

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-188251

(P2016-188251A)

(43) 公開日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/60 (2006.01)	A 6 1 K 8/60	4 C 0 5 7
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	4 C 0 8 3
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7004 (2006.01)	A 6 1 K 31/7004	
C 0 7 H 3/10 (2006.01)	C 0 7 H 3/10	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2016-154493 (P2016-154493)	(71) 出願人	314000442
(22) 出願日	平成28年8月5日 (2016.8.5)		高麗大学校産学協力団
(62) 分割の表示	特願2014-553259 (P2014-553259) の分割		KOREA UNIVERSITY RE SEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
原出願日	平成25年1月18日 (2013.1.18)		大韓民国 O2841 ソウル ソンブク ク アナムロ 145
(31) 優先権主張番号	10-2012-0005716		145, Anam-ro Seongb uk-gu Seoul O2841, Republic of Korea
(32) 優先日	平成24年1月18日 (2012.1.18)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
(31) 優先権主張番号	10-2013-0005704	(74) 代理人	100080012
(32) 優先日	平成25年1月18日 (2013.1.18)		弁理士 高石 橋馬
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(72) 発明者	キム キョンホン
			大韓民国 ソウル市 瑞草区 瑞草4洞 三豊アパート 18棟 805号 最終頁に続く

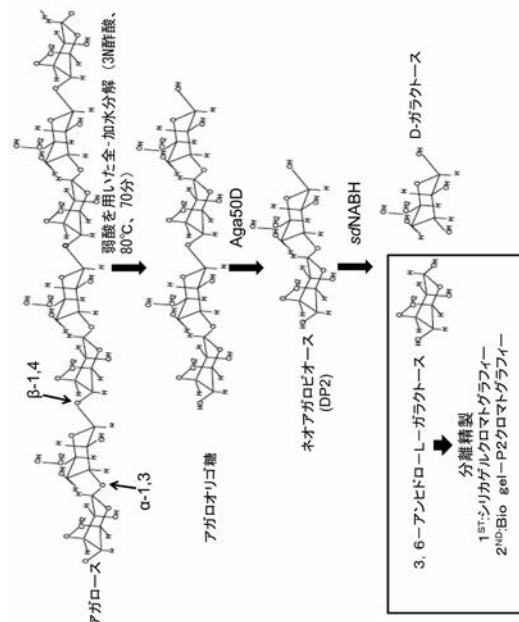
(54) 【発明の名称】 皮膚保湿用化粧料組成物

(57) 【要約】

【課題】 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの生理学的活性を糾明してこれを産業的に利用する。

【解決手段】 本発明は、3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース (3, 6 - anhydro - L - galactose) を含むことを特徴とする皮膚保湿用化粧料組成物に関する。

【選択図】 図 1



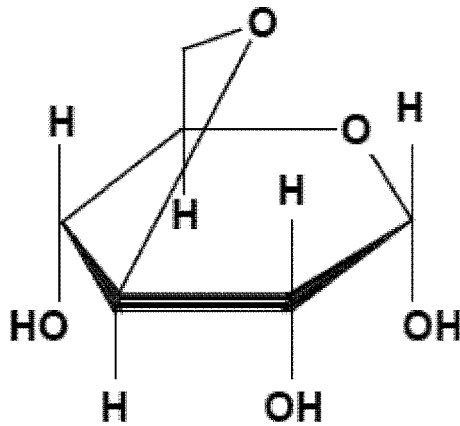
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記化学式 1 に表示する 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース (3 , 6 - a n h y d r o - L - g a l a c t o s e) を含むことを特徴とする皮膚保湿用化粧料組成物。

【化 1】

[化学式 1]



10

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを含む皮膚保湿用化粧料組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

紅藻類を構成する主な多糖体である寒天（またはアガロース）は、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースと D - ガラクトースの 2 つの単糖体がアルファ 1 , 3 結合とベータ 1 , 4 結合が交差接続されている重合体である。アガロースを塩酸と硫酸と酢酸のような化学的触媒を用いた非特異的な加水分解を介して生産したアガロオリゴ糖は抗酸化、抗炎症、抗癌、美白、抗アレルギー機能など生理学的な活性が優れることで広く知られている。このように多様な生理活性によってアガロオリゴ糖及び二糖体であるネオアガロビオースは食品産業分野及び美容産業分野で機能性物質として広く用いられている。

30

【0003】

上記アガロオリゴ糖を構成する単糖のうち 1 つである 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの場合、還元末端が不安定で高濃度の強酸及び高温反応条件下においてヒドロキシメチルパルパラルに早く転換されるので、既存の化学的処理を介して単糖体である 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを生産することは、収率が最も低く容易に過分解される問題点がある (Jol et al (1999) Anal Biochem. 268, 213-222, Kim et al (2010) Bull Korean Soc. 31(2) 511-514)。また化学的処理による加水分解は生産コストが低く処理条件が単純なので、商業化に多く応用可能であるという長所があるが、非特異的に結合を切断するので、特異的な結合を分解して所望する生産物を得る際には、収率が非常に低くなるという短所がある (Chen et al (2005) Food Technol Biotechnol. 43(1) 29-36)。また、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース結合を特異的に切断して単糖を生産する酵素も最近報告されているが、反応産物から 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースのみを分離精製及び定量化する研究は不備である。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、上記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの生理学的活性を糾明し

50

てこれを産業的に利用することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース (3, 6 - anhydro - L - galactose) を含む皮膚保湿用化粧品組成物を提供する。

【発明の効果】

【0006】

本発明は、3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの保湿などの生理学的活性を最初に
糾明することで、これを化粧品で利用できるようにする。よって、紅藻類来由のバイオエ
ネルギー生産時に副産物または醗酵阻害剤と思われる3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクト
ースをバイオエネルギー産業において高付加価値物質を創出するのに応用される。

10

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】本発明に係るアガロースで3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを製造する工
程を示す図で、図内のDPは多糖類の重合度 (Degree of polymerization) を意味する。

【図2】アガロースで3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを製造及び精製する過程を
示すTLC結果であって、進行段階 (Processing step) でレーン1はア
ガロース、レーン2は酢酸加水分解物、レーン3はAgas 50D反応産物、レーン4はs
dNABH反応産物、レーン5はシリカゲルクロマトグラフィーで分離した3, 6 - アン
ヒドロ - L - ガラクトース、レーン6はバイオゲルP2クロマトグラフィーで精製した3
, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースであり、Y軸のAHGは3, 6 - アンヒドロガラク
トース、NABはネオアガロピオースを指称する。

20

【図3】3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース精製の初段階であるシリカゲルクロマト
グラフィーTLC結果を示すもので、図面内AHGは3, 6 - アンヒドロガラクトースを
指称する。

【図4】D - 形態の3, 6 - アンヒドロガラクトースの標準物質 (a) と本発明を介して
精製した3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース (b) のGC / MS total ion
chromatogramを示す図である。

【図5】分離精製した3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの¹H NMR分析結果を
示す図である。

30

【図6】分離精製した3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの2D - HSQC NMR
分析結果を示す図である。

【図7】3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース、ネオアガロピオース、D - ガラクトー
ス及び3, 6 - アンヒドロ - D - ガラクトースの美白活性効果を示す図で、図内のα - M
SHはα - melanocyte - stimulating hormones、NAB
はネオアガロピオース、D - AHG及びL - AHGはそれぞれD - formとL - for
mの3, 6 - アンヒドロガラクトースを指称する。

【図8】3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース、ネオアガロピオース、D - ガラクトー
ス及び3, 6 - アンヒドロ - D - ガラクトースの抗酸化活性効果を示す図である。

40

【図9】HEMsでα - MSHによって誘導されたチロシナーゼ発現に対するL - AHG
の効果を示す図であって、AはL - AHGの濃度別処理後のα - MSHに露出した細胞のチ
ロシナーゼ発現結果であり、Bは前記Aの結果をβ - アクチンに対するチロシナーゼの相
手強度で表示するグラフである。

【図10】HEMsでα - MSHによって誘導されたTRP - 1発現に対するL - AHG
の効果を示す図であって、AはL - AHGの濃度別処理後のα - MSHに露出した細胞の
TRP - 1発現結果であり、Bは前記Aの結果をβ - アクチンに対するTRP - 1の相手
強度で表示するグラフである。

