

새발 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

윤 훈 석[†] · 김 정 국

고려대학교 생명과학과
(2007년 3월 6일 접수, 2007년 6월 3일 채택)

The Inhibitory Effects of *Acanthopeltis japonica* on Melanogenesis

Hoon Seok Yoon[†] and Jeong Kook Kim

Department of Life Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

(Received March 6, 2007; Accepted June 3, 2007)

요약 본 연구에서는 천연 미백소재 개발을 위하여 제주도 연안에 서식하는 해조류 중 홍조류의 일종인 새발 추출물의 멜라닌 생성에 연관된 생리활성을 분석하였다. 그 결과, 새발 추출물의 폴리페놀 함량은 2.0 % 이하였고, 라디칼 소거활성(DPPH)은 IC₅₀값이 2,000 µg/mL 이상이었고, 세포독성은 관찰되지 않았다. 그리고 생쥐의 B16/F10 흑색종 세포에서 멜라닌 생합성에 관련된 효소의 저해효과를 알아본 결과, 알파-멜라노사이트 자극 호르몬에 의해 유도된 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2)의 활성화를 억제함으로써 티로시나제와 티로시나제 연관 단백질 1을 저해하는 것으로 확인되었다. 따라서 새발 추출물은 멜라닌 생합성에 필수적인 효소인 티로시나제의 저해활성과 티로시나제 연관 단백질 1의 발현억제 효과가 뛰어난 것으로 분석되었다. 그러므로 홍조류인 새발(*Acanthopeltis japonica*)의 추출물은 멜라닌 생성 자극제로 유도된 신호전달경로를 저해하는 미백 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Abstract: To develop the skin whitening agent, we investigated the effects of *Acanthopeltis japonica*, a rhodophyta on the coast of Jeju island, on melanogenesis. Dried *A. japonica* was refluxed with 70 % aqueous ethanol and the extract was evaporated to dryness. To validate the activity as a depigmenting agent, various *in vitro* tests, polyphenol contents, and free radical scavenging activity were performed. In addition, cellular tyrosinase activity and protein expression of p-ERK, tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 were measured in B16/F10 murine melanoma cells. *A. japonica* had low polyphenol contents and low free radicals scavenging activities against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *A. japonica* suppressed cellular tyrosinase activity up to 86.9 % at 100 µg/mL with inhibition of tyrosinase and TRP-1 expression in α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-treated B16/F10 melanoma cells. Our results suggest that inhibitory effects of *A. japonica* on melanogenesis are due to inhibiting the pathways involving α -MSH-induced ERK activation. Therefore, *A. japonica* may be useful as a skin whitening agent associated with the suppressive effect of melanotrophin-induced signaling pathway to inhibit melanin synthesis.

Keywords: *Acanthopeltis japonica*, melanogenesis, tyrosinase, skin whitening activity, ERK 1/2

1. 서 론

피부의 색은 피부의 기저층에 존재하는 멜라노사이트가 만들어내는 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 표피에 존재하는 멜라닌은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선

을 차단하는 색소로서 멜라닌이 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 된다[1]. 멜라닌 생합성은 멜라노사이트에서 다단계의 효소반응과 자동산화과정을 통해 일어난다. 멜라닌은 멜라노사이트의 멜라닌소체에서 합성되며, 멜라닌소체에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한

[†] 주 저자 (e-mail: gtherapy@hanmail.net)

