보다 약 2배 낮았다. 흥미롭게도 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME는 ABRM과 달팽이의 소낭에 대해서 활성이 소실된 것과는 달리, penial retractor muscle에 활성을 나타냈다. 따라서 이들 펩타이드의 최대이완활성의 세기는 다음과 같다: MME > Des[Gly<sup>1</sup>]-MME > MMA >> Des[Gly<sup>1</sup>, Met<sup>2</sup>]-MMA > FMRFamide > MIP > Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Gln<sup>3</sup>]-MME > SCP<sub>B</sub>.

종합적으로 MME는 유도체들 뿐만 아니라 비교 물질인 FMRFamide, MIP, SCP<sub>B</sub>보다 ABRM, 달팽이의 소낭 및 penial retractor muscle에 대해 활성이 높았다. 그리고 C-말단에 존재

하는 5개의 잔기들, QMLRLamide는 사용한 조직들에 대해 최소한의 활성을 유지하기 위해 필요로 하는 영역인 것으로 생각된다. 따라서 MME는 진주담치의 이동과 부착, 달팽이의 섭식 및 생식 기능에 대해 활성화 효과를 가지기 때문에 연체동물의 생체조절기능에 복합적으로 매우 중요한 역할을 하는 신경전달 물질인 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 부경대학교 연구년 교수 지원사업에 의하여 연구되었음 (PS-2008-038).

## References

- Austin, T., S. Weiss, and K. Lukowiak. 1983. FMRFamide effects on spontaneous and induced contractions of their anterior gizzard in *Aplysia*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **61**, 949-953.
- Benarroch, E. E. 1994. Neuropeptides in the sympathetic system: Presence, plasticity, modulation and implications. *Ann. Neurol.* **36**, 6-13.
- Březina, V., B. Bank, E. C. Cropper, S. Rosen, F. S. Vilim, I. Kupfermann, and K. R. Weiss. 1995. Nine members of the myomodulin family of peptide cotransmitters at the Bl6-ARC neuromuscular junction of *Aplysia*. *J. Neurophys.* **74**, 54-72.
- Burke, J. F., N. Santama, E. Kellett, S. Saunders, M. Yeoman, and P. R. Benjamin. 1993. Expression of the neuropeptide gene FMRFamide and myomodulin in Lymnaea. *Soc. Neurosci. Abstr.* **19**, 1274.
- Christie, A. E., C. Hall, M. Oshinsky, and E. Marder. 1994. Buccalin-like and myomodulin-like peptides in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.* **193**, 337-343.
- Cooke, I., K. Delaney, and A. Gelperin. 1985. Complex computation in a small neural network, pp. 173-192. In Weinberger N. M., J. L. McGaught, and G. Lynch (eds.), *Memory systems of the brain*. Guilford Press. New York.
- Critz, S. D., D. A. Baxter, and J. H. Byrne. 1991. Modulatory effects of serotonin, FMRFamide and myomodulin on the duration of action potentials, excitability, and membrane currents in tail sensory neurons of *Aplysia*. *J. Neurophys.* **66**, 1912-1926.
- Cropper, E. C., P. E. Lloyd, W. Reed, R. Tenenbaum, I. Kupfermann, and K. R. Weiss. 1987a. Multiple neuropeptides in cholinergic motor neurons of *Aplysia*: evidence for modulation intrinsic to the motor circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3486-3490.
- Cropper, E. C., R. Tenenbaum, M. A. G. Kolks, I. Kupfermann, and K. R. Weiss. 1987b. Myomodulin: A bioactive neuropeptide present in an identified cholinergic buccal motor neuron of *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5483-5486.

