J. Korean Fish. Soc. 30(2), 244~251, 1997 한수지, 30(2), 244~251, 1997

Neuropeptide γ 의 구조 및 생리활성

구희정 · 서정길 · 김은희* · 허민도* · 정준기* · 박장수** · 강신원** · 박남규
부경대학교 수산과학대학 생물공학과, *어병학과, **부산대학교 자연과학대학 화학과

Conformation and Biological Activity of the Neuropeptide γ

Hee-Jung Ku, Jung-Kil Seo, Eun-Hi Kim*, Min-Do Huh*, Joon-Ki Chung*, Jang-Su Park, Shin-Won Kang** and Nam Gyu Park**

*Department of Biotechnology and Bioengineering, *Department of Fish Pathology, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

***Department of Chemistry, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

The relationship between structure and biological activity was studied on the three neuropeptides (mammalian-, trout- and goldfish-neuropeptide γ) that were syntheized by the solid-phase method. Circular dichroism spectra showed that mammalian-, trout- and goldfish-neuropeptide γ adopted an unordered structure in buffer solution. In the presence of neutral and acidic liposomes, mammalian- and trout-neuropeptide γ also took a random structure. However, goldfish-neuropeptide γ took an α-helical structure in acidic liposomes. The intestinal motility response was investigated with carp intestines, guinea-pig ileums and rat duodenums. In case of carp intestine, contractile activity was as follows : goldfish-neuropeptide γ ≃ trout-neuropeptide γ > mammalian-neuropeptide γ. On the other hand, the contractile activity of mammalian-neuropeptide γ was more potent than trout- and goldfish-neuropeptide γ in the guinea-pig ileums and rat duodenums. These results suggest that neuropeptide γs show the species-specific activity.

Key words : tachykinin, neuropeptide γ, solid-phase peptide synthesis, circular dichroism, contractile activity

서 론

Tachykinin 펩타이드는 1931년 von Euler and Gaddum (1931)에 의해 최초로 발견된 신경성 펩타이드로서 말초 및 중추신경계에 광범위하게 존재한다. 이러한 tachykinin 펩타이드는 substance P를 최초로 하여 neurokinin A, B가 포유동물을 비롯하여 조류, 양서류 및 어류로부터 발견되었으며 (O'Harte et al., 1991), 이들은 C-말단에 5개의 보존된 공통 아미노산배열 (-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH_2)을 가진다. 현재 substance P (SP), neurokinin A (NKA) 및 neurokinin B (NKB)에 감수성이 있는 세 종류의 수용체 (각각 NK_1, NK_2, NK_3 receptors)가 분류되어, 각각에 대한 subtype의 존재도 밝혀졌다 (Maggi et al., 1993). 이들은 평활근 (혈관평활근 제외)에 대해 강한 수축작용을 나타내며, 혈관확장 및 분비촉진 등의 다양한 생리작용을 갖는다 (Osakata et al., 1986; Murry et al., 1987).

토끼의 소장 (Kage et al., 1988)과 rat의 뇌 및 소화장관으로부터 (Takeda et al., 1990) 아미노산 21개로 구성되고 C-말단이 아미드화된 새로운 tachykinin인 neuropeptide γ (NPγ)가 정제되었다. 또한 포유동물의 NPγ와 구조적으로 유사한 tachykinin이 goldfish (*Carassius auratus*)의 뇌 (Conlon et al., 1991), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 및 hammerhead shark (*Sphyrna lewinini*)의 장관, bowfin (*Amia calva*)의 위로부터 정제되어 각각 그들의 일차구조가 밝혀졌다 (Jensen et al., 1993; Waugh et al., 1995a; Waugh et al, 1995 b). 포유류의 NPγ와 어류의 NPγ간의 아미노산 조성을 비교해보면 goldfish-NPγ (G-NPγ)와 trout-NPγ (T-NPγ)는 mammalian-NPγ (M-NPγ)와 약 57%, shark-NPγ 및 bowfin-NPγ는 약 50%의 유사성을 가지고 있다. 이러한 M-NPγ (mammalian-NPγ)는 NK_1, NK_2 수용체가 동시에 존재하는 rat 십이지장에 대해 강한 수축활성을 나타내었지만, 생리적 특이성은 아직 밝혀져 있지 않다 (Rahman et al., 1994). 또한 다른 실험동물에 대한 장관 수축활성 및 어류성 NPγ에 대한 연구는 거의 전무한 상태이며 NPγ에 대한 이차구조의 연구는 아직 보고되어 있지 않다. 그러므로 본 연구에서는 circular dichroisin (CD) spectra를 사용하여 완충액, 중성 및 산성지질하에서 합성한 세 종류의 NPγ들의 이차구조를 조사하고, 아울러 합성 펩타이드들의 활성과 구조간의 상관 관계를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 일반시약

펩타이드 합성에 사용한 Fmoc-아미노산 유도체인 Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg (Pmc)-OH, Fmoc-Asn (Trt)-OH, Fmoc-Asp (OtBu)-OH, Fmoc-Gln (Trt)-OH, Fmoc-Glu (OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His (Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser (OtBu)-OH, Fmoc-Thr- (OtBu)OH, Fmoc-Val-OH와 Fmoc-NHSAL-resin, N, N-Dimethylforamide (DMF), Piperidine, 1-hydroxybenzotriazole (HOBT), DIPCI 및 Trifluoroacetic acid (TFA)는 Watanabe Chemical Industries, LTD., Hiroshima에서 구입하였다. 1,2-Ethanedithiol, m-cresol과 thioanisol은 Wako Pure Chemical Industries, Osaka에서 구입하였으며, egg-yolk phosphatidylcholine (EYPC)와 egg-yolk phosphatidylglycerol (EYPG)는 Sigma Chemical Co., St. Louis에서 구입하였다.