특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 티로시나제(tyrosinase), 티로시나제 관련 단백질 1(tyrosinase related protein 1; TRP-1)과 TRP-2 등이 있다[2,3]. 멜라닌 생성 과정 중, 티로시나제는 멜라닌 생성의 속도조절단계로 보고 있는 티로신(tyrosine)으로부터 도파퀴논(DOPAquinone)의 전환과정에 관여하고 있기 때문에, 피부 색소 조절 과정을 연구하는 데 있어서 아주 좋은 표지로 간주되고 있다. 또한 유멜라닌(eumelanin)의 중간대사산물인 5,6-dihydroxyindole (DHI)을 indole-5,6-quinone으로 전환시키는 데에도 관여하고 있다[4,5]. TRP-1의 기능은 아직 확실하지 않지만, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 산화효소의 역할을 할 것이라는 보고와 티로시나제를 안정화시키는 작용을 할 것이라는 보고가 있다[6,7]. 두 번째 티로시나제 연관 단백질인 TRP-2는 DOPAchrome tautomerase라고도 불리는데, 그 기능은 중간대사산물인 DOPAchrome을 주로 DHICA로 이성화시키며, 멜라닌 생중합체 내에 carboxylated subunits의 구성을 조절하는 스위치 역할을 하는 것으로 보고되었다. 그러나, B16 흑색종 세포에서, α -MSH와 같은 몇몇 멜라닌 생성 활성화 인자들은, 멜라닌 생성 촉진과정에서 TRP-2를 오히려 억제한다고 보고되었다[8-10].

자외선에 의한 피부 색소 증가는 주로 각질형성세포(keratinocyte)에서 분비되는 인자들에 기인한다. 자외선을 받은 각질형성세포가 분비하는 인자들로는 endothelin-1 (ET-1), 알파-멜라노사이트 자극 호르몬(α -melanocyte stimulating hormone; α -MSH), 부신피질 자극 호르몬, 산화질소(NO) 등이 있다. ET-1의 경우 멜라노사이트의 protein kinase C 경로와 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 경로를 통해 피부 색소형성을 촉진시킨다[11,12]. α -MSH는 멜라노사이트에 있는 melanocortin-1 수용체에 결합하여 cAMP의 양을 증가시킴으로써 멜라닌 생성을 촉진시키고, NO는 cyclic guanine monophosphate (cGMP) 경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다[13,14]. 이밖에도 각질형성세포에서 분비되는 멜라닌생성 촉진인자는 basic fibroblast growth factor, stem cell factor 등이 있다[15,16]. 피부의 미백에 도움을 주는 기능성 화장품 소재를 찾아내기 위한 연구는 멜라닌 합성 전과 합성 중, 그리고 합성 이후 등 3단계로 나누어 진행되고 있다. 과거에는 멜라닌 합성 중에 관여하는 티로시나제의 활성을 저해하는 물질에 대한 연구가 주를 이루었지만 최근에는 멜라닌 합성 전에 티로시나제의 당화 및 전사체의 형성을 억제하는 물질에 대해서 보고되고 있으며, 멜라노사이트에서 각질형성세포로의 멜라닌 이동을 억제할 수 있는 물질도 보고되어 있다[17].

본 연구는 제주도의 연안 조건대 부근에서 채집한 새

발(*Acanthopeltis japonica*) 추출물의 항산화 효과 및 멜라닌 생성과정에 미치는 효과를 분석하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시료의 준비

본 연구에 사용된 새발(*Acanthopeltis japonica*)은 제주도 연안의 조건대 부근에서 채집하여 실험실로 운반한 뒤 흐르는 수돗물로 수세하여 염분을 제거하고, 건조한 후 미세하게 분쇄하여 영하 18 °C의 냉동고에 보관하였다. 보관된 새발 100 g을 70 % 에탄올 약 1 L로 48 h 상온에서 교반하여 추출한 후 여과하였고, 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 50 % 에탄올로 용해하여 사용하였다.

2.2. 폴리페놀 화합물의 함량분석

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 약간 변형시켜 측정하였다[18]. 즉, 새발 추출물 1 mg을 50 % 메탄올 용액 1 mL에 녹인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하여 시험관에 담고, 증류수를 가하여 2 mL로 만든 후, 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's 페놀 용액(Sigma, USA)을 첨가하여 잘 혼합한 후 3 min 동안 실온에 방치하였다. 3 min 후 2 M Na₂CO₃용액(Sigma, USA) 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수를 가하여 4 mL로 만든다. 실온에서 1 h 동안 방치한 후 그 상정액을 얻어 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid (Aldrich, USA)를 이용한 표준 곡선은 tannic acid 1 mg을 50 % 메탄올 용액 1 mL에 녹이고 시료의 최종농도가 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μ g/mL용액이 되도록 취하여 위와 같은 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

