J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 35, No. 4, December 2009, 271-276

4-(R_1)-Benzyl alcohol 및 4-(R_2)-Phenol 유도체들의 Tyrosinase 활성 저해에 대한 3D-QSAR 분석

김 상 진† · 이 명 희

대전보건대학 화장품과학과

(2009년 12월 11일 접수, 2009년 12월 18일 수정, 2009년 12월 22일 채택)

3D-QSAR Analyses on the Inhibition Activity of 4-(R_1)-Benzyl Alcohol and 4-(R_2)-Phenol Analogues Against Tyrosinase

Sang-Jin Kim† and Myoung-Hee Lee

Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Sciences College, 77-3, Gayang 2-dong, Dong-gu, Daejeon 300-711, Korea

(Received December 11, 2009; Revised December 18, 2009; Accepted December 22, 2009)

요 약: 기질 화합물로써 일련의 4-(R_1)-benzyl alcohol 및 4-(R_2)-phenol 유도체들의 치환기(R_1 및 R_2)가 변화함에 따른 tyrosinase 활성저해에 관한 3차원적인 구조-활성 상관 (3D-QSARs) 모델을 유도하고 정량적으로 검토하였다. 그 결과, 입체장, 정전기장, 소수성장 및 수소결합 주게장의 조합조건에서 통계적으로 양호한 CoMSIA 2 모델(상관성; r^2 = 0.858 및 예측성; q^2 = 0.951)을 유도하였다. 등고도 분석결과, 기질분자의 R_2-치환기는 입체적으로 작고 음전하를 띄며, 소수성이면서 수소결합 주게장을 선호하지 않는 치환기가, 그리고 R_1-치환기는 양전하를 띄며 수소결합 주게장을 선호하는 치환기가 tyrosinase의 저해활성이 증가 될 것으로 예상되었으며, 수소결합 받게장은 전혀 영향을 미치지 않았다.

Abstract: The 3-dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSARs) models between the substituents with changing groups (R_1 & R_2) of 4-(R_1)-benzyl alcohol and 4-(R_2)-phenol derivatives as substrate molecule and their inhibitory activities against tyrosinase were derived and discussed quantitatively. The optimized CoMSIA 2 model have best predictability and fitness (r^2 = 0.858 & q^2 = 0.951). The contour maps of optimized CoMSIA 2 model showed that, the inhibitory activities of the analogues against tyrosinase were expected to increase when hydrophobic favor, negative charge favor, steric disfavor and hydrogen bond donor disfavor groups were substituted at the R_2 position. When the positive charge and the hydrogen bond donor favor groups were substituted at the R_1 position, it is predicted that the substituents will be able to increase the inhibitory activity. However, hydrogen bond acceptor did not affect inhibitory activities of tyrosinase.

Keywords: *CoMFA, CoMSIA, 3D-QSAR, 4-(R_1)-benzyl alcohol and 4-(R_2)-phenol analogues, Tyrosinase inhibitory activity*

1. 서 론

피부의 색은 멜라닌이나 헤모글로빈과 같은 색소들의 함량에 따라 결정되며 가장 크게 영향을 미치는 색소는 멜라닌으로 알려져 있다. 멜라닌은 기저층에 존재하는 멜라노사이트 내의 멜라노좀에서 tyrosinase, TRP-1 (tyrosine related protein)과 TRP-2 또는 DCT (dopachrome tautomerase)와 같은 효소들에 의하여 생합성되어 케라티노사이트의 각화과정에서 표피로 이동하여 자외선을 차단함으로써 기미나 주근깨 같은 다양한 색소침착이나 주름의 생성을 막아주는 역할을 한다[1,2]. 그러나 멜라닌은 피부를 탁하고 칙칙하게 만들어 맑고 투

† 주 저자 (e-mail: kimsj@hit.ac.kr)

명한 피부색을 갖기를 희망하는 사람들에게는 기피 대상이다.