10. Cropper, E. C., F. S. Vilim, A. Alevizos, R. Tenenbaum, M. A. G. Kolks, S. Rosen, I. Kupfermann, and K. R. Weiss. 1991. Structure, bioactivity and cellular localization of myomodulin B: A novel Aplysia peptide. *Peptides* **12**, 683-690.
11. Evans, P. D. 1994. The effects of myomodulin and structurally related neuropeptides on skeletal neuromuscular transmission in the locust. *J. Exp. Biol.* **190**, 253-264.
12. Feany, M. B. 1996. Neuropeptide modulation of learning and memory processes. *Rev. Neurosci.* **7**, 151-164.
13. Fujisawa, Y., I. Kubota, T. Ikeda, H. Minakata, and Y. Muneoka. 1991. A variety of Mytilus inhibitory peptides in the ABRM of *Mytilus edulis*: Isolation and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**, 525-531.
14. Fujiwara-Sakata, M. and M. Kobayashi. 1992. Neuropeptides regulate the cardiac activity of a prosobranch mollusc, *Rapana thomasiana*. *Cell Tissue Res.* **269**, 241-247.
15. Hidaka, T. and B. M. Twarog. 1977. Neurotransmitter action on the membrane of *Mytilus* smooth muscle-I. Acetylcholine. *Gen. Pharmacol.* **8**, 83-86.
16. Hirata, T., I. Kubota, N. Iwasawa, I. Takabatake, T. Ikeda, and Y. Muneoka. 1988. Structures and actions of *Mytilus* inhibitory peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 1376-1382.
17. Hirata, T., I. Kubota, M. Imada, Y. Muneoka, and M. Kobayashi. 1989. Effects of the catch-relaxing peptide on molluscan muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* **92C**, 283-288.
18. Hirata, T., I. Kubota, I. Takabatake, A. Kawahara, N. Shimamoto, and Y. Muneoka. 1987. Catch-relaxing peptide isolated from *Mytilus* pedal ganglia. *Brain Res.* **422**, 374-376.
19. Ikeda, T., Y. Y. Kamatani, H. Minakata, P. T. M. Kenny, K. Nomoto, and Y. Muneoka. 1992. *Mytilus*-inhibitory peptide analogues isolated from the ganglia of a pulmonate mollusc, *Achtina fulica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **101C**, 245-249.
20. Kanda, T., Y. Kuroki, I. Kubota, Y. Muneoka, and M. Kobayashi. 1990. Neuropeptides isolated from the ganglia of a prosobranch mollusc, *Fusinus ferrugineus*. *Protein Res. Foundation Osaka* 39-44.
21. Kim, C. H., H. J. Seo, E. Y. Hwang, E. J. Kim, H. J. Go, I. H. Kim, J. K. Seo, J. H. Moon, M. D. Huh, and N. G. Park. 2001. Purification of myomodulin A and myomodulin E from the central nervous system of the sea hare, *Aplysia kurodai*. *J. Kor. Fish. Soc.* **34**, 279-284.
22. Kobayashi, M. and Y. Muneoka. 1986. Structural requirements for FMRFamide-like activity on the heart of the prosobranch *Rapana thomasiana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **84C**, 349-352.
23. Kobayashi, M. and Y. Muneoka. 1990. Structure and action of molluscan neuropeptide. *Zool. Sci.* **7**, 801-814.
24. Krajniak, K. G., M. J. Greenberg, D. A. Price, K. E. Doble, and T. D. Lee. 1989. The identification, localization, and pharmacology of FMRF amide-related peptides and SCP<sub>B</sub> in the penis and crop of the terrestrial slug, *Limax maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **94C**, 485-492.
25. Lehman, H. K. and M. J. Greenberg. 1987. The actions of FMRFamide-like peptides on visceral and somatic muscles of the snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* **131**, 55-68.
26. Lesser, W., M. J. Greenberg, K. E. Doble, T. D. Lee, C. G. Morgan, N. A. Pennell, and D. A. Price. 1992. Isolation and characterization of myomodulin-CARP-related peptides (MCRPs) in molluscs. *Soc. Neurosci.* **18**, 469.
27. Li, K. W., F. A. Van Golen, J. Van Minnen, P. A. Van Veelen, J. Vander Greef, and W. P. M. Geraerts. 1994. Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of Lymnaea: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry. *Mol. Brain Res.* **25**, 355-358.
28. Lloyd, P. E., I. Kupfermann, and K. R. Weiss. 1987. Sequence of small cardioactive peptide A: a second member of a class of neuropeptides in Aplysia. *Peptides* **8**, 179-184.
29. Lopez, V., L. Wickham, and L. Desgroseillers. 1993. Molecular cloning of myomodulin cDNA, a neuropeptide precursor gene expressed in neuron L10 of *Aplysia californica*. *DNA Cell Biol.* **12**, 53-61.
30. Miller, M. W., A. Alevizos, E. C. Cropper, F. S. Vilim, D. Karagogeos, I. Kupfermann and K. R. Weiss. 1991. Localization of myomodulin-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral tissues of *Aplysia californica*. *J. Comp. Neurol.* **314**, 627-644.
31. Miller, M. W., S. Beushausen, A. Vitek, S. Stamm, I. Kupfermann, J. Brosius, and K. R. Weiss. 1993. The myomodulin-related neuropeptides: characterization of a gene encoding a family of peptide cotransmitters in Aplysia. *J. Neurosci.* **13**, 3358-3367.
32. Miller, M. W., F. S. Vilim, E. C. Cropper, A. Alevizos, R. Tenenbaum, D. Karagogeos, I. Kupfermann, and K. R. Weiss. 1990. Structure and distribution of myomodulin related neuropeptides in Aplysia. *Soc. Neurosci.* **16**, 307.
33. Morris, H. R., M. Panico, A. Karplus, P. E. Lloyd, and B. Riniker. 1982. Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*. *Nature* **300**, 643-645.
34. Muneoka, Y., Y. Fujisawa, M. Matsuura, and T. Ikeda. 1991. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **98C**, 105-114.
35. Muneoka, Y. and M. Matsuura. 1985. Effects of the molluscan neuropeptide FMRFamide and the related opioid peptide YGGFMRF-amide on *Mytilus* muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **81C**, 61-70.
36. Muneoka, Y. and H. Saito. 1986. Pharmacology of FMRFamide in *Mytilus* catch muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **85C**, 207-214.
37. Murphy, A. D., K. Lukowiak, and W. K. Stell. 1985. Peptidergic modulation of patterned motor activity in identified neurons of *Helisoma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 7140-7144.
38. O'Shea, M. and M. Schaffer. 1985. Neuropeptide function: the invertebrate contribution. *Annu. Rev. Neurosci.* **8**, 171-198.
39. Painter, S. D. 1982. FMRFamide catch contractures of a molluscan smooth muscle pharmacology, ionic dependence and cyclic nucleotides. *J. Comp. Physiol.* **148**, 491-501.



