

천연유래물질 펩타이드 유도체의 제조와 멜라닌 생성 저해 효과 탐색

신 경 훈 · 이 재 호* · 류 근 석 · 지 경 업 · 박 수 남** · 김 재 일* · 조 인 식 · 김 한 영[†]

에 경 산 업 (주) 중 앙 연 구 소, *광 주 과 학 기 술 원, **서 울 과 학 기 술 대 학 교, 그 린 코 스 메 틱 연 구 개 발 센 터
(2010년 9월 8일 접수, 2010년 9월 16일 수정, 2010년 9월 25일 채택)

Preparation of Natural Compounds-tripeptides Derivatives and Their Melanogenesis Inhibitory Activity

Kyong-hoon Shin, Jae Ho Lee*, Geun Seok Ryu, Kyung Yup Jee, Soo Nam Park**, Jae IL Kim*, In Shik Cho, and Han-young Kim[†]

Central Research, Aekyung R&D Center, 217-2, Shinsung-dong, Yusung-gu, Daejeon-si 305-345, Korea

*Structural Biology Lab., Gwangju Institute of Science and Technology

**Research Center for Development of Green Cosmetic, Seoul National University of Science and Technology

(Received September 8, 2010; Revised September 16, 2010; Accepted September 25, 2010)

요 약: 신규 미백 소재 개발을 위하여 tyrosinase의 활성을 억제하는 천연물과, alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH)을 저해하는 펩타이드를 결합한 소재를 고체상 합성법으로 제조하였다[1,2]. Tyrosinase 활성 억제 효능이 있는 천연유래물질을 기존 연구를 바탕으로 선정하였으며, 이 중에서 상업화 된 물질 17종에 대해 Mushroom Tyrosinase 활성 억제 효과를 측정하여, 그 중 caffeic acid, coumaric acid를 선별하였다. 펩타이드는 α -MSH 분비를 억제하며, tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 알려진 melanostatin을 선정하였으며[3-5], PLG-NH₂ (Proline-Leucine-Glycine-NH₂) 중에서 유도체화 수출의 저하 원인으로 예상되는 Proline (Pro)의 서열을 다른 아미노산으로 변경하면서 선별된 천연물인 coumaric acid와 caffeic acid에 도입하였다. 또한 최종물질의 원가를 고려하여 acid-amide 형태를 acid형태로 전환한 유도체를 합성하였다. 이들 펩타이드 유도체들에 대해서 B16F1 melanoma cell에서의 멜라닌 생성 억제 효능을 평가하여 유도체화된 물질이 기존의 천연유래물질이나 펩타이드에 비하여 높은 저해효과를 가지는 것을 확인하였다.

Abstract: Derivatives of a novel natural compounds, melanostatin (PLG-NH₂) were prepared by solid phase synthesis [1,2] and assayed to evaluate their melanogenesis inhibitory activity. Also, a small library (natural compound-XLG-NH₂, natural compound-X LG-OH) was prepared with same method for increasing synthetic yield and cost-reduction. PLG-NH₂ (Proline-Leucine-Glycine-NH₂) was well-known tripeptide as its α -MSH release-inhibiting activity and tyrosinase inhibitory activity[3-5]. In order to choose best candidate for peptide derivatization, various natural compounds were screened by their tyrosinase inhibitory activity. As a result, caffeic acid and coumaric acid were selected. Most of these derivatives showed better activities than the parent natural compound, melanostatin.

Keywords: melanostatin, caffeic acid, coumaric acid, melanogenesis

1. 서 론

멜라닌은 적갈색 또는 흑갈색의 고분자 화합물로서 멜라닌 세포 내의 멜라닌 소포체 소기관에서 합성되며, 이

는 인접 각질형성 세포에 전달되어 피부의 색을 나타내게 된다. 과색소침착은 이러한 멜라닌의 축적이 과다하게 나타나는 피부에서 나타나며, 기미, 주근깨 등으로 피부에 나타나기도 한다[6]. 과색소침착을 개선하기 위해서 사용되는 retinoic acid, azelaic acid, hydroquinone 등이 효과가 있다고 알려져 있으나, 이는 피부 부작용 등으

[†] 주 저자 (e-mail: hans73@aekyung.kr)

로 인하여 화장품의 미백성분으로는 사용이 금지되어 있다[7]. 일반적으로 많이 사용되고 있는 arbutin과 같은 미백 원료는 임상적인 효과는 미약하지만, 안전성이 높다는 이유로 많이 사용이 되고 있다. 이와 같은 이유로 안전하면서 임상적으로도 효능이 뛰어난 미백소재를 찾기 위해서 많은 연구가 진행되고 있다.

