



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0059549
(43) 공개일자 2017년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 19/44 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 8/60 (2006.01)
A61K 8/63 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12P 33/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 19/44 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0163566

(22) 출원일자 2015년11월20일

심사청구일자 2016년11월23일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

양덕춘

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김연주

경기도 성남시 분당구 동판교로 275 107동 801호 (삼평동, 풍성신미주아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 20 항

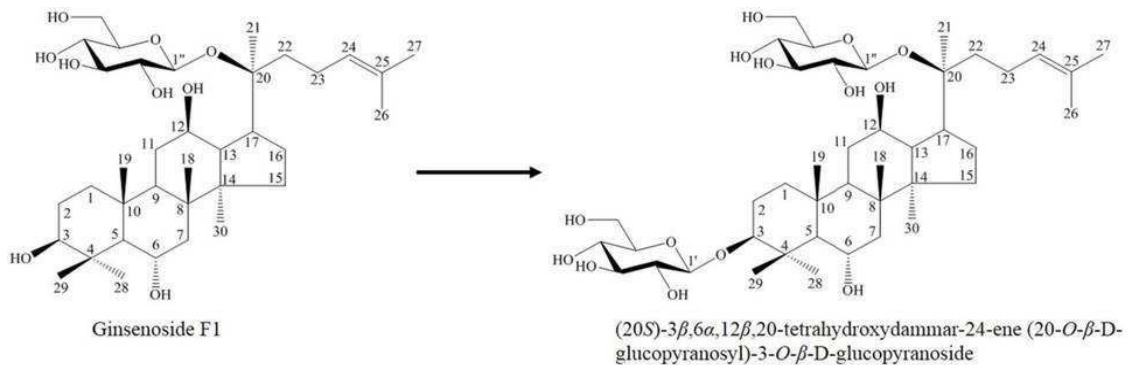
(54) 발명의 명칭 진세노사이드에 대해 당전이 활성을 가지는 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질 및 이를 이용한 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장료 조성물, 의약품 조성물, 식품 조성물, 및 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 BSGT1 단백질은 진세노사이드의 3 번 탄소에 특이적으로 당을 결합시켜 당전이된 진세노사이드를 제조할 수 있도록 한다. 또한, 상기 효소를 이용해 제조한 진세노사이드 Ia는 세포 독성 없이 타이로시나제 활성을 감소시켜 멜라닌 합성을 억제하므로 피부 미백용 조성물로서 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)
A61K 8/60 (2013.01)
A61K 8/63 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
C12N 9/1048 (2013.01)
C12P 33/16 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

왕단단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼
 소재은행 (서천동)

지메네즈 줄리

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼
 소재은행 (서천동)

왕초

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼
 소재은행 (서천동)

안성은

경기도 수원시 영통구 청명북로 81 409동 1804호
 (영통동, 청명마을4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545009680
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산물기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발사업
연구과제명	한국형 미생물의 기능성 검정 및 제품화 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2013.11.20 ~ 2016.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질; (b) 상기 단백질을 생산하는 미생물 또는 이의 배양물; (c) 상기 미생물을 파쇄한 후 수득한 조효소; 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는, 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당전이 전의 진세노사이드는 PPD (protopanaxadiol) 계열의 진세노사이드, PPT (protopanaxatriol) 계열의 진세노사이드 또는 이들의 조합인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당전이 전의 진세노사이드는 C-Y, C-Mc, CK, 지페노사이드 LXXV (Gypenoside LXXV), Re, Rg1, Rf, F1, Rg2 및 Rh1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 당은 글루코스 (glucose), 갈락토스 (galactose), 또는 이들의 조합인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 진세노사이드와 반응시키는 단계를 포함하는, 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 반응은 CO^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Cu^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 이온이 존재하는 조건에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 반응은 pH 5 내지 pH 7의 완충 용액에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 반응은 20 °C 내지 40 °C에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 9

서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질.

청구항 10

제9항의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제11항의 발현 벡터를 포함하는, 인간을 제외한 형질전환체.

청구항 13

진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 피부 미백 또는 색소 침착 개선은 멜라닌 색소의 생성 저해에 의해 수행되는 것인, 화장품 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형을 갖는 것인, 화장품 조성물.

청구항 16

진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물.

청구항 17

진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 식품 조성물.

청구항 18

진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 피부 색소 침착 질환은 기미, 주근깨, 반점, 일광 색소반, 약물 사용 후의 색소 침착, 염증 후의 색소 침착 및 임신성 색소 침착으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 질환인 것인 약학 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 약학 조성물은 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 갖는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질, 이를 이용한 당전이된 진세노사이드 제조용 조성물, 및 이를 이용한 진세노사이드의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장료 조성물, 의약품 조성물, 식품 조성물, 및 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당전이 효소 (glycosyltransferase, GTs; EC2.4.x.y)는 올리고당, 다당류, 당접합체류 (glycoconjugate)의 생합성에 중요한 다양한 수용체 분자에 활성화된 당이 부착하는 것을 촉매하는 효소 패밀리로 구성된다. 또한 당전이 효소는 글리코실화된 천연 산물 복합체의 발달에 중요한 역할을 한다. 당전이 효소는 서열, 시그네처 모티프 (signature motif), 글리코시드 연결의 입체 화학, 및 표적 특이성을 기반으로 78 개의 패밀리로 나뉜다.

[0003] 상기 당전이 효소 중 GTs 패밀리 1은 세균, 식물 및 동물에서 발견된 UDP-당전이 효소 (UDTs)를 포함한다. UDTs는 공여체로서 UDP-글루코스 같은 UDP에 의해 활성화되는 당 모이어티를 이용할 수 있으며, 당 수용체로서 플라보노이드, 항생제, 및 식물 호르몬과 같은 소분자를 이용할 수 있다. 예를 들어, 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)의 전체 유전체 서열이 완전히 분석되었고 네 개의 UDP-당전이 효소를 가지는 것으로 확인되었는데, 이들 중 하나인 BcGT-1은 플라보노이드와 반응하는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 UDP-당전이 효소에 의한 진세노사이드 (ginsenoside)의 생체 내 변환 (biotransformation)은 거의 보고되지 않았다.

[0004] 파낙스 진생 (Panax ginseng) C. A. Meyer의 뿌리인 인삼은 중국, 한국, 일본 및 기타 아시아 국가에서 널리 사용되는 전통 의약으로, 면역력 강화, 영양 공급, 및 피로 회복 용도로 2,000 년 이상 사용되었다. 진세노사이드는 인삼의 핵심 성분이며 면역 조절, 항염증, 항암, 항당뇨 및 항노화 효과에 대한 다양한 약리효과가 있다고 알려져있다. 40 개 이상의 진세노사이드가 인삼 뿌리에서 분리되었고 이들은 세 개의 그룹으로 나뉜다: 올레안 (oleanane), 프로토파낙사디올 (protopanaxadiol, PPD), 및 프로토파낙사트리올 (protopanaxatriol, PPT). 마이너 진세노사이드 F1은 고려 인삼에서 낮은 농도로 존재하며, 파낙스 진생의 진세노사이드 Re 및 Rg1이 β -글루코시다제에 의해 가수분해되어 생성된다. 진세노사이드 F1은 항암, 항노화 및 항산화 효과가 있는 것으로 확인되었고, CYP3A4 활성을 경쟁적으로 억제하고 CYP2D6 활성을 다소 억제한다. 그러나, 진세노사이드는 수용성이 없어 약물로서 적용이 제한된다. 따라서 당 결합을 통해 이들의 안정성 및 수용성을 증가시키는 것이 중요하다. 글리코실화는 약물과 식품 첨가제에서 약리학적 특성 및 생물학적으로 이용 가능한 특성을 향상시킬 수 있다 (Chemistr Letters, 2007, 36:1292-1293).

[0005] 한편, 비정상적인 피부 색소 침착을 치료하기 위해서는 멜라닌 생합성 조절이 중요하며, 특히 타이로시나제 (tyrosinase)는 멜라닌 생합성의 핵심 효소이다. 미백 기능을 가지는 화합물의 작용 기전은 멜라닌 합성을 줄이고 타이로시나제 활성을 억제하는 것이다 (Pigment Cell Research, 2006, 19:550-571). 기존 연구 결과에서는 하이드로퀴논 (hydroquinone), 아르부틴 (arbutin), 아젤라익산 (azelaic acid), 레티노익산 (retinoic acid), 및 코직산 (kojic acid) 등의 피부 미백제가 과다색소침착 질환 치료에 효과적이거나, 피부염, 피부 자극 및 멜라노사이트 손상과 같은 부작용이 있는 것으로 보고되었다 (Int J Sci., 2013, 14:23420-23440).

