

# 붕장어 (*Conger myriaster*)의 뇌로부터 Vasopressin-related Peptide, [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin의 정제

고혜진 · 김찬희 · 김은정 · 김인혜 · 박희연<sup>1</sup> · 윤호동<sup>1</sup> · 홍용기 · 박남규\*  
 부경대학교 수산과학대학 생물공학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 생명공학연구단

## Purification of Vasopressin-related Peptide, [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin, from the Brain of Conger Eel (*Conger myriaster*)

Hye-Jin GO, Chan-Hee KIM, Eun Jung KIM, In Hye KIM, Hee Yeon PARK<sup>1</sup>,  
 Ho Dong YOON<sup>1</sup>, Yong-Ki HONG and Nam Gyu PARK\*  
 Department of Biotechnology and Bioengineering, Faculty of Food Science and  
 Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Biotechnology Research, National Fisheries Research & Development Institute,  
 Busan 619-900, Korea

Vasopressin (VP)-related peptide was purified from the brain extract of conger eel (*Conger myriaster*) by reverse-phase, ion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC). This peptide with a molecular weight of 1,051.2 Da was determined as H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, whose Cys residues made an intramolecular disulfide bridge by the automated amino acid sequence analysis, MALDI-TOF mass spectrometry. It's sequence was confirmed by identity of the elution position with the synthetic peptide in HPLC system. As a result of homology investigation, the primary structure of this peptide was the same as that of VP-superfamily member, [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin. The synthetic peptide showed a contractile activity at a minimal effective concentration of 10<sup>-10</sup> M on the intestinal smooth muscle of goldfish.

Key words: Conger eel, Brain, Purification, [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin, Smooth muscle, Contractile activity.

### 서 론

Vasopressin/Oxytocin (VP/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 disulfid bond로 결합된 cyclic 구조를 지닌다. 또한 이들은 3, 4 및 8번 위치에서 서로 다른 아미노산으로 치환되어 있으며 C말단이 아미드화 되어있다. 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. Radioimmunoassay (RIA)법, 면역조직화학방법 및 HPLC를 이용한 정제법 등에 의해 척추동물 뿐만 아니라 절지동물, 환형동물, 연체동물 및 곤충 등 무척추동물의 뇌하수체, 송과선 등의 신경계 조직 그리고 독으로부터 VP/OT 그룹이 광범위하게 존재하고 있음이 확인되었다 (Chauvet et al., 1983; Cruz et al., 1987; Oumi et al., 1994; Pevet et al., 1980; Proux et al., 1987; Reich, 1992; Takuwa-Kuroda et al., 2003, Salzet et al., 1993; Nielsen et al., 1994; Noteborn et al., 1987).

[Arg<sup>8</sup>]-vasotocin (AVT)은 비포유류에 있어서 포유류 VP의 대응물로서 VP의 3번째 잔기인 Phe이 Ile으로 치환되어 있으며, 포유류, 파충류, 양서류 및 조류에서 자궁수축, 혈압, 이뇨 작용 및 생식기능에 관여한다 (Sawyer, 1967; Chiu et al., 1990; Feuerstein et al., 1984; Bodanszky et al., 1992; Mahmoud et al., 1987). 또한 어류의 경우에 이뇨작용, 삼투조절, 혈압조절에 관여한다 (Sawyer, 1967; Warne, 2002; Guibbolini and Lahlou, 1987; Le Mevel et al., 1993; Conklin et al., 1999). AVT는 양서류, 파충류, 경연골어류 등 비 포유류 척추동물로부터 정제되었으며 (Acher et al., 1967; Acher et al., 1968; Acher et al., 1970; Lane et al., 1988; Wilson and Smith, 1969), RIA법 및 면역조직화학방법에 의해 연체동물인 군소 (*Aplysia californica*) 및 원구류인 떡장어 (*Eptatretus stouti*)의 신경조직 내에서도 그 존재가 확인되었다 (Moore et al., 1981; Nozaki and Gorbman, 1983). 최근 RIA법에 의해 뱀장어목에 속하는 뱀장어 (*Anguilla anguilla*)의 plasma내에서 AVT의 존재가 확인되었지만 (Warne et al., 1994), 지금까지 같은 목에 속하는 붕장어 (*Conger myriaster*)로부터는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 붕장어 (*C. myriaster*)의 뇌 추출물로부터 금붕어 장관 평활근 bioassay를 이용하여 [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin을 분리·정제하였으며, 이 펩타이드의 구조 및 생리활성에 대해 보고하고자 한다.

