

발간등록번호

11-1541000-001033-01

일반과제 (O)

과제번호 108078-3

재조합 대장균으로부터 세로토닌유도체 생산과
기능성 화장품 소재개발 및 제품화

(Development of Functional Cosmetics Resources and Production of
Serotonin Derivatives by Using Recombinant *Escherichia coli*)

전남대학교

농림수산식품자료실



0005708

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “재조합 대장균으로부터 세로토닌유도체 생산과 기능성 화장품 소재개발 및 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 07월 08일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 백 경 환

연 구 원 : 이성진, 김영순,
최여진, 윤지혜,
이경진, 이종성,
김용우, 공경진,
정은선

협동연구기관명 : (주)바이오스펙트럼

협동연구책임자 : 이 상 엽

요 약 문

I. 제 목

재조합 대장균으로부터 세로토닌유도체 생산과 기능성 화장품 소재개발 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목표는 식물에서 미량 생산되는 세로토닌유도체(예; feruloylserotonin(FS), 4-coumaroylserotonin(CS), 및 caffeoylserotonin(AS))를 대장균에서 생산하고자 한다. 이를 위해 생합성에 관여된 두 개의 유전자를 도입하고, 이들 재조합 대장균에 기질을 공급하여 다양한 세로토닌유도체를 균체 밖으로 생산하여, 대량 생산한다. 재조합 대장균에서 대량 생산된 천연물 세로토닌유도체를 이용하여 기능성 화장품의 소재개발 및 제품화를 시도한다. 또한 세로토닌유도체 화합물의 기능을 분자적으로 규명하기 위해 피부세포를 이용하여 상기 화합물의 작용기전을 검정하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구진은 세로토닌유도체 생산하는 재조합 대장균을 만들어 놓았고, 기질인 4-coumaric acid 와 serotonin 을 처리하면 4-coumaroylserotonin 이 liter 당 200 mg 정도로 배지에서 생산됨을 확인한 상태이다. 제1세부과제는 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 생산기술을 분자적 및 생물공학을 이용하여 최적 시스템을 규명하고, 제2세부과제에서는 상기 세로토닌유도체 화합물의 pure compounds를 확보하여 피부세포에 대한 분자생물학적 세포생물학적 기법을 통해 세로토닌유도체 화합물의 생리활성을 과학적으로 입증하고 타깃유전자를 발굴하여 염증성피부질환 치료제로서의 가능성을 분석한다. 제1협동과제에서는 세로토닌유도체를 기능성 화장품 소재로서의 이용하고, 다중중리포솜 및 나노리포솜 기술로 제품화 가능성을 산업적 측면에서 연구하여 기능성 화장품소재 개발 및 제품화를 추진하고자 한다.

IV. 연구개발결과

1. 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 연구

식물에만 존재하는 phenylpropanoid amides를 재조합 대장균에서 대량으로 생산하였다. 애기장대에서 유래한 4-coumarate:coenzyme A ligase(4CL2)와 고추에서 유래한 serotonin N-hydroxycinnamoyltransferase(SHT)를 발현시킨 재조합 대장균에 여러 가지 precursor를 처리하면, 수 시간안에 다량의 phenylpropanoid amides가 배양액에 합성된다. 합성되는 phenylpropanoid amides 종류와 양은 4-coumaroylserotonin이 리터(L)당 215mg, 4-coumaroyloctopamine이 리터(L)당 208mg, 4-coumaroyltyramine이 리터(L)당 187mg 으로 나타났다. 애기장대 4CL1 과 SHT 유전자 동시발현 재조합 대장균에서 세로토닌유도체 생산을 측정해 본 결과, 4CL2/SHT 유전자 동시발현에 비해 현저히 낮은 세로토닌유도체를 생산하였다. 또한 4CL2/SHT 유전자를 periplasm targeting 서열에 클로닝하여, periplasm으로 발현 시켰을 경우, 4CL2는 periplasm으로 이동하지만, SHT가 periplasm으로 이동하지 않을 뿐더러, 발현량이 상대적으로 적어, 세로토닌유도체 합성이 매우 저조하였다. 또한 4CL2 와 THT유전자 동시발현 대장균에서 티라민유도체 생산은 세로토닌유도체 생산과 비슷하게 많은 양으로 합성되는 것을 확인 할 수 있었다. 애기장대 4CL 유전자대신 벼에서 발현되는 4CL 유전자를 SHT 유전자 동시발현 재조합 대장균에서 세로토닌유도체 생산을 측정해 본 결과, 애기장대 4CL2/SHT 유전자 동시발현에 비해 현저히 낮은 세로토닌유도체를 생산하였다. 또한 TDC 와 tryptamine 5-hydroxylase (T5H) 유전자를 동시발현 시키는 pCOLADuet-GST Δ 37T5H+TDC 발현 유전자를 발현 시켰을 경우, 트립토판 처리에 따른 세로토닌 생산을 기대할 수 있다. 트립토판 농도에 따라 트립타민은 지속적으로 생산이 증대되지만, 세로토닌 함량은 0.5 mM 농도에서 정지됨을 알 수 있었다. 최대 세로토닌 생산량은 L 당 24 mg 정도로 관찰되었다. 최적 세로토닌 생산을 유지하기 위해서는 0.5 mM IPTG 농도와 induction 온도가 20°C, 1% 에탄올 첨가에 따른 T5H 단백질의 solubility가 증대가 요구됨을 알 수 있었다.

2. 세로토닌유도체의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능 분석

사람 피부세포인 HaCaT keratinocytes에서 serotonin(SR)과 serotonin 전구체인 coumaroylserotonin(CS), caffeoylserotonin(CaS), feluroylserotonin (FS)의 항산화 활성과 세포 성장 촉진 활성을 분석하였다. SR은 5-80 uM 농도 내에서 toxicity를 보이지 않았고 CS, CaS, FS는 20 uM까지는 영향을 미치지 않았으며 40 uM부터 Toxicity를 보였다. CaS은 5, 10 uM에서 Toxicity를 보이지 않을 뿐만 아니라 세포의 성장을 촉진하는 것으로 보였다. 5-20 uM CS,

CaS, FS를 미리 처리한 후 0.5 mM H₂O₂ 산화적 스트레스에 노출 시켰을 경우 세포를 보호하는 효과를 보였으며 5, 10 uM CS, CaS, FS를 미리 처리하였을 경우 산화적 스트레스 하에서 세포내 유해산소 생성을 억제시키는 효과를 보였다. 네 가지 물질 모두 미리 처리한 후 산화적 스트레스에 노출 시켰을 경우 세포 내 지질과산화 수준이 증가되지 않게 하는 효과를 확인 할 수 있었으며 특히 serotonin에서 그 효과가 탁월하였다. 세포 성장을 촉진하는 것으로 여겨진 CaS를 10 uM 농도로 시간 별로 처리한 결과 세포 성장 유도 유전자로 알려진 c-fos와 cell cycle의 중요한 factor인 cyclin D1의 발현이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 또한 HaCaT keratinocytes에서 serotonin(SR)과 serotonin 전구체인 coumaroylserotonin(CS), caffeoylserotonin(CaS), feluroylserotonin (FS)의 항산화 활성 가운데 DNA 손상으로부터 보호하는 활성과 산화적 스트레스에 의해 촉진되는 세포내 단백질의 carbonylation 등을 측정하였으며, 피부세포 성장 촉진 활성을 분석하였다. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상은 histone H2AX 단백질의 인산화를 분석함으로써 측정이 가능한데 H2AX는 DNA에 double strand break 이 생기면 H2AX의 인산화가 촉진되기 때문이다. CaS가 H2AX의 인산화를 가장 강력하게 억제하였으며, SR이 그 뒤를 이었으나, CS, FS는 이러한 활성을 보이지 않았다. 또한 산화적 스트레스에 의해 단백질의 carbonylation 또한 증가하는데 0.5 mM H₂O₂를 처리한 HaCaT 세포의 단백질의 carbonyl content가 증가함을 관찰하였다. 산화적 스트레스에 의한 carbonylation을 억제하는 활성은 SR가 가장 높았으며, FS, CaS가 그 뒤를 이었다. 또한 세포내 단백질의 인산화를 phosphor-Tyr, p-Ser, p-Thr antibodies를 이용하여 분석해 본 결과 p-Tyr에서 인산화 패턴의 차이를 관찰할 수 있었다. 이러한 차이가 세포내 신호전달에 어떤 작용을 하는지 추가 연구가 필요한 것으로 보인다. 또한 CaS의 항염증 효능을 분석하기 위하여 human monocyte THP-1을 이용한 실험을 수행한 결과 CaS는 THP-1의 migration, invasion 등을 억제하는 것을 관찰하였다. CaS는 20 uM 농도에서 가장 높은 migration/adhesion inhibition 효과를 나타내었으며, THP-1 세포 표면에서 CCR2, VLA5, CD29와 같은 integrin 유전자의 발현을 감소시켜 단핵구 세포에서 항염증 효능을 보였다.

3. 세로토닌유도체를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발

멜라닌 형성세포인 B16 melanoma 세포와 NIH3T3 세포 그리고 콜라겐, 엘라스틴 등 피부결합조직 생산에 중요한 역할을 하는 human dermal fibroblasts에 serotonin 전구체인 coumaroylserotonin(CS), caffeoylserotonin(CaS), feluroylserotonin (FS)을 처리하여 미백효과와 항염효과, 주름효과를 확인하였다. B16 melanoma 세포에 세로토닌 전구체를 처리하여 멜라닌 양을 측정한 결과 CS와 CaS가 50 uM에서 40% 이상의 멜라닌 생성 억제효과를 보였다.

NIH3T3에 NF-kB luciferase gene을 transfection시킨 후 TNF α 와 시료를 함께 처리한 후 Luc activity를 측정된 결과 TNF α 에 의해 증가된 NF-kB 활성을 의미있게 감소시키는 시료는 관찰되지 않았다. Human dermal fibroblasts에 세로토닌 전구체를 처리하여 세포증식을 관찰한 결과 의미있는 변화는 관찰되지 않았다. 세 전구체 모두 50 μ M이상에서 fibroblast에 세포독성효과를 나타내었고, 따라서 fibroblast에서 수행한 콜라겐 합성시험과 콜라게네이즈 억제시험은 세로토닌 전구체가 세포독성을 보이지 않는 30 μ M이하로 처리하였다. 그 결과 CaS가 농도의존적으로 콜라겐 생성을 감소시키는 결과를 보였다. CaS의 경우 주름개선보다는 과도한 콜라겐생성으로 야기되는 sclerosis, scar, fibrosis등으로 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 콜라게네이즈 MMP-1활성 시험에서 MMP-1활성에 의미있는 영향을 미치는 시료는 관찰되지 않았다. 지방전구세포인 3T3L1에 세로토닌 전구체를 처리하고 지방세포로의 분화과정에 미치는 영향을 시험한 결과 CS, CaS, FS 모두 지방전구세포 분화를 억제하는 결과를 보였고, 중성지방 생성도 억제하였다. 세로토닌 전구체인 caffeoylserotonin(CaS)을 인간 섬유모세포에 처리하여 섬유모세포에서 섬유화를 유발하는 사이토카인인 TGF- β 1 및 type I collagen, fibronectin 등의 세포외기질의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. Coumaroylserotonin(CS) caffeoylserotonin(CaS), feruloylserotonin (FS)의 화장품 원료화를 위한 물리 화학적 특성을 규명하는 작업을 수행하였고 원료내 빛, pH, 열 안정성을 확인하였다. 세로토닌 유도체에 대한 물리/화학적 자료를 정리하여 CTEA등재 신청하였고, 최종 등재 완료되었다. 세로토닌 유도체의 인체안전성을 확인하기 위해 피부일차자극 시험을 수행하였고 수행결과 피부적용농도 (0.01%)에서 피부에 안전한 것으로 관찰되었다. 3종의 세로토닌 유도체중 물리화학적으로 안정성이 우수한 CS의 슬리밍원료로의 개발을 목표로, 먼저 지방분화억제 기전을 serotonin(S)과 비교하는 연구를 수행하였으며, 안정성과 피부투과도를 개선시키기 위한 리포솜 원료개발 연구를 수행하였다. 그 결과 시험된 농도에서 유의미한 효과를 나타내지 못하는 S에 비해 CS는 농도의존적으로 지방분화억제, triglyceride억제, GPDH활성억제 효과를 나타내었으며 이는 PPAR- γ 발현 억제기전을 통해 이루어짐을 확인하였다. 리포솜 제형내 CS의 안정성 시험결과 열안정성, 광안정성이 개선됨을 관찰하였고, Franz diffusion system을 이용한 피부투과도 시험결과 피부투과율이 현저히 증가됨을 확인하였다. 이를 바탕으로 슬리밍관련 시제품 1종을 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. SCI 논문 게재

- (1) Kang K, Back K (2009) Production of phenylpropanoid amides in recombinant *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 11(1): 64-68. IF: 4.7.
- (2) Kang K, Park S, kim YS, Lee S, Back K (2009) Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(1): 27-34. IF: 2.47
- (3) Kang K, Park M, Park S, Kim YS, Lee S, Lee SG, Back K (2009) Production of plant-specific tyramine derivatives by dual expression of tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase and 4-coumarate:coenzyme A ligase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 31(9): 1469-1475. IF: 1.13
- (4) Choi JY, Kim H, Choi YJ, Ishihara A, Back K, Lee SG (2010) Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in HepG2 and HaCaT cells. *Fitoterapia* 81: 1134-1141. IF: 1.899
- (5) Park S, Kang K, Lee SW, Ahn MJ, Bae JM, Back K (2011) Production of serotonin by dual expression of tryptophan decarboxylase and tryptamine 5-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(5): 1387-1394. IF: 2.896

2. 특허등록

4CL 유전자 및 SHT 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 그에 의해 형질전환된 세균 및 이를 이용한 페닐프로파노이드 아미드계 화합물의 생산방법 (출원일 2008. 03. 11, 출원번호 10-2008-0022494, 등록일 2010. 06. 16, 등록번호 10-0965984)

3. 기술이전

- 연구개발과제명 : 재조합 대장균으로부터 세로토닌유도체 생산과 기능성 화장품 소재개발 및 제품화
- 총 연구개발비 : 480,000천원 (정부출연금액 : 360,000천원, 참여기업부담금액 : 120,000천원)
- 기술료 징수액 : 50,400천원 (정부출연금액의 14%)
- 기술사용기간 : 8년 (2011년 1월 1일 ~ 2019년 12월 31일)
- 계약당사자
(갑) 주관연구기관 : 전남대학교 산학협력단
(을) 실시기업(참여기업) : 바이오스펙트럼(주)
- 기술 : 4CL 유전자 및 SHT 유전자를 포함하는 재조합 박터, 그에 의해 형질전환된 세균 및 이를 이용한 페닐프로파노이드 아미드계 화합물의 생산방법 (특허등록 제10-0965984호, 등록일 : 2010년 6월 16일)"

4. 세로토닌유도체 이용한 기능성화장품 시제품 1건 개발

제품명: Genophyto Emotique 바디쉐이핑 에센스

SUMMARY

I. Title

Development of functional cosmetics resources and production of serotonin derivatives by using recombinant *Escherichia coli*

II. Objects and Significance

Our research goal is to produce in *Escherichia coli* serotonin derivatives such as p-coumaroylserotonin (CS) and feruloylserotonin (FS) which are found in very low levels in plants. To achieve this goal, we introduce two key biosynthetic genes for serotonin derivatives into *E. coli* and have *E. coli* harboring two genes produce serotonin derivatives in abundance in the presence of various phenolic substrates and serotonin. Next, we employ these serotonin derivatives to use as functional cosmetics resources and make an attempt to develop commercially. Finally, by using skin cells, we examine the functional significance of these serotonin derivatives via various molecular analyses.

III. Research Contents and Scopes

To examine whether *E. coli* expression of two key biosynthetic genes such as 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL2) and pepper serotonin *N*-hydroxycinnamoyltransferase (SHT) for serotonin derivatives produce serotonin derivatives in *E. coli*, we have employed various sources of 4CL and SHT to maximize production yields of serotonin derivatives in *E. coli*. Several other approaches were also employed to accomplish our goal as followings. We investigate the cytoprotective effects of serotonin derivatives based on intracellular reactive oxygen radical (ROS) generation, lipid peroxidation, protein carbonylation, and phosphorylation of histone H2AX in H₂O₂ treated-HepG2 and HaCaT cells. Finally, we have observed whitening effects, anti-inflammation effects, and

anti-wrinkles effects to employ these serotonin derivatives for functional cosmetic resources.

Followings are experimental scopes in details.

- *E. coli* expression of *Arabidopsis* 4CL2 and SHT for production of serotonin derivatives.
- *E. coli* expression of *Arabidopsis* 4CL1 and SHT for production of serotonin derivatives.
- *E. coli* expression of rice 4CL1 and SHT for production of serotonin derivatives.
- Periplasmic expression of *Arabidopsis* 4CL2 and SHT for production of serotonin derivatives.
- *E. coli* expression of tryptophan decarboxylase (TDC) and tryptamine 5-hydroxylase (T5H) for production of serotonin.
- Anti-oxidant activities of serotonin derivatives in human HepG2 and HaCaT cells
- Analysis of antioxidant activities of serotonin derivatives on intracellular ROS generation, lipid peroxidation, phosphorylation of H2AX, and protein carbonylation in HaCaT cells
- Analysis of proliferating activities of serotonin derivatives in HaCaT cells
- Analysis of anti-inflammatory activity in THP-1 monocyte cells
- Analysis of whitening activity in B16 melanoma cells
- Analysis of anti-inflammatory activity in NIH 3T3 cells(mouse embryonic fibroblasts)
- Analysis of anti-wrinkle activity in human dermal fibroblasts
- Analysis of anti-obesity activity in 3T3L1 preadipocytes
- Analysis of anti-fibrosis activity in human dermal fibroblasts
- Analysis of stability of serotonin derivatives on pH, heat condition
- Analysis of serotonin derivatives' safety on human skin
- Analysis of skin permeability of liposome formulation containing serotonin derivatives

IV. Results and Suggestion on Utilization of Results

Plant-specific phenylpropanoid amides were produced in a recombinant

Escherichiacoli that expressed from *Arabidopsis* and from pepper plants. Upon exogenous treatment with several precursors, high concentrations of the following phenylpropanoid amides were produced abundantly in the culture medium in a few hours: 4-coumaroylserotonin (215 mg/l), 4-coumaroyloctopamine (208 mg/l), and 4-coumaroyltyramine (187 mg/l). Furthermore, we employed two different sources of 4CL cDNAs which are of *Arabidopsis* 4CL1 and rice 4CL1 in order to examine the yield of serotonin derivatives in *E. coli*. In addition, we investigate the cytoprotective effects of serotonin derivatives based on intracellular reactive oxygen radical (ROS) generation, lipid peroxidation, protein carbonylation, and phosphorylation of histone H2AX in H₂O₂ treated-HepG2 and HaCaT cells. We have shown that HCAAS showed various strong antioxidant activities in hydrogen peroxide treated both cell lines, suggesting that these compounds may play as chemotherapeutic agents for preventing or reducing the oxidative stress-induced diseases. In this project, we evaluated the serotonin derivatives's efficacy on skin cells. Serotonin derivatives showed whitening effect, anti-inflammatory effect, anti-fibrosis effect and anti-lipogenesis effect. It also investigated its physicochemical characteristics and performed formulation research for ingredients using liposomal formulation to maximize its stability and transdermal delivery. When stability of liposomal formulation of serotonin derivatives was examined under various circumstances (temperature, light,), it was found to be suitable to be used as a raw material of cosmetics. Toxicity test with human models to assess its safety also revealed that serotonin derivatives were safe materials. In addition, serotonin derivatives were registered in ingredient list of International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook's(CTFA). Outcomes from this project are expected to be commercialized in functional cosmetic's area.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of project	1
Section 1. Aim and necessity of study	1
Section 2. Contents of study	5
Chapter 2. Status of study in korea and other countries	7
Section 1. Our previous results	7
Section 2. Progresses in korea and other countries	11
Chapter 3. Research contents and Results	14
Section 1. Study on the production of serotonin derivatives by using recombinant <i>Esherichia coli</i>	14
1. Preface	14
2. Materials and methods	15
3. Results and discussion	20
Section 2. Possible use of serotonin derivatives for ameliorating anti-inflammatory skin disease	38
1. Preface	38
2. Materials and methods	39
3. Results and discussion	43
Section 3. Development of serotonin derivatives as functional cosmetic resources	52
1. Preface	52
2. Materials and methods	52
3. Results and discussion	57
Chapter 4. Implementation and contribution to its related field	73
Chapter 5. Application of results	76
Chapter 6. Recent progresses on related field	80
Chapter 7. References	82

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	1
제 2 절 연구개발 범위	5
제 2 장 국내외 기술개발 현황	7
제 1 절 본 연구진의 선행연구결과	7
제 2 절 국내·외 타 연구기관의 연구내용 및 결과	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 절 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 연구	14
1. 서 설	14
2. 연구 수행 방법	15
가. 4CL2과 SHT 유전자가 발현된 재조합 대장균 제작	15
나. 재조합 <i>E. coli</i> 에서 serotonin 유도체 정량	16
다. Western blotting과 SHT 효소 활성 측정	16
라. 4CL1과 SHT 유전자가 발현된 재조합 대장균 제작	17
마. 4CL2와 SHT 유전자의 peroplasm 발현	17
바. PelB-SHT 및 PelB-4CL2 동시발현 벡터 구조물 제작	17
사. 재조합 <i>E. coli</i> 에서 PAs 정량	18
아. 벡터 제작 및 대장균에서 THT와 4CL 발현	18
자. 벡 4CL1과 SHT 유전자가 발현된 재조합 대장균 제작	19
차. 대장균에서 TDC와 T5H 유전자 공동발현을 통한 세로토닌 생산	19
카. 트립토판 처리에 따른 serotonin 생성물 측정 방법	20
3. 연구 수행 결과	20
가. 애기장대 4CL2(At4CL2) 와 SHT 동시발현 재조합 대장균의 세로토닌 유도체 생산	20
나. SHT와 4CL2의 periplasm 발현 및 SHT+4CL2 동시발현	25
다. THT와 4CL2의 동시발현 대장균 발현 및 세로토닌유도체 생합성	27
라. TDC와 T5H의 동시발현 대장균 발현 및 세로토닌 생합성	31

제 2 절 세로토닌유도체의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능 분석	38
1. 서 설	38
2. 연구 수행 방법	39
가. 세포배양	39
나. 세포성장분석	40
다. 세포내 ROS (Reactive Oxygen Species) 생성 측정	40
라. 지질과산화 분석	40
마. RNA 발현 분석	40
바. 단백질 발현 분석	41
사. 항산화 물질이 피부세포에서 단백질의 carbonylation에 미치는 영향	41
아. 산화적 스트레스에 의한 H2AX 단백 인산화에 미치는 영향	41
자. 산화적 스트레스로 인한 세포 내 단백질 인산화 분석	42
차. Invasion assay	42
카. Migration assay	42
타. 세포주기 FACS 분석	42
3. 연구 수행 결과	43
가. 세로토닌 전구체가 사람 피부세포 성장에 미치는 영향 분석	43
나. 산화적 스트레스로부터 피부세포 보호하는 항산화 활성 분석	43
다. 세포내 유해산소(ROS) 생성 억제 활성 분석	44
라. 지질과산화 억제 활성 분석	44
마. CaS 의 세포 성장 촉진 활성 분석	45
바. 세로토닌 전구체의 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 방어 활성 분석	46
사. 산화적 스트레스로 인한 단백질 carbonylation 분석 및 세로토닌 유도체의 활성 분석	46
아. 산화적 스트레스에 의한 세포내 단백질 인산화 분석	47
자. 과산화수소에 의한 피부세포 독성 분석	48
차. CaS의 항염증 효능 분석	49
카. Integrin 유전자 발현 영향 분석	50
제 3 절 세로토닌유도체를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발	52
1. 서 설	52
2. 연구 수행 방법	52
가. 세포배양	52
나. Melanin content assay	53
다. NF-κB activity assay	53
라. Collagen synthesis assay	53

마. Collagenase activity inhibition assay	54
바. 지방전구세포 3T3L1 분화	54
사. TGF-beta 생산 assay	55
아. Fibronectin 발현	55
자. 피부일차자극시험	55
차. 세로토닌 유도체의 pH, 열 안정성 시험	55
카. 분광광도계에 따른 정상 관찰	56
타. 세로토닌 유도체의 리포솜 원료 피부투과시험	56
3. 연구 수행 결과	57
가. 세로토닌 유도체가 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향 분석	57
나. 세로토닌 유도체가 NIH 3T3의 NF-kB의 활성화에 미치는 영향 분석.	57
다. 세로토닌 유도체가 인체유래 섬유아세포 콜라겐 생성에 미치는 영향 분석	58
라. 세로토닌 전구체가 인체유래 섬유아세포의 콜라게네이즈 MMP-1 활성화에 미치는 영향 분석	59
마. 세로토닌 전구체가 3T3L1지방전구세포 분화에 미치는 영향 분석	59
바. 세로토닌 전구체가 3T3L1전구지방세포 TG 생산에 미치는 영향 분석	60
사. 유효물질의 작용 기전 규명(켈로이드억제관련)	60
아. 세로토닌 유도체의 물리, 화학적 특성 규명	62
자. 세로토닌 유도체의 인체사용에 따른 안전성 시험	65
차. 유효물질에 대한 원료화 및 CTFA 등재	65
카. 세로토닌과 쿠마로일세로토닌 전구체가 3T3L1지방전구세포 분화에 미치는 영향 비교	68
타. 원료 제형연구 (피부투과도 및 안정성 향상)	70
파. 시제품 개발	72
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	73
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	76
제 1 절 연구 성과	76
제 2 절 타 연구에의 응용	78
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	80
제 7 장 참고문헌	82

제 1 장 연구개발과제의 개요

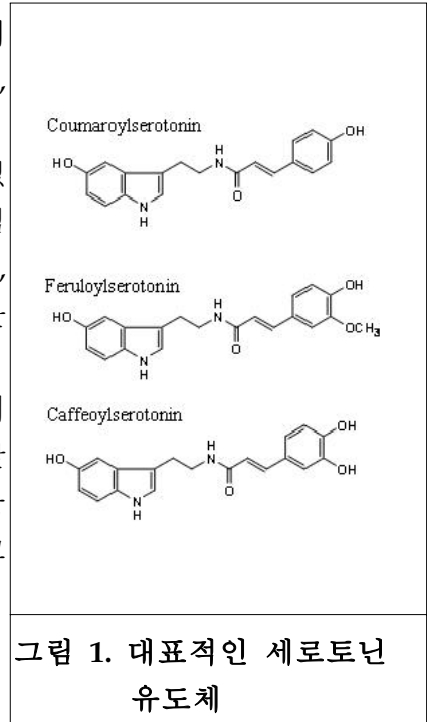
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

세로토닌유도체 화합물은 홍화씨를 포함한 식물체에서 미량으로 발견되는 2차대사산물로서, 4-coumaroylserotonin(CS), feruloylserotonin(FS), caffeoylserotonin(AS), cinnamoylserotonin(IS), sinapoylserotonin(SS) 등이 알려져 있다(그림 1). 이들 세로토닌유도체는 항산화활성, 항암활성, 항염증활성, 미백활성 등 다양한 약리기능을 가진 중요한 물질이나, pure 화합물의 확보가 매우 어려워, 전 세계적으로 기능 및 산업화 연구가 매우 제한적으로 이루어져 왔다.

본 연구진은 이들 세로토닌유도체를 재조합 대장균을 이용하여 손쉽게(easy), 신속히(rapid), 대량(mass)으로 생산할 수 있는 최적시스템을 개발하고, 이들 세로토닌유도체 화합물의 세포내 기능연구와 기능성화장품 소재로서 이용 개발하고자 한다.

기능 검정이 완료된 후 정제된 세로토닌유도체 화합물을 전 세계적으로 판매할 수 있도록 하고자 한다.



1) 대장균에서 세로토닌유도체 대량생산 기술 확립

- ▶ **Recombinant 대장균에서 천연물 세로토닌유도체 대량 생산 기술 확보** : 홍화씨의 주 약리성분인 세로토닌유도체인 4-coumaroylserotonin(CS) 및 feruloylserotonin(FS)는 종자 그램 당 0.002%(20 µg/g seed) 검출되는 것으로 알려져 있다. 본 연구진에서 개발한 recombinant 대장균 배양시스템을 이용하면 liter 당 250 mg을 생산할 수 있는 획기적인 기술을 확보하였으며(미발표자료; 선행연구자료 참고; 특허 출원 예정) 연속배양 통해 저비용, 대장균체 아닌 배양액으로부터 간편한 분리 및 생산 효율의 극대화가 가능한 바이오생산시스템을 확보하였다.
- ▶ **세로토닌유도체 화합물을 생합성하는 유전자 조성물 세계 최초로 확보** : 대장균에서 세로토닌유도체를 생산하기 위해서는 두 개의 유전자가 필요하다. 가장 중요한 유전자인 SHT 유전자는 본 연구진에 의해 고추로부터 세계 최초로 클로닝하여 특허권을 가지고 있으며(2004, Plant Physiol. 135: 346-356; 미국특허 등록 US 7084322), 또 다른 유전자는 phenolic 기질을 Co-A 형의 활성 form 으로 바꾸어 주는 4-coumarate Co-A liagse(4CL)로서 모든 식물체에서 gene family로 존재하며, 본 연구와 관련한 유

전자 특허는 세계적으로 없는 상태이다. (선행연구자료 참고).

- ▶ **페놀기질과 세로토닌 처리에 의한 세로토닌유도체 대량 및 연속 생산 시스템 구축**
: 본 연구진이 개발한 재조합 대장균에, 1 mM coumaric acid 와 1 mM serotonin을 공급하면, 4CL 효소에 의해 4-coumaroyl Co-A로 변환되고, SHT에 의해 4-coumaroylserotonin 으로 생합성 되는 시스템을 가지고 있다. 더욱 중요한 점은 이 4-coumaroylserotonin 화합물이 대장균 세포내에 있지 않고, 배양액으로 배출된다는데 있다. 이는 **간단한 방법으로 대량 정제를 가능케 하고, 연속배양이 가능한 장점을** 지니고 있다.
- ▶ **다양한 페놀기질과 세로토닌 처리에 의한 다양한 세로토닌유도체 생산 가능** : 본 연구진이 개발한 재조합 대장균에 ferulic acid 와 serotonin을 공급하면 feruloylserotonin 이 생성되고, caffeic acid 와 serotonin을 공급하면 caffeoylserotonin이 생산된다. 이런 방법으로 본 재조합 대장균으로부터, 4-coumaroylserotonin, feruloylserotonin, caffeoylserotonin, cinnamoylserotonin, sinapoylserotonin 같은 다양한 세로토닌유도체 화합물을 생산 할 수 있다. 4CL의 기질 특이성에 따라 세로토닌유도체의 합성 특이성이 결정되므로, 다양한 4CL 유전자를 도입하여 최적의 4CL/SHT 조합을 작성 할 수 있다.

2) 세로토닌유도체 화합물의 경제적 · 산업적 중요성

- ▶ **세로토닌유도체의 높은 잠재적 가격** : 포도 껍질(grape skin)에서 발견되는 폴리페놀인 resveratrol은 그램 당 0.1%(1 mg/g fw)로 존재한다. 여기에서 추출한 resveratrol은 100 mg 에 133,000원(Sigma)에 판매되고 있다. 이와 반대로 세로토닌유도체가 가장 많은 식물인 홍화씨에서는 resveratrol 보다 50배 낮은 농도인 종자 그램당 0.002%(20 µg/g seed) 발견된다. 따라서 정제된 세로토닌유도체는 100 mg 에 500,000 원 이상으로 판매될 수 있다(그림 2).

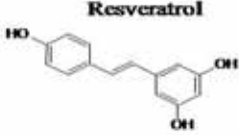
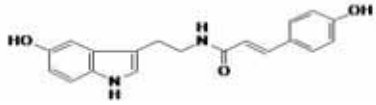
Resveratrol vs. Serotonin derivatives			
	Plant source	<i>E. coli</i>	Sale price (won)
 <p>Resveratrol</p>	Grape skin (up to 0.1%) 1 mg/g fw	16 mg/liter	100 mg 133,000 (Sigma)
 <p>Coumaroylserotonin</p>	Safflower (up to 0.002%) 20 µg/g seed	250 mg/liter	100 mg 500,000

그림 2. 시판중인 resveratrol 가격과 세로토닌유도체 추정 가격

- ▶ **효소 이용한 천연기능성물질 생합성 생산** : 세로토닌유도체의 화학적 합성도 동일한 기질이 필요하다. Coumaric acid를 dichloromethane(DCM)에 녹여 symmetrical anhydride를 만들고, *N,N*-dimethylformamide(DMF)에 녹인 serotonin과 반응시켜 coumaroylserotonin을 합성한다. 많은 유기 용매가 필요하고, HPLC 정제를 포함한 시간도 많이 소요된다. 수율은 55% 정도이다. 그러나 효소를 이용하여 대장균에서 생합성하면, 천연산물로 인정될 수 있고, 수율이 100%에 가깝고, 정제방법이 매우 쉽고, 단시일에 대량정제가 가능하여, 경제성이 매우 높다.

- ▶ **저가의 기질 이용한 고부가가치 세로토닌유도체 생산(value)** :

세로토닌유도체 합성에 필요한 기질은 serotonin 과 phenolics(coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid 등)이며, 이들 기질 자체는 기능성이 낮고, 가격도 저렴하다. Serotonin은 250 mg에 32,200원 (Sigma)이며, coumaric acid는 1 g에 12,000원 (Sigma) 정도이다. 수용성이 향상된 serotonin-HCl 형태는 25 mg에 44,000원(Sigma) 이다(표 1).

Material	Price (won)
Serotonin	250 mg 32,000
Coumaric acid	1 g 12,000
Ferulic acid	1 g 2,500
Caffeic acid	1 g 26,000

표 1. 기질 가격표(Sigma) 단위(원)

따라서 낮은 가격과 기능성이 낮은 가치(low value)의 기질들을 이용하여 고부가가치의 다양한 세로토닌유도체를 재조합 미생물을 이용하여 생산할 수 있다.

- ▶ **Resveratrol 처럼 다양한 약리활성에 미백활성을 보유** : 가장 잘 알려진 천연 기능성물질인 resveratrol 처럼, 세로토닌유도체 화합물인 feruloylserotonin (FS) 및 4-coumaroylserotonin (CS)은 항산화물질로서 기능이 처음 규명된 이후 점차적으로 다양한 약리활성 보고가 증가 추세이다. 특히 resveratrol과 달리 미백효과가 있음이 보

고 되고 있고 본 연구팀에 의해 피부세포를 보호하는 항산화 활성이 뛰어나 피부재생 효과도 기대된다 (예, 항암, 항염증, 미백효과, 빈혈억제, 동맥경화 억제 등).

- ▶ **Resveratrol 과 유사한 diphenol 형 구조 화합물로서 세계적으로 초기 연구단계 :** 본 연구의 세로토닌유도체 화합물(CS, FS)은 홍화씨의 주성분이며, 한방약재로 사용 중인 천연물질로서 독성문제가 없으며, 비타민 E보다(10배 이상) 높은 항산화활성을 갖고 있으며, 천연항암물질인 resveratrol 과 화학구조가 유사한 diphenol 형 천연물질로 피부 기능성 원료로 사용 가능성이 매우 높다(Resveratrol 관련연구 논문: 1978년 이후 1800여건, PubMed 자료). Resveratrol 보다 좋은 효능을 가지고 있음에도 불구하고 생리활성을 규명하는 연구는 아직 초기단계로서 기능성을 규명한다면 세계시장을 대상으로 높은 경쟁력을 확보할 수 있다(1996년 항산화물질로 동정 이후 10여건 논문 보고, 2007년 PubMed 자료).

3) 식물 유래 천연물질의 경제적 · 산업적 중요성

- ▶ **높은 성장성과 큰 규모의 화장품 시장 :** 우리나라의 화장품 시장 규모는 세계 6위로, 아시아에서는 일본(세계 3위) 다음으로 큰 시장이다. 2003년 서울증권의 분석 자료를 보면 과거 4년간(99년-2002년) 국내 화장품 시장은 평균 GDP 성장률 6.7%를 상회하며, 평균 15.8%의 높은 성장률을 보여 주었다. 화장품 세계시장 규모는 180조원에 이르고 있다. 통상 원료시장을 1/10으로 보면 약 18조원에 이르는 시장 규모를 형성하고 있다 (세계 화장품 원료 시장 18조원 추정).
- ▶ **기능성원료의 높은 경쟁성 :** 전 세계적으로 기능성원료 시장규모는 약 2조원으로, 기능성 원료는 그 특정 기능에 의해 런칭 시간과는 관계없이 시장 진출이 가능하므로 기능성 원료 및 제품 개발에 집중 공략할 경우 시장에 대한 경쟁 우위를 가질 수 있을 것으로 사료된다. 현재 국내 화장품원료 규모가 5000억원으로 추정되며, 이중 90% 이상을 수입에 의존하고 있는 현실을 감안할 때, 연간 4000억 규모의 수입비중을 대폭 완화 시킬 것으로 예상 하며, 단일 기능성원료 시장을 새롭게 개척 할 수 있는 높은 잠재력이 있음.

4) 세로토닌유도체의 피부 내 targeting 연구의 중요성

- ▶ **세로토닌유도체를 이용하여 피부세포에서의 기능성 검증은 세계적으로 전무한 상태임 :** 본 연구진은 피부 세포를 이용하여 항산화 활성을 분석한 결과 기존에 항산화 활성이 잘 알려진 RS(resveratrol) 보다 효능이 우수하며 VtE의 항산화 활성 보다 탁월한 항산화활성을 보임을 밝혔다(선행기술 자료 참고).
- ▶ **Resveratrol 과 견줄 수 있는 신물질 확보 가능 :** RS를 화장품 원료로 이용한 하고자 하는 시도는 세계적인 화장품 회사를 중심으로 연구되어 오고 있는 실정인데 본 연구팀에 의해 확보된 세로토닌유도체 물질은 RS 보다 탁월한 항산화활성 및 높은

미백활성을 가지고 있으므로 피부 노화, 염증성 피부질환 및 미백 개선제로서의 가능성이 탁월한 신물질 확보가 가능함.

- ▶ **기능성 화장품의 소재 가능성 매우 높음** : CS 와 FS는 미백기능 뿐 아니라 피부 노화에 관여하는 주요 원인 중의 하나인 세포내 발생기 산소를 급격히 감소시키는 효능이 있는 것으로 검증되었으며 지질과산화도 막아주어 노화 방지에 효능이 있을 것으로 사료되어 기능성 화장품 소재로서의 발굴 가능성이 확실히 됨(선행기술 자료 참고).