[0006] 본 발명자들은 천연 자원으로부터 부작용이 없는 피부 미백제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, *B. subtilis* KCTC1022 유래 UDP-당전이 효소가 진세노사이드의 3 번 탄소에서 특이적으로 당전이를 일으키는 것을 확인하였다. 또한, 상기 당전이 효소를 이용하여 생체 외에서 진세노사이드 Ia를 생산하였으며, 상기 진세노사이드 Ia는

세포에 독성이 없으며 멜라닌 생성을 막고 타이로시나제를 억제하는 효과가 있어 피부 미백 용도로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질; (b) 상기 단백질을 생산하는 미생물 또는 이의 배양물; (c) 상기 미생물을 파쇄한 후 수득한 조효소; 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는, 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 진세노사이드와 반응시키는 단계를 포함하는, 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 (a) 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질; (b) 상기 단백질을 생산하는 미생물 또는 이의 배양물; (c) 상기 미생물을 파쇄한 후 수득한 조효소; 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는, 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조용 조성물을 제공한다. 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래 당전이 효소인, 서열번호 4의 아미노산 서열로 정의되는 단백질이 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지므로, 이를 이용하면 다양한 생리활성을 가진 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드를 화학적 방법이 아닌, 안체에 안전한 생물전환 방법으로 대량 생산할 수 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "당전이 효소 (glycosyltransferase)"는 글리코실 공여자 (glycosyl donor)로부터 글리코실 수용체 분자 (glycosyl acceptor molecule)로 단당류 모이어티를 전달하는 활성을 지닌 효소로서, 구체적으로 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적인 당전이 활성을 가진 단백질을 의미한다. 구체적으로, 상기 당전이 효소는 UDP-당을 글리코실 공여자로 사용하는 효소일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 UDP-당전이 효소는 PPD (protopanaxadiol) 및 PPT (protopanaxatriol)의 다양한 글리코실화를 가져와 다양한 종류의 진세노사이드를 생산할 것으로 여겨지고 있다. 다만, UDP-당전이 효소 활성을 지닌다고 하여도 그 기질 특이성 및 위치 특이성이 효소의 종류에 따라 상이하므로, 진세노사이드에 특이적으로 작용하는 UDP-당전이 효소인지 여부는 규명되어야 한다.
- [0016] 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질은 본 발명에서 "BSGT1 단백질"과 혼용되어 사용된다. 상기 BSGT1 단백질이 진세노사이드의 3 번 탄소에 위치한 수산화기에 특이적으로 작용하여 당 모이어티를 전달하는 것은 알려진 바 없었으며, 이는 본 발명자들에 의해 최초로 규명된 것이다.
- [0017] 구체적으로 상기 BSGT1 단백질은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니고, 그 유래와 관계없이 서열번호 4의 BSGT1 단백질과 80 % 이상, 구체적으로는 90 % 이상, 보다

구체적으로는 95 % 이상, 특히 구체적으로는 97 % 이상의 상동성을 가지고 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적인 당전이 효소 활성을 가지는 것이라면 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 제한 없이 본 발명의 범위에 포함되는 자명하다.

[0018] 본 발명의 용어, "상동성"은 야생형 (wild type) 단백질의 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기 서열과 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 BSGT1 단백질과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교 대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해주는 생물정보 알고리즘 (bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시할 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용 가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화되어 있다.

[0019] 나아가, 상기 BSGT1 단백질은 정제를 용이하게 하기 위해 친화성 태그 (affinity tag)를 추가로 포함하는 융합 단백질 형태로 제조될 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어 "친화성 태그"는 융합 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산에 도입될 수 있는 펩타이드 또는 핵산 서열로서 다양한 목적으로 사용될 수 있으며, 예를 들어 목적 단백질의 정제 효율을 높이기 위한 것일 수 있다. 상기 친화성 태그는 GST, MBP, NusA, 티오레독신(thioredoxin), 유비퀴틴, FLAG, BAP, His, STREP, CBP, CBD, 또는 S-태그일 수 있고, 구체적으로는 MBP (maltose-binding protein)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 상기 친화성 태그는 이에 제한되는 것은 아니나, BSGT1 단백질의 카르복시 말단 또는 아미노 말단에 연결될 수 있다.

[0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유전체로부터 BSGT1 유전자를 클로닝하여 pMAL-C5X 벡터에 도입한 뒤, 상기 벡터를 대장균 BL21 (DE3)에 도입하여 발현시킴으로써 MBP-BSGT1 융합 단백질을 생산 및 정제하였다 (도 2).

[0023] 상기 당전이 전의 진세노사이드는 PPD (protopanaxadiol) 계열의 진세노사이드 또는 PPT (protopanaxatriol) 계열의 진세노사이드일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "PPD (protopanaxadiol) 계열의 진세노사이드"는 담마란 (dammarane)계 사포닌으로, 비 당부분 (aglycone)에 붙어있는 수산화기 (-OH)의 숫자가 2 개인 진세노사이드를 의미하며, 이의 예로 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Ra3, Rg3, Rh2, Rs1, C-O, C-Y, C-Mc1, C-Mc, F2, C-K, 지페노사이드 XVII (Gypenoside XVII), 지페노사이드 LXXV (Gypenoside LXXV) 또는 Rs2가 있다.

[0025] 본 발명에서 용어, "PPT (protopanaxatriol) 계열의 진세노사이드"는 담마란계 사포닌으로, 비 당부분에 붙어있는 수산화기가 3 개인 진세노사이드를 의미하며, 이의 예로 Re, Rg1, Rf, F1, Rg2, 또는 Rh1이 있다.

[0026] 본 발명의 목적상 상기 PPD 또는 PPT 계열의 진세노사이드는 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 단백질의 활성에 의해 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드로 전환될 수 있는 사포닌을 모두 포함한다. 본 발명의 실시예에서는 대표적으로 F1 및 CK가 본 발명의 당전이 활성을 가지는 단백질에 의하여 각각 Ia 및 F2로 전환될 수 있음을 확인하였다. 상기 당전이 전의 진세노사이드는 구체적으로 C-Y, C-Mc, CK, 지페노사이드 LXXV (Gypenoside LXXV), Re, Rg1, Rf, F1, Rg2 또는 Rh1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 당전이 전의 진세노사이드는 분리 및 정제된 형태로 이용할 수도 있고, 또는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물에 포함되어 있는 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 즉, 진세노사이드를 포함하는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물을 직접 출발물질로 이용하여 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다. 본 발명에서는, 공지된 다양한 인삼을 사용할 수 있으며, 구체적으로 고려삼 (*Panax ginseng*), 화기삼 (*P. quiquefolius*), 전철삼 (*P. notoginseng*), 죽절삼 (*P. japonicus*), 삼엽삼 (*P. trifolium*), 히말라야삼 (*P. pseudoginseng*) 및 베트남삼 (*P. vietnamensis*)을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본 발명에서 용어, "당전이된 진세노사이드"는 당전이 전의 진세노사이드를 구성하는 3 번 탄소의 수산화기에 단당류 이상의 당이 부착된 형태의 진세노사이드를 의미하며, 이의 예로 진세노사이드 Ia 또는 F2가 있으나, 이

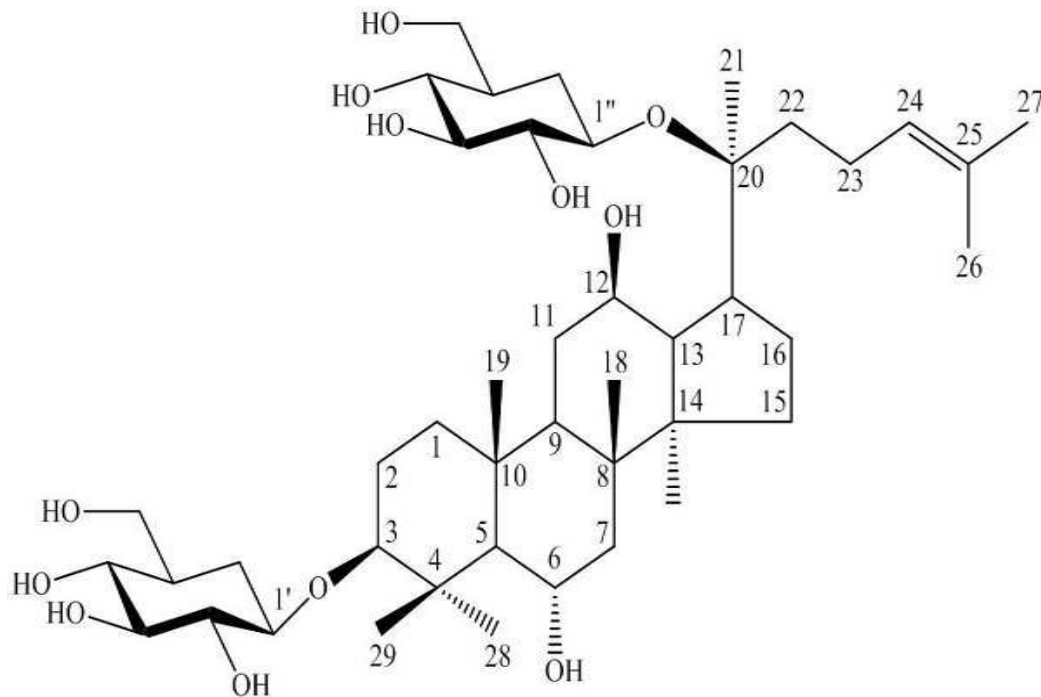
에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상 상기 당전이된 진세노사이드는 본 발명의 당전이 활성을 가지는 단백질에 의하여 당전이된 진세노사이드라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 당은 글루코스 (glucose), 또는 갈락토스 (galactose)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "진세노사이드 F1"은 인삼, 홍삼, 백삼, 수삼, 미삼 및 산삼배양근 등에 함유되어 있는 인삼 사포닌 (saponin)의 일종으로 (3b,6a,12b)-3,6,12-트리하이드록시다마르-24-엔-20-일-β-D-글루코피라노사이드 ((3b,6a,12b)-3,6,12-Trihydroxydammar-24-ene-20-yl-β-D-glucopyranoside)로도 명명된다.

[0030] 상기 진세노사이드 F1은 항암, 항노화, 항산화 효과 등이 있는 것으로 알려져있으나, 수용성이 떨어지고 고농도에서 세포 독성을 띄므로 생체에 적용하기에 어려움이 있다.

[0031] 한편, 진세노사이드 Ia는 상기 진세노사이드 F1에 당이 결합된 인삼 사포닌을 말하며, 구체적으로는 진세노사이드 F1의 3 번 탄소에 당이 결합된 것으로 (20S)-3β,6α,12β,20-테트라하이드록시다마르-24-엔-(20-O-β-D-글루코피라노실)-3-O-β-D-글루코피라노사이드 ((20S)-3β,6α,12β,20-tetrahydroxydammar-24-ene-(20-O-β-D-glucopyranosyl)-3-O-β-D-glucopyranoside)로도 명명되며 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[0032] [화학식 1]



[0033] 본 발명에서는 진세노사이드 F1이 가지는 수용성 부족, 세포 독성의 문제점을 해결하기 위해 진세노사이드 F1에 당을 결합시키하고자 하였고, UDP-당전이 효소 (glycosyltransferase) 중 하나인 BSGT1 단백질을 이용하여 진세노사이드 F1을 진세노사이드 Ia로 전환시킬 수 있음을 확인하였다 (도 1). 진세노사이드 F1의 6 번 및 12 번 탄소에서는 당전이가 일어나지 않아 BSGT1이 3 번 탄소에 특이적으로 당전이 활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0035] 또한, 본 발명에서는 BSGT1 단백질이 다른 진세노사이드에 대해서도 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는지 확인하고자, 진세노사이드 CK에 대한 당전이 활성을 확인하였다.