2.3. DPPH Radical 소거 활성 평가

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 효과는 Blois의 방법을 변형하여 수행하였다[19]. 2 mg/mL의 추출물과 널리 알려져 있는 항산화제인 트롤록스(trolox)와 미백제로 쓰이는 알부틴(arbutin)을 각각 대조군으로 사용하여 8, 16, 31, 63, 125, 500, 1000, 2000 μ g/mL의 농도로 96-well에 100 μ L를 넣고 0.4 mM DPPH 100 μ L를 첨가하여 vortex로 균일하게 혼합하였다. 실온의 암실에서 30 min 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거율은 다음과 같이 DPPH 라디칼 소거능으로 계산하였다.

$$\begin{aligned} *DPPH \text{ 라디칼 소거능}(\%) &= \\ & [1 - (OD_s - OD_b) / OD_c] \times 100 \\ OD_s &= \text{시험물질의 흡광도} \end{aligned}$$

OD_b = blank의 흡광도
 OD_c = control의 흡광도

2.4. 세포 내 티로시나제 활성 저해능 측정

세포 내 티로시나제 활성 측정은 생쥐의 B16/F10 흑색종 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/mL가 되게 준비한 후, 24 h 동안 37 °C, CO₂ 항온기에서 배양하였다. α -MSH 50 nM을 처리하고 13, 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 새발추출물 시료를 처리하여, 멜라닌 생성 유도 조건에서의 저해 효과를 관찰하였다. 72 h 동안 37 °C, CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 배양 도중 36 h 경과 시점에서, 배지 교체와 동시에 위와 같은 조건으로 다시 처리하였다. 트립신 EDTA를 이용하여 세포를 수확한 후 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 1 % Triton X-100을 함유한 67 mM 인산 나트륨 완충 용액(pH 6.8) 500 μ L로 처리하고 초음파분쇄를 실시하였으며, 이 후, 1 h 동안 얼음에서 보관하였다. 1 h 후, 4 °C 원심분리기에서 15,000 rpm으로 20 min 동안 원심분리하였으며 상층액을 취하여 세포 내 티로시나제 활성 분석에 사용했다. 세포 내 티로시나제 활성 분석은 세포 내에 존재하는 티로시나제의 작용결과 생성되는 도파크롬을 비색법에 의해 측정했다[20]. 33 mM 인산 나트륨 완충 용액(pH 6.8), 9 μ M L-티로신과 4 mM L-도파를 혼합한 후, 위에서 얻은 상층액 100 μ L를 처리하여 37 °C 항온기에서 2 h 동안 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 도파크롬을 475 nm에서 측정하여 각각의 측정값을 분석에 사용한 상층액의 단백질량으로 보정하고, 멜라닌 생성을 유도한 대조군(α -MSH 처리군)을 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다. 그리고 다음 식에 의해 저해율을 구하였다.

$$* \text{저해율}(\%) = \left[\frac{\text{보정된 } \alpha\text{-MSH 처리군의 475 nm에서의 흡광도 측정치} - \text{보정된 시료처리군의 475 nm에서의 흡광도 측정치}}{\text{보정된 } \alpha\text{-MSH 처리군의 475 nm에서의 흡광도 측정치}} \right] \times 100$$

2.5. 멜라닌 함량 측정

멜라닌 함량 측정은 Yasunobu법을 사용하였다[21]. 쥐 (*Mus musculus*)의 B16/F10 흑색종 세포주를 6 well plate에 5×10^4 cells/mL이 되게 준비한 후, 24 h 동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 α -MSH 50 nM을 처리하고 동시에 시료를 각각 처리하였다. 72 h 동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하였으며 36 h이 지난 후, 배지 교체와 동시에 α -MSH 50 nM과 시료를 다시 처리하였다. 세포를 트립신-EDTA를 이용하여 수확했다. 이렇게 수확된 세포에 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 1 % Triton X-100을