제 2 절 연구개발 범위

1. 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 조건 구축

- 애기장대 4CL2(At4CL2) 와 SHT 발현 재조합 대장균의 효소활성 연구
- 기질 처리별 time course 시스템 조절
- 기질 농도 조합 통한 세로토닌유도체 최적화 조건 규명
- 세로토닌유도체 최대 생산을 위한 specific 처리 조건 규명
- At4CL1/SHT 발현 재조합 대장균의 세로토닌유도체 생합성 특성 규명
- At4CL1/SHT 재조합 대장균에서 세로토닌유도체 대량생산
- At4CL3/SHT 발현 재조합 대장균의 세로토닌유도체 생합성 특성 규명
- At4CL3/SHT 재조합 대장균에서 세로토닌유도체 대량생산
- 벼 4CL1/SHT 발현 재조합 대장균의 세로토닌유도체 생합성 특성 규명
- 벼 4CL1/SHT 재조합 대장균에서 세로토닌유도체 대량생산
- 벼 4CL2/SHT 발현 재조합 대장균의 세로토닌유도체 생합성 특성 규명
- 벼 4CL2/SHT 재조합 대장균에서 세로토닌유도체 대량생산
- 세로토닌유도체 대량생산 재조합 대장균 제작 및 대량생산 최적 시스템 구축

2. 세로토닌유도체의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능 분석

- CS, FS, CaS 성분의 항산화 효능 분석
- 세포내 ROS 생성, 지질과산화, 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 활성 분석
- 세로토닌유도체 화합물이 DNA 손상에 의해 활성화되는 H2AX 인산화에 미치는 영향 분석
- 세로토닌유도체 화합물이 산화적스트레스에 의해 유도된 단백질 카보닐화에 미치는 영향 분석
- Poly(I:C)/PGN/TNF-a 등 염증을 유발하는 물질을 피부 세포에 처리한 후 CS/FS/AS에 의한 항염증효능 분석
- THP-1 단핵구를 이용한 항염증 효능 분석
- THP-1 세포 이동 및 침투에 미치는 영향 분석 및 염증성 관련 유전자 발현 분석

- 피부세포 성장에 미치는 영향 분석
- 무혈청배지에서 세포 성장에 미치는 영향 FACS 분석 및 유전자 발현 분석
- 세로토닌과 활성 비교 분석을 통해 작용 기전 연구

3. 세로토닌유도체를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발

- 세로토닌유도체의 피부관련 효능 및 작용기전 규명(미백, 주름개선, 항균, 비만, 발모 등)
- 세로토닌유도체를 이용한 기능성 화장품 소재개발
- 세로토닌유도체(CS, FS, AS)에 대한
- 피부 관련 효능 검색 및 작용 메카니즘 규명
- 세로토닌유도체의 미백효과 규명
- 세로토닌유도체의 주름개선 효과 검정
- 세로토닌유도체의 항균효과 검정
- 세로토닌유도체의 비만효과 검정
- 세로토닌유도체(CS, FS, AF)의 화장품 원료화
- 안전성시험(동물 및 인체안전성시험)
- 안정성시험(빛, 온도, pH 등)
- 피부투과도 개선 (리포솜 공법이용)
- 원료 제형연구
- CTFA(국제화장품 원료규격집)에 등재
- 원료화된 세로토닌유도체를 이용한 시제품 화장품
- 리포솜 제형개발
- 시제품 개발 및 안전성 시험(인체안전성)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

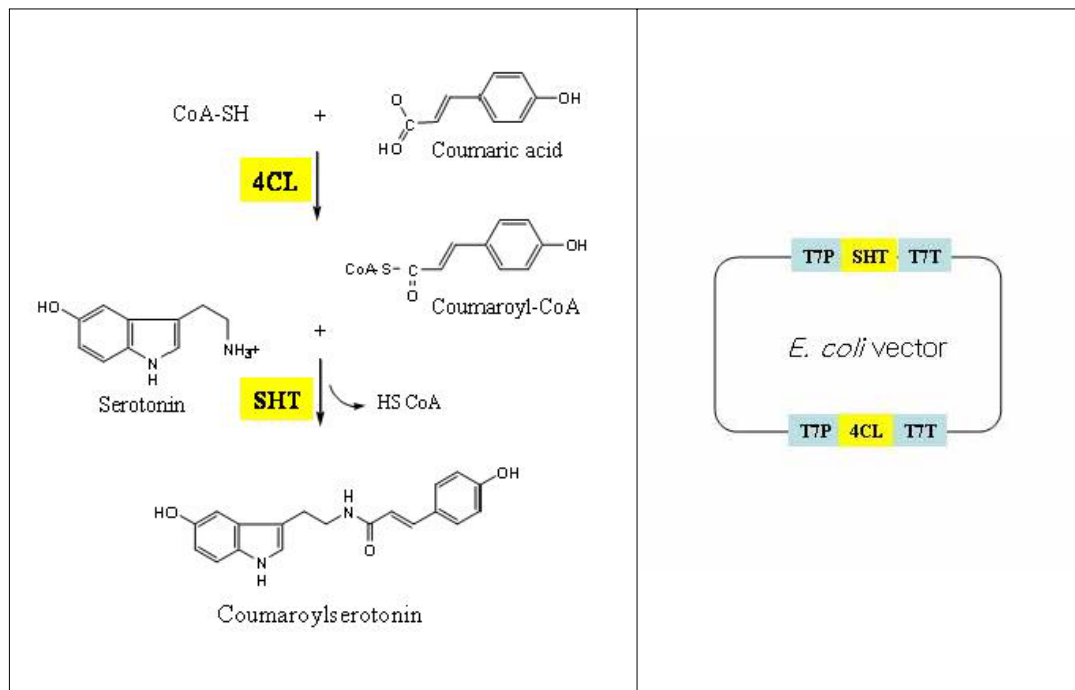
제 1 절 본 연구진의 선행연구결과

가. 세로토닌유도체를 대량 생산 할 수 있는 재조합 대장균 소재 확보

- 제 1세부과제 책임자는 세로토닌유도체를 대장균에서 생산 할 수 있는 분자학적 방법을 개발하였음(그림 3). 세로토닌유도체를 대장균에서 생산하기 위해서 두 개의 유전자를 대장균에 도입함. 첫째 유전자는 phenolic 을 활성화된 기질로 만들어 주는 4-coumarate CoA liagse(4CL) 이며, 두 번째 유전자는 활성화된 phenolic-CoA 와 serotonin 을 결합해주는 serotonin N-hydroxycinnamoyl transferase(SHT) 효소이다(아래그림; 미발표자료).

SHT 유전자는 본 세부책임 연구자가 고추에서 클로닝하여, 유전자 이용권에 대한 한국, 미국 특허 보유하고 있고, 4CL 유전자는 애기장대 및 벼에서 다수 확보함.

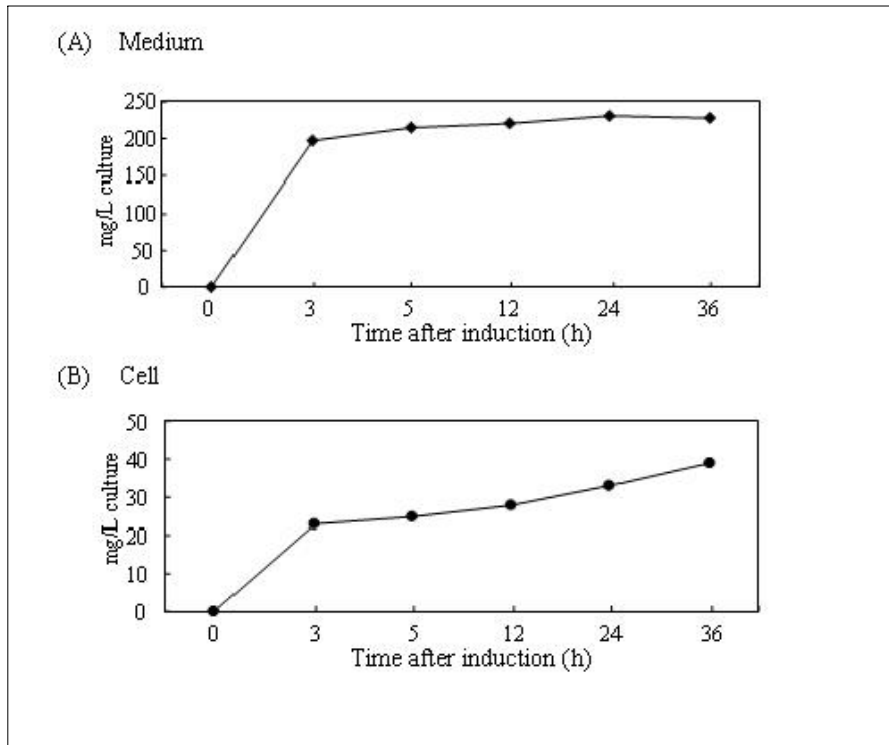
- ▶ Production of coumaroylserotonin and feruloylserotonin in transgenic rice expressing pepper hydrpxycinnamoyl-CoA:serotonin N-(hydroxycinnamoyl)transferase (2004) Plant Physiol. 135(5): 346-356.
- ▶ 식물에서 세로토닌유도체를 생합성하는 방법으로 대한민국(특허등록 10-0583207) 및 미국(US 7084322) 에서 특허를 획득 함.



나. 기질 처리 통한 세로토닌유도체의 세포외 배양액으로 배출

- OD=600 1.5 정도의 재조합 대장균에 serotonin 과 coumaric acid 1 mM을 처리하면 3시

간 내에 liter 당 200 mg 정도의 4-coumaroylserotonin 이 대장균 밖으로 배출 생산된다. 대장균 세포내에도 4-coumaroylserotonin 이 생산되지만 배지로 배출된 량의 10% 정도이다. 대장균에서 생산된 4-coumaroylserotonin 은 배양기간 36시간 동안에도 분해되지 않고 안정한 상태로 있음을 볼 수 있다. 따라서 안정적으로 세로토닌유도체 화합물을 대장균에서 생산 할 수 있으며, 처리한 기질에 따라 다양한 세로토닌유도체를 생산 할 수 있으며 (아래그림). 이를 위해 다양한 4CL 유전자 도입 통한 활성 phenolic 기질을 확보하는 것이 추후 연구로 통해 이루어져야 할 것임.



다. 세로토닌유도체 화합물이 피부세포 성장에 미치는 영향분석

○ 본 연구자는 세로토닌유도체의 대표적인 화합물인 FS, CS 및 AS의 pure chemicals을 확보하고 있고, 피부세포를 이용한 질환모델을 이미 구축해 놓은 상태이다. 나아가 상기의 정제 화합물을 이용하여 이들 물질이 피부세포 성장에 미치는 영향을 분석한 결과, 이들 물질들이 20 μM 이하의 농도에서 피부 세포 성장에 매우 안정적이며, AS 경우 세포 성장을 오히려 촉진 시킨다는 것을 확인하였다 (아래그림).

- ▶ HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hydroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. (2008) Journal of Medicinal Food in press.
- ▶ Enhanced synthesis of feruloyltyramine and 4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase. (2007) Plant Science 172(1): 57-63.
- ▶ Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels

in the Korean population.(2005) *Mol Immunol*, **42**(8):969-977.

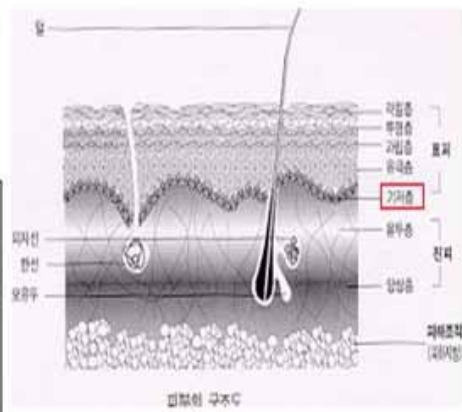
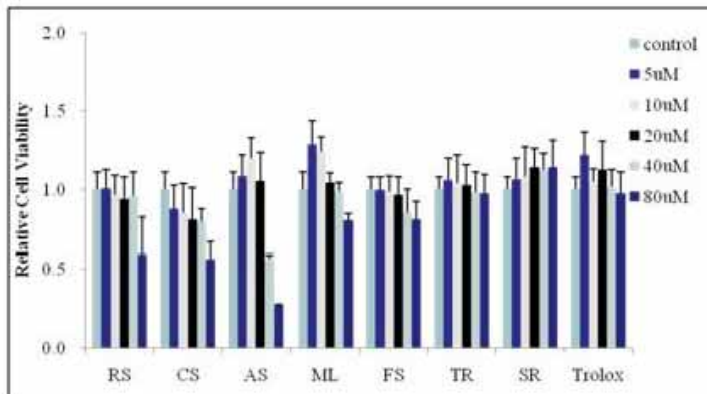
- ▶ TRF2 is in neuroglial cytoplasm and induces neurite-like processes (2004) *FEBS Letters*, 557: 129-132.
- ▶ Expression profiling and subtype-specific expression of stomach cancer (2003) *Cancer Research*, 63: 8248-8255.

(RS:resveratrol, CS: 4-coumaroylserotonin, FS: feruloylserotonin, AS:caffeoylserotonin)

핵심 선행연구 I

세로토닌유도체 화합물이 피부세포 성장에 미치는 영향분석

- 유용생리활성을 가진 Pure compounds 확보
- 피부세포를 이용한 질환모델 구축



피부세포
HaCaT

라. 세로토닌유도체의 산화적 스트레스로부터 피부세포 보호 활성효과 분석

- 본 연구자는 산화스트레스(H_2O_2)를 가한 피부세포에서 상기 세로토닌유도체 화합물의 활성 효과를 분석한 결과, 세포생장에 대한 효과는 AS의 경우 resveratrol 보다 탁월하며, CS 및 FS의 경우는 vitamin E (Trolox)와 비슷한 효과를 가지고 있음을 확인 하였다. 또한 지질과 산화효과는 CS, FS, AS 모두 resveratrol 보다 높은 효능을 보여 주었다 (아래그림). 본 연구자는 사람 세포주를 가지고 다양한 염증성 질환에 관한 연구를 수행한 경험을 바탕으로 피부세포에서의 염증성 질환에 관해 폴리페놀 화합물의 피부 효능 및 자외선에 의한 세포 손상으로부터의 보호 효능, 노화 방지 등의 다양한 피부세포 생리활성을 분석하고자 한다.
- ▶ Gene-gene interaction between IL-13 and IL-13Ralpha1 is associated with total IgE in Korean children with atopic asthma (2006) *J Hum Genet*. 51: 1055-1062.
- ▶ Association of TNF-alpha/LTA polymorphisms with Crohn's disease in Koreans (2006) *Cytokine*, 35:13-20.

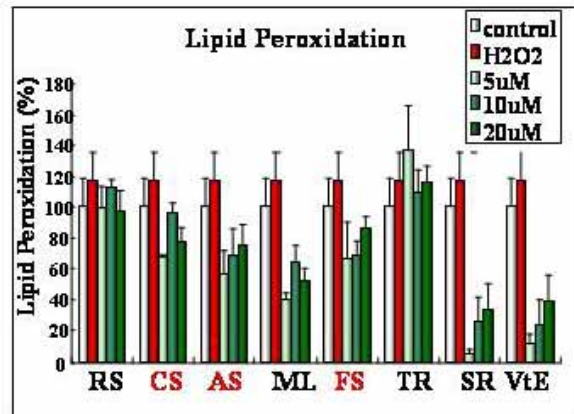
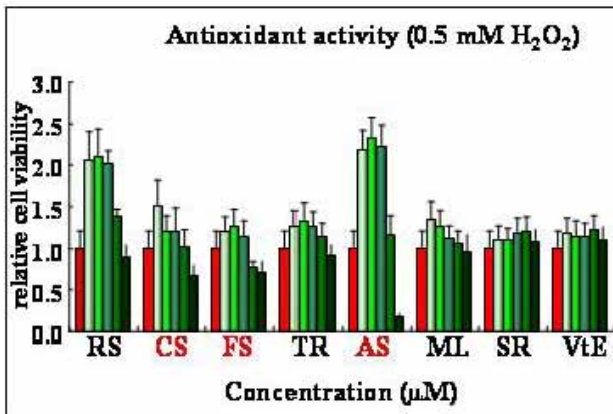
▶ IL-5 and TBXA2R gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma (2005) J Allergy Clin Immunol. 11: 758-763

핵심 선행연구 II

세로토닌유도체 산화적 스트레스로부터 피부세포 보호 활성효과 분석

● 산화 스트레스에 대한 저항성

● 지질 과산화에 대한 저항성



● AS는 Resveratrol보다 높은 항산화활성을 보임. *RS: Resveratrol

● CS/AS/FS는 매우 탁월한 지질과산화 억제 효능을 보임

마. Naturotics 독일로 기술 이전

- 바이오스펙트럼의 핵심인 원료사업이 최근 독일로의 첫 수출을 달성하여 유럽으로 진출하게 되었다. 특히 세계적인 기술력을 보유하고 있는 독일로 천연방부제 Naturotics를 수출하는 것은 대단한 의미를 가지는 것으로, BioSpectrum의 높은 기술력을 다시 한 번 세계로 알릴 수 있는 기회로서 앞으로의 유럽 진출의 교두보 역할을 하고 있다.
- 현재 국외에서는 스페인, 그리스, 말레이시아, 영국, 독일, 프랑스, 미국, 브라질, 이스라엘 등 현재 13개국에 에이전트를 확보하고 있으며, 지속적인 매출을 올리고 있다. 국내에서는 대기업 중심으로 사용되고 있으며 많은 관심을 갖는 시장으로서 급속히 성장을 예상하고 있다. 지난 2005년에는 소비자보호원에 의해 수거된 국내 제품 중 Naturotics가 포함된 제품에서 유일하게 미생물에 오염되지 않았으며 다른 화학방부제들이 검출되지 않은 결과가 보도되어 바이오스펙트럼의 독보적인 기술을 홍보하였다. 또한 기능성 원료에 대한 시장의 요구에 따라 신원료 (BSASM, Magnotics, MagnoSoothe, SapoMax, Rosanic, PsoriaSolve 등)를 준비하고 출시하여 해외뿐만 아니라 국내 여러 회사에 원료를 제공하고 있다.

제 2 절 국내·외 타 연구기관의 연구내용 및 결과

CS 및 FS 같은 세로토닌유도체 화합물은 홍화씨에서 그램 건물중 당 20 µg 추출되는 것으로 보고되고 있으며(1999, J. Korean. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42: 366-368), 고추의 화기에서 생체 그램당 20 µg 정도 생합성되며 (2006, Sci. Horti. 108: 337-341), 옥수수 잎에서 상처에 의해 12 µg 정도 생합성(2000, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 1025-1031)되는 등 다양한 식물로부터 소량으로 생합성 되는 식물유래 천연물질로서 다양한 약리적 작용이 알려져 있으나, 소재 다량 확보의 어려움 때문에 산업적 연구는 거의 시도되지 않은 상태이다. 또한 유전자를 이용한 metabolic engineering 연구도 식물 및 미생물에서 세계적으로 초보적인 단계이다.

(1) 세계적 수준

개념정립 단계	■	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

(2) 국내수준

천연 세로토닌유도체를 식물로부터 추출하기가 용이하지 않고, 추출양도 매우 적어 산업화 단계의 실험을 수행 할 수 없는 상태이다. 또한 화학적으로 합성된 세로토닌유도체를 산업적으로 이용하기에는 합성물이란 제한점이 붙고, 단가가 너무 비싸 현재까지 산업화 시도는 국내·외에서 전혀 없는 상태임.

(3) 국내·외의 연구현황

4-Coumaroylserotonin(CS), feruloylserotonin(FS), 및 caffeoylserotonin(AS)에 대한 약리적 생리적 기능이 보고 되었다. 그러나 molecular 수준의 연구는 상기 물질을 생합성하는 유전자의 클로닝이 본 연구진에 의해 2004년도에 발표된 이후부터 시작되었다. 따라서 이들 세로토닌유도체 물질에 대한 metabolic engineering 및 대량생산 및 산업화에 대한 응용 연구는 본 연구진외에는 없는 실정이며, 지금까지 연구 보고 된 자료는 이들 물질의 생리 약리적 기능에 대한 것들이다. 이들에 대한 연구는 1996년부터 보고되어 왔으며, 연구진행 상황을 아래 도표에 연도별로 작성하였다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
경희대 1996	황산화물질로 동정 -1996년 홍화씨(<i>Carthamus tinctorius</i> L.)에서 황산화활성 물질로서 최초 분리되었으며(1996, Chem Pharm Bull 44, 874-876.), 천연항산화제인 tocopherol과 합성항산화제인 BHT 보다 높은 황산화활성을 발휘하는 것으로 보고 되어 있다 (1999, J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42, 366-368).	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Diphenol 성분인 FS 및 CS의 황산화활성 규명 ▶ 합성항산화제 BHT 보다 높은 활성보유
Nagoya City Univ. 약대 1998/2003	항염증활성 - 상기 폴리페놀 화합물 중 coumaroylserotonin 이 항염증 억제활성도 갖는 것으로 보고 됨(1998, J Interferon Cytokine Res 18, 423-428, 2003, Int. Immunopharm. 3: 273-277).	항염증활성 기능성규명 연구
Nagoya City Univ. 약대 1999	섬유세포 성장촉진 - 홍화씨의 oil 성분중에 함유되어 있는 coumaroylserotonin 이 섬유아세포(fibroblasts) 세포생장을 촉진함(1999, J. Biochem. 125, 910-915).	Fibroblasts 세포성장촉진물질로서 기능 규명
Nagoya City Univ. 약대 2000	항암 활성 - 홍화씨에서 추출한 쿠마로일세로토닌 화합물이 항암활성을 보임(2000, Natural Pro. Lett. 14: 153-158).	항암활성 기능 규명
경상대학교 의과대학 2002	뼈형성촉진 활성 - 홍화씨에서 추출한 페루로일세로토닌 및 쿠마로일세로토닌이 뼈 형성을 촉진 시킨다 는 특허 (대한민국 특허등록번호 제10-0354791호)	신생골 형성 기능규명

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Nagoya City Univ. 의대 2002	국소빈혈 재관류 저해제 - 페루로일세로토닌 및 쿠마로일세로토닌 화합물들이 ischemia-reperfusion (국소빈혈 재관류)의 저해제로서 효과가 있음을 보고함 (2002, Mol. Cell. Biochem. 238: 151-162)	빈혈재관류 저해제 역할
연세대 2004	미백효과 - 최근 Rou 등의 연구 발표(2004, Biol. Pharm. Bull. 27, 1976-1978.)에 의하면, 홍화에서 추출한 페루로일세로토닌 및 쿠마로일세로토닌이 멜라닌 색소 합성을 억제하는 연구결과가 보고되어, 이들 물질의 미백효과에 대한 산업적 응용이 시도되고 있는 실정이다.	CS 및 FS의 미백효과 규명
전남대 2004 (본 연구팀)	고추로부터 SHT 생합성 유전자 클로닝 - Feluloylserotonin(FS), 4-coumaroylserotonin(CS), caffeoylserotonin(AS) 등의 polyphenol을 생합성하는 유전자를 고추로부터 클로닝하였고, 이 유전자를 발현하는 형질전환변이 육성하여, polyphenol 생성 형질전환 line 확보 (2004, Plant Physiol. 135: 346-356)	세로토닌유도체 생합성 유전자 클로닝
전남대 2006 (본 연구팀)	유전자 특이성 동정 - Feruloyltyramine, 4-coumaroyltyramine, caffeoyltyramine 등의 화합물을 생합성 하는 유전자클로닝 및 아민기질 특이성을 부여하는 핵심 아미노산부위 동정 및 chimeric 유전자 개발	세로토닌유도체 생합성 유전자 특이성 규명
Ajinomoto Co, Japan 2006	동맥경화 억제 - 홍화씨에서 추출한 FS 화합물이 atherosclerosis(동맥경화) 억제 활성이 있음을 보고 (2006, J. Agric. Food Chem. 54: 4970-4976).	FS 동맥경화 방지
Academy of Sciences of the Czech Republic 2007	불안해소 및 통각장애 해소 - 페루로일세로토닌의 경우 고통증유발 쥐로부터 선택적인 불안해소 및 통각장애를 해소한다는 보고가 있다 (2007, J Ethnopharmacol. 112: 368-374).	불안치료 효과 규명
전남대 2008 (본 연구팀)	간세포 및 피부세포에서의 항산화활성 분석 Feluloylserotonin(FS), coumaroylserotonin(CS), caffeoylserotonin(AS) 와 resveratrol 등 8종 물질의 항산화활성 비교 분석 논문 작성 중	세로토닌유도체의 간 및 피부세포에서의 항산화활성 규명

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 연구

1. 서 설

Phenylpropanoid amides는 amide(PAs)와 phenolic acid의 두 기질의 결합에 의해 만들어지는 다양한 배열의 이차대사산물이다(Facchini et al., 2002; 그림 3-1).

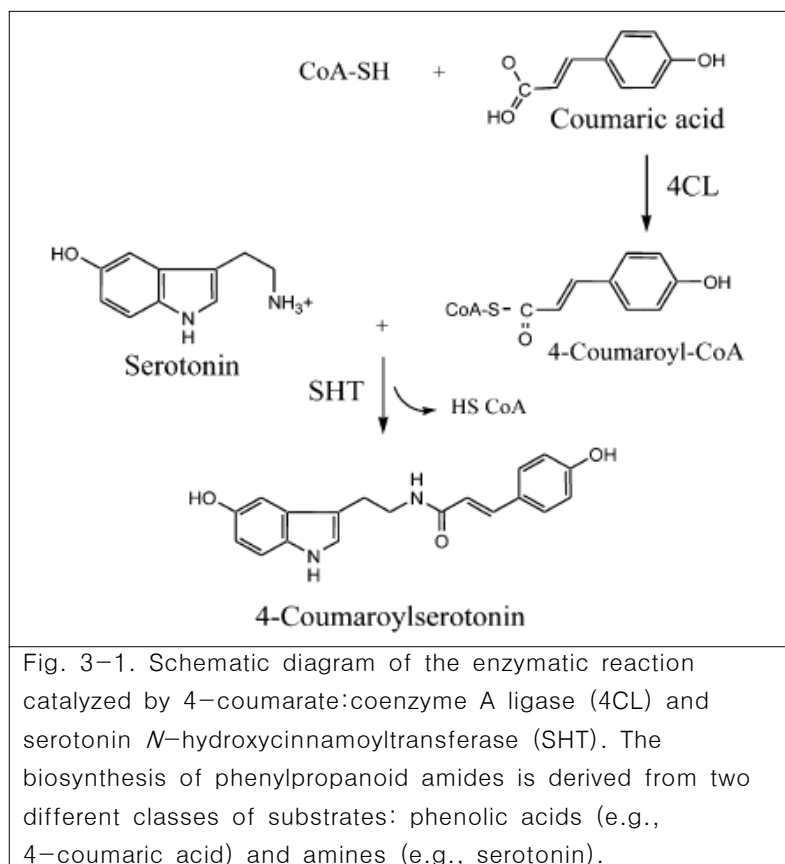


Fig. 3-1. Schematic diagram of the enzymatic reaction catalyzed by 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) and serotonin *N*-hydroxycinnamoyltransferase (SHT). The biosynthesis of phenylpropanoid amides is derived from two different classes of substrates: phenolic acids (e.g., 4-coumaric acid) and amines (e.g., serotonin).

Amines은 tyrosine과 tryptophan으로부터 유래한 tyramine, serotonin, octopamine 등이 있다. phenolic acid는 cinnamic acid로부터 유래한 4-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid 등이 있으며, 비슷한 기질 친화성을 가진다. 반면, amine의 다른 친화성으로 인해 효소의 작용에 영향을 미친다(Jang et al., 2004 Schmidt et al., 1999 Yu and Facchini, 1999). 벼와 감자, 고추 등 여러 식물에서 PAs는 상처나 병원균 침입에 의해 생성된다(Farmer et al., 1999 Schmidt et al., 1999 Von Roepenack-Lahaye et al., 2003 Kang and Back, 2006). 감자는 유도제 처리에 의해

4-coumaroyltyramine, feruloyltyramine, feruloyloctopamine, 4-coumaroyloctopamine 등의 PAs가 합성되며(Schmidt et al., 1999), 벼는 feruloylserotonin(FS), 4-coumaroylserotonin(CS)가 생성된다(Jang et al., 2004). 앞서 언급했듯이, 식물에서 PAs의 합성은 효소나 기질 친화성에 의해 영향을 받는다. 벼 잎에는 tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase(THT; EC 2.3.1.110)과 serotonin *N*-hydroxycinnamoyltransferase(SHT)가 동시에 존재함에도 불구하고 FS와 CS 같은 serotonin 유도체만 합성되는 이유는 tyramine에 비해 serotonin이 더 우세하게 합성되기 때문이다(Jang et al., 2004). serotonin은 벼의 모든 조직에서 생성되고(Kang et al., 2007) 병원균의 침입에 의해 합성된다(Ishihara et al., 2008). THT와 SHT는 PAs 합성의 대표적인 효소이다(그림 3-1). 특별히, SHT는 많은 종류의 amine에 친화력을 가지고 있으며, 이는 tyramine 유도체와 serotonin 유도체, octopamine 유도체 등 많은 종류의 PAs 합성으로 귀결된다(Kang et al., 2006). 하지만, serotonin이 SHT에 가장 높은 친화력을 가지고 있다. PAs는 식물 세포벽을 강화하거나 곰팡이 균사의 생장을 억제하는 등의 식물 방어기작에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Facchini et al., 2002). 또한, PAs는 항산화 활성(Zhang et al., 1996), 항암 활성(Park and Schoene, 2002), 항우울증 활성(Roh et al., 2004) 등 인체에 유용한 역할을 한다. 하지만, 식물에서 PAs의 합성은 gram tissue 당 수 nanogram에서 수 microgram 정도로 매우 낮다(Jang et al., 2004 Schmidt et al., 1999 Zhang et al., 1996). PAs의 합성을 증가시키기 위해 SHT 유전자를 과다발현시킨 유전자 조작 벼를 만들었다(Jang et al., 2004). 전구체를 처리한 유전자 조작 벼 잎에는 gram tissue 당 약 200 μ g의 CS, FS가 합성된 반면, 비 유전자 조작 벼는 수 microgram 정도가 합성되었다(Jang et al., 2004). 하지만, 유전자 조작벼에서 CS와 FS를 추출하고 정제하는 방법은 어렵고, 복잡하며, 시간도 오래 걸린다. 그러므로, 적절한 유전자를 발현시켜 대장균에서 PAs를 생성하는 연구를 하게 되었다. SHT 유전자에 의해 PAs가 합성하기 위해서는 amine과 함께 phenolic-CoA thioester가 필요하다. 하지만, phenolic-CoA는 상업적으로 판매가 불가하며, 대장균도 phenolic acid에서 phenolic-CoA를 합성할 수 없다. phenolic-CoA thioester는 4-coumarate:coenzyme (CoA) A ligase(4CL;EC 6.2.1.12)에 의해 합성되고, cinnamic acid 유도체인 4-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid 등을 CoA thioester로 변환시키는 기능을 한다(Ehltling et al., 1999).

2. 연구 수행 방법

가. 4CL2과 SHT 유전자가 발현된 재조합 대장균 제작

Arabidopsis thaliana(ecotype Columbia)에서 4CL 유전자를 얻기 위해, 상처난 잎에서 RNA를 추출한다. Oligo(dT)₁₅ primer(Promega, Madison, WI, USA), SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), RNase inhibitor(Invitrogen)로 RT-PCR를 수행하여 cDNA를 얻는다. 4CL2(AF106086) 전사체는 전방 primer, 5'-d(ATACATATGACGACACAAGAT)-3'(NdeI 제한효

소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)와 후방 primer, 5'-(AGACTCGAGCTAGTTCATTAATCC)-3'(XhoI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)를 사용하여 증폭시킨다. 증폭된 DNA 조각은 NdeI과 XhoI 제한효소로 자르고, 정제한 후, 같은 제한 효소 부위로 잘려진 pETDuet-1 벡터에 삽입한다. 그 결과 pETDuet-4CL 벡터로 완성된다.

SHT 유전자는 고추(*Capsicum annuum* cv. Subicho)로부터 분리한 cDNA를 복제하여 사용하였다 (Jang et al., 2004). 전방 primer는 5'-d(CATACCATGGCTTCTIGCTCCT)-3'(NcoI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체), 후방 primer는 5'-d(TATGCGGCCGCTAACAGCTTCTGCACC)-3'(NotI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)이다. PCR 생성물을 제한효소로 자르고, (NcoI, NotI) 정제한 후, NcoI 과 NotI 으로 잘려진 pETDuet-4CL로 삽입한다. 그 결과 만들어진 벡터는 pETDuet-SHT-4CL이며, BL21(DE3)로 삽입한다. 10 ml overnight 배양 후, 50 mg ampicillin이 들어있는 100 ml YEP 배지(10 g/l Bacto-peptone, 10 g/l Bacto-yeast extract, 5 g/l NaCl)에 접종하고 600 nm에서 흡광도가 1.0에 도달할 때까지 37°C에서 배양한다. 1 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; Sigma, USA)와 1 mM serotonin(TCI, Japan), 1 mM 4-coumaric acid(Sigma, USA)를 첨가하고 28°C에서 250rpm의 속도로 주어진 시간 동안 배양한다. 1 ml를 분주하여 4°C에서 7500g로 5분간 원심분리하여 대장균 침전물과 배지로 분리한다.

나. 재조합 *E. coli* 에서 serotonin 유도체 정량

PAs를 정량하기 위해서 대장균 침전물을 0.1 mM Tris-HCl(pH7.0) 0.5 ml에 녹이고, 30초간 초음파로 세포를 마쇄한 후, 4°C에서 15000g의 속도로 2분간 원심 분리 한 후, 상등액에 같은 양의 ethyl acetate를 첨가하여 PAs를 추출한다. ethyl acetate 분획만을 증발기로 말린 후, HPLC 메탄올 0.5 ml로 녹이고 5 ul를 HPLC로 분석한다(Jang et al., 2004). 배지 분획은 같은 양의 ethyl acetate를 첨가하여 대장균 침전물의 추출과 같은 방법으로 PAs를 추출한다.

다. Western blotting과 SHT 효소 활성 측정

대장균 침전물을 100 μl의 lysis buffer(50mM Tris, pH8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, and 1 mM DTT)로 녹이고 20초간 초음파로 마쇄한다. 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 침전물과 상층액을 분리하여 각각 western blotting에 사용한다. 수용성 단백질을(1μ) SDS-PAGE로 분리한다. 11%(w/v) acrylamide/bis 겔로 전기영동하고 단백질을 polyvinylidene difluoride 막으로 이동시킨다. SHT polyclonal 항체로 면역 반응을 이용하여 단백질 발현 여부를 확인한다 (Jang et al., 2004). 대장균 침전물을 14 mM β-mercaptoethanol이 포함된 100 mM sodim phosphate buffer(pH7.5)로 녹이고 20초간 초음파로 마쇄한다. 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 침전물과 상층액을 분리하여 각각 SHT 효소 활성 측정에 사용한다. 10 μl 단백질에 10 μl 1 mM feruloyl-CoA, 10 μl 10 mM serotonin, 10 μl 100 mM Tris-HCl(pH8.0)을 넣고 30°C에서 30분간 효소 반응을 시킨다. 20 μl acetic acid로 반응을 중단시키고, 380 μl HPLC 메탄올을 섞

은 후, 10 μ l를 HPLC에 주입한다(Jang et al., 2004).

라. 4CL1과 SHT 유전자가 발현된 재조합 대장균 제작

Arabidopsis thaliana(ecotype Columbia) 4CL1 유전자는 일본 Arabidopsis full-length clone database(pda08850)에서 분양 받았다. 분양받은 At4CL1 cDNA를 주형으로 삼고, 전방 primer, 5'-d(ATACATATGGCGCCACAAGAA)-3'(NdeI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)와 후방 primer, 5'-(AGACTCGAGTCAGTGAAGAACA)-3'(XhoI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)를 사용하여 Taq polymerase(Takara, Japan)와 함께 At4CL1 유전자를 증폭시킨다. 증폭된 1620 bp 크기의 DNA 조각은 NdeI과 XhoI 제한효소로 자르고, 정제한 후, 같은 제한 효소 부위로 잘려진 pETDuet-1 벡터에 삽입한다. 그 결과 pETDuet-4CL1 벡터로 완성된다. SHT 유전자는 고추(*Capsicum annuum* cv. Subicho)로부터 분리한 cDNA를 복제하여 사용하였다(Jang et al., 2004). 전방 primer는 5'-d(CATACCATGGCTTCTGCTCCT)-3'(NcoI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체), 후방 primer는 5'-d(TATGCGGCCGCCTAACAGCTTCCTGCACC)-3'(NotI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)이다. PCR 생성물을 제한효소로 자르고, (NcoI, NotI) 정제한 후, NcoI 과 NotI 으로 잘려진 pETDuet-4CL로 삽입한다. 그 결과 만들어진 벡터는 pETDuet-SHT-4CL이며, BL21(DE3)로 삽입한다. 10 ml overnight 배양 후, 50mg ampicillin 이 들어있는 100 ml YEP 배지(10 g/l Bacto-peptone, 10 g/l Bacto-yeast extract, 5 g/l NaCl)에 접종하고 600 nm에서 흡광도가 1.0에 도달할 때까지 37°C에서 배양한다. 1 mM IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; Sigma, USA)와 1mM serotonin(TCI, Japan), 1 mM 4-coumaric acid(Sigma, USA)를 첨가하고 28°C에서 250rpm의 속도로 주어진 시간 동안 배양한다. 1 ml를 분주하여 4°C에서 7500g로 5분간 원심분리하여 대장균 침전물과 배지로 분리한다.

마. 4CL2와 SHT 유전자의 periplasm 발현

먼저 4CL2 유전자와 SHT 유전자를 periplasm targeting sequence(PelB)가 내장되어 있는 pET22b 벡터에 도입하여 PelB-4CL2 와 PelB-SHT fusion form이 실제로 대장균에서 periplasm으로 단백질을 targeting 시키는 지 확인하기로 하였다. 먼저 SHT 유전자를 NcoI/NotI으로 절단하고, 동일한 효소로 절단된 pET22b에 cloning 한다. 4CL2 유전자는 NcoI 및 XhoI 제한효소로 절단한 뒤, 동일한 효소로 절단한 pET22b 벡터에 클로닝한다. pET2b-SHT 및 pET22b-4CL2 벡터를 모두 BL21(DE3) 숙주로 형질전환하여 4CL2 와 SHT 단백질이 periplasm으로 이동하는 지 본다. Periplasm 분획은 대장균 pellets을 20% sucrose 용액으로 osmotic shock을 가한 뒤, 상등액을 periplasm 층으로 사용하였다.

바. PelB-SHT 및 PelB-4CL2 동시발현 벡터 구조물 제작

동시 발현벡터로서는 pDuet vector를 사용하였으며, pET22b-SHT 구조물에서 XbaI/NotI 제

한효소로 절단한 PelB-SHT insert를 확보하여 pDuet 벡터의 동일제한효소부위로 클로닝하여, pDuet-PelB-SHT 유전자 구조물을 제작하였다. 또한 pET22b-4CL2 벡터에서 *NdeI* 및 *XhoI* 제한 효소로 절단한 PelB-4CL2 insert를 절단 한 뒤, pDuet-PelB-SHT 벡터의 *NdeI* 및 *XhoI*부위로 도입하여, pDuet: PelB-SHT/PelB-4CL2 dual expression 유전자를 제작하였고, 이 벡터를 BL21(DE3) 대장균 숙주로 형질전환하여 사용하였다.