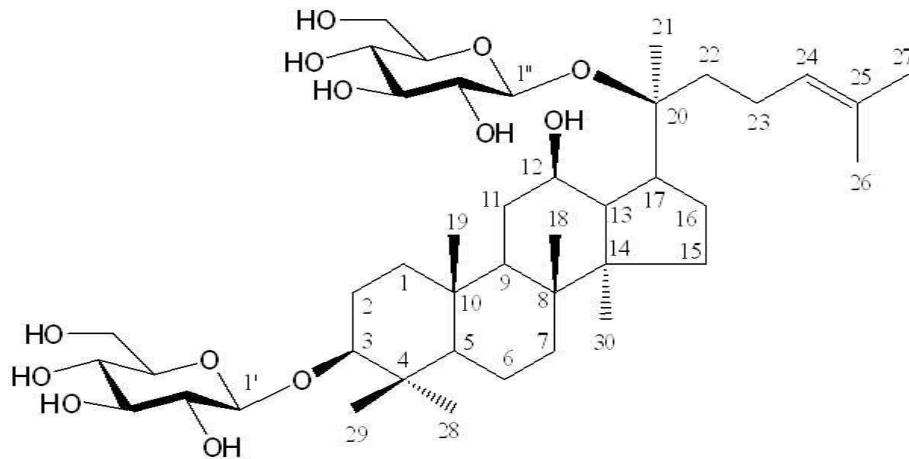
[0036] 본 발명에서 용어 "진세노사이드 CK (ginsenoside compound K)"는 인삼 자체에는 존재하지 않으나, 인삼 또는 홍삼에 존재하는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등의 사포닌이 비피더스 균과 같은 장내 미생물 또는 토양 미생물의 작용에 의하여 체내에서 흡수가 가능한 형태로 전환된 사포닌이다. 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파나사디올 (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol)로도 명명된다.

[0037] BSGT1은 진세노사이드 CK의 3 번 탄소를 특이적으로 당전이시켜, 진세노사이드 F2를 생성하였다.

[0038] 본 발명에서 용어 "진세노사이드 F2"는 PPD 계열의 사포닌의 기본 탄소 골격에 있어, 3 번 탄소 및 20 번 탄소에 글루코스가 하나씩 결합되어 있는 형태의 마이너 진세노사이드를 의미하며, 진세노사이드 Rb1 및 지페노사이드 SVII 등에 비하여 당류가 제거되어 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드를 말한다. (20S)-3β,20-비스(β-D-글루코피라노실옥시)-5α-다마르-24-엔-12β-올 ((20S)-3β,20-Bis(β-D-glucopyranosyloxy)-5α-

dammar-24-ene-12 β -ol)로도 명명되며 하기 화학식 2의 구조를 가진다.

[화학식 2]



진세노사이드 F1의 경우와 마찬가지로, 진세노사이드 CK의 12 번 탄소에서는 당전이 활성을 보이지 않아, BSGT1 이 진세노사이드의 3 번 탄소에 특이적으로 작용하는 것을 알 수 있었다.

따라서, 본 발명의 BSGT1은 상기 진세노사이드 F1 및 진세노사이드 CK 뿐만 아니라, 3 번 탄소에 수산화기를 가지는 모든 진세노사이드에 대하여 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가질 수 있다.

본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조용 조성물을 진세노사이드와 반응시키는 단계를 포함하는, 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드의 제조방법을 제공한다.

진세노사이드 및 진세노사이드 제조용 조성물에 대하여는 상기 설명한 바와 같다.

상기 3 번 탄소 특이적으로 당전이된 진세노사이드 제조용 조성물은 BSGT1 단백질을 포함하는 것일 수 있다. 즉, 정제된 BSGT1 단백질을 이용하여 진세노사이드를 당전이시킬 수 있고, 또는 상기 BSGT1 단백질을 발현하는 미생물 또는 이의 배양물을 이용하거나, 상기 미생물을 파쇄한 후 수득한 조효소 상태로 당전이 전의 진세노사이드와 반응시킬 수 있다. 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적인 당전이 활성이 있다면 어떠한 형태로 사용하더라도 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 BSGT1 단백질과 진세노사이드 F1의 반응을 통해 생성된 물질에 대한 HRFABMS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 IR을 수행하여, 생성물이 진세노사이드 F1의 3 번 탄소에 당이 결합된 진세노사이드 Ia임을 확인하였다 (도 5 및 표 1). 이와 함께 상기 BSGT1 단백질에 의한 진세노사이드 F1의 변환 수율을 HPLC 분석을 통해 정량적으로 확인하였다 (도 4).

본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 상기 BSGT1 단백질과 진세노사이드 CK의 반응을 통해 생성된 물질이, 진세노사이드 CK의 3 번 탄소에 당이 결합된 진세노사이드 F2임을 확인하였다 (도 9 및 표 2).

구체적으로, 상기 반응은 Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Cu^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 이온이 존재하는 조건으로, pH 5 내지 pH 7의 완충 용액에서 20 °C 내지 40 °C의 온도로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 제조방법은 진세노사이드 Ia를 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 효소의 최적의 금속 이온 조건, pH 조건, 온도 조건을 확인하여 재조합 BSGT1 단백질의 최대 활성 조건을 확립하였다 (도 3).

본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

상기 단백질에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 3으로 기재한 뉴클레오티드 서열로 정의되

는 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 서열번호 3으로 기재한 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 상기 서열과 80 % 이상, 구체적으로는 90 % 이상, 보다 구체적으로는 95 % 이상, 특히 구체적으로는 97 % 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열로서 실질적으로 당전이 효소 활성을 갖는 단백질을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0054] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물을 말한다. 상기 제조된 제조합 벡터를 숙주 세포에 형질전환 (transformation) 또는 형질감염 (transfection) 시킴으로써, 목적하는 단백질을 수득할 수 있게 된다.

[0055] 본 발명에서 제공하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균 유래 플라스미드 (pMAL, pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드 (YEpl3, YEpl24 및 YCp50) 및 아그로박테리움 매개 형질전환에 사용할 수 있는 Ti-플라스미드를 포함한다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ -파아지 (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11 및 λ ZAP)가 있다. 또한, 레트로바이러스 (retrovirus), 아데노바이러스 (adenovirus) 또는 백신시아 바이러스 (vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스 (baculovirus)와 같은 곤충 바이러스, 이중 가닥 식물 바이러스 (예, CaMV), 단일가닥 바이러스 또는 게미니 바이러스로부터 유래된 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다.

[0056] 아울러 본 발명의 벡터로서, 핵산 발현 활성화 단백질 (예를 들어, B42)이 연결된 융합 플라스미드 (fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 플라스미드 벡터는 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 융합 플라스미드에는 MBP, GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등을 태그 (tag)로 포함할 수 있으나, 상기 예들에 의해 제한되지 않는다.

[0057] 또한, 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질의 경우, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, MBP (maltose-binding protein)가 이용된 경우에는 아밀로스 수지 컬럼을 이용할 수 있고, 헥사히스티딘이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.

[0058] 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한 부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 BSGT1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 벡터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 핵산 외에 인핸서 (enhancer)와 같은 시스 요소 (cis element), 스플라이싱 시그널 (splicing signal), 폴리 A 추가 시그널 (poly A addition signal), 선택 마커 (selection marker), 라이보솜 결합 서열 (ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소 (dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.

[0061] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 DMSO (dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다. 본 발명의 BSGT1 당전이 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명에서 숙주는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균 (*E. coli*)과 같은 에스케리키아 (*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 같은 바실러스 (*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 같은 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속 세균; 사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카

로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) 같은 효모; 동물세포, 식물세포 및 곤충 세포가 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 대장균 균주의 구체적인 예로는 BL21 (DE3), CL41, 또는 HB101이, 바실러스 서브틸리스 균주의 구체적인 예로는 WB700 또는 LKS87이 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 본 발명의 당전이 효소를 발현할 수 있는 형질전환체라면 그 종류가 특별히 제한되지 않는다.

[0063] 본 발명의 프로모터는, 본 발명의 핵산을 숙주에서 발현하도록 하는 한 어떠한 프로모터도 사용될 수 있다. 예를 들어, trp 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터 또는 PR 프로모터 같은 대장균 또는 파아지-유래 프로모터; T7 프로모터 같은 대장균 감염 파아지-유래 프로모터, CaMV35S, MAS 또는 히스톤 프로모터가 사용될 수 있다. 또한 tac 프로모터 같은 인공적으로 변형된 프로모터도 사용될 수 있다.

[0064] 상기의 방법으로 형질전환된 본 발명의 BSGT1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 진세노사이드의 3 번 탄소에 당을 전달할 수 있는 생물학적 활성을 지닌다.

[0065] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0066] 진세노사이드 Ia는 상기 설명한 바와 같다.

[0067] 본 발명의 진세노사이드 Ia는 멜라닌의 생성을 효과적으로 저해하는 효능이 있으며, 구체적으로 멜라닌 생성의 속도 결정 단계를 촉매하는 타이로시나제 (tyrosinase) 활성을 억제하는 효능을 나타내는 바, 진세노사이드 Ia를 피부 미백 및 색소 침착 개선, 피부 색소 침착 질환의 예방 및 치료 용도로 매우 유용하게 사용할 수 있다.