2. 실험동물

Carp (*Cyprinus carpio*)는 부경대학교 부속양어장에서 분양받은 평균체중 600~800 g의 암수를 사용하였다. 평균수온 20℃의 순환여과식 수조에서 15일 이상 순치한 후 실험에 이용하였다. 또다른 실험에서는 체중 250~300 g의 Hartly계 웅성 guinea-pig과 Wistar계 웅성 rat을 사용하였다. 사육은 명암 12시간 주기로 실온 24±2℃의 동물사육실에서 행하였다.

3. Neuropeptide 가의 합성 및 정제

M-NPγ, T-NPγ 및 G-NPγ는 Milligen 9050 Peptide Synthesizer를 사용하여 Fmoc-NHSAL-resin으로부터 Fmoc-법에 따라 합성하였다. 모든 보호기와 resin을 제거하기 위하여 2시간 동안 TFA/thioanisole/ethanedithiol/m-cresole (20 : 5 : 3 : 1) 처리한 후, 얻어진 펩타이드는 10% 초산에 용해시켰다. 계속해서 Sephadex G-25로 정제한 후 0.1% TFA를 함유하는 water-acetonitrile의 gradient system으로 HPLC (a Waters 600 system with ODS column, 3.9×300 mm)를 행하였다. 아미노산 분석은 Jasco HPLC amino acid analysis system으로 행하였으며, 110℃에서 24시간 동안 5.7 M HCl로서 펩타이드를 가수분해한 후 FP-210 spectrofluorometer로서 분석하였다.

분자량은 JEOL SX-102A의 Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS)에 의해 결정하였으며, M-NPγ, T-NPγ 및 G-NPγ의 FAB-MS data는 각각 다음과 같다 : M-NPγ; base peak, 2320.7, $CH_{159}O_{29}N_{34}S$, 2321.1, T-NPγ; base peak, 2383.8, $C_{103}H_{175}O_{28}N_{35}S$, 2384.1, G-NPγ; base peak, 2367.9, $C_{103}H_{175}O_{27}N_{35}S$, 2368.1. 고상합성의 진행순서는 Table 1에 나타냈다.

4. Liposome의 조제

Small unilamellar vesicles (SUVs)는 다음과 같이 조제했다. SUVs는 각각 중성 및 산성지질로서 EYPC, EYPC-EYPG (3 : 1)로 조성된 지질로 만들었다. 인지질 (20 mg, 약 25 mmol)을 $CHCl_3$/MeOH에 녹이고, conical tube 내에서 질소로 건조시켰다. 건조된 인지질은 Kaijo Denki ultrasonic disrupter model T-A-4280을 사용하여 50℃에서 30분간 반복하여 교반한 후, 150 mM NaCl이 포함된 5 mM TES (N-Tris (hydroxy- methyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid) 완충액 (pH 7.4) 2 ml를 넣어 수화하여 CD 측정에 사용하였다.

5. Circular Dichroism (CD) spectra

1 mm pathlength의 quartz cell을 사용하는 JASCO J-600 spectropolarimeter로 CD spectra를 측정하였다. Spectra는 150 mM NaCl이 포함된 5 mM TES 완충액 (pH 7.4) 존재 하에서 100 mM의 펩타이드로 측정하였다. 중성지질인 EYPC와 산성지질인 EYPC-EYPG (3 : 1) liposome 존재하에서 펩타이드는 0.9 mM phospholipid liposome을 포함하는 5 mM TES 완충액 (pH 7.4)에 용해시켰다. α-helical 함유량는 Pouny and Shai (1992)의 방법을 사용하여 다음의 식으로부터 계산하였다.

Table 1. Program for solid-phase peptide synthesis

	Reagent	Operation	Mix time/min
1	DMF	3×Washing	3
2	20% piperidine/DMF	2×Deprotection	3
		1×Deprotection	20
3	DMF	6×Washing	1
	Fmoc−amino acid		
4	HOBT (2.5 mmol equiv each)/DMF	mix	
5	DIPCI in DMF	Coupling	90
6	DMF	3×Washing	1

$fh = ([\theta]_{222} - [\theta]^{0}_{222})/([\theta]^{100}_{222})$

$[\theta]_{222}$, 실험적으로 얻어진 평균 residue;$[\theta]^{0}_{222}$와 $[\theta]^{100}_{222}$는 각각 222 nm에서 측정한 0%와 100%의 helical 함유량 (2,000과 30,000 deg · cm^2 · $dmol^{-1}$)의 값이다.

6. Longitudinal muscle preparation

1) Carp (*C. carpio*) intestine

실험어의 중추신경을 절단하여 복부를 절개한 후 gastrointestinal tract을 적출하였다. 절취장관은 각각 1.5 cm 길이로 단편을 낸후, 입체현미경 하에서 결체조직을 제거하고 longitudinal muscle strips을 벗겨 내었다. 사용한 Ringer solution의 조성은 다음과 같다 : (mM), NaCl 100.8, KCl 2.5, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.1, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, Glucose 11.1. 이러한 용액은 95% O_2 + 5% CO_2 혼합가스로 포화시킨 후 20℃로 일정하게 유지하였다.

