(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 14/46 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년08월14일
(11) 등록번호 10-0749409
(24) 등록일자 2007년08월08일

(21) 출원번호 10-2006-0016448
(22) 출원일자 2006년02월20일
심사청구일자 2006년02월20일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자 김세권
부산 부산진구 연지동 353-1번지 세동한신아파트105동 304호

(74) 대리인 구창모
류창희
이덕록

(56) 선행기술조사문헌
KR1020020076980 A

심사관 : 손영희

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드 및 그 분리방법

(57) 요약

본 발명은 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드 및 그 분리방법에 관한 것으로, 숭어 뇌 열수추출물을 동결건조한 후 이를 메탄올로 충진된 카트리지에 통과시키면서 메탄올의 농도를 달리하여 세척함으로써 각각의 메탄올추출물을 얻고 이에 대해 숭어 후장 조직에 대한 흥분성 조사를 하여 흥분성을 나타내는 메탄올추출물을 역상 HPLC 하여 정제함으로써 정제된 신경펩타이드를 분리하고 이에 대한 구조분석, 생리분석 및 약학적 효과를 조사함으로써 내장 흥분성 신경펩타이드를 제공할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

숭어 뇌를 증류수에 넣어 끓인 후 아세트산을 첨가하여 산화시킨 다음 마쇄하는 단계;

상기 단계의 마쇄물을 원심분리하여 얻은 상등액을 농축하는 단계;

상기 단계의 농축액에 HCl을 첨가하고 원심분리한 다음 동결건조하여 동결건조물을 얻는 단계;

상기 단계의 동결건조물을 트리플루오로아세트산(TFA)에서 용해시킨 후 100% 메탄올로 충진된 카트리지를 통과시키면서 TFA로 카트리지를 세척한 후 60% 메탄올로 세척하여 60% 메탄올 용출물을 얻는 단계;

상기 단계의 60% 메탄올 용출물을 역상 C18 컬럼을 이용하여 HPLC를 통해 0.1% TFA에서 0-60% 아세토나이트릴(ACN)의 직선구배용매법을 이용하여 분획을 실시하여 시간 간격을 일정하게 두고 분획물을 수집하는 단계;

상기 단계에서 얻은 각 분획 부분에 대해 숭어의 후장에서의 장력 변화를 조사하여 장력 변화 물질을 포함하는 분획물은 다시 세미 프리패러티브 컬럼(semi preparative column)을 이용하여 0.1% TFA에서 0-40% ACN 직선구배용매법으로 정제하고 분석컬럼(analytical column)을 이용하여 0-40% ACN 직선구배용매법으로 정제하는 단계; 및

상기 단계에서 얻은 분획물들 중에서 숭어의 후장에 대한 장력변화를 나타내는 분획물은 다시 상기 단계에서 사용한 분석컬럼을 이용하여 0.1% TFA에서 ACN 농도를 주입하여 일정용매조성법에 따라 추가로 정제하는 단계를 포함하는 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드의 분리방법.

청구항 2.

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드 및 그 분리방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 숭어뇌의 추출물로부터 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리된 강류성 어종인 숭어의 뇌 유래 내장 흥분성 신경펩타이드와 이의 분리방법에 관한 것이다.

신경계에서 합성되고 분비되는 신경펩타이드는 신경전달물질, 호르몬 및 동물의 체내에서 세포 수준으로 다양한 생물학적 기능을 조절하는 조정물질로 작용한다. G-단백질은 세포내 형질도입경로를 유발하기 위해 수용체들과 결합한다. 신경펩타이드의 구조적 다양성은 생체세포에 대해 다른 영향을 유발한다.

비록 신경펩타이드가 같은 유전자로부터 코딩되고 생물학적 활성 면에서 거의 차이가 없다 할지라도, 동물마다 다른 기능과 효과를 나타낼 것이다. 이는 종마다 신경펩타이드 전구체의 유전자 스플라이싱 및 번역후 프로세싱(posttranslational processing)에서의 차이 때문이다. 지난 수십년 동안, 과학자들은 동물계 전체에 걸쳐 다양한 동물문에서 다른 종류의 신경펩타이드를 발견해왔다. 결과적으로, 지금까지 다른 동물과에 속해 있는 현재 많은 신경펩타이드들은 가장 원시적인 신경계를 가지고 있는 자포동물문(phylum cnidaria)에서 척색동물문(phylum chordate)에 이르기까지 분리 및 동정되었다. 어류에서 분리한 몇몇 신경펩타이드인 텔레오스테안(teleosteans) 및 엘라스모브랜취(elasmobranchs)는 구조가 밝혀져 있고, 그들의 생리적 역할은 부분적으로 동정되었다. 경골어류(teleosts) 및 판새류(elasmobranchs)에서 동정한 대부분의 신경펩타이드는 주로 타키키닌(tachykinin), 신경펩타이드Y(neuropeptide Y), 멜라닌 집중 호르몬(melanin-concentrating hormone), 글루카곤과 신경펩타이드(glucagon-family neuropeptide) 및 FMRFamide 펩타이드 카테고리에 속한다. online nanoscale liquid chromatography (nanoLC)과 electrospray-ionization quardrupole time-of-

flight (ESI-Q-TOF)를 병합한 기술을 포함하여 최근에 개발된 다기능 단백질 분석기술(versatile proteomic techniques)들은 동물체에서 발견되지 않은 많은 신경펩타이드의 존재를 나타낸다. 신규한 생물학적 활성 신경펩타이드 및 신경펩타이드과의 동정은 신경세포 전달의 화학적 언어의 복잡한 특성을 설명할 것으로 기대된다.

비록, 척추동물별로 대부분의 신경펩타이드들은 크로마토그래피 및/또는 방사선면역분석 기술을 통해 분석되어 왔을지라도, 체내 그들의 실제 생물학적 기능들을 동정하기란 쉽지 않다. 따라서, 그들의 생물학적 기능면에서 신경펩타이드를 밝히는 것이 중요하다. 향후, 이러한 생물학적 작용은 신경펩타이드의 발견 과정의 연쇄적 단계를 위한 생분석으로 사용될 수 있다.