[0068] 타이로시나제는 활성 부위에 한 쌍의 구리 이온을 함유하고 있는 금속 함유 단백질로서, 멜라닌의 생성 경로에서 L-타이로신이 하이드록실화 반응을 거쳐 3,4-디하이드록시 페닐알라닌 (L-DOPA)으로 전환되고, 이것이 다시 페닐알라닌-3,4-퀴논 (도파퀴논)으로 산화된 다음, 도파크롬 (dopachrome), 인돌-5,6-퀴논 등의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌으로 합성되는 단계에 관여하는 효소이다. 본 발명의 진세노사이드 Ia는 상기 타이로시나제의 활성을 억제하는 효능이 있다.

[0069] 상기 효능과 관련하여 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, B16BL6 세포를 α -MSH를 처리하여 자극한 뒤 진세노사이드 Ia를 처리한 경우 타이로시나제 활성 및 멜라닌 함량이 대조군인 아르부틴과 진세노사이드 F1 보다 감소하는 것을 확인하였다 (도 7 및 도 8). 특히 진세노사이드 Ia는 진세노사이드 F1과는 달리 세포 독성도 거의 나타나지 않고 (도 6), 3 번 탄소에 당이 부가되어 진세노사이드 F1 보다 높은 수용성을 나타내므로 피부 미백용 조성물로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0070] 본 발명에서 사용되는 용어, "피부 미백"이란 멜라닌의 합성을 저해하여 멜라닌의 피부 침착을 억제하거나 방지하는 모든 작용을 의미한다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 용어, "피부 색소 침착"이란 멜라닌의 합성 증가로 인해 피부의 색깔이 어두워지는 모든 작용 또는 그러한 상태를 의미한다.

[0072] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"이란 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0073] 본 발명의 화장품 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명의 상기 화장품 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[0076] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

- [0077] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0081] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0082] 진세노사이드 Ia, 피부 미백 및 색소 침착 개선은 상기 설명한 바와 같다.
- [0083] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.
- [0084] 본 발명의 상기 의약품 조성물은 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0085] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0086] 진세노사이드 Ia, 피부 미백 및 색소 침착 개선은 상기 설명한 바와 같다.
- [0087] 본 발명의 상기 식품 조성물은 특별히 제한되지 아니하며, 건강 기능 식품 조성물을 포함한다.
- [0088] 본 발명의 상기 건강 기능 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0089] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0090] 본 발명의 상기 건강 기능 식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0091] 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 천연 과

일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

- [0092] 본 발명의 화장료 조성물, 의약품 조성물 또는 식품 조성물에서, 진세노사이드 Ia는 바람직하게는 상기 조성물의 전체 중량을 기준으로 0.0001 중량 % 내지 50 중량 %로 함유될 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.01 중량 % 내지 40 중량 %로 함유될 수 있고, 더욱 바람직하게는 0.1 중량 % 내지 30 중량 %로 함유될 수 있다.
- [0093] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0094] 진세노사이드 Ia 및 피부 색소 침착에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.
- [0095] 본 발명의 상기 피부 색소 침착 질환은 멜라닌의 생성 증가로 인한 피부 색소 침착으로 유발되는 모든 질환을 의미한다. 상기 피부 색소 침착 질환의 비제한적인 예로 기미, 주근깨, 반점, 일광 색소반, 약물 사용 후의 색소 침착, 염증 후의 색소 침착 및 임신성 색소 침착 등을 들 수 있다.
- [0096] 본 발명의 상기 약학 조성물에서 진세노사이드 Ia의 유효 함량은 특별히 제한되지 않으며, 상기 약학 조성물의 총 중량에 대하여 0.00001 중량 % 내지 99.99 중량 %로 포함되거나 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0097] 본 발명의 상기 약학 조성물은, 진세노사이드 Ia를 유효 성분으로 함유하는 것에 더하여, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0098] 본 발명에서, 상기 "약학적으로 허용 가능"하다는 것은, 이를 투여 시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용될 수 있는 것을 의미한다.
- [0099] 본 발명의 상기 약학 조성물은, 상기 담체와 함께 제제화되어, 식품, 의약품, 사료 첨가제, 음용수 첨가제 등으로 활용될 수 있다.
- [0100] 본 발명에서, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0101] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제 들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 분산제, 계면활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [0103] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.
- [0104] 본 발명의 상기 약학 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘 (Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘 (Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨 (Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 (Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다.
- [0105] 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [0106] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 구강용 스프레이제, 구강용 세정제, 치약제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [0107] 본 발명의 상기 약학 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0108] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 (ampoule) 또는 바이알

(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0109] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0110] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나 바람직하게는 비경구 투여용 제형으로 제제화될 수 있으며, 보다 바람직하게는 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 갖을 수 있다.

[0111] 본 발명의 상기 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0112] 본 발명의 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은, 1 일 1 mg/kg 내지 1,000 mg/kg일 수 있다.

[0113] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[0114] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 아니한다.

[0115] 본 발명의 상기 약학 조성물은 바람직하게는 비경구 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 색소가 침착된 부위의 피부에 국소적으로 도포하는 방식으로 투여될 수 있다.

[0116] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명의 상기 약학 조성물을 개체에 투여하여 피부 색소 침착 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0117] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 약학 조성물을 개체에 투여하여 피부 색소 침착 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

발명의 효과

[0118] 본 발명의 BSGT1 단백질은 진세노사이드의 3 번 탄소에 특이적으로 당을 결합시켜 당전이된 진세노사이드를 제조할 수 있도록 한다. 또한, 상기 효소를 이용해 제조한 진세노사이드 Ia는 세포 독성 없이 타이로시나제 활성을 감소시켜 멜라닌 합성을 억제하므로 피부 미백용 조성물로서 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0119] 도 1은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)에 의한 진세노사이드 F1에서 진세노사이드 Ia로의 변환 반응을 나타낸 것이다.

도 2는 재조합 BSGT1의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다. M, 분자 질량 마커; 1, pMAL-BSGT1을 도입한 재조합 BL 21 (DE3) 세포의 조추출물; 2, MBP-결합 아가로스 수지로 정제한 pMAL-BSGT1.

도 3은 재조합 BSGT1의 최적 활성 조건을 확인한 결과이다. a: 금속 이온, b: pH, c: 온도.

도 4는 재조합 BSGT1에 의한 진세노사이드 F1의 변환 시간을 HPLC 분석으로 확인한 것이다.

도 5는 재조합 BSGT1으로 변환한 진세노사이드 Ia의 질량 분석 결과이다.

도 6은 진세노사이드 Ia 및 진세노사이드 F1을 처리한 B16BL6 세포의 세포 생존율 (%)을 나타낸 것이다. 세포

생존율은 MTT 분석으로 확인하였다. 데이터는 미처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었고 두 번의 반복 실험에 대한 평균 $\pm$ 표준편차 값이다. ***P < 0.0001 vs 대조군.

도 7은 멜라닌 함량에 대한 진세노사이드 Ia의 효과를 나타낸 것이다. 데이터는 α -MSH를 처리한 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며 두 번의 반복 실험에 대한 평균 $\pm$ 표준편차 값이다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. α -MSH 처리 대조군.

도 8은 타이로시나제 활성에 대한 진세노사이드 Ia의 효과를 나타낸 것이다. 데이터는 α -MSH를 처리한 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며 두 번의 반복 실험에 대한 평균 $\pm$ 표준편차 값이다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. α -MSH 처리 대조군.

도 9는 진세노사이드 F2의 화학 구조를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0120] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0121] 본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) KCTC1022 유래 UDP-당전이 효소를 코딩하는 BSGT1 유전자를 클로닝하고 발현시켰다. 진세노사이드 Ia (saponin (20S)-3 β ,6 α ,12 β ,20-tetrahydroxydammar-24-ene (20-O- β -D-glucopyranosyl)-3-O- β -D-glucopyranoside)는 진세노사이드 F1을 기질로 이용하여 상기 재조합 바실러스 서브틸리스 KCTC1022로 변환하여 수득하였다 (도 1). 상기 글리코실화 산물은 C-3 위치에 추가적인 β -글루코피라노실기 (β -glucopyranosyl group)를 갖는다.

[0122] 실시예 1: 재료

[0123] 진세노사이드 F1은 인삼소재은행, B16BL6 멜라노마 세포주는 한국 세포주은행, 아르부틴은 Abcam (Cambridge, UK), UDP-글루코스 및 α -MSH는 시그마 (St. Louis, MO), MITF 및 타이로시나제 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

[0124] 실시예 2: 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래 재조합 UDP-당전이 효소 BSGT1의 클로닝, 발현 및 정제

[0125] 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적인 당전이 활성을 가지는 BSGT1 단백질 (서열번호 4)을 수득하기 위하여, 먼저 유전체 DNA 추출 키트 (GeneA11, Korea)를 이용하여 바실러스 서브틸리스로부터 유전체 DNA를 분리하였다. *Pfu* DNA 중합효소 (GeneA11, Korea)로 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 유전체 DNA에서 UDP-당전이 효소 유전자를 증폭시켰다. BSGT1 유전자 (서열번호 3)는 다음의 프라이머를 이용하여 증폭시켰다 (*Nde*I 및 *Eco*RI 제한효소 인식 부위는 bold 체로 표기): BSGT1 F (5'-CGCATATGATGATTTACATGGTTGGTGAAA-3', 서열번호 1) 및 BSGT1 R (5'-CGGAATTAAAAGACGCTGATAATACTG-3', 서열번호 2).