멜라닌 생성을 차단 또는 저해하는 방법으로는 자외선 차단, tyrosinase 생합성저해, tyrosinase 활성저해, 항산화, 생성된 멜라닌색소 파괴 및 각질박리, 등의 다양한 방법이 적용되고 있으며 각각의 방법에 적합한 다양한 소재들이 개발되어 미백용 제품에 적용되고 있다. 가장 일반적인 방법은 자외선을 차단하는 방법으로 TiO_2, ZnO와 같은 무기물질과 PABA, 계피산, 벤조페논 및 살리실산 유도체 등의 유기물질이 많이 사용되고 있다. tyrosinase 활성저해제로는 L-tyrosine과 경쟁적저해 작용하는 알부틴 등과 tyrosinase 활성부위의 Cu와 킬레이트를 형성하여 tyrosinase의 활성을 저해하는 코지산 등이 많이 알려져 있다[3,4]. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA로 전환시키는 tyrosine hydroxylase 역할과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화시키는 DOPA oxidase의 역할을 한다. TRP-2라고 알려진 DCT는 DOPA chrome을 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로 이성화 시키는 이성화효소이고, TRP-1은 DHICA를 Indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시키는 역할을 하는 산화효소이다[5,6]. Nicolaus는 폴리머인 멜라닌 형성이 아미노산에 의해 만들어진 cyclo-DOPA로부터 유도된다고 하여[7] 고리 형성을 방해하면 멜라닌 생성을 차단할 수 있음을 시사하였다. 또한, tyrosinase 활성 저해제를 탐색하기 위하여 멜라닌 생합성의 출발물질인 tyrosine과 구조가 비슷한 물질이 연구 대상물질로 거론되고 있는데 이는 tyrosine의 hydroxyl-기가 tyrosinase의 구리(Cu) 원자와 반응하여 멜라닌을 합성하기 때문이며[8], tyrosine과 구조가 비슷한 화합물이 tyrosine보다 먼저 tyrosinase와 반응 후 생성된 물질이 고리를 형성하지 않는다면 효과적으로 멜라닌의 형성을 저해할 수 있을 것으로 예상되기 때문이다.

본 연구에서는 tyrosinase 활성 부위의 구리(Cu) 원자와 반응하여 멜라닌생성 저해 활성을 나타낼 것으로 예상되는 일련의 4-(R_1)-benzyl alcohol 및 4-(R_2)-phenol 유도체 중의 치환기(R_1 및 R_2) 변화와 tyrosinase 활성저해에 관한 3차원적인 정량적 구조-활성 상관관계(3D-QSAR)인 비교분자장분석(CoMFA, Comparative Molecular Field Analysis)과 비교분자유사성지수분석(CoMSIA, Comparative Molecular Similarity Indices Analysis)을 구체적으로 검토하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 분자 모델링

기질 분자로 사용된 4-(R_1)-benzyl alcohol 및 4-(R_2)-phenol 유도체(**1-8**)들의 치환기(R_1 및 R_2) 변화에 따른 tyrosinase의 활성저해값(*Obs.*pI_{50})은 문헌을 활용하였다[9]. 약물설계(drug design) 방법상 강력한 도구 중의 하나인 CoMFA 및 CoMSIA 분석은 Sybyl 분자모델링(Tripos Inc.)[10] 소프트웨어(Ver. 8.0)를 사용하였고 특정 원자의 부분적인 전하는 Gästeiger-Hückel 전하를 적용하였다[11]. 분자정렬은 phenoxy group을 분자틀(template)로 3차원 공간상에 atom base fit (AF)과 field fit (FF)의 2가지 방법으로 정렬하였다[12,13]. 모델의 상관성을 높이기 위하여 CoMFA는 입체장(S)과 정전기장(E) 그리고 소수성장(H)으로 조합된 모델로 유도하였고, CoMSIA는 입체장(S), 정전기장(E), 소수성장 및 H-bond 주게장(HD)과 H-bond 받게장(HA)으로 조합된 모델로 유도하였다[14]. 또한 화합물 수가 적으므로 전체 화합물을 training set로 설정하여(n=8) 모델의 상관성(r^2) 만을 검토하고자 하였다.

