



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0106155
(43) 공개일자 2012년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23J 3/20 (2006.01) A23J 3/30 (2006.01)

C07K 4/08 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0024062

(22) 출원일자 2011년03월17일

심사청구일자 2011년03월17일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

강경화

부산광역시 남구 용소로19번길 62-6, 503호 (대연동, 성원하우스)

중-지 첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

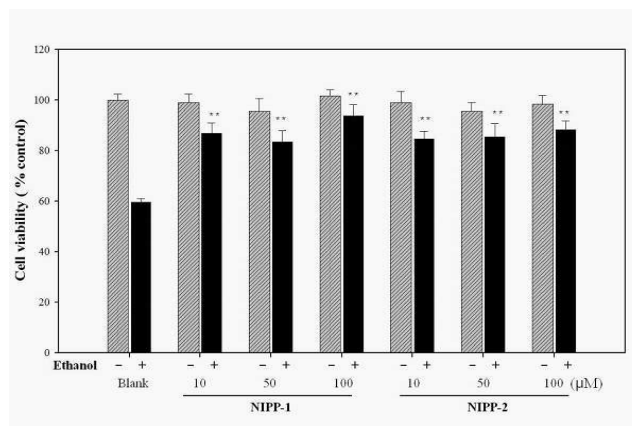
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물로부터 유래된 펩타이드 및 이를 포함한 간세포 보호를 위한 건강보조식품용 조성물

(57) 요약

본 발명은 미세조류 나비쿨라 인세르타를 단백질 효소에 의해 가수분해하여 얻은 펩타이드 NIPP-1 및 NIPP-2를 에탄올-유도된 간세포 손상 보호에 사용하는 것을 특징으로 하는 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물 및 이를 함유하는 건강식품에 관한 것으로, 미세조류 나비쿨라 인세르타로부터 효소적 단백 가수분해에 의해 수득된 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드가 HepG2/CYP2E1 세포를 알코올-유도된 간손상으로부터 보호하므로, 상기 펩타이드 및 이를 함유하는 건강식품은 간세포 손상을 보호하는 효과를 갖는다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

류보미

부산광역시 수영구 남천바다로9번길 5, 협성엠펜
이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트
125동 1402호 (사직동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-01

부처명 국토해양부(마린바이오프로세스연구단)

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양생물유래 항고혈압 기능성 펩타이드의 임상평가를 통한 제품화 및 산업적 적용

주관기관 부경대학교

연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

미세조류 나비쿨라 인세르타의 단백 가수분해물 유래인 것을 특징으로 하는 간세포 보호용 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드가 분자량 1,171 Da을 갖는 하기 아미노산 서열의 NIPP-1 또는 분자량 1,108 Da을 갖는 하기 아미노산 서열의 NIPP-2인 것을 특징으로 하는 간세포 보호용 펩타이드:

NIPP-1: Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu;

NIPP-2: Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu.

청구항 3

제1항에 있어서,

알코올-유도된 간손상으로부터 간세포를 보호하기 위한 것임을 특징으로 하는 간세포 보호용 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 간세포 보호용 건강보조식품용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 간세포 보호용 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물로부터 유래된 펩타이드 및 이를 포함한 간세포 보호를 위한 건강보조식품용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 미세조류 나비쿨라 인세르타를 단백질 효소에 의한 가수분해로 수득되어 간세포 보호에 사용되는 것을 특징으로 하는 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물로부터 분리된 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 및 이를 함유하는 간세포 보호를 위한 건강보조식품용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 장내 소화 대사의 효과적인 생리 조절자로서 작용하는 다양한 단백질의 효소 단백질분해에 의해 방출되는 생체 활성 펩타이드에 대하여 최근 많은 연구가 이루어지고 있다. 이들 펩타이드는 일반적으로 3 내지 20개의 아미노산 잔기를 함유하며, 이들의 활성은 아미노산 조성 및 서열에 따라 결정된다. 이들의 구조, 조성 및 서열 특성에 따라, 항산화, 항고혈압 및 면역조절 효과와 같은 상이한 종류의 생체활성이 나타난다. 따라서, 천연 공급원에서 안전한 천연 생체활성 펩타이드를 얻는 것에 대한 관심이 증가하고 있다.

[0003] 에탄올 대사의 대부분은 간에서 발생한다. 그 결과, 에탄올 남용은 간을 크게 손상시킨다. 에탄올은 간에서 알코올 산화를 촉진시키는 알코올 탈수소효소에 의해 약 90%가 아세트알데하이드로 일차 산화된다. 나머지는 카탈라아제 또는 CYP2E1 효소에 의해 분해되어 아세트알데하이드로 된다. 시토크롬 P-450 2E1 (CYP2E1)는 MEOS(Microsomal ethanol oxidizing system)의 중심 효소이다. 상기 효소는 에탄올 산화 촉진 이외에, 아세트아미노펜, 할로알케인 및 니트로사민과 같은 다른 약물의 생체내변환(biotransformation)과 관련된다. 에탄올은 체내의 CYP2E1 효소를 증가시키고, 이러한 경로를 통하여 대사된 알코올의 남용 및 기간에 따라 증가한다. 최근 연구에 따르면 MEOS (CYP2E1)경로는 카탈라아제 및 ADH 경로보다 더욱 심한 간손상을 야기한다.

[0004] 체내 알코올 수준의 증가는 CYP2E1 및 ADH 수준을 증가시킨다. 알코올에 의해 유도되어 알코올 대사에 기여하는 시토크롬 P-450 2E1 (CYP2E1)의 역할이 광범위하게 연구되고 있다. CYP2E1는 ROS(Reactive oxygen

species)를 발생시켜서 산화 스트레스를 발생시키고, 그 결과 간 세포가 손상된다. 이러한 손상에 대한 정상적인 신체 방어 시스템 - 예컨대, 글루타티온(GSH) 및 비타민 E α-토코페롤과 같은 항산화제-이 손상되면 ROS로 인한 결과가 더 악화된다. 알코올 및 그 대사는 GSH 및 비타민 E 둘다의 농도를 감소시키는 것으로 보인다. CYP2E1를 갖지 않는 마우스에 알코올을 섭취시키면 알코올 간 손상을 예방할 수 있으며, 이는 산화 스트레스가 감소되었기 때문으로 보인다. 알코올이 산화제라는 증거는 항산화 치료 또는 요법이 알코올 노출과 동시에 또는 그 이전에 이루어지는 경우에는 에탄올-유도된 변화 또는 손상이 예방된다는 연구 결과에 근거한다.

[0005] ROS 발생은 알코올-유도된 간 손상에서 중요하다: 알코올은 쿠퍼(Kupffer) 세포 및 간세포에서의 ROS 발생을 증가시킨다. TNF-α 유도된 간세포 사멸은 ROS에 의한 산화적 스트레스 증가 때문이다. 화합물에 의한 산화적 세포 손상이 세포 구조 및 기능을 변형시킨다는 것이 널리 알려져 있다.