\*Corresponding author: ngpark@pknu.ac.kr

Table 1. The primary structure various peptides of the vasopressin/oxytocin superfamily

	Amino acid sequence	Source
Vasopressin-related peptide		
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	
[Arg <sup>8</sup> ]-vasopressin	*Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Mammals
Lys-vasopressin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub>	Mammals
[Arg <sup>8</sup> ]-vasotocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Nonmammalian vertebrates, In this study
Arg-conopressin	Cys-Ile-Ile-Arg-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Mollusc ( <i>Conus striatus</i> )
Diuretic hormone	Cys-Leu-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Insect ( <i>Locusta migratoria</i> )
Oxytocin-related peptide		
Oxytocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub>	Mammals
Mesotocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH <sub>2</sub>	Mammals, birds, amphibians, Lunfishes
Isotocin	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH <sub>2</sub>	Bony fish
Glunitocin	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Gln-Gly-NH <sub>2</sub>	Catilaginous fishes (rays)
Valitocin	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Val-Gly-NH <sub>2</sub>	Catilaginous fishes (shark)
Cephalotocin	Cys-Tyr-Phe-Arg-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH <sub>2</sub>	Mollusc ( <i>Octopus vulgaris</i> )

\*The Cys residues form internal disulfide bonds. Residues at positions 1, 5, 6, 7 and 9 are common to all members.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용된 붕장어 (*C. myriaster*)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 CH<sub>3</sub>CN 및 H<sub>2</sub>O는 Tedia사 (Ohio, USA), [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin은 sigma사 (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 블랜더 (Multi Blender Mill, Nihonseiki Kaisha. Ltd.)로 균질화한 뒤, 4℃에서 24시간 정치하였다. 추출액을 4℃에서 원심분리 (20,000×g, 50 min)하여 상층액을 모아서 감압농축한 뒤, ethanol을 1:3 (vol/vol) 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 적용하였다. 먼저 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)를 포함한 100% 증류수로 column을 씻은 뒤, 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 장관평활근 수축활성을 측정하였으며 (Fig. 1), 강한 수축활성을 나타낸 RM 60분획으로부터 활성펩타이드를 정제하였다.

평활근 수축활성펩타이드의 분리 및 정제

금붕어 장관에 대해 수축활성을 나타낸 RM 60은 6단계의 HPLC 과정을 사용하여 평활근 수축활성 펩타이드를 분리하였다 (Fig. 2). 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: A용매; 0.1% TFA 수용액 (pH 2.2), B용매; 0.1% TFA를 포함한 100% CH<sub>3</sub>CN (pH 2.2), B용매

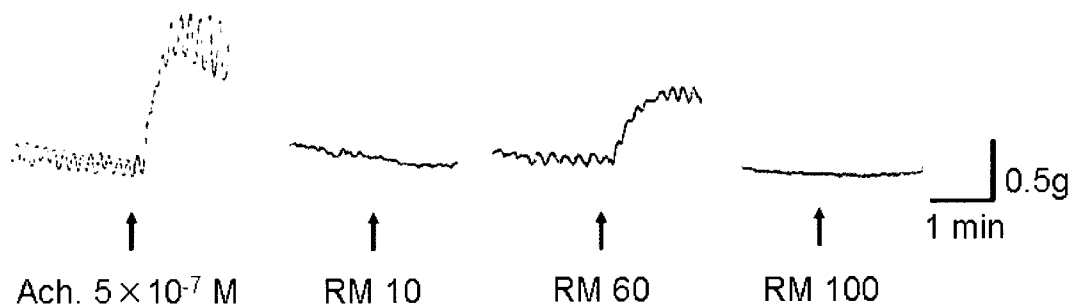


Fig. 1. Typical tracing illustrating the contractile activity of conger eel, *Conger myriaster*. Each up arrow represents the sample applied to the goldfish, *Carassius auratus*.

