

효모에서 분리한 멜라닌 생성 억제 물질의 작용 기전

이 승 선 · ¹정 호 권 · ¹오 철 · † 최 태 부
건국대학교 미생물 공학과, ¹(주) 참존 생물소재 연구소
(접수 : 2003. 12. 11., 게재승인 : 2004. 4. 25.)

Mechanism of Melanogenesis Inhibition by Melanoston Isolated from Yeast

Seungsun Lee, Hokwon Jung¹, Oh Chul¹, and Taeboo Choe
Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
¹Charmzone Cosmetics
(Received : 2003. 12. 11., Accepted : 2004. 4. 25.)

Melanocytes synthesize melanin within discrete organelle termed melanosomes which are transferred to the surrounding keratinocytes and can be produced in varying sizes, numbers and densities. Skin whitening products have become increasingly popular in the past few years. The most successful natural skin whitening agents are: Arbutin, Vitamin C, Kojic acid, Mulberry, which are all tyrosinase inhibitors. In this work, melanoston, a melanogenesis inhibitor isolated from yeast was studied to understand its mechanism of melanogenesis inhibition. It was found that melanoston was not a tyrosinase inhibitor, while when melanoston was applied to the B16 melanoma cell culture media, the intracellular tyrosinase activity was decreased by more than 30%. When B16 melanoma was stimulated with α -MSH, cell morphology was dramatically changed to have lots of dendrites on the cell membrane surface. On the other hand, B16 was treated with α -MSH and melanoston, simultaneously, the change of cell morphology was not so great. This inhibition effect of melanoston was found to be related to the inhibition of intracellular activation and transportation of tyrosinase, which was observed by immunostaining of B16 melanoma using anti-tyrosinase antibody. From these results, melanoston was regarded as an inhibitor to the differentiation of melanoma cells.

Key Words : Melanogenesis inhibition, melanoma, cell differentiation, UV radiation, tyrosinase

서 론

피부의 기저층에 존재하는 melanocyte는 자외선의 자극을 받으면 타이로신으로부터 멜라닌을 합성하여 피부를 보호한다. 그러나 지나친 멜라닌의 생성은 미적으로나 피부 건강상 문제를 야기할 수 있으므로 최근에는 멜라닌에 의한 피부 착색을 회피하거나 완화시키는 기능성 화장품들이 개발되고 있다. 멜라닌은 melanosome에서 합성되며, melanosome에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase

(EC 1.14.18.1), tyrosinase related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (DCT) (EC 5.3.2.3) 등이 있다. 이중에 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP1은 mouse에서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. 그러나 human TRP1은 이러한 활성이 없는 것으로 보고되어졌다(1). DCT는 초기에는 tyrosinase-related protein 2 (TRP2)로 불려졌던 효소로서 Dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 포유류에서 멜라닌은 두 가지 형태의 멜라닌으로 생성되는데, 흑·갈색을 띠는 eumelanin과 적·노랑색을 띠는 pheomelanin이 있다. 앞서 말한 효소들 중 tyrosinase는 eumelanin과 pheomelanin의 합성 모두에 절대적으로 필요하며, TRP1과

† Corresponding Author : Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel : +82-2-450-3523, Fax : +82-2-3436-5594
E-mail : bchoe@konkuk.ac.kr

DCT는 eumelanin의 합성에 더 깊이 관여를 하는 것으로 알려져 있다(2, 3). 기존의 미백물질들은 작용기전에 따라 자외선 흡수제나 산란제, vitamin C나 Kojic acid, 알부틴 등과 같은 tyrosinase 저해제, 활성 산소종을 소거하는 토크페놀 등으로 분류할 수 있다. 그러나 이들 물질들은 피부 알러지나 독성을 나타내기도 하며, 화장품 원료로서의 안정성이 떨어지는 등 화장품 원료로서의 사용이 어려운 점이 있어 새로운 미백물질의 개발이 필요하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 효모에서 분리한 melanoston이라고 명명된 멜라닌 생성을 억제하는 물질의 작용 기전을 밝히기 위한 것이다. 지금까지 알려진 멜라닌 생성 기전은 다음과 같다. 먼저 자외선 자극을 받은 keratinocyte가 α -MHC와 같은 사이토카인을 분비하고 사이토카인이 melanocyte의 수용체를 활성화시키면 이로 인해 melanocyte내 cAMP가 증가하며 증가된 cAMP에 의한 PKA (Protein kinase A) 활성화, MITF (microphthalmia associated transcription factor) 생성, tyrosinase 합성증가로 이어진다(4-8). Endoplasmic reticulum에서 합성된 tyrosinase는 Golgi body에서 glycosylation을 거친 후 melanosome으로 이동하게 되는데 여기서 다시 PKC (Protein kinase C)에 의한 활성화 (activation)과정을 거쳐야 비로소 멜라닌 합성이 시작된다. 또 한편으로 melanocyte는 세포골격 단백질인 actin filament의 재구성에 의해 많은 수지상돌기 (dendrite)를 갖는 dendritic cell로 세포형태가 바뀌게 되는데 이러한 형태변화를 거쳐야 주위에 있는 keratinocyte로 생성된 멜라닌들을 내 보낼 수 있게 된다. 따라서 melanoston의 작용기전으로 tyrosinase의 발현 억제, glycosylation 억제, tyrosinase 활성화억제, 생성 멜라닌 분비억제 등을 생각할 수 있으나 본 연구에서는 B16 melanoma 세포를 이용하여 주로 tyrosinase 발현과 활성화 및 세포 형태변화를 중점적으로 조사하였으며 그 결과 melanoston이 B16 세포의 형태변화와 tyrosinase 활성화를 억제 하는 것으로 나타났다. 따라서 melanoston은 α -MSH에 의한 B16 세포 분화 억제와 melanosome에서의 tyrosinase 활성화를 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보인다.