특히 최근 들어서는 기존에 상용화가 가장 많이 되어 있는 티로시나제의 저해라는 하나의 미백 기작[8,9]에서 벗어나 새로운 기작을 연구하고 적용하려는 경향이 늘고 있다. 이는 기존에 상용화된 미백 소재들의 한계가 점차 드러남에 따라 새로운 접근 방법으로 이를 극복하고자 함이다. 이러한 새로운 접근 방법으로 멜라닌 형성을 촉진시키는 자외선, 사이토카인 및 호르몬 등의 영향을 감소시키거나[10], 티로시나제의 전사를 조절하는 멜라닌 생성 전 단계[11-16], 생성된 멜라닌이 멜라노솜의 형태로 각질형성 세포에 전달되는 멜라닌의 전달 단계 등을 조절하는 소재[17,18] 등 여러 가지 다른 기작을 조절하는 소재들이 개발되고 있다.

이러한 소재들 중 각 단계에 관여하는 물질들의 근간을 이루는 펩타이드를 이용하고자 하는 연구들이 활성화되고 있다[19-21]. 펩타이드는 생체친화적이며 매우 높은 활성을 가지기 때문에 차세대 신소재로 화장품 및 의약품 업계에서 많은 연구를 진행하고 있다. 하지만 안정성이 매우 낮기 때문에 피부에서 쉽게 분해되어 활성을 잃는 단점이 있다[22]. 이러한 쉽게 분해되는 펩타이드의 단점을 해결하기 위해 C 말단을 amidation하거나 N 말단을 작은 유기물질로 capping 하는 방법이 많이 이용되고 있다[23].

본 연구에서는 미백 효능을 갖는 펩타이드에 일반적인 유기물질 대신에 천연유래물질 또는 이와 유사한 구조를 갖는 물질을 결합하여 미백 효능의 상승효과를 발휘하면서도 안정성이 높은 인체에 안전한 신규 미백 소재를 개발하고자 하였다. 이를 위해서 미백 효능을 갖는 천연유래물질의 탐색하였고, 이 중에서 선정된 caffeic acid와 coumaric acid에 미백 효능을 갖는 펩타이드를 도입한 유도체를 합성하고 합성된 유도체의 미백 활성 변화를 평가하고자 하였다. 또한 합성의 용이성과 합성 유도체의 원가를 고려하여 미백효능이 알려진 펩타이드 중에서 가장 짧은 서열을 가지고 있는 펩타이드 중에 하나인 melanostatin을 이용하였다. Melanostatin은 α -MSH의 발현 자체를 억제하여 미백효능을 발휘하는 펩타이드이다[3-5].

또한 본 연구에서는 개발된 유도체의 상용화 가능성을

높이기 위하여 선정된 펩타이드의 서열 중에 천연유래물질이 도입되는 쪽인 N 말단의 Proline (Pro)를 다른 구조가 간단한 아미노산으로 바꾼 형태의 작은 library를 제조하였다. C-말단 부분도 amidation을 진행하지 않은 acid 형태로 유지한 library도 제조하였으며, 준비된 각각의 유도체에 대하여 멜라닌 형성 억제 효과를 확인하여 새로운 미백 소재로 가장 개발 가능성이 높은 유도체를 찾고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

시험에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co (St. Louis, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였고, 배지로 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, USA)를 사용하였다. B16F1 melanoma cell은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다. Fmoc 아미노산은 BeadTech (Seoul, Korea)사의 제품을 구입하여 사용하였으며, benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent), Hydroxybenzotriazole (HOBt), diisopropylethylamine (DIEA)는 TCI (Tokyo, Japan)사의 제품을 사용하였고, Rink amide resin, 2-Chlorotriyl (CTC) resin은 GLS (shanghai, China)사의 제품을 사용하였다. 합성에 사용된 천연유래물질인 caffeic acid, coumaric acid는 TCI (Tokyo, Japan)사의 제품을 사용하였고, 천연유사물질인 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid는 Acros (New Jersey, USA)사의 제품을 사용하였으며, melanostatin은 ANYGEN사(Kwangju, Korea)의 제품을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. Mushroom Tyrosinase 활성 억제 측정