비록 경골어류와 판새류 유래의 신경펩타이드들을 분리하기 위한 많은 실험들이 이루어져 왔으나, 강류성 행동양식(catadromous behaviors)을 갖는 경골어류의 중추신경계에서 신경펩타이드들의 존재에 관한 연구는 거의 없었다. 열대 근해에서 난대 수역에 걸쳐 사는 숭어는 강류성 어류의 대표종이다. 주로 담수 또는 강어귀에서 주로 살고 번식을 위해 바다로 이주하기 때문에, 숭어는 초고염도 저항과 같은 강어귀 파수종으로 행동하기에 필요한 특성들을 가지고 있다.

이에 본 발명자는 숭어 뇌 열수추출물을 동결건조한 후 이를 메탄올로 충진된 카트리지에 통과시키면서 메탄올의 농도를 달리하여 세척함으로써 각각의 메탄올추출물을 얻고 이에 대해 숭어 후장 조직에 대한 흥분성 조사를 하여 흥분성을 나타내는 메탄올추출물을 역상 HPLC 하여 정제함으로써 정제된 신경펩타이드를 분리하고 이에 대한 구조분석, 생리분석 및 약학적 효과를 조사함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 역상 크로마토그래피를 통해 얻은 강류성 어종인 숭어의 뇌에서 생성되는 내장조직 흥분성 신경펩타이드를 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 역상 크로마토그래피를 이용하여 강류성 어종인 숭어의 뇌에서 생성되는 내장조직 흥분성 신경펩타이드를 분리하는 방법을 제공하는데 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기 본 발명의 목적은 숭어 뇌 열수추출물을 동결건조한 후 이를 메탄올로 충진된 카트리지에 통과시키면서 메탄올의 농도를 달리하여 세척함으로써 각각의 메탄올추출물을 얻고 이에 대해 숭어 후장 조직에 대한 흥분성 조사를 하여 흥분성을 나타내는 메탄올추출물을 역상 HPLC 하여 정제함으로써 정제된 신경펩타이드를 분리하고 이에 대한 구조분석, 생리분석 및 약학적 효과를 조사함으로써 달성되었다.

이하, 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

발명의 구성

본 발명은 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드 및 그 분리방법을 제공한다.

본 발명의 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드의 분리방법은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다:

숭어 뇌를 증류수에 넣어 끓인 후 아세트산을 첨가하여 산화시킨 다음 마쇄하는 단계;

상기 단계의 마쇄물을 원심분리하여 얻은 상등액을 농축하는 단계;

상기 단계의 농축액에 HCl을 첨가하고 원심분리한 다음 동결건조하여 동결건조물을 얻는 단계;

상기 단계의 동결건조물을 트리플루오로아세트산(TFA)에서 용해시킨 후 100% 메탄올로 충진된 카트리지를 통과시키면서 TFA로 카트리지를 세척한 후 60% 메탄올로 세척하여 60% 메탄올 용출물을 얻는 단계;

상기 단계의 60% 메탄올 용출물을 역상 C18 컬럼을 이용하여 HPLC를 통해 0.1% TFA에서 0-60% 아세토나이트릴(ACN)의 직선구배용매법을 이용하여 분획을 실시하여 시간 간격을 일정하게 두고 분획물을 수집하는 단계;

상기 단계에서 얻은 각 분획 부분에 대해 숭어의 후장에서의 장력 변화를 조사하여 장력 변화 물질을 포함하는 분획물은 다시 세미 프리패러티브 컬럼(semi preparative column)을 이용하여 0.1% TFA에서 0-40% ACN 직선구배용매법으로 정제하고 분석컬럼(analytical column)을 이용하여 0-40% ACN 직선구배용매법으로 정제하는 단계; 및

상기 단계에서 얻은 분획물들 중에서 숭어의 후장에 대한 장력변화를 나타내는 분획물은 다시 상기 단계에서 사용한 분석컬럼을 이용하여 0.1% TFA에서 ACN 농도를 주입하여 일정용매조성법에 따라 추가로 정제하는 단계.

본 발명은 또한 상기의 방법에 의해 분리된 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드를 제공한다.

이하, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명을 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 숭어 뇌 추출물 제조

동물

줄무늬 숭어의 성체는 부산 자갈치시장에서 구입하였다. 0.1%의 MS-222(3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate salt)로 마취시킨 어체의 목부분을 베어내고 머리 부분은 뇌 전체(연수(medulla oblongata), 시엽(optic lobes), 후엽(olfactory lobes), 대뇌(cerebrum) 및 소뇌(cerebellum))를 얻기 위해 절개하였다. 떼어낸 뇌는 ice-cold acidified(with 1 mM HCL) 아세톤(아세톤 최종 농도: 70%)에서 즉시 냉동시킨 다음, 격리박스를 포함하는 드라이아이스 내에 넣어 실험실로 옮겼다.

추출

얼린 뇌는 증류수에서 15분 동안 끓였다. 3% 아세트산을 첨가하여 산화시킨 후, 끓인 뇌는 Waring blender로 분쇄하고 Polytron homogenizer(Polytron® PT3000, Brinkmann Instruments Co., Lucerne, Switzerland)를 이용하여 마쇄하였다. 상기 마쇄물은 4℃에서 9 000 × g에서 30분간 원심분리하였다. 펠렛은 3% 아세트산에서 재추출하였고 원심분리하였다. 2개의 상등액을 혼합한 후 농축하였다. 단백질을 침전시키기 위해, 1M HCl을 부피의 1/10배 첨가하고, 원심분리한 다음(9 000 × g, 30분, 4℃) 동결건조하였다. 동결건조한 물질을 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)에서 용해시킨 후, 0.1% TFA에서 100% 메탄올로 충진된 Sep-pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridges (Waters Associates, Milford, MA, USA)를 통과시켰다. 0.1% TFA으로 카트리지를 세척한 후, 0.1% TFA내 메탄올 농도를 달리하여 세척하였다(60% 및 80%). 각 용출물은 진공농축한 후 동결건조시켰다. 동결건조된 시료를 이용하여 숭어의 후장조직에 대한 흥분성 효과를 시험하였다.

본 발명은 숭어의 내장조직에서 장력을 변화할 수 있는 능력이 있는 뇌의 신경펩타이드를 동정할 목적으로 실시된 것이다. 따라서, 예비 연구에서, 뇌의 생활성 펩타이드에 가장 잘 반응하는 조직을 동정하기 위해 숭어에서 분리한 내장 조직 분절별(식도, 후장 및 직장) 자연발생 장력에 대한 효과를 뇌의 조추출물에서 실험하였다.