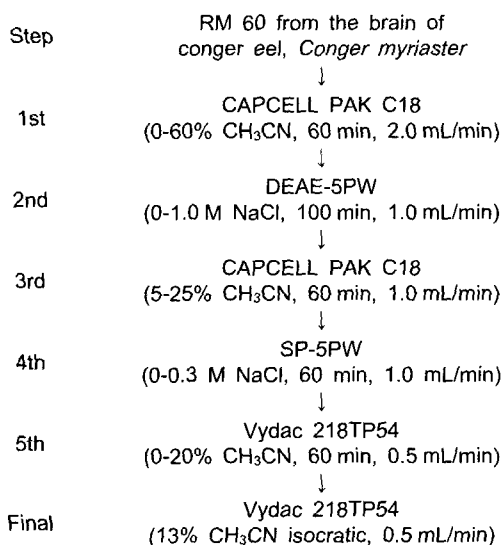


Fig. 2. Procedures for the HPLC purification of [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin with contractile activity from the brain extract of conger eel, *Conger myriaster*.

의 농도구배; 0→70% (70 min), 유속; 1.0 mL/min, 분획양; 2.0 mL/분획, 파장; 220 nm, 온도; 40°C.

반응을 나타낸 분획 13-14번을 TSKgel DEAE-5PW (7.5×75 mm, Tosoh, Japan)을 이용하여 다음의 분리조건으로 정제하였다: A용매; 10 mM Tris-HCl (pH 9.7), B용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM Tris-HCl (pH 9.7), B용매 농도구배; 0→50% (50 min), 유속; 1.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40°C. 세 번째 정제단계로 전단계의 활성분획 2-4번을 CAPCELL PAK C18 column (4.6×250 mm)에 적용시켜 다음과 같은 조건으로 분리하였다: B용매의 농도구배; 5→25% CH<sub>3</sub>CN (60 min), 유속; 1.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40°C. 계속해서 활성을 나타낸 분획 19-20번을 TSKgel SP-5PW (7.5×75 mm, Tosoh, Japan)에 주입하여 다음의 조건으로 분리하였다: A용매; 10 mM Phosphate buffer (pH 6.5), B용매; 1.0 M NaCl을 포함한 10 mM phosphate buffer (pH 6.5), B용매 농도구배; 0→30% (60 min), 유속; 1.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40°C. 네 번째 단계의 활성분획 14번을 218TP54 protein & peptide column (4.6×250 mm, Grace Vydac, USA)에 적용시켜 첫 번째 HPLC 분리과정과 같은 용매를 이용하여 다음조건으로 분리하였다: B 용매 농도구배; 0→20% CH<sub>3</sub>CN (60 min), 유속; 0.5 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40°C. 마지막으로 다섯 번째 단계의 활성분획 21번을 218TP54 column (4.6×250 mm)를 이용하여 0.5 mL/min의 유속으로 0.1% TFA를 포함한 13% CH<sub>3</sub>CN (pH 2.2)의 등용매 조건으로 정제하였다 (Fig. 3).

#### 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열결정

정제한 펩타이드의 1차구조를 결정하기 위해 한국기초과학지원연구원의 protein sequencer (Procise<sup>®</sup> cLC Sequencing System, Model 492 cLC, Applied Biosystems, USA)를 이용하였

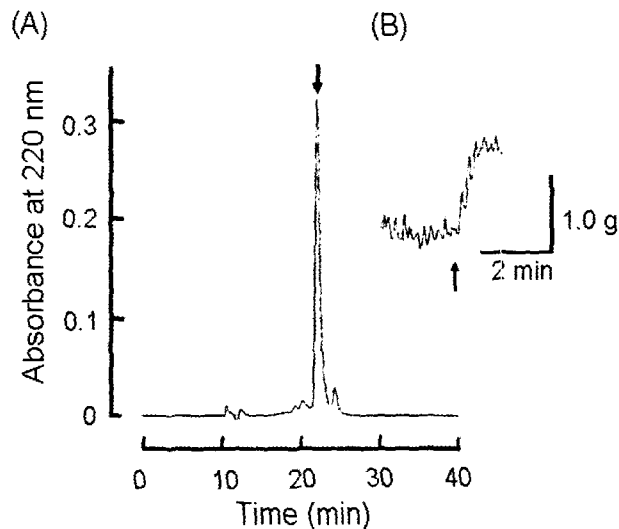


Fig. 3. Final purification of [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin by HPLC using Vydac C18 218TP54 column. The active peak was eluted isocratically with 13% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min (A). The bioactivity of purified substance on a goldfish, *Carassius auratus*, intestine. The arrow represents the sample applied to the isolated intestine (B).