버섯 tyrosinase 활성저해효과는 Jang[24,25] 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 에탄올에 용해한 적정 농도의 시험물질을 96well plate의 각 well에 50 μ L씩 넣고 0.1 M sodium phosphate buffer에 녹인 버섯 tyrosinase (2500 units/mL) 50 μ L와 10 mM의 L-tyrosine 100 μ L를 넣었다. plate를 37 $^{\circ}$ C에 10 min 동안 반응시킨 뒤 ELISA microplate reader로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 억제율(%)을 하기식을 이용하

여 구하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성 저해율(\%)} = (1 - \text{시험용액의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) * 100$$

2.2.2. 세포 배양 및 멜라닌 생성량 측정

실험에 사용된 B16F1 melanoma cell은 10 % FBS와 1 % streptomycin/penicillin이 첨가된 DMEM배지를 사용하였으며, 37 °C에서 5 % CO₂ 조건에서 배양하여 사용하였다. 계대배양된 B16F1 melanoma cell을 6 well plate에 3 × 10⁵ cell/well의 농도로 분주한 후 1일 뒤에 각 약물들을 일정농도로 처리하였다. 2일째 세포를 인산 완충용액(pH 7.4)으로 세척하고 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 바닥에서 떼어내어 수득하였다. 2,500 rpm, 10 min, 4 °C 조건으로 원심분리한 후 상층액을 버리고 인산완충용액으로 재 세척한 후 추가로 원심분리를 진행하여 상층액을 제거하였다. 수득된 세포를 건조한 후 1 N NaOH + 10 % DMSO용액 500 uL을 추가한 후 60 °C에서 1 h 동안 증탕하여 멜라닌을 녹였다. 멜라닌을 녹인 용액을 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 합성멜라닌을 사용하여 작성된 표준 직선을 이용하여 정량하였다. 멜라닌 녹인 용액의 단백질 농도 확인을 위하여 멜라닌 용액 3 uL과 advanced protein assay reagent를 300 uL을 반응하여 590 nm 1 min 이내에 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 1 % Bovine serum albumin (BSA)을 이용하여 표준 곡선을 작성하여 정량하였다.

2.2.3. Rink amid 레진에서 펩타이드 유도체 합성 방법

치환율이 0.5 mmol/g인 Rink amid 레진을 반응기에 가하고 N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) 용매에서 2 h 동안 팽윤시켜준 뒤, 20 % piperidine/NMP를 가하여 30 min 반응하여 레진의 Fmoc 보호기를 제거한다. 용액을 제거한 뒤, 20 % piperidine/NMP를 레진이 들어있는 반응기에 다시 가하고 1 h 동안 반응시켜 준다. 다시 용액을 제거한 뒤, 레진을 NMP, Methanol (MeOH), Dichloromethane (DCM)으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하여 잉여의 반응용액을 제거한다. 이 과정을 2회 반복하여 Fmoc 보호기를 확실히 제거한다.

위의 반응기에 Fmoc으로 아민 말단이 보호된 아미노산(치환기의 2당량)과, BOP reagent, HOBt, DIEA을 각각 아미노산의 1당량, 1당량, 1.1당량을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 3 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다[26]. 반응기

의 용액을 모두 제거하고 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척 한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하였다. 세척이 완료된 레진에 20 % piperidine/NMP를 가하고 앞서 설명한 방법과 동일한 반응을 진행하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 뒤에 이어서 다른 2종의 Fmoc 아미노산을 같은 방법으로 레진에 도입한다.

위와 같이 tripeptide가 도입된 레진에 천연유래(유사)물질(치환기의 2당량), BOP reagent (아미노산 시약과 동량), HOBt (아미노산 시약과 동량), DIEA (아미노산 시약의 1.1 당량)을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 24 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다.

상기와 같이 Rink amide 레진 위에서 제조된 최종생성물인 펩타이드 유도체를 reagent K를 이용하여 알려진 방법으로 레진에서 분리하였다[27]. 분리된 펩타이드 유도체는 cold ether를 이용하여 침전시킨 후, 0 °C에서 원심분리하여 용액과 분리하였다. 분리된 펩타이드 유도체는 동일 조건에서 cold ether를 20 mL 가하여 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 불순물을 제거하였다. 최종 생성물을 원심분리가 끝난 펩타이드 유도체를 24 h 동안 동결건조(FDU-2200, EYELA, Japan)하여 최종생성물을 얻었다.

