

B16F10 멜라닌 세포에서 신규 헥사펩타이드의 MITF 조절을 통한 멜라닌 생성 저해 효과

이 응 지[†] · 김 잔 디 · 정 민 경 · 이 영 민 · 정 용 지 · 김 은 미

(주)케어젠 중앙연구소

(2019년 12월 5일 접수, 2020년 3월 13일 수정, 2020년 3월 18일 채택)

Inhibitory Effects of Novel Hexapeptide on Melanogenesis by Regulating MITF in B16F10 Melanoma Cells

Eung Ji Lee[†], Jandi Kim, Min Kyeong Jeong, Young Min Lee, Yong Ji Chung, and Eun Mi Kim

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea
(Received December 5, 2020; Revised March 13, 2020; Accepted March 18, 2020)

요약: 본 연구에서는 6 개의 아미노산으로 이루어진 헥사펩타이드(hexapeptide)의 미백 효능에 대해 수행하였다. 실험 결과 헥사펩타이드 처리에 의해 유의한 수준의 멜라닌 생성 저해가 관찰 되었고, 멜라닌 생성 과정에 관여하는 주요 효소인 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 억제됨이 관찰 되었다. 멜라닌 생성 관련 인자들의 발현을 관찰 한 결과 tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) 및 이들의 상위 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현이 헥사펩타이드 처리에 의해 유의한 수준으로 저해 되었다. 또한 헥사펩타이드 처리에 의해 MITF 발현을 조절하는 상위 전사인자인 cAMP-response element binding protein (CREB)의 인산화가 저해 되었고 MITF 인산화를 통해 프로테아좀 분해(proteasomal degradation)를 유도하는 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 인산화가 증가 되었다. 이외에도, 멜라노솜의 세포 내 이동에 관여하는 복합체의 구성 인자들로 알려진 Rab27A, melanophilin, myosinVa의 발현도 헥사펩타이드에 의해 유의한 수준으로 저해 되었다. 이 결과를 통해, 본 연구의 헥사펩타이드는 멜라닌세포의 멜라닌 생성 관련 핵심 전사인자인 MITF의 발현 및 분해 조절을 통해 멜라닌 생성 억제 및 멜라노솜 이동과 같은 전반적인 멜라노솜 성숙 과정에 저해 효과를 나타내는 것으로 보인다. 헥사펩타이드의 이러한 미백 효능은 신규 미백 기능성 화장품 소재로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, we investigated anti-pigmentation effect of a hexapeptide. The peptide significantly reduced melanin contents and inhibited tyrosinase activity in a dose-dependent manner, in which tyrosinase is a key enzyme in melanogenesis. The peptide also significantly reduced the expression levels of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) and their upstream transcription factor, microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Furthermore, the peptide suppressed the phosphorylation level of cAMP-response element binding protein (CREB), a transcription factor of MITF, and increased the phosphorylation level of extracellular signal-regulated kinase (ERK), a kinase mediates MITF phosphorylation and proteasomal degradation. The peptide significantly inhibited the expression of Rab27A, Melanophilin, and MyosinVa, the components of motor complex involved in intracellular movement of melanosome. These results suggest that Hexapeptide could be used as an effective whitening agent that has inhibitory effect on melanin production and melanosome transport by regulating expression and degradation of MITF in melanocytes.