사. 재조합 E. coli에서 PAs 정량

PAs를 정량하기 위해서 대장균 침전물을 0.1 mM Tris-HCl(pH7.0) 0.5ml에 녹이고, 30초간 초음파로 세포를 마쇄한 후, 4°C에서 15000g의 속도로 2분간 원심 분리 한 후, 상등액에 같은 양의 ethyl acetate를 첨가하여 PAs를 추출한다. ethyl acetate 분획만을 증발기로 말린 후, HPLC 메탄올 0.5 ml로 녹이고 5 ul를 HPLC로 분석한다(Jang et al., 2004). 배지 분획은 같은 양의 ethyl acetate를 첨가하여 대장균 침전물의 추출과 같은 방법으로 PAs를 추출한다.

아. 벡터 제작 및 대장균에서 THT와 4CL 발현

THT와 4CL 유전자의 이중 발현을 위해 pETDuet-1(Novagen, San Diego, CA, USA) 벡터를 사용하였다. 먼저, 고추(*Capsicum annum* cv. Subicho)에서 분리한 cDNA 주형을 사용하여 THT 유전자를 증폭하였다. 전방 primer는 5'-d(TTIGCCATGGCTTCAGCTATATCT)-3'(밑줄은 *NcoI* 제한효소 부위이고 볼드체는 전사 개시 코돈이다.) 이고 후방 primer는 5'-d(TATGCGGCCGCTTAACAGTTTCCTCCTTC)-3'(밑줄은 *NotI* 제한효소 부위이고 볼드체는 전사 종결 코돈이다.) PCR로 증폭된 유전자를 *NcoI* 과 *NotI*으로 자르고 전기영동 후, 정제하여 *NcoI*과 *NotI*으로 잘려진 pETDuet-1 벡터에 삽입한다. 그 결과로 pETDuet-THT 벡터가 완성된다. 애기장대(Columbia)의 4CL 유전자를 pETDuet-THT 벡터에 도입하기 위해서 4CL2 cDNA(RIKEN BioResource Center, Saitama, Japan; Seki et al. 1998, 2002) 주형을 사용한다. 전방 primer는 5'-d(ATACATATGACGACACAAGAT)-3' (밑줄은 *NdeI* 제한효소 부위이고 볼드체는 전사 개시 코돈이다.) 이고 후방 primer는 5'-(AGACTCGAGCTAGTTCATTAATCC)-3' (밑줄은 *XhoI* 제한효소 부위이고 볼드체는 전사 종결 코돈이다.) PCR로 증폭된 유전자를 *NdeI* 과 *XhoI*으로 자르고 전기영동 후, 정제하여 같은 제한 효소로 잘려진 pETDuet-THT 벡터에 삽입한다. 완성된 pETDuet-THT + 4CL2 벡터를 BL21(DE3)(Novagen) 대장균에 넣는다. 대장균 5 ml을 키운 배지를 50mg의 ampicillin l^{-1} 이 함유된 50 ml YEB 배지(10g Bacto-pepton l^{-1} , 10g Bacto-yeast extract l^{-1} , 5gNaCl l^{-1})에 넣고 37°C에서 OD₆₀₀ 값이 1이 될 때까지 배양한다. 1 mM IPTG와 적절한 amine과 phenolic acid를 넣고 28°C에서 250rpm의 속도로 지정된 시간동안 배양한다. 1 ml 배양액을 4°C에서 11,500×g 의 속도로 1분간 원심분리 후, 상층 배양액과 대장균 침전물로 분리한다.

자. 벼 4CL1과 SHT 유전자가 발현된 재조합 대장균 제작

벼의 4CL1 유전자(AK068985)는 일본 생물자원연구소 (National Institute of Agrobiological Science, <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp>) 에서 분양 받았다. 분양받은 rice 4CL1 cDNA를 주형으로 삼고, 전방 primer, 5'-d(GCAGATCTCATGGGGTCCATGGCG)-3'(BglIII 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)와 후방 primer, 5'-(AGACTCGAGTTAGCTTTTCAACTG)-3'(XhoI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)를 사용하여 Taq polymerase(Takara, Japan)와 함께 rice 4CL1 유전자를 증폭시킨다. 증폭된 1680 bp 크기의 DNA 조각은 BglIII과 XhoI 제한효소로 자르고, 정제한 후, 같은 제한 효소 부위로 잘려진 pETDuet-1 벡터에 삽입한다. 그 결과 pETDuet-벼 4CL1 벡터로 완성된다. SHT 유전자는 고추(*Capsicum annuum* cv. Subicho)로부터 분리한 cDNA를 복제하여 사용하였다(Jang et al., 2004). 전방 primer는 5'-d(CATACCATGGCTTCTGCTCCT)-3'(NcoI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체), 후방 primer는 5'-d(TATGCGGCCGCCTAACAGCTTCCTGCACC)-3'(NotI 제한효소 부위는 밑줄, 전사 개시 코돈은 볼드체)이다. PCR 생성물을 제한효소로 자르고,(NcoI, NotI) 정제한 후, NcoI 과 NotI 으로 잘려진 pETDuet-4CL로 삽입한다. 그 결과 만들어진 벡터는 pETDuet-SHT-4CL이며, BL21(DE3)로 삽입한다. 10 ml overnight 배양 후, 50 mg ampicillin이 들어있는 100 ml YEP 배지(10 g/l Bacto-peptone, 10 g/l Bacto-yeast extract, 5 g/l NaCl)에 접종하고 600 nm에서 흡광도가 1.0에 도달할 때까지 37°C에서 배양한다. 1 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; Sigma, USA)와 1 mM serotonin(TCI, Japan), 1 mM 4-coumaric acid(Sigma, USA)를 첨가하고 28°C에서 250rpm의 속도로 주어진 시간 동안 배양한다. 1 ml를 분주하여 4°C에서 7500g로 5분간 원심분리하여 대장균 침전물과 배지로 분리한다.

차. 대장균에서 TDC와 T5H 유전자 공동발현을 통한 세로토닌 생산

대장균에서 TDC 와 T5H 유전자 공동발현을 위해 T5H 유전자는 GST-Δ37T5H 를 사용하였고, TDC 유전자는 *Catharanthus roseus*(일일초) 꽃으로부터 추출한 total RNA를 이용하여, RT-PCR 클로닝하였다. 공동발현을 위한 dual vector으로서는 pCOLADuet(Novagen, San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 첫째로 GST-Δ37T5H는 pGEX6P1-Δ37T5H를 template로 이용하였으며, 사용한 forward primer는 5'-ACCATGGGCATGTCCCCTATACTA-3'(NcoI 제한효소 밑줄), reverse primer 5'-AGAATTCTTAAACCTCACTAAGCTCCTC-3'(EcoRI 제한효소 밑줄) 이었다. 상기의 PCR 산물을 NcoI과 EcoRI으로 절단한 뒤, 젤 정제하였고, NcoI과 EcoRI으로 절단된 pCOLADuet 벡터로 ligation 통하여 클로닝하였다(pCOLADuet-GST Δ37T5H). Tryptophan decarboxylase(TDC) 유전자를 도입하기위해 *Catharanthus roseus*(일일초) total RNA를 이용하여, RT-PCR을 수행하였다. M-MuLV reverse transcriptase(Fermentas, Canada)을 이용하여 cDNA을 합성하였고, TDC(GenBank No. J04521)mf PCR 클로닝하기 위해사용한 forward primer은 5'-CATATGGGCAGCATTGAT-3' & reverse primer 5'-GGTACCTCAAGCTTCTTTGAG-3' 였

다. 전장 TDC PCR 산물을 TA vector(RBC Bioscience, Taipei)에 클로닝하였고(TA-TDC), DNA 서열을 확인하였다. TA-TDC 벡터를 *NdeI* 과 *KpnI*으로 절단하여, 동일한 효소로 open 된 pCOLADuet-GST Δ 37T5H 벡터로 ligation 하여, 최종적으로 pCOLADuet-GST Δ 37T5H+TDC 벡터구조물을 완성하였다. 사용한 대장균 host strain은 BL21(DE3) 이다. Overnight 배양한 pCOLADuet-GST Δ 37T5H+TDC 발현 대장균 500 μ l를 2XYT 배지 10 ml에 분주한 뒤, 37°C에서 OD600=1.0 이 될때까지 배양한 후, 다양한 농도의 IPTG, 트립토판 및 다양한 온도에서 세로토닌 생성 유무를 동정하였으며, 주로 대장균 cells 층과 medium 층으로 분획하여 각 각 조사하였다.

카. 트립토판 처리에 따른 serotonin 생성물 측정 방법

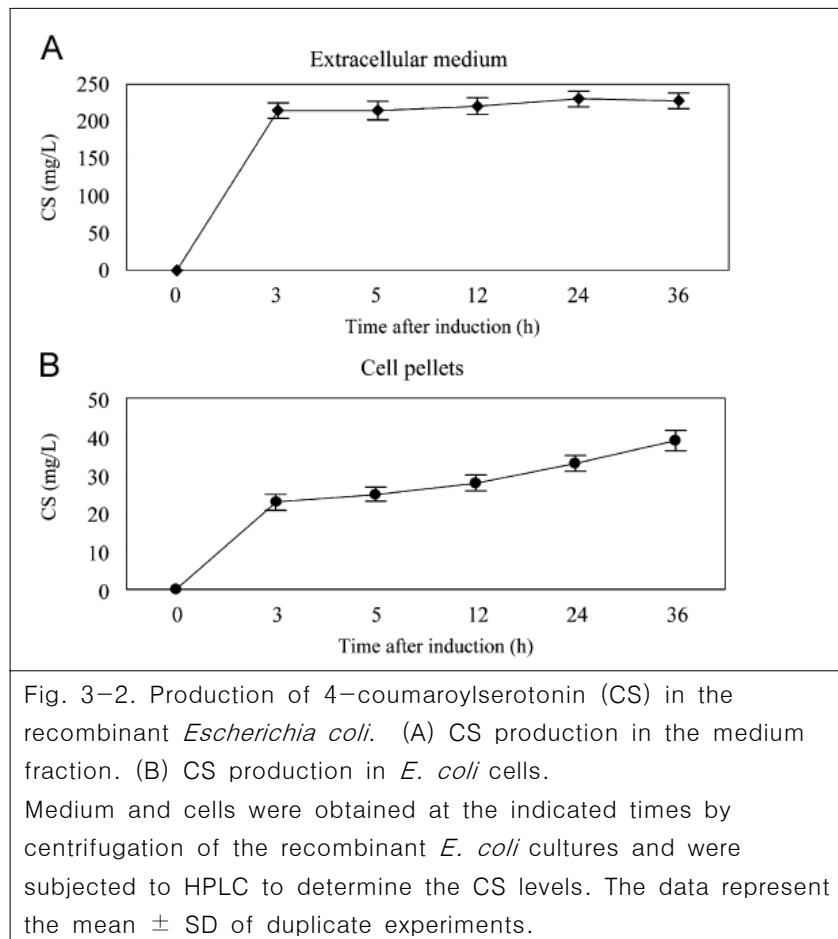
pCOLADuet-GST Δ 37T5H+TDC 발현 대장균을 발현하는 대장균을 이용하여 트립타민 처리 시 세로토닌을 생합성하는지를 검정하였다. 대장균 배양액에서 트립토판, 트립타민, 세로토닌 함량을 측정하기 위해서, 배양액은 Millex-LG(Milipore, USA) 필터를 사용하여 HPLC에 직접 주입하였으며, 대장균 pellets는 0.5 ml MeOH 에 녹인 후, 30초간 sonication 한 후, 원심분리 11,500 x g 로 2분한 후, 상등액을 상기와 같이 filtering 한 후, HPLC에 주입하여 조사하였다. HPLC 조건은 전반부에 기술한 조건과 동일하였다.

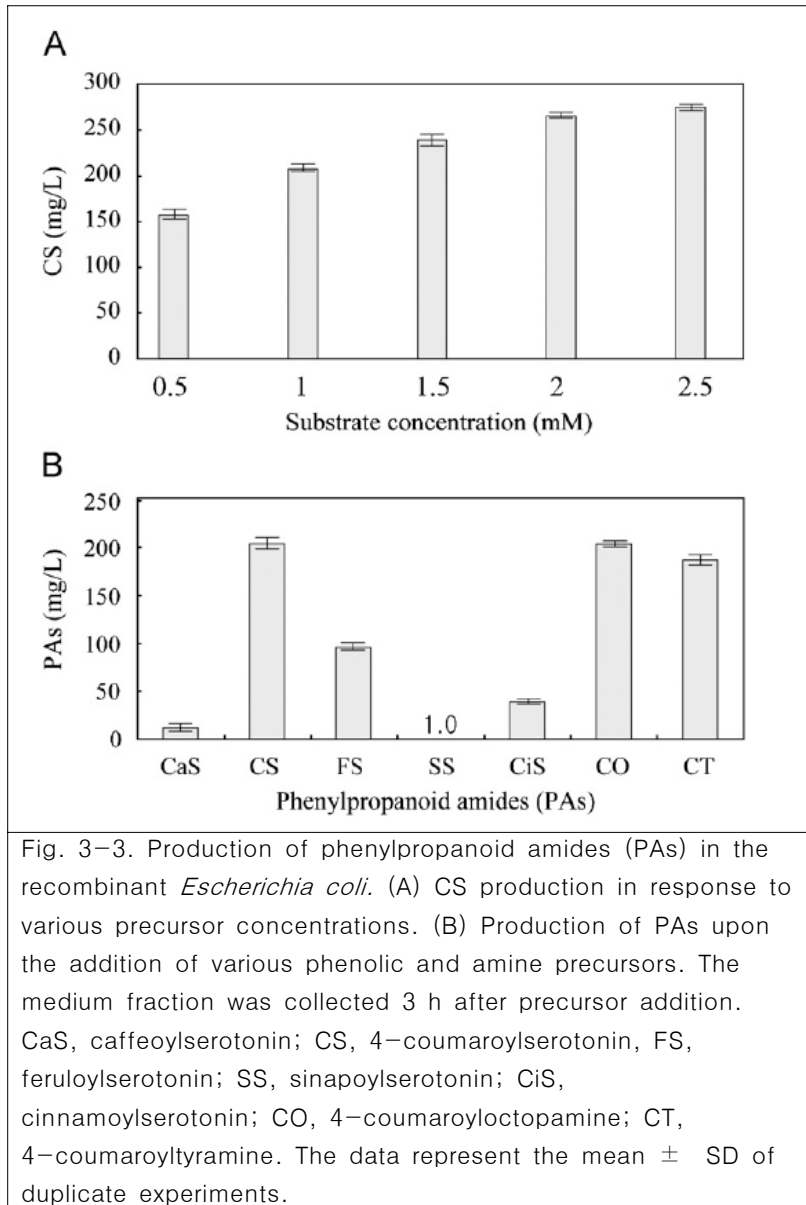
3. 연구 수행 결과

가. 애기장대 4CL2(At4CL2) 와 SHT 동시발현 재조합 대장균의 세로토닌유도체 생산

- 4CL과 SHT가 발현된 재조합 대장균에서 PAs가 합성되는 지 확인하기 위해서 1 mM serotonin hydrochloride과 1 mM 4-coumaric acid를 1mM의 IPTG와 함께 첨가하여 28°C에서 주어진 시간동안 배양하였다. 1 ml의 배양액을 원심분리하여 대장균 분획과 상층액으로 분리하여 각각을 ethyl acetate로 추출하였다.
- 배양액에는 발현 3시간 후에 215 mg/l의 4-coumaroylserotonin(CS; 그림 3-2A)가 축적되었고 발현 24시간 후에는 230 mg/l로 최고의 농도를 보였다. CS는 36시간 동안 분해되지 않았지만, 4CL과 stilbene synthase가 발현된 재조합 대장균에서 생성되는 resveratrol은 반대되는 결과를 보여주었다(Beekwilder et al., 2006). 5 mM 4-coumaric acid를 첨가하여 발현 20시간 후에 20 mg/l의 resveratrol이 합성되었으며, 합성된 resveratrol은 분해되어 36시간 후에는 발견되지 않았다.
- 대장균 내에서는 발현 3시간 후에 22 mg/l의 CS가 합성되었다(그림 2B). 이는 배양액에서

합성된 양의 1/10 수준이다. 좀 더 긴 시간 동안 발현하면 좀 더 많은 CS가 합성되나 배양액에서 합성되는 양과는 차이가 많다. 시간을 세분화 하면, 발현 2시간 후에는 210 mg/l의 CS가 합성되는데, 이는 발현 3시간과 비교했을 때, 거의 같은 양이다. CS의 양은 발현 5분 후에 최고 합성량의 20%까지 도달하며 30분 후에는 50%까지 도달한다. 대장균 내에서 생성된 CS는 배양액으로 유출되는 정도가 우수하다. 이는 고농도의 CS를 간단한 방법으로 얻을 수 있다는 장점이 있으며, 상업적 생산 기술로 적용이 가능하다.





- CS합성에 전구물질의 농도가 미치는 영향을 알아보기 위해 같은 양의 전구물질(serotonin, 4-coumaric acid)을 다르게 첨가하여 CS의 합성 정도를 측정하였다(그림 3-3). 37°C에서 배양한 대장균 배양액(OD₆₀₀=1.0)에 0.5 mM serotonin과 0.5 mM 4-coumaric acid를 첨가하고 28°C에서 3시간 동안 배양한 후, CS의 함량을 측정하였다. 배양액 분획의 CS를 HPLC로 측정하였다. 0.5 mM의 serotonin과 4-coumaric acid를 처리할 때, 156 mg/l의 CS가 생성되었다(그림 3A). 1 mM의 serotonin과 4-coumaric acid를 처리한 것은 215 mg/l의 CS가 생성되었다. 2.5 mM serotonin과 4-coumaric acid까지 처리하면, CS 함량이 증가하지만, 증가량의 무시할 정도로 작고 0.5 mM의 전구체를 처리했을 때, CS의 수율(156mg/l)이 최고의 94%까지 도달하는 것을 보았을 때, 두 전구체의 거의 모든 양을 사용하여 CS를 합성한다는 것을 알 수 있다. 반면, 1 mM의 전구체를 사용했을 때, 회수율이 67%로 약 30%의 전구체는 CS합성에 사용되지 않았다. 그러므로 CS 합성에 사용되는 최적의 전구체 농도는 0.5

mM이다.

- 재조합 대장균에서 serotonin과 4-coumaric acid 이외의 다른 전구체를 처리했을 때, 그에 맞는 PAs가 생성되는지 연구를 수행하였다(그림 3-3B). 1 mM의 다른 전구체를 처리하고 PAs의 생성 여부를 HPLC로 조사하였다. amine 전구체는 serotonin, octopamine, tyramine 을 사용하였고 phenolic acid 전구체는 caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, cinnamic acid를 사용하였다. 생성된 PAs는 4-coumaroyloctopamine(CO)이 208 mg/l 생성되었고 4-coumaroyltyramine(CT)이 187 mg/l 생성되었다. 반면, FS는 CS의 절반정도인 96 mg/l가 생성되었고, cinnamoylserotonin(CiS)은 39 mg/l, caffeoylserotonin (CaS)은 11 mg/l 생성되었다. 가장 적은 PAs는 sinapoylserotonin(SS)로 1mg/l 정도 생성되었다. 기질에 따라 4CL과 SHT가 다른 효소 활성을 나타냄으로 합성되는 PAs의 양이 다양하게 나타난다(Ehltling et al., 1999 Jang et al., 2004). 4CL은 4-coumaric acid(252 μ M)와 달리 caffeic acid에 가장 높은 기질 친화도(20 μ M)를 가지는 반면, caffeic acid(V_{max} =0.21pkal/mg protein)에 비해 4-coumaric acid(V_{max} =0.28pkal/mg protein)에서 가장 높은 효소 활성을 나타낸다. SHT의 K_m 값은 caffeic acid는 12.7 μ M, 4-coumaric acid는 23.2 μ M을 나타내지만, V_{max} 값은 각각 31nkat/mg protein과 35nkat/mg protein을 가진다. 또한, 4-coumaric acid에 비해 caffeic acid와 sinapic acid가 대장균 안으로 투과되는 정도가 낮거나(Torres et al., 2007) caffeic acid와 sinapic acid에 의해 합성되는 PAs가 세포밖으로 잘 나오지 못하는 가능성도 있다. 하지만, 대장균 세포 안에 CaS의 함량이 낮은 것으로 보아 후자의 경우는 그 가능성이 낮은 것 같다. Ehltling et al. 보고서(1999)에서는 애기장대 4CL2가 ferulic acid를 기질로 사용하지 못한다고 보고했다. 하지만, 같은 4CL2는 ferulic acid를 기질로 사용하여 관련된 PAs를 생산하였고 재조합 효모에서도 ferulic acid를 기질로 사용했다(Park et al., 2008).
- SHT 유전자 발현이 CS의 생성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 western blotting과 SHT 효소 활성을 측정하였다. IPTG를 처리하면, 전구체를 처리한 세포와 처리하지 않는 세포 모두 SHT 단백질 발현이 증가하였다(그림 3-4A). SHT 단백질의 상대적인 발현 정도는 다르지 않았다. 또한, 대장균의 성장속도와 배양액의 흡광도도 차이가 없었다. 하지만, SHT 효소 활성은 IPTG 처리 후 증가하였다(그림 3-4B). 전구체를 처리하지 않는 대장균에서 SHT 활성은 IPTG 처리 후, 30분 후에 증가하기 시작하고 60분에는 최고 활성을 나타내며 (262pkal/mg protein), 이후에 빠르게 감소하여 5시간 후에는 100 pkal/mg protein의 활성을 보였다. IPTG 처리 전에 37 $^{\circ}$ C에서 소량으로 T7 promoter가 발현되어 22pkal/mg protein의 기본적인 SHT 활성을 나타낸다. 전구체와(1 mM serotonin과 4-coumaric acid)함께 IPTG를 처리한 대장균 배양액에서는 60분 후에 143 pkal/mg protein의 최대 활성을 나타낸다. 그 후에는 SHT효소 활성이 IPTG를 처리하지 않는 대장균과 비슷하게 감소한다. 30분과 60분에서 전구체를 처리한 대장균은 처리하지 않는 대장균에 비해 SHT 효소 활성이

각각 6배와 2배 정도 낮다. 하지만, SHT 효소 활성의 차이는 5시간 뒤에는 같아진다. 비록 SHT 단백질의 발현은 전구체의 처리와 관계없이 비슷하지만, 전구체를 처리한 대장균에서 SHT 효소 활성이 낮은 것은 전구체에 의해 합성된 CS에 의한 저해작용일 것이다. 따라서 IPTG 처리 후, CS가 15 mg/l 정도 합성된 30분까지 SHT 효소 활성은 나타나지 않고 있다 (그림 3-4B, C). 전구체를 처리한 대장균의 SHT는 처리하지 않은 대장균의 60% 정도로 효소 활성을 나타내고 이는 전구체에 의해 합성된 CS가 SHT의 효소 활성을 저해해서 나타나는 현상일 것이다. 이와 같이 높은 농도의 전구체를 처리해도 CS의 합성이 급격하게 증가하지 않는 이유는 THT 효소와 같이 SHT 효소 활성에 대해서도 생성물 저해 기작이 작용하기 때문이다. THT에 대해 4-coumaroyltyramine의 K_i 값은 $95 \mu\text{M}$ 이다(Hohlfeld et al., 1995). 재조합 대장균의 CS농도(22 mg/l)는 $68 \mu\text{M}$ 정도 되는데, 이는 4-coumaroyltyramine의 K_i 값과 비슷한 농도이다. 따라서 CS의 수율을 높이는 것은 CS가 세포안에서 저해 작용을 하지 못하도록 세포밖으로 내보내는 능력에 달려 있다.

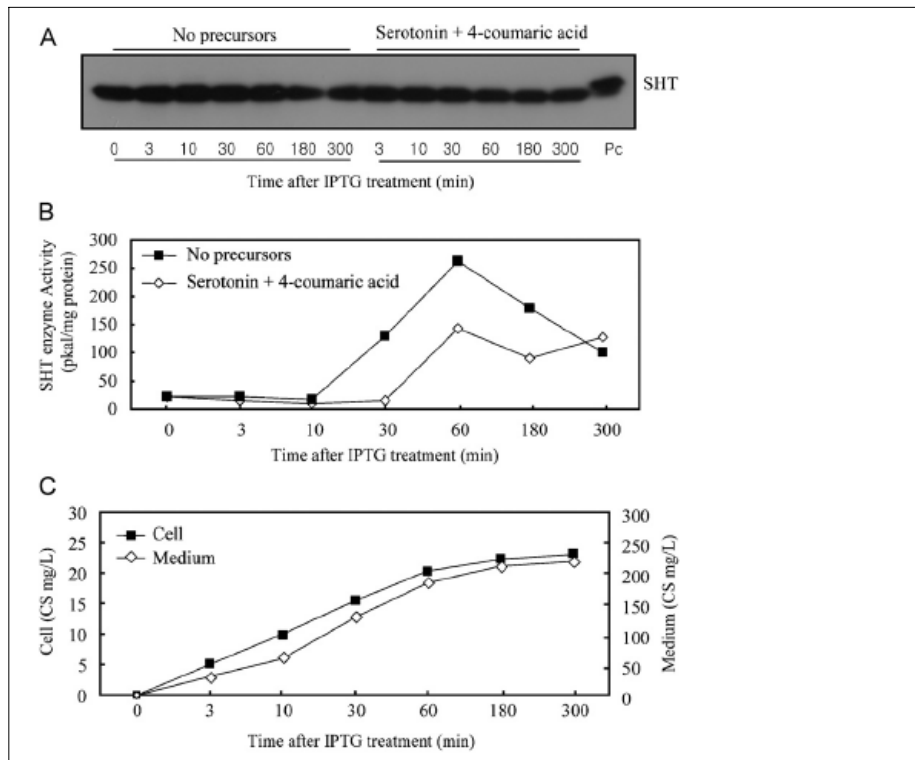


Fig. 3-4. Time course of the immunoblot (A), SHT enzyme activity (B), and CS product levels (C). The recombinant *E. coli* cultures were induced upon 0.5 mM IPTG in the absence of precursors or in the presence of each 1 mM serotonin and 4-coumaric acid. Soluble protein extracts (1 g) were prepared at various time intervals (as indicated below the lanes) from the recombinant *E. coli*. SHT enzyme activity was measured with 1 mM serotonin as the acyl acceptor and 250 M 4-coumaroyl-CoA as the acyl donor as described previously (Kang et al., 2006). Data from duplicates of the same sample were identical. Pc, purified His-tagged SHT protein.

- 재조합 대장균을 이용하여 식물의 이차대사산물을 생성하는 좋은 예가 있다. Flavonoid는 재조합 대장균에서 생산되는 가장 잘 알려진 이차대사산물이다(Chemler et al., 2007; Katsuyama et al., 2007). 이와 비슷하게 PAs를 생합성하였지만, 지금까지 알려진 것과는 다른 방법으로 재조합 대장균에서 PAs를 생성하였다. 지금까지 치료효과를 입증하기 위해 PAs를 화학적 합성으로 생산해 왔다. PAs를 합성하기 위한 출발 물질은 coumaric acid와 serotonin(또는 tyramine)이다. 간단히, coumaric acid는 serotonin과 동량으로 결합하여 CS를 만들기 때문에 그 수율은 55%정도 된다. 합성된 CS는 HPLC를 통해 정제하게 된다. 화학적 합성 과정은 많은 유기용매를 필요로 하고 시간도 수일이 걸린다. 그리고 마지막으로 HPLC 정제를 통해 고순도의 PAs를 얻을 수 있다(Ishihara et al., 2000; Park and Schoene, 2002). 하지만, 재조합 대장균 방법은 PAs를 합성하기 위해 단지 수 시간이 걸리고, 많은 유기용매도 필요치 않는다. 더군다나 CS, CO, CT를 이 방법을 통해 얻을 수 있다. 비록, YEP 배지를 제거하기 위해 HPLC나 컬럼 크로마토그래피가 필요하지만, 각각 0.5 mM의 기질만으로 약 98%의 순도를 가진 PAs를 생산할 수 있다. 따라서 대장균을 이용한 합성방법은 현재 사용하고 있는 화학적 방법보다 더 빠르고 쉽다.
- 결론적으로 유용한 PAs는 재조합 대장균을 이용해 수 시간안에 200 mg/l를 생산할 수 있으며 생성된 화합물은 대장균에서 배지로 빠져 나오게 되고, 정제 과정도 상대적으로 쉽다는 장점이 있다.

나. SHT와 4CL2의 periplasm 발현 및 SHT+4CL2 동시발현

- 4CL과 SHT가 발현된 재조합 대장균인 pET22b-SHT 및 pET22b-4CL2 에서 SHT 및 4CL2 단백질이 periplasm으로 targeting 되는지 알고자 각 recombinant 대장균을 1 mM의 IPTG와 함께 첨가하여 28°C에서 5 시간동안 배양하였다. 대장균 총 단백질은 배양액을 2x sample buffer로 denaturation 하여 직접 사용하였고, medium층은 1ml의 배양액을 원심분리하여 상층액을 0.4 µm syringe filter으로 통과한 후, filtrate를 이용하였다. Soluble 층은 박테리아 pellets를 sonication 한 후, 원심분리하여 상층액을 이용하였다.
- 이들 각 fractions을 10% SDS-PAGE 에 분리하여, Western blot 을 각각 SHT 및 4CL2 항체와 결합하여 발현량을 분석하였다. 그림2에 도시한 바 같이, SHT 단백질은 signal PeIB 서열은 잘려나갔지만, periplasm 층에서 SHT 발현이 검출되지 않았다. 또한 cytoplasm 발현용 벡터인 pET28b-SHT 발현량에 비해 발현율이 현저히 낮았으며, 약 5배정도 낮은량으로 발현하는 것으로 나타났다. 이는 PeIB 서열 첨부가 SHT발현율을 낮추는 것으로 보여진다(그림 3-5A). pET22b-4CL2 벡터의 경우, SHT 단백질과는 다르게 4CL2 단백질이 아주 적

은량으로 periplasm 층으로 이동됨을 확인 할 수 있었으며, 심지어 medium 층에서 4CL2 단백질의 발현이 검출되었다. 따라서 PelB 서열에 따른 외부유전자의 targeting 정도는 단백질의 종류에 따라 서로 상이함을 알 수 있었다.

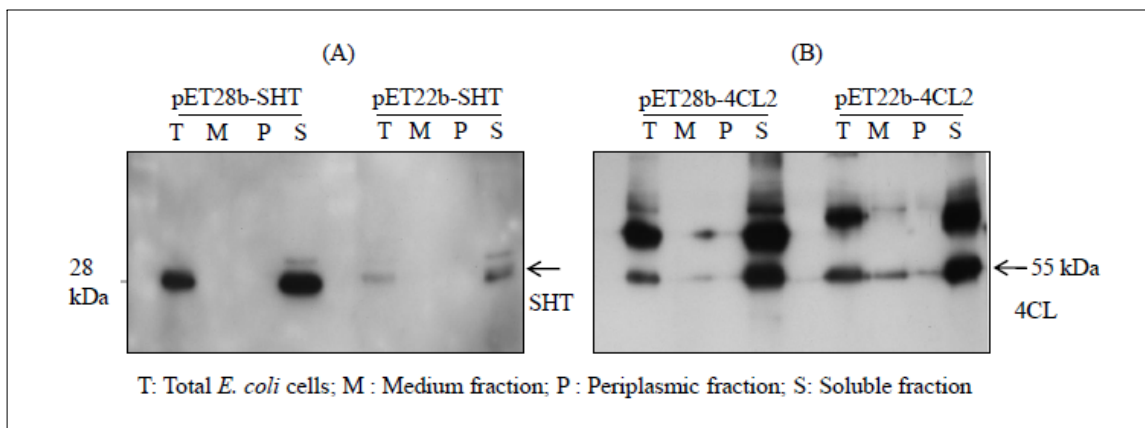
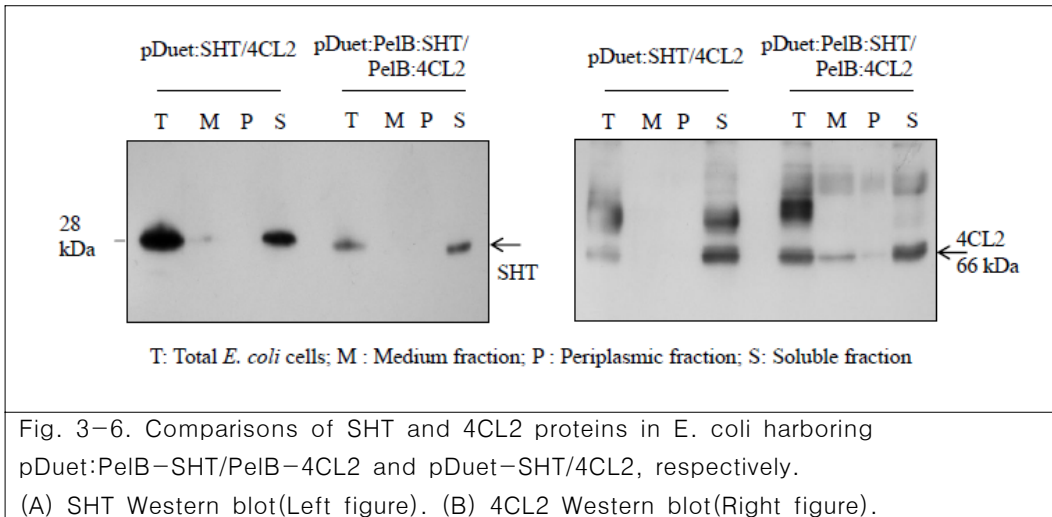


Fig. 3-5. Western blot analysis for targeting transgene into periplasm. (A) Expression patterns of SHT protein(Left figure). (B) Expression pattern of 4CL2 protein(Right figure).

- Periplasm 발현벡터 pDuet: PelB-SHT/PelB-4CL2 와 cytoplasm 발현 pDuet-SHT/4CL2 벡터에서 각 단백질의 발현이 어느정도 차이가 있는지 비교하기 위하여, 대장균을 IPTG 1 mM 로 유도발현 시킨 후, 3시간에서 total protein, medium, periplasm protein, soluble protein 층으로 분획하여, SDS-PAGE 에 분리한 후 Western blot 분석을 수행하였다. 그림 3에 도시한 바 같이, pDuet: PelB-SHT/PelB-4CL2에서 SHT 발현이 periplasm으로 targeting 되지 않았으며, 특히 발현량이 pET2b-SHT 에서와 같이 매우 적은 량으로 발현되고 있음을 볼 수 있었다. 이에비해 pDuet-SHT/4CL2 벡터에서 SHT 발현은 total 및 soluble fractions 에서 다량으로 발현되고 있음을 볼 수 있었다(그림3-6A). 4CL2 단백질 역시, pDuet: PelB-SHT/PelB-4CL2 에서 medium 및 periplasm으로 targeting 되는 4CL2 단백질이 검출되어, 소량으로 targeting 됨을 알 수 있었으며, soluble 층에서 4CL2 단백질 발현율은 pDuet-SHT/4CL2에서 검출되는 4CL2 단백질 발현율과 차이가 없었다(그림 3-6B). 이후, pDuet: PelB-SHT/PelB-4CL2 발현 대장균에 caffeic acid, ferulic acid, 4-coumaric acid 및 serotonin을 첨부하여 대장균 내에서 세로토닌유도체 함량을 측정된 결과, 세포질에 발현된 pDuet-SHT/4CL2에 비해 10배 이상 적은 량으로 검출되어 실험을 더 이상 진행 할 수 없었다. 이는 최종적으로 세로토닌유도체를 합성하는 SHT 효소의 절대량이 pDuet: PelB-SHT/PelB-4CL2에서 아주 낮게 발현됨이 원인으로 사료된다.



다. THT와 4CL2의 동시발현 대장균 발현 및 세로토닌유도체 생합성

- THT와 4CL이 도입된 재조합 대장균에 IPTG와 tyramine, 다양한 phenolic acid(각각 0.5 mM)를 처리하고 대장균이 어떠한 tyramine 유도체를 합성하는지 측정하였다. 그림 4a에서 보듯이 IPTG 유도 후, 3시간 후부터 다양한 tyramine 유도체가 합성되었다. 가장 많이 합성된 화합물은 tyramine과 4-coumaric acid에 의한 4-coumaroyltyramine(CT)이며 188 mg l^{-1} 합성된다. 비슷한 양으로 tyramine과 ferulic acid에 유도된 feruloyltyramine(175 mg l^{-1})이 합성된다. tyramine과 caffeic acid에 의해 Caffeoyltyramine(CaT)이 31 mg l^{-1} 합성된다. tyramine과 cinnamic acid에 의해 소량의 cinnamoyltyramine(CiT)(2.7 mg l^{-1}) 이 합성된다. 그러나 tyramine과 sinapic acid를 처리했을 때, sinapoyltyramine(ST)는 발견되지 않았다.
- Tyramine 유도체는 대부분 대장균 배양액 중에서 배양액 분획에서 발견된 반면 대장균 세포에서는 아주 적은 양으로 존재하였다. 이는 대부분의 tyramine 유도체들이 대장균에서 합성된 후, 배양액으로 분비되는 것을 알 수 있다. 0.5 mM의 전구체를 처리한 후, CT(188 mg l^{-1})수율은 처리한 전구체의 약 66% 회수율을 보이는 반면, FT와 CaT는 각각 약 56%와 10%의 회수율을 보인다. 대장균에 THT와 4CL를 각각 홀로 발현시키고 앞서 언급한 다양한 유도체를 처리하면, tyramine 유도체는 생성되지 않는다. CT합성에 전구체 농도의 영향을 알아보기 위해 같은 양의 전구체(tyramine, 4-coumaric acid)를 다양한 농도로 처리하였다. 0.1 mM의 tyramine과 0.1 mM의 4-coumaric acid를 처리했을 때, 35 mg l^{-1} CT가 합성되었다.(그림 4b). 전구체의 농도를 0.1 mM에서 0.5 mM로 높이면, CT역시 188 mg l^{-1} 까지 증가한다. 하지만, 1 mM이상의 전구체 농도에서는 0.5 mM의 전구체를 처리했을 때의 절반 정도의 생성물이 합성된다. 이와같이, 0.5 mM의 전구체 농도에서 가장 많은 CT가 합성되었다. tyramine 유도체에 비해 dopamine 유도체의 함량은 상대적으로 낮다.(그림 4c). dopamine(0.5 mM)과 ferulic acid(0.5 mM)를 처리했을 때, 48 mg l^{-1} 의 feruloyldopamine(FD)

이 합성되었다. 4-coumaroyldopamine(CaD; 34 mg l^{-1})과 caffeoyldopamine(CD; 34 mg l^{-1})의 합성도도 비슷한 수준이다. CiT와 같이 cinnamoyldopamine(CiD)도 매우 낮은(0.8 mg l^{-1})수준으로 합성되었다. 하지만, sinapoyldopamine(SD)은 전혀 합성되지 않았다. 재조합 대장균에서 sinapic acid는 tyramine 유도체와 dopamine 유도체 합성에 이용되지 않는다. 재조합 대장균에서 주요하게 합성되는 tyramine 유도체는 CT, FT, CaT이다(그림 3-7). 재조합 대장균에서 모든 유도체들이 동시에 합성되는지 알아보기 위해 4-coumaric acid(0.5 mM), ferulic acid(0.5 mM), caffeic acid(0.5 mM)와 tyramine(1.5 mM)을 동시에 처리한 후, 배양액을 HPLC 분석하였다. 그림 4d에서 보듯이 대장균에서 모두 363 mg l^{-1} 의 tyramine 유도체가 합성되었다. CT 합성(189 mg l^{-1})도 tyramine과 4-coumaric acid만 단독으로 처리했을 때와 같았다. FT도 전구체를 단독으로 처리했을 때의 77% 수준으로 합성되었다. CaT 합성(40 mg l^{-1})은 전구체를 독립적으로 처리했을 때보다 30%정도 더 많이 합성되었다. tyramine 유도체(CT+FT+CaT)의 회수율은 41%로 단독으로 처리했을 때의 평균값인 44%와 비슷하였다. tyramine 유도체와 반대로 dopamine 유도체는 전구체를 동시에 처리(1.5 mM dopamine, 0.5 mM 4-coumaric acid, 0.5 mM ferulic acid, 0.5 mM caffeic acid)했을 때, 독립적으로 처리했을 때 보다 낮은 수율을 보였다(그림 4e). 예로 들어, 22 mg l^{-1} 의 4-coumaroyldopamine(CD)은 전구체를 단독으로 처리했을 때 합성량의 61% 정도이다. 게다가, caffeoyldopamine(CD)은 4% 이고, feruloyldopamine(FD)은 전혀 합성되지 않았다. 대장균에서 전구체를 동시에 처리했을 때, dopamine 유도체의 합성은 저해되는 것을 알 수 있다.