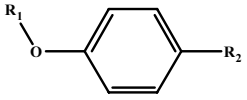
2.2. 부분 최소자승 분석

3차원 공간상에 정렬된 화합물들의 3D 구조적 특징에 관한 설명인자와 생물 활성간의 상관관계는 부분 최소자승(PLS)법[15]으로 분석하여 최적의 3D-QSARs 모델을 유도하였다. 최적의 성분수를 결정하기 위하여 LOO 교차확인(leave-one-out cross-validation)으로 최적의 예측성 값(r^2cv. 또는 q^2)과 성분수를, 비교차 확인으로 상관성($r^2_{ncv.}$) 값을 구하였다. 예측성 값은 교차확인 결과로부터 얻어지는 squared prediction errors의 합인 PRESS (predictive residual sum of squares)값을 계산하여 구하였으며 상관성은 standard 및 column filtering; 2.0 kcal/mol 조건으로 구하였다. 통계값 중, n은 각 회귀분석에 사용된 화합물의 수이고 r은 상관 계수, r^2 는 유의성, q^2는 예측성, F는 상관율이며 s는 표준편차이다. 유도된 모델의 안정성과 합리적인 예측성을 판단하려면 $r^2_{ncv.}$ 값과 q^2값이 각각 0.90 이상, 0.5 이상이어야 한다[16].

2.3. 등고도 분석

최적화된 3D-QSARs 모델의 정보에 기초한 기질분자(**1-8**)의 구조적인 특징과 활성과의 관계를 시각적으로 분석하기 위하여 field fit으로 정렬된 CoMSIA 2 모델의 특성을 3차원 공간상에 등고도(contour map)로 표시하

Table 1. Observed Inhibition Activity (*Obs* pI_{50}) of 4-(R_1)-Benzyl alcohol and 4-(R_2)-Phenol Analogues Against Tyrosinase, and Predicted Inhibition Activity (*Pred*.pI_{50}) by the Optimized 3D-QSAR Models



No.	Substituents		*Obs*.pI_{50}[a)*]	CoMFA 2		CoMSIA 2[b)]	
	R_1	R_2		Pred.	ΔpI_{50}[c)]	Pred.	ΔpI_{50}[c)]
1	H	CH_2OH	2.82	2.66	0.16	2.83	-0.01
2	H	CH_2OCOCH_3	3.64	3.52	0.12	3.63	0.01
3	$COCH_3$	CH_2OH	2.26	2.22	0.04	2.24	0.02
4	H	$CH_2OCOCH_2CH_3$	4.03	3.71	0.32	3.78	0.25
5	$COCH_2CH_3$	CH_2OH	2.26	2.24	0.02	2.21	0.05
6	H	$CH_2OCO(CH_2)_4CH_3$	3.66	3.97	-0.31	3.87	-0.21
7	H	OH	2.25	2.64	-0.39	2.49	-0.24
8	H	β-glucoside	2.41	2.36	0.05	2.28	0.13

[a)]Ref. [9]., [b)]optimized model., [c)]difference of observed (*Obs*.pI_{50}) values and predicted (*Pred*.pI_{50}) values.

였다. Figure 3 및 4에는 기질분자들 중에서 가장 높은 tyrosinase 활성저해(*Obs*.pI_{50} = 4.03)를 나타낸 R_1=H, R_2 = $CH_2OCOCH_2CH_3$ 치환체(**4**)의 등고도를 나타내었다. 이때 기여수준(favor : disfavor)의 비율(steve*co-eff)은 80 : 20으로 각각 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tyrosinase 활성 저해값