[0006] 글루타티온(GSH)은 활성 산소 종 및 반응성 중간물질에 대한 세포 방어에서 독특한 역할을 한다. 세포내 GSH가 부족하면 세포의 산화 스트레스가 야기된다는 것이 밝혀졌다.

[0007] 유리 라디칼은 각종 사이토카인 및 케모카인의 전사를 유도할 수 있는 NF-κB 전사인자를 활성화시킬 수 있다. NF-κB 계열은 ROS에 의해 활성화되는 여러 사이토카인 및 성장 인자의 전사 조절에 관여한다.

[0008] 최근 몇 년동안, 간질환 발병시에 종양괴사인자-알파(TNF-α)와 같은 염증성 사이토카인의 유의한 역할이 ALD(alcoholic liver disease) 환자에서 TNF-α 및 다른 사이토카인의 순환 수준이 증가하는 임상 관측 및 시험관내 실험, 그리고 동물 모델에 의한 알코올-유도된 간손상 관련 논문에서 증명되었다. 또한, 내독소(endotoxin: LPS) 뿐만 아니라 에탄올 및 그의 대사산물, 주로 아세트알데하이드는 IL-1β, IL-6 및 TNF-α와 같은 성장 인자 및 사이토카인에 의해 조절되는 염증 반응에 직접 관여한다고 알려졌다. 염증성 사이토카인의 수준 증가가 알코올성 간염 환자의 혈장 및 간 둘다에서 발견되었다. 사망률 증가와 관련된 알코올성 간염 및 경화에 있어서 또는 간 기능부전에 있어서 혈장 TNF-α 농도가 증가한다고 보고되었다. 인터루킨-6 농도는 알코올성 간염의 임상적 중증도 및 경과와 크게 상관관계를 갖는 것으로 보인다.

[0009] 집중적인 연구에도 불구하고 알코올-유도된 간 질환의 발병기전 및 여러 인자의 영향이 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 간은 알코올 또는 그 대사산물에 대하여 단계에 따라 염증, 섬유증 및 재생 등으로 반응하고, 최종적으로는 경화로 진행될 수 있다. 사이토카인으로 알려진 매개물질 분자의 복잡한 네트워크는 간 기능을 조절하고 생리적 항상성을 유지하며 다양한 간세포 유형의 세포간 신호전달의 통합 구성성분인 것으로 보인다. 간의 다양한 세포에서 분비되는 성장 인자 및 사이토카인은 자가분비(autocrine) 또는 주변분비(paracrine) 경로를 통해 작용하며, 간에 있는 세포의 매트릭스 단백질 및 섬유증의 상향조절을 비롯하여 유전자 발현 조절패턴의 중심 매개물질일 수 있다. 간은 사이토카인의 주요 생산자인 동시에 제거제(scavenger)이므로, 많은 유형의 간 질환이 사이토카인 대사 조절부전(dysregulation)과 관련되어 있다. 사이토카인의 주변분비/자가분비 기능, 상이한 간 세포 유형 및 세포의 매트릭스의 복잡한 상호작용은 간 손상에서 중요한 역할을 한다.

[0010] 에탄올-유도된 간세포 손상의 치료 또는 예방과 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-0403720호 ‘헛개나무 어린 가지로부터 분리된 간독성, 숙취 및 피로해소 활성을 갖는 저급알콜 불용성 추출 분획 및 다당체물질 및 이를 함유한 조성물’이 알려져 있고, 대한민국 등록특허 제10-05933260호 ‘간경변, 지질 대사 개선 및 간손상 억제 활성을 갖는 혼합생약 추출물을 포함하는 간질환의 예방 및 치료용 조성물’이 알려져 있으며, 대한민국 등록특허 제10-0878699호 ‘배무채 추출물을 함유하는 간질환 환자를 위한 건강기능식품’이 알려져 있고, 대한민국 등록특허 제10-0403818호 ‘뽕부기 추출물을 함유하는 간질환 및 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약학조성물’이 알려져 있다.

[0011] 그러나, 선행 기술중에는 간세포 보호와 관련하여 미세조류를 사용하는 기술적 구성이 개시된 바가 없고, 더욱이 미세조류 나비쿨라의 단백 가수분해물을 간세포 보호에 사용하는 것에 대하여는 전혀 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 알코올 남용은 간 질환, 췌장염, 심혈관 질환, 면역학적 이상증, 악성 신생물, 내분비 장애 및 신장 문제를 비롯한 광범위한 의학적 합병증과 관련되어 있다. 이 중에서, 간은 알코올 중독에 의해 가장 심하게 손상되는

기관이다. 알코올성 간 질환(ALD)은 대한민국에서 이환률 및 사망률의 주요 원인으로 남아있다. 그러나, 집중적인 연구에도 불구하고, 알코올-유도된 간질환의 발병기전 및 여러 요인의 복잡한 관계가 아직 완전히 밝혀지지 않았다.

[0013] 본 발명의 목적은 미세조류 나비쿨라 인세르타를 효소적 가수분해하여 수득한 펩타이드를 이용하여 간세포를 보호하고, 궁극적으로는 간질환, 구체적으로는 에탄올-유도된 간질환의 치료 또는 예방에 일조하는데 있다. 또한, 본 발명의 목적은 상기 펩타이드를 함유하여 간 세포를 보호할 수 있는 건강보조식품을 제공하려는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에 따르면, 미세조류 나비쿨라 인세르타로부터 분리 및 정제된 생체활성 펩타이드인 NIPP-1 및 NIPP-2는 HepG2/CYP2E1 세포로 명명된 간세포를 보호하여, 알코올-유도된 간손상에 대한 치료 또는 예방 효과에 일조한다. 본 발명에서는 간 손상에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2이 작용하는 메카니즘이 제시된다. 알콜 섭취시 대부분은 아세트알데하이드로 분해되지만, 만성 알콜 섭취시 체내에 흡수된 알콜의 독성으로 CYP2E1 효소가 증가하여 metabolic stress를 유도하게 된다. 이때 산화스트레스로 인하여 GSH, GGT가 증가하여 염증을 일으켜 간세포에 손상을 초래하게 된다. NIPP-1과 NIPP2는 CYP2E1을 감소시켜 산화스트레스 및 간세포 지표가 될 수 있는 GGT 및 GSH를 감소시키게 된다.

[0015] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간 질환의 치료 또는 예방용 건강보조식품이 제공된다. 펩타이드의 유효성분은 당업계에서 통상적으로 사용되는 양일 수 있다.