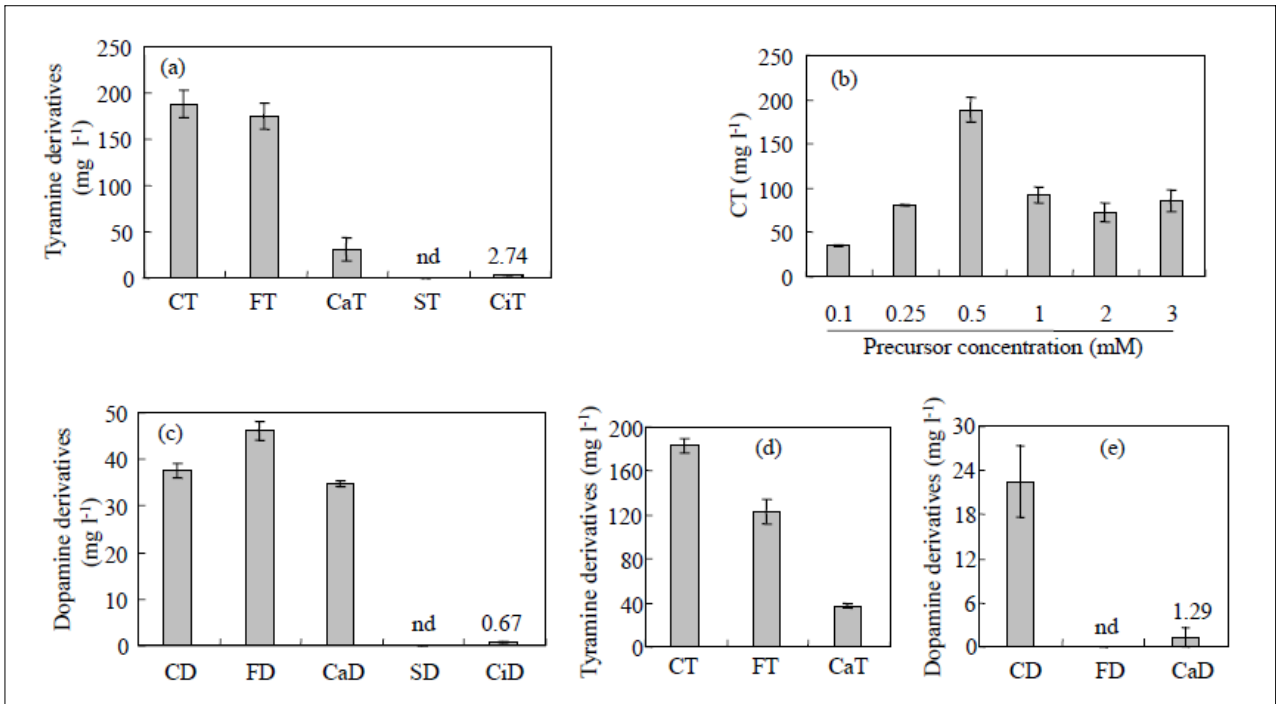


Fig. 3-7. Production of tyramine or dopamine derivatives in the media fraction of recombinant *E. coli*. The media fraction of the recombinant *E. coli* culture was collected 3h after the addition of 1mM IPTG, 0.5mM tyramine, and 0.5mM of various phenolic acids for the measurement of tyramine derivatives (a). Precursor concentration effect on CT production (b). Production of dopamine derivatives in the media fraction of recombinant *E. coli* (c). Simultaneous production of multiple tyramine (d) and dopamine derivatives (e) after simultaneous addition of precursors with 1.5mM tyramine (or dopamine), 0.5mM 4-coumaric acid, 0.5mM ferulic acid, and 0.5mM caffeic acid. CT: 4-coumaroyltyramine; FT: feruloyltyramine; CaT: caffeoyltyramine; ST: sinapoyltyramine; CiT: cinnamoyltyramine; CD: 4-coumaroyldopamine; FD: feruloyldopamine; CaD: caffeoyldopamine; SD: sinapoyldopamine; CiD: cinnamoyldopamine. The data represent the mean \pm SD of duplicate experiments. nd: not detected.

- 대장균에서 tyramine 유도체의 수율, 분배, 안정성을 알아보기 위하여 1.5 mM tyramine, 0.5 mM 4-coumaric acid, 0.5 mM ferulic acid, 0.5 mM caffeic acid를 처리하고 12시간 동안 IPTG 유도발현을 하였다(그림 3-8). 배양액 분획에서 30분 후에 118 mg CT l⁻¹ (그림 3-8a)가 합성되었고 3시간 후에 최고점인 183 mg l⁻¹에 도달하였다. 하지만, 3시간 이후에 CT 양은 줄어들어 12시간 후에서 70 mg l⁻¹에 이르렀다. FT의 합성은 5시간 동안 137 mg l⁻¹ 까지 증가하였다. CT와는 달리 FT의 합성량은 12시간 동안 유지되었다. CaT의 합성 경향은 FT와 비슷하게 5시간에 42 mg l⁻¹까지 합성되었다. FT와 CaT는 대장균 배양액에서 배양시간동안 안정하였지만, CT는 그러지 못했다. 대장균 세포에서 어떠한 tyramine 유도체가 더 잘 축적되는지 알아보기 위해 tyramine 유도체의 합성 수준을 측정하였다(그림 3-8b). 전구체 유도 3시간 후, 세포에서 2 mg CT l⁻¹가 합성되었다. 하지만, 세포내의 CT합량은 5시간에 28 mg l⁻¹, 8시간에 42 mg l⁻¹, 12시간에 61mg l⁻¹로 증가하였다. 이는 배지에서 CT합량의 감소는 세포에서 CT합량의 증가와 밀접한 관련이 있다. 5시간 이후에 배지에 존재하

는 CT가 대장균 안으로 이동하여 12시간에는 대장균 안과 밖의 CT농도가 거의 동일하게 된다. CT와는 달리 FT나 CaT는 3시간 이후에 대장균에서 발견된다. 이후에 대장균 세포의 FT농도는 5 mg l^{-1} 정도 되고 이는 배양액의 1/25수준이다. 더욱이, CaT($<1 \text{ mg l}^{-1}$)는 세포에서 5시간 이후에 소량 발견된다. 이와 같이, tyramine 유도체는 대장균 배양액에 더 많이 축적되며, CT는 긴 배양시간에 대장균 세포 안과 밖의 농도가 비슷해진다. 마지막으로 안정되고 많은 양의 tyramine 유도체 합성은 THT와 4CL 유전자의 안정적 발현과 관련이 있는지 알아보기 위해 항원-항체 반응 분석을 하였다. 그림 5c에서 보듯이, THT와 4CL 유전자는 IPTG 유도 전에 발현되는데 이는 T7-lac promoter 조절하에 종종 발생한다. THT(28kD)와 4CL(61kD)의 발현은 IPTG 유도후에 안정적으로 발현된다. THT와 4CL보다 큰 1개 또는 2개의 비특이적 단백질이 발현된다. 4CL보다 작은 band는 4CL이 분해된 산물로 보인다. 이와같이 안정된 THT와 4CL 단백질의 발현은 대장균에서 안정된 tyramine 유도체의 발현과 밀접하게 관련되어 있다. 결론적으로, 대장균에서 THT와 4CL의 동시발현은 많은 양의 tyramine 유도체와 dopamine 유도체를 합성할 수 있게 한다. 이 연구의 가장 큰 성과는 CT, FT, CaT, CD, FD, CaD와 같은 tyramine 유도체와 dopamine 유도체를 동시에 발현할 수 있다는 것이다. 모든 tyramine 유도체와 dopamine 유도체는 대장균 배양액에 많이 존재하고 간단히 추출 및 정제 할 수 있다는 점에서 유용한 대사산물의 기능을 확인하는데 적용할 수 있다.

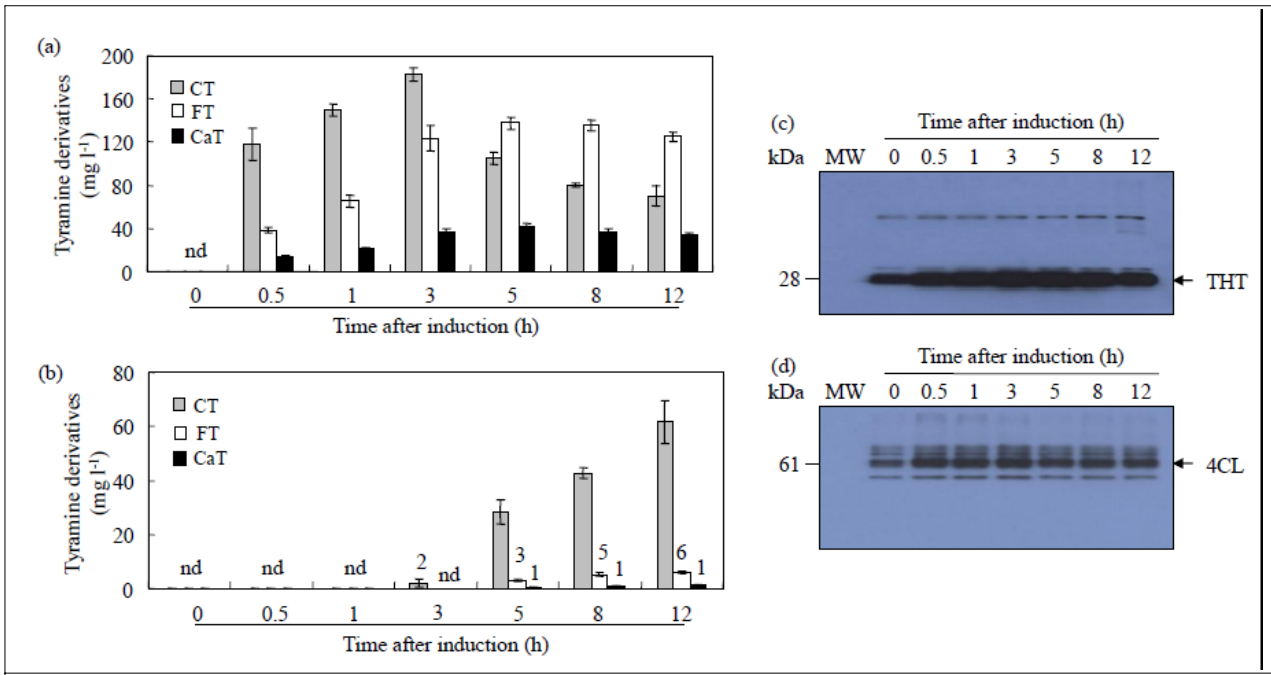


Fig. 3-8. Time-course analysis of the simultaneous production of tyramine derivatives in the media fraction (a) and cells (b) as well as immunoblot analysis of recombinant THT (c) and 4CL (d) proteins during the time courses. Experiments were the same as described in Fig. 2. Aliquots (5 ml) from the cultures were collected at the indicated time intervals (h) and subjected to SDS-PAGE. CT: 4-coumaroyltyramine; FT: feruloyltyramine; CaT: caffeoyltyramine; CD: 4-coumaroyldopamine; FD: feruloyldopamine; CaD: caffeoyldopamine. The data represent the mean \pm SD of duplicate experiments. nd: not detected.

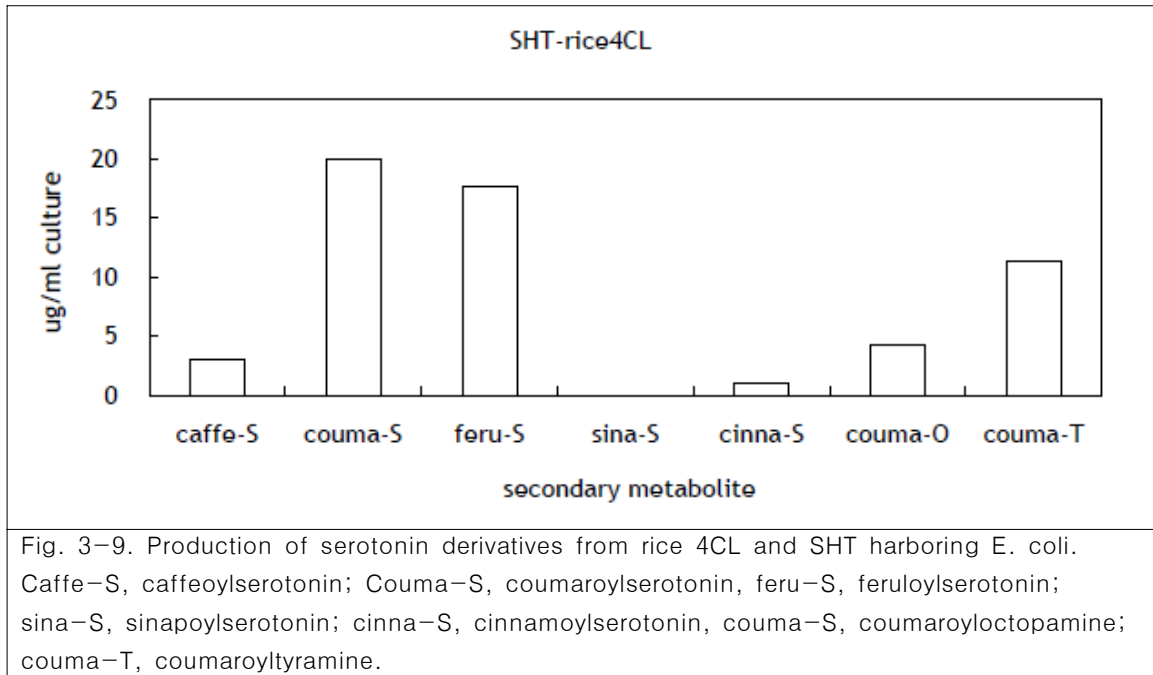
라. TDC와 T5H의 동시발현 대장균 발현 및 세로토닌 생합성

- 벼의 genome에서는 4개의 4CL 유전자가 존재함을 database (KOME) 로부터 확인하였다. 3개는 plasma membrane에 발현되는 것으로 보이고, 1개는 세포질에 발현되는 특징을 보임을 확인하였다. 막 단백질의 경우, 대장균에서 발현되지 못하는 특성이 비추어 세포질에서 발현되는 특성을 지닌, 559 아미노산 서열을 가진 4CL1 유전자를 선정하여 대장균에 발현하기로 하였다 (표 3-1).

Table 3-1. Types of 4Cl genes expressed in rice genome.

type	Accession No	Protein localization	aa length	amino acid sequences
4C11	AK068985	cytoplasm	559	MGSMAAAAEAAQEEETVFRSKLPDIEIPSHLTLQAYCFEKLPEVAARPCLDIGQTGAVYSYGEVEELSRRAAAGLRRLGVGKGDVMSLLRNCPEFAFTFLGAARLGAATTTANPFYTPHEIHRQASAAGARVIVTEACAWEKVRGFAADRGIPVVAVDGDFDGCVGFGEAMLDAASIEPLDADEEVHPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHRSLVTSVAQQVDGENPNLYFRREDVVLCLLPLFHIYSLNSVLLAGLRAGSAIVIMRKFDLGALVDLRRHGVTVPFVPPVIVVEIAKSPRVTADDLASIRVMMSGAAPMGKDLQDAFMAKIPNAVLGQGYGMTEAGPVLAMCLAFKEPFEVKS GSGCTVVRNAELKIVDPDTGATLGRNQSGEICIRGEQIMKGYLNDPESTKNTIDKGGWLHTGDIGYVDDDDIEFIVDRLEIKIYKGFQVPPAELEALLITHPDIKDAAVVPMIDEIAGEVPVAFVIRIEGSAISENEIKQFVAKEVVFYKRLNKVFFADSIKSPSGKILRKDLRAKLAAGIPTNDNTQLKS
4C12	AK120964	plasma membrane	539	MGSLPEQVFRSRLPDIAIPDHLPLHDYVFERLADRRGRACLIDGATGETLSFGDVALSRRVAAGLSSIGVCHGSTVMLLLPNSVEFAVAFLASSRLGAVTTTANPLHTPEIAKQVAASGATVVTEPAFVAVKVSGLAGVTVATGGGAERCASFAGLAAADGSALEVAIDVANDVALPYSSGTTGLPKGVMLSHRGLVTSVAQLVDGENPNLHREDDVVLVPMFHVYLSHSILLCGMRAGAAIVMCRFDTVKMLQLVERHGVTIAPLVPPVIVEMAKSDALDRHLLSSIRMVISGAAPMGKELQDIVHAKLPNAVLGQGYGMTEAGPVLSCMCAFAKEPTPVKSGACGTVVRNAELKIVDPDTGLSLPRNQSGEICIRGKQIMKGYLNNPEATEKTIDKDGWLHTGDIGFVDDDDIEFIVDRLEIKIYKGFQVAPAELEAMLIAHAAVADA AVVPMKDDSCGEIPVAFVVARDDGSGITDDEIKQYVAKQVVFYKRLHKIFFVDAIPKAPSGKILRKDLRAKLAAGIPAC
4C13	AK105636	"	569	MITVAAPEAQPQVAAVDEAPPEAVTVFRSKLPDIDIPSHLPLHEYCFARAAELPDAPCLIAAA TGRTYTFAETRLLCRRAAALHRLGVGHGDRVMVLLQNCVEFAVAFFAASFLGAVTTAANPFCTPQEIHKQFKASGVKILITQSVYVDKLRQHEAFPRIDACTVGD DTLTVITIDDDDEATPEGCLPFWDLIADADEGVSVEVAISPDDPVALPFSSGTTGLPKGVVLT HRSVSVGVAQQVDGENPNLHMGAGDVALCVLPLFHIFSLNSVLLCAVRAGAAVALMPRFEMGAMLGAIERWRVTVA AVVPPVLALAKNPVVERHDLSSIRIVLSGAAPLKGKELEDALRARLPQAIFGQGYGMTEAGPVLSCMCPAFAKEPTPAKSGSGCTVVRNAELKVDPDTGFSLGRNLPGEICIRGPOIMKGYLNDPEATAA TIDVEGWLHTGDIGYVDDDDIEFIVDRVLEIKIFKGFQVPPAELESLIIAHPSIADA AVVPOKDDVAGEVPVAFVRAADSDITEESIKEFISKQVVFYKRLHKVHFIHAIPKASGKILRRELRAKLAAC
4C14	AK067261	"	445	MGSMAAAAEAAQEEETVFRSKLPDIEIPSHLTLQAYCFEKLPEVAARPCLDIGQTGAVYSYGEVEELSRRAAAGLRRLGVGKGDVMSLLRNCPEFAFTFLGAARLGAATTTANPFYTPHEIHRQASAAGARVIVTEACAWEKVRGFAADRGIPVVAVDGDFDGCVGFGEAMLDAASIEPLDADEEVHPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHRSLVTSVAQQVDGENPNLYFRREDVVLCLLPLFHIYSLNSVLLAGLRAGSAIVIMRKFDLGALVDLRRHGVTVPFVPPVIVVEIAKSPRVTADDLASIRVMMSGAAPMGKDLQDAFMAKIPNAVLGQGYGMTEAGPVLAMCLAFKEPFEVKS GSGCTVVRNAELKIVDPDTGATLGRNQSGEICIRGEQIMKGSISLSFFPLHIIIGIISAKSIHHLPRVYGHASACTTT

- 1 mM phenolic compounds 와 1 mM serotonin을 처리한 pETDuet:4CL+SHT 대장균배양에서 다양한 세로토닌유도체 함량을 정량하여 본 결과(그림 3-9), coumaroylserotonin 함량이 20 mg/L 함량으로 최대용량으로 생산되었고, 다음으로 feruloylserotonin 이 17 mg/L, coumaroyltyramine이 11 mg/L, coumaroyloctopamine 이 4 mg/L, caffeoylserotonin 3 mg/L 순으로 생합성되었다. 전체적으로 볼때, 애기장대 4C12+SHT 유전자발현 보다, 10배 정도 세로토닌유도체 함량이 낮아졌음을 볼 때, 대장균에서 세로토닌 유도체 생합성을 위한 유전자로서는 애기장대 4C12가 가장 적합한 것임을 알 수 있었다.



- pCOLADuet-GST Δ 37T5H+TDC 발현 대장균에서 기질인 트립토판의 농도에 따른 TDC활성에 의한 트립타민의 함량과 트립타민을 이용한 T5H 활성에 의한 세로토닌 생성량을 조사하였다. IPTG농도는 0.5 mM을 사용하였고, 처리한 기질은 0, 0.5, 1, 2.4 mM tryptophan 이었다. 트립토판 농도가 높을수록 트립타민 생합성 정도는 지속적으로 증대되었으며(그림 3-10), 0 mM 처리에서 20 mg/L, 1 mM 처리에서 80 mg/L, 2 mM에서는 150 mg/L, 4 mM에서는 200 mg/L의 트립타민이 생성되었다. 이에 비해 세로토닌 생성량은 0, 0.5, 1 mM 각 각의 농도에 따라, 17, 23, 24 mg/L의 세로토닌이 생성되었으며, 2 및 4 mM 처리에서는 더 이상 세로토닌의 함량이 증대되지 않음을 알 수 있었다. 이 결과는 트립타민을 기질로 이용하여 세로토닌 화합물을 생합성하는 T5H 효소가 아마도 생성된 세로토닌에 의해 feedback 저해를 받음으로 생기는 결과가 아닌가 추정하고 있다.

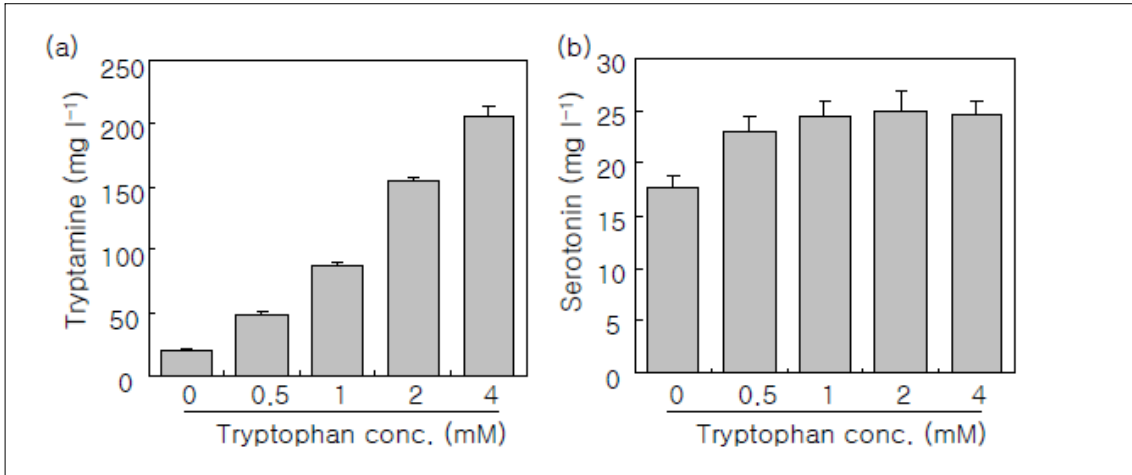


Fig. 3-10. Effects of tryptophan pCOLA-*GST*Δ37T5H+TDC on serotonin and tryptamine production in *E. coli*. Various concentrations of tryptophan were added and incubated for 24h at 20° C, and media fractions were subjected to HPLC analysis. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

- IPTG 농도에 따른 트립타민 및 세로토닌 생성량을 비교해 본 결과를 그림 3-11에 도시하였다. IPTG 농도가 0 mM 인 경우, 트립타민은 3 mg/L, 0.01 mM 에서는 66 mg/L, 0.05 mM 에서는 최고 값인 85 mg/L가 생성되었고, IPTG 농도가 0.5 mM 이상에서는 약간 감소하는 경향을 보여 주었다. 이에비해 세로토닌 생성량은 0 mM 처리에서는 세로토닌이 전혀 생성되지 않았고, 0.5 mM 농도에서 최고값인 24 mg/L 의 세로토닌이 생성되었다. 따라서 적정 IPTG 농도는 0.5 mM 이다.
- 적정 Induction 온도를 알고자, 0.5 mM IPTG, 1 mM 트립토판을 처리한 후, 다양한 온도 즉 37도, 28도, 및 20도에서 24시간 배양하여 보았다. 세로토닌 생성량은 28도, 및 37도에서는 전혀 생성되지 않았으며, 20도에서만 24 mg/L의 세로토닌이 생산되었다(그림 3-12). 온도별 트립타민의 함량은 37도에서 4 mg, 28도에서 45 mg, 20도에서는 88 mg의 트립타민이 생성되어, 두 화합물 모두 20도에서 최대한의 트립타민과 세로토닌이 생성되었다.
- 대장균 배양시 에탄올 처리가 heat shock 단백질의 발현을 증대시켜, 이중 단백질의 용해도와 발현을 증대한다는 보고가 있다. 따라서 induction 시 IPTG 0.5 mM과, 다양한 농도의 에탄올을 첨가하여 세로토닌 함량을 측정하였다. 에탄올 농도가 0.5% 이상 처리시에 세로토닌 함량이 에탄올을 처리하지 않은 것에 비해 20% 정도 높은 세로토닌 함량을 보여주었다(그림 3-13). 그러나 트립타민의 경우 에탄올 처리 시 감소하는 경향을 보여 주었다. 에탄올 처리에 의한 세로토닌의 증대와 트립타민의 감소는 soluble T5H 와 TDC 함량과 값은 관련이 있음을 immunoblot 분석 결과 정확하게 나타내어, 에탄올 처리가 T5H 효소의 solubility와 관련이 있음을 알 수 있었다.

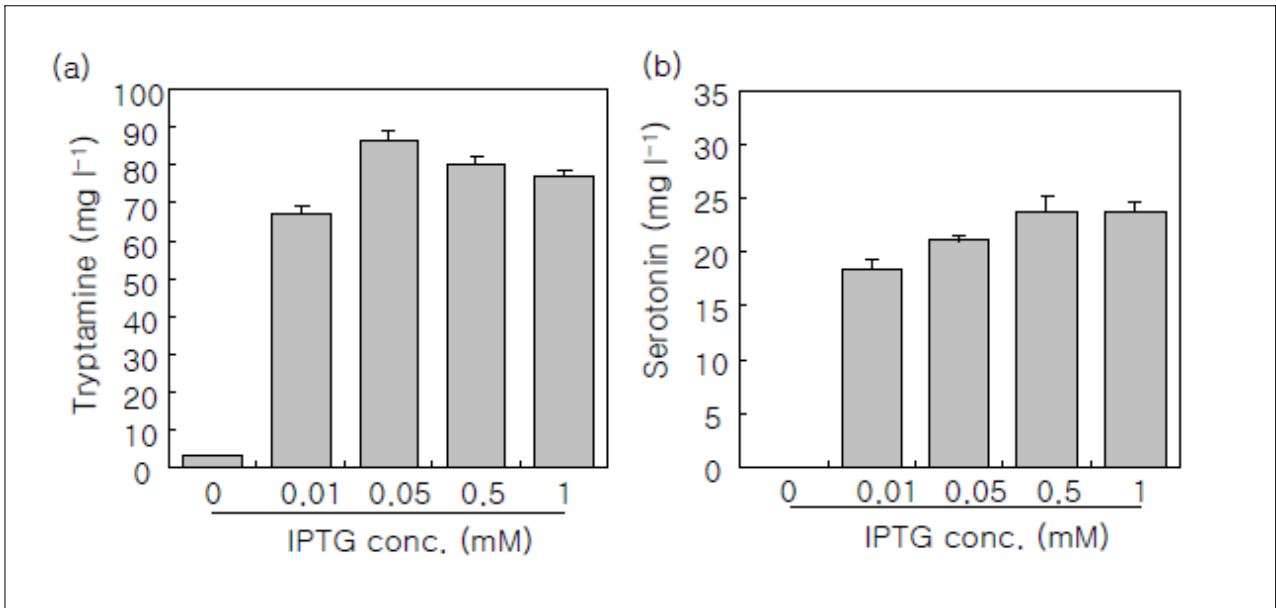


Fig. 3-11. IPTG dose response of pCOLA-GSTΔ37T5H+TDC in *E.coli*.

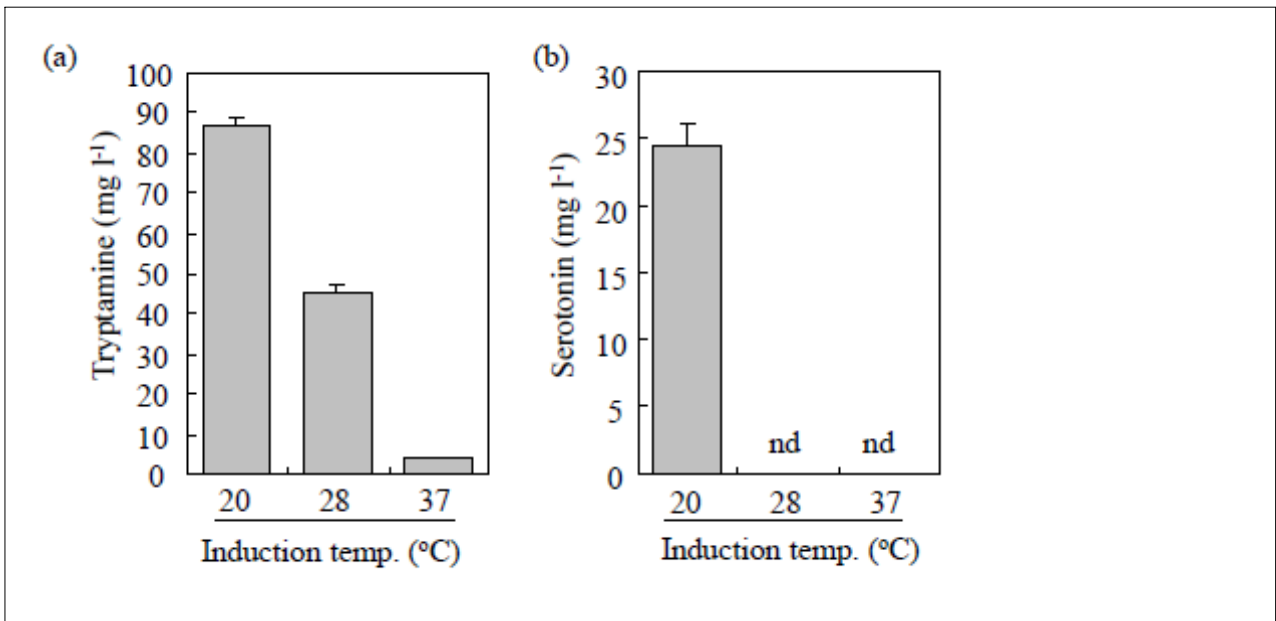


Fig. 3-12. Temperature-dependent expression of pCOLA-GSTΔ37T5H+TDC in *E.coli* in which the production of tryptamine(a) and (b) serotonin were measured.

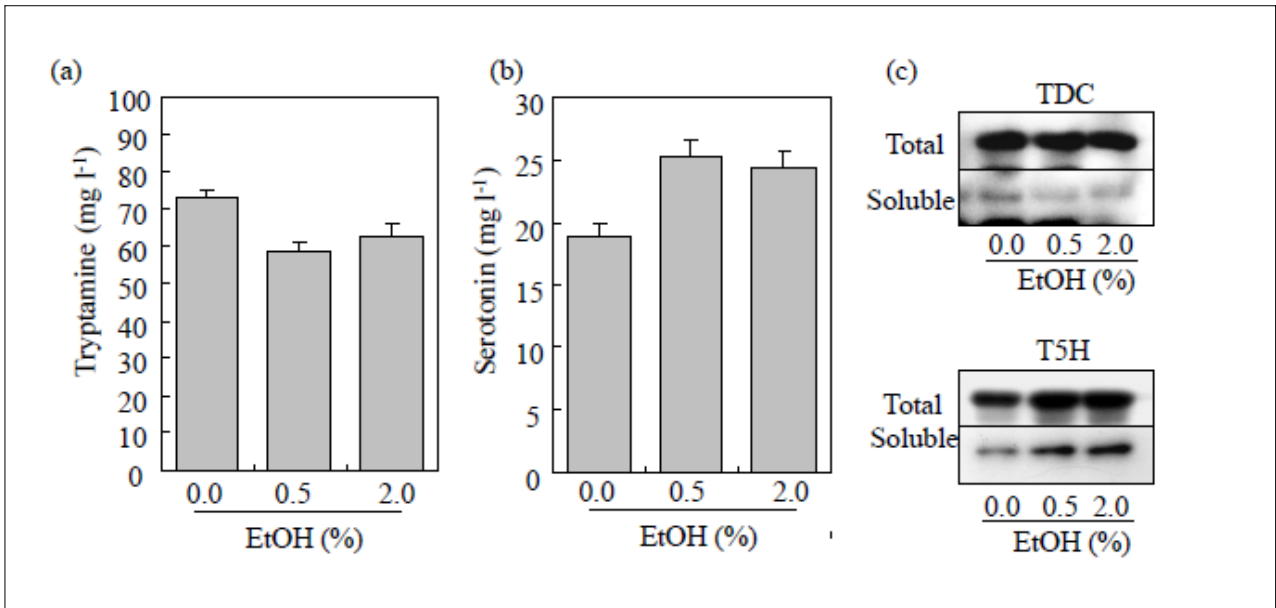


Fig. 3-13. Effects of ethanol pCOLA-*GST* Δ 37*T5H*+*TDC* on the production of tryptamine(a) and (b) serotonin in *E.coli*. Soluble protein extracts(20mg) were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis (c). GST and rice TDC polyclonal antibodies were used for GST- Δ T5H and TDC protein detection.

- 시간별에 따른 세로토닌 생성 분포를 조사하기 위해, 0.5 mM IPTG, 1 mM 트립토판, 및 2% 에탄올을 처리하여, 48시간동안 20도에서 배양하였다. 시간별로 대장균 세포와 배양액을 분리하여, 트립토판과 세로토닌 함량을 조사하였다(그림 3-14). 세로토닌 함량이 배양액에서 12시간 후 1.8 mg/L, 24시간에 최고 수치인 24 mg/L 가 생성되었고, 48시간에도 같은 수치의 24 mg/L의 세로토닌이 생성되어 24 시간 이후 부터 함량이 증대되지 않음을 볼 수 있었다. 반면 트립타민은 12 시간에 86 mg이 생성되어 세로토닌 보다 3.4 배 높았다. 세로토닌 생성량과 재조합 단백질의 발현율을 immunoblot 분석하여 본 결과, 정의 상관 관계가 있음을 확인 하였으며, 특히 insoluble 함량은 TDC 및 T5H 모두 높은 반면, soluble 단백질 발현량은 비교적 적음을 볼때, 세로토닌 생성량 증대는 이들 단백질의 solubility을 증대하는 것이 관건이 됨을 보여 준다. 배양액과 달리, 대장균 세포내에서는 4 mg, 및 22 mg의 세로토닌 및 트립타민이 생성되어 각 각 배양액의 농도에 비해 6 및 4배 낮은 농도가 대장균 세포에서 생성되었다. 이는 TDC 및 T5H 단백질에 의해 생성되는 트립타민 과 세로토닌이 세포막 밖으로 배출되는 특성을 보여 주었다.
- 정제된 효소를 이용한 세로토닌유도체를 생합성하는 방법과 대장균을 이용한 방법과의 비교 연구는 추후 심도있게 연구할 필요가 있다고 생각된다. 정제한 두 개의 효소 SHT 및 4CL 효소의 효율성, 안정성, 고정화, 및 연속공정 가능성 여부 등 다양한 비교 연구가 추후 수행되어야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

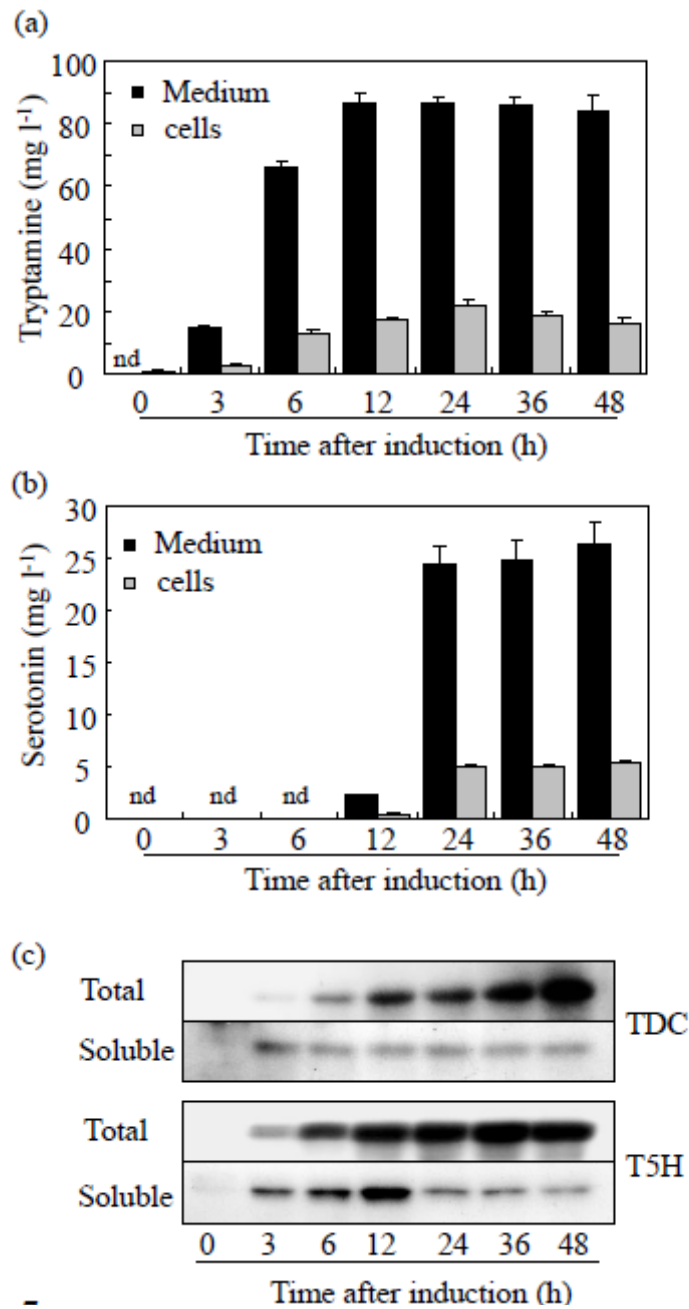


Fig. 3-14. Time-course analysis of pCOLA-*GSTΔ37T5H+TDC* for tryptamine(a) and serotonin(b) production in media fractions and cells as well as an immunoblot analysis(c).