【図11】インビトロでチロシナーゼ活性に対するL - AHGの効果を示す図である。

【図12】人の角質細胞でHAS2発現に対するL - AHGの効果を示す図であって、A

50

は $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の L - A H G の時間別処理後の H A S 2 発現水準であり、B は L - A H G の濃度別処理後の H A S 2 発現水準である。

【図 1 3】人の角質細胞で E R K の燐酸化に対する L - A H G の効果を示す図であって、A は $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の L - A H G の時間別処理後の E R K 燐酸化結果であり、B は L - A H G の濃度別処理後の E R K 燐酸化結果である。

【図 1 4】人の角質細胞で A K T の燐酸化に対する L - A H G の効果を示す図であって、A は $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の L - A H G の時間別処理後の A K T 燐酸化結果であり、B は L - A H G の濃度別処理後の A K T 燐酸化結果である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

10

以下、本発明の構成を具体的に説明する。

【0009】

本発明は、アガロースと $0.5 \sim 60\%$ (w/v) 濃度の弱酸を $40 \sim 150$ の温度範囲で $100 \sim 200 \text{rpm}$ の条件に $30 \text{分} \sim 6 \text{時間}$ の間反応させてアガロオリゴ糖を製造する段階と、前記アガロオリゴ糖とアガロース分解酵素及びネオアガロビオース加水分解酵素を $20 \sim 40$ の温度範囲で $0 \sim 200 \text{rpm}$ の条件に $30 \text{分} \sim 7 \text{日間}$ 反応させる段階とを含む $3, 6$ - アンヒドロ - L - ガラクトースの製造方法に関する。

【0010】

本発明の $3, 6$ - アンヒドロ - L - ガラクトースの製造方法は、弱酸を用いたマイルド条件にアガロースを加水分解し、酸加水分解産物から得たアガロオリゴ糖を、二糖体を生産するエキソ型のアガロース分解酵素と反応させてネオアガロビオースを生産し、ネオアガロビオース加水分解酵素との追加反応を介して単糖体であるガラクトースと $3, 6$ - アンヒドロ - L - ガラクトースを生産することを特徴とする。

20

【0011】

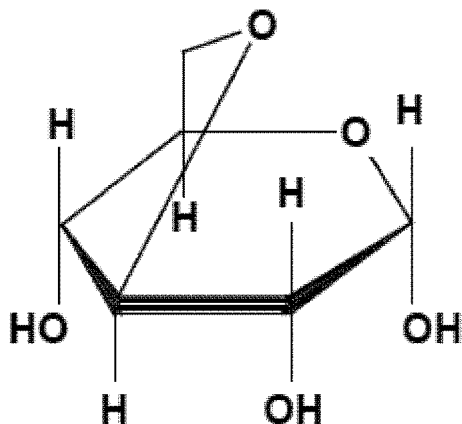
前記 $3, 6$ - アンヒドロ - L - ガラクトースは、下記化学式 1 の構造を有することができる。

【0012】

【化 1】

[化学式 1]

30



40

【0013】

次に、図 1 に示す $3, 6$ - アンヒドロ - L - ガラクトースの製造工程を参照してより詳しく説明する。

【0014】

第 1 段階は、アガロースに弱酸を処理してアガロオリゴ糖を製造する段階である。

【0015】

前記弱酸は、酢酸 (Acetic acid)、蟻酸 (Formic acid)、コ

50

ハク酸 (Succinic acid)、クエン酸 (Citric acid)、リンゴ酸 (Malic acid)、マレイン酸 (Maleic acid) またはシュウ酸 (Oxalic acid) などを単独または２種以上用いることができる。

【0016】

前記弱酸は、生産単価及び弱酸中化後に生成される塩の分離を考慮して 0.5 ~ 60 % (w/v) の濃度で用いることが好ましい。より詳しくは 20 ~ 40 % (w/v) の濃度で用いることができる。

【0017】

前記アガロース及び弱酸の反応は、40 ~ 150 の温度範囲で 100 ~ 200 rpm の条件に 30 分 ~ 6 時間の間実施することができる。前記範囲内の場合、弱酸によるアガロースの過分解物を最小化することができる。

10

【0018】

前記反応後に得た反応産物は、アガロオリゴ糖に残存する弱酸と過分解物を除去するために洗浄後に乾燥して粉末状態に修得することができる。

【0019】

前記洗浄溶媒として炭素数 1 ~ 6 の低級アルコールを用いることができるが、これに特に限定されない。

【0020】

第２段階は、アガロオリゴ糖の酵素的分解を介して 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを製造する段階であって、前記酵素的分解はエキソ型のアガロース分解酵素を処理して二糖体であるネオアガロビオースを生産し、続いてネオアガロビオース加水分解酵素を処理して D - ガラクトースと 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースに分解することである。

20

【0021】

前記酵素反応は、20 ~ 40 の温度範囲で 0 ~ 200 rpm の条件に 30 分 ~ 7 日間実施することができる。

【0022】

次に、前記酵素反応をより詳しくは説明する。

【0023】

まず、アガロオリゴ糖を分解して二糖体であるネオアガロビオースを生産するアガロース分解酵素は、アガロースの D - ガラクトースと 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースとの間の β - 1, 4 - グリコシド結合を切断する酵素（以下、「Agas0D」とする）を用いることができる。

30

【0024】

前記アガロース分解酵素は、序列番号 1 に記載されたアミノ酸序列及び前記序列と序列同一性が 80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、93 % 以上、94 % 以上、95 % 以上、96 % 以上、97 % 以上、98 % 以上、及び 99 % 以上のアミノ酸序列を含むことができる。

【0025】

本発明でポリペプチドがさらに他の序列に対して特定の割合（例えば、80 %、85 %、90 %、95 %、または 99 %）の序列同一性を有するとのことは、前記２つの序列を整列する際、前記序列の比較時に前記割合のアミノ酸残基が同じであることを意味する。前記整列及び百分率相同性または同一性は、当業界に公知された任意の適当なソフトウェアプログラム、例えば文献 [CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel など (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)] に記載されたものを使用して決定することができる。好ましいプログラムとしては、GCG Pileup プログラム、FASTA (Pearson など 1988 Proc. Natl Acad. Sci US A 85: 2444 - 2448)、及び BLAST (BLAST Manual、Altschul など、Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib

40

50

. Med . (N C I B N L M N I H) 、 B e t h e s d a , M D , 及び A l t s c h u l など 1 9 9 7 N A R 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2) が 有 る 。 さ ら に 他 の 好 ま し い 整 列 プ ロ グ ラ ム は 、 A L I G N P l u s (S c i e n t i f i c a n d E d u c a t i o n a l S o f t w a r e , P A) と し て 、 好 ま し く は 、 基 本 媒 介 変 数 を 用 い る 。 使 用 可 能 な さ ら に 他 の 序 列 ソ フ ト ウ ェ ア プ ロ グ ラ ム は 、 S e q u e n c e S o f t w a r e P a c k a g e V e r s i o n 6 . 0 (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , U n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n , M a d i s o n , W I) で 利 用 可 能 な T F A S T A D a t a S e a r c h i n g P r o g r a m で 有 る 。

【 0 0 2 6 】

本 明 細 書 に お い て 「 タ ン パ ク 質 」 及 び 「 ポ リ ペ プ チ ド 」 は 本 願 で 相 互 交 換 可 能 に 用 い ら れ る 。 本 願 で は 、 ア ミ ノ 酸 残 基 に 対 し て 通 常 の 1 文 字 ま た は 3 文 字 コー ド が 用 い ら れ る 。

10

【 0 0 2 7 】

前 記 酵 素 は 、 サ ッ カ ロ フ ァ ガ ス ・ デ グ ラ ダ ン ス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) 2 - 4 0 か ら 由 来 し た も の と す る こ と が で き る が 、 こ れ に 特 に 限 定 さ れ な い 。

【 0 0 2 8 】

前 記 酵 素 は 、 酵 素 の コー ディ ング 領 域 の 前 及 び 後 の 領 域 だ け で は な く 、 個 別 コー ディ ング 分 節 と の 間 の 介 在 序 列 が 含 ま れ た ポ リ ペ プ チ ド を 生 産 す る の に 連 関 さ れ た D N A 分 節 、 す な わ ち コー ディ ング 遺 伝 子 に よ り 転 写 及 び 翻 訳 さ れ る 。 例 え ば 、 序 列 番 号 2 に 記 載 さ れ た 序 列 と す る こ と が で き る が 、 こ れ に 特 に 限 定 さ れ な い 。

