



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0000036
(43) 공개일자 2011년01월03일

(51) Int. Cl.

A61K 36/03 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0057371

(22) 출원일자 2009년06월26일

심사청구일자 2009년06월26일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

남택정

부산 남구 문현1동 53-3번지 부광주택 B-101호 16/2

황혜정

부산 사하구 괴정1동 530-13번지 협진태양아파트 3동 303호

(74) 대리인

이덕록

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 다시마 유래 당단백질을 함유한 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 다시마에서 분리한 당단백질을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 다시마 유래의 당단백질은 카스파아제 캐스캐이드 활성화, Wnt 신호전달과정, Nf κ -B 신호전달과정을 조절함으로써 HT-29 대장암세포의 성장을 저해할 수 있어 인간 대장암에 대한 신규한 천연 억제제로써 사용할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 지역MT특성화사업

연구과제명 부산 인근 해역에서 생산되는 해양식물로부터 신기능성 단백질 소재 개발

기여율

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2009년 1월 1일~2011년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다시마를 실온에서 6시간 물(80g/2L)로 추출한 후 여과하여 나온 상층액에 3배 부피의 에탄올을 첨가한 다음 에탄올 추출물을 감압농축하여 80% 황산암모늄을 첨가하고 4℃에서 웨이킹하여 원심분리한 후 남은 펠렛을 물로 녹이고 투석하여 나온 용액을 농축함을 특징으로 하는 다시마 당단백질 제조방법.

청구항 2

제 1항의 방법으로 얻을 수 있는 다시마 유래의 당단백질을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 인간의 대장암 항암용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 항암효과를 가진 다시마 당단백질에 관한 것으로 다시마에서 분리한 당단백질을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 식생활의 서구화 등으로 인해 대장암이 늘고 있다. 통계에 따르면, 인구 10만명당 1980년대 3.8명, 1995년 10명으로 증가하고 있고 전체 암 가운데 8.2%를 점유하며, 남자는 위암, 간암, 폐암에 이어 4위, 여자는 자궁경부암, 위암, 유방암에 이어 4위를 차지하고 있다. 대장암의 원인은 식생활 즉 먹는 음식물이 가장 큰 유발요인이라고 할 수 있다. 야채 과일 곡물을 섭취해서 대변량과 배변횟수가 많아지면 대장암이 발생이 적고, 가공식품 육류의 섭취가 늘어나면 반대로 증가되는데 특히 동물성 지방은 담즙산을 증가시켜 대장암을 유발시키는 주요 원인이다. 즉 대변의 세균으로부터 발암물질이 생산되는데 먹는 음식에 따라 발암물질의 농도가 달라진다. 대장의 폴립(용종)은 대장암의 중요한 전구병변인데 대장점막세포의 일부가 이상증식을 일으켜 혹이 되고 여러 단계를 거쳐 최종적으로 암으로 발전하게 되며 대장암의 80%는 이 단계를 거쳐 발생된다.

[0003] 해양 조류는 기능성 식품 및 약품개발의 발견적 측면에서 시료채취를 위한 커다란 생물학적 다양성을 제공해 주고 있다. 일반적으로 해양생물체는 그 잠재적인 항균 및 항암 활성을 갖는 화합물의 중요한 공급원이 된다. 해조류는 필수 단백질, 비타민 및 미네랄의 주요 공급원일 뿐만 아니라 몇몇 종의 조류는 항-종양, 항균 또는 면역-촉진 활성을 갖는 2차 대사체, 다당체 및 당단백질을 생산하거나 함유하고 있다.