[0126] 증폭된 단편을 *Nde*I와 *Eco*RI로 자르고, EzFusion Cloning 키트 (Enzynomics, Korea)를 이용하여 pMAL-c5X 벡터에 삽입하여 MBP (maltose-binding protein)-BSGT1 융합 유전자를 제조하였다. Genotech facility (한국, 대전)에서 상기 증폭된 유전자 (BSGT1)의 서열을 확인하였다. 재조합 pMAL-BSGT1을 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환시키고, 37 °C, 600 rpm에서 0.4의 밀도 (OD₆₀₀)로 LB (Luria-Bertani)-앰피실린 배지에서 배양하였다. 상기 대장균은 28 °C에서 추가적으로 9 시간 동안 배양한 뒤 4 °C, 5,000 x g로 20 분 동안 원심분리하여 수득하였다. 그 다음 상기 세포를 20 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0, 1 mM EDTA 및 1 mM NaCl)으로 2 회 세척하고 20 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)에 재현탁하였다. 그 다음, 상기 세포를 얼음에서 파쇄하고, 4 °C, 12,000 x g에서 20 분 동안 원심분리하여 찌꺼기를 제거하였다. 융합 단백질은 아밀로스 수지 컬럼 (amylose resin column, New England bioLabs, UK)으로 정제하였다. 상층액을 수거하고, 12 % SDS-PAGE 및 Coomassie blue 염색으로 단백질의 균질성을 평가하였다.

[0127] 실시예 3: pH, 온도 및 금속 이온에 따른 효소 활성 분석

[0128] 0.5 mM 진세노사이드 F1을 기질로 사용하여 200 μ l 반응 용액에서 다음과 같이 초기 생체 내 변환 실험을 수행하였다.

[0129] (1) 10 mM의 Co²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, Na⁺, Cu²⁺, NH₄⁺, K⁺, Ca²⁺, 및 Zn²⁺가 존재하는 조건에서, 30 °C에서 30 분 동안

BSGT1의 활성을 평가하였으며 금속 이온이 없는 대조군과 비교하였다.

[0130] (2) 30 °C, 최적 금속 이온 농도에서 20 mM Tris-HCl을 함유하는 pH 2.0, pH 4.0, pH 6.0, pH 8.0, 및 pH 10.0의 완충액 및 Tris-NaOH를 함유하는 pH 12.0의 완충액에서 pH에 따른 효소 활성을 확인하였다.

[0131] (3) 최적 pH 및 금속 이온 조건에서 48 시간 동안 각각 20 °C, 30 °C, 37 °C, 50 °C 및 60 °C에서 온도에 따른 효소 활성을 확인하였다.

[0132] 표본은 일정한 간격을 두고 분석하였고, 동량의 물 포화 n-부탄올 (water-saturated n-butanol)을 각 표본에 첨가하여 반응을 종결시켰다. 진세노사이드 F1을 함유하는 상층액 및 변환된 산물을 TLC, HPLC 및 LC/MS를 이용하여 분석하였다.

[0133] **실시예 4: 진세노사이드의 TLC 분석**

[0134] 효소 추출물을 회수하여 상온에서 건조시켰다. 현상 용액 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (65 : 35 : 10, v/v/v, 저위상)으로 Silica Gel 60 플레이트에서 TLC 분석을 수행하였다. TLC 플레이트 상의 스팟은 10 % H_2SO_4 를 분사한 뒤 110 °C에서 10 분간 열을 가해 검출하였다.

[0135] **실시예 5: 진세노사이드의 HPLC, NMR 및 MS 분석**

[0136] 반응 용액을 물 포화 n-부탄올에서 추출하고 진공 상태에서 증발시켰다. Agilent 1260 시스템 (Agilent)을 이용하여 HPLC를 수행하였다. HPLC 등급의 아세토나이트릴 (acetonitrile) 및 물은 SK Chemicals (한국, 울산)에서 구입하였다. 1.6 ml/분의 유속으로 85 % B 5 분, 79 % B 20 분, 42 % B 55 분, 10 % B 12 분 및 85 % B 18분의 아세토나이트릴 (용매 A), 증류수 (용매 B) 이동상을 이용하여 C18 컬럼 (250 x 4.6 mm, ID 2.6 μm)에서 분리를 수행하였다. 각 표본은 UV 203 nm 흡광도에서 검출하였다.

[0137] ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR로 진세노사이드의 구조를 확인하였다. Bruker AV 600NMR 스펙트로미터로 100 MHz에서 피리딘- d_5 를 용매로 사용하여 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 얻었다.

[0138] MS 분석은 Finnigan LCQ-Advantage 질량분석기로 수행하였다 (Ion Mode: FAB-; Elements: C 43/0, H 72/0, O 14/0; Mass Tolerance: 1000 ppm, 10 mmu if $m/z < 10$, 20 mmu if $m/z > 20$; Unsaturation: -0.5-50.0).

[0139] **실시예 6: 세포 배양**

[0140] B16BL6 세포는 10 % FBS (fetal bovine serum) 및 1 % 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium)으로 37 °C, 습도 95 %/ CO_2 5 % 조건에서 배양하였다.

[0141] **실시예 7: 세포 생존율 분석**

[0142] 진세노사이드 F1 및 진세노사이드 Ia에 대한 세포 생존율 분석은 MTT (Life Technologies)를 이용하여 포르마잔 (formazan)으로 변환을 확인하여 수행하였다. 96-웰 플레이트 (Corning Costar)에 세포를 웰 당 1×10^5 개의 밀도로 접종하고 24 시간 배양한 뒤, 다양한 농도의 진세노사이드 F1 및 Ia (1 내지 200 μM)로 5 일 동안 처리하였다. 그 다음, 10 μl MTT (5 mg/ml 함유 PBS)를 각 웰에 첨가하였다. 37 °C에서 3 시간 세포를 배양한 다음, 포르마잔 결정을 용해시키기 위해 DMSO (100 μl)를 첨가하였다. ELISA 리더기 (Bio-Tek Instrument, USA)를 이용하여 630 nm의 레퍼런스 파장으로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0143] **실시예 8: 멜라닌 함량 측정**

[0144] 배양된 B16BL6 세포의 멜라닌 함량을 측정하였다. 6-웰 플레이트에 α -MSH (1 μM)와 함께 웰 당 2×10^5 개의 밀도로 세포를 접종하였다. 24 시간 후, 상기 세포를 100 μM 의 진세노사이드 F1, 진세노사이드 Ia 또는 아르부틴 (arbutin)으로 5 일 동안 처리하였다. PBS로 세척한 뒤, 상기 세포를 트립신 처리하여 회수하였다. 80 °C에서 한 시간 동안 10 % DMSO를 함유하는 1 N NaOH 500 μl 에 상기 세포 펠렛을 반응시켰다. ELISA 리더기 (Bio-Tek Instrument, USA)를 이용하여 475 nm 흡광도에서 상대적 멜라닌 함량을 측정하였다. 각 실험에 대해 합성 멜라닌 (0 내지 500 $\mu\text{g/ml}$)의 표준 곡선을 구하였다. 멜라닌 생산량은 미처리 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0145] **실시예 9: 타이로시나제 활성 분석**

[0146] 타이로시나제 활성은 DOPA 옥시데이즈 (oxidase) 활성을 통해 간접적으로 측정하였다. 세포는 6-웰 플레이트에 웰 당 4×10^5 개의 밀도로 배양하였다. 24 시간 뒤, 상기 세포에 100 μ M의 진세노사이드 F1, 진세노사이드 Ia 또는 아르부틴을 5일 동안 처리하였다. 그 다음, 배지를 제거하고, 세포를 차가운 PBS로 세척한 뒤 1 % Triton X-100을 함유하는 포스페이트 완충액 (pH 6.9)으로 용해시켰다. 상기 혼합물을 -80 °C에서 15 분, 상온에서 10 분간 인큐베이션하였다. 그 다음 표본을 12,000 g에서 15 분 동안 원심분리하였다. Bradford 방법을 이용하여 단백질 양을 측정하고 용해 완충액으로 농도를 조정된 뒤, 90 μ l의 상층액에 10 μ l의 기질 (15 mM L-DOPA 함유 48 mM 소듐 포스페이트 완충액 pH 7.1)을 첨가하고 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, ELISA 리더기 (Bio-Tek Instrument, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 확인하였다.

[0147] **실시예 10: 통계 분석**

[0148] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차 (S.E.)로 나타내었으며, 모든 실험은 두 번씩 반복하였다. 처리군의 평균 값은 Student's t-test를 이용하여 미처리 대조군과 비교하였다. p-값이 0.05 이하인 경우 통계적 유의한 것으로 처리하였다.

[0149] **실험예 1: 대장균 BL21에서 BSGT1의 이종 발현 (heterologous expression)**

[0150] 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유전체로부터 BSGT1 유전자를 클로닝하였다. 상기 유전자는 393 아미노산 잔기를 코딩하는 1,179 bp 뉴클레오티드로 구성되며 당전이 효소 패밀리 1의 단백질 도메인과 상동성을 갖는다. 상기 BSGT1 유전자를 pMAL-C5X 벡터에 삽입한 후 대장균 BL21 (DE3)에서 발현시켰다. MBP-BSGT1 융합 단백질을 MBP 아밀로스 수지에서 정제하고, 세포 용해물의 상층액 및 정제된 단백질을 이용하여 SDS-PAGE 분석을 수행하였다 (도 2). 상기 재조합 단백질의 분자량은 86.1 kDa으로 확인되었다.

[0151] **실험예 2: 효소 활성에 대한 온도, pH 및 금속 이온의 효과**

[0152] 금속 이온 프로필 테스트에서, 효소 활성은 Co^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Cu^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} 및 Zn^{2+} 에 의해 상당히 촉진되었다. 효소 활성에 대한 최적의 금속 이온은, 특히 Co^{2+} 에 의해 강하게 영향을 받는 것으로 확인되었다 (도 3a). 상기 효소는 20 mM Tris-HCl pH 6에서 최적의 활성을 보였다 (도 3b). BSGT1의 최적 온도 범위는 20-30 °C였으나, 재조합 BSGT1은 30 °C에서 최대 활성을 보였다 (도 3c).

[0153] **실험예 3: BSGT1에 의한 진세노사이드 F1의 변환 생성물 확인**

[0154] 본 발명에서, 진세노사이드 Ia는 진세노사이드 F1의 생체 외 효소 변환으로 생성되었다. 당전이 효소 BSGT1에 의한 진세노사이드 F1의 변환 수율을 HPLC 분석을 통해 정량적으로 확인하였다 (도 4).