20

【 0 0 2 9 】

本 発 明 の ア ガ ロ ー ス 分 解 酵 素 は 、 サ ッ カ ロ フ ァ ガ ス ・ デ グ ラ ダ ン ス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) の 培 養 物 の 上 澄 液 ま た は 上 清 液 か ら 分 離 及 び 精 製 す る こ と が で き 、 遺 伝 工 学 的 再 組 合 技 術 を 用 い て サ ッ カ ロ フ ァ ガ ス ・ デ グ ラ ダ ン ス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) 以 外 の 菌 株 ま た は 人 工 的 な 化 学 的 合 成 法 な ど に よ っ て 生 産 及 び 分 離 す る こ と が で き る 。

【 0 0 3 0 】

再 組 合 技 術 を 用 い る 場 合 、 通 常 的 な 再 組 合 タ ン パ ク 質 発 現 の 容 易 さ の た め に 使 わ れ る 因 子 、 例 え ば 抗 生 剤 抵 抗 性 遺 伝 子 、 親 和 性 コ ラ ム ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー に 使 用 さ れ る リ ポー ター タ ン パ ク 質 ま た は ペ プ チ ッ ド を 用 い る こ と が で き 、 こ の よ う な 技 術 は 、 本 願 発 明 が 属 す る 技 術 分 野 の 当 業 者 な ら 容 易 に 実 施 可 能 な 範 疇 に 該 当 す る 。 ま た 本 発 明 の ア ガ ロ ー ス 分 解 酵 素 は 、 サ ッ カ ロ フ ァ ガ ス ・ デ グ ラ ダ ン ス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) 培 養 物 の 上 澄 液 ま た は 上 清 液 を 代 替 し て 用 い る か 、 ま た は 食 用 菌 株 、 例 え ば 酵 母 に 形 質 転 換 さ せ て 形 質 転 換 さ れ た 酵 母 の 培 養 物 の 上 澄 液 ま た は 上 清 液 を 代 替 し て 用 い る こ と が で き る 。

30

【 0 0 3 1 】

本 発 明 に お い て 、 細 胞 、 核 酸 、 タ ン パ ク 質 ま た は ベ ク ター と 係 わ っ て 使 用 す る 際 、 用 語 「 再 組 合 」 は 、 前 記 細 胞 、 核 酸 、 タ ン パ ク 質 ま た は ベ ク ター が 異 種 核 酸 ま た は タ ン パ ク 質 の 導 入 ま た は 本 来 核 酸 ま た は タ ン パ ク 質 の 変 更 に よ っ て 変 形 さ れ た か 、 ま た は 前 記 細 胞 が こ の よ う に 変 形 さ れ た 細 胞 か ら 由 来 し た こ と を 示 す 。 す な わ ち 、 例 え ば 、 再 組 合 細 胞 は 、 前 記 細 胞 の 本 来 (非 再 組 合) 形 態 内 で は 発 見 さ れ な い 遺 伝 子 を 発 現 す る か 、 ま た は 異 な っ て 発 現 し た 非 正 常 的 に 発 現 さ れ る か 、 ま た は 全 然 発 現 さ れ な い 本 来 遺 伝 子 を 発 現 す る 。

40

【 0 0 3 2 】

本 明 細 書 に お い て 「 核 酸 」 は 、 単 一 本 ま た は 二 重 本 D N A 、 R N A 、 及 び こ れ ら の 化 学 的 変 形 体 を 包 括 す る 。 「 核 酸 」 及 び 「 ポ リ ヌ ク レ オ チ ド 」 は 、 本 願 で 相 互 交 換 可 能 に 使 用 さ れ る 。 遺 伝 暗 号 が 退 化 さ れ て い る の で 、 特 定 ア ミ ノ 酸 を エ ン コー ド す る た め に 1 つ 以 上 の コー ド ン を 用 い る こ と が で き 、 本 発 明 は 特 定 ア ミ ノ 酸 序 列 を エ ン コー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド を 包 括 す る 。

【 0 0 3 3 】

核 酸 序 列 を 細 胞 内 に 挿 入 す る 用 語 「 導 入 」 は 「 ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン (t r a n s f e

50

c t i o n)」、または「形質転換」または「形質導入 (t r a n s d u c t i o n)」を意味し、核酸序列の真核または原核細胞内への統合に対する言及が含まれ、このとき前記核酸序列は細胞のゲノム (例えば、染色体、プラスミド、色素体、またはミトコンドリア DNA) 内に統合されて、自律レプリコンに転換されるか、または一時的に発現される。

【 0 0 3 4 】

前記アガロオリゴ糖及びアガロース分解酵素の反応は、20～40 の温度範囲で0～200rpmの条件に30分～7日間実施することができる。より詳しくは、25～35の温度範囲で100～150rpmの条件に1日～4日間実施することができる。

【 0 0 3 5 】

前記アガロオリゴ糖が粉末状態の場合、通常の緩衝溶液に溶かして用いることができるが、これに特に限定されない。

【 0 0 3 6 】

次に、前記酵素反応により生産されたネオアガロビオースをD - ガラクトースと3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースで分解することができるネオアガロビオース加水分解酵素は序列番号3に記載されたアミノ酸序列だけでなく、前記酵素の1つ以上の置換、欠損、転位、添加などの変異タンパク質として前記ネオアガロビオース加水分解活性を有するタンパク質も本発明の酵素の権利範囲に含まれ、好ましくは序列番号3に開示されたアミノ酸序列と序列同一性が80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、及び99%以上のアミノ酸序列を含む (以下、「s d N A B H」とする)。

【 0 0 3 7 】

前記酵素は、サッカロファガス・デグラダンス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) 2 - 40 から由来したものとすることができるが、これに特に限定されない。

【 0 0 3 8 】

前記酵素は、酵素のコーディング領域の前及び後の領域だけでなく、個別コーディング分節との間の介在序列が含まれたポリペプチドを生産するのに連関されたDNA分節、すなわちコーディング遺伝子を介して転写及び翻訳される。例えば、序列番号4に記載された序列とすることができるが、これに特に限定されない。

【 0 0 3 9 】

前記ネオアガロビオース加水分解酵素は、サッカロファガス・デグラダンス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) の培養物の上澄液または上清液から分離及び精製することができ、遺伝工学的再組合技術を用いてサッカロファガス・デグラダンス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) 以外の菌株または人工的な化学的合成法などによって生産及び分離することができる。

【 0 0 4 0 】

再組合技術を用いる場合、通常的な再組合タンパク質発現の容易さのために使用される因子、例えば抗生剤抵抗性遺伝子、親和性コラムクロマトグラフィーに使用されるリポータータンパク質またはペプチッドを用いることができ、このような技術は、本願発明が属する技術分野の当業者なら容易に実施可能な範疇に該当する。また本発明のネオアガロビオース加水分解酵素は、サッカロファガス・デグラダンス (S a c c h a r o p h a g u s d e g r a d a n s) 培養物の上澄液または上清液を代替して用いるか、または食用菌株、例えば酵母に形質転換させて形質転換された酵母の培養物の上澄液または上清液を代替して用いることができる。

【 0 0 4 1 】

前記ネオアガロビオースとネオアガロビオース加水分解酵素の反応は、20～40 の温度範囲で0～200rpmの条件に30分～7日間実施することができる。より詳しくは25～35 の温度範囲で100～150rpmの条件に1日～4日間実施することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

また、本発明の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの製造方法は、ネオアガラビオースの分解産物のうち 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースだけを分離精製する段階をさらに実施することができる。

【 0 0 4 3 】

前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースは吸着クロマトグラフィーであるシリカゲルクロマトグラフィー及びゲル透過クロマトグラフィーであるバイオゲル P 2 クロマトグラフィーを順次を実施しておおよそ 9 6 % の高純度で分離精製することができる。

【 0 0 4 4 】

精製した産物は、¹H - NMR と 2 D - H e t e r o n u c l e a r S i n g l e Q u a n t u m C o h e r e n c e (H S Q C) NMR 分析を施行して既存に報告された 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの¹H p p m と¹³C p p m とを比較して構造を同定することができる。