[0004] 해조류 중 갈조류는 알지네이트, 푸칸 및 라미나린을 포함한 다양한 용해성 다당체와 더불어 셀룰로오스로 구성된 불용성 섬유질을 함유한다(Mabeau & Kloareg, 1987 ; Yan et al., 1996 ; Lahaye & Kaeffer, 1997). 그중에서도 다시마(*Laminaria japonica*)는 한국, 중국 및 일본의 해안 지방에서 널리 소비되고 있는 갈조류이다. 다시마는 조미재료로 예부터 널리 이용되어 왔으며, 단백질 성분인 글루탐산과 아스파탐산을 다량 함유하고 있어 국물 제조에 널리 이용되어 왔다. 다시마에는 다당류가 가장 많으며, 그 종류로는 알긴산과 셀룰로오스, 그리고 수용성인 푸코이딘 등이 있다. 그 외, 요오드를 비롯해 칼륨, 나트륨, 칼슘, 마그네슘 등 무기질을 다량 함유하고 있고 이외에 철, 아연, 구리, 셀레늄 등이 ppm 단위로 다양하게 들어있다. 이렇듯 다양한 생리활성적 효과를 지니고 있는 다시마임에도 불구하고 우리나라에서는 다시마를 직접 사용하는 식품관이 발달하지 못하였다. 그 원인으로는 부드러운 미역에 비하여 다시마는 단단하여 식용으로 어렵다는 점과 양적으로 미역에 비하여 적었던 점을 들 수 있다. 다양한 가공방법과 상품의 개발로 최근 다시마의 소비가 폭발적으로 증가하는 추세이기는 하지만, 대부분 전초를 건조하여 만든 분말이 상품화되고 있는 실정이다. 다시마의 소비를 늘리고 그를 통해 국민 보건을 향상시키기 위해서는 다시마의 효능을 널리 알리고, 홍보하는 점이 가장 중요하다 할

수 있겠다.

[0005] 해조류와 항암효과에 관한 지금까지의 특허 등록 및 출원 현황을 살펴보면,

[0006] 대한민국 특허출원 제 10-1993-0002251호 “해조류에서 추출한 다당체를 주로 하는 항암효과가 있는 건강 보조 식품의 제조방법” 에서는 톱으로부터 추출한 다당체의 항암 및 면역기능이 개시되어있다. 그러나, 아직까지 다시마유래의 당단백질의 항암활성에 대하여는 보고된 바 없다.

[0007] 본 발명자들은 천연 해조류인 다시마로부터 항암활성을 갖는 생리활성물질을 탐색하기위의 예의 연구를 거듭한 결과, 다시마로부터 당단백질을 분리하였고, 그 분자 활성 메카니즘을 밝힘으로써 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 대장암 억제 활성을 갖는 다시마 유래 당단백질의 신규한 용도를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명의 목적은 다시마로부터 당단백질을 추출 및 정제하고, 이들의 대장암 억제효과를 확인함으로써 달성하였다.

[0010] 특히, 본 발명에 따른 다시마 유래의 당단백질은 HT-29 대장암세포주의 증식을 억제, 카스파아제 캐스케이드의 활성화, Wnt 신호전달과정의 억제를 통해 대장암세포의 증식을 억제시킴으로써 항암효과를 나타냄을 확인하였다.

효 과

[0011] 본 발명 다시마로부터 당단백질을 추출·정제하는 효과가 있고, 본 발명 다시마 유래 당단백질을 유효성분으로 함유하는 대장암 억제용 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

[0012] 이하, 본 발명의 구체적인 내용을 실시예를 들어 상세히 설명한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 생리작용에 의해 그 효능을 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질 군으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0014] 본 발명에서는 먼저 다시마로부터 당단백질을 추출 및 정제하고, 나아가 HT-29 대장암 세포주를 이용하여 인간 대장암억제 효과를 탐색하였다.

[0015] 다시마속 식물은 태평양 연안에 20여 종이 자라고 있으며 10m 이상의 큰 종류도 있는데, 주요 종으로는 참다시마(L.japonica)·오호츠크다시마(L.ochotensis)·애기다시마(L.religiosa) 등이 있다. 옛날부터 한국을 비롯하여 일본·중국에서 식용해왔다.