다. 또한 펩타이드의 분자량은 부경대학교 공동실험실습관의 MALDI-TOF-MASS Spectrometer (Voyager-DE<sup>™</sup> PRO, Perseptive Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 금붕어 장관에 대한 수축활성측정

금붕어 장관표본을 만들기 위해 먼저 복부를 절개한 후, 장관을 약 2.0-3.0 cm 길이로 직출하여 결체조직 등을 제거하였다. 장관의 길이가 약 1 cm가 되도록 하여 아래쪽 말단을 반응조의 지지봉에 고정하고 다른 한 쪽 끝을 isometric transducer에 연결하였다. 연결한 장관에 1.0 g의 장력을 준 뒤, 실온에서 15분 간격으로 완충액을 교체하면서 안정화시켰다. 사용한 완충액의 조성은 다음과 같다: (mM) NaCl 110, KCl 2, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1, Glucose 10, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.8) 5.

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, 각 활성 정도는 acetylcholine (ACh) 5×10<sup>-7</sup> M에 대한 수축반응을 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

금붕어 뇌 추출물로부터 부분 정제한 RM 10, RM 60, RM 100을 사용하여 장관 평활근에 대한 수축활성을 측정하였다

(Fig. 1). RM 60에서는 금붕어 장관 평활근에 대해 높은 수축활성을 나타냈으며, RM 10과 RM 100은 수축활성을 나타내지 않았다. 따라서 RM 60을 사용하여 수축활성을 가진 펩타이드를 정제하였다.

**펩타이드의 정제**

장관 평활근에 대해 수축활성을 나타낸 RM 60은 역상 column과 이온교환 column을 사용한 6단계의 정제과정을 거쳐 하나의 순수한 펩타이드를 정제하였다 (Fig. 2). 마지막 단계로서 활성물질을 218TP54 protein & peptide column에 적용시켜 0.1% TFA를 포함한 13% CH<sub>3</sub>CN용매를 사용하여 유속 0.5 mL/min으로 수축활성을 하나의 순수한 물질을 정제하였으며 (Fig. 3A), 정제된 물질은 장관 평활근에 대해 강한 수축활성을 보였다(Fig. 3B).

**정제한 펩타이드의 일차구조**

붕장어의 뇌로부터 정제한 순수한 물질의 구조를 조사하기 위해 아미노산의 서열과 분자량을 측정하였다. 물질의 일차구조는 Xaa-Tyr-Ile-Gln-Asn-Xaa-Pro-Arg-Gly으로 N-말단쪽의 1번 잔기와 6번 잔기가 검출되지 않았다. 또한 이 물질의 분자량을 측정된 결과 m/z 1,051.2 (M+H)<sup>+</sup>이었다 (Fig. 4). 이 펩타이드의 일차구조를 GenBank™/EMBL Data Bank를 사용하여 이전에 밝혀져 있는 단백질 서열과의 상동성을 조사한 결과, 2개의 Xaa를 제외한 나머지 잔기들이 뇌하수체호르몬인 VP/OT family와 높은 유사성을 가지는 것으로 나타났다. 또한 이 일차구조로부터 2개의 Xaa를 제외한 아미노산의 분자량의 합은 844.9 Da으로 정제한 물질의 분자량과 206.3 Da의 차이가 있었다. 1개의 Cys의 잔기량은 103.1 Da이며, 2개의 Cys는 206.2 Da이다. 따라서 이 값은 정제물질의 분자량

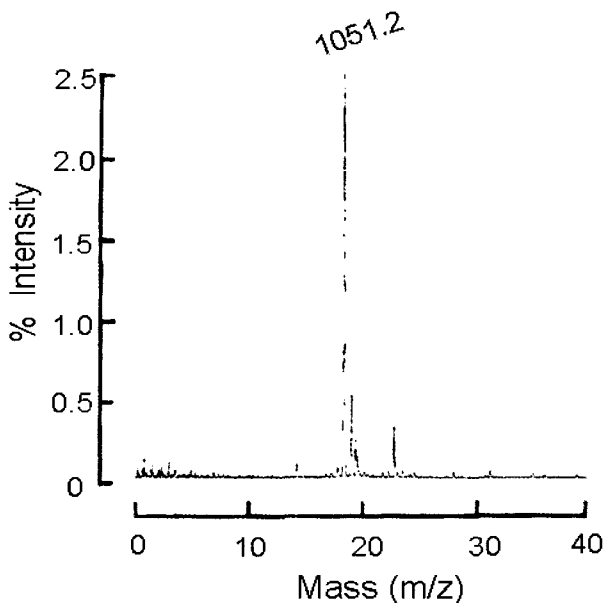


Fig. 4. Molecular weight of [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin isolated from the brain of conger eel, *Conger myriaster*.