10

【 0 0 4 5 】

一具体例によれば、本発明の製造方法を介して 1 0 0 g のアガロースから化学的加水分解を介して 7 6 g のアガロオリゴ糖を生産し、A g a 5 0 D と s d N A B H 酵素を用いて 3 7 . 5 5 g のネオアガラビオースと 1 5 . 2 1 g の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースをそれぞれ生産し、また 2 種クロマトグラフィーを用いた精製過程を介して 3 . 9 8 g の純粋な 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを精製することができる。

【 0 0 4 6 】

本発明は、さらに 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース (3 , 6 - a n h y d r o - L - g a l a c t o s e) を含む皮膚美白または保湿用化粧品組成物に関する。

20

【 0 0 4 7 】

また、本発明は、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの皮膚美白または保湿のための美容的用途を提供する。

【 0 0 4 8 】

前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースは、既存の美白物質で最も広く知られているアルブチンよりも美白活性がさらに高く、メラニン合成を促進することと係わったチロシナーゼ、T R P - 1 などの発現を濃度依存的方式で抑制する特徴がある。

【 0 0 4 9 】

本発明の一具体例によれば、インビートでチロシナーゼ活性実験において、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースはチロシナーゼ活性を抑制するのでなく、酵素の発現を抑制することで美白効果を示す。

30

【 0 0 5 0 】

また、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースは、ヒアルロン酸の合成に関与する保湿マーカである H A S 2 タンパク質の発現を促進する特徴がある。

【 0 0 5 1 】

本発明の一具体例によれば、H A S 2 発現は、E R K 及び A K T などの多様な炎症信号伝達経路によって調節されるが、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースは E R K 及び A K T の燐酸化を増加させ、増加された燐酸化された E R K 及び A K T は H A S 2 発現を増加させることができる。

40

【 0 0 5 2 】

前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースは合成して用いるか、または本発明に係る 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの製造方法により製造されたものを制限なく用いることができる。

【 0 0 5 3 】

有効量を基準として、前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを自体または化粧品学的に許容された担体を混合した組成物を機能性成分で含む化粧品または化粧品を提供するが、一般的な乳化剤形及び可溶化剤形の形態で製造することができる。乳化剤形の化粧品としては、栄養化粧水、クリーム、エッセンスなどがあり、可溶化剤形の化粧品として

50

は柔軟化粧水がある。好適な化粧品の剤形としては、例えば溶液、ゲル、固体または練り無水生成物、水型に油型を分散させて得たエマルジョン、懸濁液、マイクロエマルジョン、マイクロカプセル、微細顆粒球またはイオン型（リボゾーム）、非イオン型の小胞分散剤の形態、クリーム、スキン、ローション、パウダー、軟膏、スプレーまたはコンシールスティックの形態で提供される。

【 0 0 5 4 】

また、フォーム（ f o a m ）の形態または圧縮された推進剤をさらに含むエアロゾル組成物の形態としても製造される。

【 0 0 5 5 】

このとき、上記形態の化粧品製造方法と担体は、当業者に自明な事項であって具体的な製造方法の記載については省略する。

10

【 0 0 5 6 】

また、前記化粧品は、本発明の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースに追加として脂肪物質、有機溶媒、溶解剤、濃縮剤及びゲル化剤、軟化剤、抗酸化剤、懸濁化剤、安定化剤、発布剤（ f o a m i n g a g e n t ）、芳香剤、界面活性剤、水、イオン型または非イオン型乳化剤、充填剤、金属イオン封鎖剤及びキレート化剤、保存剤、ビタミン、遮断剤、湿潤化剤、必須オイル、染料、顔料、新水性または油性と調和活性剤、脂質小胞または化粧品に通常的に用いる任意の他の成分のような化粧品学分野において通常的に使用される補助剤を含むことができる。

【 0 0 5 7 】

20

前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを食品または食品添加物として使用する場合、前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースをそのまま添加するか、または他の食品または食品成分とともに用いることができ、通常的な方法により適切に使用される。有効成分の混合量はその使用目的（予防、健康または治療的処置）によって適合に決定することができる。一般に、食品製造時、本発明の組成物は原料に対して 1 5 重量 % 以下、好ましくは 1 0 重量 % 以下の量に添加される。しかし、健康及び衛生を目的とするか、または健康調節を目的とする長期間の摂取の場合には、前記量は前記範囲以下とすることができ、安全性面から何ら問題もないので、有効成分は前記範囲以上の量であってもよい。

【 0 0 5 8 】

本発明は、さらに 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを含む皮膚色素沈着疾患の予防または治療用薬剤学的組成物に関する。

30

【 0 0 5 9 】

また、本発明は、皮膚色素沈着疾患の予防または治療のための薬剤学的組成物の製造のための 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの用途を提供する。

【 0 0 6 0 】

本発明の薬剤学的組成物は、薬剤学的組成物の製造に通常的に使用する適切な担体、賦形剤及び希釈剤をさらに含むことができる。

【 0 0 6 1 】

本発明の薬剤学的組成物は、それぞれ通常の方法によって散剤、顆粒剤、精製、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアロゾルなどの外用剤及び滅菌注射溶液の形態に剤形化して用いることができ、好ましくは、クリーム、ゲル、パッチ、噴霧剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、リニメント剤、パスタ剤またはカタプラズマ剤の形態で使用される。

40

【 0 0 6 2 】

本発明の薬剤学的組成物に含まれる担体、賦形剤及び希釈剤としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、オリゴ糖、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、澱粉、アカシアゴム、アルジネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、カルシウムシリケート、セルロース、メチルセルロース、未晶質セルロース、ポリビニールピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、マグネシウムステアレート及び鉱物油を有することができる。

50

【0063】

製剤化する場合には、普通用いる充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を用いて調剤することが好ましい。

【0064】

経口投与のための固形製剤としては、精製、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれ、このような固形製剤は、前記化合物に少なくとも1つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム (calcium carbonate)、スクロース (sucrose) またはラクトース (lactose)、ゼラチンなどを交ぜて調剤することが好ましい。また単純な賦形剤以外にマグネシウムステアレートタルクのような潤滑剤も使用される。経口のための液状製剤としては、懸濁液剤、内容液剤、油剤、シロップ剤などが該当するが、よく使用される単純希釈剤である水、液体パラフィン以外に多様な賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれることができる。非経口投与のための製剤としては、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁液剤、油剤、凍結乾燥製剤、坐剤などが含まれる。非水性溶剤、懸濁液剤としては、プロピレングリコール (propylene glycol)、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油、エチルオレートのような注射可能なエステルなどが使用される。坐剤の基材としては、witepsol、マクロゴール、ツイン (tween) 61、カカオ脂、ラウリンジ、グリセロゼラチンなどが使用される。

10

【0065】

本発明の薬剤学的組成物は、皮膚に適用することができる皮膚外用剤の剤形としてクリーム、ゲル、パッチ、噴霧剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、リニメント剤、パスタ剤またはカタプラズマ剤の皮膚外用剤形態の薬剤学的組成物として製造して用いることができるが、これに限定されない。

20

【0066】

本発明の薬剤学的組成物の好ましい投与量は、患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び期間によって異なるが、当業者により適切に選択することができる。しかし、好ましい効果のため、本発明の組成物は、1日に0.0001~100mg/kgで、好ましくは0.001~10mg/kgで投与した方がよい。外用投与は、一日に一度投与することもでき、数回分けて投与することもできる。前記投与量は、いかなる面においても本発明の範囲を限定するものではない。

30

【0067】

本発明は、さらに3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースの有効量を好ましくはこれを含む薬剤学的または化粧品組成物形態で投与する段階を含む美白または保湿を要求する哺乳動物、好ましくは人間皮膚の美白または保湿のための美容または医療方法に関する。

【0068】

同様に、本発明は、3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースを含む薬剤学的または化粧品組成物を皮膚に塗布する段階を含む色素沈着の調節と係わる皮膚の病態、疾患及び/または病変、好ましくはメラニン色素の合成増加により皮膚に局所的に発生し、しみ、そばかす、黒色点、母斑、薬物による色素沈着、炎症後の色素沈着、及び皮膚炎に発生する過色素沈着から選択された1つ以上を治療する美容または医療方法を提供する。