[0016] 중국에서는 높은 수온에서도 잘 자라는 품종을 개발하여 양식하고 있다. 한국에서는 양식이 동해안부터 제주도를 제외한 전 연안에서 이루어진다. 주로 양식하는 종류는 일본 홋카이도 원산의 참다시마인데, 원산지에

서는 12~3월에 어린잎[幼葉]이 나와서 7월까지 성장한다. 이 종은 아직 엽체가 얇고 가벼워서 상품가치가 없으며 초가을에서 겨울까지 자란 다음, 포자를 내보내고 나면 엽체 끝부분이 점점 녹아버려 심하면 밀동만 남는다.

[0017] 다시마는 각종 내상기 질병으로 인한 식욕부진, 만성피로, 위장질환 등에 유효하며 장기의 실열로 인한 변폐에 통변하는 작용이 강하고 간염, 간암, 위궤양, 위암에 좋은 식품으로 알려져 있다. 또한 신진대사기능의 부조화로 야기되는 부종증과 산후부종에 매우 좋다. 그러나 갑상선 기능의 이상이 있는 사람에게는 좋지 않으며 각종질병으로 인한 만성피로에 달임물이나 건조 시켜서 제분화해서 복용하기도 하며 만성피로와 변비를 호소하는 환자에게 백급과 다시마 가루를 환 내어 매일 40그램씩 복용시킨 결과 대부분의 환자에서 한달 내에 만성피로와 변비가 개선되었으며 환자들의 국물 맛을 내는 양념으로 훌륭한 재료가 된다.

[0018] 인간 대장암은 대장의 가장 안쪽 표면인 점막에서 발생한 암으로 아주 흔하다. 식생활 등의 환경요인이 서구화되어감에 따라 그 발생빈도는 계속 증가하고 있으며, 우리나라에서는 소화기 암중에서 위암 다음으로 두 번째로 흔히 발생한다. 식사가 대장암을 예방하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉 섬유질이 많고 지방이 적은 식사를 하면 대장암을 예방할 수가 있다. 섬유소는 그자체로 발암물질의 생성을 억제하며 또한 변비를 예방하여 대장점막이 발암물질과 접촉할 수 있는 기회를 줄여준다. 섬유소가 많은 음식으로는 각종 채소와 해조류를 들 수 있다.

[0019] 따라서 해조류 중의 섬유소와 대장암발생과의 관련성에 대해서는 이미 여러 연구를 통해 밝혀진 바 있으나, 해조류중의 단백질과 대장암과의 관련성에 대해서는 연구된 바 없다.

[0020] 본 발명에서는 해조류중 다시마에서 도 1에 도시한 바 절차에 따라 추출·정제한 당단백질의 대장암억제효과 유무와 그 작용기전을 밝힘으로써 대장암억제용 기능성 식품 원료로서의 당단백질 사용가능성을 제시하고자 시도하였다.

[0021] 해조류중 다시마로부터 당단백질의 추출

[0022] 부산 기장에서 채취한 다시마를 실온에서 6시간 물(80g/2L)로 추출한 후, 여과하여 나온 상층액에 3배 부피의 에탄올을 첨가한다. 에탄올 추출물을 감압농축하여 80% 황산암모늄을 첨가하고 4℃에서 shaking한다. 원심분리 후, 남은 pellet을 물로 녹이고 투석하여 나온 용액을 농축하여 다시마 당단백질 공시재료로 사용하였다(도 1).

[0023] SDS-PAGE 및 염색

[0024] 각각의 획분에 2X Laemmli sample buffer (13.3% SDS, 0.4 M Tris, 0.013% bromophenol blue, 40% glycerol, pH 6.5)를 1X의 농도가 되도록 첨가하고, Mighty Small II Apparatus (Hofer Science Instrument, USA)를 사용하여 12.5% - 20% 사이의 SDS-polyacrylamide 겔에 전기영동하였다. 전기영동 후, 겔에 분리된 단백질은 coomassie brilliant blue R-250법과 glycoprotein staining kit로 염색과 탈색하여 확인하였다.