함유한 67 mM 인산 나트륨 완충 용액(pH 6.8) 500 μ L로 처리하고 초음파로 분쇄하였으며, 이 상태로 1 h 동안 얼음에서 보관하였다. 1 h 후, 4 °C 원심분리기에서 15,000 rpm으로 20 min 동안 원심분리하였으며, 이 때 상층액을 버리고 분리된 침전물에 10 % DMSO를 함유한 1 N NaOH 용액을 첨가하고 65 °C 항온 수조에서 3 h 동안 보관하면서 침전물이 용해되기를 기다린 후 이 용해된 용액을 멜라닌 함량 분석에 사용하였다. 멜라닌 함량은 490 nm에서 측정하였고, 그 측정값은 상층액의 단백질량으로 보정하였다. 그리고 α -MSH만 처리한 대조군과 비교하여 상대적인 멜라닌 함량을 측정하였다.

2.6. 단백질 발현 양상 분석

생쥐의 B16/F10 흑색종 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/mL가 되게 준비한 후, 24 h 동안 37 °C, CO₂ 항온기에서 배양하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 α -MSH 50 nM을 처리하고 동시에 새발 70 % 에탄올 추출물 시료를 13, 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 처리하였다. 72 h 동안 37 °C, CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 배양 도중 36 h이 지난 후, 배지 교체와 동시에 위와 같은 조건으로 다시 처리하였다. 이렇게 배양된 세포는 먼저 배지를 제거하고, 1 × PBS 1 mL를 첨가하여 스크레이퍼로 수거한 후, 4 °C, 2,000 rpm에서 5 min 동안 원심분리하여 세척하였다. 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 100 μ L RIPA 완충용액(10 × RIPA, 0.1 M PMSF, 0.1 M Na₃VO₄, 0.5 M NaF, 5 mg/mL aprotinin, 5 mg/mL leupeptin)로 용해시키고, 원심분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 이용하여, 10 % SDS-PAGE로 전기영동하고, 이를 polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, USA)에 이전시켰다. 그리고 이를 5 % 탈지분유가 함유된 Tris buffered saline tween 20 (TBST; 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) 용액에서 상온에서 1 h 동안 blocking을 실시하였다. 인산화된 ERK의 양을 검토하기 위한 항체로는 mouse monoclonal anti-p-ERK (Santa-Cruz, USA), iNOS의 항체로는 mouse monoclonal anti-iNOS₂ (Santa-Cruz, USA), 티로시나제의 항체로는 goat polyclonal anti-tyrosinase (Santa-Cruz, USA), Trp- 1의 항체로는 goat polyclonal anti-Trp-1 (Santa-Cruz, USA), Trp-2의 항체로는 rabbit polyclonal anti-Trp-2 (Santa-Cruz, USA), β -actin의 항체로 mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma, USA)을 5 % 탈지분유가 함유된 TBST 용액에 희석하여 4 °C, 24 h 동안 반응시켰다. TBST 용액으로 세척하고, 2차 항체로는 horse radish peroxidase가 결합된 anti-goat, anti-mouse, anti-rabbit IgG를 5 % 탈지분유가 함유된 TBST 용액에 희석하여 상온에서 1 h 동안 반응시켰다. 그 후, mem-

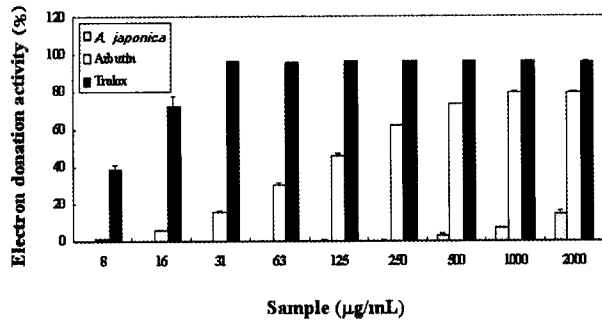


Figure 1. Anti-oxidant effect of *A. japonica* in DPPH assay. A solution of 100 μL of 0.4 mM DPPH solution in methanol was gently mixed with 100 μL of *A. japonica* solution for 30 min and absorbance was measured at 517 nm. The data was expressed as mean values (\pm S.D.) of the three independent experiments.

brane을 TBST로 세 번 세척하고 ECL kit (Amersham, USA)를 사용하여 1 ~ 3 min 동안 반응시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성