40

【0069】

3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースを含む薬剤学的または化粧品組成物の塗布頻度は、それぞれの被験者の必要に応じて変わりやすく、塗布頻度は毎月ないし1日10回、好ましくは毎週ないし1日4回、さらに好ましくは1週当たり3回ないし1日3回、最も好ましくは1日1回または2回が提案される。

【0070】

また、本発明は、皮膚、好ましくは顔、首、首線、手、わき、股座、ヒジ及び/または膝の皮膚、さらに好ましくは、顔、首及び/または手の局所部位の治療、管理及び/または洗浄のための薬剤学的または化粧品組成物の製造において3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースの用途に関する。

50

【 0 0 7 1 】

本発明は、さらに 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを含む炎症性疾患の予防または治療用薬剤学的組成物を提供する。

【 0 0 7 2 】

また、本発明は、薬剤学的有効量の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを含む炎症性疾患の予防または治療用組成物を個体に投与する段階を含む動物の炎症性疾患治療方法を提供する。

【 0 0 7 3 】

さらに、本発明は、炎症性疾患の予防または治療のための薬剤学的組成物の製造のための 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの用途を提供する。

10

【 0 0 7 4 】

前記 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースは、亜硝酸塩 (n i t r i t e 、 N O 2) の生成を抑制する抗酸化活性があり、これは海藻類を構成する他の二糖及び単糖であるネオアガロピオースとガラクトース、そして D - 形態の 3 , 6 - アンヒドロガラクトースと比較した場合、最も高く現われて炎症性疾患の予防または治療用薬剤学的組成物として用いることができる (図 8 参照) 。

【 0 0 7 5 】

前記炎症性疾患治療方法に使用される薬剤学的組成物及び投与方法は、上述したので、この 2 つの間に共通する内容は、本明細書の複雑性を避けるため、その記載を省略する。一方、前記炎症性疾患予防または治療用薬剤学的組成物を投与することができる個体はすべての動物を含む。例えば、犬、猫、マウスのような人間を除いた動物とすることができる。

20

【 0 0 7 6 】

前記薬剤学的組成物の有効成分の有効量は、疾患の治療をするのに要求される量を意味する。よって、疾患の種類、疾患の重症度、組成物に含有された有効成分及び他の成分の種類及び含量、剤形の種類及び患者の年齢、体重、一般健康状態、性別及び食餌、投与時間、投与経路及び組成物の分泌率、治療期間、同時使用する薬物を含めた多様な因子に応じて調節することができる。

【 0 0 7 7 】

さらに「治療」は、症状を軽減させるか、症状の原因を一時的または永久的に除去するか、または症状の出現及び上記の疾病、障害または疾患の進行を予防または鈍化させることを含むが、これに限定されない。

30

【発明の実施するための形態】

【 0 0 7 8 】

以下、本発明を、実施例を介して詳しく説明する。下記実施例は本発明を例示することであるだけ本発明の範囲が下記実施例に限定されるのではない。

【 0 0 7 9 】

< 実施例 1 > 酢酸を用いたアガロースの加水分解

海藻類を構成する代表的な多糖体であるアガロースを、酢酸を用いて加水分解した。 5 % (w / v) のアガロースを 3 M 酢酸と 8 0 で 7 0 分間反応させた後に乾燥させて酢酸を除去した。また、エチルアルコールを使った洗浄過程を介して乾燥後に残存している酢酸及び加水分解時に生成される過分解物を除去して純粋な粉末状態のアガロオリゴ糖を生産した (図 2) 。

40

【 0 0 8 0 】

< 実施例 2 > A g a 5 0 D 、 s d N A B H を用いた 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの生産

実施例 1 から生産した酸加水分解物から単糖体である D - ガラクトースと 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースに分解するためにエキソ型 (e x o - t y p e) の二糖体生産酵素である A g a 5 0 D (大韓民国公開特許第 2 0 1 0 - 0 0 4 0 4 3 8 号参照) と反応させて、反応産物としてネオアガロピオースを生産した。

50

【0081】

A g a 5 0 D 反応が終了した後にネオアガロビオースから単糖体である D - ガラクトースと 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを生産するために A g a 5 0 D 反応産物を s d N A B H 酵素 (大韓民国公開特許第 2 0 1 0 - 0 1 0 8 2 4 1 号参照) と反応させた。酵素反応条件は 1 0 0 m L の 5 0 m M T r i s - H C l 緩衝溶液 (p H 7 . 4) に 5 % (w / v) アガロオリゴ糖を溶かした後 3 0 において 1 5 0 r p m の条件に 3 日間反応させた。酵素反応時に使用した酵素の量は、A g a 5 0 D が 1 0 m g 、 s d N A B H が 2 . 5 m g であった (図 2) 。

【0082】

< 実施例 3 > シリカゲルクロマトグラフィーとバイオゲル P 2 クロマトグラフィーを用いた分離精製

実施例 1 と 2 によって生産された反応産物のうちに 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースだけを分離精製するためにクロマトグラフィーを実施した。反応産物をセルライトに吸着させてパウダー形態のサンプルを製造した後に吸着クロマトグラフィーであるシリカゲルクロマトグラフィーを実施した。移動相は、クロロホルム : メタノール : 水をそれぞれ 7 8 : 2 0 : 2 (v / v / v) の割合で混合した溶媒を使用し、全体移動相の溶媒の体積は 3 L であった。一分画の体積は 2 0 m L であって、総 1 5 0 分画のサンプルを T L C で分析した後にそのうち 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースがある分画を集めた。さらに進行するバイオゲル P 2 クロマトグラフィーは分子量により物質が分離されるので、3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースがある分画のうちから 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースと分子量が類似する D - ガラクトースがある分画は除去した (図 3) 。

【0083】

バイオゲル P 2 クロマトグラフィーを介して二糖体及び重合度が低いアガロオリゴ糖から 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースだけを純粋にすることができる。このときに使用する移動相は水であり、一分画当たり体積は 2 m L であった。各分画のうち T L C 上から 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトーススパッドだけを示す分画のみを集めて高純度の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを得た (図 2) 。

【0084】

図 2 に示すように、実施例 1 ~ 3 を介して 1 0 0 g のアガロースから化学的加水分解を介して 7 6 g のアガロオリゴ糖を生産し、A g a 5 0 D と s d N A B H 酵素を用いて 3 7 . 5 5 g のネオアガロビオースと 1 5 . 2 1 g の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースをそれぞれ生産した。さらに 2 種クロマトグラフィーを用いた精製過程を介して 3 . 9 8 g の純粋な 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを精製した。

【0085】

また、図 3 に示すように、湧出体積 (E l u t i o n v o l u m e) (L) の 0 . 2 5 ~ 0 6 7 では何も現れず、0 . 7 7 ~ 1 . 7 7 では 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース及びガラクトースを除外した異なる糖が現れ (濃縮した後のバイオゲル P 2 クロマトグラフィーに使用したサンプル) 、1 . 8 7 ~ 2 . 6 7 では、ガラクトースと異なる糖が現れた。

【0086】

< 実施例 4 > G C / M S 分析による 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの定性及び定量

実施例 3 によって生産された高純度の 3 , 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースを G C / M S で分析して定量した。G C / M S 分析のための誘導体化過程は次のようになる。精製したサンプルをスピードバッグで乾燥した後に 5 0 μ l の 2 % (w / v) の O - メチルヒドロキシルアミンヒドロクロライド / ピリジン (O - m e t h y l h y d r o x y l a m i n e h y d r o c h l o r i d e i n p y r i d i n e) を入れて 7 5 において 3 0 分間反応させた。そして、8 0 μ l の N - メチル - N - (トリメチルシリル) トリプルオロアセタミド (N - m e t h y l - N - (t r i m e t h y l s i l y l) t r i f l u o r o a c e t a m i d e) を入れて 4 0 において 1 5 0 r p m で 3 0 分間反

応させた。GC / MS 分析のための機器条件は次のようになる。分析時に使用したコラムは DB 5 - MS capillary column であり、GC コラム温度条件は先に 100 において 3.5 分間維持し、160 まで昇温させた後 20 分間維持した。その後 200 まで昇温した後に 15 分間維持し、最後に 280 まで昇温した後に 5 分間維持した。1 μ l のサンプルを 9.6 の分割比 (split ratio) で分析した (図 4)。