(1,051.2 Da)에서 2개의 Xaa를 제외한 분자량 (844.9 Da)을 빼 값과 일치함을 알 수 있다. 또한 일반적으로 S-S결합이 펩타이드 내에 존재하는 경우, Cys는 아미노산 서열분석기에 의해 검출되지 않는다. 따라서 이들 결과로부터 1과 6번 잔기는 각각 Cys잔기이며, 이 일차구조는 VP/OT family 중 AVT와 같은 일차구조임을 알 수 있었다.

**천연물과 합성물과의 동일성 비교**

구입한 합성 AVT를 사용하여 천연 펩타이드와의 동일성을 확인하기 위해서 역상 및 양이온 교환 HPLC에 적용시켜 retention time (RT)을 비교하였다. Fig. 5A에 나타내듯이 먼저 천연물 (N)과 합성물 (S) 및 천연물/합성물의 혼합물 (N+S)을 각각 Vydac C18 218TP54 column에 적용한 결과, 동일한 RT (13.7분)에서 하나의 peak로 용출되었다. 또한 Fig. 5B에서와 같이 천연물 (N), 합성물 (S) 및 천연물/합성물의 혼합물 (N+S)을 TSKgel SP-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 (23.1분)에서 하나의 peak로 용출되었다.

따라서 천연물의 일차구조는 1번과 6번 잔기의 Cys이 disulfid bond를 가지며, C-말단이 아마이드화된 H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>인, AVT와 동일물질인 것으로 판명되었다.

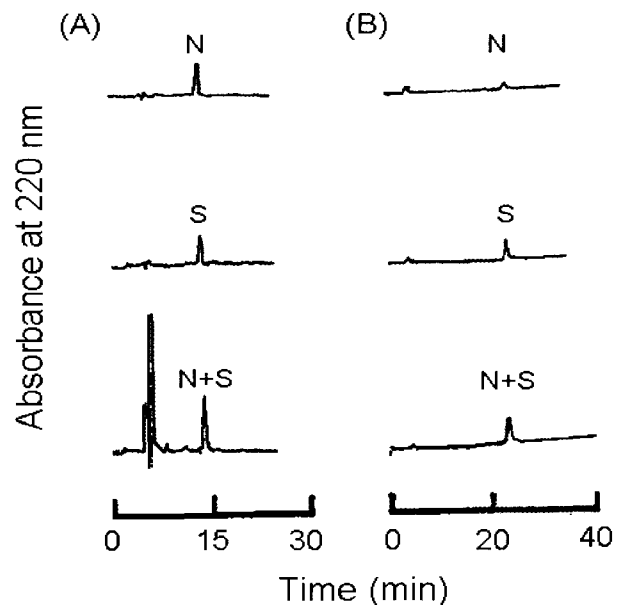


Fig. 5. Comparison between HPLC profiles of the native (N) and synthetic (S) [Arg<sup>8</sup>]-vasotocin (AVT). AVT was injected to a C18 reverse-phase column (Vydac C18 218TP54) and eluted with 13% CH<sub>3</sub>CN isocratic in 0.1% TFA (pH 2.2) (A). AVT was injected to cation-exchange column (TSKgel SP-5PW) and eluted with 0-0.2 M NaCl in 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) (B). N+S represents a mixture of native and synthetic peptide.

Fig. 6은 금붕어 장관 평활근에 대한 AVT의 농도의존적 반응을 나타낸다. 그 결과, AVT는  $10^{-10}$  M에서 역치값을 나타냈다. 또한 농도가 증가할수록 수축활성이 증가하였고  $10^{-5}$  M에서 최대수축활성을 보였다.