[0016] 미세조류는 종래 식품재의 영양분 함량을 증가시킬 수 있고, 따라서 인간과 동물의 건강 증진에 일조한다. 이는 미세조류 고유의 화합물 조성 때문이다. 다양한 미세조류 종은 단백질 함량이 높아서, 독특한 단백질 공급원으로 간주된다. 또한, 거의 모든 조류(algae)의 아미노산 패턴은 다른 식품 단백질에 비해 우수하다. 이들은 인간 및 동물에게 필수 아미노산을 제공할 수 있다. 그러나, 미세조류의 아미노산 함량을 결정하고 단백질을 완전히 특성분석하기 위해서는 단백질의 영양가 및 아미노산의 이용도에 대한 정보가 주어져야 한다. 많은 대사(metabolite) 연구에서, 연구대상 조류 대부분의 평균 단백질 품질이 다른 통상적인 고 품질 식물 단백질과 동등하거나 또는 그보다 우수한 것으로 밝혀졌다. 미세조류 균주를 수경재배하기 위해서는 다양한 기준을 충족시켜야 한다. 예컨대, 쉽게 재배되고, 비독성이어야 한다. 또한, 미세조류 섭취를 위해서는 적절한 크기 및 형상을 가져야 하고, 영양분이 이용가능하도록 높은 영양적 품질 및 소화가능한 세포벽을 가져야 한다. 단백질 함량은 미세조류의 영양가를 결정하는 주요 인자이다.

[0017] 음식의 항산화 활성 연구 결과, 몇몇 항산화 펩타이드는 스피롤리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 두나리엘라 살리나(*Dunaliella salina*) 및 보트리오크쿠스 브라우니(*Botryococcus braunii*), 가쓰오부시(dried bonito), 건염 생선, 생선 소스 및 생선 수용성 단백질을 비롯한 다양한 수생식품 단백질을 효소 분해하여 생산되는 것으로 밝혀졌다. 인간 및 동물을 대상으로 한 많은 연구에 따르면, 클로렐라를 섭취하면 항산화 활성을 갖게 되는 것으로 밝혀졌으며, 이는 활성 펩타이드 때문일 것으로 판단된다. 활성 펩타이드의 거의 전부는 그 구조에 프롤린, 발린, 루이신, 페닐알라닌 및 글루탐산 잔기를 갖는다. 항산화 펩타이드의 구조 및 활성 관계에 대하여, 고 효능 억제 활성을 갖는 펩타이드가 카복시 말단에서 Pro, Phe 또는 Tyr을 갖고 아미노 말단에서 Val 및 Ile을 갖는 것으로 보고되었다. 그러나, 그 메카니즘은 아직 밝혀지지 않았다. 또한, 항산화 펩타이드는 다양한 단백질성 식품재의 가수분해물로부터 분리된다.

[0018] 나비쿨라 인세르타(*Navicula incerta*)는 저생 규조류의 일종으로, 식물 플랑크톤의 주요한 구성성분이고, 재배하기가 비교적 용이하다.

[0019] 본 발명에서는 나비쿨라 인세르타의 과파인 가수분해물로부터 2개의 특정 펩타이드, 즉, NIPP-1 및 NIPP-2를 동정한다. NIPP-1 펩타이드의 아미노산 서열은 Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu이고, NIPP-2 펩타이드의 아미노산 서열은 Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu이다.

[0020] 과파인은 시스테인 프로테아제로, 류신(leucine) 또는 글리신(glycine)과 같은 소수성 아미노산에 대하여 광범위한 특이성을 나타낸다.

[0021] 간은 섭취된 에탄올을 대사, 분해(disposition) 및 해독하는 주요 기관이다. 알코올 탈수소효소(ADH)는 마이크로솜 시토크롬 P450 2E1(CYP2E1) 및 카탈라아제에 의한 경로에 비해 섭취 알코올의 대부분을 간에서 아세트

알데하이드로 산화시킨다.

[0022] 인간 간세포 암종(HepG2) 세포주는 에탄올 유도된 간 손상의 메커니즘을 이해하는데 널리 이용되어 왔다. 본 발명에서는 에탄올-유도된 간세포 손상의 대사를 이해하기 위하여 CYP2E1에 의해 핵내주입(transfection)된 HepG2 세포를 이용한다. 즉, 본 발명에서는 미세조류 나비쿨라 인세르타의 단백 가수분해물인 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드가 HepG2/CYP2E1 세포에서 에탄올-유도된 간 세포독성을 억제함을 증명함으로써 간질환 치료 또는 예방에서의 용도를 밝힌다.

[0023] 내독소 뿐만 아니라 에탄올 및 그의 대사산물, 주로 아세트알데하이드는 IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 성장인자 및 사이토카인에 의해 조정되는 염증 반응에 직접 관여하는 것으로 보고되었다. 또한, 사망률 증가와 관련된 알코올성 간염 및 경화에서 그리고 간 기능부전에서 혈장 TNF- α 농도 증가가 보고되었다. 혈장 IL-6 농도는 알코올성 간염의 임상 중증도 및 경과와 크게 관련된 것으로 보인다. 본 발명에 따르면, 에탄올에 의한 산화적 손상으로 공격받은 제조함 HepG2 세포는 상이한 사이토카인 반응을 나타낸다.

[0024] 알코올 간 질환-관련 염증에서 IL-4 수준은 감소되는 반면, TNF- α , TGF- β , 인터루킨(IL-1 β) 및 IL-6과 같은 다른 사이토카인 수준은 증가한다. 이들 사이토카인은 간 성상 세포(hepatic stellate cell)를 자극하여, 콜라겐을 증가시키고, 과도한 콜라겐 증가는 결국엔 간 섬유증을 야기한다. 알코올 관련된 동물 실험 모델에 따르면, 간세포 독성을 야기하는 가장 중요한 사이토카인은 TNF- α 로 판단된다. 본 발명자들은 높은 농도의 NIPP-1이 TNF- α 를 억제하는 경향을 밝혀냈다. NIPP-2 유용도보다 NIPP-1 유용도가 높은 이유는 생체활성을 부가하는 것으로 보고된 Pro, Phe 및 Trp 아미노산 함량이 높기 때문으로 보인다. 이러한 결과는 상기 억제 가 알코올-유도된 사이토카인 증가에 대한 NIPP-1의 방어 효과와 직접 관련된다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 미세조류 나비쿨라 인세르타로부터 효소적 단백 가수분해에 의해 수득된 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드가 HepG2/CYP2E1 세포를 알코올-유도된 간손상으로부터 보호하므로, 상기 펩타이드, 이를 함유하는 건강보조식품은 간세포를 보호하는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 나비쿨라 인세르타의 과파인 가수분해물에 대한 항-간독성 펩타이드를 분리한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2A는 0.1% TFA를 함유하는 아세트니트릴의 선형 구배(0 내지 30%)로 1mL/분 유속으로 용출하여 얻은, 활성 펩타이드 정제를 위한 RP-HPLC (Capcell Pak C18 UG-120 컬럼)의 크로마토그램이고, 도 2B는 0.1% TFA를 함유하는 아세트니트릴의 선형 구배(0 내지 15%)로 1mL/분 유속으로 용출하여 얻은, Synchropak RPP-100 분석 컬럼 상에서의 RP-HPLC의 반복 크로마토그램이다.

도 3A는 NIPP-1의 분자량 및 아미노산 서열을 동정하기 위한 그래프이고, 도 3B는 NIPP-2의 분자량 및 아미노산 서열을 동정하기 위한 그래프이다.

도 4는 에탄올-유도된 간 세포독성에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 효과를 세포 생존도 측면에서 나타낸 그래프이다.