2.2.4. 2-CTC 레진에서 펩타이드 유도체 합성 방법

치환율이 0.5 mmol/g인 Rink amid 레진을 반응기에 가하고 NMP 용매에서 2 h 동안 팽윤시켜준 뒤, Fmoc으로 아민 말단이 보호된 아미노산(치환기의 2당량), DIEA (아미노산 시약의 1.1 당량)을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 2 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다. 반응기의 용액을 모두 제거하고 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하였다. 세척이 완료된 레진에 20 % piperidine/NMP를 가하고 1 h 동안 반응시켜 준다. 다시 용액을 제거한 뒤, 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하여 잉여의 반응용액을 제거한다. 이 과정을 2회 반복하여 Fmoc 보호기를 확실히 제거한다.

위의 반응기에 Fmoc으로 아민 말단이 보호된 아미노산(치환기의 2당량), BOP reagent (아미노산 시약과 동량), HOBt (아미노산 시약과 동량), DIEA (아미노산 시약의 1.1 당량)을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 3시간 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다. 반응기의 용액을 모두 제거하고

레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막으로 NMP로 다시 세척하였다. 세척이 완료된 레진에 20 % piperidine/NMP를 가하고 앞서 설명한 방법과 동일한 반응을 진행하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 뒤에 이어서 다른 1종의 Fmoc 아미노산을 같은 방법으로 레진에 도입한다.

위와 같이 2-CTC 레진 위에 tripeptide가 도입된 이후에는 2.2.3의 Rink amide 레진과 같은 방법으로 진행하여 펩타이드 유도체를 얻었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Mushroom Tyrosinase 활성 억제 효과

Tyrosinase는 melanogenesis과정에서 주요한 역할을 하는 효소로 알려져 있으며, tyrosinase의 활성을 저해하는 것을 주요 기능으로 하는 미백 효능을 갖는 물질들이 많이 알려져 있으며, 실제 임상적으로도 많이 사용이 되고 있다. Tyrosinase의 활성 저해정도를 알아보기 위해서 mushroom tyrosinase를 이용하여 천연물의 tyrosinase활성 저해 정도를 비교 평가하였다. 상업화되어 있는 천연 유래물질 또는 천연유래 물질과 유사한 구조를 갖는 물질에 대하여 mushroom tyrosinase 활성을 비교 평가한 결과 coumaric acid, caffeic acid가 기존에 많이 활용되고 있는 kojic acid, arbutin보다 tyrosinase활성 저해 효과가 뛰어난 것으로 나타났으며, 50 %의 활성을 저해하는 IC₅₀값이 0.005와 0.037 mM을 나타내었다. 후보 물질들의 tyrosinase 활성 저해 효과를 Table 1에 정리하였다.

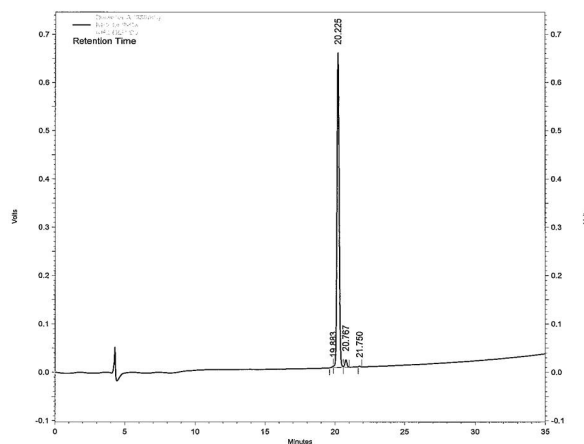
3.2. 천연물 펩타이드 유도체 합성

Coumaric acid와 caffeic acid에 펩타이드를 도입하여 32종의 천연유래 물질 펩타이드 유도체를 합성하였다 (Table 2). 합성된 천연유래물질 펩타이드 유도체의 순도와 분자량은 HPLC (Shimadzu LC-10Avp system, Shimadzu, Japan)와 MALDI-TOF-MS (Kratos Compact matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다(Figures 1, 2). HPLC에서 컬럼은 ODS column (4.6 × 250 mm; Shim-pack)을 사용하였으며, gradient 조건은 0.1 % Trifluoroacetic acid (TFA) H₂O에서 0.1 % TFA Acetonitrile 농도를 30 min 동안 5 %에서 65 %로 늘리는 것으로 하였으며 유속은 1 mL/min로 하였다. MALDI-TOF는 일반적인 펩타이드의 matrix인 α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA)를