【0087】

< 実施例 5 > ^1H -NMR と 2D HSQC NMR 分析による 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの構造糾明

実施例 1 ~ 3 によって生産された高純度の 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトース化学構造の糾明のために NMR 分析をした。2 mg の 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースサンプルを D₂O に溶かし、化学的移動 (chemical shift) を計算するために内部標準 (internal standard) で 3 - (トリメチルシリル) - プロピオニック - 2, 2, 3, 3 - d₄ アシッド (3 - (trimethylsilyl) - propionic - 2, 2, 3, 3 - d₄ acid) を入れた。 ^1H -NMR と 2D HSQC NMR の化学的移動は、この以前に報告された文献の結果値と比較して構造を糾明して確認した (Sugano et al (1994) J Bacteriol . 176 (22) 6812 - 6818, Miller et al (1982) Aust J Chem . 35 (4) 853 - 856) (図 5 及び図 6)。

【0088】

< 実施例 6 > 分離、精製した 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの美白効果及び抗酸化活性の調査

実施例 1 ~ 3 によって生産された高純度の 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの美白活性を測定するために黒色腫細胞 (melanoma cell) である B16F10 を培養した。メラニン生成を促進するホルモンである α - メラニン細胞刺激ホルモン (α - melanocyte - stimulating hormone) を処理する前に美白剤として最も広く使用されるアルブチンと紅藻類を構成する糖類であるネオアガロピオース、D - ガラクトース、3, 6 - アンヒドロ - D - ガラクトース、そして 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースをそれぞれ 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した後に α - メラニン細胞刺激ホルモンと反応を実施した。4 日を一緒に培養した後に 475 nm 吸光度を測定してメラニン含量を分析した。

【0089】

その結果 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースが他の処理群より美白活性が非常に優れており、実際の美白活性機能性物質としてよく知られたアルブチンよりも活性が高く示された (図 7)。

【0090】

< 実施例 7 > 分離、精製した 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの抗酸化活性

実施例 1 ~ 3 によって生産された高純度の 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの抗酸化活性を測定するために RAW 264.7 細胞培養液の nitrite (NO_2) の濃度を Griess 反応方法で測定した。2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度のリポポリサカライド (lipopolysaccharides) を細胞に処理しながらネオアガロピオース、ガラクトース、3, 6 - アンヒドロ - D - ガラクトース、そして 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースをそれぞれ 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で処理した後に一緒に処理して抗酸化活性測定をした。24 時間を一緒に培養した後に 540 nm 吸光度を測定して抗酸化活性分析した。

【0091】

その結果 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースが他の処理群よりも抗酸化活性が非常に優れており、これは以前に報告された 3, 6 - アンヒドロ - D - ガラクトースの活性よりも高く示された (図 8)。

【0092】

10

20

30

40

50

<実施例 8> 3, 6 - アンヒドロ - L - ガラクトースの人の表皮メラニン細胞で美白効果実験

メラニンは皮膚及び髪の毛の色を決定する天然色素である。メラニンの知られた主要機能は吸収及び散乱された紫外線の照射による紫外線による DNA 損傷から保護するものである。しかし、過量のメラニン生成または非正常的な分布は、しみ、そばかす、老人性黒点などの不規則的な皮膚過色素沈着を誘発する。紫外線の照射は α - MSH (α - melanocyte-stimulating hormone)、ACTH 及びそれらの関連収容体である melanocortin 1 receptor (MC1R) の水準を増加させてチロシナーゼ及びチロシナーゼ関連タンパク質 (tyrosinase related proteins (TRPs)) を含めてメラニン合成酵素の発現を促進することが先行研究で明らかになった。銅含有糖蛋白質であるチロシナーゼは特定細胞器官、すなわち、メラニン細胞でのみ生成されるメラニン小体でメラニン合成のための重要な速度 - 調節段階酵素である。よって、チロシナーゼ発現の減少は皮膚着色を抑制するための良い戦略であるものと看做される。

【0093】

また、TRP - 1 は、構造的にチロシナーゼと連関されていて、~ 40 % アミノ酸相同性を共有し、チロシナーゼのようにメラニン小体に存在する。先行研究報告によると、TRP - 1 の突然変異結果、青白い皮膚または髪の毛色が現れ、眼皮膚白皮症の特定タイプで現れる。また、TRP - 1 は、TRP - 1 発現抑制が低色素沈着症と連関されているので、メラニン合成で役割を担当するものと提示されている。

【0094】

したがって、L - AHG の皮膚美白活性可能性を評価するため、 α - MSH により誘導されたチロシナーゼ及び TRP - 1 発現に対する L - AHG の効果を調査した。

【0095】

そのための細胞として適当に着色された新生児包皮来由の人の表皮メラニン細胞 (Human epidermal melanocytes、HEMs、Cascade Biologics (Oregon, USA)) を使用した。細胞は 5 % CO_2 を含む加湿雰囲気中で 37 の温度条件に培養した。HEMs に対する生長培地は HMGs を添加した Medium 254 (Cascade Biologics (Oregon, USA)) である。

【0096】

HEM (1×10^5) を 6 - cm ディッシュで 24 時間の間培養した。何日間 100 nM α - MSH (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) に露出する前に前記細胞に 0, 25, 50 及び $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度の 3, 6 - anhydro - L - galactose (L - AHG) を 1 時間の間処理した。溶菌バッファ [20 mM Tris - HCl ($\text{pH} 7.5$)、 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA 、 1 mM EGTA、1 % Triton X - 100, 2.5 mM sodium pyrophosphate、 1 mM β - glycerophosphate、 1 mM Na_3VO_4 、 $1 \text{ g}/\text{mL}$ leupeptin、 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 及び protease inhibitor cocktail tablet] で細胞を溶解した。タンパク質濃度は、染料が結合されたタンパク質分析キット (Bio - Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA) を用いて製造社のマニュアルに応じて測定した。溶解されたタンパク質 ($20 - 40 \mu\text{g}$) に対して 10 % SDS - PAGE を実施し、誘電泳動によってポリビニリデンフルオライド (polyvinylidene fluoride、PVDF) メンブレインでトランスファした (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)。プロテイング後、5 % スキムミルク (MBC cell, Los Angeles, CA, USA) で 2 時間の間メンブレインをブロッキングして 1 次抗体 (goat anti - mouse IgG - HRP) とともに、4 でオーバーナイト間インキュベーションした。続いて、前記メンブレインを 2 次抗体 (

10

20

30

40

50

goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody)とともに、インキュベーションし、化学発光検出キット (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用いて抗体が結合されたタンパク質を検出した。対照群として β -アクトチンの発現水準を測定した。データは2回独立実験の代表値を示すものである。

【0097】

インビートでチロシナーゼ分析は、既報告された方法 (Ishihara Y et al., The journal of antibiotics (Tokyo) 1991; 44: 25-32; An SM, Koh JS, Boo YC, Phytotherapy Research 2010; 24: 1175-1180) を少し変形して実行した。簡単に言って、250 μ l の0.1 Mポタシウムフوسفेटバッファ (pH 6.8) を24-ウェルプレート上に入れ、25 μ l のキノコ来由のチロシナーゼ (2000 unit/mL)、25 μ l の試料及び225 μ l の蒸留水を前記ウェルに付加した。前記プレートは、25 において10分間インキュベーションし、25 μ l の1 mM L-チロシンを前記ウェルに付加して基質として使用した。25 において10分間インキュベーションした後、microplate reader (Sunrise-Basic Tecan, Austria) を用いて475 nmで各ウェルの吸光度を測定した。各測定する対照群に対する変化率 (%) で表示した。L-チロシンを基質として使用し、アルブチンを養成対照群として使用した。結果は未処理対照群に対してチロシナーゼ相手活性として表現した。

10

20

【0098】

図9に示すように、 α -MSHにより誘導されたチロシナーゼ発現を比較すると、100 μ g/mL のL-AHGを処理した場合、HEMsで α -MSHにより誘導されたチロシナーゼ発現が有意的に減少した。