도 5는 에탄올-유도된 GGT(감마-글루타밀 트랜스퍼라아제) 방출 및 글루타티온(GSH)에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 효과를 나타낸 그래프로, Blank는 에탄올-유도되지 않은 세포를 나타내고, Control 및 샘플은 에탄올-유도된 세포를 나타낸다. 상기 데이터는 3회의 독립적 실험의 평균 $\pm$ SEM을 나타내고, * p <0.05 및 ** p <0.01은 대조군을 기준으로 한 것이다.

도 6은 에탄올-유도된 GGT 방출(도 6A), 에탄올-유도된 GSH 방출(도 6B) 및 에탄올-유도된 CYP2F1 방출(도 6C)에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 효과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 에탄올-유도된 IL-6 방출(도 7A), 에탄올-유도된 TNF- α 방출 (도 7B) 및 에탄올-유도된 IL-1 β 방출 (도 7C)에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 효과를 나타낸 그래프로, Blank는 알코올-자극되지 않은 세포이고, Control 은 1.0M 알코올로 자극된 세포이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명을 하기 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 재료 및 실험장비
- [0029] 저생 규조류인 나비쿨라 인세르타(*Navicula incerta*) 배양물은 효소 가수분해물이다. 보다 구체적으로, 나비쿨라 인세르타의 건조시료(powder) 100g을 세포벽분해 효소를 사용하여 1차 가수분해 한 다음, 다시 동결건조시켜 건조시료를 확보한다. 동결건조시킨 시료 10g씩을 7가지 효소를 사용하여 가수분해한 다음 각각의 효소 가수분해물을 동결건조시켜 건조시료를 확보하였다.
- [0030] 파파인, 및 4-메틸 피라졸(4-MP), L-아르기닌, 니트로-L-아르기닌 메틸 에스테르(L-NAME), 아포사이닌(apocynin), 알로푸리놀(allopurinol), GSH, N-아세틸-L-시스테인(NAC), 5-아데노실-L-메티오닌(SAM), DL-부티오닌-(S,R)-설폭시민(BSO), 5,5'-디티오비스[2-니트로벤조산](DTNB) 및 아시비신을 비롯한 다른 시험재료를 시그마-알드리치 (Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재) 및 칼바이오켄(Calbiochem, 미국 캘리포니아 라즐라 소재)에서 구입하였다. 시토크롬 P450 (CYP2E1, 인간) 다분지성 항체는 록랜드(Rockland, 미국 펜실베이니아주 길버트스빌 소재) 및 옥스퍼드 바이오메디칼 리서치(Oxford Biomedical Research, 미국 미시간주 옥스퍼드 소재)에서 각각 입수하였다. BCA 단백질 분석 키트(kit), 전기영동 시약 및 염소 항-토끼 퍼옥시다아제 IgG는 피어스 바이오테크놀로지 잉크(Pierce Biotechnology Inc., 미국 일리노이주 록포트 소재)에서 구입하였다.
- [0031] 항산화물질 펩타이드의 정제
- [0032] 나비쿨라 인세르타 파파인 효소 가수분해물(20mg/mL)을 20mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)에 용해시키고, 20mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7.0)으로 평형을 맞춘 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 컬럼 (16 X 100mm) 상에 로딩하고, 2mL/분 유속으로 동일한 완충액 중 NaCl의 선형 구배(0 내지 2.0M)로 용출시켰다. 각각의 분획물을 280 nm 흡광도로 관측하고, 각 분획물을 2mL 부피로 모으고, 2개의 비-흡착부 및 2개의 흡착부로 분획하고(도 1의 Fr I, Fr II, Fr III, Fr IV), 회전 증발기를 이용하여 농축시키고, 항산화 활성 및 간세포 활성을 조사하였다. 분획물 중에서 가장 높은 활성을 나타낸 분획물 IV (Fr IV)를 추가 크로마토그래피를 위해 동결 건조하였다.
- [0033] 1.0mL/분 유속으로 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유한 아세토니트릴(0 내지 30%, 45분)의 선형 구배로 프라임스피어(Primesphere) 10C₁₈ (20 x 250mm) 컬럼 상에서 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 추가 정제하였다. 용출 피크는 215 nm에서 검출되었고, 상기 피크에서 수득한 물질을 회전 증발기를 이용하여 농축시켰다. 유효 피크의 물질을 모으고, 산화 활성을 측정하고, 상기 분획물을 5개의 명확한 분획물(IV-1, IV-2, IV-3, IV-4 및 IV-5)로 구분하였다(도 2A). 또한, 활성에 근거한 분리를 위해 분획물 IV를 세포 생존도, GGT 및 GSH 분석하였다. 분획물 IV의 항-간독성 및 항산화 활성 분석 결과에 따르면, 분획물 IV-2가 가장 높은 활성을 가졌고, 이에 분획물 IV-2를 추가 정제를 위해 선택하였다. 활성 분획물 IV-2를 추가로 모으고(pooled), Synchropak RPP-100 분석 컬럼 상에서 RP-HPLC 재크로마토그램으로 정제하였다. 1mL/분 유속으로 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴의 선형 구배(0 내지 15% v/v, 30분)로 용출하였다. 이어서, 분획물 IV-2를 크로마토그래피하여서 6개의 하위분획물로 분리하였다. 또한, 분획물 IV-2를 세포 생존도, GGT 및 GSH 분석하였다.
- [0034] 분석 결과, 분획물 IV-2-5 및 분획물 IV-2-6이 가장 높은 활성을 가졌으므로, 이를 추가 정제를 위해 선택하였고, 각각 NIPP-1 및 NIPP-2로 명명하였다.
- [0035] 아미노산 서열의 결정
- [0036] 전자분사 이온화(ESI) 공급원을 장착한 Q-TOF 질량분석기(마이크로매스(Micromass), 영국 알트링엄)를 사용하여, 상기에서 정제한 펩타이드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열을 결정하였다. 정제된 펩타이드를 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해한 후에 전자분사 이온화 공급원에 주입하고, 질량 스펙트럼에서 doubly charged 상태에 의해 결정하였다. 분자량 결정에 이어, 단편화할 펩타이드를 자동 선별하고, 탠덤(tandem) 질량 분광분석법

에 의해 서열 정보를 얻었다. Tandem 질량 분석 실험은 나노-전기분사 이온화 공급원을 장착한 시간-비행 탠덤 질량 분광기를 이용하여 실시하였다. 활성 펩타이드의 서열은 50 내지 2,500 m/z 범위에서 얻어졌고, PepSeq de novo 서열화 알고리즘을 이용하여 서열화하였다. 그 결과, 정제 펩타이드의 아미노산 서열은 NIPP-1 (Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu) 및 NIPP-2 (Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu)로 결정되었고, 각각의 분자량은 1,171 Da 및 1,108Da로 결정되었다(도 3A 및 도 3B 참조). ESI/MS 분광기로 결정한 정제 펩타이드의 분자량은 서열로부터 계산된 질량 이론치와 잘 합치하였다.