제 2 절 세로토닌유도체의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능분석

1. 서 설

- 유럽과 미국의 기능성 화장품의 시장 규모는 2003년 14.9 백만 달러에서 2008년 18.4 백만 달러로 약 24% 성장하였다. 특히, 피부 관리에 관한 시장 규모는 42% 가량으로 피부 관리에 관한 시장이 매우 큰 규모를 차지함을 알 수 있다. 또한 기능성 화장품을 사용하는 사람들의 92.7%가 피부 노화나 문제의 예방을 위해 사용한다는 것이다 (Decision News, 2008).
- 전 세계 화장품 마켓의 42%는 유럽이, 30%는 미국이 차지하고 있으며, 아시아가 26%의 시장 규모를 가지고 있다.
- 국내의 화장품 시장 규모는 5조8천억 원에 이르고 있으며, 정밀화학 산업 중에는 의약품 산업 다음으로 거대한 시장을 형성하고 있으며, 기능성 화장품의 경우 전체 화장품 시장 규모와 비교해 약 14% 정도를 차지하고 있다. 특히, 중국을 비롯한 동남아시아, 동유럽, 중안미 등의 화장품 시장 활성화는 기능성 화장품 시장을 더욱 확대 발전시킬 것으로 보인다.
- 최근 식약청에 승인받은 기능성 화장품은 전년 대비 약 47%로 급격한 증가율을 보이고 있으며, 주름 방지, 미백, 자외선 차단 및 수분 보습 분야에 집중되어 있다.
- Functional cosmetics나 nutraceuticals 등은 의약품 개발보다 투자가 적게 드는 반면 쉽게 산업화가 가능하여 전세계적으로 이들 분야의 여구가 매우 활발히 진행되고 있다.
- 기능성 제품을 개발의 원천 소스로 가장 많이 연구되고 있는 것은 천연식물이다. 천연 식물에는 다양한 기능을 하는 polyphenol 성분이나, carotinoids, alkaloids, saponins, vitamins, quinones, 등이 다량 함유되어 있어, 기능성 제품의 보고라고 할 수 있다.
- 기능성 제품을 개발하기 위해서는 biomaterial의 개발, 생체 내 효능 검증, 물질의 안전성 및 stability 등이 고려되어야 한다. 이러한 측면에서 생체 내에 존재하는 바이오아민 유도체는 바이오아민의 생리활성과 비교를 통해 작용 기전에 대한 분석이 용이하고, 차별성과 특이성을 분석하는데 장점이 있다.
- 식물로부터 추출하거나 분리한 물질을 이용한 고부가 가치 기능성 화장 소재 개발이 국내외적으로 활발히 연구되고 있는데, 그 중 하나가 적포도주에서 추출한 레스베라트롤 이다. 이 물질에 대한 다양한 생리활성이 분석되어 있으며, 유명 화장품 회사에 의해 기능성 화장품 첨가제로도 이용되고 있다. 그러나 이 물질의 단점은 뛰어난 효능에도 불구하고 stability에 문제가 있는 것으로 알려져 있다.
- 본 연구자는 레스베라트롤과 비교할 만한 항산화 활성 및 피부 세포 성장 효능을 보이는 caffeoylserotonin (CaS)를 화학 합성하여 생리현상을 분석하였다 (아래 선행 연구 결과 참고). 그 결과 다양한 피부 세포를 이용하여 생리활성을 다각도로 분석 한다면 고부가 가치 기능성 소재 및 화장품 소재를 개발 할 수 있을 것으로 기대된다.
- Caffeoyl 유도체에 관한 연구는 아직 초기 단계로서 caffeic acid는 과일과 야채, 허브, 커피 등에

함유되어 있는 페놀성 물질 중의 하나이다. Caffeic acid는 항암활성이 있는 것으로 알려져 있으며, *in vitro* 및 *in vivo*에서 항산화 활성을 나타내고 있다. 식물체내에서 caffeic acid는 caffeoyl-CoA 형태로 활성화 되며 다양한 biogenic amine들과 결합하여 2차대사 산물을 생성한다. 현재까지 보고되고 있는 caffeoyl 유도체들로는 N-caffeoyltyramine, ccaffeoyl glycosides, caffeoyl quinic acid 등이 보고되고 있다 (Park and Schoene, 2003; Zhu et al., 2008).

- 식물체에서 발견되는 caffeoyl 유도체는 caffeoyltyramine, caffeoyldopamine, caffeoylserotonin, caffeoyltryptamine, caffeoylphenethylamine 등이 있다. 그러나 이들 물질의 생리활성에 관한 연구는 아직 활발히 이뤄지고 있지 않은 초보 상태로 생리활성을 구명할 필요성이 매우 높으며, 이들 물질의 기능성을 구명함으로써 고부가 가치 기능성 식의약 소재를 발굴할 수가 있다.
- 바이오아민과 결합되어 있는 caffeoyl 유도체 가운데 가장 연구가 많이 되어 있는 것이 caffeoyltyramine과 caffeoyldopamine으로 2009.2월 현재 총 13편의 논문이 발표되어 있다. 그 중 생리활성에 관한 논문은 6-7편으로 연구가 거의 되어 있지 않은 상태이다.
- Caffeoyldopamine의 밝혀진 주요 생리활성으로는 P-selectin의 발현을 억제함으로써 COX 유전자의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Park, 2008a). Caffeoyltyramine의 경우 U937 세포와 Jurkat 세포에서 단백질 tyrosine 인산화 과정을 저해함으로써 암세포 사멸을 유도한다는 보고가 있다 (Park and Schoene, 2003). 또한 caffeoylserotonin과 caffeoyltryptamine은 신장상피세포의 5-HT1 수용체를 통한 cAMP의 생성을 억제하는 활성이 있으며, 이는 caffeoylserotonin과 caffeoyltryptamine이 5-HT1 수용체를 활성화 시킬 수 있거나 억제시키는 물질로 작용한다고 보고하고 있다 (Park, 2008b).
- 피부 세포와 관련하여서는 caffeoyltyramine이 tyrosinase의 활성을 억제하여 melanin 생성을 저해하는 미백 효능에 관한 보고가 있다 (Okombi et al., 2006). 이상의 caffeoyl 유도체에 관한 연구를 표 1에 정리하였다.
- 본 연구자는 일상적으로 섭취하는 농식품 가운데 이들 바이오아민과 바이오아민 유도체의 함량을 HPLC 방법으로 분석하여 결과를 국제 학술지에 발표 하였다 (Ly et al., 2008). 10종의 농산물-고추, 파프리카, 토마토, 미니토마토, 파, 상추, 배추, 치커리, 시금치, 딸기-을 분석한 결과 고추와 토마토에서 바이오아민의 함량이 매우 높게 나타났으며, coumaroylserotonin, feruloylserotonin 등의 바이오아민 유도체를 검출하였다. 이들 유도체는 홍화씨 등 약용작물에서 보고된바 있으나, 농산물에서 보고된 바는 없다.
- 이러한 연구 결과로부터 바이오아민 유도체를 합성하여 생리활성을 분석하는 것은 국민 건강 뿐만 아니라, 기능성 의약품 소재 개발에 크게 기여 할 것으로 기대된다.

2. 연구 수행 방법

가. 세포배양

HaCaT 세포를 10% Fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin/ streptomycin이 포함

된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 1×10^6 /mL 의 농도로 배양하고 세포 밀도가 90% 이상이 되었을 때 계대 배양 및 실험하였다. 이때 배양조건은 37°C, 5% CO₂를 유지하였다.

나. 세포성장분석

96 well plate에 HaCaT 세포를 well당 9×10^3 으로 세포를 분주하여 24시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 배지에 다양한 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 시료가 처리된 배지를 제거하고 0.5 mM H₂O₂를 한 시간 동안 처리한다. XTT용액과 PMS 혼합액(50:1)을 배지의 1/5 volume 처리하고 3시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하여 ELISA reader를 이용하여 450nm 와 690nm 에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{세포성장율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군}(450\text{nm} - 690\text{nm})}{\text{무첨가군}(450\text{nm} - 690\text{nm})} \times 100$$

다. 세포내 ROS (Reactive Oxygen Species) 생성 측정

96 well plate에 HaCaT 세포를 well당 9×10^3 으로 세포를 분주하여 24시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 배지에 다양한 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 PBS buffer로 세척한 후 100 uM DCF-DA(in media)를 30분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후, DCF-DA를 제거하고 HBS buffer로 washing 한 후 0.5 mM H₂O₂ (in HBS)를 처리하고 0h과 1h에서의 fluorescence 값 (485nm/530nm, ex/em)을 측정한다. Increased ROS(%)=(1h-0h)/0h x 100

라. 지질과산화 분석

24 well plate에 HaCaT cell을 1×10^5 /well로 세포를 분주하여 24시간동안 CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 배지를 제거하고 PBS buffer로 washing 한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 시료가 처리된 배지를 제거하고 난 후 PBS buffer로 세척한 후 0.5 mM H₂O₂를 한 시간 동안 처리한다. 배지를 제거하고 640 ul TBA 혼합액(100 ul homogenate buffer (pH 7.4), 40 ul 8.1% SDS, 300 ul 20% acetic acid (pH 3.5), 200 ul 1.2% TBA (pH 3.5))를 처리하여 60°C water bath에서 1h 동안 반응시킨 후 곧바로 ice에서 10분간 cooling 시킨다. 400 ul의 반응액을 동일 volume의 n-butanol : pyridine(15:1)과 섞어서 vortexing 후 400 X g 에서 10분간 centrifuge 하고 상등액 200 ul를 96 well plate에 옮겨서 fluorescence (530nm/590nm or 515nm/553nm, ex/em) 를 측정한다.

마. RNA 발현 분석

6 well plate에 HaCaT cell을 5×10^5 /well로 세포를 분주하여 24시간동안 CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 배지

에서 48시간 배양하여 Cell Cycle을 Arrest시킨다. 시료(in FBS가 들어있지 않은 DMEM)를 처리하고 시간 별(10, 20, 30, 60min, 3, 6, 12, 24hr)로 세포를 harvest하여 TRIzol reagent를 사용하여 RNA를 추출하였다. 20~100ng RNA를 사용하여 RT-PCR을 통해 특정 유전자의 mRNA 발현 정도를 분석하였다.

바. 단백질 발현 분석

100mm plate에 HaCaT cell을 7×10^6 /well로 세포를 분주하여 24시간동안 CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 배지를 제거하고 FBS가 포함되지 않은 배지에서 48시간 배양하여 Cell Cycle을 Arrest시킨다. 시료(in FBS가 들어있지 않은 DMEM)를 처리하고 시간 별(10, 20, 30, 60min, 3, 6, 12, 24hr)로 세포를 harvest하였다.

사. 항산화 물질이 피부세포에서 단백질의 carbonylation에 미치는 영향

피부세포를 6well plate에 5×10^5 split한 후 12-16h 동안 attachment 시킨 후 무혈청 DMEM으로 배지를 바꾸어주고, 10uM의 antioxidant 들을 24시간 처리한다. 그 후 w/o DMEM으로 배지를 한 번 더 바꾸어주고, 0.5mM H₂O₂를 처리하여 4시간동안 incubation을 시킨다. 반응이 끝나면 세포를 harvesting하고, protease inhibitor가 첨가된 lysis buffer 50 ul를 첨가하여, 10초씩 총 4번의 sonication으로 세포를 깨고, protein을 분리해내어, lysate 5 ul와 12%SDS 5 ul를 서로 섞어준다. 여기에 1X DNPH를 첨가하여, 15분 동안 실온에서 반응시킨 후 neutralization 용액 7.5 ul를 첨가하여 반응을 멈추게 한다. 이렇게 하여 얻어진 샘플을 10%, 1.0mm SDS-PAGE 하고, 130 mA, 4 h 동안 membrane에 transfer한 후 1% BSA에서 1시간 동안 blocking 시켜준다. 이 membrane을 Oxyblot protein oxidation detection kit (Millipore, S7150, CA92590)으로 분석하였다.

아. 산화적 스트레스에 의한 H2AX 단백질 인산화에 미치는 영향

HaCaT 세포는 10% FBS가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 키운다. 대략, 6well plate에 5×10^5 split한 후 12-16hr 동안 attachment 시킨 후 무혈청 DMEM으로 배지를 바꾸어주고, 10uM의 antioxidants 들을 4시간 처리한다. 그 후 무혈청 DMEM으로 배지를 한 번 더 바꾸어주고, 0.5 mM H₂O₂를 처리하여 30분 동안 incubation을 시킨다. 반응이 끝나면 세포를 harvesting하고, protease inhibitor가 첨가된 lysis buffer 50ul를 첨가하여, 10초씩 총 4번의 sonication으로 세포를 깨고, protein을 분리해낸다. 단백질을 12%, 1.0mm SDS-PAGE 하고, 130mA, 3hr 동안 membrane에 transfer한 후 1%BSA에서 1시간 동안 blocking 시켜준다. 이 membrane을 Rabbit-anti-pH2A(Ser139) IgG Ab (5%BSA에 1:1000으로 희석, cell signaling, #2577)로, overnight incubation한 후, Goat-anti-rabbit (1:5000, diluted in TBST) IgG, 1시간 동안 incubation한 후 ECL 용액으로 detection 한다.

자. 산화적스트레스로 인한 세포 내 단백질 인산화 분석

HaCaT 세포는 10% FBS가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 키운다. 대략, 6well plate에 5×10^5 split한 후 12-16hr 동안 attachment 시킨 후 무혈청 DMEM으로 배지를 바꾸어주고, 10 uM의 antioxidants 들을 24시간 처리한다. 그 후 무혈청 DMEM으로 배지를 한 번 더 바꾸어주고, 1 mM H₂O₂를 처리하여 4시간동안 incubation을 시킨다. 반응이 끝나면 세포를 harvesting하고, protease inhibitor가 첨가된 lysis buffer 50 ul를 첨가하여, 10초씩 총 4번의 sonication으로 세포를 깨고, protein을 분리해낸다. 단백질을 10%, 1.0 mm SDS-PAGE 하고, 130 mA, 4hr 동안 membrane에 transfer한 후 1%BSA에서 1시간 동안 blocking 시켜준다. 이 membrane을 Mouse monoclonal anti-Phospho-Tyr IgG2b Ab (1:500, SC508), Mouse monoclonal anti-Phospho-Ser IgM Ab (1:200, Calbiochem 525280,USA), Mouse monoclonal anti-phospho-Thr IgG Ab (1:200, Calb 52586, CD)로, overnight incubation한 후, Bovine-anti-mouse IgG-HRP (1:5000, SC2386), Goat-anti-mouse IgM-HRP (1:5000, SC2973) 1 시간 동안 incubation한 후 ECL 용액으로 detection 한다.

차. Invasion assay

Matrigel이 코팅된 24 well (BD사)에 2.5×10^4 cells을 split 한 후 무혈청 PRMI 배지에서 22-24 시간 배양한다. 이 때 CaS를 농도별로 첨가하여 배양하고 배양이 완료되면 well과 inset 의 배지를 제거한 후 메탄올로 2분간 고정한다. 고정이 끝난 후 hematoxylin을 넣고 2-5분산 염색한 후 DW로 세척한다. 세척이 완료되면 membrane을 물기가 없도록 건조시키고 slide glass 위에 놓고 mounting 한 후 현미경으로 세포수를 counting 한다.

카. Migration assay

Migration을 관찰하는 24 well plate (Corning 사)에 THP-1 세포를 2.5×10^4 cells을 split 한 후 다양한 농도의 CaS를 처리한 후 22-24시간 배양한다. 배양이 종료된 후 배지를 제거하고 메탄올로 고정한 후 hematoxylin으로 2-5분간 염색한다. 염색 후 DW로 세척하고 membrane은 건조시킨 후 현미경으로 세포수를 관찰한다.

타. 세포주기 FACS 분석

세포를 60 mm dish에 1×10^5 cell/plate가 되도록 분주한 후 37, 5% CO₂조건에서 24시간 전 배양후, 원하는 Drug을 FBS가 함유되지 않은 Basal media와 함께 분배양을 한다. 배양이 끝난 세포는 PBS와 Trypsinization step을 거쳐 수확 후 70% EtOH로 fixation시킨다. Fixation이 끝난 세포는 PBS로 여러 번 washing한 다음, propidium iodide (PI, 5 mg/ml) solution으로 염색 후, FACS (AB, Attune acoustic focusing cytometer, USA)에 로딩하여 세포주기를 분석한다.

3. 연구 수행 결과

가. 세로토닌 전구체가 사람 피부세포 성장에 미치는 영향 분석

HaCaT 세포에서 CS, CaS, FS, SR을 처리한 결과 SR는 5 - 80 uM 농도 내에서 세포생장에 영향을 미치지 않았으며 SR을 제외한 나머지 시료는 40 uM부터 toxicity를 보였다.

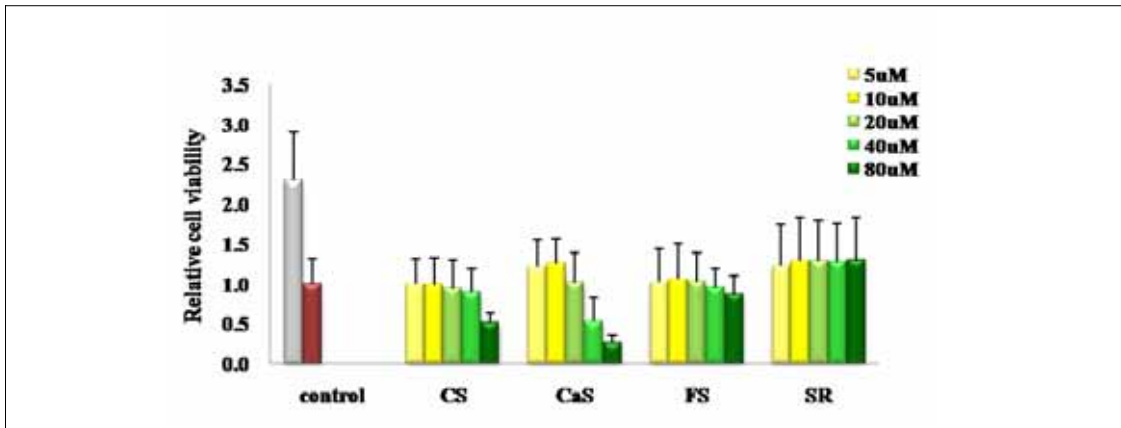


Fig. 3-15 세로토닌 전구체가 세포생장에 미치는 영향
(control : gray; complete media, red; with out serum media)

나. 산화적 스트레스로부터 피부세포 보호하는 항산화 활성 분석

산화적 스트레스로부터 피부세포 보호 활성 분석을 위해 세로토닌 전구체들을 처리 24시간 후 0.5 mM H₂O₂를 1시간 처리하여 XTT assay를 통하여 세포 성장을 측정 한 결과 H₂O₂를 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 약 40%정도의 Toxicity를 보였으며 CS, CaS, FS 5-20 uM 농도에서 항산화효과를 보였다. 특히 CaS에서 그 효과가 뛰어났으며 SR에서는 항산화 효과가 미미했다.

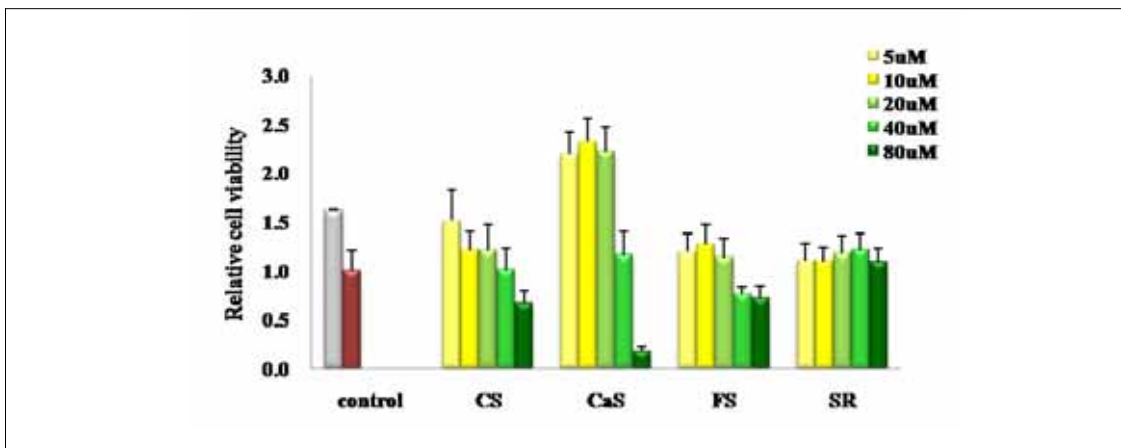
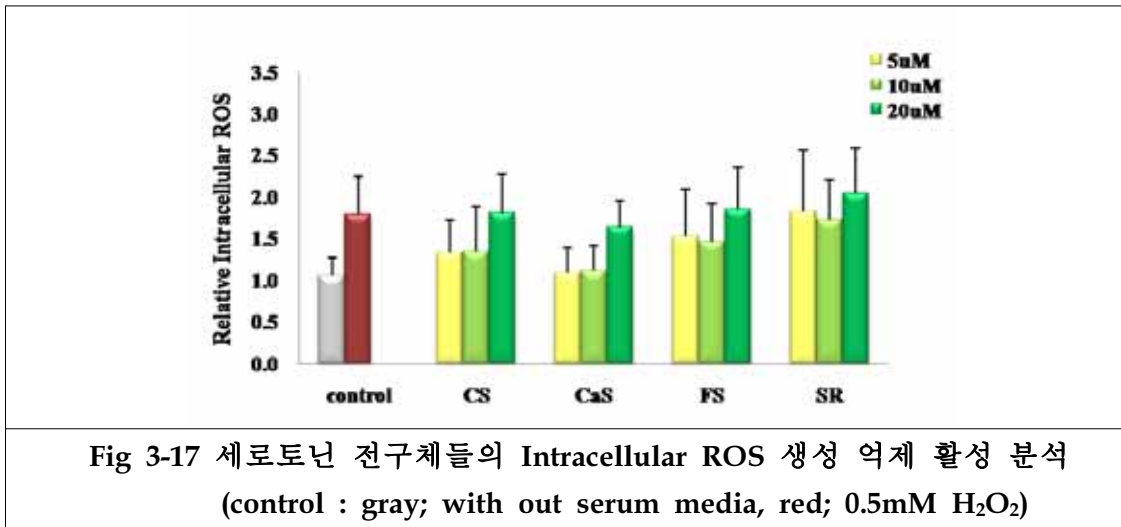


Fig. 3-16 세로토닌 전구체들의 산화적 스트레스로부터 피부세포 보호활성 분석
(control : gray; with out serum media, red; 0.5mM H₂O₂)

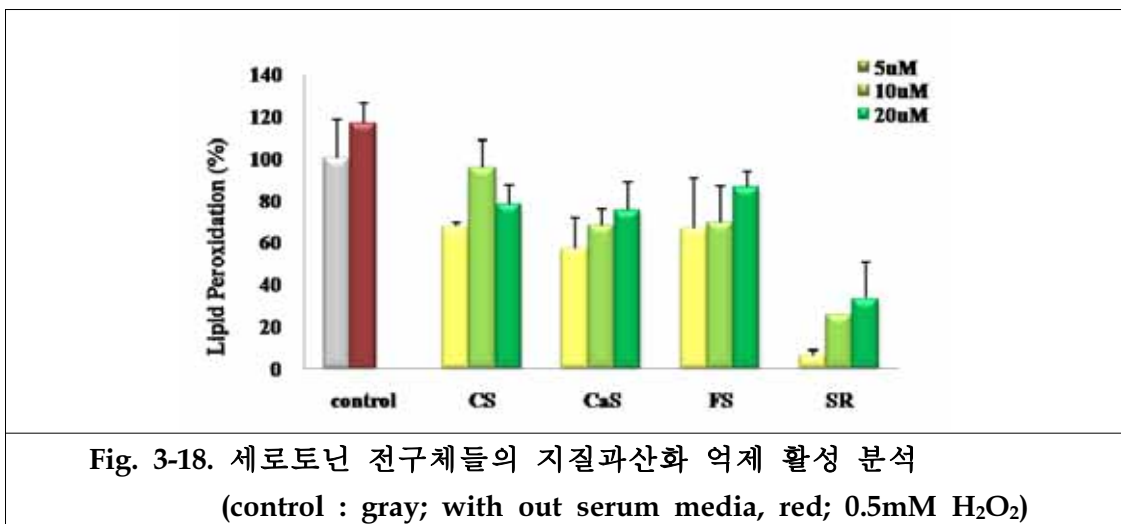
다. 세포내 유해산소(ROS) 생성 억제 활성 분석

세로토닌 전구체에 의한 세포내 유해산소 생성 억제 활성 분석 결과 산화적 스트레스 상태에서 대조군과 비교하였을 때 약 1.7배 정도 세포 내 유해산소의 생성을 보였으며 세로토닌 전구체 CS, CaS, FS 를 미리 처리한 세포에서는 유해산소 생성이 억제됨을 확인하였다. CS, CaS, FS 5, 10 uM에서 그 효과가 뛰어났으며 SR에서는 유해산소생성 억제 효과를 확인할 수 없었다.



라. 지질과산화 억제 활성 분석

세로토닌 전구체에 의한 세포 내 지질과산화 수준 억제 활성 분석 결과 산화적 스트레스 상태에서 대조군과 비교하였을 때 약 1.2배 정도 세포 내 지질과산화 수준을 증가 시키는 것으로 보였으며 세로토닌 전구체 CS, CaS, FS, SR를 미리 처리한 세포에서는 지질과산화 수준 증가가 억제됨을 확인하였다. 모든 세로토닌 전구체에서 그 효과가 뛰어났지만 특히 SR에서 지질과산화 수준을 억제하는 효과가 탁월하였다.



마. CaS 의 세포 성장 촉진 활성 분석

CaS는 세포생장에 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 5, 10 uM 농도에서 세포 성장을 촉진하는 것을 볼 수 있다. 따라서 CaS가 세포 성장을 어떠한 경로를 통하여 촉진시키는 지 세포 내의 변화를 분석해보았다.

(1) 세포생장을 유도하는 유전자의 mRNA 레벨에서의 발현 분석

Serum이 포함되어있지 않은 배지에서 세포를 배양하여 cell cycle을 arrest 시킨 다음 10 uM의 CaS를 시간 별로 처리한 결과 growth factor에 반응하는 유전자로 잘 알려진 c - fos , c-myc와 cell cycle을 다시 활성화하여 세포 성장을 유도하는 cyclin D1의 발현이 upregulation 되는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였다. CaS를 처리 후 10분부터 유전자들이 발현되는 것을 확인 할 수 있었으며 720분(12시간)이후 부터는 발현이 감소되는 경향을 보였다.

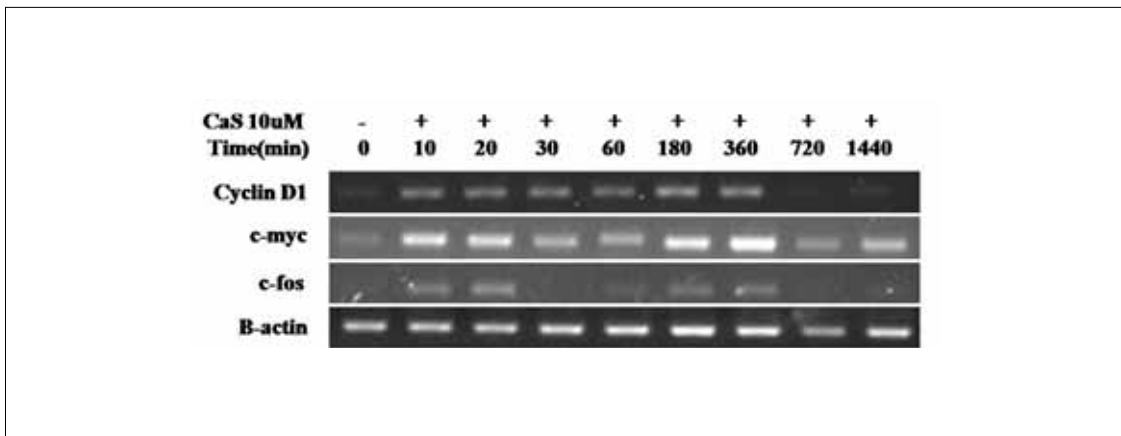


Fig. 3-19. RT-PCR을 통한 CaS 의 세포 성장 촉진 활성 분석

(2) 세포생장을 유도하는 cyclin D1의 단백질 레벨에서의 발현분석

Serum이 포함되어있지 않은 배지에서 세포를 배양하여 cell cycle을 arrest 시킨 다음 10 uM CaS를 시간 별로 처리한 결과 cyclin D1이 처리 후 10분부터 발현이 됨을 western blot 방법을 통해 확인 할 수 있었으며 1440분(24시간)에서는 발현이 되지 않았다. RT-PCR 결과와 비교하였을 때 일치되는 결과임을 확인할 수 있었다.

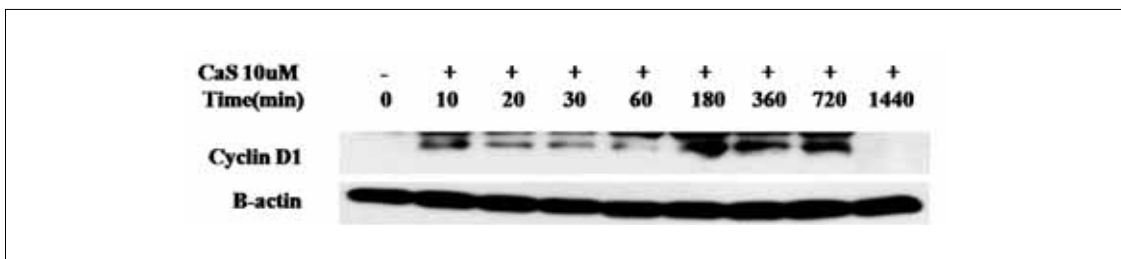
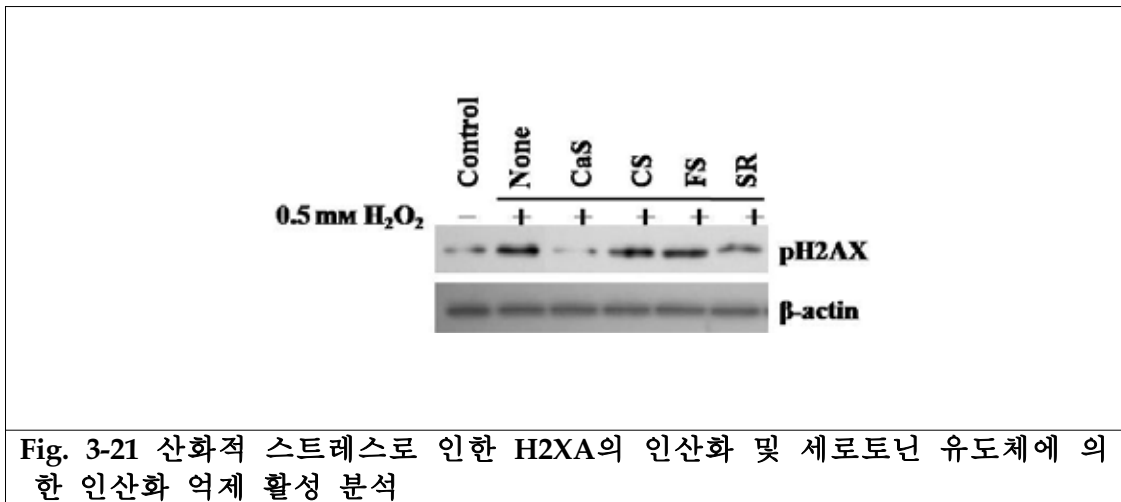


Fig. 3-20. western blot 방법을 통한 CaS 의 세포 성장 촉진 활성 분석

바. 세로토닌 전구체의 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 방어 활성 분석

HaCaT 세포에서 0.5 mM H₂O₂를 1시간 처리하면 산화적 스트레스를 가하면 double strand DNA break이 발생한다. 이 때 10 uM의 CS, CaS, FS, SR을 4시간 처리하고 0.5 mM H₂O₂를 1시간 처리하여 DNA손상에 대한 보호 활성을 세로토닌 유도체가 보이는 지 분석하였다. DNA double strand break이 일어나면 그 주변에 histone H2AX 단백질의 인산화가 일어나므로 이들 단백질의 인산화 정도를 통해 DNA double strand break 생성 여부와 세로토닌 유도체의 보호 활성을 분석할 수 있다. 분석 결과 CaS는 과산화수소에 의해 유도되는 H2AX 단백질의 인산화를 효과적으로 억제시킴을 알 수 있었으며, CS와 FS는 활성을 보이지 않았고 SR은 약하게 인산화를 억제 하였다.



사. 산화적 스트레스로 인한 단백질 carbonylation 분석 및 세로토닌 유도체의 활성 분석

산화적 스트레스를 가한 피부세포는 세포내 단백질의 carbonylation이 증가하게 된다. 세로토닌보호 활성 분석을 위해 10 uM의 CS, CaS, FS, SR을 4시간 처리하고 0.5 mM H₂O₂를 1시간 처리하여 세포 내 단백질의 carbonylation 양상을 분석하였다. 0.5 mM H₂O₂을 처리하면 단백질의 carbonylation이 증가하였으며, FS와 SR는 carbonylation을 억제하는 효능을 보였으나, CaS는 약하게, CS는 전혀 carbonylation을 억제하지 않았다. 이상의 연구 내용을 Biological & Pharmaceutical Bulletin에 투고하였으며, 현재 review 중이다.

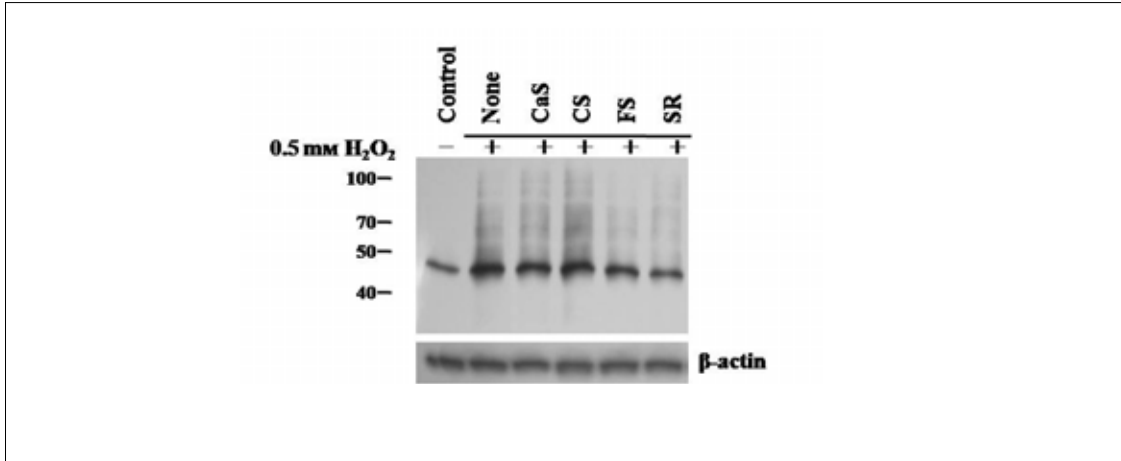
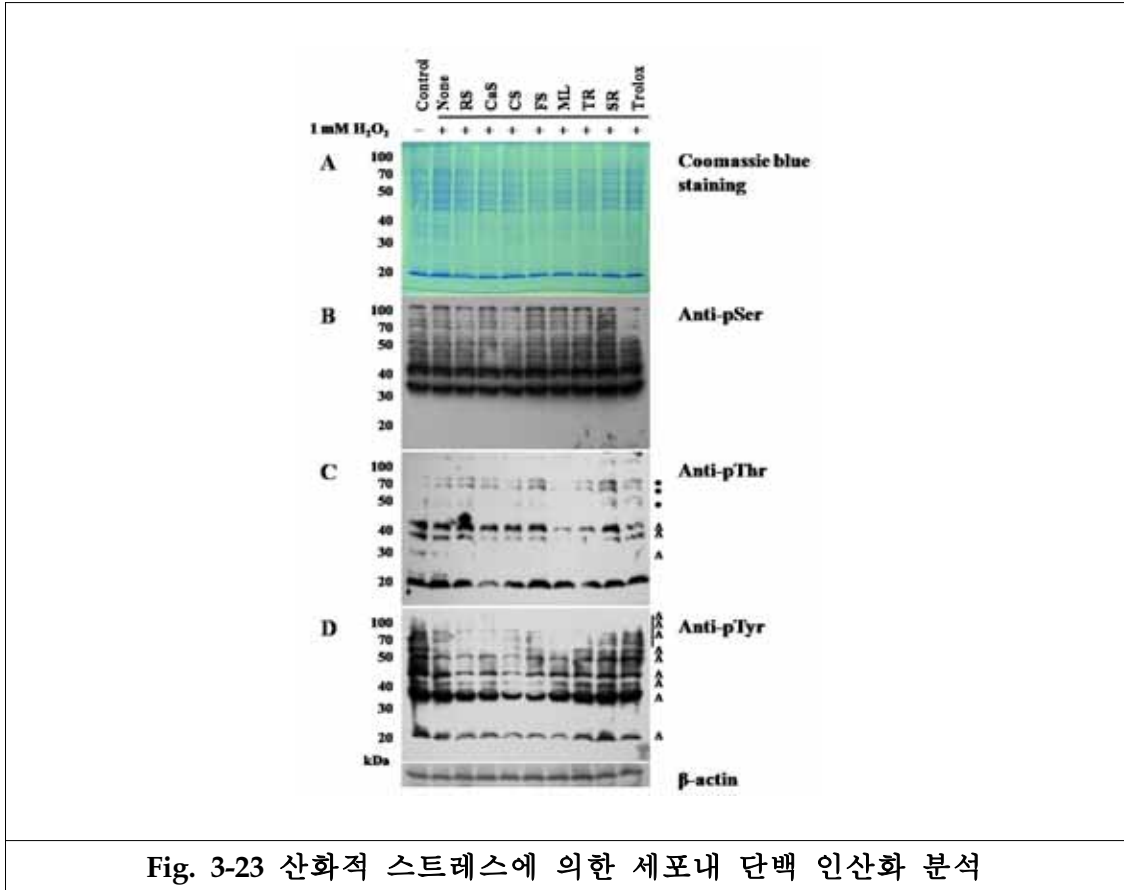


Fig. 3-22 산화적 스트레스에 의한 단백질의 carbonylation 분석 및 세로토닌 유도체의 활성 분석

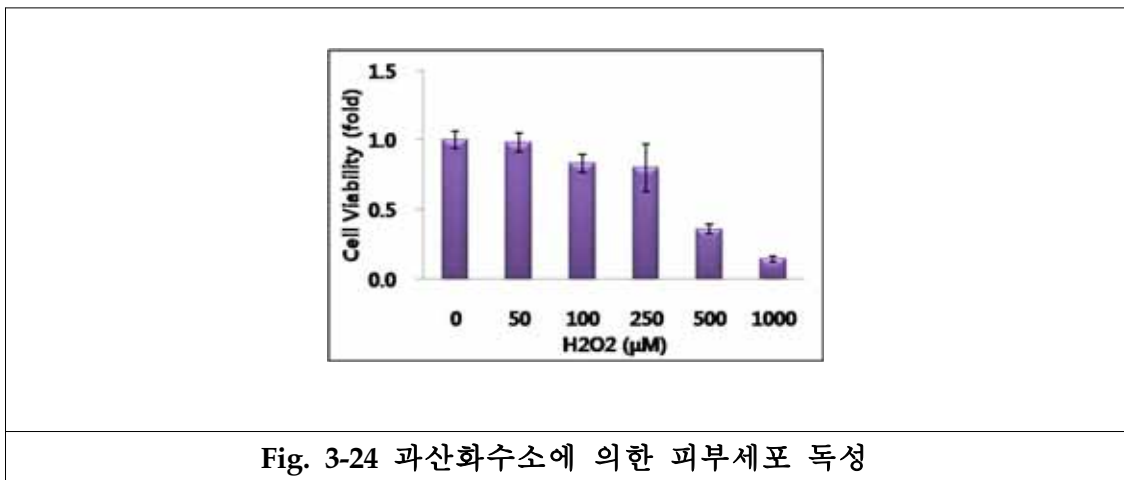
아. 산화적 스트레스에 의한 세포내 단백 인산화 분석

피부세포는 10 uM의 CS, CaS, FS, SR을 4시간 처리하고 0.5 mM H₂O₂를 1시간 처리하여 세포 내 단백질의 인산화 양상을 분석하였다. Phosphor-Ser, -Thr, -Tyr antibodies를 이용하여 immunoblot하여 분석해 본 결과 p-Tyr의 양이 0.5 mM H₂O₂에 의해 줄어드는 반면 p-Ser, p-Thr은 큰 변화를 알 수가 없었다. 세로토닌 유도체에 의한 세포내 단백질의 인산화 양상의 차이를 그림에 표시하였으며, 이들 인산화가 전사조절유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 추가 분석이 필요하다.