2) Guinea-pig ileum

Albino Hartly guinea-pig을 decapitation하여 복부를 절개한 후 맹장에 인접한 ileum을 절취한 후 longitudinal muscle strips을 만들었다. 이 장관조직에 사용한 Kreb's buffer의 조성은 다음과 같다 : (mM), NaCl 127.0, KCl 2.5, $CaCl_2$ 1.8, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, Glucose 10.0. 이 용액은 37℃로 일정하게 유지시키고 organ bath 내에 조직을 고정시켰다.

3) Rat duodenum

Albino Winstar rat을 decapitation하여 복부를 절개한 후 위장 아래 유문괄약근으로부터 십이지장을 절취한다. Guinea-pig ileum과 같은 방법으로 longitudinal muscle strips을 만들어 37℃로 유지된 organ bath에 조직을 고정시켰다. 이 장관 조직에 사용한 Kreb's buffer의 조성은 다음과 같다 : (mM), NaCl 118.7, KCl 4.7, $CaCl_2$ 1.8, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 24.8, Glucose 10.1.

7. 장관 수축 활성

장관수축 실험을 위해 organ bath 내에 carp, rat 및 guineapig의 장관조직을 아래쪽말단은 지지봉에 연결시키고, 위쪽말단은 myograph force transducer (Narco F-60, Narco Biosystems Inc., U. S. A.)에 연결하였다. 1.0 g의 resting tension을 걸고 1시간 동안 안정화시킨 muscle strips에 펩타이드를 투여하고 수차례 씻은 후 20분간 안정화시켰다. 수축반응은 cholinergic receptor agonist인 carbachol에 대한 상대적인 수축 %로서 나타내었으며, ED_{50} (-Log[최고 수축의 50%를 나타낼 때의 농도])및 Emax (최고수축 %)로서 비교하였다.

Table 2. Amino acid compositions of synthesized M-NP, T-NPγ and G-NPγ in 5.7N-HCl

Amino acid	Mammalian-NPγ	Trout-NPγ	Goldfish-NPγ
Asx	1.3 (2)	1.8 (2)	–
Ala	1.0 (1)	1.0 (1)	2.8 (2)
Gly	2.3 (3)	1.0 (1)	1.2 (1)
His	1.8 (3)	1.0 (1)	1.4 (1)
Glx	0.6 (1)	0.6 (1)	1.1 (1)
Ile	0.6 (1)	1.8 (2)	2.6 (2)
Ser	2.0 (2)	2.4 (3)	2.3 (2)
Lys	1.2 (2)	1.8 (2)	2.8 (2)
Arg	0.5 (1)	1.6 (2)	2.5 (2)
Thr	0.7 (1)	0.8 (1)	1.1 (1)
Phe	0.6 (1)	0.5 (1)	1.2 (1)
Val	0.7 (1)	0.9 (1)	1.4 (1)
Leu	0.7 (1)	0.9 (1)	1.4 (1)
Met	0.0 (1)	0.0 (1)	0.0 (1)
Pro	–	1.0 (1)	1.0 (1)

Acid hydrolysis was performed 6N-HCl at 110℃ for 22 hr in the presence of 2% phenol. Number in parentheses are theoretical value.

Table 3. Amino acid sequences of neuropeptide γ series

Mammalian-NPγ	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH_2
Goldfish-NPγ	Ser-Pro-Ala-Asn-Ala-Gln-Ile-Thr-Arg-Lys-Arg-His-Lys-Ile-Asn-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH_2
Trout-NPγ	Ser-Ser-Ala-Asn-Pro-Gln-Iln-Thr-Arg-Lys-Arg-His-Lys-Iln-Asn-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH_2

결 과

1. CD 연구

고상합성법에 의해 합성된 펩타이드들의 아미노산조성을 확인하기 위해 아미노산분석 결과, 그 측정치와 이론치가 잘 일치하였으며 (Table 2), 아미노산 서열은 Table 3에 나타내었다. 합성한 세 종류의 NPγ들의 이차구조를 알아보기 위해 TES 완충액, 중성지질 및 산성지질하에서 CD spectrum을 측정하였다 (Fig. 1).

TES 완충액 하에서 세 종류의 펩타이드는 모두 200 nm에서 negative maximum을 지나는 전형적인 random coil 형태를 취했다 (Fig. 1A). 중성지질하에서도 M-NPγ 및 T-NPγ는 여전히 random 구조를 취했다. 그러나 G-NPγ의 경우 M-NPγ 및 T-NPγ와 달리 222 nm에서 약간의 변화를 보였고, G-NPγ의 α-helical 함유량은 약 7% 이었다 (Fig. 1B). 한편, 산성지질 하에서 M-NPγ 및 T-NPγ는