조직 수축에 대한 조추출물의 흥분성 효과는 식도 및 후장 분절에서 관찰될 수 있지만, 유의한 장력 변화는 후장 분절에서만 관찰되었다(미도시됨). 따라서, 후장조직은 연속 정제 단계에서 생분석을 위한 최적 조직으로써 선택하였다.

실시예 2: 숭어 뇌추출물의 정제

Sep-pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridges에서 얻은 다른 분획물 중에서(60% 및80% 메탄올), 60% 메탄올 용출물은 숭어 후장의 자연 수축에 대해 효과를 나타내었다. 따라서, 60% 메탄올 용출물을 RP-HPLC를 통해 추가로 정제하였다.

60% 메탄올로 용출한 분획은 후장 수축을 유도하는 물질을 포함하고 있다. 따라서, C18 reversed-phase column (CAPCELL Pak C18, 20 mm × 250 mm, Shiseido Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 HPLC를 실시하였다. 0.1% TFA에서 0-60% 아세토나이트릴(ACN)의 직선구배용매법을 이용하여 70분 동안 용출하였고, 유속은 3.5 ml/min으로 하여 분획을 실시하였다. 3분마다 분획물을 수집하였다. 각 분획(1/300) 부분에 대해 숭어의 후장에서의 장력 변화(tension change)를 시험하였다. 장력 변화 물질을 포함하는 분획물은 다음의 역상 C18 컬럼을 이용하여 HPLC를 통해 정제하였다: (1) 세미 프리패러티브 컬럼(semi preparative column) (CAPCELL Pak C18, 10 mm × 250 mm, Shiseido Co., Ltd,

Tokyo, Japan; 0.1% TFA에서 0-40% ACN 직선구배용매법, 50분, 유속: 2 ml/min) 및 (2) 분석컬럼(SynChropak RP C18, 4.6 mm ×250 mm, SynChrom Inc., Indiana, USA; 0-40% ACN 직선구배용매법, 25분, 유속: 0.3 ml/min). 그 후, 숭어의 후장에 대한 장력변화를 나타내는 분획물은 동일한 분석컬럼에 0.1% TFA에서 ACN 농도를 주입하여 일정용매조성법에 따라 추가로 정제하였다.

HPLC 정제 1단계에서, 약 33~36분경에 용출된 분획이 후장에 대해 수축 변화를 나타냈다(도 1). 다른 세미 프리패러티브 C18 컬럼에 생활성 분획을 가한 후, 7개의 피크를 얻었다. 28% ACN concentration in 0.1% TFA를 첨가하여 용출되는 6번째 피크는 후장 조직 표본에서 보다 높은 내장 수축 변화를 현저하게 나타내었다(도 2).

동결건조 후, 생활성 물질은 reversed phase C18 analytical column을 이용하여 추가로 정제하였다. 숭어의 내장활성 펩타이드 1과 2(Mvp-1, Mvp-2)로 표시한 2개의 피크를 얻었다(도 3). 둘 다 숭어의 후장조직수축에 대한 흥분성 효과를 나타내었다. 마지막으로, Mvp-1 및 Mvp-2는 각각 26.2%과 27.3% 농도의 ACN 함유 0.1% TFA를 첨가한 동일한 컬럼을 이용하여 일정용매법에 따라 용출하였다(도 4 및 5).

실시예 3: 숭어 뇌 유래의 정제된 펩타이드의 구조분석

정제된 펩타이드는 electro spray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS) (Micromass Q-TOF, Altrincham, UK)를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였다. 정제된 펩타이드의 분자량은 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight on a Voyager DE-PRO MALDI-TOF mass spectrometer(Applied Biosystems, Warrington, UK)를 이용하여 얻었다.

Mvp-1 및 Mvp-2의 아미노산 서열을 분석하였다 할지라도, Mvp-2의 서열을 분석할 만큼 충분하지는 않았다. ESI-Q-TOF as SGP AGVL에 의해 Mvp-1의 1차 아미노산 서열 전장을 측정하는 것은 가능하였다. 599.7 m/z $(M+H)^+$에서 분자 이온 피크(관찰된 분자량(598.7 Da)과 계산된 분자량(598.7 Da))는 Mvp-1이 아마이드 형태임을 나타냈다. 따라서, 이들 결과들은 Mvp-1의 1차 구조가 SGPAGVLamide임을 예시하고 있다. 정제된 Mvp-2의 MALDI-TOF mass spectrum은 monoisotopic mass 1622.73를 갖는 피크를 나타냈다.

실시예 4: 숭어 뇌 유래의 추출물 및 펩타이드의 생리분석

숭어 혈장의 이온 및 생화학적 프로필은 표 1에 나타내었다. 실제 혈장 성분에 근거하여, 생분석시 시험관내 조직 표본용 배지로 사용된 생리식염수는 표 2에 따라 제조하였다.

[표 1]
숭어의 혈장 성분

성분	mM
Na^+	129 ±1.23
K^+	10 ±0.48
Ca^{2+}	1.3 ±0.24
Mg^{2+}	3.87 ±0.06
HCO_3^-	7.0 ±0.02
PO_4^{3-}	2.0 ±0.37
SO_4^{2-}	3.5 ±0.63
D-glucose	5.7 ±0.40
[주] 결과는 평균 mM ±SD (n=3)으로 나타냄. 혈장의 pH는 7.2 ±0.08임.	

[표 2]

숭어의 시험관내 조직 표본을 위한 생분석 시 사용된 생리식염수의 조성

성분	mM
NaCl	120
KCl	10
$CaCl_2$	1.3
$MgSO_4$	3.87
$NaHCO_3$	7.0
NaH_2PO_4	2
D-glucose	5.7
[주] 결과는 mM/L로 나타냄. pH는 7.2임.	