40. Park, N. G., Y. Yamato, S. Lee, and G. Sugihara. 1995. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. *Biopolymers* **36**, 793-801.
41. Price, D. A. and M. J. Greenberg. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* **197**, 670-671.
42. Prior, D. J. and W. H. Watson. 1988. The molluscan neuropeptide, SCP<sub>B</sub>, increases the responsiveness of the feeding motor program in *Limax maximus*. *J. Neurobiol.* **19**, 87-105.
43. Santama, N., M. Brierley, J. F. Burke and P. R. Benjamin. 1994a. Neural network controlling feeding in *Lymnaea stagnalis*: immunocytochemical localization of myomodulin, small cardioactive peptide, buccalin, and FMRFamide-related peptides. *J. Comp. Neurol.* **342**, 352-365.
44. Santama, N., C. H. Wheeler, J. F. Burke, and P. R. Benjamin. 1994b. Neuropeptides myomodulin, small cardioactive peptide, and buccalin in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*: purification, immunoreactivity, and artifacts. *J. Comp. Neurol.* **342**, 335-351.
45. Satchell, D. G. and B. M. Twarog. 1978. Identification of 5-hydroxytryptamine (serotonin) released from the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus californianus* in response to nerve stimulation. *Comp. Biochem. Physiol.* **59C**, 81-85.
46. Swales, L. S. and P. D. Evans. 1994. Distribution of myomodulin-like immunoreactivity in the adult and developing ventral nervous system of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Comp. Neurol.* **343**, 263-280.
47. Takahashi, T., O. Matsushima, F. Morishita, M. Fujimoto, T. Ikeda, H. Minakata, and K. Nomoto. 1994. A myomodulin-CARP related peptide isolated from a polychaete annelid, *Perinereis vancaurica*. *Zool. Sci.* **11**, 33-38.
48. Van Golen, F. A., K. W. Li, S. Chen, C. R. Jimenez, and W. P. M. Geraerts. 1996. Various isoforms of myomodulin identified from the male copulatory organ of *Lymnaea* show overlapping yet distinct modulatory effects on the penis muscle. *J. Neurochem.* **66**, 321-329.
49. Vilim, F. S. and E. Ziff. 1994. Antibodies to the *Aplysia* neuropeptide myomodulin stain varicose processes in rat brain. *Soc. Neurosci.* **20**, 515.
50. Wang, Y., D. A. Price and C. L. Sahley. 1998. Identification and characterization of a myomodulin-like peptide in the leech. *Peptides* **19**, 487-493.
51. Wang, Y., J. A. Strong and C. L. Sahley. 1999. Modulatory effects of myomodulin on the excitability and membrane currents in retzius cells of the leech. *J. Neurophysiol.* **82**, 216-225.