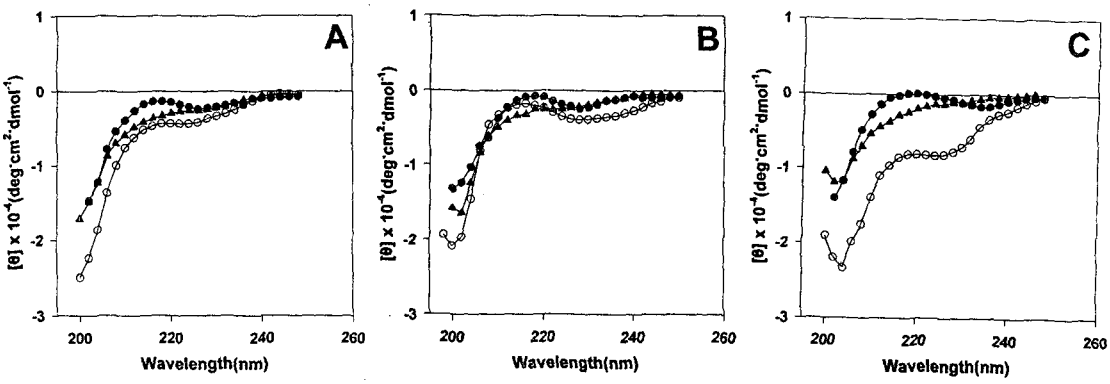

Fig. 1. CD spectra of M-NPγ, T-NPγ, G-NPγ in TES buffer (A) in the presence of EYPC liposomes (B) and EYPC-EYPG (3 : 1) liposomes (C). M-NPγ (●), T-NPγ (▲), and G-NPγ (○). Peptide and lipid concentrations are 0.1 and 1 mM, respectively.

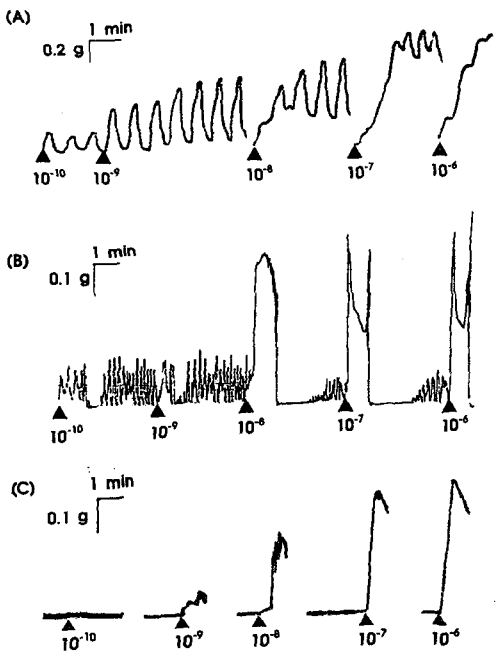

Fig. 2. Typical tracings illlustrating the contractile response of the carp intestine (A), guinea-pig ileum (B) and rat duodenum (C) to neuropeptide γ.

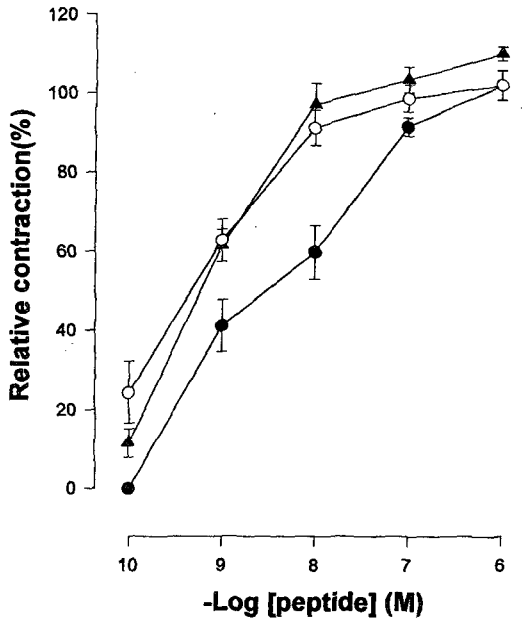

Fig. 3. Concentration-response curves to neuropeptide γs (NPγs) induced contraction (n=6) in carp intestine: M-NPγ (●), T-NPγ (▲), G-NPγ (○). Contractile effects expressed as% the maximal response to carbachol, 5×10^{-7} M.

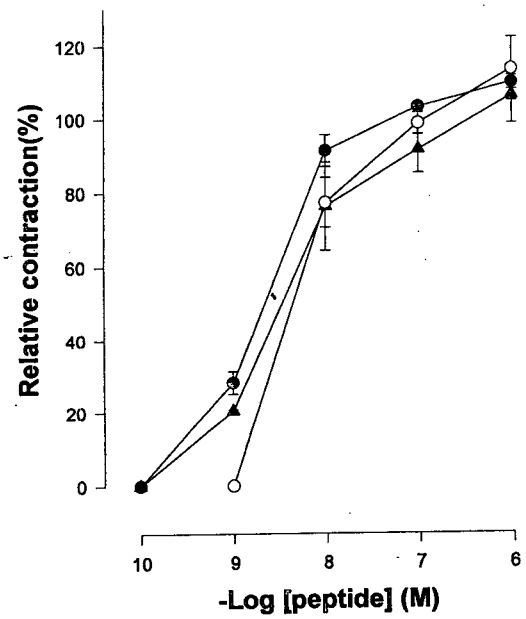

Fig. 4. Concentration-response curves to neuropeptide γs (NPγs) induced contraction (n=3) in guinea-pig ileum: M-NPγ (●), T-NPγ (▲), GγNP (○). Contractile effects expressed as% the maximal response to carbachol, 5×10^{-8} M.