각 정제 단계 후 수집한 분획물들은 refined myograph system (TIS8105R, Kent Scientific Cooperation, Torrinton, USA)를 이용하여 숭어에서 분리한 후장에서의 흥분성 효과 생성능을 실험하였다. 후장(15mm) 부분은 하복부를 배쪽으로 절개한 후 희생시킨 통통한 어체의 항문에서 내장 10mm 부분에서 얻었다. 조직 분절을 세척한 후, 양끝을 명주실로 잡아당겼다. 그 후, 한쪽 끝을 pre-calibrated transducer head (2 g)에 연결하고 다른쪽 끝은 지지막대에 연결한 후, 3ml 생리식염수(PSS)를 포함한 가스로 충진된 조직 배스에서 수평으로 고정시켰다. 후장 분절의 기계적 반응을 기록하기 위해, 증폭기(TRN005-220, Kent Scientific Cooperation, Torrinton, USA)를 이용하여 변환기(Transducer)를 차트기록기(REC101, Kent Scientific Cooperation, Torrinton, USA)에 연결하였다. 각 분획의 생활성을 점검하기 위해, 100㎕의 PSS에 녹인 건조 앨리쿼트를 조직 배스에 넣었다.

모든 생분석 및 약학적 실험들은 25℃에서 수행하였다. 조직은 10분 간격으로 PSS를 바꿔주면서 1시간 이상 동안 평형화시키면서 조직 배스에서 유지하였다. 연속적인 시료 처리 사이에 선행 시료의 효과를 피하기 위해 20분 동안 PSS로 조직을 완전히 세척하였다.

신경펩타이드의 정제는 후장 생분석 시스템의 차원에서 수행하였다. 생분석을 위한 적당한 PSS를 제조하기 위해 숭어의 혈장 성분을 분석하였다. 헤파린을 포함한 시린지(1½ inch needle, 6 ml syringe)를 이용하여 마취시킨 어체의 꼬리 정맥에서 혈액을 얻은 다음, 2000×g, 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 혈장의 pH는 적당한 pH 미터에서(25℃) 측정하였다. 전해질(Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, PO_4^{3-}, HCO_3^- 및 SO_4^{2-})은 각각 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - Perkin Elmer optima 3300 XL, Perkin Elmer INC., New York, USA) 및 ionic chromatography (Model 650, Alltech Associates Inc., USA)를 이용하여 측정하였다. 혈장 내 용해성 당은 비색법, 페놀-황산 분석에 따라 정량하였다. 혈장 분석은 숭어로부터 얻은 3가지 시료로 실시하였다.

실시예 5: 숭어 뇌 유래 펩타이드의 약학적 효과 조사

1. 숭어 후장 조직에 대한 흥분성 효과를 위한 Mvp-1의 역치농도

숭어의 후장 장력 변화에 대한 정제된 Mvp-1의 역치 농도는 Mvp-1의 농도별로 측정하였다(10^{-9} ~ 10^{-6} M). Mvp-1 농도가 10^{-9} M일 때, 후장에서의 장력 변화는 관찰되지 않았다. 10^{-8} M 농도에서, 후장에서 근육 긴장이 약간 증가하였다. 따라서, 후장에 대한 Mvp-1의 흥분성 효과의 역치 농도는 10^{-9} ~10^{-8} M로 밝혀졌다(도 6 참조). 유의한 흥분성 효과는 10^{-7} M의 농도에서 관찰될 수 있다. 더욱이, 10^{-8} M이상의 농도에서는 농도 의존적으로 후장 분절에서 흥분 작용을 나타내었다. 후장 분절에서 유의한 장력 변화를 생성하는 10^{-7} M농도에서 본 발명의 다른 약학적 작용을 시험하기 위해 사용하였다.

2. 숭어 후장 조직에서 흥분성효과를 위한 Mvp-1의 시간 의존적 반응

각 Mvp-1 100㎕를 조직 배스에 첨가하고 조직 농도는 생리분석에서 언급된 과정에 따라 실험하였다. Mvp-1에 대한 근육의 급속면역(tachyphylaxis) 즉, 활성물질 투여 증가에 대한 조직의 탈감작은 처리시간별로 비교하여 수행하였다. 10^{-7} M농도의 Mvp-1을 시간대별로 숭어 후장의 다른 조직 표본에 처리하였다(5분 및 30분). 그 후, 이미 언급한 조건으로 설정된 생분석 시스템에서 흥분성 효과를 시험하였다.

Mvp-1에 대한 근육의 급속면역(tachyphylaxis)을 측정하기 위해, 연속 처리 시간대별 효과를 비교하였다. 5분과 30분 간격으로 10^{-7} M의 Mvp-1를 처리하여 흥분성 효과를 비교하였다. 5분 간격으로 처리할 때 두번째와 세번째 처리 시 아무런 효과도 나타내지 않았다(도 7a). 그러나, 30분 간격으로 동일한 농도를 처리하였을 때, 각 시간대별로 흥분 작용을 나타내었다(도 7b). 이들 결과로부터, 10^{-7} M Mvp-1처리로 인해 30분 이내에 내장은 완전히 탈감작 상태로부터 복원됨을 나타내었다.

3. 숭어 다른 조직에 대한 Mvp-1의 효과

숭어의 조직별 정제된 Mvp-1의 효과는 난관(oviduct), 식도(esophagus) 및 체벽근(body wall muscle) 분절을 이용하여 실험하였다. 설정된 생분석의 조직 배스에 각 조직을 고정시키고 생분석을 위한 모든 조건은 상기에서 언급한 바와 같이 설정하였다. 조직별로 Mvp-1을 10^{-7} M농도로 첨가한 후 장력 변화를 비교하였다.

생분석 시스템을 이용하여 10^{-7} M의 Mvp-1의 숭어 조직별(난관 분절, 체벽 근육 스트립 및 식도 분절) 효과를 비교하였다. Mvp-1은 식도와 난관의 긴장을 일으켰지만 체벽 근육 스트립(body wall muscle strip)의 이완 또는 수축에는 영향을 미치지 않았다(도 8). 따라서, Mvp-1 펩타이드는 숭어의 내장과 난관에 있는 평활근의 수축에 영향을 미쳤다.

시험관내 조직 표본에서 생리분석을 통해 숭어 뇌의 아세트산추출물로부터 내장 흥분성 신경펩타이드를 동정하였기 때문에, 숭어의 시험관내 후장 표본을 유지하기 위한 적당한 배지가 필요하였다. 생화학적 생리적 기능 면에서 조직 생존능의 유지는 시험관내 조직 표본을 이용한 그들의 최적 수준에서 실험적으로 유도된 효과를 동정하기 위한 중요한 인자이다. 실제적인 관점에서, 분리된 조직의 생존능의 정도는 일차적으로 인공 혈청 또는 식염수에 달려있다. 따라서, 숭어에서 분리한 내장 표본의 시험관내 유지를 위한 선결조건은 조직의 인 시츄(in situ) 생화학적 생리적 프로세스를 보다 효과적으로 지지할 수 있는 생리 배지를 세우는 것이었다.