재료 및 방법

세포주 및 재료

실험에 사용한 melanoma 세포주 B16F10은 한국세포주 은행으로부터 분양받았다. 세포주는 Dulbecco's modified essential medium (DMEM), 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL) (Gibco BRL, USA)을 첨가한 것을 기본배지로 하여 humidified 5% CO₂, 37°C incubator에서 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

Melanoston은 유산균추출물로서 조정제 과정을 거친 후 (주)삼촌 생물소재연구소로부터 제공받았으며 α -MSH, arbutin, L-3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA), synthetic melanin, sodium azide, sodium dodecyl sulfate (SDS), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, Nonidet P-40 (NP-40), β -nitrophenyl- α -glucopyranoside (PNPG), isopropanol, DMSO, NaOH, HCl 등은 Sigma (USA)제품을 사용하였다.

Mouse tyrosinase와 TRP-1의 carboxy terminus로 합성된

polyclonal antibody aPEP7과, aPEP1 그리고 human DCT의 carboxy terminus antibody인 aPEP8h를 Dr. Vincent J. Hearing (NIH, Bethesda, MD)으로부터 제공받아 Western blotting에 사용하였다(9).

멜라닌 함량 측정

세포 멜라닌 함량 측정을 위하여 6-well plate에 1×10^4 이 되게 세포를 plating하고 1일 경과 후 각 물질을 농도별로 첨가하여 배양하였다. 배양이 끝난 후 1,200 rpm에서 5분동안 원심분리를 실시하여 약 2×10^6 정도의 세포를 회수하였다. 세포를 1.5 mL capped tube로 옮기고 phosphate buffered saline (PBS)로 수세, 원심분리를 2회 실시하였다. 상등액을 제거하고, 물에 불용성을 나타내는 멜라닌의 액화를 일으키기 위하여 1 N NaOH/10% DMSO를 첨가한 다음 65°C 수조에서 2시간 동안 처리하였다. 이후 405 nm에서 흡광도를 측정하고 synthetic melanin을 이용한 standard curve와 비교하여 멜라닌 함량을 정량하였다. B16 mouse melanoma에서 α -MSH만을 첨가하였을 때와 저해제인 arbutin, melanoston을 동시에 첨가하였을 때 나타나는 melanin 합성의 상대적 변화량을 조사하였다(10).

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 DOPA oxidase 활성을 측정한 것으로 나타내었다. 멜라닌 함량 측정실험과 같은 방법으로 세포를 배양한 후 trypsin으로 세포를 떼어내고 원심분리를 실시하였다. 회수한 세포를 PBS로 2회 수세, 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 single detergent lysis buffer [50 mM Tris · Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide 0.1% SDS, 100 μ g/mL PMSF, 1 μ g/mL aprotinin, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate]를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시켜 세포를 lysis시켰다. 원심분리하여 얻은 cell lysate 1 mL와 reaction mixture [0.1% DOPA in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)] 3 mL를 혼합하여 상온에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 dopachrome의 양을 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적 tyrosinase 활성으로 나타내었다.

Western blotting을 이용한 단백질 측정

세포를 100 mm dish에 1×10^5 cells이 되도록 plating하여 24시간이 지나면 각 물질들을 첨가하여 2일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 lysis buffer를 첨가하고 4°C에서 20분 반응시켰다. cell scraper로 완전히 lysis되도록 하여 1.5 mL tube로 옮긴 다음, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 실시해 cell debris 등을 제거하였다. 시료내 단백질의 정량은 bicinchoninic acid (BCA) 방법으로 실시하였으며, 총단백질 50 μ g을 이용하여 10% SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 nitrocellulose membrane (0.45 μ m, Schleicher & Schuell)을 사용하여 electrotransfer (50 mA for overnight)하였다. Electrotransfer가 끝나면 blotting하기에 앞서 Ponceau S를 사용하여 transfer가 올바르게 되었는지 확인하였다. Nitrocellulose membrane을 blocking solution [PBS-T with 5% skim milk]으로 실온에서 1시간 반응시켰다. Primary antibody

는 mouse tyrosinase와 TRP-1, human DCT의 polyclonal antibody (from rabbit)인 각각 α PEP7, α PEP1, 그리고 α PEP8h를 이용하였다. Membrane을 blocking solution에 1 : 1000이 되게 희석한 각각의 primary antibody와 실온에서 2시간 반응을 실시하였다. PBS-T로 15분씩 4회 수세하였고, anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody를 blocking sol'n에 1 : 2000로 희석하여 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나 후 PBS-T로 20분씩 4회 수세하였다. Protein band는 enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Pharmacia Biotech, UK)와 photographic film (Kodak, UK)를 이용하여 나타내었다(11, 12).

mRNA 측정

Melanogenesis에 관여하는 효소인 tyrosinase, TRP-1, DCT 등의 mRNA level에서 melanoston에 의한 변화를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