[0155] 구체적으로 진세노사이드 Ia의 생산을 위해, 0.5 mM 진세노사이드 F1 기질 및 2.5 mM UDP-글루코스를 24 시간 동안 사용하였다. 반응 생성물의 변환 수율은 45.6 %이었다. 흰색의 무정형 분말인 반응 생성물은 음성 HRFABMS 및 ^{13}C -NMR (DEPT) 스펙트럼에서 987.5532 m/z의 분자 이온 피크 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, $\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{O}_{14}$ 가 799.4844로 계산됨)를 통해 $\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{O}_{14}$ 의 분자식을 가지는 것으로 추정되었다 (도 5). 또한, 반응 생성물의 IR 스펙트럼은 OH 기에 대한 3401 cm^{-1} 및 이중 결합에 대한 1649 cm^{-1} 에서 흡수 밴드가 나타났다. ^1H - 및 ^{13}C -NMR 데이터는 추가적인 6 탄당을 제외하면 진세노사이드 F1과 유사하게 나타났다. ^{13}C -NMR에서는 하나의 헤미아세탈 (δC 107.1), 네 개의 산화 메틴 (oxygenated methine) (δC 78.2, 78.1, 76.4, 74.0), 그리고 하나의 산화 메틸렌 (δC 62.9)의 당 신호가 나타났으며, 이는 상기 당이 β -글루코피라노스 (β -glucopyranose)임을 의미한다. 상기 아노머 (anomer) 수산화기의 β -배열은 아노머 수소 신호의 커플링 상수 (δH 4.31, d, $J=7.8\text{ Hz}$)로 확인하였다. 글리코실화 쉬프트 (shift)에 따라 진세노사이드 F1에 비해 11.3 ppm 다운필드 (downfield)로 이동한 C-3의 케미컬 쉬프트 (δC 90.8)가 관찰되어 상기 당이 C-3 수산화기에 연결되어 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, HMBC 스펙트럼으로 두 당이 C-3 및 C-20에 위치하는 것을 확인하였다. 두 아노머 수소 신호 H-1' 및 H-1'' (δH 4.61, d, $J=7.8\text{ Hz}$)은 각각 산화 메틴 탄소 신호 (δC 90.8, C-3)와 산화 쿼터너리 (quaternary) 탄소 신호 (δC 85.0, C-20)의 교차 신호 (cross peak)가 나타났다. 이를 종합하면, 상기 결과로부터 BSGT1에 의한 진세노사이드 F1의 변환 생성물이 진세노사이드 Ia인 (20S)-3 β , 6 α , 12 β , 20-테트라히드록시다마르-24-엔 (20-O- β -D-글루코피라노실)-3-O- β -D-글루코피라노사이드 ((20S)-3 β , 6 α , 12 β , 20-tetrahydroxydammar-24-ene (20-O- β -D-glucopyranosyl)-3-O- β -D-glucopyranoside)임을 알 수 있었다 (표 1). 또한, 이를 통해 본 발명의 BSGT1은 진세노사이드 F1의 6 번 및 12 번 탄소는 당전이시키지 않으며, 3 번 탄소 특이적으로 당전이 활성을 가지는 것을

알 수 있었다.

표 1

¹H- (400 MHz) and ¹³C-NMR (100 MHz) data (CD₃OD) of ginsenoside Ia

C	δ _C	δ _H
1	40.1	-
2	27.3	-
3	90.8	3.13, dd, J=3.7, 8.0 Hz
4	41.1	-
5	62.5	-
6	68.9	4.03, ddd, J=3.7, 10.6, 10.6 Hz
7	47.3	-
8	42.1	-
9	50.6	-
10	39.9	-
11	31.4	-
12	71.3	3.28, m
13	49.5	-
14	52.5	-
15	31.1	-
16	27.1	-
17	53.2	-
18	17.9	1.11, 3H, s
19	17.8	1.05, 3H, s
20	85.0	-
21	22.9	1.35, 3H, s
22	36.7	-
23	24.4	-
24	126.0	5.11, t, J=5.3 Hz
25	132.4	-
26	26.0	1.66, 3H, s
27	18.1	1.63, 3H, s
28	31.8	1.37, 3H, s
29	17.0	0.96, 3H, s
30	17.4	0.97, 3H, s
C-1'	107.1	4.31, d, J=7.8 Hz
C-2'	76.4	-
C-3'	78.2	-
C-4'	74.0	-
C-5'	78.1	-
C-6'	62.9	-
C-1''	98.4	4.61, d, J=7.8 Hz
C-2''	75.5	-
C-3''	78.4	-
C-4''	72.0	-
C-5''	77.8	-
C-6''	62.7	-

[0156]

[0157] 실험예 4: 진세노사이드 Ia의 세포 독성 평가

[0158] 멜라노마 (melanoma) 세포에서 진세노사이드 Ia의 세포 독성 효과를 확인하고자 하였으며, 세포 생존율 분석 결과는 도 6에 나타내었다. 세포 생존율은 가장 높은 농도 (200 μM)의 진세노사이드 Ia를 처리한 경우에도 90 % 이상으로 나타났다. 반면, 진세노사이드 F1에 대한 세포 생존율은 200 μM에서 68 %로 나타났다.

[0159] 실험예 5: 진세노사이드 Ia의 멜라닌 합성 억제 효과

[0160] B16BL6 세포를 α-MSH로 자극한 뒤 진세노사이드 Ia의 멜라닌 합성에 대한 효과를 도 7에 나타내었다. 100 μM의 아르부틴 및 진세노사이드 F1을 처리했을 때 세포 내 멜라닌 함량은 각각 96 % ± 0.02 % 및 65 % ± 0.02 %로 감소하였으나, 같은 농도의 진세노사이드 Ia를 처리한 경우에는 56 % ± 0.02 %로 상당히 감소하였다.

[0161] 실험예 6: 진세노사이드 Ia의 타이로시나제 활성 억제 효과

[0162] 도 8에서 보이는 바와 같이, α-MSH를 처리한 B16BL6 세포에서 진세노사이드 Ia는 아르부틴과 유사한 수준으로 세포 내 타이로시나제 활성을 감소시켰다. 또한, 진세노사이드 Ia는 진세노사이드 F1 보다 동일 농도에서 현저히 우수한 효과를 보였다.

[0163] 이를 통해, 진세노사이드 Ia가 3 번 탄소에 당전이 되지 않은 진세노사이드 F1 보다 멜라닌 합성 및 타이로시나제 활성을 억제하는 효과가 매우 높음을 확인한바, 진세노사이드 Ia를 피부 미백 및 색소 침착 개선, 피부 색소 침착 질환의 예방 및 치료 용도로 매우 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0164] **실험예 7: BSGT1에 의한 진세노사이드 화합물 K (Compound K, CK)의 변환 생성물 확인**

[0165] 본 발명자들은 당전이 효소 BSGT1이 진세노사이드 F1 이외의 다른 진세노사이드에서도 3 번 탄소 특이적으로 당전이활성을 가지는지 확인하고자 하였다. 이에, BSGT1을 이용하여 상기 실험예 3과 동일한 방식으로 진세노사이드 CK의 3 번 탄소에서 당전이가 일어나는지 확인하였다.

[0166] BSGT1과 진세노사이드 CK의 반응 후 산물은 음성 HRFABMS 및 ^{13}C -NMR (DEPT) 스펙트럼에서 784.4969 m/z 분자이온 피크 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, $\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{O}_{13}$ 784.4973)를 보여 $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$ 의 분자식을 가지는 것으로 나타났다. 상기 산물의 IR 스펙트럼에서는 OH 기에 대한 3401 cm^{-1} 밴드, 그리고 이중 결합에 대한 1649 cm^{-1} 밴드가 나타났다. ^1H - 및 ^{13}C -NMR 데이터는 진세노사이드 CK와 유사하게 나타났으나, 추가적으로 육탄당을 가지는 것으로 나타났다. ^{13}C -NMR의 당 신호는 헤미아세탈 (δC 106.8), 네 개의 산화 메틴 (δC 78.4, 78.0, 75.5, 71.7), 및 하나의 산화 메틸렌 (δC 62.6)이 관찰되어, 상기 당은 β -글루코피라노스 (β -glucopyranose)인 것을 알 수 있었다. 상기 아노머 (anomer) 수산화 기의 β -배열은 아노머 수소 신호의 커플링 상수 (δH 4.32, d, $J=7.8\text{ Hz}$)로 확인하였다. 글리코실화 쉬프트 (shift)에 따라 진세노사이드 CK에 비해 11.2 ppm 다운필드 (downfield)로 이동한 C-3의 케미컬 쉬프트 (δC 90.8)가 관찰되어 상기 당이 C-3 수산화기에 연결되어 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, HMBC 스펙트럼을 통해 두 당의 위치가 C-3 및 C-20인 것을 확인하였다. H-1' 및 H-1''의 두 아노머 수소 신호 H-1' 및 H-1'' (δH 4.61, d, $J=7.8\text{ Hz}$)은 각각 산화 메틴 탄소 신호 (δC 90.7, C-3)와 산화 쿼터너리 (quaternary) 탄소 신호 (δC 85.0, C-20)의 교차 신호 (cross peak)가 나타났다 (표 2).