자. 과산화수소에 의한 피부세포 독성 분석

과산화수소를 농도별로 처리하여 피부세포 성장에 미치는 영향을 분석하였다 (그림 3-24). 과산화수소에 의한 세포 사멸에 0.1 mM부터 나타나기 시작하였으며, 0.5 mM 이상의 농도에서 50% 이상의 세포가 사멸하였다.



차. CaS의 항염증 효능 분석

사람의 monocyte THP-1에 CaS를 처리하여 THP-1의 adhesion과 migration에 미치는 영향을 분석하였다. 먼저 Adhesion assay를 실시한 결과 CaS 농도 의존적으로 cell adhesion이 감소하였으며, 또한 migration도 CaS 농도 의존적으로 감소시킴을 알 수 있어 과민반응으로 인한 염증 작용 완화에 CaS가 효능을 보임을 밝혔다.

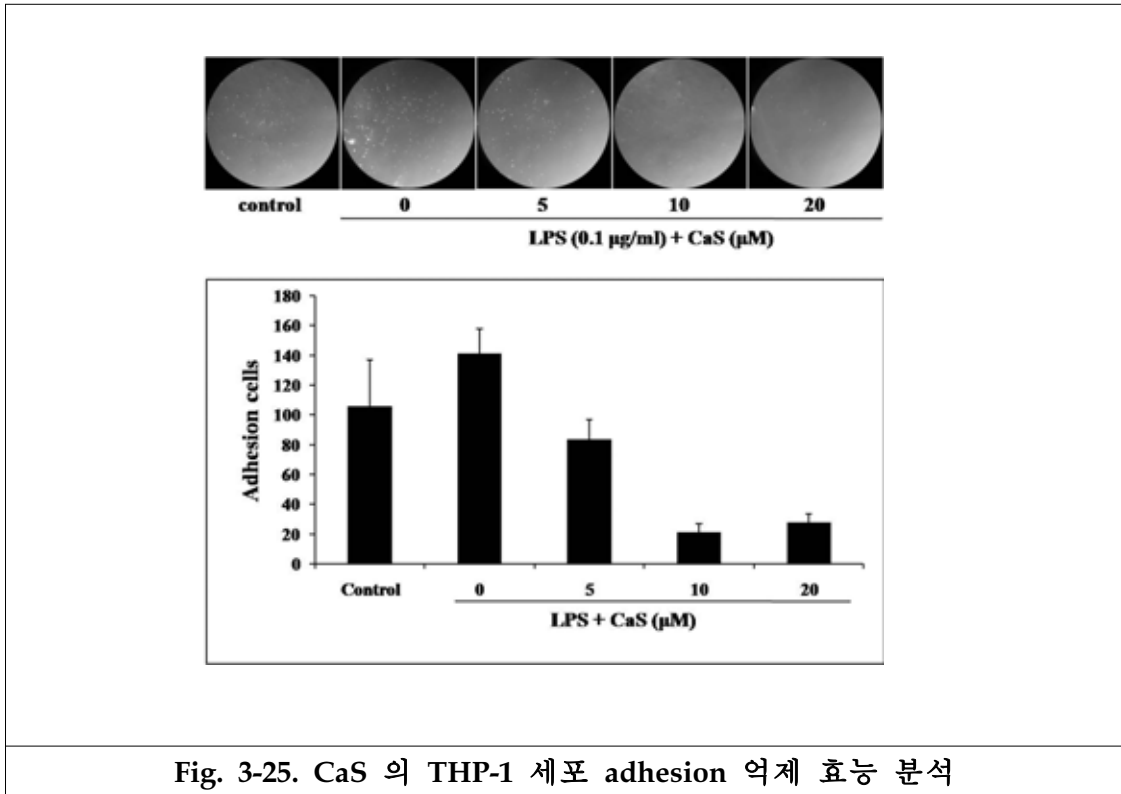


Fig. 3-25. CaS 의 THP-1 세포 adhesion 억제 효능 분석

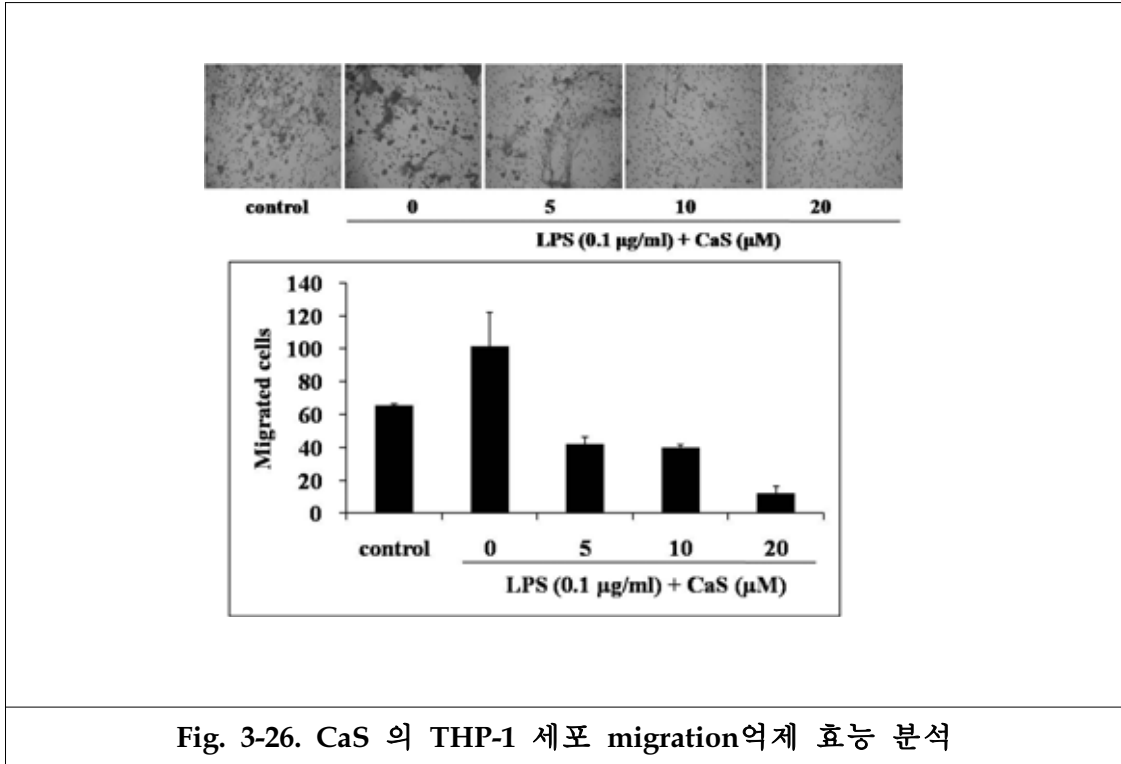


Fig. 3-26. CaS 의 THP-1 세포 migration 억제 효능 분석

카. Integrin 유전자 발현 영향 분석

사람의 monocyte THP-1에 MCP-1을 처리하여 염증 반응을 유도한 후에 CaS를 처리하여 세포막에 발현되는 integrin 단백질의 발현을 분석하였다. CCR2, VLA5, CD29와 같은 유전자는 THP-1 monocyte가 혈관벽의 endothelial 세포와 반응하여 혈관벽을 침투해 들어갈 수 있도록 THP-1 세포의 adhesion에 관여한다. CaS 20 μM을 처리하면 CCR2 유전자는 68.0%에서 39.6%로 발현이 줄었으며, VLA5 유전자의 경우 75.7%에서 39.6%로 CD29는 76.1%에서 54.4%로 감소하였다. CaS는 integrin 유전자 발현을 억제함으로써 THP-1 monocyte의 항염증에 관여하는 것으로 관찰되었다.

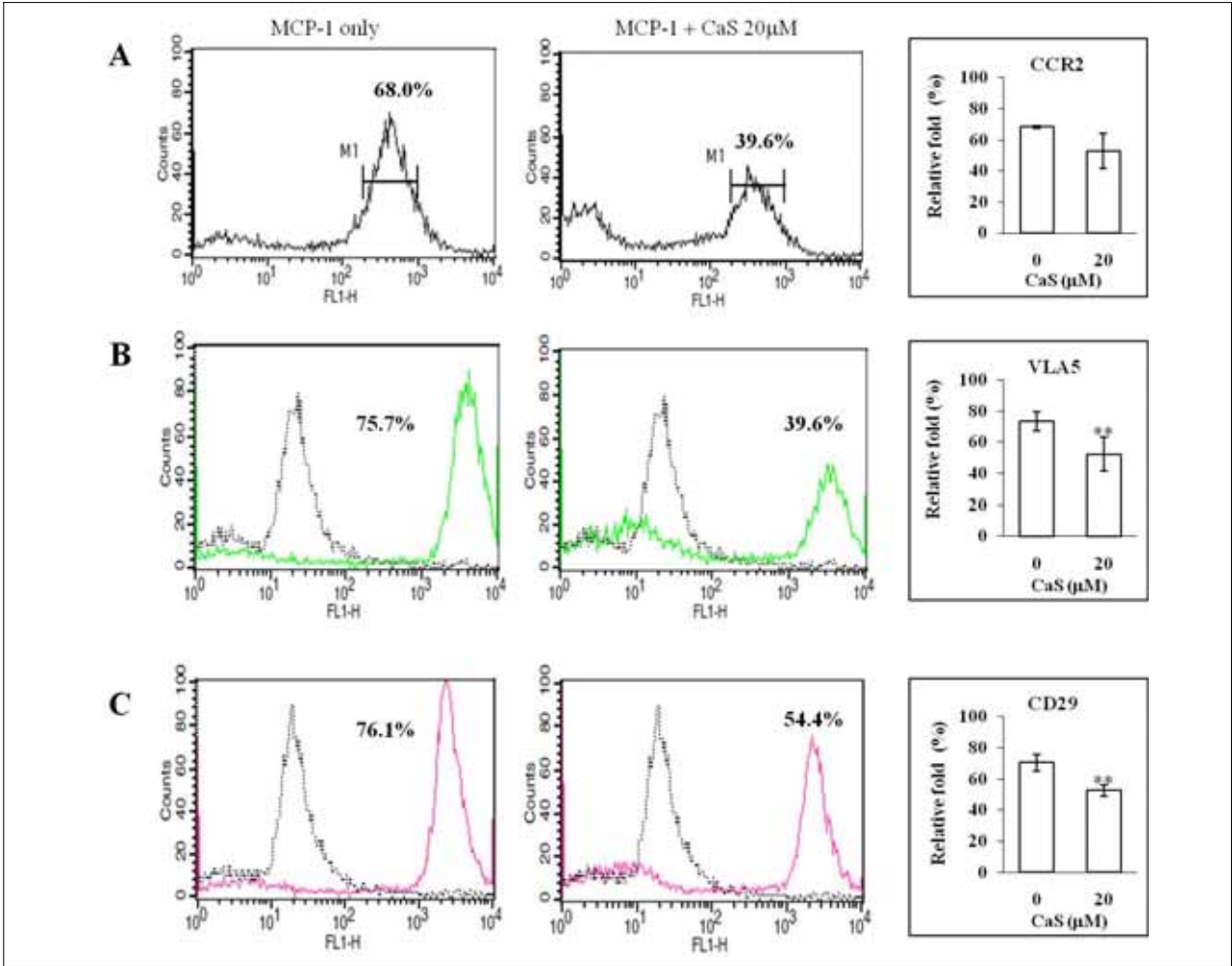


Fig. 3-27. CaS가 Integrin 유전자 발현에 미치는 영향분석

제 3 절 세로토닌유도체를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발

1. 서 설

- 화장품 산업은 기초과학과 응용과학이 종합적으로 적용되는 정밀화학 산업으로서 고부가가치 창출이 가능한 선진형 미래 산업이다. 세계 화장품 시장 규모는 2001년 이후 약 4%대의 꾸준한 증가세를 보여주고 있으며 국내 화장품 시장규모는 연 7%이상 성장하고 있다 특히 미국 발 금융위기로 경기 하락세가 본격화 된 2008년도에서도 전년대비 약 16%, 2009년도에도 10% 이상의 성장률을 이어가고 있다.
- 기능성 화장품은 화장품 기술에 의약 기술을 접목시켜 미용 뿐 만 아니라 치료와 예방작용을 하는 화장품 군으로, 경제적 수준의 향상과 노령인구의 증가 및 삶의 질에 대한 사회적 욕구를 충족시킬 수 있는 제품으로 인식되고 있으며 천연물 유래의 기능성 소재 및 이를 활용한 제품 수요가 폭발적으로 증가하고 있다. 그러나 국내 화장품의 주요 원료는 80% 이상을 수입에 의존하고 있으며, 화장품에 대한 해외수출기반도 취약한 상태이다.
- 따라서 천연물을 이용한 화장품 원료 개발은 화장품 원료의 해외 의존도를 낮추고 더 나아가 해외시장에서도 경쟁력 있는 원료 및 제품개발의 계기가 될 것으로 기대된다.
- 현재 국내 화장품 시장이 성숙 및 포화수준에 에 따른 기능성 시장의 화장품 시장의 활성화 그리고 FTA 체결등으로 세계시장에서의 경쟁력 향상/새로운 시장개척을 위해서 천연물 유래의 고 기능성 소재 개발이 필요하다 할 것이다
- 본 연구는 천연물 유래의 세로토닌 유도체를 이용한 화장품 원료화 및 제품화에 관한 것이다. 세로토닌유도체의 경우 현재까지 화장품소재로서의 개발이 전무한 상태로 소재의 신규성이 높다. 본과제를 통해 세로토닌유도체에 피부활성을 주름, 미백, 발모, 비만 등 다양한 분야에서 확인하고국제화장품규격집 CTFA에 등록한다. 또한 소재의 화장품 원료화 과정(안전성, 안정성 검정과 세포투과도 증진방안 강구 등) 및 이를 이용한 원료화 과정을 수행하여 세계적으로 경쟁력 있는 소재를 개발하고자 한다.

2. 연구 수행 방법

가. 세포배양

B16 melanoma 세포, NIH3T3 세포, 인체유래 섬유아세포 (Human dermal fibroblasts), 그리고 3T3L1세포를 10% Fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin/ streptomycin이 포함

된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 1×10^6 /mL 의 농도로 배양하고 세포 밀도가 90% 이상이 되었을 때 계대 배양 및 실험하였다. 이때 배양조건은 37°C, 5% CO₂를 유지하였다.

나. Melanin content assay

6 well plate에 B16 melanoma 세포를 well당 1×10^5 으로 세포를 분주하여 24시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 24시간 후 시료를 농도별로 처리하여 72시간 배양하였다. 시료가 처리된 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 cell scraper로 세포를 긁고 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은다. 상층액을 제거하고 1N NaOH 300 μ l를 넣은 뒤 56°C에서 30분간 반응시켜 멜라닌을 유리시킨 후 96 well plate로 옮겨 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정한다.

다. NF- κ B activity assay

24 well plate에 NIH3T3 세포를 well당 5×10^5 으로 세포를 분주하여 24시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한다. 24시간 후 NF- κ B luciferase report vector를 superfect(Qiagen) reagent를 이용하여 transfection한다. transfection 후 TNF- α (10 ng/ml)를 처리하여 NF- κ B promoter를 활성화 시키고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 세포를 수집하여 cell lysate를 얻은 뒤 원심분리시켜 cell pellet을 제거하고 일정량의 상층액을 luciferase substrate와 반응시킨 후, luminometer를 이용해 450nm에서 흡광도를 측정한다.

라. Collagen synthesis assay

콜라겐(type I, II, III, IV and V)들은 프로콜라겐이라는 전구물질의 형태로 합성된다. 프로콜라겐은 아미노 말단과 카복시 말단에 프로펩티드라는 펩티드염기서열을 포함한다. 프로펩티드의 기능은 소포체내에서 프로콜라겐 분자의 folding을 도와줌과 동시에 콜라겐 중합반응이 일어날 때 콜라겐 분자로부터 절단, 분리된다고 알려져 있다. 그래서 분리된 프로펩타이드의 양을 측정함으로써, 세포내에서의 콜라겐 생합성정도를 파악할 수 있다. Human dermal fibroblast cells을 24 well dish에 일정수의 세포를 seeding한 후 하루동안 배양한다. 배양액을 serum-free 배양액으로 16시간 배양한다. FBS가 0.05%들어있는 각각의 well에 시험물질을 농도별로 처리한 후, 48시간 동안 다시 배양한다. 48시간 후, 세포배지를 수집한다. 수집한 각 sample의 100 μ l를 항체로 코팅된 microplate의 각 well에 넣고, 37°C에서 2시간동안 incubation한다. 각 well를 PBS 300 μ l로 3회 세척한다. 용액I (Antibody-POD conjugate

solution)을 각 well에 100 ul씩 넣고, 37°C에서 1시간 동안 incubation한다. 각 well를 PBS 400 ul로 3회 세척한다. 기질용액(TMBZ) 100ul를 각 well에 첨가한 후, 상온(20-30°C)에 15분 간 incubation한다.

1N H₂SO₄ 100 ul를 각 well에 첨가 하여 잘 섞는 후, 450nm에서 ELISA reader로 detection 한다.

마. Collagenase activity inhibition assay

콜라겐을 분해하는 효소인 콜라게네이즈 (MMP-1)의 활성정도를 측정하는 방법으로 collagenase 에 대한 항체를 이용한다. 본 시험에서는 Type I Collagenase assay kit (Amersham)를 이용하였으며, ELISA로 흡광도를 측정하였다. Human dermal fibroblast 세포를 적합한 배지로 37°C 5% CO₂ incubator 조건하에 배양 유지한다. 시험을 위하여 일정한 수의 세포를 적절한 배양용기에 분주하고 일정시간 배양하여 세포의 부착을 확인한 후, serum-free 배양액에서 16시간 배양한다. 세포 배양액에 시험물질(0.05%~1%)과 TNF- α (10ng/ml)를 가하여 24시간 동안 배양하였다. 이 때 MMP-1을 활성화시키는 물질로 TNF- α 를 사용한다. 24시간 배양후, 세포배지를 수집하여 그 중 100 ul를 assay well에 넣고 2-8도에서 overnight incubation한다. 각각의 assay well을 wash buffer를 이용하여 4번 wash한 후, 각 well에 APMA 50 ul, assay buffer, detection reagent (detection enzyme + substrate)를 각각 50 ul씩 첨가하여 잘 섞어준다. 37°C에서 90분간 incubation한 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 측정한다.

바. 지방전구세포 3T3L1 분화

3T3-L1 세포는 3T3 세포로부터 유래된 세포주로서 Green과 Kehinde¹에 의해 분리되어 세포 분화 과정을 연구하는데 유용한 모델로 사용되고 있으며 분화유도물질을 처리해 주면 지방세포(adipose cell)로 분화하는 성질을 갖고있다. 전구세포로부터 지방세포로의 분화가 일어나게 되면, 세포내에 triglyceride로 이루어진 중성지방이 축적된다. 이런 지방의 양을 측정하기 위한 oil-red O staining method는 oil-red O (solvent red 27; 1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol)라는 염색약이 지용성인 지방에 특이적으로 염색됨으로써 지방 세포의 분화 정도를 가늠할 수 있게 되는 방법으로 Sudan III(Cerasin Red; Fat Ponceau G; Scarlet B; Fat Soluble Sudan)의 방법과 유사하다. Oil red O staining은 처리가 끝난 세포를 PBS로 수세 해주고 10% formaldehyde in PBS 고정액을 처리하여 상온에서 15분 방치한다. 고정액을 제거하고 Oil-Red O 염색용액을 넣어주고 상온에서 30분 반응시킨다. 다시 PBS로 2회 washing해 주고 지방과립에 염색된 oil-red O를 용출시키기 위해 Isopropyl alcohol을 처리한 후 30분동안 방치한다. ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정한다. Triglyceride 측정은 다음과 같다. 처리가 끝난 3T3L1세포를 PBS로 수세한 후 세포를 수확한다. 수확한 세포를 원심분리 후 펠렛만 모은 뒤 1 mM EDTA를 포함한 25 mM Tirs buffer를 넣어주고 sonicator 로 분쇄한다. 분쇄

된 세포용액을 TG assay kit(Sigma)와 반응시켜 TG양을 측정한다.

사. TGF-beta 생산 assay

TGF-beta는 섬유모세포에 의한 콜라겐과 fibronectin의 생성을 증가시켜 켈로이드를 형성에 관여한다. TGF-beta가 여러조직 및 세포에서 섬유화를 초래하는 주된 매개물질로 알려짐에 따라 상처치료관련 켈로이드 방지를 위해 TGF-beta를 치료목표로 많이 이용하고 있다. Human dermal fibroblast cells을 24 well dish에 일정수의 세포를 seeding한 후 하루 동안 배양한다. 배양액을 serum-free 배양액으로 16시간 배양한다. FBS가 0.05%들어있는 각각의 well에 TGF-beta(20 ng/mL)와 시험물질을 농도별로 처리한 후, 48시간 동안 다시 배양한다. 48시간 후, 세포배지를 수집한 후 TGF-beta elisa assay kit (R&D system)를 이용하여 TGF-beta 양을 측정한다..

아. Fibronectin 발현

Human dermal fibroblast cells을 100 mm dish에 일정수의 세포를 seeding한 후 하루동안 배양한다. 배양액을 serum-free 배양액으로 16시간 배양한다. FBS가 0.05%들어있는 각각의 well에 TGF-beta(20ng/mL)와 시험물질을 농도별로 처리한 후, 24시간 동안 다시 배양한다. 24 시간 후, 세포를 수확하고 western blotting 시험을 이용해 fibronectin발현양을 관찰한다..

자. 피부일차자극시험

사람을 상대로 한 자극시험으로서 첩포시험을 수행하여 자극유무를판단하여 자극이 있으면 어느 정도이며 다른 진정 성분으로 완화 가능한지를 점검함. 시험은 당사에서 수행하였고, 10 명의 인원이 시험에 참가였다. 첩포부위는 사람의 상등부(정중선의 부분은 제외) 또는 전완부 등 인체사용시험을 평가하기에 적절한 부위를 폐쇄첩포한다. 원칙적으로는 첩포 24시간 후에 팻취를 제거하고 제거에 의한 일과성의 홍반의 소실을 기다려 관찰하여 판정하며 판정함.

차. 세로토닌 유도체의 pH, 열 안정성 시험

세로토닌의 유도체 3종 Feruloylserotonin, Coumarylserotonin, Caffeylserotonin과 세로토닌 에 대하여 pH와 열에 대한 안정도를 측정한다. Feruloylserotonin, Coumarylserotonin, Caffeylserotonin (전남대 제공), 세로토닌 (Sigma, $\geq 98\%$) 10 mg을 정확하게 달아 에탄올을 넣어 녹여 10mL로 한다. 이액 100 μ L을 각각 pH3, 4, 5, 6, 7, 8, 9로 적정시킨 물을 넣어 녹여 10 mL로 한액을 표준액으로 한다. 이액 5 ml을 덜어 121 $^{\circ}$ C에서 30분간 가압멸균시킨액을 검액으로 한다. 각각 검액과 표준액을 0.22 μ m 크기의 Syringde filter로 여과한후 액체크로마토

그래피법에 따라 시험하여 얻은 각물질의 피크 면적비를 구하여 백분율로서 비교하여 함량계산을 실시하였다.

세로토닌 유도체 3종은 조작조건(1)에 따라, 세로토닌은 조작조건(2)에 따라 분석을 실시하였다.

조작조건(1)

기 기 : Waters 600 controller, Waters 996 PDA, Waters 616 pump, Waters 717 autosampler

컬 럼 : Phenomenex Luna C18 4.6 x 150 mm, 5 μ m

검출기파장 : 315nm

컬럼 온도 : 실온

이 동 상 : Water (0.1% TFA) : Acetonitrile = 75 : 25

유 량 : 1.0 mL/min

주 입 량 : 10 μ L

조작조건(2)

기 기 : Waters 600 controller, Waters 996 PDA, Waters 616 pump, Waters 717 autosampler

컬 럼 : Phenomenex Luna C18 4.6 x 150 mm, 5 μ m

검출기파장 : 280nm

컬럼 온도 : 실온

이 동 상 : Water (0.1% TFA) : Acetonitrile = 90 : 10

유 량 : 1.0 mL/min

주 입 량 : 10 μ L

카. 분광광도계에 따른 성상 관찰

위에서 제조한 검액 및 표준액을 가지고 300 μ L를 옮겨 96-well plate에 옮겨 담아 ELISA Reader기로 420nm에서 측정된 OD(Optical Density) 을 가지고 성상에 변화가 있는지 관찰한다. (n=3)

타. 세로토닌 유도체의 리포솜 원료 피부투과시험

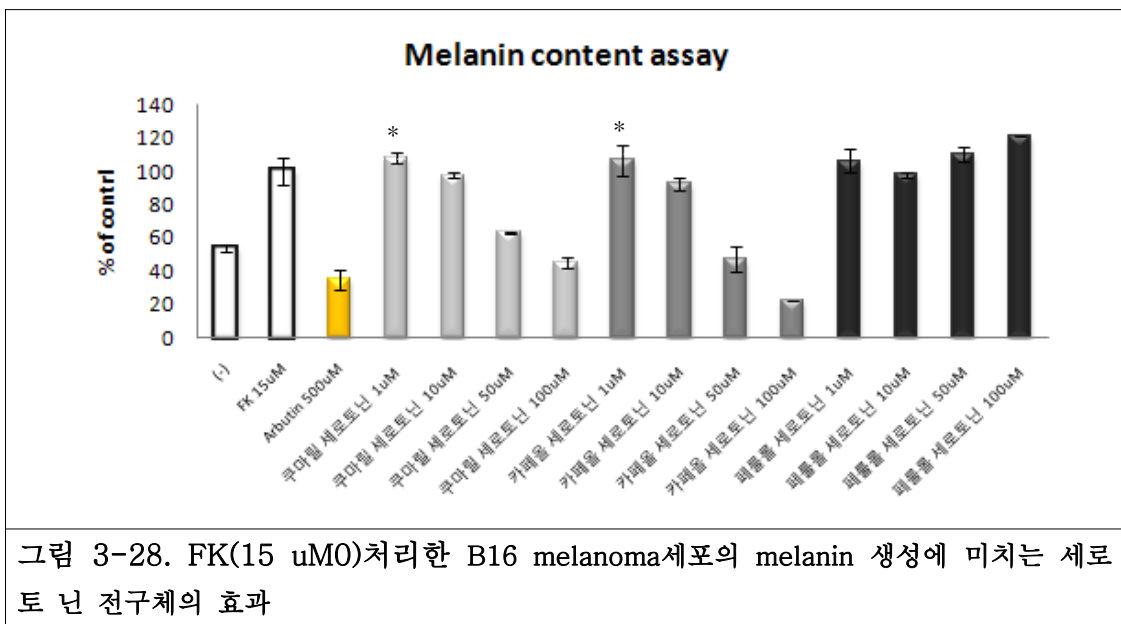
경피흡수는 털을 제거한 기니아 피그(Jackson Laboratories) 피부를 대상으로 프란츠 투과셀(PermeGear, Inc.)을 이용하여 측정하였다. 시험 직전, 털을 제거한 기니아 피그의 복부 부분의 피부를 채취하여, 평방 1cm²의 면적으로 절단한 후, 이를 투과경의 직경이 0.9cm인 투과셀에 장착하고, 클램프로 고정하였다. 피부의 한쪽면(donor 용기)은 coumarylserotonin와 coumarylserotonin-liposome원료 0.5 ml를 각각 넣어주었다. 반대쪽 면(receptor 용기)은 정제수와 에탄올이 4:1 중량비로 혼합된 용매와 접촉하도록 하였으며, 시험시 온도는 실제피부 온

도인 32°C를 유지하였다. 시험 시작 후, 일정 시간 간격으로 용매의 일부를 채취한 후, 피부를 통과한 coumarylserotonin의 양을 측정하여, 도포 농도 당 피부흡수량($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{중량}\%$)으로 나타내었으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. Coumarylserotonin의 정량 분석은 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 방법으로 수행하였다.

3. 연구 수행 결과

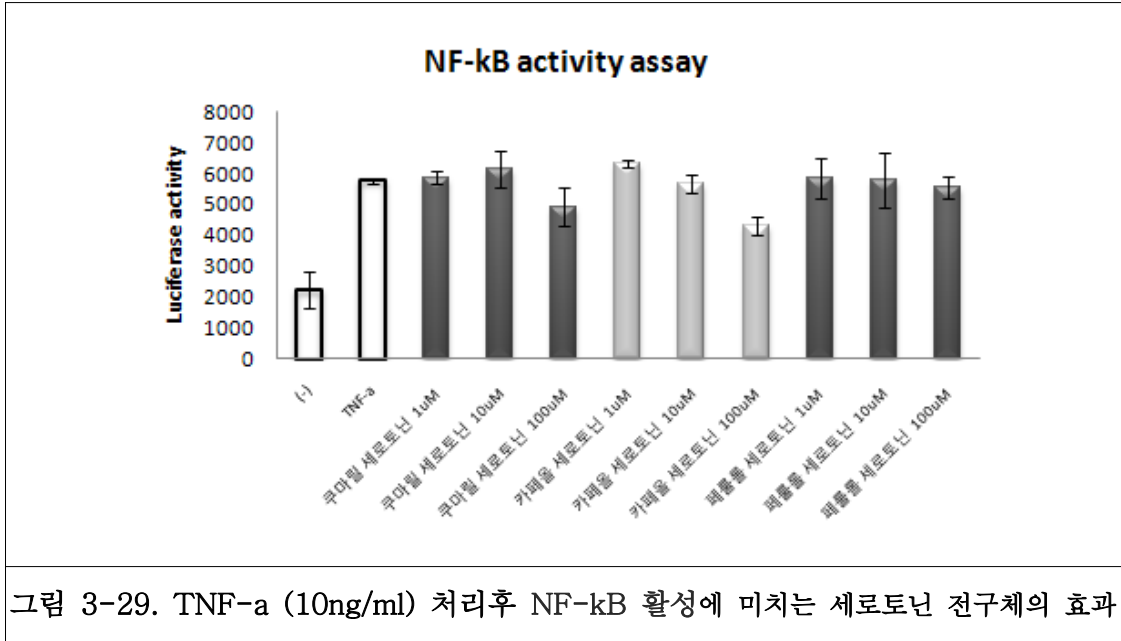
가. 세로토닌 유도체가 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향 분석

세로토닌 전구체에 의한 세포내 멜라닌 생성량을 측정한 결과 forskolin을 처리한 대조군과 비교하였을 때 쿠마릴세로토닌과 카페올세로토닌에 의해 멜라닌 생성이 억제됨을 확인하였다. 페롤롤세로토닌은 멜라닌 생성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 카페올세로토닌은 100 μM 에서 toxicity를 보였다.(그림 3-28)



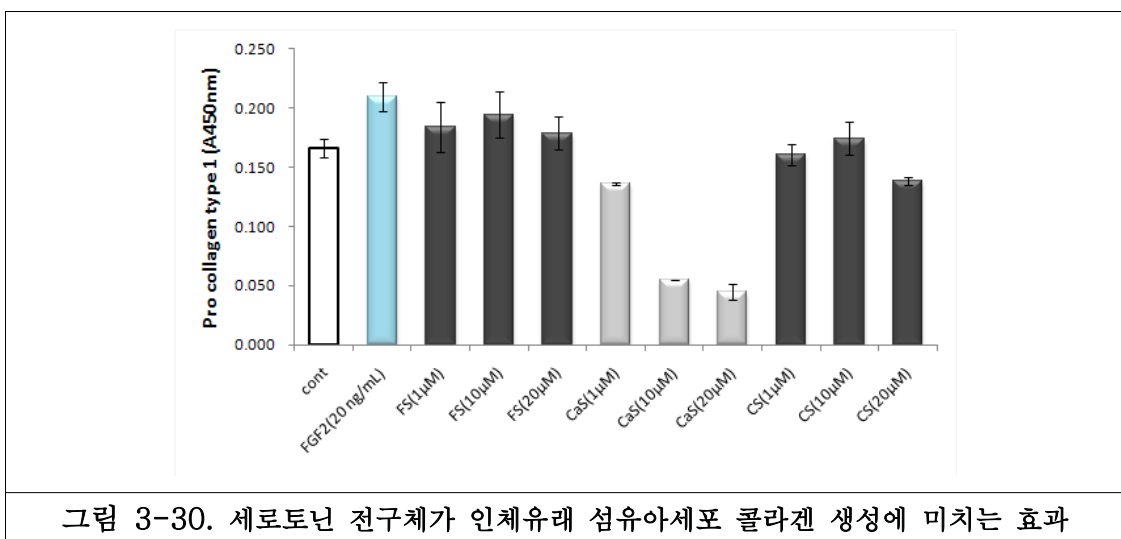
나. 세로토닌 유도체가 NIH 3T3의 NF- κB 의 활성화에 미치는 영향 분석

세로토닌 전구체에 의한 NF- κB 의 활성화 증감을 측정한 결과 TNF- α 를 처리한 대조군과 비교하였을 때 3가지 세로토닌전구체 모두 NF- κB 의 활성을 억제하지 않는 것으로 관찰되었다. 쿠마릴세로토닌과 카페올세로토닌은 100 μM 에서 toxicity를 보였다.(그림 3-29)



다. 세로토닌 유도체가 인체유래 섬유아세포 콜라겐 생성에 미치는 영향 분석

Human dermal fibroblast 세포내에서의 콜라겐합성에 대한 세로토닌전구체의 효과를 세포독성이 없는 농도내에서 시험한 결과 (그림 A), 시험물질 모두 처리농도에 따라 콜라겐 생합성을 유의성있게 증가시키는 않았다 ($p < 0.05$). CaS의 경우 오히려 농도의존적으로 콜라겐 양이 감소되는 결과를 보였다. (그림 3-30) 양성대조군으로는 Fibroblasts growth factor 2 (FGF2)를 사용하였다.



라. 세로토닌 전구체가 인체유래 섬유아세포의 콜라게네이즈 MMP-1 활성화에 미치는 영향 분석

Human dermal fibroblast에 콜라게네이즈 MMP-1을 활성화시키는 것으로 알려진 TNF α 를 처리하고 함께 세로토닌전구체를 농도별로 처리한 결과, TNF α 처리군에 비해 collagenase 활성을 의미있게 감소시키는 시료는 관찰되지 않았다(그림 3-31).

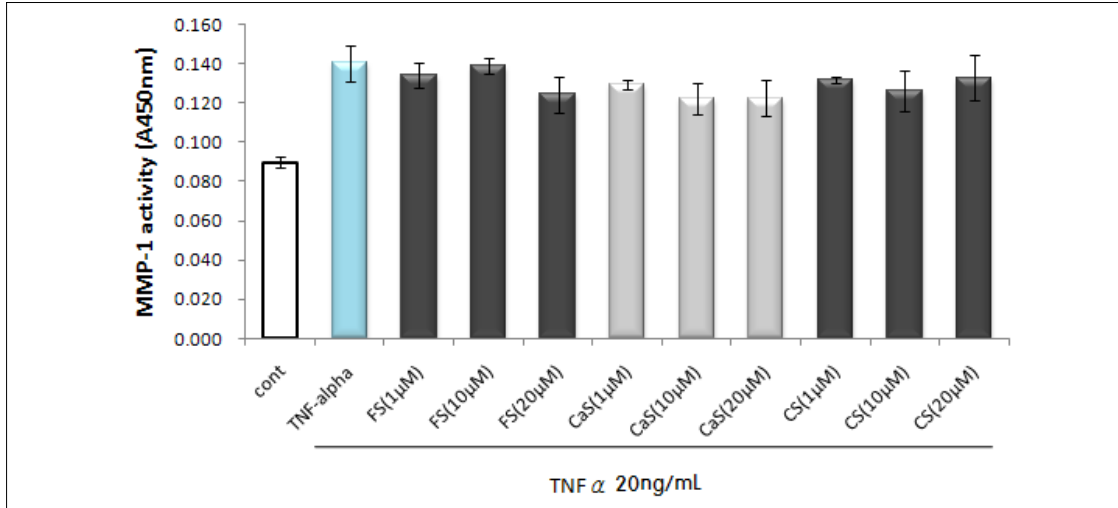


그림 3-31. 세로토닌 유도체가 인체유래 섬유아세포 콜라게네이즈(MMP-1) 활성화에 미치는 효과

마. 세로토닌 전구체가 3T3L1지방전구세포 분화에 미치는 영향 분석

Oil-red O 염색법을 이용하여 지방전구세포의 분화에 미치는 세로토닌 전구체의 효과를 관찰한 결과 CS, Cas, FS 모두 50 µM에서 지방전구세포 분화를 억제하는 결과를 보였다(그림 3-32).