Table 1에 기질분자인 4-(R_1)-benzyl alcohol 및 4-(R_2)-phenol 유도체들(**1-8**)의 치환기(R_1 및 R_2)가 변화함에 따라 관측된 tyrosinase 활성저해값(*Obs*.pI_{50})과 두 정렬조건(AF 및 FF)에서 가장 양호한 통계값을 보인 CoMFA 2 모델과 CoMSIA 2 모델로 예측한 활성저해값(*Pred*.pI_{50}) 그리고 이들 두 값들의 차이(ΔpI_{50})도 함께 정리하였다. 기질분자 중에서 R_1 = H, R_2 = OH인 치환체(**7**)가 가장 낮은 tyrosinase 활성저해(*Obs*.pI_{50} = 2.25)를 나타낸 반면에 R_1 = H, R_2 = $CH_2OCOCH_2CH_3$ 치환체(**4**)가 가장 높은 tyrosinase 활성저해(*Obs*.pI_{50} = 4.03)를 나타내었는데 활성저해 값의 차이는 Δ*Obs*.pI_{50} = 1.78이었다.

Tyrosinase의 관측한 활성저해값(*Obs*.pI_{50})과 최적화된 CoMSIA 2 모델로 예측한 활성 저해값(*Pred*.pI_{50})과의 상관관계를 Figure 1에 나타내었다. Figure 1에서와 같이 training set에 대한 관측값과 예측값의 비례관계식(*Pred*.pI_{50}=0.954*Obs*.pI_{50} + 0.134, n = 8, s = 0.171, F = 120.657, r^2 = 0.953 및 q^2 = 0.888)으로부터 유의성, r^2 > 0.90이고 예측성, q^2 > 0.50를 나타내므로 관측값과 예측값의 상관성이 매우 양호함을 잘 설명하고 있다.

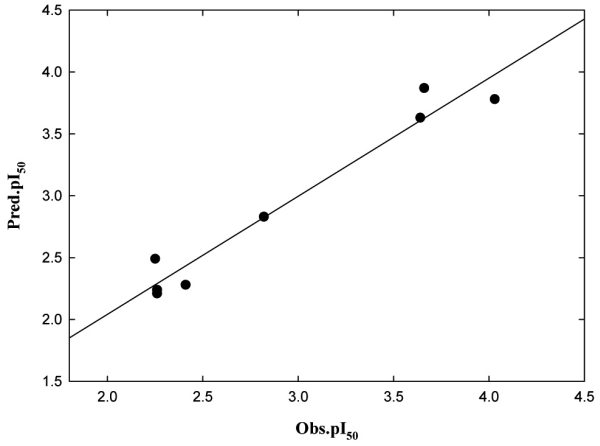


Figure 1. Relationship between observed inhibition activity (*Obs*. pI_{50}) against tyrosinase and predicted inhibition activity (*Pred*. pI_{50}) by the optimized CoMSIA 2 model. (For training set: *Pred*.pI_{50}=0.954*Obs*.pI_{50} + 0.134 n = 8, s = 0.171, F = 120.657, r^2 = 0.953 & q^2 = 0.888).

3.2. 3D-QSAR 모델

CoMFA장과 CoMSIA장의 조합에 따라 유도된 모델들의 통계값은 Table 2에 정리하였다. 정렬에 따른 모델의 PLS 분석결과를 비교한 결과, AF 정렬과 FF 정렬에는 큰 차이가 없었다. 그러나 Grid 1.0 Å 조건에서

Table 2. Summary of the Statistical Parameters of 3D-QSAR Models in Two Alignments

Models No.	Alignments	α	PLS Analyses					
			Grid (Å)	Component	$r^2_{cv.}$ [a]	$r^2_{ncv.}$ [b]	$SE_{ncv.}$ [c]	F
CoMFA 1	AF	-	2.5	1	0.794	0.897	0.259	52.082
CoMFA 2	FF	-	2.5	1	0.793	0.897	0.259	52.181
CoMSIA 1	AF	0.6	1.0	1	0.857	0.950	0.179	114.724
CoMSIA 2[d]	FF	0.6	1.0	1	0.858	0.951	0.177	117.659

Notes: F: fraction of explained versus unexplained variance; attenuation factor: α; [a]cross-validated r^2; [b]non-cross-validated r^2; [c]standard error estimate; [d]optimized model.