#### 초록 : Myomodulin E 및 유도체들의 합성 및 생리활성

고혜진<sup>1</sup> · 서정길<sup>1</sup> · 서혜점<sup>1</sup> · 이민정<sup>1</sup> · 박태현<sup>2</sup> · 김군도<sup>3</sup> · 박남규<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부경대학교 수산과학대학 생물공학과, <sup>2</sup>웨스트맨쿠버고등학교, <sup>3</sup>부경대학교 자연과학대학 미생물학과)

군소인 *Aplysia kurocki*의 중추신경절로부터 발견된 myomodulin A (MMA, PMSMLRLamide)와 myomodulin E (MME, GLQMLRLamide)는 *Mytilus edulis*의 anterior byssus retractor muscle (ABRM)을 활성측정시스템으로 사용하여 정제되었다. 정제된 MMA와 MME는 연체동물에서 발견된 myomodulin 계열의 펩타이드와 동일한 일차구조를 지닌다. MME의 구조와 활성간의 상관관계를 알아보기 위해서 MME, 유도체 및 다른 신경성 펩타이드들을 합성하였다. MME의 유도체인 Des[Gly<sup>1</sup>]-MME, Des[Gly<sup>1</sup>,Leu<sup>2</sup>]-MME 및 Des[Gly<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>,Gln<sup>3</sup>]-MME의 일차구조는 각각 LQMLRLamide, QMLRLamide 및 MLRLamide이다. 합성 물질들을 사용하여 ABRM에 대한 phasic contraction을 측정하였다. MME는  $1 \times 10^{-9}$  M 또는 더 높은 농도에서 ABRM의 phasic contraction을 저해하였다. 또한 MME는  $1 \times 10^{-8}$  M에서 catch-tension에 대해 이완활성을 나타내었다. 합성 펩타이드들을 사용하여 Africa giant snail, *Achatina fulica*의 소낭과 penial retractor muscle에 대해서도 활성을 측정하였다. MME와 유도체들은 소낭에 대해서는 수축반응을 보였지만, penial retractor muscle에 대해서는 이완 활성을 나타내었다. 이러한 결과들은 MME와 그 유도체들은 연체동물의 다양한 조직에 대해 조절 효과를 가지고 있다는 것을 의미한다. 본 연구는 생체 내에서 발생하는 신경 및 circuit의 변화를 조절하는 작용 연구에 대한 기본적인 자료가 될 것이다.