RNA extraction

6-Well plate에 1×10^4 cells이 되게 plating하고 48시간 경과 후 아무것도 첨가하지 않은 것을 (-) control로, melanogenesis stimulating agent인 α -MSH를 처리한 것을 (+) control로 하고 측정하고자 하는 저해제를 처리하여 24시간 더 배양하였다. Total RNA 분리는 RNA gents[®] total RNA isolation system kit (Promega, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 세포배양을 마친 다음 PBS로 수세하고 denaturing sol'n 400 μ L를 첨가하여 세포를 용해시킨 후, 1.5 mL tube에 옮겨 2 M sodium acetate (pH 4.0) 30 μ L를 첨가하였다. RNA의 분해가 일어나지 않도록 조심스럽게 혼합하고 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 용액 300 μ L를 첨가한 후 10초 동안 강하게 vortex해주고 얼음에서 15분 동안 대기하였다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리를 실시한 다음 상층액을 회수하였다. Isopropanol을 동량 (v/v) 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 다시 10분 동안 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. DEPC 처리 75% ethanol로 수세를 한 다음 nuclease-free water에 pellet을 녹였다. RNA의 순도와 정량은 Hitachi U-2000 Spectrophotometer (Tokyo, Japan)를 사용하여 A_{260}/A_{280} ratio로서 확인하였다.

RT-PCR

First strand cDNA 합성은 total RNA 2 μ g, $1 \times$ M-MLV reaction buffer, 0.2 mM dNTP, 200 units의 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), 100 pM oligo-dT₁₆가 되도록 혼합하고 총 volume 50 μ L로 조정된 후 PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 extension : 37 $^{\circ}$ C 60분, denaturation : 95 $^{\circ}$ C 5분을 실행하였다.

PCR은 cDNA 2 μ L, $1 \times$ amplification buffer, 0.2 mM dNTP, 1 unit의 super-therm DNA polymerase (Hoffmann-La-Roche, Canada), Table 1의 oligonucleotides를 각각 1 μ L, 총 volume 50 μ L로 조정하여 실행하였다. PCR 조건은 denaturation : 95 $^{\circ}$ C 50초, annealing : [tyrosinase와 TRP-1 : 56 $^{\circ}$ C, TRP-2 : 64 $^{\circ}$ C] 20초, extension : 72 $^{\circ}$ C 20초로 총 30 cycle을 실행하였다.

PCR products는 1.5% agarose gels에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide (Et-Br) staining을 하여 UV illuminator (Vilber Lourmat, France)로 확인하였다. RNA의 integrity는 mouse β -actin mRNA에 대한 primer를 이용하여 확인하였다 (13, 14).

PCR-ELISA

PCR에서 증폭된 cDNA 양을 정량하기 위하여 PCR-ELISA라는 방법을 개발하여 사용하였다. 이 방법은 증폭시 5' biotinylated primers과 digoxigenin-11-dUTP를 동시에 사용하여 PCR products를 합성하였고 곧바로 항체만을 이용해서 detection하는 방법이다. 합성한 cDNA를 $10 \times$ buffer, 10 mM dNTPs, 0.5 mM digoxigenin-11- dUTP (Roche), 1U Taq DNA polymerase and tyrosinase primers과 섞어 최종 volume 이 50 μ L가 되도록 하였다. 그 다음 과정은 위에서 실행한 PCR method와 동일하게 수행하였다. Coating buffer에 50 μ g/ml로 avidin을 녹인 후 Microplate (Maxisorp Nunc)에 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 코팅시켰다. 3번 수세 후 blocking을 위하여 coating buffer에 만든 2% blocking solution으로 실온에서 2시간동안 방치시켰다. Biotinylated PCR products를 3% bovine serum albumin을 포함한 PBS (PBS-B)로 희석하여 loading하고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. PBS-T (0.05% Tween-20포함)로 세 번 수세한 뒤 PCR method 1의 경우 0.25 M NaOH로 상온에서 10분간 방치하여 denaturing을 시켰다. 수세 후 10

Table 1. The oligonucleotide primers used to amplify the portions of the gene of melanogenesis related enzymes in polymerase chain reaction

Gene	Primer	Sequence	Position	Product(bp)	Gene bank
tyrosinase 1	Biotinylated forward	5'CCTCCTGGCAGATCATTTGT3'	911-930	61	X12782.1
	Reverse	5'ATCGCATAAAACCTGATGGC3'	951-972		
	Digoxygenated probe	5'ATCGCATAAAACCTGATGGC3'	951-972		
tyrosinase 2	Biotinylated forward	5'CCTCCTGGCAGATCATTTGT3'	911-930	235	X12782.1
	Reverse	5'GGCAAATCCTTCCAGTGTGT3'	1127-1146		
	Digoxygenated probe	5'ATCGCATAAAACCTGATGGC3'	951-972		
GAPDH	Biotinylated forward	5'			
	Reverse	5'			
	Digoxygenated probe	5'			

pmol/ml digoxigenin-labelled probes을 포함한 hybridization buffer를 well당 100 μ l씩 loading하여 42°C에서 2시간동안 반응시켰다. 그 후 Anti-digoxigenin AP-conjugated antibody (Sigma)를 PBS-B에 1 : 3000으로 희석시켜 첨가한 후 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 1 M diethanolamine buffer에 녹인 0.1% pNPP로서 상온에서 30분간 방치하고 405 nm에서 ELISA reader를 사용하여 optical density를 측정하였다. PCR method 2의 경우에는 denaturing과 hybridization의 과정을 없애고 직접 anti-digoxigenin AP-conjugated antibody를 처리하였으며 그의 방법과 그 뒤 과정은 위에서 실행한 PCR method와 동일하였다.