[0025] 항암효과 검증용 위한 실험

[0026] 한국 세포주 은행 (서울의대)로부터 인체 결장암세포 (HT-29 human colon cancer cell)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였으며, MTT assay를 통해 세포사멸 정도를 측정하였다.

[0027] HT-29 세포 성장 억제 효과 검증

[0028] < 세포배양 및 MTT assay를 통한 세포생존율 측정 >

[0029] 상기 기술한 방법과 마찬가지로, 한국 세포주 은행 (서울의대)로부터 분양받은 인체 결장암세포 (HT-29

human colon cancer cell)를 배양하였다. 이들 세포는 RPMI 배지를 사용하여, 37° C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양중인 세포를 1주일에 2번 refeeding하고, confluent가 되면 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 뒤 0.05% trypsin용액으로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 다음 피펫으로 각각의 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 동일하게 분주한다.

[0030] 다시마 당단백질을 농도별 (0, 6.25, 12.5, 25., 50, 100 μ g/mL)로 24시간 처리한 후, 세포성장율을 MTT assay를 통해 측정 하였다. 즉, 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하고, 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지로 희석하여 배양하였다. 24시간이 지난 후, 무혈청 배지로 교환하고 다시 24시간 혹은 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지에 각각의 샘플을 다양한 농도로 첨가하였다. 24시간 경과 후, MTS/PMS solution (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, Promega Co., USA)을 첨가하고 37° C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 다음, ELISA plate reader를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0031] < Western blot analysis >

[0032] 각각의 세포를 100-mm diameter culture dish에서 confluent monolayer가 될 때까지 10% FBS를 함유하는 배지로 배양한 다음, 무혈청 배지로 교환하여 24시간 배양한다. 24시간 경과 후, 아세트아미노펜과 각각의 추출물을 농도별로 첨가한 무혈청 배지로 처리하여 다시 24시간동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 냉 PBS용액으로 세척한 다음 1% Triton이 함유된 cell lysate buffer로 세포를 희수하였다. 원심분리 후 취한 상층액에 4X Laemmli sample buffer (13.3% SDS, 0.4 M Tris, 0.013% bromophenol blue, 40% glycerol, pH 6.5)를 1X의 농도가 되도록 첨가하고, Mighty Small II Apparatus (Hofer Science Instrument, USA)를 사용하여 12.5% SDS-polyacrylamide 겔에 전기영동하였다.

[0033] 전기영동 후, 겔에 분리된 단백질은 Semi-dry Transfer Unit(Sigma, USA)를 사용하여 Immobilon-P 멤브레인 (Millipore Corp., pore size; 0.1 μ m, USA)으로 옮기고, 1% BSA가 함유된 1 $\times$ TBS (Tris-buffered saline; 20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1 M HCl)에서 2시간동안 실온에서 반응시킨 다음 1차항체로 4° C에서 하룻밤 방치시켰다.

[0034] TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)로 10분씩 3번 세척하고 1:20,000으로 희석한 anti-rabbit or anti-mouse IgG-conjugated horseradish peroxidase 2차 항체와 함께 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 2차항체로 반응시킨 멤브레인은 TBS-T로 10분간 3번 세척하고 Supersignal west pico stable peroxide solution과 Supersignal west picoluminol / enhancer solution을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켜 각각의 단백질을 밴드로 확인하였다.

[0035] < Hoechst33342염색 >

[0036] HT-29 세포를 PBS로 세척하고 3.7% 파라포름알데하이드로 상온에서 10분간 고정시킨 후, 형광물질인 Hoechst 33342를 30분간 처리하고 30분 후, PBS로 세척하고, 100% 에탄올로 탈수시킨 다음, 형광현미경으로 관찰하였다.

[0037] 다시마 유래 당단백질의 항암효과를 확인하기위해 HT-29 대장암세포 성장에 대한 다시마 유래 당단백질의 효과를 관찰한 결과를 알 수 있다 즉, 다시마 유래 당단백질 24시간 처리로 대장암세포 증식을 농도의존적으로 억제하였으며, Hoechst33342에 의한 세포형태관찰에서 아포토시스(apoptosis)의 전형적인 형태인 염색체분열을 관찰할 수가 있었다(도 2).