Table 1. IC₅₀ of Natural Origin Material in Mushroom Tyrosinase

	Sample name	IC ₅₀ (mM)
Control	Kojic acid	0.118
Control	Arbutin	0.183
1	D-(-)-salicin	> 25
2	2,5-Dihydroxybenzoate	2.938
3	Methyl-2,5-dihydroxybenzoic acid	> 25
4	trans-Cinnamic aldehyde	18.085
5	4-Hydroxybenzoic acid	2.733
6	trans-p-Coumaric acid	0.012
7	2-Furaldehyde	> 25
8	Caffeic acid	0.037
9	p-Coumaric acid	0.005
10	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionic acid	2.757
11	trans-Ferulic acid	0.559
12	4-Hydroxyphenyl acetic acid	2.537
13	p-Anisaldehyde	4.170
14	Genistein	0.147
15	Quercetin	0.109
16	Galangin	0.107
17	Psoralene	> 2.5

Sample ID : NH2-GLP-Ca



Detector A (230nm)	PK #	Retention Time	Area	Area %
	1	19.883	24043	0.337
	2	20.225	6938021	97.316
	3	20.767	156130	2.190
	4	21.750	11179	0.157
Totals			7129393	100.000

Figure 1. Caffeic acid-PLG-NH₂ HPLC data. Purity of caffeic acid-PLG-NH₂ is more than 97 %.

이용하여 측정하였다.

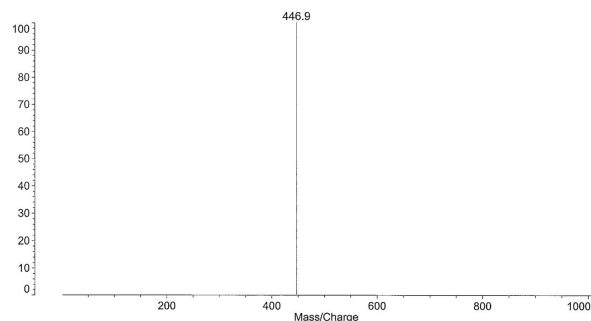
Table 2. Synthesized Coumaric Acid and Caffeic Acid Peptide Derivatives

Name	MW	Purity
Coumaric acid-ALG-OH	405.5	96.6 %
Coumaric acid-GLG-OH	391.4	97.8 %
Coumaric acid-VLG-OH	433.5	98.0 %
Coumaric acid-ILG-OH	447.5	98.7 %
Coumaric acid-PLG-OH	431.5	95.1 %
Coumaric acid-LG-OH	334.4	98.0 %
Coumaric acid-HyP-LG-OH	447.5	93.2 %
Coumaric acid-GLP-OH	431.3	98.8 %
Coumaric acid-GLG-NH ₂	391.0	96.3 %
Coumaric acid-VLG-NH ₂	433.1	94.4 %
Coumaric acid-PLG-NH ₂	431.1	90.1 %
Coumaric acid-LG-NH ₂	333.7	94.2 %
Coumaric acid-HyP-LH-NH ₂	446.7	95.7 %
Coumaric acid-ILG-NH ₂	447.0	95.5 %
Coumaric acid-GLP-NH ₂	430.7	96.5 %
Coumaric acid-ALG-NH ₂	404.7	93.9 %
Caffeic acid-ALG-OH	421.5	99.6 %
Caffeic acid-GLG-OH	407.4	93.6 %
Caffeic acid-VLG-OH	449.5	99.2 %
Caffeic acid-ILG-OH	463.5	97.8 %
Caffeic acid-PLG-OH	447.5	99.3 %
Caffeic acid-LG-OH	350.4	94.9 %
Caffeic acid-HyP-LG-OH	463.5	91.8 %
Caffeic acid-GLP-OH	447.5	96.1 %
Caffeic acid-GLG-NH ₂	406.1	95.3 %
Caffeic acid-VLG-NH ₂	448.9	96.1 %
Caffeic acid-PLG-NH ₂	446.9	97.3 %
Caffeic acid-LG-NH ₂	349.5	94.1 %
Caffeic acid-HyP-LG-NH ₂	462.7	96.6 %
Caffeic acid-ILG-NH ₂	462.4	95.4 %
Caffeic acid-GLP-NH ₂	446.5	92.0 %
Caffeic acid-ALG-NH ₂	420.5	94.3 %

3.3. 천연물 펩타이드 유도체의 멜라닌 생성 억제 효과

Mushroom tyrosinase 활성 억제 평가를 통해 tyrosinase 활성 억제를 갖는 천연물을 coumaric acid와 caffeic acid로 선정하고 여기에 펩타이드를 도입한 신규 물질의 melanin 생성 억제 효능을 측정하였다. 펩타이드를 도입한 신규 미백 물질이 기존의 coumaric acid, caffeic acid보다 멜라닌 생성 저해효과가 뛰어남을 확인할 수 있다(Tables 3, 4).