형광현미경 관찰

세포형태의 변화를 관찰하기 위하여 25T-flask에 5×10^4 이 되게 세포를 plating하고 24시간이 경과된 후 melanoston과 arbutin이 첨가된 배지로 교환하여 48시간 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS로 2회 수세한 후 현미경으로 관찰하였다(15). 형광현미경 관찰을 위해서는 다음과 같이 처리하였다. 24 well plate에 plate당 10000개씩 cell을 loading한 후 48시간 후에 실험하였다. 먼저 배지를 제거하고 PBS로 3회 washing한다. 이어서 PBS에 paraformaldehyde와 Sucrose를 각각 4% 농도로 녹이고 37°C로 pre-warming한 후 10~15분간 상온에서 fixation한다. 다시 PBS로 5분씩 3회 흔들어 주면서 washing한다. 0.25% Triton X-100으로 5분간 처리하고 다시 PBS로 5분씩 3회 washing 한다. Blocking은 Goat serum을 10%로 희석해서 30분간 실시하고 1st antibody (PEP7-Polyclonal rabbit antisera to mouse tyrosinase)는 3% goat serum solution에 1/400로 희석해서 4°C에 overnight 한다. 다시 PBS로 5분씩 3회 washing 후 2nd antibody (Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate)를 3% Goat serum solution에 1/50로 희석해서 30분간 상온에 incubation한다. 2nd antibody를 처리하면서 동시에 DAPI를 1 μ g/ml 농도로 처리, counter staining을 해준다. 마지막으로 PBS로 5분씩 3회 washing을 하고 증류수에 살짝 한 번 더 washing 한다. Mounting media를 사용해 mounting을 한다. Mounting media는 10 μ l 정도만 사용하고 bubble이 생기지 않도록 주의한다.

결과 및 고찰

멜라닌 합성 저해

B16 세포 배양에서 기본배지만을 사용한 것을 control로 하고 100 nM의 α -MSH만을 첨가한 것, 그리고 α -MSH를 첨가한 배지에 arbutin, melanoston을 농도별로 첨가하였을 때 멜라닌 합성 저해 정도를 측정하였다. Melanogenesis stimulating agent인 α -MSH를 처리한 경우 B16에 의해 생성된 멜라닌 농도는 control에 비해 80 μ g/ml에서 304 μ g/ml로 증가하였으며 여기에 저해제인 arbutin과 melanoston을 배양액에 첨가하였을 경우 1.36 mg/mL의 농도에서 각각 130 μ g/ml과 111 μ g/ml으로 나타나 α -MSH에 의해 증가된 멜라닌 양의 70% 정도가 감소할 정도로 멜라닌 합성 저해능이 우수한 것으로 관찰되어졌다(Fig. 1).

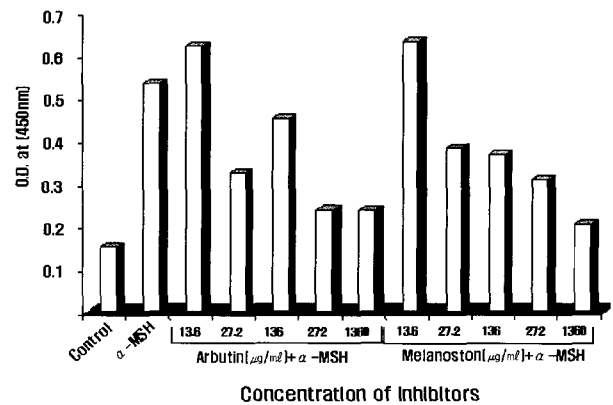


Figure 1. The inhibition of melanogenesis in B16 melanoma by arbutin or melanoston.

Tyrosinase 활성 측정

배양 증 저해제를 첨가하였을 경우 나타나는 tyrosinase 활성의 변화

배양액에 α -MSH를 첨가할 때 동시에 arbutin과 melanoston을 첨가하여 48시간 배양한 후 세포를 분리하고 세포를 충분히 세척한 후 얻은 세포 파쇄액의 tyrosinase 활성 변화를 조사하여 보았다. 그 결과 Fig 2에서처럼 tyrosinase competitive inhibitor로 알려진 arbutin을 첨가한 경우 세포 파쇄액에 존재하는 tyrosinase의 활성이 전혀 저해를 받지 않는 모습을 나타냈다. 반면에 melanoston은 농도 의존적인 형태로 활성을 저해하는 것을 알 수 있었으며 272 μ g/mL의 농도에서 33% 정도의 활성이 감소하였다.

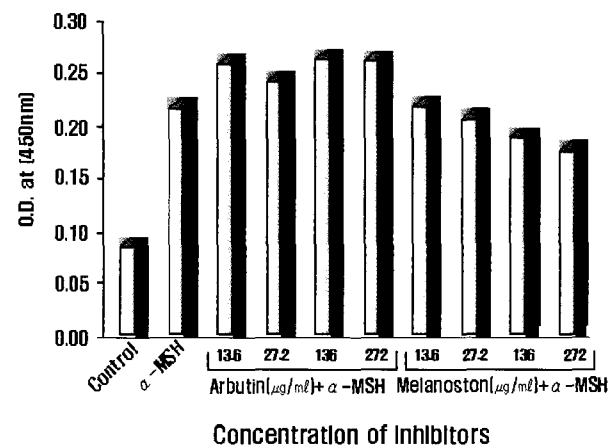


Figure 2. Inhibition of tyrosinase activity by arbutin or melanoston measured in the B16 melanoma cell culture. Arbutin or melanoston was added at the beginning of cell culture.