[0038] 또, 상기 아포토시스 유도에 대한 다시마 당단백질의 효과를 확인하기 위하여 HT-29 세포의 카스파아제 캐스케이드의 활성정도를 측정하였다. 카스파아제는 프로카스파아제로 알려진 불활성 전구체로서 존재한다. 프

로카스파아제가 분열되어 활성화될 때, DNA 분획화 및 사멸 수용체 활성화를 유발시킨다(Joza et al., 2002). 카스파아제-3은 아포토시스 진행 하에서 다른 단백질 기질을 분열시키는 작동제 카스파아제이며, 카스파아제-9 및 -9는 불활성 예비-형태의 작동제를 분열시키는 개시제 카스파아제이다. 카스파아제-8은 사멸-유발 신호 복합체(death-inducing signaling complex ; DISC)의 형성 시에 활성화되고, 카스파아제-9는 아포토솜(apoptosome) 내에서 활성화된다(Kaufmann and Earnshaw, 2000). 카스파아제 캐스캐이드는 사멸 경로와 미토콘드리아 경로를 포함한다. 카스파아제-9는 미토콘드리아-의존성 아포토시스와 관련이 있고, 카스파아제-3을 활성화시킨다. 더욱이, PARP는 카스파아제-3의 주요기질이다.

[0039] 상기 아포토시스 결과에 상응하여, 50 μ g/mL의 다시마 당단백질을 처리한 결과 카스파아제-3, -7, -8, -9가 시료 처리 12시간부터 현저하게 활성화되어 24시간까지 유지되는 것으로 나타났다(도 3).

[0040] Wnt는 최근 그 수용체로 밝혀진 초파리의 Frizzled를 통해 신호를 전달한다. Wnt 신호 전달계에는 Dishevelled와 함께 glycogen synthase kinase 3(GSK3) 그리고 β -catenin이 관여한다. β -catenin은 암조직과 암세포에서 그 변이가 발견되면서 β -catenin이 관여하는 신호경로가 암발생과 전이에 중요한 역할을 할 것이라는 많은 추측에도 불구하고 대장암과 그 신호경로사이의 명확한 관련성에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 바가 없다. 이에 본 발명에서는 다시마의 대장암 성장 억제 작용을 Wnt 신호전달 경로를 통해 규명하고자 하였으며, 그 결과 β -catenin의 세포질에서 핵으로의 이동이 감소되었으며, 이후 c-myc와 cyclin D1단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였다(도 4).

[0041] 염증반응에 있어 중요한 전사인자 중 하나인 nuclear factor κ B(NF- κ B)는 염증 반응과 면역반응을 조절하고 세포의 증식 및 자연세포사(apoptosis)에 관여하며 160 개 이상의 유전자들을 조절할 뿐 아니라, 수 많은 인자들에 의해 NF- κ B의 활성이 유도된다. 도 5는 염증/세포생존에 관여하는 NF- κ B신호전달과정을 살펴본 것이다. 다시마당단백질 24시간 처리후 NF- κ B의 핵으로의 이동, IKB α 인산화, 염증관련 단백질인 COX-2와 iNOS발현이 억제되는 것으로 나타났다(도 5).

산업이용 가능성

[0042] 본 발명은 다시마로부터 당단백질을 추출·정제하는 효과가 있고 본 발명 다시마 유래의 당단백질을 유효성분으로 함유하는 대장암 억제용 항암조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있으므로 생물의료보건산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명 공시재료인 다시마 유래의 당단백질 추출·정제공정을 보인 다이어그램이다.

[0044] 도 2는 추출한 다시마 당단백질이 인체 대장암 세포인 HT-29세포 증식을 억제시키는 것을 MTS assay와 형광염색으로 살펴본 것이다.