시험관내 생리 연구에서 일반적으로 사용되는 방법은 당해 동물의 혈장 성분과 유사한 배지를 제조하는 것이다. 따라서, 숭어의 혈장은 그것의 이온 종류, 용해성 당 및 pH를 위해 분석하였다. 혈장에서 관찰된 이온과 생화학적 프로필은 표 1에 나타내었다. 따라서, 실제 혈장 성분과 유사한 조성을 갖는 생리식염수는 표 2에 기재된 대로 실험실 수준의 화학물질을 이용하여 제조하였다. 일반적으로, 해양 무척추동물, 해양 경골어류 및 판새 어류용으로 사용되는 생리식염수는 담수의 경골어류용으로 사용되는 식염수보다 Na^+ 농도가 더 높다.

숭어 혈장은 해양 어류의 혈장보다 낮은 농도의 Na^+ 를 포함하였다. 숭어 혈장에서 Na^+ 함량이 낮은 이유는 그들의 경류성 행동양식 때문이었다. 즉, 그들은 Na^+ 농도가 해수보다 낮은 담수 또는 강어귀에서 살며, 번식을 위해 바다로 이주한다. 따라서, 숭어 성체는 0 ppt ~ 75 ppt의 염도에 내성을 가질 수 있다. 염도 변화에 대한 숭어의 적응능은 호르몬, 특히 프로락틴(담수)과 코티졸(염도가 높은 물)에 의해 조정된다. 어체의 호르몬 적응을 통해 염도 변화 시 이온 밸런스를 유지할 수 있다. 따라서, 그들의 혈장 내 이온 조성은 담수의 경골어류와 유사하다.

그러나, 경류성 어류인 전기 뱀장어(*Electrophorus electrics*)를 위해 보다 높은 Na^+ 농도를 갖는 생리 식염수를 준비하였다. 따라서, 경류성 어류 조직을 입증하는 것은 고농도 및 저농도의 Na^+ 조건에서 둘 다 잘 실시할 수 있다. 본 발명에서, 숭어의 혈장 성분과 관련하여 제조된 생리식염수는 신경펩타이드 정제 과정과 약학적 연구용 생분석의 각 단계에서 조직 배지로 사용하였다.

본 발명은 경류성 어류, 줄무늬 숭어의 뇌에서 내장 흥분성 신경펩타이드를 분리하고자 수행되었다. 상기 줄무늬 숭어 뇌에서 2종류의 생활성 펩타이드 Mvp-1 및 Mvp-2가 분리정제되었다. 그들은 숭어의 후장에 대해 흥분성 효과를 나타내었다.

자연에 존재하는 신경펩타이드의 구조를 아는 것은 그들의 합성, 행동 양식 및 기능을 측정하는데 필요하다. 신경펩타이드의 아미노산 서열은 게놈에서 해당 뉴클레오티드 서열로부터 추정될 수 있지만, 이러한 접근은 최종적으로 발현되는 신경펩타이드보다는 신경펩타이드 전구체를 번역하는 것이다. 비록 전구체에서 프로세스되는 최종 펩타이드는 일반적으로 추정되는 단백질 분해 사이트를 고려하여 예측할 수 있다 할지라도, 번역후 프로세싱은 일반적이지 않은 사이트에서 일어날 수 있고, 모든 단백질 분해 사이트가 이용되는 것도 아닐 것이다. 더욱이, 뉴클레오티드 서열은 신경펩타이드 전구체의 발달 또는 조직 특이적 프로세싱에 관한 사실을 제공하지는 않는다. 게다가, 단일 유전자는 몇몇 신경펩타이드들을 코딩할 수 있으며, 일반적인 전구체로부터 개개의 펩타이드들의 프로세싱은 발달 동안 그리고 조직 간에 다를 수 있다. 또한, 뉴클레오티드 서열로부터 번역되는 펩타이드들은 예측되는 1차 서열에 관한 정보를 나타내며, 신경펩타이드들의 활성에 필요한 구체적인 번역후 변형을 제공하지 않는다.

따라서, 본 발명에서 ESI-Q-TOF 접근은 숭어 뇌에서 분리한 내장 흥분성 펩타이드의 구조를 측정하는데 사용되었다. 지금까지, 경골어류에서 밝혀진 신경펩타이드들은 타키키닌, FMRFamides, 신경펩타이드Y, 멜라닌 집중 호르몬 및 글루카곤과 신경펩타이드(tachykinins, FMRFamides, neuropeptide Y, melanin-concentrating homones and glucagons-family neuropeptides)를 포함하여 몇 개의 신경펩타이드 과로 분류하였다. 비록 Mvp-1의 1차 구조가 SGPAGVLamide이긴 하지만, 그것이 어떤 신경펩타이드 과에 속하는지를 제공하지는 않는다.

따라서, 우리는 지금까지 경골어류에서 밝혀진 신경펩타이드 과에 따라 Mvp-1를 분류할 수 없었다. 비록, 지난 수 십년간 자연에 존재하는 신경펩타이드의 구조들이 소수의 mass spectrometric approaches를 이용하여 밝혀왔지만, 자연에 존재하는 신경펩타이드를 동정하기 위해 online nanoscale liquid chromatography (nanoLC) 및 electrospray-ionization quardrupole time-of-flight (ESI-Q-TOF)를 병합한 신경단백질분석적 접근(neuroproteomic approach)과 같은 몇몇 발전된 분광광도법 기술(spectrometry techniques)이 개발되어 왔다. 그러한 다기능의 단백질 분석 기술들은 동물체 내에 밝혀지지 않은 신경펩타이드가 수 백종 있음을 나타낸다. 예를 들어, 알려지거나 아직 알려지지 않은 약 1500개의 쥐의 뇌의 펩타이드와 그들의 단백질 단편들이 동정되었다. 또한, 이러한 새로운 접근을 이용하여 초파리 유생의 중추신경계 추출물에서 28개의 신경펩타이드가 있음을 보고한바 있다. 그들 중에서, 몇몇 신경펩타이드들은 분리된 적이 없지만 뉴클레오티드 서열 데이터로부터 예견될 수는 있다. 반면, 다른 것들은 주석이 달린 적이 없는 유전자에 의해 코딩되는 완전히 신규한 것이었다.