배양 후 arbutin과 melanoston 첨가시 tyrosinase 활성의 변화

Melanoston이 arbutin과 같은 tyrosinase 저해물질인지를 확인하고자 α -MSH만을 처리하여 배양한 B16 세포 파쇄액에 arbutin이나 melanoston을 처리하여 tyrosinase 활성도를 조사하였다. Fig. 3에서처럼 arbutin은 tyrosinase 활성을 저해하는

것으로 나타났으나 melanoston은 농도를 1.36 mg/mL까지 증가시켜도 tyrosinase 활성에 별다른 영향이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 놓고 볼 때 melanoston은 tyrosinase 저해제가 아닌 것으로 볼 수 있다.

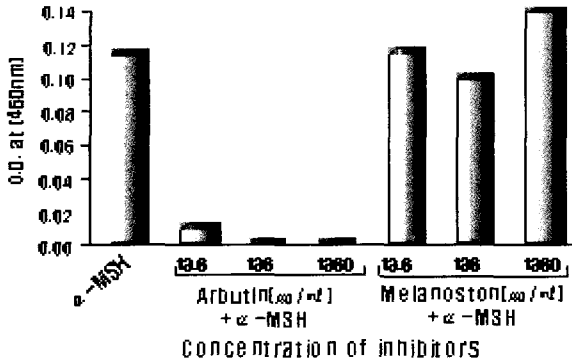


Figure 3. Inhibition of tyrosinase activity by arbutin or melanoston measured using the cell lysate of B16 melanoma. No inhibition of tyrosinase activity was observed with melanoston.

멜라닌 합성 관련효소의 발현량 변화

Melanoston을 배양 중에 첨가하였을 경우 tyrosinase 활성이 감소하였으나 배양 후 세포 파쇄액에 첨가한 경우는 tyrosinase 활성에 대한 직접적인 저해를 나타내지 않았으므로 melanoston이 tyrosinase의 저해제가 아닐 것으로 판단되어 tyrosinase 활성의 감소가 효소 발현량의 변화에 의한 것인지를 확인하고자 하였다. 또한 melanogenesis 관련 효소 중 중요한 작용을 하는 TRP-1, DCT에 대한 발현량에 대한 melanoston의 효과도 동시에 조사하였다(Fig. 4). 기본베이스에 α-MSH를 20, 50, 100 nM로 첨가하였을 때 각 효소들의 발현량의 변화를 panel (A)에 나타내었다. 세 효소는 모두 65-75 kDa의 크기를 가지며 protein marker로서 그 위치를 확인하였다. 두 개의 band를 나타낸 것은 각 효소들의 glycosylation 형태에 대해서 항체가 작용한 것으로 여겨진다. Tyrosinase는 α-MSH를 처리하였을 때 20 nM 이상의 경우 control에 비해 현저히 발현량이 증가하는 모습을 관찰할 수 있었으며 DCT도 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 TRP-1의 경우는 α-MSH에 의한 변화량이 큰 차이를 보이지는 않았다. Panel (B)는 α-MSH (100 nM)와 동시에 arbutin과 melanoston을 농도별로 처리하였을 때 각 효소들의 발현량 변화를 표시하였다. Tyrosinase의 경우 melanoston에 의해서 저해를 받는 것으로 나타났으며 arbutin에 의해서는 오히려 증가한 모습을 나타냈다. DCT 역시 비슷한 경향을 나타냈으나 TRP-1의 경우는 band의 두께가 너무 얇아 육안상으로 확인하기 어려웠다. 따라서 각 protein band는 Bio-Rad Fluor-S system을 이용하여 density를 측정하였다(16). Fig. 4는 band를 scan하여 densitometry units으로 나타낸 것이다. 앞서 본 바와 같이 tyrosinase, DCT의 경우는 α-MSH에 의해 발현량이 증가하였으며 TRP-1은 control과 큰 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다. Melanoston의 경우, 첨가한 양에 따라 α-MSH에 의해 증가된 tyrosinase 발현량이 20% 정도 감소하는 것으로 나타났으며, TRP-1은 육안상으로 보는 것과 달리 melanoston에

의해 발현량이 감소하는 것처럼 나타났으나 α-MSH에 의해 증가된 수치가 적기 때문에 그 저해효과는 낮다고 사료된다. DCT는 tyrosinase와 비슷한 변화를 보여 melanoston을 272 μg/mL 첨가한 경우 처리하지 않은 control보다도 낮은 값을 나타냈다. Arbutin의 경우는 관련 효소의 발현과 상관없는 tyrosinase competitive inhibitor이기 때문에 세 효소들에 대하여 유의성 있는 발현량의 감소를 찾아볼 수 없었다.