[0045] 도 3은 다시마 당단백질이 카스파아제 캐스캐이드에 미치는 영향을 살펴본 결과로 카스파아제-3/-8/-9의 활성화, 및 카스파아제-3의 기질인 PARP 분열화가 유도되는 것으로 나타났다.

[0046] 도 4는 다시마 당단백질이 세포생존 신호전달과정중의 하나인 Wnt신호전달 과정에 미치는 영향을 살펴본 것으로, β -catenin의 핵으로의 이동, c-myc과 cyclin D1발현을 억제시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다.

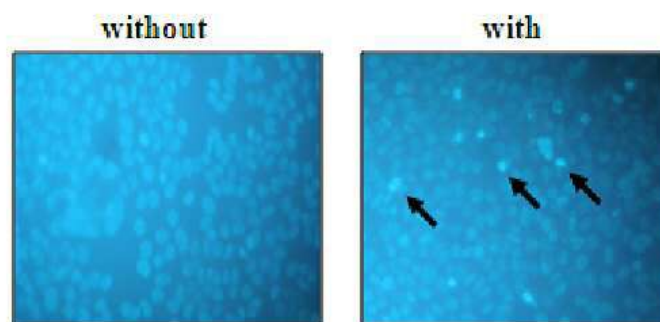
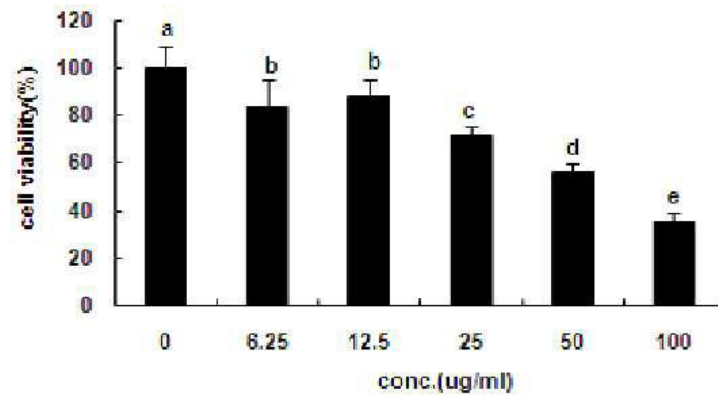
[0047] 도 5는 염증/세포생존에 관여하는 NF- κ B신호전달과정을 살펴본 것이다. 다시마당단백질 24시간 처리후 NF- κ B의 핵으로의 이동, IKB α 인산화, 염증관련 단백질인 COX-2와 iNOS발현이 억제되는 것으로 나타났다.

도면

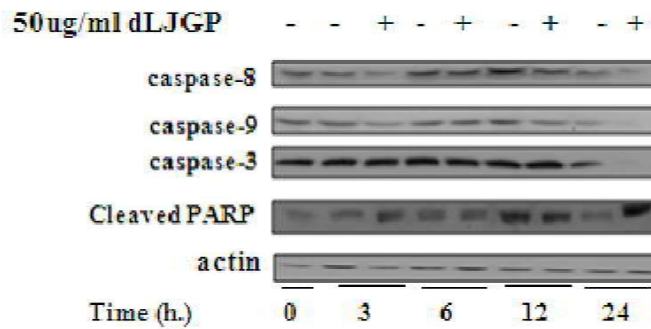
도면1



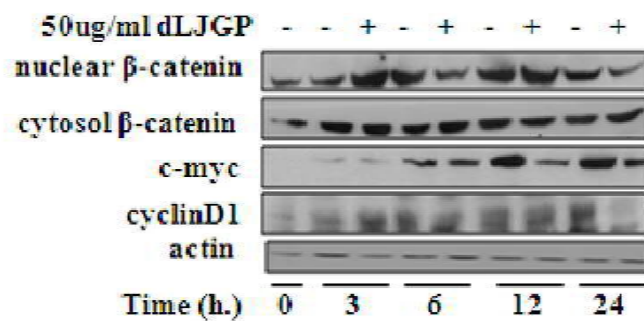
도면2



도면3



도면4



도면5