Table 3. Summary of Field Contribution Ratio (%), Ave. and PRESS of 3D-QSAR Models

Model No.	Field contribution (%)					Training set	
	S	E	Hy	HD	HA	Ave.	PRESS
CoMFA 1	47.7	30.8	21.5	-	-	0.178	0.406
CoMFA 2	44.8	30.9	21.5	-	-	0.176	0.395
CoMSIA 1	24.7	35.0	20.7	19.6	-	0.115	0.191
CoMSIA 2[a]	25.3	34.1	21.0	19.5	-	0.115	0.184

Notes: S: steric, E: electrostatic, Hy: hydrophobic, HD: H-bond donor field, HA: H-bond Accept field, Ave.: average residual, PRESS: Predictive residual sum of squares, [a]optimized model.

CoMSIA 모델(r^2_{cv} = 0.85, r^2_{ncv} = 0.95, $SE_{ncv.}$ = 0.177)의 예측성과 상관성이 Grid 2.5 Å 조건에서 CoMFA 모델(r^2_{cv} = 0.79, r^2_{ncv} = 0.897, $SE_{ncv.}$ = 0.259) 보다 월등한 통계값을 나타내었다. 또한, Figure 2에서와 같이 CoMSIA 2 모델은 probe atom과 기질분자 내 원자들 사이의 거리에 관련한 attenuation factor (α)와 q^2 (또는 $r^2_{cv.}$) 값과의 관계로부터 α = 0.6일 때 가장 높은 q^2값을 나타내었다. 그러므로 두 정렬조건에서 유도된 3D-QSAR 모델 중에서 양호한 통계값을 나타내는 최적화된 모델은 CoMSIA 2 모델임을 알 수 있다. 또한 training set에 대한 오차(Ave. 및 PRESS)에서도 CoMFA모델(Ave. = 0.176 ~ 0.178, PRESS = 0.395 ~ 0.406)보다 CoMSIA 모델(Ave.=0.115, PRESS=0.184 ~ 0.191)들의 오차가 현저히 작은 값을 보이므로 CoMSIA 2 모델이 가장 적절한 최적화 모델임을 재확인할 수 있다.

Table 3에는 각 정렬조건에서 유도된 모델에 따라 tyrosinase의 활성저해에 미치는 특성장(field)에 따른 기여도의 비율(%), 예측값과 관측값과의 평균편차(Ave.) 및 PRESS값을 정리하였다. FF 정렬조건과 입체장(S), 정전기장(E), 소수성장(H)과 수소결합 주게장(HD) 및 수소결합 받게장(HA)이 조합된 조건에서 유도된 최적화된 CoMSIA 2 모델을 분석한 결과, tyrosinase 활성저해에 미치는 기여비율(%)은 S : 25.3 %, E : 34.1 %, Hy : 21.0 % 및 HD : 19.5 %로 분석되어 E > S > Hy > HD의 순서로 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. Hy와 HD는 같은 비율(Hy : HD = 1 : 1)로 영향을 미치고 있지만, HA는 두 가지 모델 모두에서 활성저해에 기여하지 않는 특성을 나타내었다. 이는 수소결합 받게로 작용하는 furan, oxazoles 및 isooxazoles과 같은 비방향족 헤테로고리 화합물 중의 산소 원자나 $-CF_3$와 같은 치환기가 분자 내