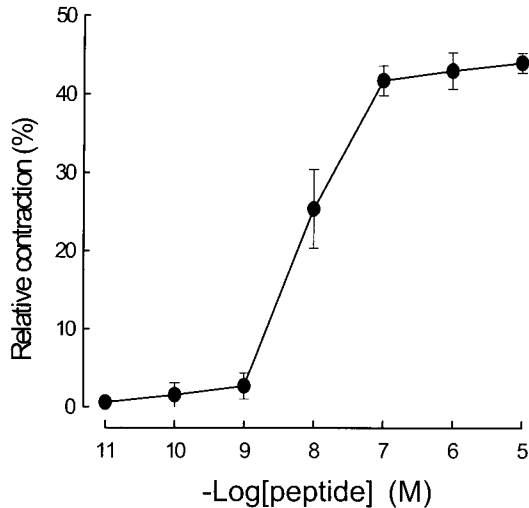


Fig. 6. Dose-related contraction of isolated goldfish (*Carassius auratus*) intestine in response to  $[Arg^8]$ -vasotocin ( $n=5$ ). Contractile effect was expressed as % the maximal response to Ach,  $5 \times 10^{-7}$  M.

## 사 사

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 해양바이오프로세스연구단 연구비 지원 (과제관리번호 P-2004-02) 및 2004년도 KSGP (Korea Sea Grant Program)과제에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Acher, R., J. Chauvet, M.T. Chauvet and D. Crepy. 1967. Amphibian neurohypophysial hormones: Isolation and characterization of mesotocin and vasotocin from the toad, *Bufo bufo*. Gen. Comp. Endocrinol., 8, 337-343.
- Acher, R., J. Chauvet and M.T. Chauvet. 1968. Neurohypophysial hormones of reptiles: isolation of mesotocin and vasotocin of the viper, *Vipera aspis*. Biochem. Biophys. Acta, 154, 255-257.
- Acher, R., J. Chauvet and M.T. Chauvet. 1970. Molecular evolution of the neurohypophysial hormones: The active peptides of a primitive bony fish *Polypterus bichir*. FEBS Lett., 11, 332-335.
- Bodanszky, M., H. Sharaf, J.B. Roy and S.I. Said. 1992. Contractile activity of vasotocin, oxytocin, vasopressin on mammalian prostate. Eur. J. Pharmacol., 216, 311-313.
- Chauvet, M.T., D. Hurpet, J. Chauvet and R. Acher. 1983. Identification of mesotocin, lysine vasopressin, and phenylepressin in the eastern gray kangaroo (*Macropus giganteus*). Gen. Comp. Endocrinol., 49, 63-72.
- Chiu, K.W., Y.C. Lee and P.K.T. Pang. 1990. Neurohypophysial hormones and cardiac activity in the frog, *Rana trigrina*, and the snake, *Ptyas mucosa*. Gen. Comp. Endocrinol., 78, 150-154.
- 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.
- Feuerstein G., R.L. Zerbe and A.L. Faden. 1984. Central cardiovascular effects of vasotocin, oxytocin and vasopressin in conscious rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., 228, 348-353.
- Guibbolini, M.E. and B. Lahlou. 1987. Neurohypophysial peptide inhibition of adenylate cyclase activity in fish gills. FEBS Lett., 220 (1), 98-102.
- Lane, T.F., S.A. Sower and H. Kawachi. 1988. Arginine vasotocin from the pituitary gland of the lamprey (*Petromyzon marinus*): Isolation and amino acid sequence. Gen. Comp. Endocrinol., 70, 152-157.
- 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.
- Mahmoud, I.Y., R.V. Cyrus and D.L. Wright. 1987. The effect of arginine vasotocin and ovarian steroids on uterine contractility in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Comp. Biochem. Physiol., 86A, 559-564.
- Moore, G.J., J.A. Thornhill, V. Gill, K. Lederis and K. Lukowiak. 1981. An arginine vasotocin-like neuropeptide is present in the nervous system of the marine mollusc *Aplysia californica*. Brain Res., 206, 213-218.
- 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*. Toxicon, 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.

- Nozaki, M. and A. Gorbman. 1983. Immunocytochemical localization of somatostatin and vasotocin in the brain of the Pacific hagfish, *Eptatretus stouti*. Cell Tissue Res., 229, 541-550.
- 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 and 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.
- Warne, J.M., N. Hazon, J.C. Rankin and R.J. Balment. 1994. A radioimmunoassay for the determination of arginine vasotocin (AVT): plasma and pituitary concentration in fresh- and seawater fish. Gen. Comp. Endocrinol., 96, 438-444.
- Wilson, N. and M. Smith. 1969. Isolation and amino acid sequence of neurohypophysial hormones of Pacific chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Gen. Comp. Endocrinol., 13, 412-424.

---

2005년 1월 19일 접수  
2005년 2월 25일 수리