[0037] 세포 배양 및 세포 생존도 분석

[0038] 더 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(the American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나세스 소재)에서 수득한 인간 간세포 암종(HepG2) 세포를, 10% 소태아 혈청(김코 비알엘(Gibco BRL), 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재), 100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)을 함유한 전술한 바와 같은 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle medium)에서, 5% CO₂ 및 95% 공기를 함유하는 가습 분위기 및 37°C에서 증식시켰다. 인간 CYP2E1 cDNA를 핵내주입(transfection)시킨 HepG2 세포는 경희대학교 의학센터(KyongHee University Medical Center)로부터 제공받았다. 상기 세포를 24-웰 배양 플레이트에 약 1×10^4 세포 밀도로 씨딩(seeding)하고, 약 24시간동안 DMEM 배지 1mL에서 50 내지 60% 컨플루언시(confluency)에 이를 때까지 증식시키고, 2-3일 간격으로 계대배양하고, 서브컨플루언시(subconfluency) 밀도로 유지하였다. 표준물질로 소 혈청 알부민을 사용하고 BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 상기 단백질을 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

[0039] 세포독성 평가

[0040] HepG2/CYP2E1 세포 상에서 에탄올-유도된 세포독성에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드의 효과를 평가하기 위하여, MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이하닐테트라졸륨 브로마이드) 분석을 이용하였다. HepG2/CYP2E1 세포를 48-웰 플레이트에서 1×10^4 세포/웰의 밀도로 증식시켰다. 24시간 후에 세포를 신선한 배지로 세척하고, 10 µM, 50 µM 및 100 µM 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 각각으로 1시간동안 처리하였다. 1.0M 에탄올과 함께 48시간동안 배양한 후에, 세포를 재세척하고, MTT 100 µL(1mg/mL)와 함께 4시간동안 37°C에서 배양하였다. 최종적으로, DMSO 100 µL를 첨가하여서, 형성된 포르마잔 결정을 용해시키고, 다중탐침 마이크로플레이트 판독기(multidetecation microplate reader)(제니오스(GENios: 등록상표) 마이크로플레이트 리더, 테칸 오스트리아 게엠베하(Tecan Austria GmbH), 오스트리아 소재)를 이용하여 540nm 흡광도를 측정하여 포르마잔 결정의 양을 결정하였다. 상기 데이터를 적어도 3개의 독립적인 실험의 평균값으로 표기하였다. 각각의 수치를 3회 반복 실험의 평균치 ± SD로 표기하였다.

[0041] 도 4에 도시된 바와 같이, NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드로 처리한 세포 상에서는 임의의 유의한 독성 효과가 관찰되지 않았다. 활성 원리를 확인하기 위하여, NIPP-1 및 NIPP-2를 또한 비교하였다. 그 결과, 2가지 펩타이드 모두는 100 µM 농도에서 가장 높은 활성을 나타내었고, NIPP-1가 NIPP-2보다 더 효율적으로 에탄올-유도된 세포 사멸을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[0042] GGT 분석

[0043] GGT 억제가 에탄올-유도된 세포독성을 약화시키는 것으로 보이므로, GGT 활성에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드의 영향을 분석하였다.

[0044] 상기 분석은 GGT 촉매가 인공 기질인 감마-글루타밀-p-니트로아닐라이드를 p-니트로아닐린으로 분해하는 것과, 상기 p-니트로아닐린이 아질산염 및 나프틸에틸렌 다이아민과 더 반응하여서 적색 발색성 화합물을 형성하는 것에 근거한다.

[0045] 세포 배양을 위한 DMEM 배지 '둘베코 변형 이글 배지' 20 µL 분액을, 180mM Tris-Cl (pH 8.2), 2mM 감마-글루타밀-p-니트로아닐라이드, 20mM 글리실글리신, 0.8mM NaNO₂ 및 3.2mM 나프틸에틸렌 다이아민으로 이루어진 분석 혼합물 180 µL에 첨가하였다. 감마-글루타밀-p-니트로아닐라이드 기질을 함유하지 않은 분석 혼합물을 사용하여 상기 분석을 실시하여서 샘플에 의한 임의의 간섭 가능성에 대하여 보정하였다. 60분동안 37°C에서

플레이트를 배양한 후에, 1.0N HCl 40 μ L을 첨가하여 상기 반응을 중지시켰다. 즉, 혈청 감마-글루타밀트랜스퍼라아제(GGT) 활성을 조정 배지로 처리한지 24 및 48시간 후에 멀티-웰 주사 분광광도계(multi-well scanning spectrophotometer)를 이용하여 520 nm에서 적색 색소원 형성을 측정하고, 기질을 함유하지 않은 분석 혼합물로부터 얻은 값으로 보정하였다.

[0046] 도 5A 및 도 5B에 나타난 바와 같이, NIPP-1 및 NIPP-2는 GGT를 투약량 의존적으로 억제하였다. 상기 펩타이드는 저 농도보다 고 농도에서 더 높은 효능을 나타내었고, 48시간 처리한 경우에 24시간 처리한 경우보다 더 높은 억제를 나타내었다.

[0047] GSH 함량 분석

[0048] 5% 메타인산 100 μ L에서 상기 HepG2/CYP2E1 세포를 과열시키고, 10,000 X g에서 15분동안 원심분리하여서 투명 상청액을 수득하였다. 상청액으로부터, DTNB를 이용한 효소 재순환 방법(enzymatic recycling method)에 의해 총 GSH (GSH + 그의 산화 형태 GSSG)를 결정하였다. 미세적정 플레이트 상에서 분석을 실시하였다. 반응 혼합물(100 μ L)은 143mL NaPO₄ (pH 7.5), 6.3mM EDTA, 0.6mM DTNB, 0.25mM NADPH, 0.25U/mL 글루타티온 리덕타아제(reductase) 및 2.0 μ L NIPP-1, NIPP-2 샘플로 이루어졌다. 상기 플레이트를 37°C에서 60분동안 배양하고, 415nm 흡광도로 2-니트로-5-티오벤조산 형성을 관측하고, 공지된 양의 GSH를 사용하여 검량선에 의해 GSH 농도로 전환시켰다.

[0049] 1M의 에탄올에 1시간 처리된 세포를 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드에 24 내지 48시간동안 노출시키고, 이어서 GSH 수준을 측정하였다. 도 5C 및 도 5D는 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M 농도의 NIPP-1, NIPP-2 샘플에서의 GSH 수준을 나타낸다. 고 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2에 노출시킨 경우가 저 농도에 노출된 경우에 비해 GSH 수준이 유의하게 높았다. GGT 활성 분석 결과와 일치하게, 2가지 펩타이드 모두는 시간 및 투약량-의존적 방식 모두에서 GSH 활성 증가를 나타내었다. NIPP-1은 시간 및 농도 방식으로 NIPP-2보다 더 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다.

[0050] 웨스턴 블롯 분석

[0051] 에탄올-유도된 세포를 NIPP-1 및 NIPP-2로 처리한 후에 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 GGT 및 GSH 단백질 수준을 연구하였다.