페놀성 물질은 식물계에서 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질이 있으며, 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 갖는다[22]. Tannic acid를 standard로 사용하여 검량선을 작성하고 이로부터 새발 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 새발 추출물의 폴리페놀 함량은 2.0 %로 육상식물에 비해 낮았다(data not shown). 멜라닌 합성과정은 일련의 산화과정이며, 이로 인해 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동하여 항산화제로서의 역할을 수행하게 된다. 그러므로, 항산화 활성이 아주 좋은 물질의 경우, 멜라닌 합성과정을 저해하여 미백 생리활성이 나타나게 된다[17]. 이에 따라 항산화 활성을 분석한 결과, 항산화제로 알려진 트롤록스의 DPPH 라디칼 소거활성은 IC_{50} 값이 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 미백제로 알려진 알부틴의 DPPH 라디칼 소거활성은 IC_{50} 값이 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인데 비해, 새발 추출물은 DPPH 라디칼 소거활성이 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 14.2 %로 IC_{50} 값이 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이기 때문에 라디칼 소거활성에 의한 항산화 활성은 매우 낮은 것으로 나타났다(Figure 1). 그러므로 폴리페놀 함량 자체가 낮고, 항산화 활성이 아주 낮은 새발 추출물은 폴리히드록시 페놀화합물이 갖는 세포독성과 항산화 활성이 탁월한 화합물이 화장품 제형에 포함될 경우에

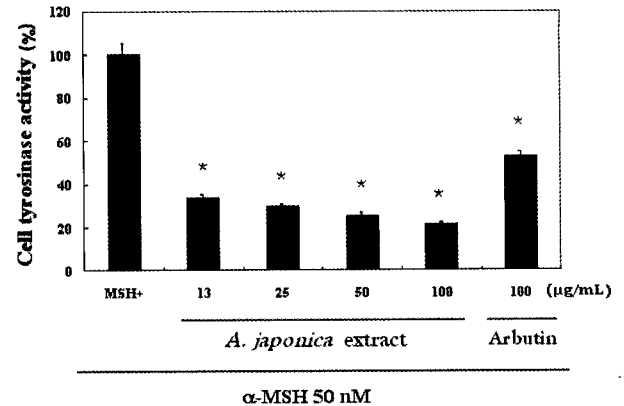


Figure 2. The effects of *A. japonica* on tyrosinase activity in murine B16/F10 melanoma cells treated with α -MSH. The cells were cultured with *A. japonica* at the indicated concentrations for 36 h. And then, α -MSH was added and *A. japonica* solution was retreated in the same manner for another 12 h. The data was expressed as mean values (\pm S.D.) of the three independent experiments. * $p < 0.05$ compared with α -MSH-treated cells. Arbutin was used as a reference material.

쉽게 산화되어 일어나는 제형의 불안정성, 변색, 변취 등의 문제를 상대적으로 적게 가질 수 있을 것이라 사료된다[22].

3.2. α -MSH에 의해 유도된 B16/F10 흑색종 세포 내 멜라닌 생성저해 효과

α -MSH 50 nM로 멜라닌 생성과정을 촉진시켜준 B16/F10 흑색종 세포에 새발 추출물 시료를 13 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 세포 내 티로시나제 저해활성을 분석하였다(Figure 2). 시료 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 처리시 알부틴의 세포 내 티로시나제 저해활성이 47.4 %인데 반해, 새발 추출물은 86.9 %로 알부틴보다 세포 내 티로시나제 저해활성이 좋은 것을 알 수 있었다. 그리고 멜라닌 생성 저해정도는 알부틴이 32.9 %인데 비해 새발 추출물은 46.1 %로, 결과적으로 α -MSH에 의해 유도되어진 B16/F10 흑색종 세포 내에서 멜라닌 생성저해효과도 좋은 것을 알 수 있다(Figure 3). 이는 새발 추출물이 멜라닌 생성을 자극하는 작용제인 α -MSH에 의해 유도되어진 세포 내 티로시나제 활성을 저해함으로써 결과적으로 생성되는 멜라닌의 함량도 줄어들고 있다는 것을 의미하며, 새발 추출물의 멜라닌 생성저해 효과가 단순한 활성산소 소거활성에 의한 것일 가능성이 상대적으로 낮다는 것을 알 수 있었다.