【0099】

また、L-AHG処理によるチロシナーゼ発現減少と類似に (図9A)、TRP-1発現は、HEMsでL-AHG濃度依存的方式に減少した (図10)。

【0100】

次に、無細胞分析システムを用いてチロシナーゼ活性に対するL-AHGの効果を調査した。多くの報告で、キノコ来由のチロシナーゼは精製形態で直ちに用いることができ、モデルとして一次的に使用したと記載している。L-チロシンの競争的抑制剤であるアルブチン (Arbutin) は養成対照群として使用し、これはキノコのチロシナーゼ活性を抑制する (図11)。結果は、未処理対照群に対するチロシナーゼの相手活性として表示した。データは3回独立実験から平均 $\pm$ S.D.として示し、単一統計比較のためにスチューデントテストを使用した。統計的意義に対する基準として $p < 0.05$ の有意性値を使用した。別表は、未処理対照群と比較して有意的な差 ($p < 0.05$) を示すものである。

30

【0101】

図11に示すように、L-AHGは、キノコのチロシナーゼ活性においてどのような有意的な減少も誘導しなかった。アルブチンは200 μ Mの濃度で、40%までチロシナーゼ活性を減少させた。

40

【0102】

前記結果を総合すると、L-AHGは、チロシナーゼ及びTRP-1の発現を抑制する新規の低色素沈着剤であることを示唆する。

【0103】

<実施例9> 3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースの人の角質細胞で保湿効果実験

ヒアルロナン (Hyaluronan, HA) は、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンで構成されたグリコサミノグリカンである。多量の水を保管することができる能力により、HAは水分バランス及び浸透圧を調節することにおいて重要な役割を担当する。HAは、HAS1、2及び3により細胞膜で合成され、特にHAS2は人

50

の正常組織で現れる。先行研究において、HAS2の遺伝子欠乏はマウスモデルで胎児期致死率を誘発し、成人の皮膚の表皮及び真皮で減少されたHAS2遺伝子発現を見せる。よって、HAS2発現増加は皮膚恒常性を維持するための良い戦略とすることができる。HAS2発現に対するL-AHGの誘導時点及び濃度を測定するため、ウエスタンブロット分析を実行した。

【0104】

このために使用された細胞は、HaCaT細胞として10% FBS及びペニシリン/ストレプトマイシンが添加されたDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、GIBCO (登録商標) Invitrogen、Auckland、NZ)を用いて5% CO₂雰囲気下で37℃で培養した。

10

【0105】

細胞 (1×10^5) を6-cmディッシュで24時間の間培養した後、無血清培地でさらに24時間の間飢えさせてキナーゼの活性化に対するFBSの影響を除去した。その後、日程時間及び濃度で3, 6-anhydro-L-galactose (L-AHG) を処理した。溶菌バッファ [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM Na₂EDTA、1 mM EGTA、1% Triton X-100、2.5 mM sodium pyrophosphate、1 mM β -glycerophosphate、1 mM Na₃VO₄、1 g/mL leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 及び protease inhibitor cocktail tablet] で細胞を溶解させた。タンパク質濃度は、染料が結合されたタンパク質分析キット (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて製造社のマニュアルに応じて測定した。溶解されたタンパク質 (20-40 μ g) に対して10% SDS-PAGEを実施し、誘電泳動によりポリビニリデンフルオライド (polyvinylidene fluoride (PVDF)) メンブレインでトランスファした (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)。ブロッキング後、5% スkimミルクで2時間の間メンブレインをブロッキングし、1次抗体 (goat anti-mouse IgG-HRP) とともに、4℃でオーバーナイト間インキュベーションした。続いて、前記メンブレインを2次抗体 (goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody) とともに、インキュベーションし、化学発光検出キット (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用いて抗体が結合されたタンパク質を検出した。データは2回独立実験の代表値を示した。

20

30

【0106】

図12に示すように、L-AHGは、処理3時間後HAS2発現を増加させた。また、L-AHGは、濃度依存的な方式でHAS2発現を増加させた。

【0107】

HAS2発現は、MAPKs及びAKTなどの多様な炎症信号伝達経路によって調節されることが既に明かされている。よって、多様な炎症信号伝達経路でL-AHGの効果を測定した。

40

【0108】

図13Aに示すように、100 μ g/mLのL-AHGは、処理3時間後、ERKの磷酸化を有意的に増加した。ERKの磷酸化に対するL-AHGの濃度依存的な効果を測定するため、25, 50及び100 μ g/mLのL-AHGを処理した。L-AHGによち誘導されたHAS2発現と類似に (図13B)、ERKの磷酸化はL-AHG濃度依存的な方式で増加した。

【0109】

図14Aに示すように、100 μ g/mLのL-AHGは、処理3時間後、AKTの磷酸化を有意的に増加させた。AKTの磷酸化に対するL-AHGの濃度依存的な効果を測定するため、25, 50及び100 μ g/mLのL-AHGを処理した。L-AHGは、

50

濃度依存的な方式でA K Tの燐酸化を増加させた(図14B)。

【0110】

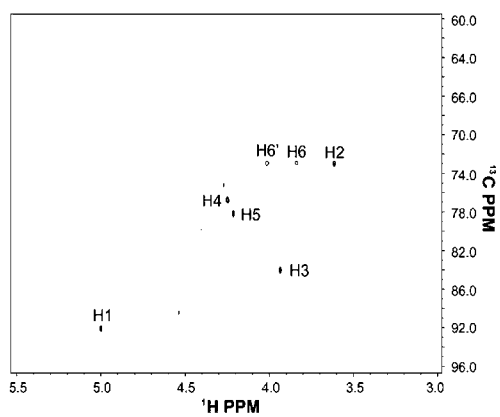
前記結果を総合すると、L-AHGにより誘導されたERK及びAKTの燐酸化は、L-AHGによるHAS2発現増加に寄与するものと見られる。