따라서, Mvp-1은 이전에 주석이 달린 적이 없는 유전자에 의해 코딩되는 신규한 내장 흥분성 신경펩타이드일 것이다. 더욱이, Mvp-1을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대한 설명은 구조를 위해 필요하다.

후장의 자연 수축 시 변화를 유발하기 위한 Mvp-1의 역치 농도는 10^{-9} M ~ 10^{-8} M이었다. 생활성 펩타이드 또는 신경펩타이드는 표적 조직에 있는 수용체와 높은 친화성을 가지면서 매우 효과적으로 반응하기 때문에 그들은 효과를 개시하기 위해 아주 작은 농도를 필요로 한다. Mvp-1 펩타이드가 신경전달물질 또는 신경펩타이드로 작용하여 숭어의 후장 이동을 조절하는데 관여함을 상상할 수 있다. 내장 조직에 대한 흥분성 효과를 갖기 위한 다른 동물문의 뇌 유래의 신경펩타이드의 역치 농도는 10^{-9} M ~ 10^{-7} M으로 보고되어 있다.

10^{-7} M 농도의 Mvp-1을 5분 간격으로 반복 처리할 경우, 후장 조직은 탈감작되었다. 동일한 농도의 Mvp-1을 30분 간격으로 처리한 경우 후장의 자연발생적으로 생기는 장력 변화는 상기 조직이 30분 이내에 10^{-7} M의 Mvp-1에 의해 생긴 탈감작 상태를 완전히 없앨 수 있음을 나타내는 것이다. Mvp-1은 후장에서 흥분성을 나타낼 뿐만 아니라 숭어의 난관과 식도 분절에서 흥분성 작용을 발생하였다. 비록 Mvp-1이 평활근에 대해 흥분성 효과를 나타낸다 할지라도, 어류의 체벽근에 대한 Mvp-1의 흥분성 효과는 관찰할 수 없었다. 따라서, Mvp-1은 어류의 평활근에서만 작용하는 생활성 펩타이드이다.

자연에서 존재하는 신경펩타이드의 양이 적음으로 인해, 그것의 구조를 측정하기 위해 충분한 정도의 특정 신경펩타이드를 분리하고자 하는 도전이 있어왔다. 비록 분리된 Mvp-2 시료 물질이 서열을 측정하기에는 충분하지 않았지만, MALDI-TOF mass spectrometry는 1622.73 m/z $(M+H)^+$에서 명백한 이온 피크를 나타내었다. 줄무늬 숭어에서 분리한 Mvp-2의 MALDI-TOF MS는 1622.73 m/z $(M+H)^+$에서 피크를 나타내었고, 내장의 자발적 수축에 영향을 미치기 때문에, 타키키닌과 펩타이드에 속하는 펩타이드라고 예측할 수 있다. Phe-Xaa-Gly-Leu-MetNH_2의 일반적인 아미노산 서열을 갖는 타키키닌 과의 신경펩타이드는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 대서양 대구(*Gadus morhua*)의 뇌 조직에서 분리되었다. 물질P(substance P), 뉴로키닌A(neurokinin A), 신경펩타이드 K(neuropeptide K), 및 신경펩타이드 γ(neuropeptide γ)를 포함하는 타키키닌은 주로 척추동물의 뉴런과 내분비선세포에 분포하고 있다. 어떤 연구들은 타키키

닌이 척추동물에서 심혈관 및 위장관 기능을 조절하는데 중요한 역할을 담당한다고 보고하고 있다. 또한, 타키키닌 펩타이드는 뇌 조직을 제외하고 위장관과 피부를 포함하여 다른 조직에서 분리된바 있다. 다른 척추동물에서 분리한 타키키닌의 분자량은 1000~2500Da임이 몇몇 연구들에서 입증되었다(표 3 참조).

본 발명에서, 우리는 줄무늬 숭어의 뇌에서 내장 흥분성 펩타이드를 분리하였다. Mvp-1에 상동성이 있는 신경펩타이드는 이전에 보고된바 없다. 따라서, Mvp-1은 숭어의 위장관 수축을 조절하는 신규한 신경펩타이드임을 확인할 수 있다.

[표 3]

경골 어류에서 분리한 타키키닌의 아미노산 서열

폴리펩타이드	아미노산서열																				참고문헌
Substance P	R	P	K	P	Q	Q	F	F	G	L	M										
Trout substance P	K	-	R	-	H	-	-	-	-	-	-										Jensen and Conlon, 1992
Cod substance P	K	-	R	-	-	-	-	I	-	-	-										Jensen and Conlon, 1992
Neuropeptide γ	D	A	G	H	G	Q	I	S	H	K	R	H	K	T	D	S	F	V	G	L	M	
Neurokinin A												-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Trout neurokinin A												-	-	I	N	-	-	-	-	-	-	Jensen and Conlon, 1992
Cod neurokinin A												-	-	I	N	-	-	-	-	-	-	Jensen and Conlon, 1992
Carassin-goldfish	S	P	A	N	A	-	-	T	R	-	-	-	-	I	N	-	-	-	-	-	-	Conlon et al., 1991

발명의 효과

이상, 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명 숭어뇌 유래의 내장 흥분성 신경펩타이드 및 그 분리방법은 숭어뇌 열수추출물을 동결건조한 후 이를 메탄올로 충진된 카트리지에 통과시키면서 메탄올의 농도를 달리하여 세척함으로써 각각의 메탄올추출물을 얻고 이에 대해 숭어 후장 조직에 대한 흥분성 조사를 하여 흥분성을 나타내는 메탄올추출물을 역상 HPLC 하여 정제함으로써 정제된 신경펩타이드를 분리하고 이에 대한 구조분석, 생리분석 및 약학적 효과를 조사함으로써 내장 흥분성 신경펩타이드를 제공할 수 있는 매우 뛰어난 효과가 있으므로 수산 및 의약품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1(a)은 역상 컬럼 상에서 생활성 물질의 HPLC 분리 정제의 제1단계의 크로마토그램을 나타낸 것이다. 용출은 0-60% ACN in 0.1% TFA의 직선구배로 70분동안 수행하였으며, 유속은 3.5 ml/min이었다. 생활성 분획은 흑색 수평 막대로 표시하였다.