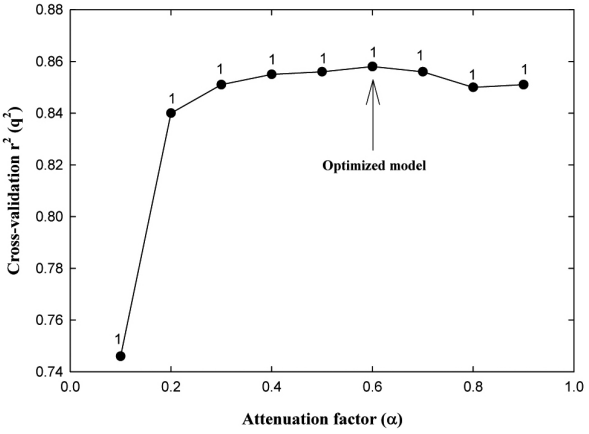


Figure 2. Variation of q^2 upon changing the attenuation factor (α) used in the distance dependence between the probe atom and the atoms of the molecules in CoMSIA 2 model (Component: 1).

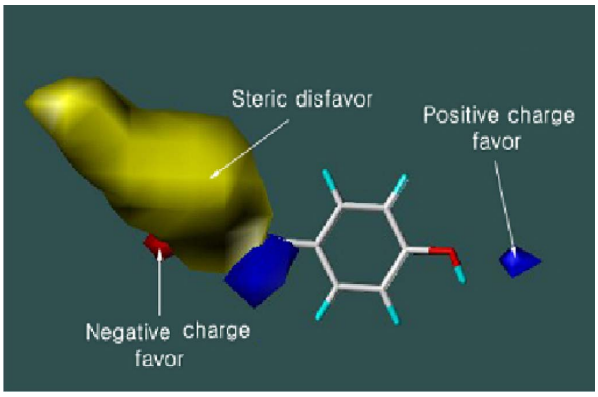


Figure 3. The contour map for the steric field and electrostatic field. The most active compound (**4**) is shown in capped sticks.

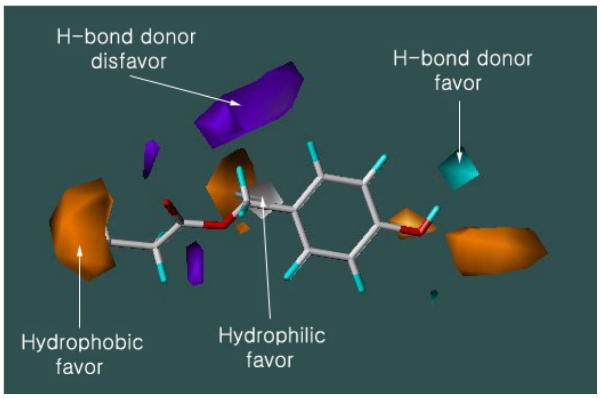


Figure 4. The contour map for the hydrophobic field and H-bond donor field. The most active compound (**4**) is shown in capped sticks.

에 존재할 경우, tyrosinase 활성저해에 효과적이지 못함을 의미한다.[17]

3.3. CoMSIA 등고도

기질 유도체 중에서 tyrosinase의 활성저해를 가장 잘 설명하는 최적화된 CoMSIA 2 모델의 입체장(S)과 정전기장(E)에 관한 등고도(Figure 3)에서, R_2-치환기에는 입체적으로 크기가 작고, moiety의 끝 부근은 음전하를 띄며, R_1-치환기는 양전하를 띄는 작용기일수록 가장 효과적으로 tyrosinase 활성 저해에 기여 할 것으로 예상되었다. 또한, 소수성장(Hy)과 수소결합 주게장(HD)에 대한 등고도(Figure 4)에서, R_2-치환기의 1번째 탄소원자(ipso C_1)에는 크기가 작은 친수성이고 그 주위와 치환기의 끝 부분은 소수성, 그리고 C_1 및 3번째 탄소원자(C_3) 주위에 수소결합 주게로 작용하지 않는 치환기가 효과적으로 tyrosinase 활성 저해를 나타낼 것이다. 이와 같이 등고도상의 특성장을 만족하는 구조적인 특성들이 기질-수용체 사이의 착화합물 형성을 안정적이고 빠르게 촉진시킴으로서 tyrosinase 활성 저해에 효과적으로 기여할 것으로 예측되었다.