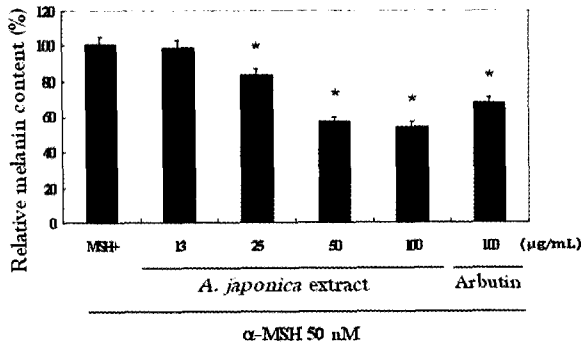


Figure 3. The effects of *A. japonica* on melanin production in murine B16/F10 melanoma cells treated with α -MSH. The cells were treated with *A. japonica* solution at the indicated concentrations for 36 h. And, then α -MSH was added and *A. japonica* solution was retreated in the same manner for another 12 h. The absorbance was measured at 490 nm and the corresponding total protein content was used to normalize absorbance. The data was expressed as mean values (\pm S.D.) of the three independent experiments. * $p < 0.05$ compared with α -MSH-treated cells. Arbutin was used as a reference material.

3.3. 새발 추출물에 의한 B16/F10 흑색종 세포 내 백질 발현 저해 효과

새발 추출물이 멜라닌 생성과정에 관여하는 단백질 발현양상에 미치는 영향을 Western blot으로 분석하였다. 새발 추출물은 α -MSH에 의해 유도된 ERK 1/2의 활성화를 저해함으로써 멜라닌 생성성에 직접적으로 관여하는 효소인 티로시나제와 TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 확인되었다. TRP-2는 DOPAchrome tautomerase라고 불리며, 그 기능은 중간대사산물인 DOPAchrome을 주로 DHICA로 이성화시키며, 멜라닌 생중합체 내에 carboxylated subunits의 구성을 조절하는 스위치 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 그러나, B16 흑색종 세포에서, α -MSH와 같은 몇몇 멜라닌 생성 활성화 인자들은, 멜라닌 생성 촉진 과정에서 TRP-2를 오히려 억제하는 영향을 미친다고 보고되어 있다[8-10]. 본 연구에서는, 또한 α -MSH에 의한 TRP-1의 영향이 티로시나제에 비해 훨씬 적다는 것을 알 수 있었다(Figure 4). 이는 미백의 지표물질인 알부틴이 티로시나제의 활성 부위에서 L-티로신과 경쟁적 저해제로 작용함으로써 티로시나제 특이적인 멜라닌 생성저해 효과를 보이는 것[24]과는 달리 α -MSH에 의해 유도된 ERK 1/2의 활성화와 관련된 세포신호전달 경로를 저해함으로써 티로시나제와 TRP-1 등의 멜라닌 생성에 필요한 효소경로를 저해하는 것으로 보인다.

따라서 제주도 연안에 서식하며, 우뚝가사리 속에 속하는 새발(*Acanthopeltis japonica*)의 추출물은 흑색종 세포

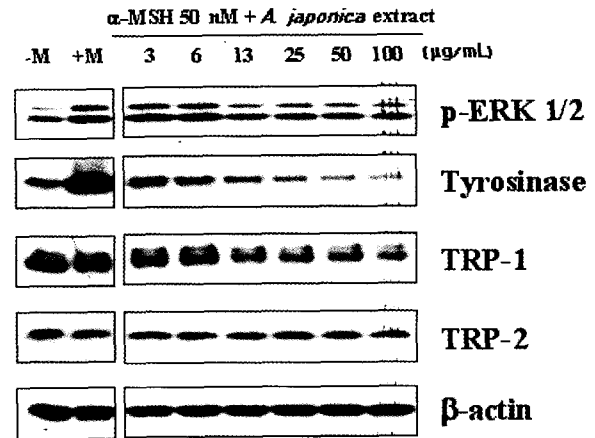


Figure 4. The effect of *A. japonica* on p-ERK 1/2, tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression in murine B16/F10 melanoma cells. The cells were treated with *A. japonica* solution at the indicated concentrations for 36 h. And then, α -MSH was added and *A. japonica* solution was retreated in the same manner for another 72 h.