도 1(b)은 크로마토그램에서 흑색 수평 막대에 의해 지적되는 분획의 내장 흥분성 효과를 나타낸 것이다. 화살표는 생활성 물질의 처리 시점을 나타낸다.

도 2(a)는 역상 컬럼 상에서 생활성 물질의 HPLC 분리 정제의 두번째 단계의 크로마토그램을 나타낸 것이다. 용출은 0-40% ACN in 0.1% TFA의 직선구배로 50분 동안 수행하였으며, 유속은 2 ml/min이었다. 생활성 피크는 흑색의 수평 막대로 표시하였다.

도 2(b)는 크로마토그램에서 흑색 수평 막대에 의해 지적되는 분획의 흥분성 효과를 나타낸 것이다. 화살표는 생활성 물질의 처리 시점을 나타낸다.

도 3(a)는 분석 컬럼에서 내장 흥분성 신경펩타이드의 HPLC 분리 정제의 제3단계의 크로마토그램을 나타낸 것이다. 용출은 0-40% ACN in 0.1% TFA의 직선구배로 25분동안 수행하였으며, 유속은 0.3 ml/min이었다.

도 3(b)는 Mc-1 및 Mc-2의 내장 흥분성 효과를 나타낸 것이다. 화살표는 생활성 물질의 처리 시점을 나타낸다.

도 4는 Mc-1의 일정용매조성법(the isocratic elution)에 따른 크로마토그램에 관한 것이다. 용출 조건은 26.2% ACN in 0.1% TFA이고, 유속은 0.3 ml/min이다.

도 5는 Mc-2의 일정용매조성법에 따른 크로마토그램에 관한 것이다. 용출 조건은 27.3% ACN in 0.1% TFA이고, 유속은 0.3 ml/min이다.

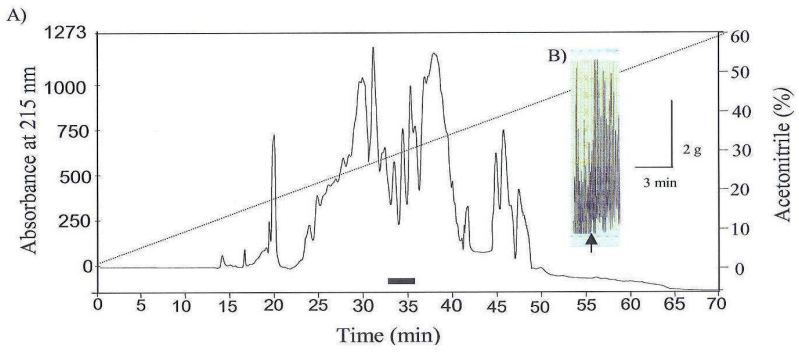
도 6은 숭어에서 분리한 후장 표본에서 Mvp-1의 농도별 흥분성 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 숭어의 후장 분절에서 10^{-7} M 농도의 Mvp-1을 처리한 후 흥분성 효과를 나타낸 것이다. (a)는 5분 간격으로, (b)는 30분 간격으로 처리한 것을 나타내고, 3개의 다른 조직 표본에서 관찰한 결과를 나타낸다.

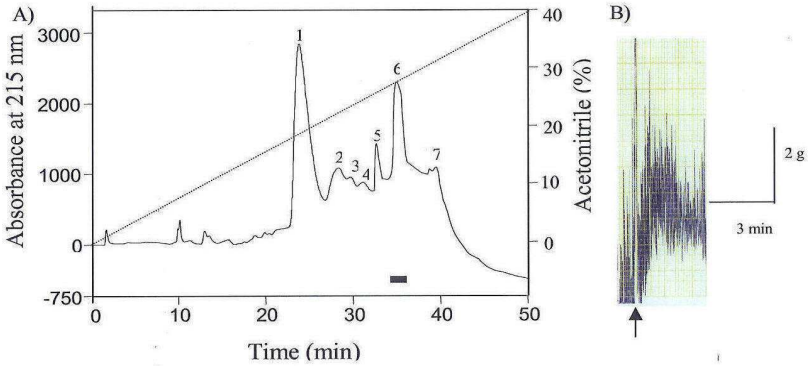
도 8은 숭어의 다른 조직에서 10^{-7} M 농도의 Mvp-1을 처리한 후 흥분성 효과를 나타낸 것이다. (a)는 난관 분절, (b)는 체벽근 스트립, (c)는 식도 분절이다.