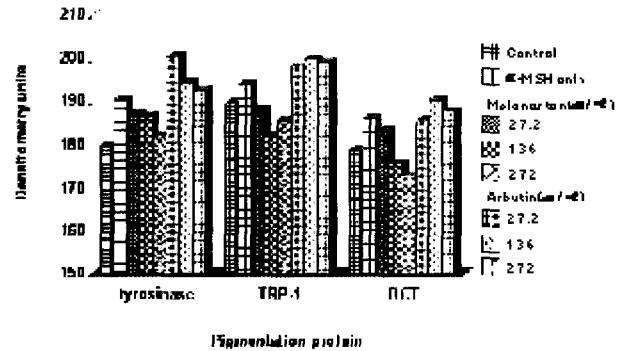


Figure 4. Western blot analysis of the expression of tyrosinase, TRP-1, DCT in B16 melanoma treated with arbutin or melanoston. (A): expression of tyrosinase and tyrosinase related proteins by α-MSH (B): Lanes 1, non-treated; lanes 2, with α-MSH (100 nM); lanes 3 to 5, α-MSH (100 nM) and melanoston (27.2, 136, 272 μg/mL, respectively); lanes 6 to 8, α-MSH (100 nM) and arbutin (27.2, 136, 272 μg/mL, respectively). (C): the result of B was replotted in graph.

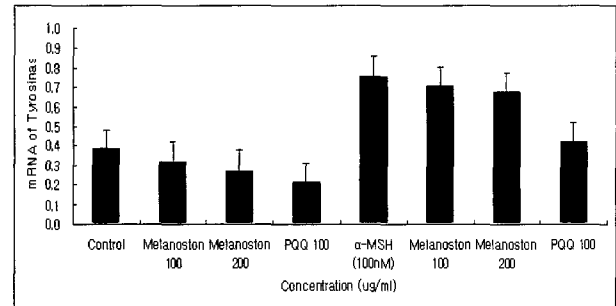


Figure 5. Effect of melanoston on the expression of tyrosinase mRNA by the α-MSH treated B16 melanoma.

PCR-ELISA법을 이용한 유전자 발현측정

Tyrosinase의 mRNA 발현 양을 측정하기 위하여 PCR-ELISA법을 이용하는 방법으로 4회 반복 실험하여 얻은 결과는 Fig. 5와 같다. 먼저 B16에 100 nM의 α-MSH를 처리하였을 때 tyrosinase 발현량이 198% 가량 증가하였다(control과 α-MSH 비교). 그리고 melanoston을 100 μg/ml의 농도로 배양액에 첨가했을 경우 tyrosinase mRNA의 발현량은 약 7.2%가 감소했고 200 μg/ml에서는 약 10.9%가 감소하였다. PQQ란 화학물질은 tyrosinase 유전자 발현을 억제하는 물질로 알려져 있으며 본 실험에서 100 μg/ml의 농도로 배양액에 첨가했을 경우 tyrosinase mRNA의 발현량이 약 44% 감소했고 이러한 감소현상은 α-MSH를 처리하지 않은 경우에도 나타났으며 100 μg/ml의 농도로 배양액에 첨가했을 경우 역시 44%의 발현량 감소가 나타났다. 즉 이상의 실험결과를 종합

하면 B16 배양액에 melanoston을 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리할 경우 10~20% 내외의 유전자 및 단백질 발현 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 적은 양의 유전자 발현 억제가 melanoston의 주된 멜라닌 합성 억제 작용 기전으로 보기 어렵다고 생각되어 아래와 같은 실험을 진행하였다.

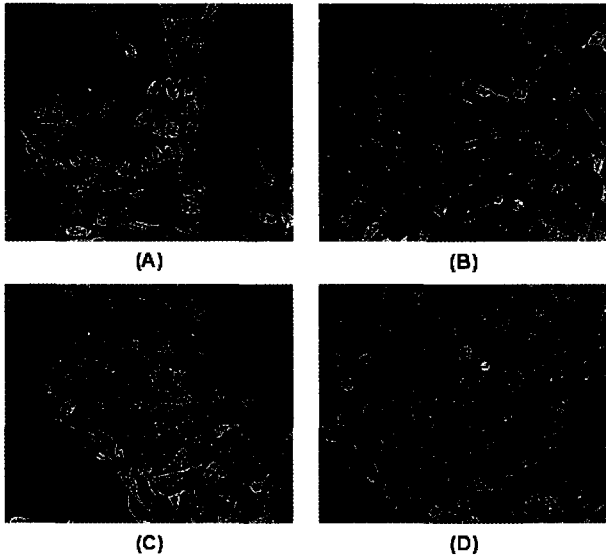


Figure 6. The effect of arbutin or melanoston on the morphology of B16 melanoma (A), Control; (B), 100 nM of α -MSH; (C), α -MSH (100 nM) and arbutin 200 $\mu\text{g/ml}$; (D), α -MSH (100 nM) and melanoston 200 $\mu\text{g/ml}$.