표 2

[0167]

C	δC	δH
1	40.4	1.70, 1.08, overlapped
2	27.3	1.92, 1.73, m
3	90.7	3.19, overlapped
4	40.3	-
5	57.6	0.80, br d, $J=11.4\text{ Hz}$
6	19.3	1.60, 1.50, overlapped
7	35.9	1.59, 1.32, overlapped
8	41.1	-
9	51.1	1.48, dd, $J=12.9, 1.8\text{ Hz}$
10	38.0	-
11	31.1	1.82, 1.23, m
12	72.0	3.65, ddd, $J=8.4, 8.4, 2.6\text{ Hz}$
13	49.9	1.76, m
14	52.6	-
15	31.7	1.61, 1.08, overlapped
16	27.3	1.98, 1.38, overlapped
17	53.2	2.29, m
18	16.9	0.93, s
19	17.3	0.93, s
20	85.0	-
21	22.9	1.34, s
22	36.7	1.84, 1.64, overlapped
23	24.3	2.07, 1.62, m
24	126.0	5.11, dd, $J=6.6, 6.7\text{ Hz}$
25	132.4	-
26	26.0	1.70, s
27	18.1	1.62, s
28	28.5	1.05, s
29	16.9	0.85, s

30	16.3	1.02, s
C-1'	106.8	4.32, d, $J=7.8$ Hz
C-2'	75.5	3.05, dd, $J=7.8, 7.8$ Hz
C-3'	78.4	3.35, dd, $J=7.8, 7.8$ Hz
C-4'	71.7	3.27, overlapped
C-5'	78.0	3.19, m
C-6'	62.6	3.85, dd, $J=12.0, 2.4$ Hz, 3.67, dd, $J=12.0, 5.4$ Hz
C-1''	98.4	4.61, d, $J=7.8$ Hz
C-2''	75.7	3.22, overlapped
C-3''	77.8	3.17, overlapped
C-4''	71.3	3.34, overlapped
C-5''	78.3	3.25, m
C-6''	62.9	3.78, dd, $J=12.6, 2.4$ Hz, 3.64, dd, $J=12.6, 5.4$ Hz

[0168] 이를 종합하면, 반응 산물은 (20S)-3 β , 12 β , 20-트리하이드록시다마르-24-엔-(20-O- β -D-글루코피라노실)-3-O- β -D-글루코피라노사이드 ((20S)-3 β , 12 β , 20-trihydroxydammar-24-ene (20-O- β -D-glucopyranosyl)-3-O- β -D-glucopyranoside) 즉, 진세노사이드 F2인 것으로 확인되었다 (도 9).

[0169] **실험예 8. 다른 당전이 효소와 BSGT1의 당전이 활성 비교**

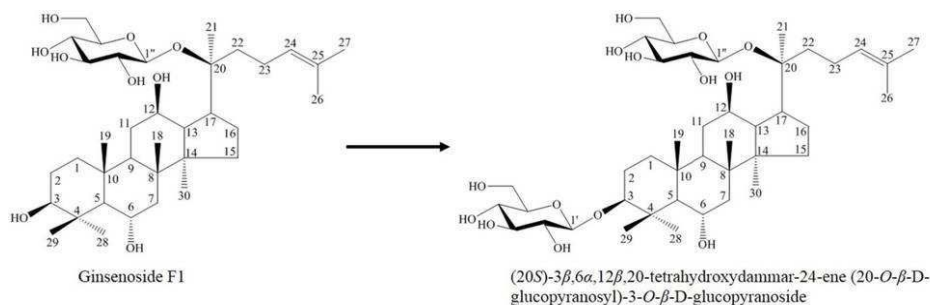
[0170] 진세노사이드 F1 및 CK에 대하여 본 발명의 당전이 효소인 BSGT1과 기존에 이미 알려진 당전이 효소들과의 당전이 활성을 비교한 결과, BSGT1은 다른 당전이 효소에 비해 진세노사이드의 3 번 탄소 특이적으로 가장 우수한 당전이 활성을 가진다는 것을 확인하였다.

[0171] 따라서, 본 발명의 BSGT1을 이용하여 진세노사이드 F1으로부터 진세노사이드 Ia, 진세노사이드 CK로부터 진세노사이드 F2를 제조할 수 있다. 나아가, BSGT1은 상기 확인한 진세노사이드 F1 및 진세노사이드 CK 외에도 3 번 탄소에 수산화기를 가지는 다른 진세노사이드에 대해서도 3 번 탄소 특이적인 당전이 활성을 가짐을 알 수 있다.

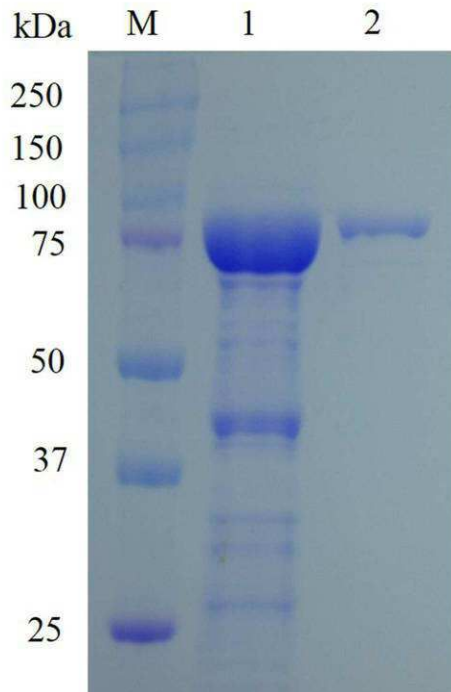
[0172] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