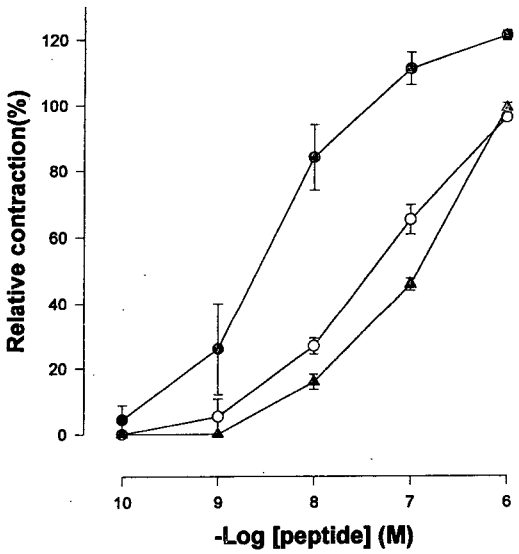

Fig. 5. Concentration-response curves to neuropeptide γs (NPγs) induced contraction (n=6) in rat duodenum: M-NPγ (●), T-NPγ (▲), G-NPγ (○). Contractile effects expressed as% the maximal response to carbachol, 5×10^{-7} M.

완충액과 중성지질에서와 유사하게 주로 random한 구조를 취했으나, G-NPγ는 α-helix의 전형적 특징인 205 nm와 222 nm 부근에서 double minimum을 나타내었다 (Fig. 1 C). 그리고, 산성지질에서의 G-NPγ의 α-helical 함유량은 약 12%로 중성지질보다 α-helical 함유량이 증대되었다.

2. 장관 수축 활성 연구

Carp, guinea-pig 및 rat의 장관에 대한 M-NPγ의 전형적인 수축양상은 Fig. 2에 나타내었다. M-NPγ는 carp 및 guinea-pig의 조직에 대하여 10^{-9} M에서 역치값을 나타내었으며, rat duodenum에서는 10^{-10} M에서 역치값을 나타내었다. 모든 NPγ는 10^{6} M까지 투여하였고 수축반응은 농도의존적으로 증가하였다. 이러한 반응결과는 carbachol의 최대반응을 100%으로 하여 상대적인 수축 %으로서 나타내었는데 carp 장관에 대한 NPγ들의 농도의 존곡선은 Fig. 3에 나타내었다.

Carp 장관에 대해 M-NPγ는 10^{-9} M에서 41.2%, T-NPγ 및 G-NPγ는 10^{-10} M에서부터 각각 11.6%, 24.4%의 수축을 나타내기 시작하여 농도가 증가함에 따라 NPγ의 수축반응은 증가하였다. 또, ED_{50} 값은 G-NPγ > T-NPγ > M-NPγ의 순서로 어류성 NPγ가 포유류인 M-NPγ보다 더 우세한 수축활성을 나타내었다.

Guinea-pig ileum에 있어서 NPγ에 의해 유도되는 농도의존곡선은 Fig. 4에 나타내었다. M-NPγ 및 T-NPγ의 수축작용은 10^{-9} M에서 각각 28.1%, 20.4%이었으며, G-NPγ는 10^{-8} M에서 77.1%의 수축을 나타내기 시작하여 농도가 증가함에 따라 NPγ의 수축반응은 증가하였다. Guinea-pig ileum에 대한 NPγ들의 ED_{50}값은 carp의 경우와는 달리 M-NPγ> T-NPγ ≃ G-NPγ의 순서였다.

Fig. 5는 rat duodenum에 대한 NPγ의 농도의존곡선이다. Rat에 대해서는 M-NPγ > G-NPγ ≃ T-NPγ의 순으로 반응이 나타났다. M-NPγ는 10^{-10} M에서 역치값을 나타내었으나 G-NPγ는 10^{-9} M에서 약 5%, T-NPγ는 10^{-8} M에서 약 16%의 역치값을 나타내었다. 각 장관 조직에 대한 ED_{50} 및 Emax 값은 Table 4에 나타내었다. ED_{50}으로 비교했을 때 carp에서는 G-NPγ가 3.6×10^{-9} M로서 가장 활성이 뛰어났으며, guinea-pig 및 rat에서는 M-NPγ가 2.1×10^{-9} M, 3.0×10^{-9} M로 가장 효과적이었다. 한편, Emax의 경우, 어류 장관에 있어서는 그들간의 현저한 차이는 없으나 어류의 장관에 대해서는 어류성 NPγ가, 포유류 장관에 있어서는 포유류성 NPγ가 높은 수치를 나타내었다.

고 찰

최근 hormone 펩타이드에 대한 구조-활성간의 상관관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Williams and Weaver, 1990; Rolka et al., 1986; Wu and Yang, 1983; Woolley and Deber, 1987; Schwyzer et al., 1990; Young et al., 1994). CD 및 Raman spectrum에 의하면 SP는 완충액 조건하에서 random 구조를 취하지만 trifluoroethanol (TFE) 또는 지질 존재하에서는 부분적으로 α-helix 구조를 취한다. 이러한 구조적변화는 수용체와 SP간의 상호작용 뿐만아니라 생리활성에 중요한 역할을 담당하고 있다고 여겨진다.