[0052] 즉, 무혈청 배지를 함유한 6웰 플레이트 배양접시에서 세포를 1×10^4 세포/mL 밀도로 배양하였다. 48시간동안 배양한 후에, 상기 세포를 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M 농도의 나비콜라 인세르타 효소 가수분해물로 1시간동안 처리하고, 이어서 무혈청 배지와 함께 1.0M 에탄올로 48시간동안 처리하였다. 50mM 트리스-HCl (pH 8.0), 0.4% 노니데트(Nonidet) P-40, 120mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 2mM 페닐메틸설포닐 플로라이드, 80 μ g/mL 류페틴, 3mM NaF 및 1mM DTT를 함유한 세포용해(lysis) 완충액에서 4°C에서 30분동안 세포를 용해하였다. 전체 단백질을 추출하고, 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 및 5% 농축 겔(stack gel)을 이용하여 단백질 100 μ g/mL을 분리하고, 니트로셀룰로즈 멤브레인으로 옮겼다(아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech., 영국 소재). 0.1% 트윈(Tween)-20 및 3% BSA를 함유한 TBS-T 완충액을 이용하여 상기 멤브레인을 1.5시간동안 37°C로 블로킹(blocking)하였다. 상기 멤브레인을 TBS-T 완충액으로 2회 세척한 후에, 상기 블롯을 1차 항체(Antibody) 및 2차 항체 (Antibody)를 각각 25°C에서 1시간동안 배양하였다. 화학발광 ECL 분석 키트(아머샴 파마시아 바이오사이언스(Amersham Pharmacia Biosciences), 미국 뉴저지주 소재)를 제조업체 설명서에 따라 이용하여 각각의 단백질을 검출하였다. LAS-3000 시스템을 이용하여 웨스턴 블롯 밴드를 시각화하고, 멀티 게이지(Multi Gauge) V3.0 소프트웨어에 의해 정량화하였다 (후지필름 라이프 사이언스(Fujifilm Life Science), 일본 동경 소재).

[0053] NIPP-1 및 NIPP-2의 3가지 농도 모두에서 에탄올-유도된 세포에서 GGT 농도가 투약량 의존적 방식으로 감소되었다(도 6A). NIPP-1 및 NIPP-2 처리는 에탄올-유도된 세포에 대해 GSH 수준을 농도 의존적인 방식으로 증가시켰다(도 6B). 에탄올-유도된 세포내의 CYP2E1 수준은 간세포 손상과 관련시키기에 충분한 정도이다. 에탄올-유도된 CYP2E1 단백질 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 효과에 따르면(도 6C), NIPP-1 만이 CYP2E1 수준을 감소시켰으며, NIPP-2는 CYP2E1 수준을 감소시키는 것에 대하여 유의한 효과를 나타내지 않았다.

[0054] 또한, 간 세포의 세포독성 지표로서, IL-6, TNF- α 및 IL- β 와 같은 사이토카인 수준을 연구하였다(도 7).

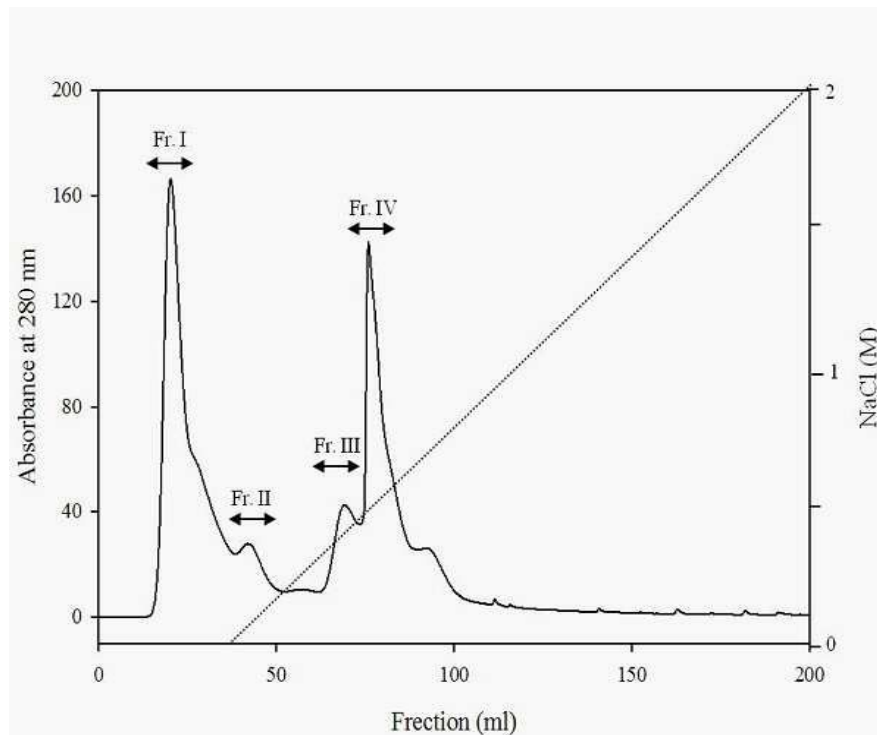
HepG2/CYP2E1 세포를 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드로 전처리하고, 48시간 더 알코올로 자극하였다. NIPP-1 및 NIPP-2 처리는 특히 100 μ M 와 같은 높은 농도에서 증가된 사이토카인 수준을 감소시켰으며, 모든 단백질 수준에서 NIPP-1은 NIPP-2보다 더 높은 활성을 나타내었다.

[0055] 통계 분석

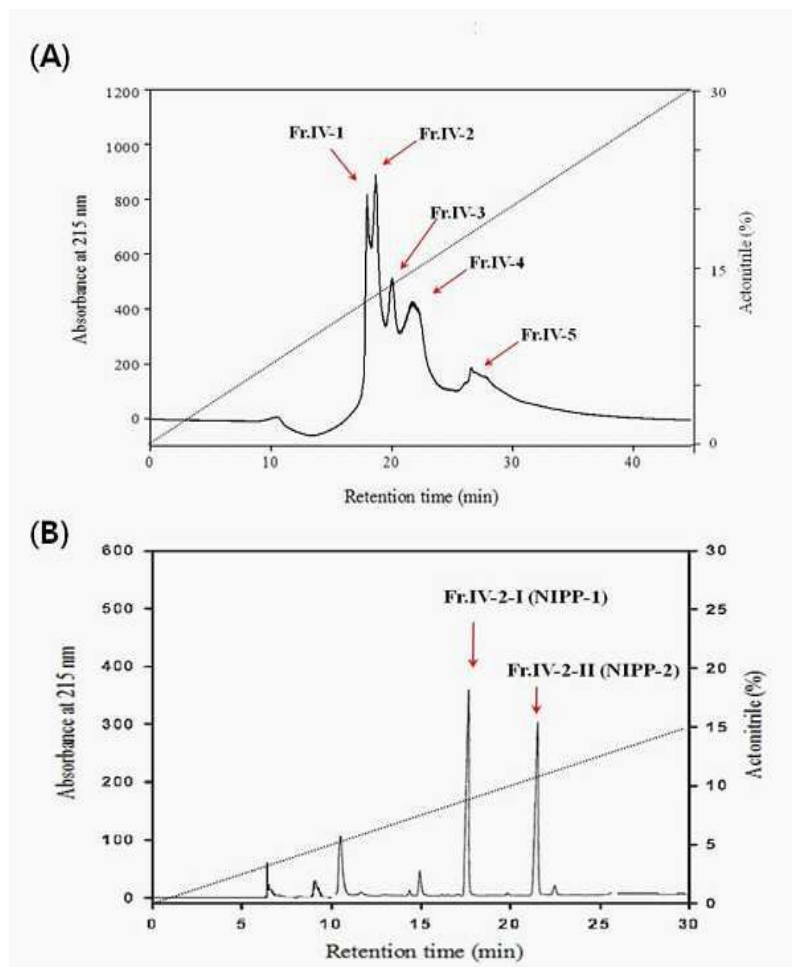
[0056] 각각의 수치를 평균 $\pm$ S.E.M (n=3)으로 표기하였다. SPSS(미국 일리노이주 시카고 소재)를 이용한 스튜던트 (Student) t-테스트에 의해 통계적 유의도를 분석하였다.