도면

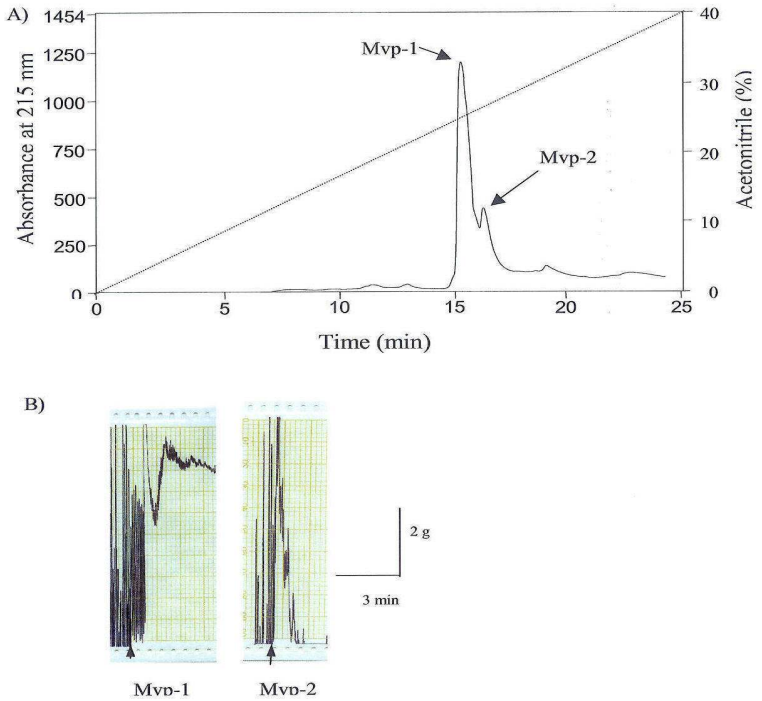
도면1



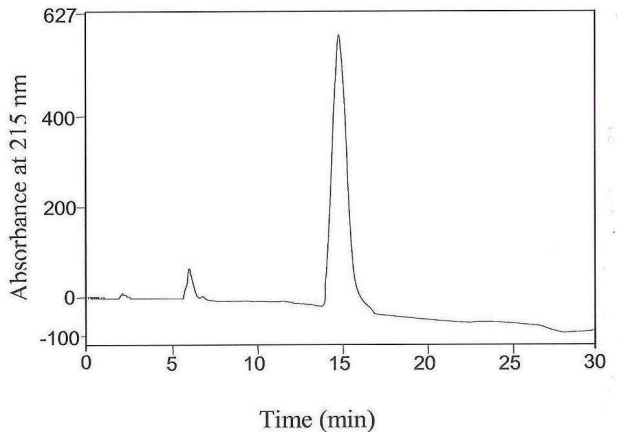
도면2


A)
Absorbance at 215 nm
3000
2000
1000
0
-750
0
10
20
30
40
50
Time (min)
40
30
20
10
0
Acetonitrile (%)
1
2
3
4
5
6
7
B)
2 g
3 min

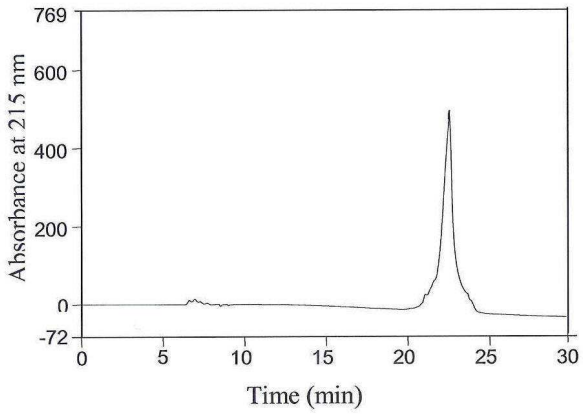
도면3


A)
Absorbance at 215 nm
1454
1250
1000
750
500
250
0
0
5
10
15
20
25
Time (min)
40
30
20
10
0
Acetonitrile (%)
Mvp-1
Mvp-2
B)
2 g
3 min
Mvp-1
Mvp-2

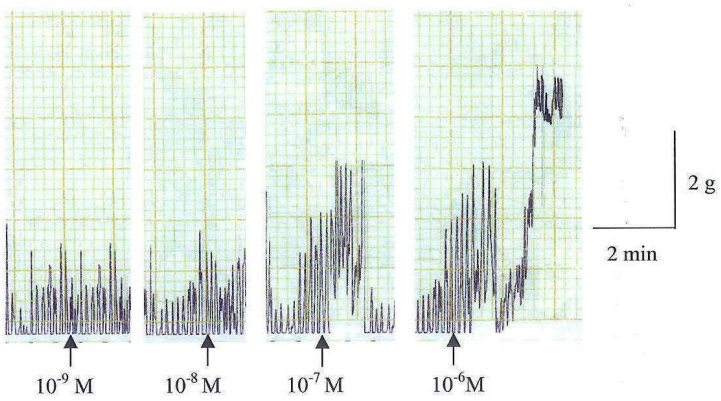
도면4


Absorbance at 215 nm
627
400
200
0
-100
0
5
10
15
20
25
30
Time (min)

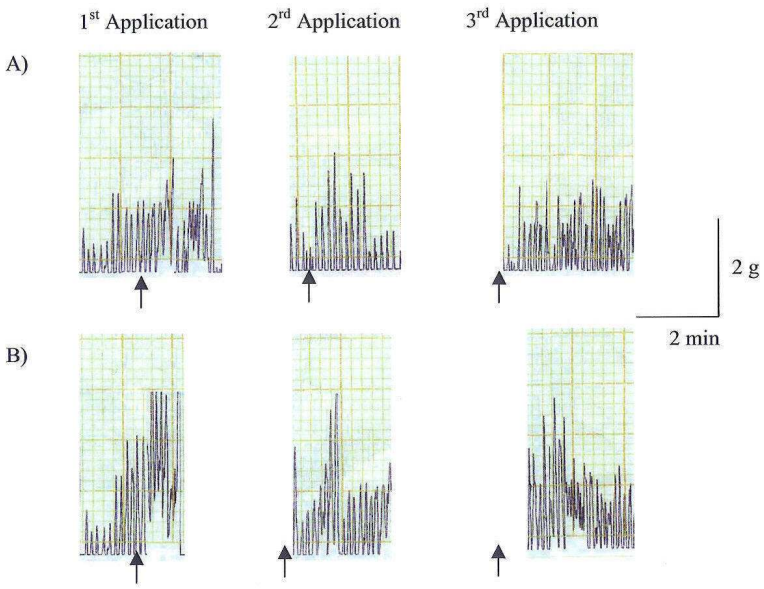
도면5


769
600
400
200
0
-72
Absorbance at 215 nm
0
5
10
15
20
25
30
Time (min)

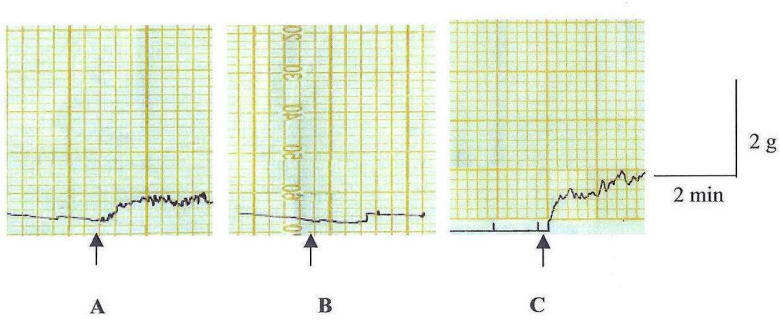
도면6


2 g
2 min
10-9 M
10-8 M
10-7 M
10-6M

도면7


1st Application
2rd Application
3rd Application
A)
B)
2 g
2 min

도면8



서열목록

서열목록 전자파일 첨부