【産業上の利用可能性】

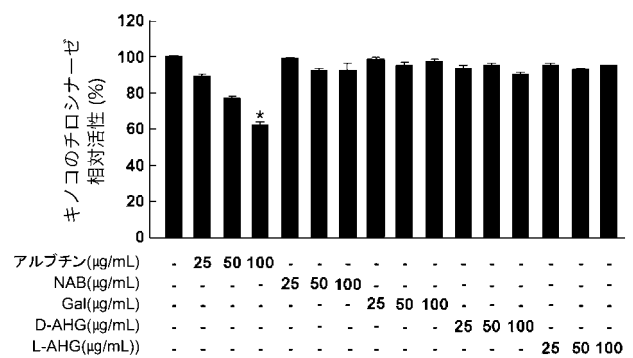
【0111】

本発明は、3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースを保湿剤として用いることができる。

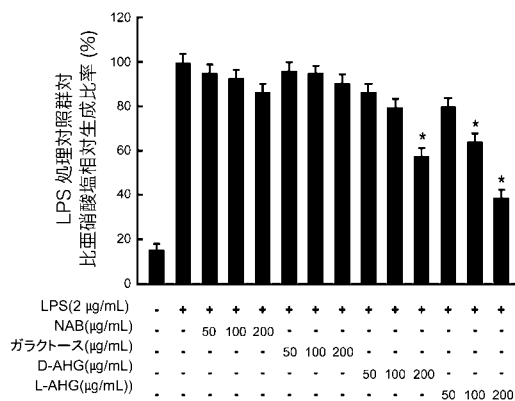
【図6】



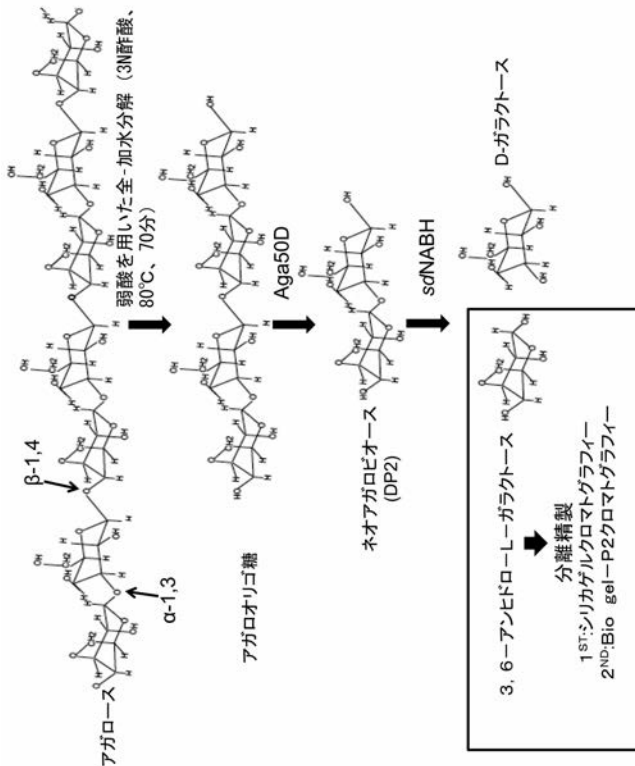
【図11】



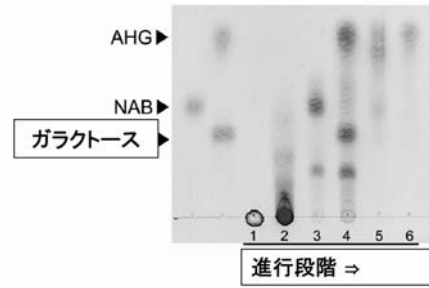
【図8】



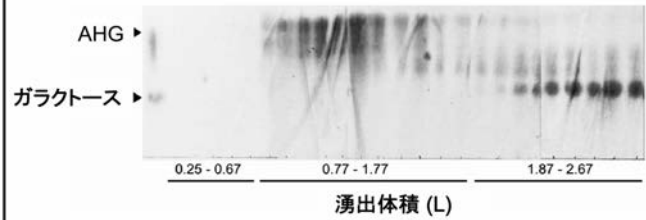
【 図 1 】



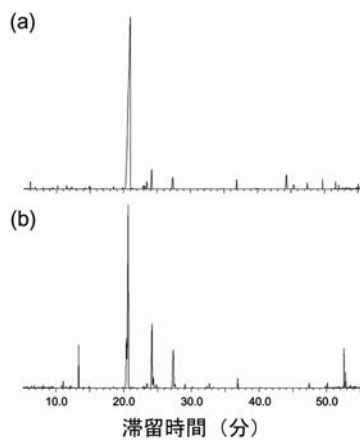
【圖 2】



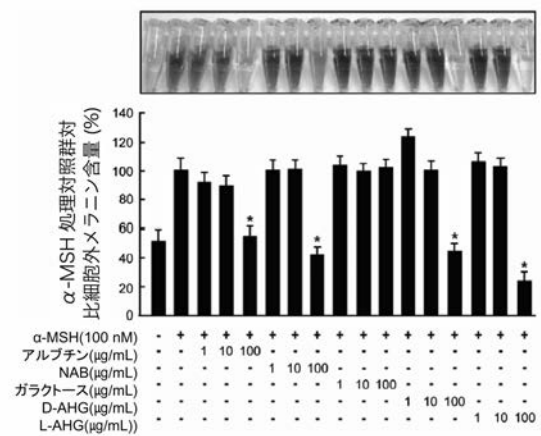
【 図 3 】



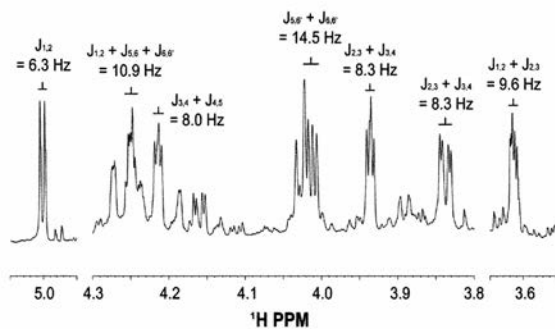
【 図 4 】



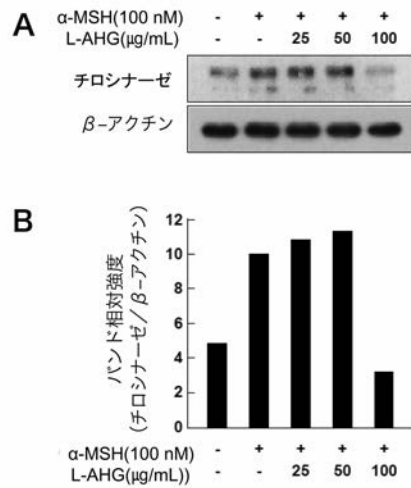
【圖 7】



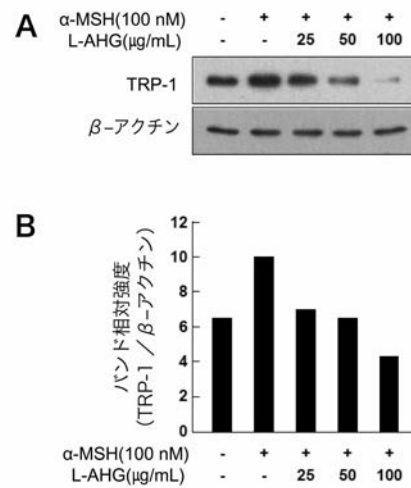
【 図 5 】



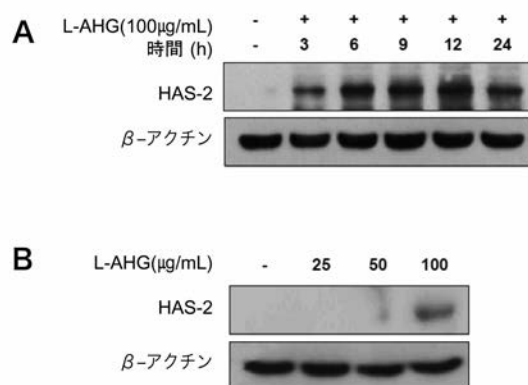
【 図 9 】



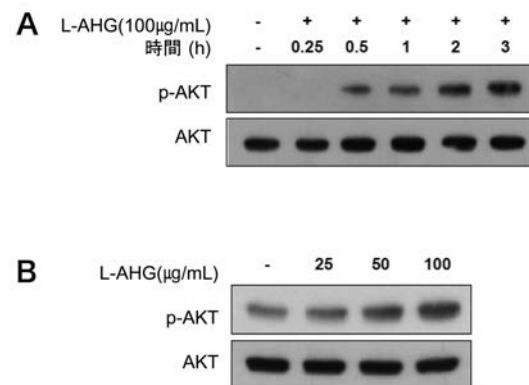
【 図 10 】



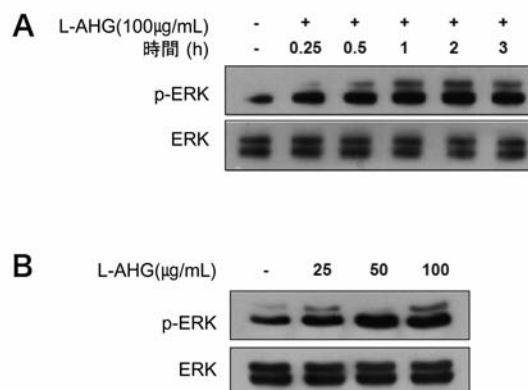
【 図 12 】



【 図 14 】



【 図 13 】



フロントページの続き

- (72)発明者 チェ インゴル
大韓民国 ソウル市 銅雀区 舎堂1洞 419-92 201
- (72)発明者 カン ナムジュ
大韓民国 大邱市 北区 山格洞 1370番地 慶北大学 農業生命科学大学 食品工学部
- (72)発明者 ユン ウンジュ
大韓民国 ソウル市 衿川区 始興3洞 現代ヴィラ 14棟 104号
- (72)発明者 イ セヨン
大韓民国 京畿道 義王市 五全洞 エルジーアパート 103棟 1502号
- (72)発明者 キム ジヘ
大韓民国 大邱市 北区 山格洞 1370番地 慶北大学 農業生命科学大学 3号館 314号
- (72)発明者 キム ヨンア
大韓民国 大邱市 北区 山格洞 1370番地 慶北大学 農業生命科学大学 3号館 314号
- (72)発明者 キム ポベ
大韓民国 大邱市 北区 山格洞 1370番地 慶北大学 農業生命科学大学 3号館 314号
- (72)発明者 ペク ウンジ
大韓民国 大邱市 北区 山格洞 1370番地 慶北大学 農業生命科学大学 3号館 314号

Fターム(参考) 4C057 BB02

4C083 AD201 AD202 CC02 EE12

4C086 AA01 AA02 EA01 MA01 MA04 MA63 NA14 ZA89