도면

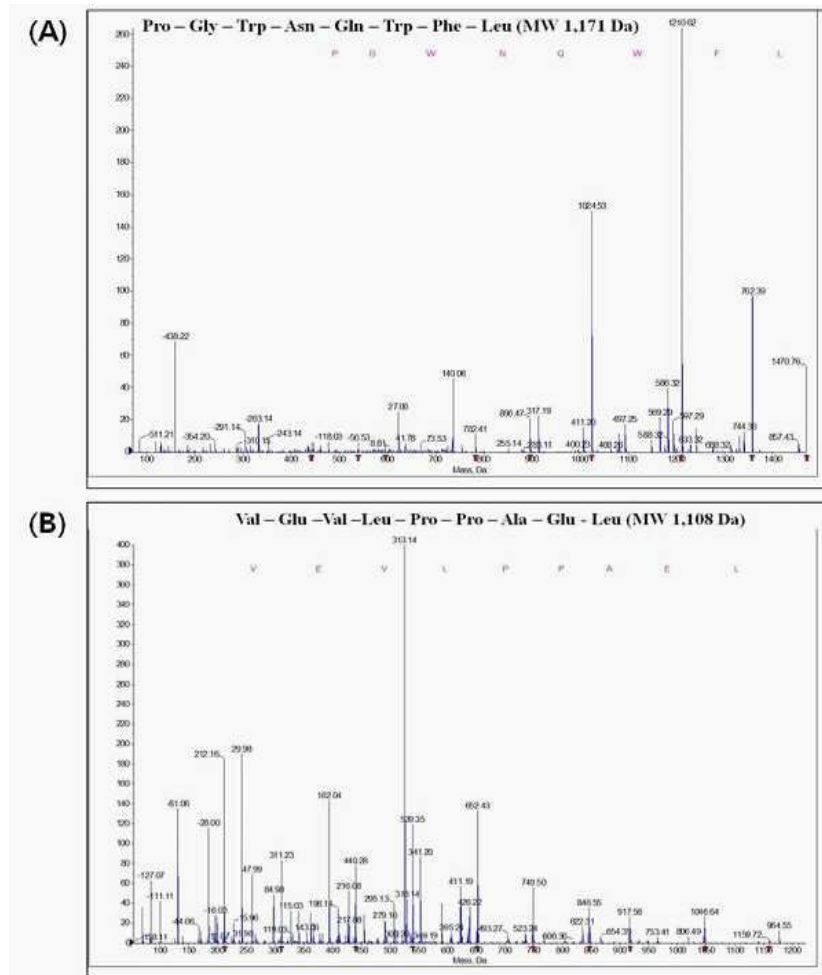
도면1



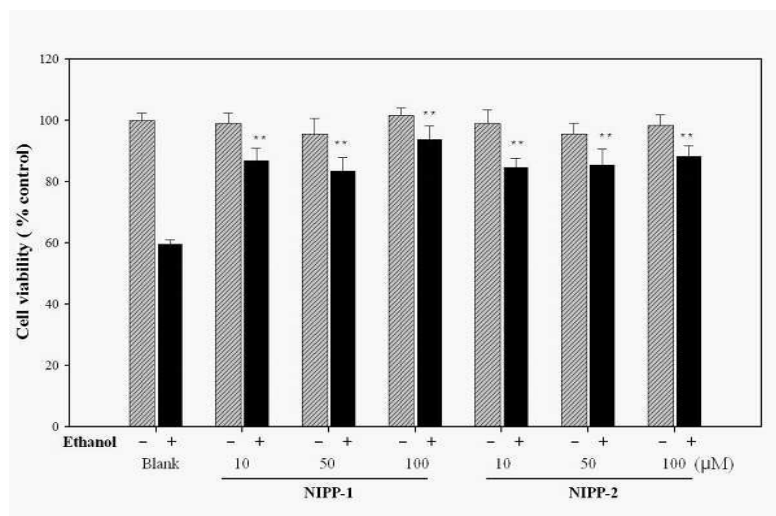
도면2



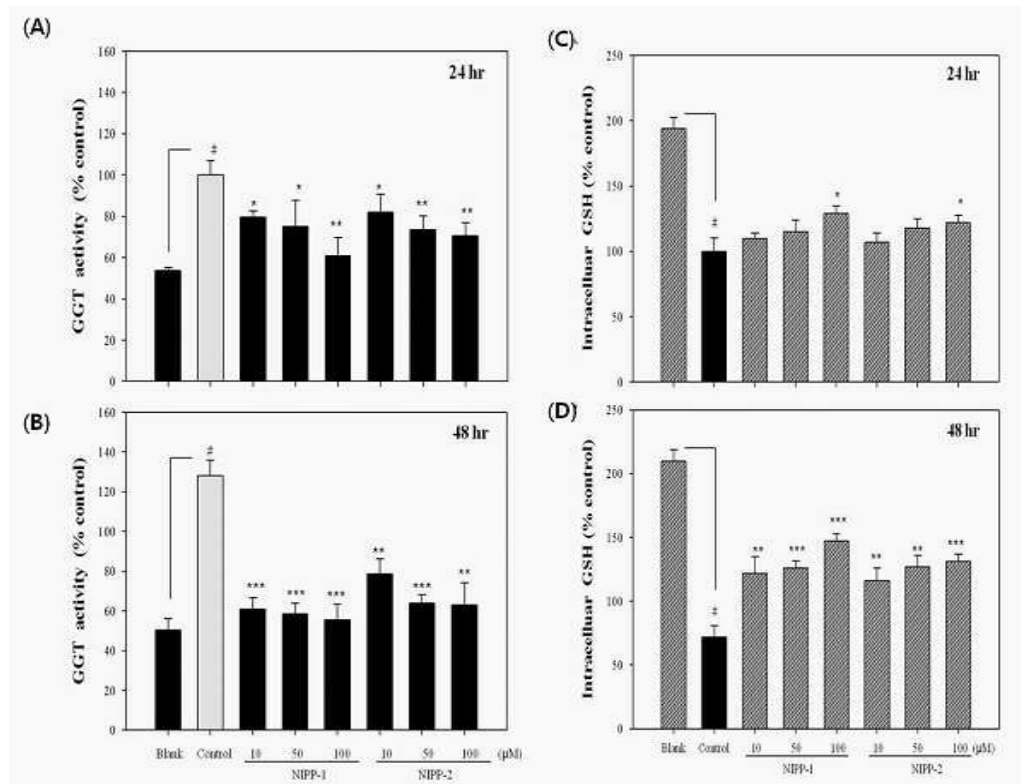
도면3



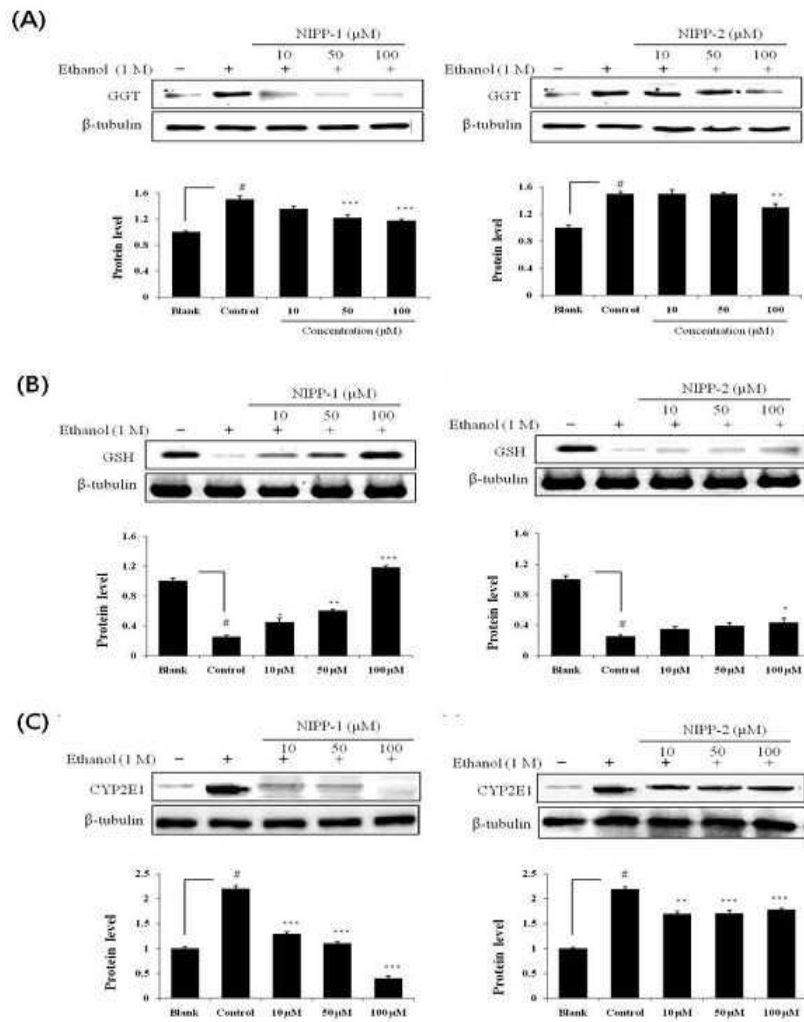
도면4



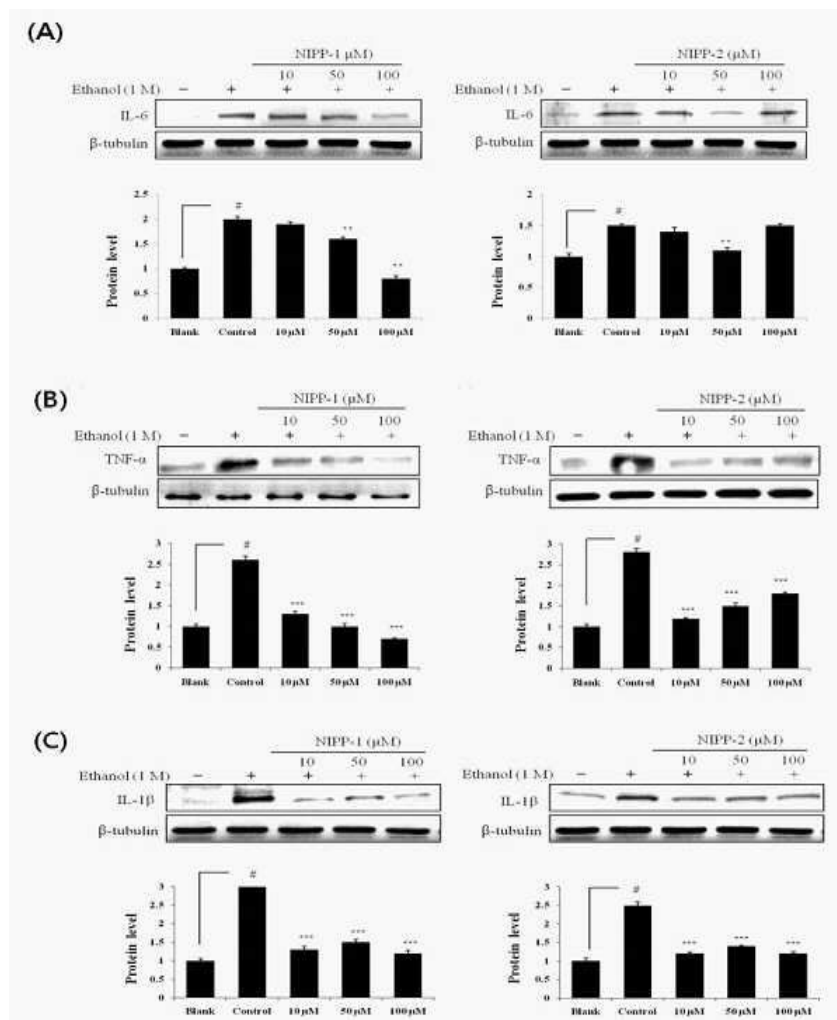
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY SANHAK
 - <120> Peptides derived from Microalgae Navicula incerta protein hydrolysate and health food composition containing the same for protecting hepatocytes
 - <130> 0000
 - <160> 2
 - <170> Kopatent In 2.0
 - <210> 1
 - <211> 8
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> NIPP-1 peptides derived from microalgae Navicula incerta
 - <400> 1
- Pro Gly Trp Asn Gln Trp Phe Leu

1	5
<210>	2
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	NIPP-2 peptides derived from microalgae <i>Navicula incerta</i>
<400>	2
Val Glu Val Leu Pro Pro Ala Glu Leu	
1	5