NH₂-GLP-Ca
Data: NH₂-GLP-Ca0003.H17 26 Jul 2010 14:07 Cal: 500 - 1500 1128 10 Aug 2007 7:37
Kratos PC Axima CFR V2.3.5: Mode linear, Power: 42, P.Ext. @ 1000 (bin 62)
%Int. 259 mV Profiles 1-11:

**Figure 2.** Caffeic acid-PLG-NH₂ MALDI-TOF data. The molecular weight of caffeic acid-PLG-NH₂ is 446.9 g/mol.**Table 3.** Melanogenesis Inhibition of Coumaric Acid and It's Peptide Derivatives at 50 uM Concentration

Sample	Inhibition %
Coumaric acid-ALG-OH	15.3 %
Coumaric acid-GLG-OH	42.9 %
Coumaric acid-VLG-OH	31.3 %
Coumaric acid-ILG-OH	41.1 %
Coumaric acid-PLG-OH	45.2 %
Coumaric acid-LG-OH	44.6 %
Coumaric acid-HyP-LG-OH	22.3 %
Coumaric acid-GLP-OH	17.4 %
Coumaric acid-GLG-NH ₂	33.7 %
Coumaric acid-VLG-NH ₂	42.4 %
Coumaric acid-PLG-NH ₂	47.1 %
Coumaric acid-LG-NH ₂	45.3 %
Coumaric acid-HyP-LH-NH ₂	41.3 %
Coumaric acid-ILG-NH ₂	42.3 %
Coumaric acid-GLP-NH ₂	26.7 %
Coumaric acid-ALG-NH ₂	20.1 %
p-Coumaric acid	23.2 %
Kojic acid	13.8 %
Melanostatin	13.1 %

4. 결 론

Coumaric acid와 caffeic acid는 tyrosinase 활성 저해 효과를 가지며, B16F1 melanoma에서의 melanin 생성 효과가 선택된 후보물질 중에서 뛰어났다. Coumaric acid와 caffeic acid에 멜라닌 생성을 유도하는 호르몬으로 알려진 α -MSH의 방출을 저해하며, 직접적으로 tyrosinase의 활성을 저해하는 효과를 가지는 펩타이드인

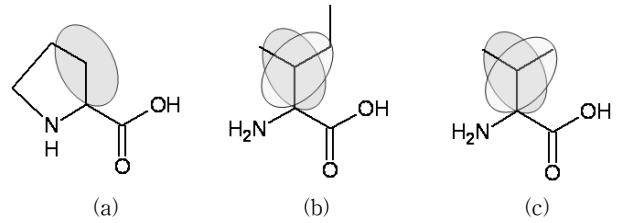
Table 4. Melanogenesis Inhibition of Caffeic Acid and It's Peptide Derivatives at 50 μ M Concentration

Sample	Inhibition %
Caffeic acid-ALG-OH	39.6 %
Caffeic acid-GLG-OH	31.4 %
Caffeic acid-VLG-OH	44.7 %
Caffeic acid-ILG-OH	42.8 %
Caffeic acid-PLG-OH	41.4 %
Caffeic acid-LG-OH	21.1 %
Caffeic acid-HyP-LG-OH	31.4 %
Caffeic acid-GLP-OH	28.2 %
Caffeic acid-GLG-NH ₂	37.9 %
Caffeic acid-VLG-NH ₂	44.4 %
Caffeic acid-PLG-NH ₂	46.4 %
Caffeic acid-LG-NH ₂	41.0 %
Caffeic acid-HyP-LG-NH ₂	42.3 %
Caffeic acid-ILG-NH ₂	43.7 %
Caffeic acid-GLP-NH ₂	17.1 %
Caffeic acid-ALG-NH ₂	33.4 %
Caffeic acid	15.6 %
Kojic acid	13.8 %
Melanostatin	13.1 %

melanostatin (PLG-NH₂)을 도입한 천연유래물질 펩타이드 유도체는 천연유래물질이나 펩타이드 단독 물질보다 멜라닌 생성 억제 능력이 증가하는 것을 확인하였다.

펩타이드의 경우 대부분의 cell에 존재하는 protease에 의해 쉽게 분해되기 때문에 그 효능의 유지가 어렵다 [22]. 하지만 합성된 유도체의 경우는 펩타이드의 N말단에 천연유래물질이 도입되었기 때문에 기존의 펩타이드에 비해 protease에 대한 안정성이 증가하여 그 멜라닌 생성 억제 효능이 향상된 것으로 보인다[23].