4. 결 론

1) 정렬조건(AF 및 FF)은 3D-QSAR 모델의 통계값에 큰 영향을 미치지 않았으며 CoMSIA 모델(r^2_{cv} = 0.85, r^2_{ncv} = 0.95, $SE_{ncv.}$ = 0.177)의 예측성과 상관성은 CoMFA 모델(r^2_{cv} = 0.79, r^2_{ncv} = 0.897, $SE_{ncv.}$ = 0.259)보다 월등한 통계값을 나타내었다.

2) 최적화된 CoMSIA 2 모델에 의한 예측값과 tyrosinase에 대하여 관측된 4-(R_1)-benzyl alcohol과 4-(R_2)-phenol 유도체들의 활성 저해값과의 1차식(*Pred*.pI_{50} = 0.954*Obs*.pI_{50} + 0.134, n = 8, s = 0.171, F = 120.657, r^2 = 0.953 및 q^2 = 0.888) 관계는 상관성이 매우 양호함을 잘 설명하고 있다.

3) Tyrosinase 활성저해에 미치는 치환기(R_1 및 R_2)의 영향력은 정전기장 34.1 % 〉 입체장 25.3 % 〉 소수성장 21.0 % 〉 수소결합 주게장 19.5 %의 순서이었으며 등고도상의 특성장을 만족하는 구조적인 특성들이 tyrosinase 활성 저해에 효과적으로 기여 할 것으로 예측되었다. 또한, 수소결합 받게는 tyrosinase 활성 저해에 기여하지 않는 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. V. Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
2. 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).
3. G. Battaini, E. Monzani, L. Casella, L. Santagostini, and R. Pagliarin, Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 262 (2000).
4. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765 (1996).

5. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Mitchell, Melanin: A two edged sword? *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
6. M. Seiberg, Kerationcyte-melanocyte interaction during melanosome transfer. *Piment Cell Res.*, **14**, 236 (2001).
7. N. D. Sung, H. S. Jung, and S. J. Kim, Hydrolytic Reactivity and Holographic Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis on the Melanogenesis Inhibitory Activities of Alkyl-3,4-dihydroxybenzoate and N-Alkyl-3,4-dihydroxybenzamide Derivatives, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **30**, 4 (2004).
8. N. W. Boaz and S. K. Clendennen, A Green, Solvent-free Biocatalytic Method to Produce Cosmetic Esters. *Cosmetics & Toiletries*, **124**, 7 (2009).
9. Tripos Sybyl, Molecular modeling and QSAR software on CD-Rom (Ver. 8.0), *Tripos Associates, Inc.* (2001).
10. W. P. Purcell and J. A. Singer, A brief review and table of semiempirical parameters used in the Huckel molecular orbital method, *J. Chem. Eng. Data.*, **122**, 235 (1967).
11. G. R. Marshall, C. D. Barry, H. E. Bosshard, R. A. Dammkoehler, and D. A. Dunn, In computer- assisted drug design: The conformational parameter in drug design: active analog approach, *Am. Chem. Soc.*, **205** (1979).
12. M. Clark, R. D. Cramer III, D. M. Jones, D. E. Patterson, and P. E. Simeroth, Comparative molecular field analysis (CoMFA). Toward its use with 3D-structural databases. *Tetrahedron Comput. Methodol.*, **3**, 47 (1990).
13. G. E. Kellogg, S. F. Semus, and D. J. Abraham, HINT: A new method of empirical hydophobic field calculation for CoMFA. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **5**, 545 (1991).
14. R. D. Cramer, J. D. Bunce, and D. E. Patterson, Cross validation, Bootstrapping, and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies. *Quant. Struct. Act. Relat.*, **7**, 18 (1988).
15. D. C. Robert and C. F. Peter, Statistical variation in progressive scrambling. *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, **18**, 563 (2004).
16. G. Schneider and K. H. Baringhaus. Molecular Design: Concepts and Application. *WILEY-VCH. Weinheim*, 64 (2008).