세포분화에 따른 형태 변화

B16 세포에 α -MSH를 처리하면 α -MSH 수용체가 활성화되어 세포내 cAMP의 농도를 증가 시키고 따라서 tyrosinase와 관련 효소들의 발현양이 증가하며 골지체에서 당화된 tyrosinase는 melanosome으로 이동하게 된다. 이 때 동시에 melanosome 표면에 결합되어 있던 tyrosinase들은 PKC에 의해 활성화되게 되어 멜라닌 합성을 시작한다. 또 한편으로 actin filament들이 재구성되면서 세포골격 (cytoskeleton)이 변화하게 되고 결국 세포 형태가 dendrite가 많은 수지상 세포로 변하여 생성된 멜라닌의 방출을 용이하게 한다. 따라서 melanoston이 이러한 복잡한 분화 과정에 어떠한 영향을 미치는지 보기위해 B16을 24시간동안 배양한 뒤 저해제가 첨가된 배지로 교환하여 48시간동안 배양한 후 세포 형태를 관찰하였다. Control과 100 nM의 α -MSH, 그리고 저해제인 arbutin과 melanoston을 136 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 첨가한 네 가지 경우의 세포형태를 Fig. 6에 나타내었다. 시약을 처리하지 않은 control의 경우, 수지상 돌기를 거의 나타내지 않은 spindle 형태의 모습을 나타냈으며 멜라닌의 합성이 거의 나타나지 않은 흰색을 보였다(A). 반면에, 100 nM의 α -MSH를 처리한 경우는 많은 수지상 돌기를 보여 멜라닌이 합성되면 주변 말피기세포로 전달하기 위하여 이런 dendricity가 증가한다는 발표들과 일치하였다(B). 100 nM의 α -MSH와 arbutin (C)과 melanoston (D)를 136 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 경우에는 세포 형태에서 많은 차이를 나타내었다. 즉 arbutin은 α -MSH에 의해 유도된 돌기에 별다른 영향을 주지 않는 것으

로 관찰되었으나, melanoston의 경우 돌기의 수가 많이 감소한 모습을 나타내어 세포가 전체적으로 원형을 나타내었다. 따라서 melanoston이 멜라닌 합성을 억제하는 작용기전 중 하나는 세포의 형태를 결정하는 세포골격 단백질 합성에 영향을 주거나 세포 분화에 영향을 주는 것이라 사료된다.

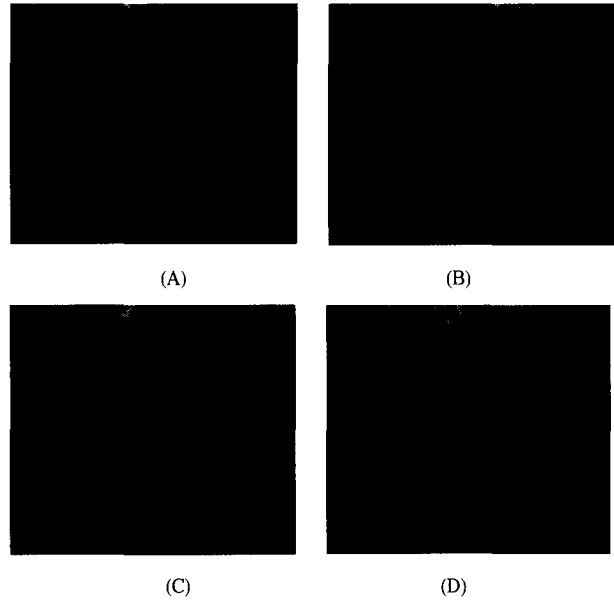


Figure 7. Fluorescence staining of tyrosinase in B16 melanoma treated with arbutin or melanoston. (A), Control; (B), 100 nM of α -MSH; (C), α -MSH(100 nM) and arbutin 200 $\mu\text{g/ml}$; (D), α -MSH(100 nM) and melanoston 200 $\mu\text{g/ml}$.

Melanoston이 B16 세포 분화에 미치는 영향

위에서 설명한 대로 melanoston이 B16 세포의 분화를 억제하여 tyrosinase가 melanosome으로 이동하는 과정을 억제하거나 melanosome 표면에 위치한 tyrosinase 활성화 (activation) 과정을 억제하고 따라서 melanin 합성을 억제하게 된다는 가설을 좀 더 구체적으로 증명해 보이기 위하여 α -MSH를 처리한 세포와 α -MSH 및 melanoston을 동시에 처리한 세포에서 형광현미경을 이용하여 세포내 tyrosinase 발현 분포의 변화를 조사하였다. 그 결과 Fig. 7에서와 같이 α -MSH를 처리하지 않은 B16 세포는 tyrosinase staining시 비교적 핵주위로 tyrosinase가 관찰되었으며 cytosol과 세포막 부근에서는 관찰되지 않았다(A). 그러나 α -MSH를 처리한 B16 세포는 세포형태가 변하여 많은 dendrite를 형성하고 있음을 알 수 있었고 tyrosinase staining시 tyrosinase가 dendrite 전체에 걸쳐 확산되어 있음을 관찰할 수 있었다(B). Arbutin을 처리한 경우 (B)의 경우와 마찬가지로 B16 세포의 dendrite 형성에는 변함이 없고 tyrosinase 발현에도 변함이 없었으며 따라서 arbutin은 B16 세포의 형태 변화와 tyrosinase 발현에 별다른 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 그러나 melanoston 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우 (D)의 경우에 비해 B16 세포의 dendrite 형성을 억제함을 알 수 있었다. 이때 증가된 tyrosinase 발현양은 (B)의 경우에 비해 크게 감소하지 않는 것으로 나타나 위에서 수행한 western blotting을 이용한 단백질 발현 실험 결과와 일치함을 알 수 있었다. 이

러한 결과들을 종합해 볼 때 melanoston은 현재 그 기전을 명확히 설명하기는 어렵지만 B16 세포의 분화과정에 어떤 식으로든 개입하여 α -MSH에 의해 생성이 증가된 tyrosinase가 melanosome으로 이동하는 단계나 melanosome에서 마지막으로 tyrosinase가 활성화하는 단계를 방해하는 것으로 보인다. 이러한 억제효과는 또한 10~20% 정도의 적은 양의 tyrosinase 발현을 억제하는 결과로 나타났으며 따라서 전반적으로는 멜라닌 합성 억제라는 현상으로 나타나게 된 것이다.