또한 천연유래물질 단독의 경우 tyrosinase의 효능을 억제하는 한가지의 기작을 가지지만, 펩타이드를 도입함에 따라 α -MSH의 발현을 저해하는 기능이 추가되었기 때문에 멜라닌 생성 억제 능력이 증가한 것으로 보인다. Tables 3, 4의 결과를 보면 기본적으로 본래의 melanostatin 서열인 PLG-NH₂의 N말단에 caffeic acid나 coumaric acid를 도입했던 유도체의 경우 멜라닌 생성 저해 효능이 각각 46.4 %와 47.1 %로 기존의 천연유래 물질에 비해 그 효능이 향상되었음을 알 수 있다. 여기에 미백 원료의 상용화의 가능성을 높이고자 amidation된 말단을 그 전의 acid 상태로 유지한 구조 역시 그 저해 효능이 각각 41.4 %와 45.2 %로 향상되어 그 가능성을 볼 수 있었다. 천연유래물질의 도입 수율을 향상시키기 위하여

**Figure 3.** Structural similarity of Pro, Ile and Val ((a) Proline has rigid ring side chain structure; (b) Isoleucine has symmetrical side chain and it make similar environment in α -amino position carbon structure with Proline; (c) Valine has symmetrical side chain structure also).

기존서열의 Pro를 다른 아미노산으로 전환한 구조들은 그 서열에 따라 멜라닌 저해 효능이 향상되기도 하였지만, 그렇지 못한 경우도 있었다. 이들 아미노산 중, 특히 Valine (Val)과 Isoleucine (Ile)이 기존의 Pro와 대등한 멜라닌 저해 효능의 향상효과를 보였다. 이는 이들 두 아미노산이 Pro와 비슷한 효과를 보일 수 있는 결가지를 가지고 있기 때문으로 판단된다(Figure 3). Val의 경우 ring 구조이기 때문에 원으로 표시한 부분이 항상 유지되지만, 다른 아미노산의 결가지는 해당 부분 결합의 회전이 가능하기 때문에 그렇지 못하다. 하지만, Val과 Ile의 경우는 해당 부분이 회전을 한다고 해도 대칭적이기 때문에 Pro와 비슷한 효과를 보이는 것으로 판단된다.

그리고 가장 중요한 것은 Pro 자체를 생각하고 caffeic acid나 coumaric acid를 도입한 경우이다. 이들은 각각 41.0 %와 45.3 %의 멜라닌 생성 억제 효과를 보여서 기존의 서열인 melanostatin을 도입한 유도체에 비해 손색이 없는 향상효과를 보였다. 아미노산 서열자체를 생략한 구조는 원료의 원가구조에 매우 좋은 영향을 줄 것이며, 그 결과로 미백원료의 상용화 가능성이 더욱 향상될 것으로 판단된다.

본 연구를 통하여 천연물에 기능성을 갖는 펩타이드의 도입을 통하여 한 물질이 다양한 기능을 가질 수 있으며, 그 효과가 증가할 수 있다는 가능성을 확인하였다. 추가적으로 각질형성세포와 멜라노 사이트의 co-culture를 통하여 자외선 등에 의해서 발현이 유발되는 α -MSH의 생성 변화를 확인하여 본 시험물질의 효능 기작을 확인해야 할 여지가 남아있다.

추가적으로 α -MSH를 리간드로 하는 리셉터인 melanocortin receptor를 타겟으로 하는 펩타이드를 천연물에 도입하여, tyrosinase 활성을 억제하면서 α -MSH에 의한 melanogenesis도 저해하는 소재개발에 대한 연구도 진행될 예정이다.

결론적으로 미백기능을 갖는 천연유래물질과 펩타이드의 유도체화를 통해서 기존에 가지고 있던 천연유래물질의 효능을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. Coumaric acid와 caffeic acid에 다양한 기능을 갖는 펩타이드의 결합을 통해서 더욱 강력한 미백 소재를 개발할 수 있는 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A092055).