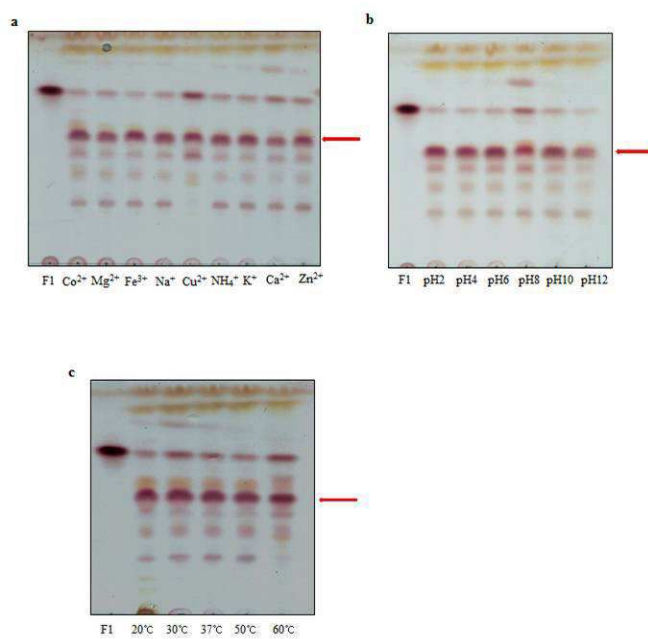
도면1



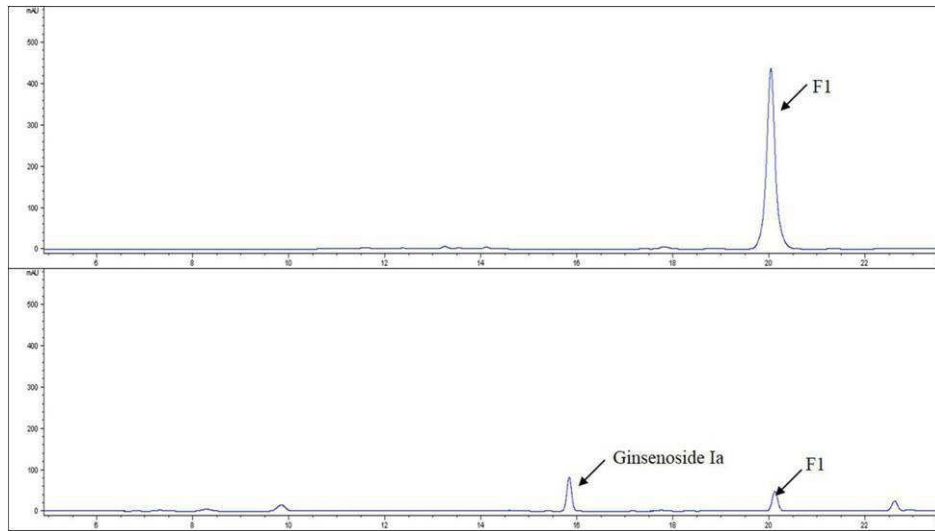
도면2



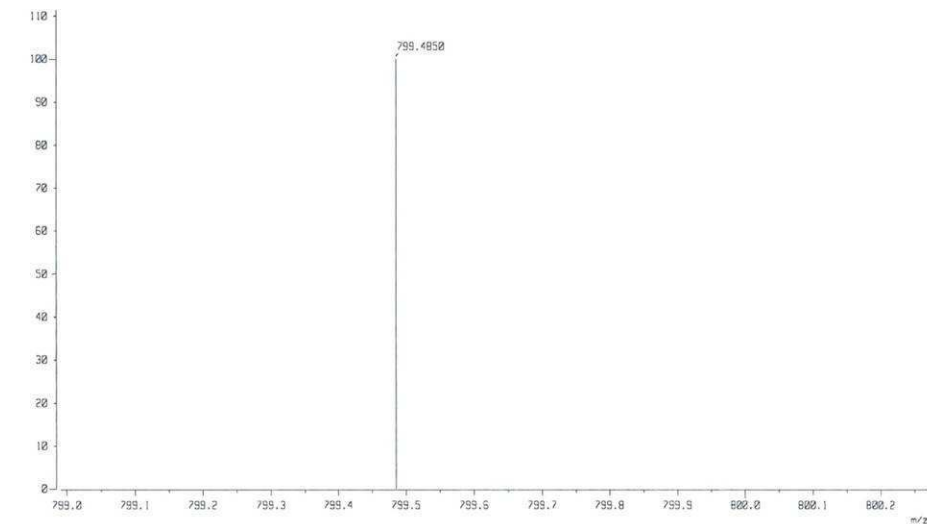
도면3



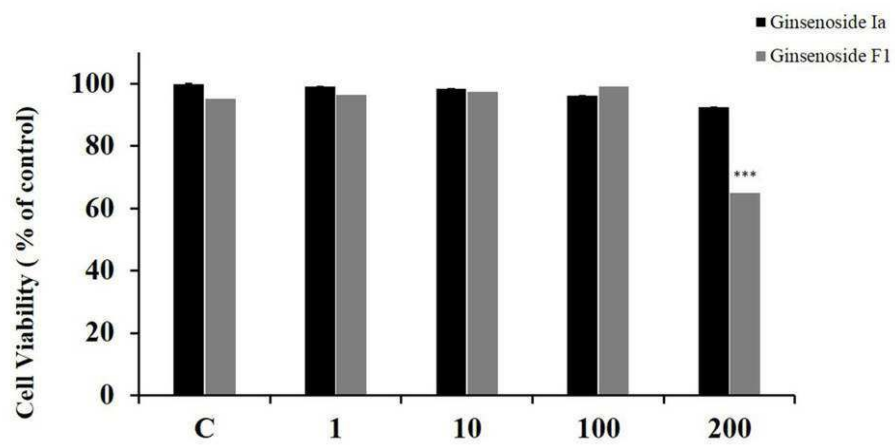
도면4



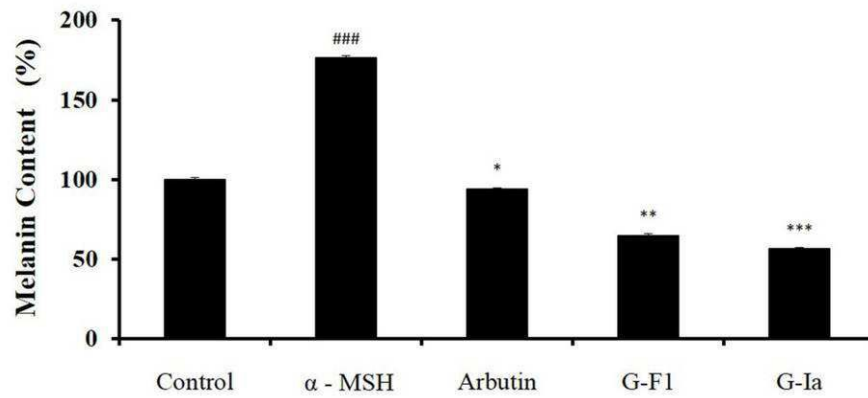
도면5



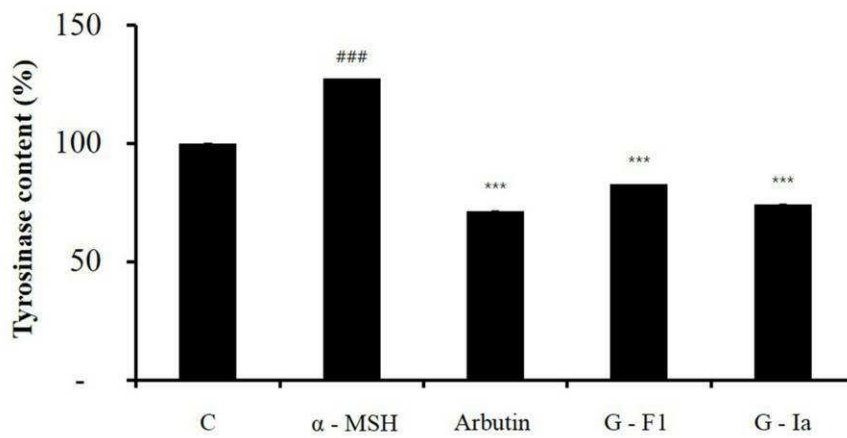
도면6



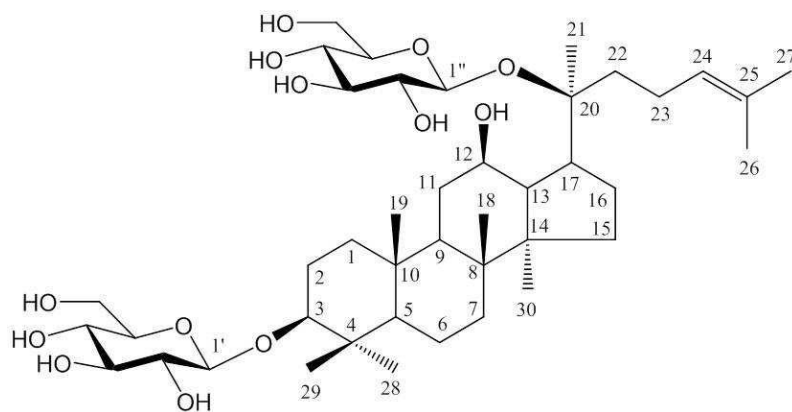
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A protein having glycosyltransferase activity to ginsenoside and use thereof

<130> KPA150816-KR

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSGT1 F primer

<400> 1

cgcatatgat gatttacatg gttggtgaaa 30

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> BSGT1 R primer

<400> 2

cggaattaaa agaacgctga taatactg 28

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSGT1

<400> 3

atgaaaaagt accatatttc gatgatcaat atcccggcat acggacatgt caatcctacg 60

cttgcttttag tagagaagct ttgtgagaaa gggcacctg tcacgtacgc gacgactgag 120

gagtttgcgc ccgctgttca gcaagccggt ggagaagcat tgatctatca tacatccttg 180

aatattgatc ctaagcaaat caggagatg atggaaaaga atgacgcgcc cctcagtctt 240

ttgaaagaat cactcagcat tctgccgcag cttgaggagt tatataagga tgatcagcct 300

gatctgatca tctatgactt tgttgcgctg gctggtaaata tgtttgctga aaagcttaat 360

gttccggtca ttaagctctg ttgcgcataat gcccaaaatg aatcctttca gttaggaaat 420

gaagacatgc tgaaaaaaat aagagaagca gaggtgaat ttaaagccta ctggagcaa 480
gagaagtgc cggtgtttc attgaacag ttagctgtgc cggaagcatt aaatattgtc 540
tttatgccga agtcttttca gattcagcat gagacgttcg atgaccgttt ctgttttgc 600
ggcccctctc tcggagaacg gaaggaaaaa gaaagcctgt tgattgacaa ggatgatcgc 660

ccgcttatgc tgatttcttt gggtacggcg tttaacgcat ggccggaatt ttacaagatg 720
tgcataagg catttcggga ttcttcattg caagtaatca tgcggttg gaaaacgatt 780
gatccagaaa gcttgagga tattctgtct aactttacca ttcgccaag tgtgccgcag 840
cttgaggtgt tagagaaagc tgattgttc atctctcatg gcgggatgaa cagtacgatg 900
gaagcgtatg acgcagggtg gccgctgtc gtcattccgc aaatgtatga gcaggagctc 960
actgcaaadc gggttgatga attaggcctt ggcgtttatt tgccgaaaga ggaagtact 1020
gtttccagcc tgcaggaagc ggttcaggct gtatccagtg atcaagagct gtcagccgc 1080

gtcaagaata tgcaaaagga tgtaaaagaa gctggcggag cggagcgtgc ggcagctgag 1140
attgaagcgt ttatgaaaaa atccgctgtc ccgcagtaa 1179

<210> 4

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BSGT1

<400> 4

Met Lys Lys Tyr His Ile Ser Met Ile Asn Ile Pro Ala Tyr Gly His

1 5 10 15

Val Asn Pro Thr Leu Ala Leu Val Glu Lys Leu Cys Glu Lys Gly His

20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ala Thr Thr Glu Glu Phe Ala Pro Ala Val Gln Gln

35 40 45

Ala Gly Gly Glu Ala Leu Ile Tyr His Thr Ser Leu Asn Ile Asp Pro

50 55 60

Lys Gln Ile Arg Glu Met Met Glu Lys Asn Asp Ala Pro Leu Ser Leu

65 70 75 80

Leu Lys Glu Ser Leu Ser Ile Leu Pro Gln Leu Glu Glu Leu Tyr Lys

85 90 95

Asp Asp Gln Pro Asp Leu Ile Ile Tyr Asp Phe Val Ala Leu Ala Gly

100 105 110
Lys Leu Phe Ala Glu Lys Leu Asn Val Pro Val Ile Lys Leu Cys Ser

115 120 125
Ser Tyr Ala Gln Asn Glu Ser Phe Gln Leu Gly Asn Glu Asp Met Leu

130 135 140
Lys Lys Ile Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Gln

145 150 155 160
Glu Lys Leu Pro Ala Val Ser Phe Glu Gln Leu Ala Val Pro Glu Ala

165 170 175

Leu Asn Ile Val Phe Met Pro Lys Ser Phe Gln Ile Gln His Glu Thr

180 185 190
Phe Asp Asp Arg Phe Cys Phe Val Gly Pro Ser Leu Gly Glu Arg Lys

195 200 205
Glu Lys Glu Ser Leu Leu Ile Asp Lys Asp Asp Arg Pro Leu Met Leu

210 215 220
Ile Ser Leu Gly Thr Ala Phe Asn Ala Trp Pro Glu Phe Tyr Lys Met

225 230 235 240
Cys Ile Lys Ala Phe Arg Asp Ser Ser Trp Gln Val Ile Met Ser Val

245 250 255
Gly Lys Thr Ile Asp Pro Glu Ser Leu Glu Asp Ile Pro Ala Asn Phe

260 265 270
Thr Ile Arg Gln Ser Val Pro Gln Leu Glu Val Leu Glu Lys Ala Asp

275 280 285
Leu Phe Ile Ser His Gly Gly Met Asn Ser Thr Met Glu Ala Met Asn

290 295 300
Ala Gly Val Pro Leu Val Val Ile Pro Gln Met Tyr Glu Gln Glu Leu

305 310 315 320

Thr Ala Asn Arg Val Asp Glu Leu Gly Leu Gly Val Tyr Leu Pro Lys
325 330 335

Glu Glu Val Thr Val Ser Ser Leu Gln Glu Ala Val Gln Ala Val Ser

340	345	350
Ser Asp Gln Glu Leu Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Gln Lys Asp Val		
355	360	365
Lys Glu Ala Gly Gly Ala Glu Arg Ala Ala Ala Glu Ile Glu Ala Phe		
370	375	380
Met Lys Lys Ser Ala Val Pro Gln		
385	390	