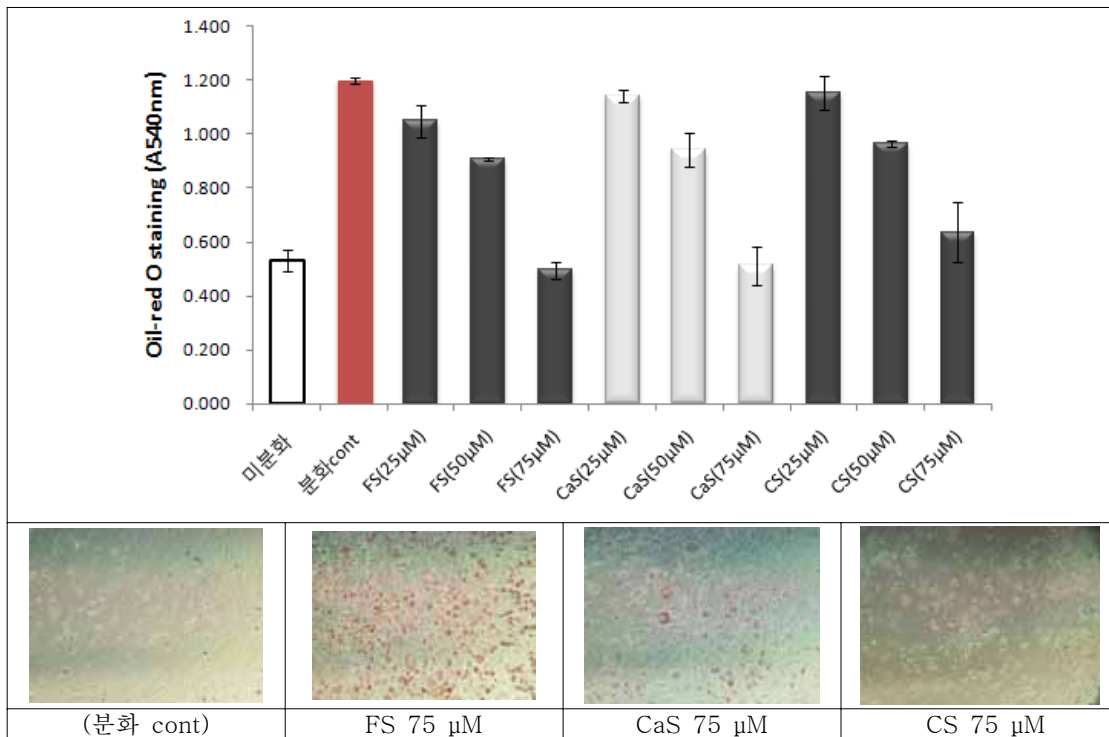


그림 3-32. 세로토닌 유도체가 3T3L1지방전구세포 분화에 미치는 효과

바. 세로토닌 전구체가 3T3L1지방세포 TG 생산에 미치는 영향 분석

TG assay kit를 이용하여 지방전구세포의 TG생성에 미치는 세로토닌 전구체의 효과를 관찰한 결과 CS, Cas, FS 모두 농도의존적으로 TG 생산을 억제하는 결과를 보였다(그림3-33).

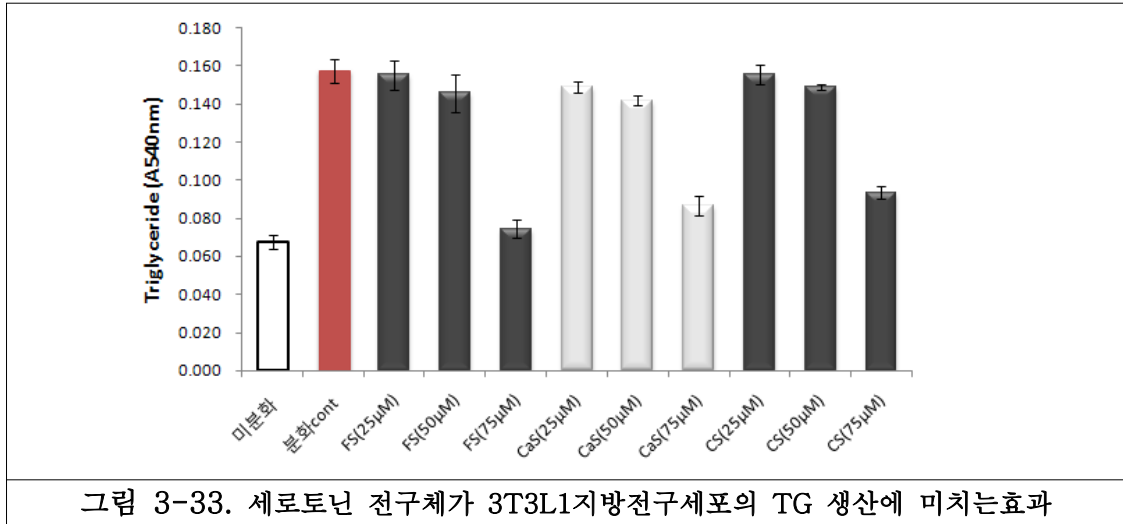


그림 3-33. 세로토닌 전구체가 3T3L1지방전구세포의 TG 생산에 미치는효과

사. 유효물질의 작용 기전 규명

켈로이드는 상처에 대한 반응으로 피부의 섬유모세포가 활성화되어 콜라겐, 파이브로넥틴, 글리코사미노글리칸과 같은 세포외물질(extracellular matrix)들을 과잉으로 생산할 때 만들어진다. Human dermal fibroblast를 이용하여, CaS의 wound healing관련 켈로이드 억제 작용 기전을 콜라겐, TGF-beta, fibronectin의 발현과 생성량을 관찰하였다. Human dermal fibroblast 세포내에서의 콜라겐합성에 대한 CaS의 효과를 세포독성이 없는 농도내에서 시험한 결과 농도의존적으로 콜라겐 양이 감소되는 결과를 보였다(그림 3-34).

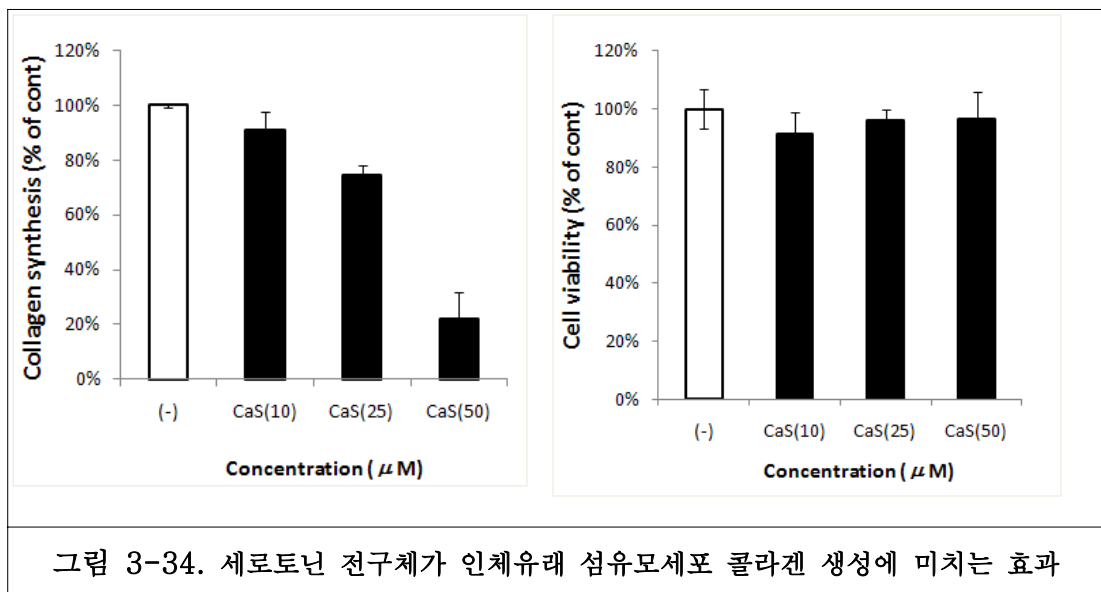
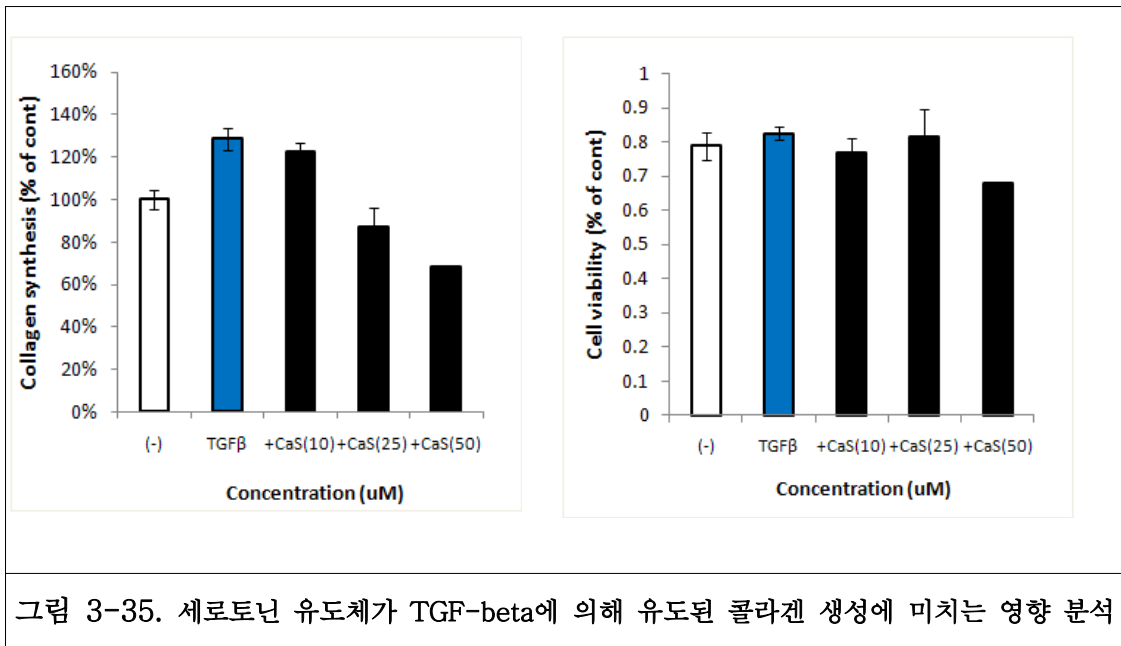
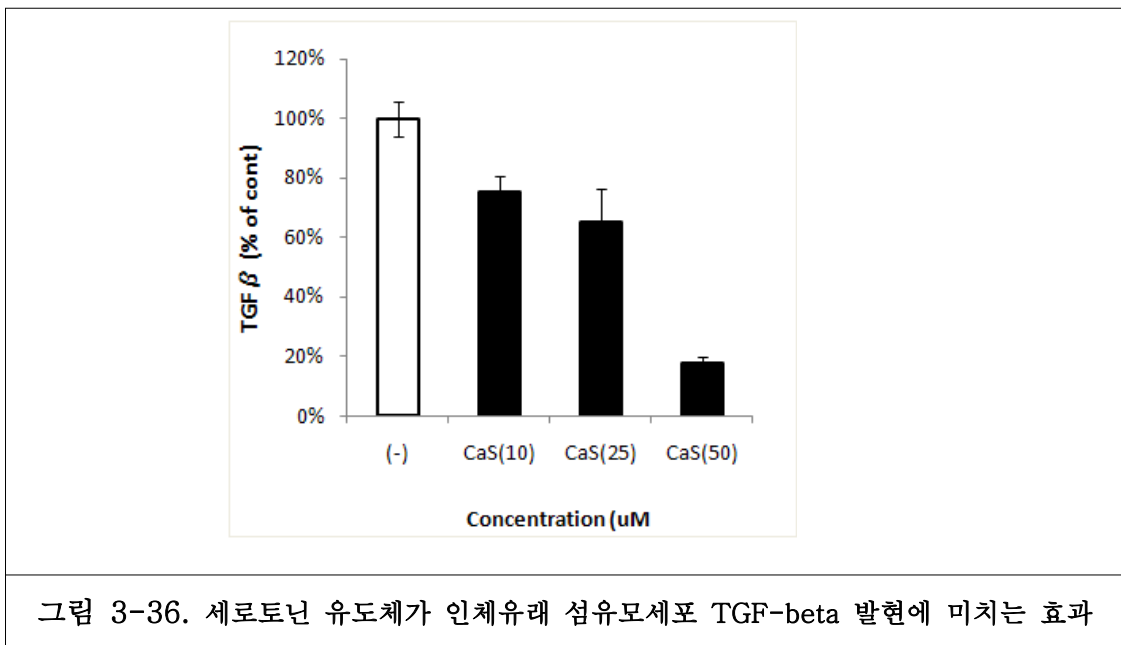


그림 3-34. 세로토닌 전구체가 인체유래 섬유모세포 콜라겐 생성에 미치는 효과

Human dermal fibroblast 세포내에서의 TGF-beta에 의해 유도된 콜라겐합성에 대한 CaS의 효과를 시험한 결과 농도의존적으로 콜라겐 양이 감소되는 결과를 보였다. (그림 3-35)



Human dermal fibroblast 세포내에서의 TGF-beta에 의해 유도된 콜라겐합성에 대한 CaS의 효과를 시험한 결과 농도 의존적으로 콜라겐 양이 감소되는 결과를 보였다(그림 3-36).



Human dermal fibroblast 세포내에서의 TGF-beta에 의해 유도된 fibronectin발현에 대한 CaS의 효과를 시험한 결과 농도 의존적으로 fibronectin발현이 감소되는 결과를 보였다(그림 3-37).

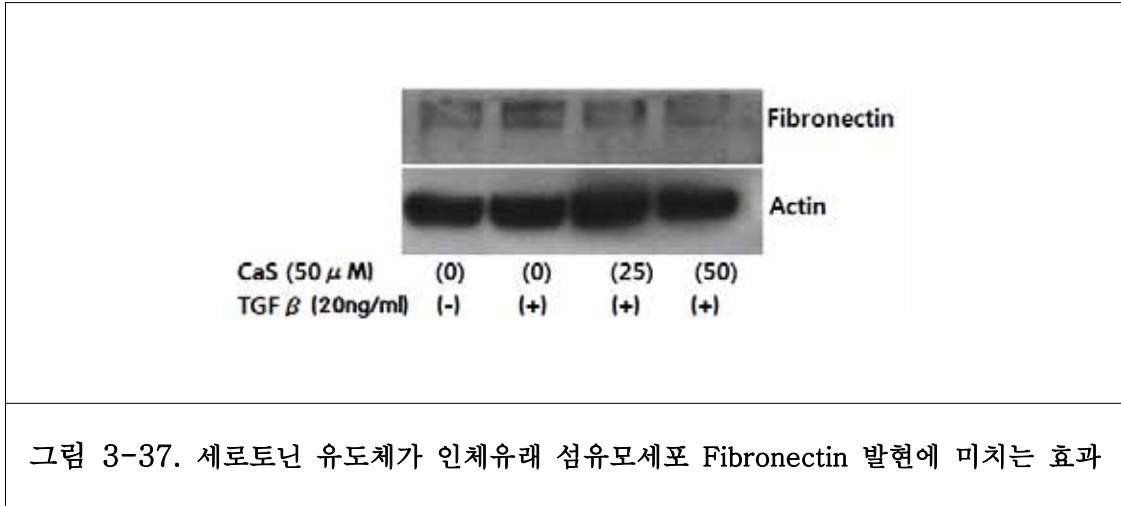


그림 3-37. 세로토닌 유도체가 인체유래 섬유모세포 Fibronectin 발현에 미치는 효과

아. 세로토닌 유도체의 물리, 화학적 특성 규명

세로토닌 유도체의 물리, 화학적 특성을 규명하는 작업을 수행하였다. 세로토닌은 분말 형태로 알콜에서의 용해도는 좋으나, 물에는 녹지 않는 특성이 있다 (하기 표 참조).

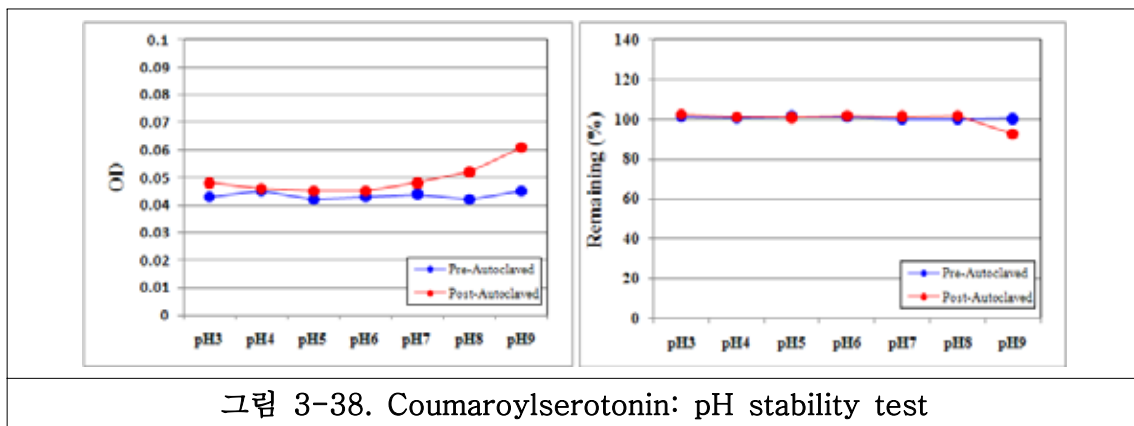
[Coumaroylserotonin의 용해도]

Solvents	Solubility
Macadamia nut oil	Insoluble
Glycerol	Insoluble
Butylene Glycol	Soluble (가온조건)
Propylene Glycol	Soluble (가온조건)
Alcohol (100%)	Soluble
Water/Alcohol (50:50)	Soluble (가온조건)
Water(100%)	Insoluble

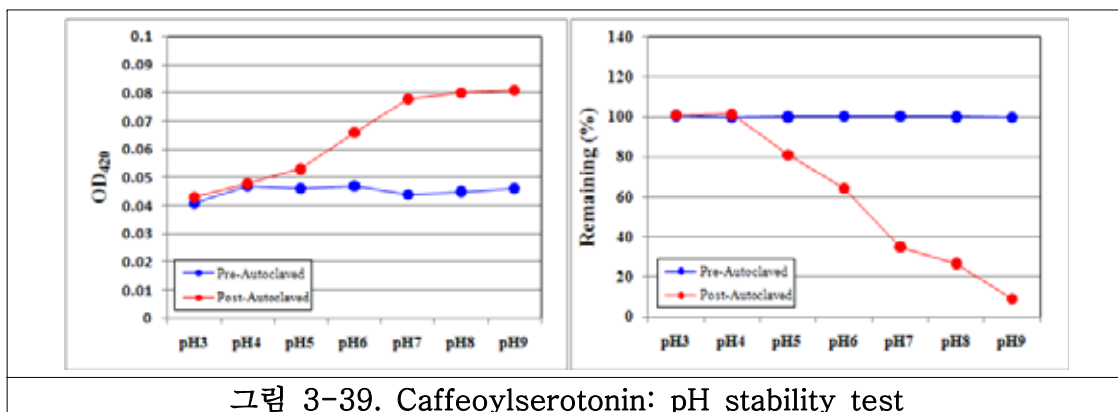
[Caffeoylserotonin의 용해도]

Solvents	Solubility
Macadamia nut oil	Insoluble
Glycerol	Soluble (가온조건)
Butylene Glycol	Soluble (가온조건)
Propylene Glycol	Soluble (가온조건)
Alcohol (100%)	Soluble
Water/Alcohol (50:50)	Soluble

Water(100%)	Insoluble
[Feluroylserotonin의 용해도]	
Solvents	Solubility
Macadamia nut oil	Insoluble
Glycerol	Insoluble
Butylene Glycol	Soluble (가온조건)
Propylene Glycol	Soluble (가온조건)
Alcohol (100%)	Soluble
Water/Alcohol (50:50)	Soluble
Water(100%)	Insoluble



121°C에서 30분동안 가온한 샘플의 성상을 420 nm에서 측정하였을때 pH8~9까지 OD값이 증가하는 경향을 확인하였고, pH8, 9에서 육안으로 관찰된 얼은 갈변현상과 일치하였다 [사진 미첨부]. 마찬가지로 안정도 시험결과 상온에서는 pH에 상관없이 대체로 안정한 것으로 나타났으며, 가온조건에서도 pH9를 제외한 나머지 구간에서 안정한 것으로 확인되었다(그림 3-38, 3-39, 3-40 & 3-41).



121°C에서 30분동안 가온한 샘플의 성상을 420 nm에서 측정하였을때 pH6~9까지 OD값이 증가하는 경향을 확인하였고, pH7~9에서 육안으로 관찰된 열은 갈변현상과 일치하였다 [사진 미첨부]. 안정도 시험결과 pH5~8까지 범위에서 열에 불안정한 것으로 나타났고, 갈변현상과도 연관성이 있을 것으로 사료된다.

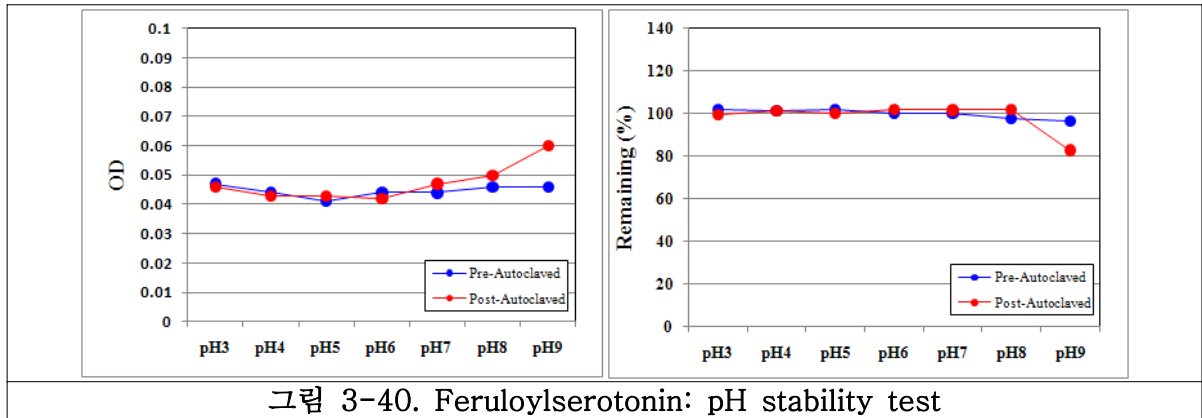


그림 3-40. Feruloylserotonin: pH stability test

121°C에서 30분동안 가온한 샘플의 성상을 420 nm에서 측정하였을때 pH9에서 OD값이 증가하는 경향을 확인하였고, pH9에서 육안으로 관찰된 열은 갈변현상과 일치하였다 [사진 미첨부]. 안정도 시험결과 pH3~8까지 범위에서 열에 안정한 물질로 판단되며, 일부 pH9에서 열이 가해질 경우에만 불안정한 것으로 확인 되었다.

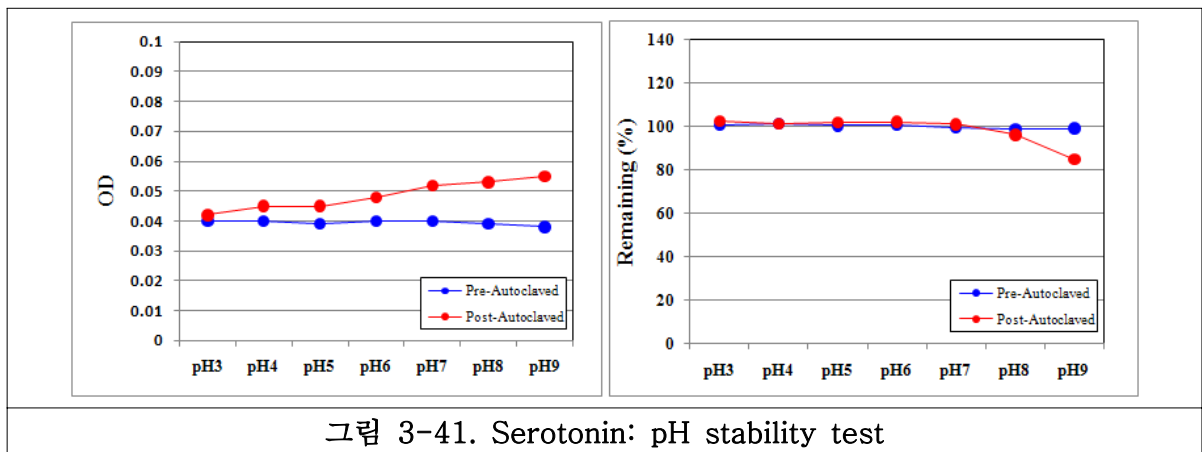


그림 3-41. Serotonin: pH stability test

121°C에서 30분동안 가온한 샘플의 성상을 420 nm에서 측정하였을때 pH가 증가할수록 OD값이 증가하는 경향을 확인하였지만, 육안관찰시 갈변현상은 관찰 할수 없었다 [사진 미첨부]. 안정도 시험결과 pH3~8까지 범위에서 열에 안정한 물질로 판단되며, 일부 pH9에서 열이 가해질 경우에만 불안정한 것으로 확인 되었다.

위에서 관찰한 것처럼 세로토닌유도체인 Feruloylserotonin, Coumarylserotonin은 전구물질인

세로토닌과 마찬가지로 pH3~9범위에서 비교적 열에 안정한 물질로 판단되며, 수용액의 성상 또한 비슷한 경향을 나타냄을 관찰하였다. 단, Caffeoylserotonin의 경우 pH가 증가함에 따라 열에 취약하며 그 안정도가 급격히 떨어짐을 확인하였다. 세로토닌 유도체의 광안전성 시험은 현재 중에 있다.

자. 세로토닌 유도체의 인체사용에 따른 안전성 시험

사람을 상대로 한 자극시험으로서 48시간 폐쇄 첩포시험을 수행하여 자극유무를 판단하여 자극이 있으면 어느 정도이며 다른 진정 성분으로 완화 가능한지를 점검할 수 있는 시험이다. 인체피부일차자극시험 결과 세로토닌 전구체에 대해 임상시험에 지원한 10명 중 2명에게서 100 µg/mL 농도에서 +1 grade(Slight erythema, either spotty or diffuse)반응이 관찰되었으며, 그 중 한명은 대조군인 증류수 적용부위에서도 +1 grade의 자극반응을 보였다. 2명을 제외하고 다른 10명의 지원자에게서는 패치가 적용된 부위의 자극반응은 관찰되지 않았다. [표 1, 첨부자료참고]

표 1. Results of human skin primary irritation test (n=10명)

번호	시 험 물 질	1 hrs				24 hrs			
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+
1	Cont (DW:EtOH=99:1)	1	-	-	-	1	-	-	-
2	CaS (100 µg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-
3	CS (100 µg/mL)	1	-	-	-	1	-	-	-
4	FS (100 µg/mL)	-	-	-	-	1	-	-	-

차. 유효물질에 대한 원료화 및 CTFA 등재

세로토닌 유도체의 특성에 따라 다양한 원료화 기술을 사용하여 상업적인 이용이 가능한 원료화를 진행하였다. 원료화 과정에 용해도 점검, 온도에 대한 안정성, 빛에 대한 안정성 및 다양한 조건에서의 안정도도 살펴보았다. 세로토닌 유도체에 대해 확보된 결과를 정리하여 원료에 대한 규격서(Specification)와 물질안전보건데이터(MSDS)를 작성하고 시험 생산된 원료에 대한 시험성적서(Certification) 작성 등을 수행하여 모든 기본 서류를 준비하였다. 최종적으로 이를 활용하여 국제화장품 원료규정집에 등재하였다 (하기 그림 참조, 첨부자료 참고).

[CTFA 등재 자료]

==>세로토닌 유도체의 원료화를 완료하였다. 세로토닌 유도체의 피부투과성과 안정성/안전성을 최적화할 수 있는 리포솜 제형으로 제품을 시험중에 있다(그림 3-42).

INCI Name Application

Administrative Information:

File Number: 2-02-2010-11224
Submitted On: 2/19 9:23:27 PM
Submitted By: biospectrum, biospectrum (BIO/SPECTRUM2090)
 101-701 SK VENTUREM
 322 DANGJUNG DONG
 GUSPO CITY GYUNGGU DO 415-410
 Korea (South)
Phone: +82-31-416-2090 **Fax:** +82-31-416-0402
E-Mail: ksh@biospectrum.com
Company Name: BIOSPECTRUM, INC.
Address: 101-701 SK VENTUREM
 322 DANGJUNG DONG
 GUSPO CITY GYUNGGU DO 415-410
 Korea (South)
Phone: +82-31-416-2090 **Fax:** +82-31-416-0402
Last Reviewed On:
Category: Botanical

International Nomenclature Committee Information

Anticipated Review Date:
Ingredient: Vegetable Based
Trade Name: Coffeylanestromin H
Suggested INCI Name: Coffeylanestromin
References:
 1. Zhang, H. L., Fogarty, S., and Ishikawa, J. Direct non-revision from caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) to 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-dimethylxanthine (1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-dimethylxanthine) (2009)
 2. Song HJ, Song MH, Song K, Lee YJ, Park SH, Yi HyeonJae, *antioxidative component from the seed of Coffea arabica var. C. / Korean Jour. Agric. Chem Biotechnol* 42, 348-352 (1999)
 3. *Scientific Description: 3,7-p-Caffeoyltheobromine, Isolated from Coffea arabica L., 1, 2, 3-Catechol Epoxide, the Hydrolysis of Theobromine and Methylxanthine in Storage with Heat-Photooxidation Factors (HPLC) or Epoxidation Growth Factor (HPLC) / Bioscience, 125, 593-615 (1995)*
 4. Kawahara, Y., Nishida, M., Taki, Y., Kaneko, H., Ding, H.L., Sugita, A., Ishikawa, J., Mizuta, K., Osumi, Y., and Onozaki, K. *Structure-activity, 3,7-p-caffeoyl theobromine, inhibit the production*
CAS Number:
EINECS Number:
ELINCS Number:
Chemical Synonym:
Genus and Species: Coffea arabica
Type of Preparation: Powder
Plant Part Used: whole plant
Composition Statement: Coffeylanestromin, 99%
Manufacturing Method: Coffeylanestromin, 99% normal Dry and 100% Ethanol extraction—Concentration—Purification—Silica Column Chromatography—Concentration—HPLC—Purification—Quality analysis—Product—Packaging—Store
Solvent or Diluent: None
Function: Skin Promotant
Other Functions:
Empirical Formula:
Chemical Structure: Attached

Attachments (CAS Reports, Literature References, etc.):

Uploaded File Name	Stored File Name
Coffeylanestromin H	Page 1
Application Number: 2-02-2010-11224	Print Date: 02/04/10 12:42

INCI Name Application

Administrative Information:

File Number: 2-02-2010-11226
Submitted On: 2/19 9:29:36 PM
Submitted By: biospectrum, biospectrum (BIO/SPECTRUM2090)
 101-701 SK VENTUREM
 322 DANGJUNG DONG
 GUSPO CITY GYUNGGU DO 415-410
 Korea (South)
Phone: +82-31-416-2090 **Fax:** +82-31-416-0402
E-Mail: ksh@biospectrum.com
Company Name: BIOSPECTRUM, INC.
Address: 101-701 SK VENTUREM
 322 DANGJUNG DONG
 GUSPO CITY GYUNGGU DO 415-410
 Korea (South)
Phone: +82-31-416-2090 **Fax:** +82-31-416-0402
Last Reviewed On:
Category: Botanical

International Nomenclature Committee Information

Anticipated Review Date:
Ingredient: Vegetable Based
Trade Name: Coffeylanestromin H
Suggested INCI Name: Coffeylanestromin
References:
 1. Lee B Park, *Structure and caffeine-like molecule theobromine-stimulated cAMP formation via 5-HT1 receptors*, The FASEB Journal, 2006,22:158-2
 2. Park M, Kang K, Park S, Kim YJ, Ha SH, Lee SW, Ahn MJ, Bae DH, Baik K. *Expression of theobromine derivative (synthetic) genes on a single cell-producing polypropylene and the production of theobromine derivative in microtiter*. Appl Microbiol Biotechnol. 41(1):41-9. (2005)
CAS Number:
EINECS Number:
ELINCS Number:
Chemical Synonym:
Genus and Species: Coffea Canaphora
Type of Preparation: Powder
Plant Part Used: Branch, Leaf
Composition Statement: Coffeylanestromin, 99%
Manufacturing Method: Coffea Canaphora, 99% normal Dry and 100% Ethanol extraction—Concentration—Purification—Silica Column Chromatography—Concentration—HPLC—Purification—Quality analysis—Product—Packaging—Store
Solvent or Diluent: None
Function: Skin Promotant
Other Functions:
Empirical Formula:
Chemical Structure: Attached

Attachments (CAS Reports, Literature References, etc.):

Uploaded File Name	Stored File Name
Coffeylanestromin structure.pdf	2-02-2010-11226_1.pdf
caffeylanestromin.pdf.pdf	2-02-2010-11226_2.pdf
caffeylanestromin.pdf	2-02-2010-11226_3.pdf

Trade Name: Coffeylanestromin H **Page:** 1
Application Number: 2-02-2010-11226 **Print Date:** 02/04/10 12:40

INCI Name Application

Administrative Information:

File Number: 2-02-2010-112215
 Submitted On: 2/4/10 9:28:33 PM
 Submitted By: biospectrum biospectrum (BIOSPECTRUM2010)
 101-701 SK VENTURE
 323 DANGNUNG-DONG
 GUNPO CITY GYUNGGI DO 415-010
 Korea (South)
 Phone: +82-31-436-2090 Fax: +82-31-436-0603
 E-Mail: ksh@biospectrum.com
 Company Name: BIOSPECTRUM INC
 Address: 101-701 SK VENTURE
 323 DANGNUNG-DONG
 GUNPO CITY GYUNGGI DO 415-010
 Korea (South)
 Phone: +82-31-436-2090 Fax: +82-31-436-0603
 Last Revised On:
 Category: Botanical

International Nomenclature Committee Information

Anticipated Review Date:
 Ingredient: Vegetable Based

Trade Name: Feruloylserotonin H
 Ingressed INCI Name: Feruloylserotonin
 Reference: 1.Zhang, H. L., Magatao, A. and Sakakibara, T. Novel anti-oxidant from coffee (Coffea
 racemosa L.) oil cake. Chem. Pharm. Bull. 44, 874-876 (1996)
 2.Bang SI, Bang MH, Song X, Lee SY, Park SK, 35-feruloylserotonin, antioxidant component from
 the seed of Coffea racemosa L. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 42, 366-368. (1999)
 3.Katada S, Suzuki K, Koyama H, Takahashi M, Miyata M, Harano A, Takayama E. Sulfonamide
 polyphenols (5-(p-coumaroylserotonin and 5-feruloylserotonin) acetylserine ethylester) and
 distalubiquin of the outer wall in Kava-kava and Kava-piperidine-molecule (KPC) tablet.
 Hypertens Res. 32(1):944-9. (2009)
 4.Ly D, Kong K, Choi JY, Jilchava A, Bock K, Lee SG. HPLC analysis of serotonin, tryptamine,
 tyramine, and the hydroxytryptamine acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. J Med Fo

CAS Number:
 EINECS Number:
 EELNCS Number:
 Chemical Synonym:
 Common and Species: Coffea: Tinctura
 Type of Preparation: Powder
 Plant Part Used: whole plant
 Composition Information: Feruloylserotonin, 50%
 Manufacturing Method: Coffea: Tinctura, Raw material Dry and Smash--70% Ethanol
 extraction--Concentration--Purification--Silica Column Chromatography--Concentration--HPLC
 --Purification--Quality analysis--Product--Packing--Uses
 Substrate or Diluent: None
 Function: Skin Promoter
 Other Function:
 Empirical Formula:
 Chemical Structure: Attached

Attachments (CAS Reports, Literature References, etc.):

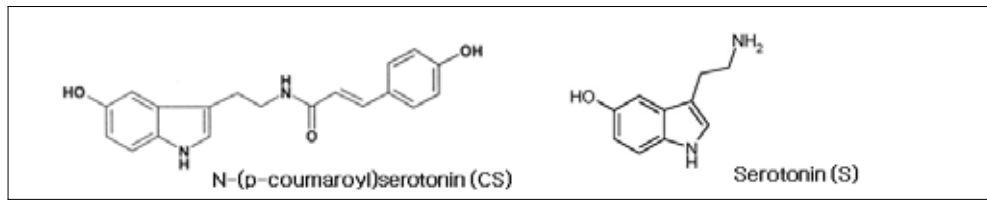
[Uploaded File Name](#) | [Stored File Name](#)

Trade Name: Feruloylserotonin H
 Application Number: 2-02-2010-112215 Page: 1
 Print Date: 02/04/10 21:42

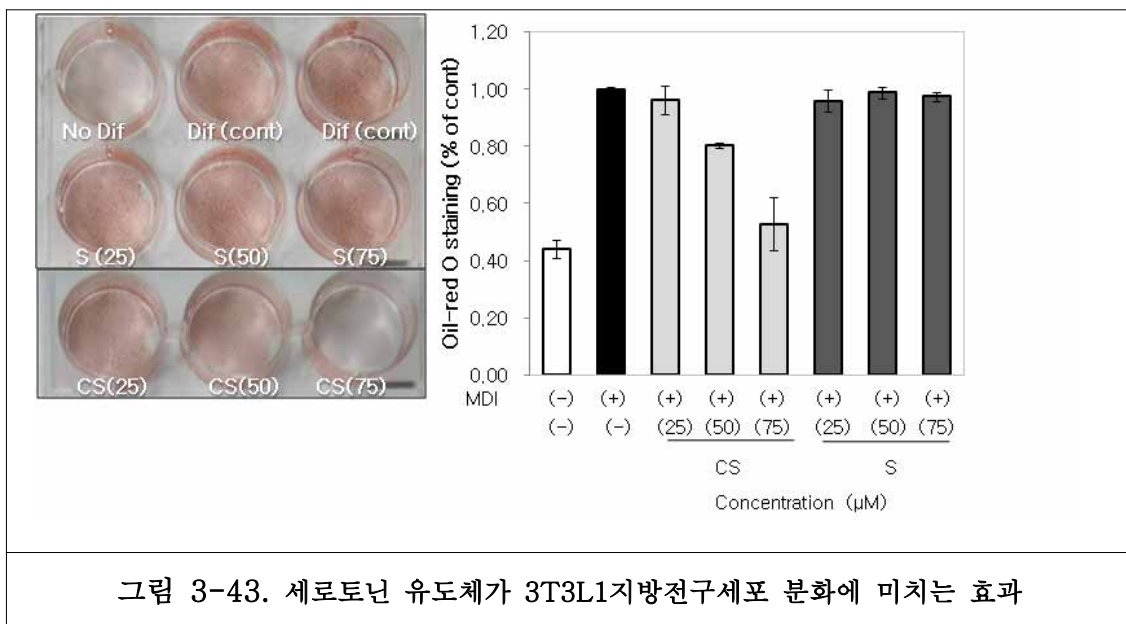


그림 3-42. Photograph of samples: Caffeoylserotonin, feruloylserotonin, coumaroylserotonin

카. 세로토닌과 쿠마로일세로토닌 전구체가 3T3L1지방전구세포 분화에 미치는 영향 비교



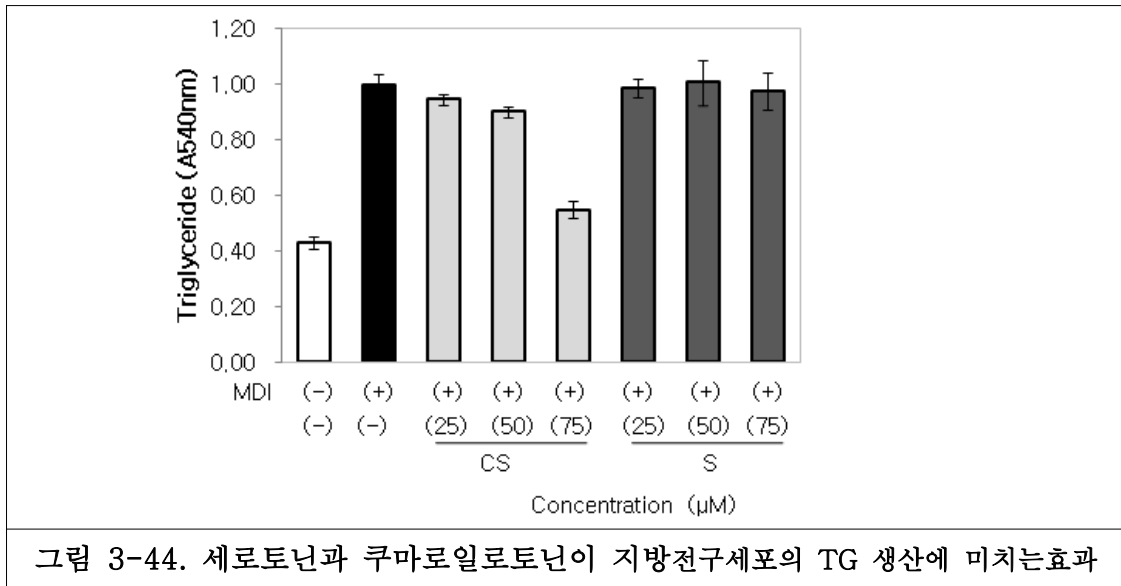
세로토닌 유도체 중 열과 pH 안정성 시험에서 가장 우수한 안정성을 보인 coumarylserotonin의 전구지방세포 분화억제능을 신경전달물질로 알려진 세로토닌과 함께 비교하였다. 세로토닌은 뇌 시상하부에서 분비되는 신경전달물질로 비만의 주요 표적으로도 여겨지고 있다. 2003년 'Diabetes'에 발표된 연구결과에 따르면 serotonin 5-HT(2c) 수용체가 결실되면 에너지 대사가 하락하여 몸에 살이 많이 붙게 된다고 보고되었다. 실제로 이들 수용체를 표적으로 하는 ATHX-105나 로카세린과 같은 비만 치료제들이 개발되고 있으나 지방전구세포의 분화미치는 연구는 미비한 상황이다.



coumarylserotonin의 경우 이전시험에서와 같이 지방전구세포 분화를 억제하는 결과를 보인 반면 세로토닌은 지방전구세포 분화에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다(그림 3-43).