요 약

본 연구에서는 효모에서 분리한 melanoston이라고 명명된 멜라닌 생성을 억제하는 물질의 작용 기전을 밝히기 위한 것이다. α -MSH를 처리한 B16 melanoma 세포에서 melanoston은 tyrosinase mRNA 발현양을 10% 정도 저해되는데 그쳤으며 western blotting을 이용한 단백질 측정에서도 이와 비슷한 정도의 단백질 생성 억제를 보였다. 그러나 B16 세포 배양액에 melanoston을 첨가할 경우 세포내 tyrosinase 활성이 33%까지 감소되는 것으로 나타나 melanoston이 tyrosinase inhibitor는 아니지만 세포내 tyrosinase 활성화 (activation) 과정을 억제하는 것으로 추측할 수 있었다. 또한 광학 현미경을 이용한 morphology 관찰에서 α -MSH를 처리한 세포에서는 많은 dendrite가 형성되면서 세포분화가 일어나는 반면 melanoston를 처리한 경우에는 dendrite가 감소하면서 세포형태가 대조군과 비슷하게 회복 되는 것을 알 수 있었다. 또 FITC-anti-tyrosinase-Ab를 이용한 형광 염색을 통해서 α -MSH만 처리한 세포에서는 tyrosinase의 분포가 dendrite를 포함한 세포 전체로 퍼져나가는 것을 관찰할 수 있었고 α -MSH와 melanoston을 동시에 처리한 세포에서는 대조군과 비슷하게 tyrosinase가 핵 주변에서만 관찰되어 melanoston이 B16 melanoma 세포의 분화과정에서 이를 억제하는 효과를 주고 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 melanoston은 α -MSH에 진행되는 B16 세포의 분화를 억제하고 이 과정에서 멜라닌 생성의 주된 효소인 tyrosinase의 활성화를 억제하며 결과적으로는 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 2000년도 산업자원부 공업기반기술과제의 연구 지원에 의해 수행된 것입니다.

REFERENCES

- Sánchez-Ferrer, Á., J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, and F. García-Carmona (1995), Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochimica et Biophysica Acta*. **1247**, 1-11.
- Hearing, V. J. (1999), Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J. Invest. Dermatol.* **4**, 24-28.
- Marmol, V. D. and F. Beerman (1996), Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Letters* **381**, 165-168.
- Romero-Graillet, C., E. Aberdam, M. Clement, J. -P. Ortonne, and R. Ballotti (1997), Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis, *J. Clin. Invest.* **99**, 1-8.
- Gilchrist, B. A., H. Y. Park, M. S. Eller, and M. Yaar (1996), Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation, *Photochem. Photobiol.* **93**, 1-10.
- Park, H. Y., J. M. Perez, R. Laursen, M. Hara, and B. A. Gilchrist, (1999), Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain, *J. Biol. Chem.* **274**, 16470-16478.
- Romero-Graillet, C., E. Aberdam, N. Biagoli, W. Massabni, J. -P. Ortonne, and R. Ballotti (1996), Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes, *J. Biol. Chem.* **271**, 28052-28056.
- Buscà, R. and R. Ballotti (2000), Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cell. Res.* **13**, 60-69.
- Virador, V. M., N. Matsunaga, J. Matsunaga, J. Valencia, R. J. Oldham, K. Kameyama, G. L. Peck, V. J. Ferrans, W. D. Vieira, Z. A. Abdel-Malek and V. J. Hearing (2001), Production of melanocyte-specific antibodies to human melanosomal proteins: expression patterns in normal human skin and in cutaneous pigmented lesions, *Pigment Cell Res.* **14**, 289-297.
- Virador, V. M., N. Kobayashi, J. Matsunaga, and V. J. Hearing (1999), A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation, *Anal. Biochem.* **270**, 207-219.
- Mahalingam, H., A. Watanabe, M. Tachibana, and R. M. Niles (1997), Characterization of density-dependent regulation of the tyrosinase gene promoter: role of protein kinase C, *Exp. Cell. Res.* **237**, 83-92.
- Smalley, K. and Tim Eisen (2000), The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells, *FEBS Letters* **476**, 198-202.
- Kosano, H., T. Setogawa, K. Kobayashi, and H. Nishigori (1995), Pyrroloquinoline quinone (PQQ) inhibits the expression of tyrosinase mRNA by α -melanocyte stimulating hormone in murine B16 melanoma Cells, *Life Sci.* **56**, 20:1707-1713.
- Bertolotto, C., R. Buscà, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J.-P. Ortonne, and R. Ballotti (1998), Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP : pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of Microphthalmia, *Mol. Cell. Biol.* **18**, 694-702.
- Kosano, H., T. Kayanuma, and H. Nishigori (2000), Stimulation of melanogenesis in murine melanoma cells by 2-mercapto-1-(β -4-pyridethyl)benzimidazole (MPB), *Biochimica et Biophysica Acta.* **1499**, 11-18.
- Sylvia B., B. K. Smith, Zhou, and S. J. Orlow (1997), Expression of tyrosinase and the tyrosinase related proteins in the Mitf^{ml}(Vitiligo) mouse eye: implications for the function of the microphthalmia transcription factor (Mitf), *Exp. Eye Res.* **66**, 403-410.