에서 α -MSH에 의해 유도된 ERK 1/2의 활성화와 멜라닌 생성 경로를 저해하는 효과가 입증됨으로써 미백 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구를 위해 물심양면으로 도움을 주신 제주대학교 지역기술혁신센터 김세재 소장님과 임직원 여러분, 그리고 시료의 채집과 동정에 애써준 김병석 선생님께 진심 어린 감사의 마음을 전합니다.

참고 문헌

- H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged swords, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
- J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 982 (1994).
- M. Veronique and B. Friedrich, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
- R. K. Tripathi, V. J. Hearing, K. Urabe, P. Aroca, and R. A. Spritz, Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase, *J. Biol.*

- Chem.*, **267**, 707 (1992).
5. A. Korner and J. Pawelek, Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin, *Science*, **217**, 1163 (1982).
 6. R. Han, H. P. Baden, J. L. Brissette, and L. Weiner, Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay, *Pigment Cell Res.*, **15**, 290 (2002).
 7. T. Kobayashi, G. Imokawa, D. C. Bennett, and V. J. Hearing, Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein), *J. Biol. Chem.*, **273**, 31801 (1998).
 8. P. Manga, K. Sato, L. Ye, F. Beermann, M. L. Lamoreux, and S. J. Orlow, Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related protein 1 and 2 *in vitro*, *Pigment Cell Res.*, **13**, 364 (2000).
 9. K. Tsukamoto, I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague, and V. J. Hearing, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase, *EMBO J.*, **11**, 519 (1992).
 10. J. H. Martinez-Liarte, F. Solano, J. C. Garcia-Borron, J. R. Jara, and J. A. Lozano, α -MSH and other melanogenic activators mediate opposite effects on tyrosinase and DOPAchrome tautomerase in B16/F10 mouse melanoma cells, *J. Invest. Dermatol.*, **99**, 435 (1992).
 11. G. Imokawa, T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi, and Y. Yada, The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis, *Pigment Cell Res.*, **10**, 218 (1997).
 12. A. J. Thody and A. Graham, Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?, *Pigment Cell Res.*, **11**, 265 (1998).
 13. S. Im, E. S. Lee, W. Kim, W. On, J. Kim, M. Lee, and W. H. Kang, Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte, *J. Korea Med. Sci.*, **17**, 58 (2002).
 14. C. Romero-Graillet, E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne, and R. Bailotti, Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated stimulates melanogenesis, *J. Clin. Invest.*, **99**, 635 (1997).
 15. B. A. Gilchrest, H. Y. Park, M. S. Eller, and M. Yaar, Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 1 (1996).
 16. J. Grabbe, P. Welker, E. Dippel, and B. M. Czarnetzki, Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes, *Arch Dermatol. Res.*, **287**, 78 (1994).
 17. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**, 101 (2003).
 18. T. Gutfinger, R. Ashkenazy, and A. Letan, Determination of benzoic and sorbic acids in orange juice, *Analyst.*, **101**, 49 (1976).
 19. S. Blois, A note on free radical formation in biologically occurring quinones, *Biochem. Biophys. Acta.*, **18**, 165 (1955).
 20. S. H. Pomerantz, The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase, *J. Biol. Chem.*, **241**, 161 (1966).
 21. O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Hitoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS*, **6**, 69 (2003).
 22. Y. Lu and L. Yeap Foo, Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*), *Food Chem.*, **75**, 197 (2001).
 23. H. H. Kang, H. S. Rho, J. S. Hwang, and S. G. Oh, Depigmenting activity and low cytotoxicity of alkoxy benzoates or alkoxy cinnamate in cultured melanocytes, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 1085 (2003).
 24. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765 (1996).