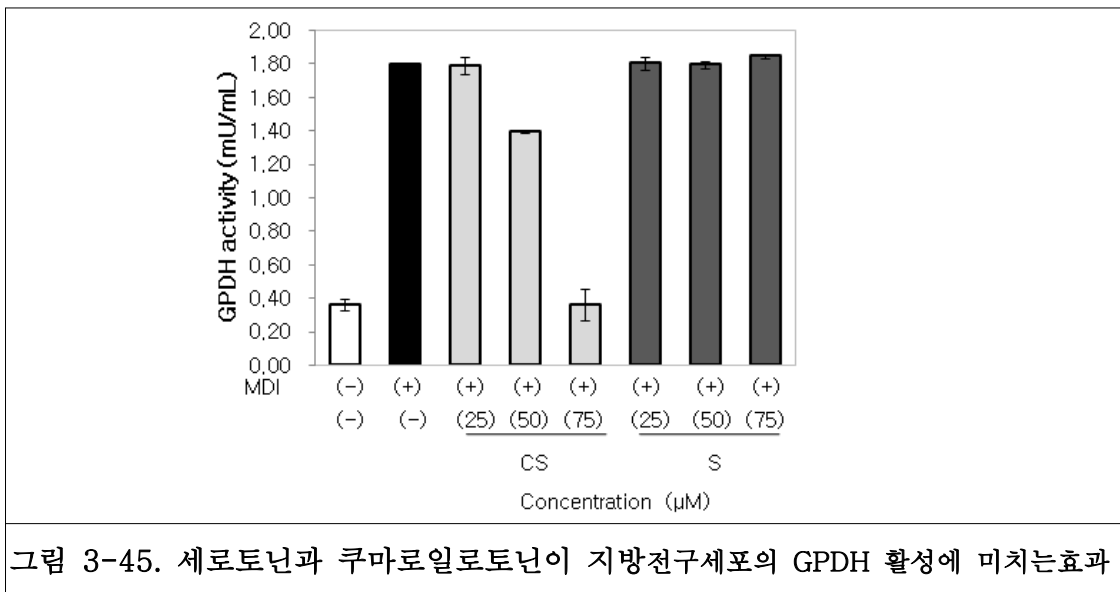
세로토닌과 쿠마로일세로토닌 전구체가 트리글리세라이드생성에 미치는 영향 비교

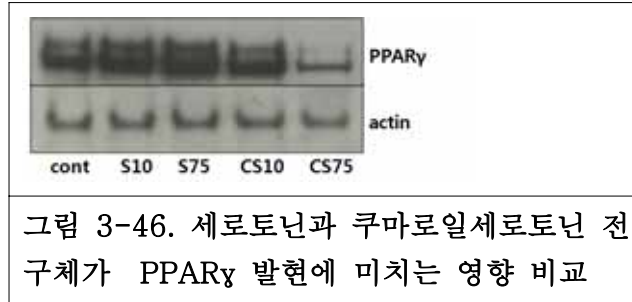
TG assay kit를 이용하여 지방전구세포의 TG생성에 미치는 coumarylserotonin과 serotonin의 효과를 관찰한 결과 coumarylserotonin이 농도의존적으로 TG 생산을 억제하는 결과를 보였다(그림 3-44).



세로토닌과 쿠마로일세로토닌 전구체가 GPDH활성에 미치는 영향 비교

또한 지방 축적에 관여하는 효소 중 하나인 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)는 지방세포로 분화가 진행될수록 발현이 증가하며, 세포 내 지방축적에 관여하는 것으로 알려져 있다. GPDH activity assay kit를 이용하여 지방전구세포의 GPDH 활성에 미치는 coumarylserotonin과 serotonin의 효과를 관찰한 결과 coumarylserotonin이 농도의존적으로 GPDH 활성을 억제하는 결과를 보였다. 세로토닌의 경우 유의한 변화를 보이지 않았다(그림3-45). 또한 GPDH 활성이 지방분화의 중요 조절자인 PPAR γ 의 발현 억제를 통해 이루어지고 있음을 확인하였다(그림3-46).





타. 원료 제형연구 (피부투과도 및 안정성 향상)

*** 소재의 고급 리포솜 원료화**

특정 유효성분이 피부에 대한 효능을 나타내기 위해서는 피부 진피층 내까지 전달가능한 기술을 응용하는 게 필요하다. 그러므로, coumarylserotonin를 나노리포솜화하여 원료 제품화하였다. 또한 나노 리포솜화한 원료가 실제 피부내로 어느정도 투과되는 지에 대한 피부투과 시험을 실시하였다.

경피흡수는 털을 제거한 기니아 피그(Jackson Laboratories) 피부를 대상으로 프란츠 투과셀 (PermeGear, Inc.)을 이용하여 측정하였다. 시험 직전, 털을 제거한 기니아 피그의 복부 부분의 피부를 채취하여, 평방 1cm²의 면적으로 절단한 후, 이를 투과경의 직경이 0.9cm인 투과셀에 장착하고, 클램프로 고정하였다. 피부의 한쪽면(donor 용기)은 coumarylserotonin와 coumarylserotonin-liposome원료 0.5ml를 각각 넣어주었다. 반대쪽 면(receptor 용기)은 정제수와 에탄올이 4:1 중량비로 혼합된 용매와 접촉하도록 하였으며, 시험시 온도는 실제피부 온도인 32℃를 유지하였다. 시험 시작 후, 일정 시간 간격으로 용매의 일부를 채취한 후, 피부를 통과한 coumarylserotonin의 양을 측정하여, 도포 농도 당 피부흡수량($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{중량}\%$)으로 나타내었으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. Coumarylserotonin의 정량 분석은 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 방법으로 수행하였으며, 그 조건은 각각 다음과 같다:

[고속 액체 크로마토그래피 방법]

- 기 기 : Waters 600 controller with 616 pump, 717 plus autosampler
- 컬 럼 : ABBOTA Abbosil C18, 5 μm , 4.6 X 150 mm
- 이 동 상 : 25% A (0-10 min), gradient to 100% A (10-30 min),
A: MeCN, B: Water.
- 유 속 : 1 mL/min
- 검 출 기 : Waters 996 PDA and Sedex55 ELSD (Sedere, Frances)
- 주 입 량 : 20 μL
- 가동시간 : 30 min

평가방법: 기니아 피부 피부를 통과한 coumarylserotonin의 함량 측정을 통해, 경피 흡수 정도를 판단한다.

-시험결과 요약-

【표 1】 coumarylserotonin의 경피흡수량 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

구분	시료	경과시간(hour)												평균			
		1회차				2회차				3회차							
		0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12
경피잔류	coumarylserotonin	0	14	15	17	0	13	16	18	0	13	14	17	0	13.3	15	17
	coumarylserotonin-liposome	0	26	80	125	0	27	68	119	0	30	81	133	0	27.6	76.3	125.6

평가

상기한 표 1의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, coumarylserotonin 자체만을 이용하였을 경우, 피부내로 coumarylserotonin이 거의 이동되지 못한 것을 알 수 있다. 반면, coumarylserotonin-liposome의 경우, 시간 의존적으로 coumarylserotonin 이 피부내로 흡수됨을 관찰할 수 있었다. 따라서, coumarylserotonin-liposome은 coumarylserotonin의 피부투과도를 현저히 향상시키고 있음을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

*** 리포솜원료내에서 안정성 평가**

리포솜 제형 내의 의 온도와 빛에 대한 안정성

리포솜 제형 내의 coumarylserotonin의 온도와 빛에 대한 안정성을 확인하기 위하여 coumarylserotonin 을 0.1%를 함유하는 리포솜제형을 제조하였으며, 실험 조건은 25℃와 50℃에서 명상태와 암상태를 유지하며, 1개월간 원료내의 coumarylserotonin의 함량을 측정하였다. 그 결과 일반 butylene glycol제형에서 50℃, 명상태에서 1주부터 coumarylserotonin 의 함량이 감소하여, 4주차에서 약 20%의 coumarylserotonin 의 함량이 감소하였으나, 리포솜 제형에서 coumarylserotonin의 함량이 1개월간 유지되어 안정함을 확인하였다(그림 3-47). 안정성이 확인된 coumarylserotonin 이 함유된 시제품을 Genophyto Emotique 바디쉐이핑 에센스로 제작하였다(그림 3-48).

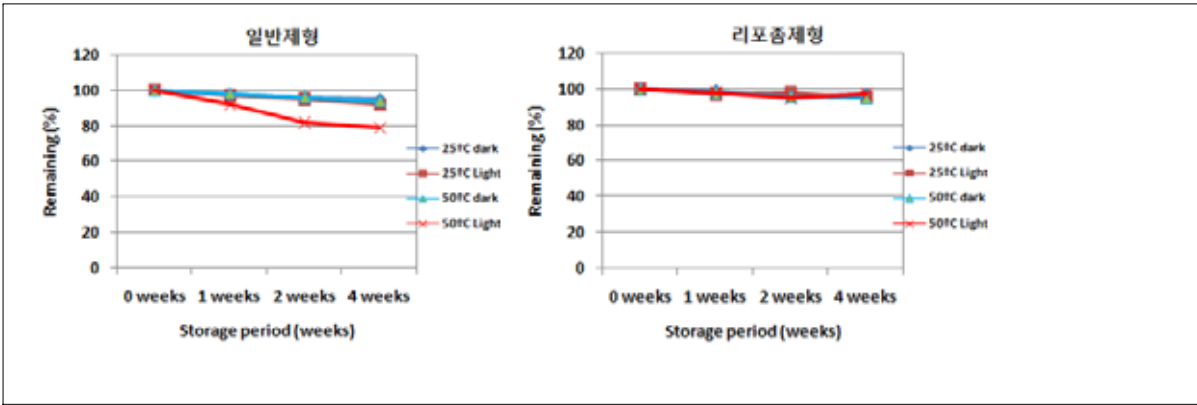


그림 3-47. Stability of coumaroylserotonin against temperature and light in Butylene glycol (1), and liposome formulation.

파. 시제품 개발



그림 3-48. Coumaroylserotonin 함유 기능성 화장품 시제품

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	1세부과제: 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 연구	세로토닌유도체 생산을 위한 재조합 대장균 제작	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 4CL2 와 SHT 재조합 유전자 발현 벡터 구축에기장대 ○ 4CL2(At4CL2) 와 SHT 발현 재조합 대장균의 효소활성 연구
		대장균에서 세로토닌유도체 대량생산 조직 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기질 농도 조합 통한 세로토닌유도체 최적화 조건 규명 ○ 세로토닌유도체 최대 생산을 위한 specific 처리 조건 규명
	2세부과제: 세로토닌유도체 의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능 분석	정제된 폴리페놀계 화합물 (CS, FS, CaS)의 항산화활성 기전규명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세로토닌 유도체 3종과 바이오아민의 항산화활성 분석 ○ ROS생성 및 지질 과산화 억제 효능 분석
		CaS의 피부세포 성장에 미치는 영향 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세포주기를 억제 시킨 피부세포에서 CaS가 세포 성장을 촉진 시키는 기전 분석 ○ 유전자 발현 분석
	1협동과제: 세로토닌유도체 를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발	세로토닌전구체의 미백효능 평가	100	○ B16 melanoma 세포에서 멜라닌합성양 측정
		세로토닌전구체의 항염효능 평가	100	○ NIH3T3 세포에서 Nf-kB luc 활성 측정
		세로토닌전구체의 주름효능 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체유래섬유아세포에서 콜라겐 합성측정 ○ 인체유래섬유아세포에서 콜라게네이즈 억제력 측정
		세로토닌전구체의 항비만효 능평가	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3T3L1 지방전구세포 분화억제력 측정 (oil-red Oduatorqjq) ○ 3T3L1 세포의 TG 생성억제력 측정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2009)	1세부과제: 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 연구	4CL isozyme(4CL1)과 SHT 유전자 발현 통한 세로토닌 유도체 생산 효과 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 4CL1 와 SHT 재조합 유전자 발현 벡터 구축 ○ 4CL1(At4CL1) 와 SHT 발현 재조합 대장균의 에서 세로토닌유도체 생산 연구 ○ SHT 및 4CL2 유전자의 periplasm 발현 가능성 검정
		4CL 과 THT 유전자 발현 통한 티라민유도체 생산 효 과 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 4CL2 와 THT 재조합 유전자 발현 벡터 구축 ○ 4CL2(At4CL2) 와 THT 발현 재조합 대장균의 에서 티라민유도체 생산 연구
	2세부과제: 세로토닌유도체 의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능 분석	CaS의 항산화 및 항노화 효 능 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산화적 스트레스로 인한 double strand DNA break과 같은 DNA 손상을 감지하는 H2AX 단백질의 인산화에 세로토닌 유도체의 항산화 활성 분석 ○ 산화적 스트레스로 인한 세포내 단백질의 carbonylation에 미치는 영향 분석 ○ 항노화 활성 분석을 위해 dermal fibroblast 배양 및 조건 확립
		CaS의 항염증 효능 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 단핵구 THP-1세포를 이용하여 CaS의 항염증 효능 분석 ○ THP-1 adhesion/migration 억제 활성 분석
	1협동과제: 세로토닌유도체 를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발	CaS의 미백기전 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ Human melanocyte에서 미백효능평가 ○ Melanin 생성관련 tyrosinase, TRP-1,2, MITF등 신호전달 분석
		CaS의 원료화 제형화연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 제형내에서의 시험물질에 대한 안정성(빛, 온도, pH 등), 평가 ○ 시험물질의 안정성, 안전성 및 피부투과도를 증가시킬 수 있는 원료제형개발
		세로토닌유도체의 인체 안전 성시험	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 피부일자자극시험을 통한 인체안전성 평가

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2010)	1세부과제: 재조합 대장균을 이용한 세로토닌유도체 대량생산 연구	Rice 4CL 과 SHT 유전자 발 현 통한 세로토닌유도체 생 산 효과 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rice 4CL 와 SHT 재조합 유전자 발현 벡터 구축 ○ Rice 4CL 와 SHT 발현 재조합 대장균의 에서 세로토닌유도체 생산 연구
		대장균에서 TDC 와 T5H 유 전자 공동발현에 의한 세로 토닌 기질생산 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rice TDC 와 T5H 재조합 유전자 발현 벡터 구축 ○ Rice TDC 와 T5H 발현 재조합 대장균의 에서 세로토닌 기질 수율 향상에 대한 연구
	2세부과제: 세로토닌유도체 의 항염증성 피부질환 개선제로서의 효능 분석	CaS의 항산화 활성에 관여하 는 유전자 및 전사조절 인자 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산화적 스트레스를 가한 HaCaT 세포의 세포 사멸을 억제하는 유전자 발굴 및 분석 ○ 신호전달 저해제를 이용하여 CaS의 피부세포 생리활성 증진 기전 규명
		CaS의 항염증 효능에 관여하 는 기전 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ CaS가 단핵구 THP-1 세포의 이동 및 침투에 억제효능에 관여하는 전사조절 인자 및 산화전달 인자 규명 ○ 신호전달 저해제를 이용한 작용기전 검증 및 과민 반응에 CaS의 약리 작용 기전 분석
	1협동과제: 세로토닌유도체 를 이용한 기능성 화장품 소재 및 제품개발	세로토닌유도체 지방세포분 화억제기전연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 지방전구세포 3T3L1 분화 억제 효능 측정 ○ 지방전구세포분화억제 signal규명
		세로토닌유도체 원료/제형내 안정화, 피부투과기술개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험물질의 안정성 및 피부 투과도를 증가시킬 수 있는 원료 제형 개발 ○ 개발제품의 빛, 온도 pH 안정성 및 투과도 측정
		세로토닌함유 시제품개발	100	○ 세로토닌함유 시제품개발 (슬리밍)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구 성과

본 연구의 1-3년차 연구로 통해 4CL 유전자와 SHT 유전자를 대장균에 동시발현 시킴으로써, 세로토닌유도체를 대장균에서 대량 생산 할 수 있는 자료를 제공하였다. 또한 P450 효소인 T5H 유전자와 TDC 유전자를 동시발현 시킴으로써, 대장균에서 세로토닌을 생산할 수 있는 발현 시스템을 개발하였다. 세로토닌유도체는 radical을 제거하는 항산화 활성이 탁월하였으며, 피부세포와 간세포를 이용한 세포 실험에서도 높은 H2AX의 인산화를 가장 강력하게 억제하였으며, serotonin이 그 뒤를 이었으나, CS, FS는 이러한 활성을 보이지 않았다. 또한 산화적 스트레스에 의해 단백질의 carbonylation 또한 증가하는데 0.5 mM H2O2를 처리한 HaCaT 세포의 단백질의 carbonyl content가 증가함을 관찰하였다. 산화적 스트레스에 의한 carbonylation을 억제하는 활성은 SR가 가장 높았으며, FS, CaS가 그 뒤를 이었다. 또한 세로토닌 유도체들의 피부세포에 대한 효능을 관찰한 결과 CaS와 CS가 유의한 미백활성을 보였으며, CaS의 경우 피부상처시 흉터형성에 참여하는 콜라겐생산, TGF-beta생산, 그리고 fibronectin 생산을 억제하여 향후 상처치료물질로서의 가능성을 보였다. 또한 CaS와 CS, FS 모두 지방전구세포의 분화를 억제하는 결과를 보였고 이들 물질의 화장품 원료로서의 안정성을 관찰한 결과 CS와 FS가 열과 pH에 안정한 결과를 보였다. 열과 pH에 안정한 CS의 지방전구세포 분화억제 효과를 세로토닌과 함께 비교한 결과, CS가 유의하게 지방전구세포 분화, tri-glyceride 생산, GPDH 활성 등을 억제하였으며, 이는 지방분화의 중요 조절자인 PPAR γ 의 발현 억제를 통해 이루어짐을 확인하였다. 이들 세로토닌 유도체는 국제화장품 규격집인 CTFA에 등록을 마쳤으며, 리포솜원료화를 통해 물질안정성과 피부침투력을 향상시켰다. 결론적으로, 본 연구과제를 통해 CS, CaS, FS의 피부에서의 활성을 검색하고 화장품원료화시험을 수행함으로써 기능성 피부소재 개발의 발판을 마련하였다.

1. SCI 논문 게재

- (1) Kang K, Back K (2009) Production of phenylpropanoid amides in recombinant *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 11(1): 64-68. IF: 4.7.
- (2) Kang K, Park S, kim YS, Lee S, Back K (2009) Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(1): 27-34. IF: 2.47

- (3) Kang K, Park M, Park S, Kim YS, Lee S, Lee SG, Back K (2009) Production of plant-specific tyramine derivatives by dual expression of tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase and 4-coumarate:coenzyme A ligase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 31(9): 1469-1475. IF: 1.13
- (4) Choi JY, Kim H, Choi YJ, Ishihara A, Back K, Lee SG (2010) Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in HepG2 and HaCaT cells. *Fitoterapia* 81: 1134-1141. IF 1.899
- (5) Park S, Kang K, Natsagdorj U, Lee SW, Ahn MJ, Bae JM, Back K (2011) Production of serotonin by dual expression of tryptophan decarboxylase and tryptamine 5-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(5): 1387-1394. IF: 2.896

2. 특허등록

4CL 유전자 및 SHT 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 그에 의해 형질전환된 세균 및 이를 이용한 페닐프로파노이드 아미드계 화합물의 생산방법 (출원일 2008. 03. 11, 출원번호 10-2008-0022494, 등록일 2010. 06. 16, 등록번호 10-0965984)

3. 기술이전

- 연구개발과제명 : 재조합 대장균으로부터 세로토닌유도체 생산과 기능성 화장품 소재개발 및 제품화
- 총 연구개발비 : 480,000천원 (정부출연금액 : 360,000천원, 참여기업부담금액 : 120,000천원)
- 기술료 징수액 : 50,400천원 (정부출연금액의 14%)
- 기술사용기간 : 8년 (2011년 1월 1일 ~ 2019년 12월 31일)
- 계약당사자
 - (갑) 주관연구기관 : 전남대학교 산학협력단
 - (을) 실시기업(참여기업) : 바이오스펙트럼(주)
- 기술 : 4CL 유전자 및 SHT 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 그에 의해 형질전환된 세균 및 이를 이용한 페닐프로파노이드 아미드계 화합물의 생산방법 (특허등록 제10-0965984호, 등록일 : 2010년 6월 16일)"

4. 세로토닌유도체 이용한 기능성화장품 시제품 1건 개발

제품명: Genophyto Emotique 바디쉐이핑 에센스

제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구 결과에서 얻어진 세로토닌유도체 생합성을 위한 metabolic engineering 기술은 다음과 같이 요약된다. 첫째로 4CL 유전자와 SHT 유전자의 공동발현으로 기질인 세로토닌과 phenolic 화합물을 공급하여 줄때, 대장균에서 4CL 효소에 의해 활성화된 phenolic 화합물 (Phenolic-CoA forms)을 생합성하고, 이를 이용하여 SHT 효소가 세로토닌과 phenolic-CoA 기질을 중합하여 세로토닌 유도체를 대장균내에서 생합성하게 하는 생물학적 방법을 개발한 것이 주요한 성과라 할 수 있다. 또한 이러한 식물유래 세로토닌유도체의 생물학적 효용성을 검증하기 위해 항산화활성 능력 및 피부노화 억제 등의 활성을 이용하여 기능성 화장품 원료 소재로서의 이용을 연구함으로써 추후 상업적 응용이 가능할 것으로 예측된다.

가. 세로토닌생합성 유전자(TDC 와 T5H)와 4CL + SHT 유전자 공동발현을 통한 세로토닌 유도체 화합물 생산 기술 개발

본 연구결과에서 도출된 idea를 이용하여, 대장균에 세로토닌유도체를 세로토닌 기질투여 없이 고 함량으로 증대시키기 위해서는 serotonin을 생합성하는 key 유전자인 두 개의 효소 TDC + T5H 을 발현 시켜야 한다. TDC+T5H 공동발현하는 대장균과 본 연구의 4CL+SHT 유전자를 공동으로 발현하는 대장균을 공동배양하면, 세로토닌의 첨가 없이, phenolic 화합물의 단일 첨가에 의해서도 세로토닌유도체를 대장균에서 생합성 할 수 있는 대장균을 획득 할 수 있을 것이다. 추후 연구 사업으로 통해 serotonin 유도체의 metabolic engineering을 위한 실용적인 대안을 획득 할 것으로 사료된다.

나. 세로토닌유도체의 생물학적 특성 연구개발

세로토닌 유도체들의 피부세포에 대한 효능을 관찰한 결과 CaS와 CS가 유의한 미백활성을 보였으며, CaS의 경우 피부상처시 흉터형성에 참여하는 콜라겐생산, TGF-beta생산, 그리고 fibronectin 생산을 억제하여 향후 상처치료물질로서의 가능성을 보였다. Fibrosis 증상과 관련한 타분야의 질환으로 간경화 질환을 들 수 있다. CaS의 경우 간세포를 이용 간경화 치료연구로도 적용이 가능할 것으로 사려된다. 지방세포연구에서 CaS와 CS, FS 모두 지방전구세포의 분화를 억제하는 결과를 보였다. 이들 물질은 비만관련 원료로의 응용뿐 아니라 비만과 밀접히 관련되어있는 대사성 질환인 당뇨연구에도 응용이 가능할 것으로 추측된다. 최근 연구발표에 따르면 비만과 당뇨를 악화시키는 인자로 염증성 인자들과 산화스트레스등을 뽑고 있다. 세로토닌 유도체의 경우 우수한 항산화능력과 항염증 효과를 지녀 이러한 인자에 의해 악화되는 대사성 질환에로의 적용도 적극 모색해 볼 수 있다.

다. 세로토닌유도체의 화장품소재로서의 이용 실용화

본 연구를 통해 세로토닌 유도체는 국제화장품 규격집인 CTFA에 등록을 마쳤으며, 리포솜 원료화를 통해 물질안정성과 피부침투력을 향상시켰다. 또한 피부자극 시험을 거쳐 인체안정성을 확인하였다. 이로써 세로토닌 유도체의 화장품 원료로의 적용과 상업적 이용의 길을 마련하였다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

가. 2010년: 벼에서 MAP based cloning 기법 통한 세로토닌 생합성 유전자 T5H 클로닝

일본 Nara 과학기술연구소의 Ko Shimamoto group은 세로토닌 생합성의 최종 유전자인 tryptamine 5-hydroxylase (T5H) 유전자를 돌연변이 벼인 Sekiguchi line(sl line)으로부터 map base cloning 방법으로 클로닝하였다(Fujiwara et al., 2010). Sekiguchi line은 T5H 기질인 tryptamine이 과량축적되는 특징을 지니고 있어, T5H 유전자 돌연변이체로 추정되었다. T5H 유전자는 cytochrome P450 계통으로 CYP71P1 으로 분류되었다. Insect cells 을 이용한 recombinant T5H 효소는 tryptamine을 기질로 이용하여 serotonin을 생성함을 확인하였다. T5H 유전자의 발현은 chitin 과 병원균(*Magnaporthe grisea*) 감염에 유도되는 특징을 보였으며, 외부에서 serotonin을 벼에 처리시 병원균(*Magnaporthe grisea*) 감염에 저항성을 보여 주는 특징을 보였다. 세로토닌 유도 병원균 방어기작 유전자의 발현은 RacGTPase 경로를 통하여 유도됨을 보고하였다. Map based cloning 방법과 다르게 본 연구진은 벼 P450 유전자 150 여개를 효모에 발현시켜, tryptamine 처리에 의해 세로토닌이 생성되는 형질전환 효모 line을 선발하는 assay 방법으로 T5H 유전자를 클로닝하였으며, 추가적인 실험을 진행 중이다.

나. 2009년: Nb-(a-hydroxynaphthoyl)serotonin의 JAK3 활성저해 능력

식물 추출물 library로부터 JAK/STAT 신호전달 저해제를 screening 하는 동안에 MS-1020 화합물로 명명된 세로토닌유도체 Nb-(a-hydroxynaphthoyl)serotonin를 동정하였다. MS1020 물질은 신규한 JAK3 저해제이다. 또한 MS1020은 STAT3 을 세포 특이적 mode 로 저해하는 특성을 보인다. MS1020은 선택적으로 JAK3을 억제하고, interleukin2 유도 JAK3/STAT5 신호전달을 차단한다. 그러나, prolactin 유도 JAK3/STAT5 신호는 저해하지 않는 특성을 보인다. 특이하게도, MS1020 은 JAK3/STAT5을 항상유도하는 암세포에 특이하게 cell viability 를 보여준다. in vitro kinase 활성조사에 의하면, MS1020 이 JAK3에 직접적으로 결합하여 선택적으로 JAK3을 저해하고, 이어서 STAT 신호를 저해하는 것으로 비정상적으로 JAK3 신호를 저해하는 암세포의 치료제로서의 약리적 활성이 있는 것으로 보고하였다.

다. 세로토닌유도체의 생물학적 특성 연구개발

2009년 Koyama N 그룹의 발표에 따르면 세로토닌 유도체를 포함하는 홍화씨추출물이 인체 심혈관질환 개선에 유의한 효과를 보이는 결과를 발표하였으며, 같은 해 Hypertension Research 에 실린 Katsuda1 S 실험그룹의 실험에 따르면 FS와, CS가 Local PWV (pulse wave velocity)

를 낮추는 기전을 통해 심혈관위험을 낮추는 것으로 보고하였다. 본 과제를 수행하고 있는 이성진 교수팀(2010년)은 세로토닌 유도체가 강력한 항산화 효과를 통해 활성산소로부터 피부각질형성세포와 간세포를 보호하는 기능을 보고하였다.

라. 세로토닌유도체의 화장품소재로서의 이용 실용화

연구개발 과정동안 수집한 정보에 의하면 세로토닌유도체를 이용한 화장품원료개발이나 화장품 제품개발건은 아직 보고되지 않고 있다. 다만 국내 화장품 회사 중 사임당에서 세로토닌 유도체 인 CS, FS를 주요성분으로 함유하고 있는 홍화씨 추출물을 미백소재로 개발한 사례가 보고되어 있다.

제 7 장 참고문헌

- Back K, Jang SM, Lee BC, Schmidt A, Strack D, Kim KM** (2001) Cloning and characterization of a hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase induced in response to UV-C and wounding from *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol* 42:475-481
- Back K, Yin S, Chappell J** (1994) Expression of a plant sesquiterpene cyclase gene in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 315:527-532
- Beekwilder J, Wolswinkel R, Jonker H, Hall R, Ric de Vos CH** (2006) Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5670-5672.
- Chemler JA, Yan Y, Leonard E, Koffas MAG** (2007) Combinatorial mutasynthesis of flavonoid analogues from acrylic acids in microorganisms. *Org. Lett.* 9, 1855-1858.
- Choi JY, Kim H** (2010) Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in HepG2 and HaCaT cells. *Fitoterapia.* 81(8), 1134-41.
- Ehltling J, Buttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich I.E, Kombrink E** (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* 19, 9-20.
- Efdi M, Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y, Koketsu M, Ishihara H** (2007) *N*-trans-Feruloyltyramine as a melanin biosynthesis inhibitor. *Biol Pharm Bull* 30:1972-1974
- Facchini PJ, Hagel J, Zulak KG** (2002) Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* 80, 577-589.
- Farmer MJ, Czernic P, Michael A, Negrel J** (1999) Identification of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco. *Eur. J. Biochem.* 263, 686-694.
- Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutanin M, Chen L, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K** (2010) Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J. Biol. Chem.* 285, 11308-11313.
- Hagel JM, Facchini PJ** (2005) Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves. *Planta* 221, 904-914
- Hohlfeld H, Schurmann W, Scheel D, Strack D** (1995) Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl-coenzyme A:tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol.* 107, 545-552.

- Ishihara A, Kawata N, Matsukawa T, Iwamura H** (2000) Induction of N-hydroxycinnamoyltyramine synthesis and tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase (THT) activity by wounding in maize leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1025-1031.
- Ishihara A, Hashimoto Y, Tanaka C, Dubouzet JG, Nakao T, Matsuda F, Nishioka T, Miyagawa H, Wakasa K** (2008) The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J.* 54, 481-495.
- Jang SM, Ishihara A, Back K** (2004) Production of coumaroylserotonin and feruloylserotonin in transgenic rice expressing pepper hydroxycinnamoylcoenzyme A:serotonin N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *Plant Physiol.* 135, 346-356.
- Kang S, Back K** (2006) Enriched production of N-hydroxycinnamic acid amides and biogenic amines in pepper (*Capsicum annuum*) flowers. *Sci. Hortic.* 108, 337 - 341.
- Kang S, Kang K, Chung GC, Choi D, Ishihara A, Lee DS, Back K** (2006) Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin N-hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiol.* 140, 704-715.
- Kang S, Kang K, Lee K, Back K** (2007) Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep.* 26, 2009-2015.
- Kang K, Park S, Kim YS, Lee S, Back K** (2009) Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 83, 27-34.
- Kang K, Park S, Kim YS, K Lee, Ishihara A, Back K** (2010) Induced synthesis of caffeoylserotonin in pepper fruits upon infection by the anthracnose fungus, *Colletotrichum gleosporioides*. *Scientia Horticulturae.* 124, 290-293.
- Katsuda S, Suzuki K, Koyama N** (2009) Safflower seed polyphenols (N-(p-coumaroyl)serotonin and N-feruloylserotonin) ameliorate atherosclerosis and distensibility of the aortic wall in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Hypertens Res.* 32(11), 944-9.
- Katsuyama Y, Funa N, Miyahisa I, Horinouchi S** (2007) Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem. Bio.* 14, 613 - 621.
- Koyama N, Suzuki K, Furukawa Y** (2009) Effects of safflower seed extract supplementation on oxidation and cardiovascular risk markers in healthy human volunteers. *Br J Nutr.* 101(4), 568-75.
- Lee DE, Kang K, Lee SG, Back K** (2007) Enhanced synthesis of feruloyltyramine and 4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase. *Plant Sci.* 172, 57-63

- Ly D, Kang K, Choi J, Isihara A, Back K, Lee SG** (2008) HPLC Analysis of Serotonin, Tryptamine, Tyramine, and the Hydroxycinnamic Acid Amides of Serotonin and Tyramine in Food Vegetables. *J Med Food*. 11, 385-389.
- Mata R, Morales I, Pérez O, Rivero-Cruz I, Acevedo L, Enriquez-Mendoza I, Bye R, Franzblau S, Timmermann B** (2004) Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *J Nat Prod* 67, 1961-1968.
- Minami H, Kim JS, Ikezawa N, Takemura T, Katayama T, Kumagai H, Sato F** (2008) Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 7393-7398.
- Negrel J, Lherminier J** (1987) Peroxidase-mediated integration of tyramine into xylem cell walls of tobacco leaves. *Planta* 172, 494-501.
- Okombi S, Rival D, Bonnet S, Mariotte A, Perrier E, Boumendjel A** (2006) Analogues of N-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorg Med Chem Lett*. 16, 2252-2255.
- Park J** (2007) Caffeodymine from cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selection. *J Agric Food Chem* 55, 2171-2175.
- Park M, Kang K, Park S, Kim YS, Ha SH, Lee SW, Ahn MJ, Bae JM, Back K** (2008) Expression of serotonin derivatives synthetic genes on a single self-processing polypeptide and the production of serotonin derivatives in microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 43-49.
- Park JB, Schoene N** (2002) Synthesis and characterization of -coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1104 - 1110.
- Park JB, Schoene N** (2003) N-caffeoyltyramine arrests growth of U937 and Jurkat cells by inhibiting protein tyrosine phosphorylation and inducing caspases-3. *Cancer Lett*. 202, 161-171.
- Park JB** (2008a) 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *J Nutr Biochem*. doi:10.1016/j.jnutbio. 2008.07.009.
- Park JB** (2008b) Serotomide and safflomide modulate forskin-stimulated cAMP formation via 5-HT1 receptor. *Phytomedicine*. 15, 1093-1098.
- Roh JS, Han JY, Kim JH, Hwang JK** (2004) Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1976 - 1978.
- Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D, Rosahl S** (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase.

J. Biol. Chem. 274, 4273-4280.

Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, Hayashizaki Y, Shinozaki K (1998) High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J.* 15, 707-720

Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, Sakurai T et al. (2002) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science* 296, 141-145.

Torres AF, Mesquita PAR, Campos FM, Couto JA, Toth IV, Rangel AOSS, Hogg TA (2007) Development of a flow injection method for monitoring cell membrane damage of wine lactic acid bacteria. *Microchim. Acta* 159, 87-93.

Von Roepenack-Lahaye E, Newman MA, Schornack S, Hammond-Kosack KE, Lahaye T, Jones JDG, Daniels MJ, Dow JM (2003) p-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogen. *J. Biol. Chem.* 278, 43373-43383.

Yokozawa T, Tanaka T, Kimura T (2001) Examination of the nitric oxide production-suppressing component in *Tinospora tuberculata*. *Biol Pharm Bull* 24, 1153-1156.

Yu M, Facchini PJ (1999) Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-(hydroxycinnamoyl) transferase from opium poppy. *Planta* 209, 33-44.

Zhang H., Nagatsu A, Sakakibara J (1996) Novel antioxidants from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 874-876.

Zhu TF, Huang KY, Deng XM, Zhang Y, Xiang H, Gao H, Wang DC (2008) Three New Caffeoyl glycosides from the roots of *Picrorhiza Scrophulariiflora*. *Molecules*, 13, 729-735.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발연구과제 **사업의** 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림 기술개발연구과제의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.