참고 문헌

- H. Kim, J. Choi, J. K. Cho, S. Y. Kim, and Y. S. Lee, Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 2843 (2004).
- D. S. King, C. G. Fields, and G. B. Fields, A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **36**, 255 (1990).
- T. K. von Almen, G. A. Olson, and R. D. Olson, Behavioral effects of melanocyte stimulating hormone release-inhibiting factor-1, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **7**(2), 257 (1983).
- WO2007137015A2, Dermatological uses of tri-, tetra-, penta-, and polypeptides
- A. M. Lopez-Contreras, J. H. Martinez-Liarte, F. Solano, P. Samaraweera, J. M. Newton, and J. T. Bagnara, The amphibian melanization inhibiting factor (MIF) blocks the alpha-MSH effect on mouse malignant melanocytes, *Pigment Cell Res.*, **9**(6), 311 (1996).
- K. Schallreuter, A. Slominski, J. M. Pawelek, K. Jimbow, and B. A. Gilchrist, What controls melanogenesis?, *Exp. Dermatol.*, **7**, 143 (1998).
- A. Perez-Bernal, M. A. Munoz-perez, and F. Camacho, Management of facial hyperpigmentation, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **1**(5), 261 (2000).
- Y. J. Kima and H. Uyamab, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1707 (2005).
- S. Parvez, M. Kang, H. Chung, C. Cho, M. Hong, M. Shin, and H. Bae, Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents, *Phytother. Res.*, **20**, 921 (2006).
- D. Kim, S. Park, S. Kwon, K. Li, S. Youn, and K. Park, (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production, *Arch. Pharm. Res.*, **27**(3), 334 (2004).
- S. Boonanuntanasarn, G. Yoshizaki, and T. Takeuchi, Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 1089 (2003).
- J. W. Wiechers, A. V. Rawlings, C. Garcia, C. Chesne, P. Balaguer, J. C. Nicolas, S. Corre, and M.-D. Galibert, A new mechanism of action for skin whitening agents: binding to the peroxisome proliferator activated receptor, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **27**, 123 (2005).
- K. Sato, H. Takahashi, R. Iraha, and M. Toriyama, Down-regulation of tyrosinase expression by acetylsalicylic acid in murine B16 melanoma, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**(1), 33(2008).
- J. Koo, H. T. Kim, H. Yoon, K. Kwon, I. Choi, S. H. Jung, H. Kim, B. Park, and J. Park, Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cell, *Exp. Mol. Medicine*, **40**(3), 313 (2008).
- K. Sato and M. Toriyama, Depigmenting Effect of Catechins, *Molecules*, **14**, 4425 (2009).
- K. Ohguchi, C. Nakajima, M. Oyama, M. Inuma, T. Itoh, Y. Akao, Y. Nozawa, and M. Ito, Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* 'Fuyu') on melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**(1), 122 (2010).
- K. V. Bossche, J. Naeyaert, and J. Lambert, The quest for the mechanism of melanin transfer, *Traffic*, **7**(7), 769 (2006).
- R. E. Boissy, Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte, *Experimental Dermatology*, **12**, 5 (2003).
- S. Bonetto, I. Carlván, and D. Baty, Isolation and

- characterization of antagonist and agonist peptides to the human melanocortin 1 receptor, *Peptides*, **26**, 2302 (2005).
20. C. Haskell-Luevano, J. R. Holder, E. K. Monck, and R. M. Bauzo, Characterization of melanocortin NDP-MSH agonist peptide fragments at the mouse central and peripheral melanocortin receptors, *J. Med. Chem.*, **44**, 2247 (2001).
21. M. Tsatmali, J. Ancans, and A. J. Thody, Melanocyte function and its control by melanocortin peptides, *J. Histochem. Cytochem.*, **50**(2), 125 (2002).
22. L. H. Brinckerhoff, V. V. Kalashnikov, L. Thompson, G. V. Yamshchikov, R. A. Pierce, H. S. Galavotti, V. H. Engelgard, and C. L. Slingluff, Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines, *Int. J. Cancer*, **83**, 326 (1999).
23. M. F. Powell, T. Stewart, L. Otvos, L. Urge, F. C. A. Gaeta, A. Sette, T. Arrhenius, D. Thomson, K. Soda, and S. M. Colon, Peptide stability in drug development. II. Effects of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum, *Pharm. Res.*, **10**, 1268 (1993).
24. D. I. Jang, B. G. Lee, C. O. Jeon, N. S. Jo, and J. S. Koh, Melanogenesis inhibitor from paper mulberry, *Cosmet. Toiletries*, **112**(3), 59 (1997).
25. A. Andrawis and V. Kahn, Effect of methimazole on the activity of mushroom tyrosinase, *Biochem. J.*, **235**, 91 (1986).
26. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, and P. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.* **34**, 595 (1970).
27. *Synthetic Peptides: A User's Guide* (G.A. Grant, ed.), W.H. Freeman and Company, New York, (1992).