구조적으로 유사한 M-NPγ, T-NPγ 및 G-NPγ간의 아미노산 서열의 상동성을 조사한 결과, 이들 세 종류의 tachykinin은 약 57% 유사성을 보였다. Table 3에서 나타낸 바와 같이 C-말단에서는 아미노산 서열이 잘 보존되어 있으나 N-말단에서 약간의 변화를 가진다. 이러한 변화는 계통발생학적 측면에서 고려해볼 때 진화에 기인된 것 같다. 따라서 이들 세 종류의 이차구조를 조사하기 위해 CD spectra를 사용하여 완충액, 중성 및 산성지질하에서 그들의 구조변화를 측정하였다 (Fig. 1A~C). M-NPγ 및 T-NPγ는 거의 모든 환경하에서 random 구조를 취했다. 그러나 G-NPγ는 중성지질하에서 M-NPγ와 T-NPγ와는 다르게 222 nm 부근에서 약간의 변화를 나타내었으며 이것은 random한 구조로부터 부분적인 α-helix로의 변화를 의미한다. 한편, 산성지질하에서 G-NPγ는 α-helix의 전형적인 특징인 205 nm, 222 nm에서 double minimum을 나타내고, 약 12%의 helix 함유량을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 보아 M-NPγ 및 T-NPγ는 모든 조건하에서 random한 구조를 취하며, 지질과 정전기적 및 소수성 상호작용에 의한 구조변화는 일어나지 않는 것 같다. 또한 G-NPγ는 중성지질에서보다 산성지질에서 α-helix 구조를 형성하는 능력이 증대되었기 때문에, 이러한 구조적 변화는 산성지질의 negative charge와 G-NPγ에 존재하는 positive charge간의 정전기적 상호작용이 크게 작용하고 있다는 것을 암시하고 있다. Chou-Fasman법 (Chou & Fasman, 1978)을 사용하여 G-NPγ의 이차구조를 해석한 결과, G-NPγ는 5~14위의 아미노산들이 α-helix를 취할 가능성이 높다고 나타냈다 (Conlon et al., 1991). 따라서 산성지질하에서 G-NPγ의 구조적변화는 Chou-Fasman의 예측법에 의한 결과와 부분적으로 일치한다는 것을 나타낸다.

펩타이드 4_3, Ac-(L-Leu-L-Ala-L-Arg-L-Leu)$_3$-NHCH$_3$, 은 양친매성 α-helical 구조를 취하며, 항균활성을 가진 염기성 모델 펩타이드이다 (Lee et al., 1986). α-helix breaker로 잘 알려진 proline을 4_3의 2번 위치, 2번과 6번 위치 및 2, 6, 10번째 위치에 치환한 유도체를 합성하여 이차구조의 변화 및 항균활성을 관찰한 결과, ^{2}Pro-4_3의 이차구조와 활성은 4_3의 그것들과 유사하였으며, proline의 수가 증가할수록 α-helix 함유량과 항균활성이 감소되었다 (Park et al., 1989). 이러한 결과로 미루어 보아 ^{2}Pro-4_3의 경우 치환된 proline은 α-helix 형성에 있어 helix breaker로 작용하지 않는다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서 사용한 세 종류의 NPγ에 있어서, G-NPγ만이 산성지질하에서 부분적인 NPγ의 N-말단의 아미노산 서열을 비교해 보면 다음과 같다. 우선 M-NPγ는 N-말단 3번째 및 5번째 위치에 glycine이, T-NPγ는 5번째 위치에 proline이, G-NPγ는 2번째 위치에 proline이 존재한다. 다시 말해서 G-NPγ에 비해 M-NPγ는 N-말단에 helix breaker의 수가 많으며, 또한 T-NPγ는 N-말단의 중앙부분에 proline이 존재하기 때문에 M-NPγ 및 T-NPγ는 G-NPγ보다 α-helix 형성능력이 부족한 것 같다. 따라서 산성지질하에서 구조적 변화는 N-말단의 영역이 결정적 역할을 하고 있는 것 같다. 이와 같이 G-NPγ가 다른 두 NPγ에 비해 α-helix 구조를 취하기 용이하다는 것은 Park et al. (1989)의 연구결과와 연관 지을 수 있다.

Table 4. ED50 (95% confidence limits in brackets) and Emax (expressed as % of the maximal response to carbachol, 5 가 10-7 M) of M-NPγ, T-NPγ and G-NPγ induced contraction in the carp intestine (n=6), guinea-pig ileum (n=3) and rat duodenum (n=3)

	Carp intestine		Guinea-pig ileum		Rat duodenum	
	ED_{50}	Emax	ED_{50}	Emax	ED_{50}	Emax
Mammalian -NPγ	2.3×10^{-8}	102.1 (3.71)	2.1×10^{-9}	109.4 (1.89)	3.0×10^{-9}	121.2 (1.53)
Trout-NPγ	6.5×10^{-9}	110.1 (1.76)	3.0×10^{-9}	106.0 (7.65)	2.6×10^{-8}	96.1 (0.61)
Goldfish-NPγ	3.6×10^{-9}	102.1 (3.91)	4.4×10^{-9}	113.1 (8.35)	3.0×10^{-8}	99.1 (1.56)

Number in parentheses are standard error.

또한, 이러한 구조연구와 생리활성간의 상관관계를 고찰하기 위해 실험동물을 사용하여 장관 수축활성을 조사하였다. Guinea-pig ileum의 longitudinal muscle에는 NK_2 수용체보다 NK_1 수용체가 많이 존재하는데 (Petitet et al., 1992), 이 조직에 대하여 M-NPγ가 ED_{50}에 있어 가장 우세했으나, Emax의 경우 G-NPγ가 가장 높은 값을 나타내었다. 또한 rat duodenum은 NK_2 수용체가 NK_1 수용체 보다 많이 존재하며 (Burcher et al., 1984), guinea-pig ileum에서와 마찬가지로, M-NPγ가 T-NPγ 및 G-NPγ보다 ED_{50} 및 Emax값이 높았다. M-NPγ가 guinea-pig ileum 및 rat duodenum에서 높은 수축활성을 나타낸것은 NK_1 및 NK_2 수용체에 동시에 작용한다는 이전의 연구 (Rahman et al., 1994)와 유사한 결과를 보여주고 있다.

한편 carp intestine에 대한 이전의 연구는 NK_1 수용체의 존재를 제시하였다 (Kitazawa et al., 1988a; Kitazawa et al., 1988b). Carp에 대해 ED_{50}은 G-NPγ가, Emax는 T-NPγ가 대체적으로 높은활성을 나타내었고, M-NPγ는 낮은활성을 나타내었다 (Table 4). Table 4에서 나타낸 값을 토대로 진화학적인 면에서 고찰해 볼 때 포유류의 장관에 존재하는 수용체는 포유류의 NPγ와 결합부위가 유사하다고 생각되며, carp의 장관에 대해서는 trout이 진화상 carp에 가깝다고 생각된다.

CD spectra 결과에서 M-NPγ와 T-NPγ는 모든 환경하에서 유사한 구조를 취하고 있지만 포유류의 장관에 대해서는 M-NPγ가, 어류의 장관에는 G-NPγ가 가장 높은 수축활성을 나타내었다. 그러나 CD spectrum 만으로는 이들간의 이차구조를 명확히 해석할 수가 없었다. 따라서 M-NPγ와 T-NPγ간의 수축활성과 구조와의 상관관계를 더 상세하게 알아보기 위해 FT-IR (Fourier transform-infrared)을 사용하여 M-NPγ와 T-NPγ의 이차구조를 측정하였다 (data not shown). CD spectrum에서 random 구조를 취하는 M-NPγ 와 T-NPγ를 FT-IR을 사용하여 중성 및 산성 지질 조건 하에서 측정한 결과, M-NPγ가 T-NPγ보다 α-구조 및 loop 영역을 더 많이 함유하고 있었다. 이러한 차이점이 guinea-pig ileum 및 rat duodenum에 대해 M-NPγ와 T-NPγ가 활성의 차이를 나타내는 것으로 사료된다. 이러한 결과들을 바탕으로, NPγ들과 carp, guinea-pig 및 rat의 장관에 존재하는 수용체들 간의 가상적인 작용 메카니즘을 유추해 보면, carp의 수용체는 산성 지질 하에서 helix 구조를 취하는 G-NPγ가 불규칙 구조를 취하는 M-NPγ 또는 T-NPγ보다 더 특이적으로 작용하는 것 같다. 그러나 guinea-pig ileum 및 rat duodenum의 수용체에는 부분적으로 helix를 취하는 G-NPγ보다 오히려 random 구조와 β 구조로 혼합된 M-NPγ가 더 결합하기 쉬운 것 같다.

요 약

생리활성을 지닌 신경펩타이드의 구조와 활성간의 관계를 규명하기 위하여 고상법으로 합성한 세 종류의 neuropeptide γ (mammalian-, trout- 그리고 goldfish-neuropeptide γ)를 사용하여 연구하였다. Circular dichroism spectra에 의하면 mammalian-, trout-와 goldfish-neuropeptide γ는 완충액 조건하에서 모두 random한 구조를 나타내었다. 중성 및 산성 지질 존재 하에서, mammalian-과 trout-neuropeptide γ는 여전히 random한 구조를 취했다. 그러나, goldfish-neuropeptide γ는 중성 및 산성지질 하에서 부분적으로 α-helix 구조를 나타내었다. 장관 수축활성에 있어서는 carp 장관, guinea-pig 회장 그리고 rat 십이지장에 대하여 비교하였다. Carp에 대해서는 goldfish-neuropeptide $\gamma \simeq$ trout-neuropeptide $\gamma >$ mammalian- neuropeptide γ 순으로 활성이 나타났다. 그러나, guinea-pig 회장과 rat 십이지장에 대해서 mammalian-neuropeptide γ는 어류 유래성 neuropeptide g들 보다 높은 수축활성을 나타내었다. 이러한 결과들은 neuropeptide γ들이 종-특이적인 활성을 나타낸다는 것을 제시한다.

감사의 말씀

본 연구는 '95년도 한국과학재단 핵심연구비 (KOSEF : 951-0605-029-1) 및 '95년도 교육부 학술연구조성비 (수산해양과학)에 의하여 연구되었슴.

참 고 문 헌

Burcher, E., C. W. Shults, S. H. Buck, T. N. Chase and T. L. O'Donohue. 1984. Autoradiographic distribution of substance K binding sites in rat gastrointestinal tract: a comparison with substance P. European J. Pharmacol., 102, 561.

Chou, P. Y. and G. D. Fasman. 1978. Empirical predictions of protein conformation. Annu. Res. Biochemistry, 47, 251~276.

Conlon, J. M., F. O'Harte, R. E. Peter and O. Kah. 1991. Carassin: A tachykinin that is structurally related to neuropeptide-γ from the brain of the goldfish. J. Neurochem., 56, 1432~1436.

Jensen, J. K., R. Olson and J. M. Conlon. 1993. Primary st-

ructures and effects on gastrointestinal motility tachykinins from the rainbow trout. Am. J. Physiol., 265, R 803~R810.

Kage, R., G. P. McGregor, L. Thim and J. M. Conlon. 1988. Neuropeptide-γ: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from γ-preprotachykinin., J. Neurochem. 50, 1412~1417.

Kitazawa, T., H. Kondo and K. Temma. 1988. Presence of a substance P-like peptide in an acid extract of the intestinal bulb of the carp (*Cyprinus carpio*). Br. J. Pharmacol., 95, 39~48.

Kitazawa, T., A. Kimura, H. Furugashi, K. Temma and H. Kondo. 1988. Contractile response to subatance P in isolated smooth muscle strips from the intestinal bulb of the carp (*Cyprinus carpio*). Comp. Biochem. Physiol., 89C, 277~285.

Lee, S., H. Mihara, H. Aoyagi, T. Kato, N. Izumiya and N. Yamasaki. 1986. Relationship between antimicrobial activity and amphiphilic property of basic model peptide. Biochim. Biophys. Acta., 862, 211~219.

Maggi, C. M., R. Patacchini, P. Rovero and A. Giachetti. 1993. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. J. Auronom. Pharmacol., 13, 23~93.

Maggi, C. A, R. Patacchini, S. Meini, L. Quartara, A. Sisto, E. Potier, S. Giuliani and A. Giachetti. 1994. Comparison of tachykinin NK1 and NK_2 receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum and proximal colon. Br. J. Pharmacol., 112, 150~160.

Murry, C. W., A. Cowan, D. L. Wright, J. L. Vaught and H. I. Jacoby. 1987. Neurokinin-induced salivation in the anesthetized rat : three receptor hypothesis. J. Pharmacol. Exp. Ther., 242, 500~506.

O'Harte, F., E. Burcher, S. Lovas, D. D. Smith, H. Vaudry and J. M. Conlon. 1991. Ranakinin: A novel NK1 tachykinin receptor agonist isolated with neurokinin B from the brain of the frog Rana ridibunda. J. Neurochem., 2086~2091.

Park, N. G., K. Tamaki, S. Lee and H. Aoyagi. 1989. Conformation of proline-containing basic peptides in the presence of liposme and their biological activities. Peptide Chemistry, 1988, 267~272.

Petitet, F., M. Saffroy, Y. T. S. Lavitlle, G. Chassaing, D. Loeuillet, J. Glowinske and J. C. Beaujouan. 1992. Possible existence of a new tachykinin receptor subtype on the guinea-pig ileum. Peptides, 13, 383~388.

Pouny, Y. and Y. Shai. 1992. Interaction of D-amino acid incorporated analogues of pardaxin with membranes. Biochemistry, 31, 9482~9490.

Rahman, M., M. Lordal, A. Al-Saffar and P. M. Hellstrom. 1994. Intestinal motility responses to neuropeptide γ in vitro and in vivo in the rat: comparison with neurokinin 1 and neurokinin 2 receptor agonist. Acta. Physiol. Scand., 151, 497~505.

Rolka, K., D. Erne and R. Schwyzer. 1986. Membrane structure of substance P: secondary structure of substance P, [9-Leucine]substance P, and shorter segments in 2,2, 2,-trifluoroethanol, methanol, and on liposomes studied by circular dichroism. Helv. Chim. Acta., 25, 63 35~6342.

Schwyzer, R., D. Erne and K. Rolka. 1986. Membrane structure of substance P: prediction of preferred conformation, orientation, and accumulation of substance P on lipid membranes. Helv. Chim. Acta., 69, 1789~1797.

Seelig, A. and P. M. Macdonald. 1989. Binding of a neuropeptide, substance P, to neutral and negatively charged lipids. Biochemistry, 28, 2490~2496.

Takeda, Y., J. Tadeda, B. M. Smart and J. E. Krause. 1990. Regional distribution of neuropeptide γ and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. Reg. Pept., 28, 323~333.

Von Euler, U. S. and J. H. Gaddum. 1931. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J. Physiol. Lond., 72, 72~86.

Waugh, D., K. E. Groff, B. Platzack, J. H. Youson, K. R. Olson and J. M. Conlon. 1995a. Isolation, localization, and cardiovascular activity of tachykinins from the stomach of the bowfin Amia calve. Am. J. Physiol., 269, R565~R571.

Waugh, D., V. Bondareva, Y. Rusakov, C. Bjenning, P. F. Nielsen and J. M. Conlon. 1995b. Tachykinins with unusual structural features from a urodele, the amphiuma, an elasmobranch, the hammerhead shark, and an Agnathan, the river lamprey. Peptides, 16, 615~621.

Williams R. W. and J. M. Weaver. 1990. Secondary structure of substance P bound to liposomes in organic solvents and in solution from Raman and CD spectroscopy. J. Biol. Chem., 265, 2505~2513.

Woolley, G. A. and C. M. Deber. 1987. Peptides in membranes: lipid-induced secondary structure of substance P. Biopolymers, 26, S109~S121.

Wu, C. -S. C. and J. T. Yang. 1983. Instability of terminal animo acid residues in oligopeptides in sodium dodecyl sulfate solution. Biochim. Biophys. Acta, 746, 72~80.

Young, J. K., C. Anklin and R. P. Hicks. 1994. NMR and molecular modeling investigations of the neuropeptide substance P in the presence of 15 mM sodium dodecyl sulfate micelles. Biopolymers, 34, 1449~1462.

1996년 11월 4일 접수
1997년 3월 5일 수리