Keywords: hexapeptide, MITF, melanogenesis, melanosome transport, pigmentation

[†] 주 저자 (e-mail: witch83@caregen.co.kr)
call: 031-420-9283

1. 서 론

멜라닌은 자외선, 미세먼지, 각종 화합물 등 외부 유해 환경에 대한 세포 보호를 위해 표피 기저층의 색소형성세포(melanocytes)에서 생성된다[1]. 주로 자외선 조사에 의해 각질형성세포에서 분비된 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), stem cell factor (SCF), endothelin 1 (ET-1), hepatocyte growth factor (HGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)와 같은 인자들에 의해 멜라닌세포 표면의 수용체가 자극되며, 리소좀 관련 소기관(lysosome-related organelles)인 멜라노솜(melanosome) 내에서 생성된다[2-7]. 이 중 각질형성세포에서 유리된 α -MSH는 pro-opiomelanocortin (POMC)에서 유래된 작은 펩타이드 호르몬으로 멜라닌세포 표면의 melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합하여 세포 내 cAMP 수준을 올리고 protein kinase A (PKA)의 활성을 유도한다[8,9]. 활성화 된 PKA는 핵 내로 유입되어 cAMP responsive element binding protein (CREB)의 활성을 유도하고 이에 의해 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현 증가가 이루어진다[10]. MITF는 멜라닌 합성 과정의 핵심 효소인 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), dopachrome tautomerase (DCT)에 대한 전사 인자로 작용하여 발현 증가를 유도한다[11].

갈색 및 검은색을 띠는 유멜라노솜(eumelanosome)의 성숙 단계는 크게 네 단계로 나눌 수 있다. 소기관 내 루멘(lumen)에 색소가 없는 초기 단백질 섬유체가 관찰되는 1단계를 거쳐 타원형의 소기관 내 PMEL17 / gp100을 주요 구성 요소로 하는 완벽한 섬유체가 형성되는 2단계를 거치게 된다. 3단계부터는 멜라닌 합성 효소들에 의해 형성된 멜라닌이 멜라노솜 내 섬유체에 자리잡게 되고 4단계까지 점점 멜라닌의 밀도가 높아지며 성숙 과정이 진행된다[12,13]. 이렇게 성숙된 멜라노솜은 Rab27a, melanophilin, myosin Va 로 구성된 멜라노솜 이동 복합체에 의해 핵 주변에서 수직상 돌기 끝으로 세포 내 이동 과정을 거치게 된다 [14-16]. 이동된 멜라노솜은 이 후 표피층에 함께 존재하는 각질형성세포로 전달, 핵 주변부에 위치해 자외선 자극에 대한 세포 사멸 억제 효과를 나타낸다[17,18]. 적절한 멜라닌 형성은 정상적인 세포 보호 기전으로 꼭 필요한 반응이지만, 자외선이나 화합물 또는 미세먼지와

같은 외부 유해 인자의 자극이나 호르몬 등에 의해 과도한 멜라닌 형성이 이루어져 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 과 색소 침착을 유발한 경우 정신적 스트레스나 삶의 질 저하를 일으키게 된다[19,20]. 이에 따라 피부 자극, 알러지 유발, 발암 등의 부작용 없이 만족스러운 미백 효능을 나타내는 소재 개발이 요구되고 있으며 다양한 미백 기전을 타겟으로 하는 연구가 진행되고 있다[21,22].

펩타이드 소재는 단백질의 최소 단위인 아미노산들이 서로 연결되어 이루어지는 단일 물질로 생체친화성이 높고 인체내 단백질과 같은 활성을 유사하게 보일 수 있는 장점이 있어, 최근 화장품 및 의약품 업계에서 활성 소재로 많은 연구 개발이 이루어지고 있지만[23,24] 대체로 친수성의 성격을 가지고 있기에 지질로 구성된 경피 투과에 어려움이 있으며 피부에 존재하는 단백질 분해효소들에 의해 쉽게 분해되는 단점도 보유하고 있다[25]. 이를 극복하기 위해, 먼저 경피 투과에 대한 부분은 alcohols, azones, hexanoates, unsaturated fatty acids와 같은 투과 유도제를 사용하는 방법, 투과를 용이하게 해 주는 특정 펩타이드 서열을 이용하는 방법, 친유성 유도체를 결합하는 방법, 그리고 liposomes, transfersomes, niosomes, ethosomes 과 같이 펩타이드를 캡슐화 하는 방법 등이 연구되고 있다[26-28]. 또한 단백질 분해 효소들에 의한 분해를 막아 펩타이드의 안정성을 높이는 방법으로는 절단 서열 예측을 통해 해당 부위의 아미노산을 치환하는 방법, 또는 N 말단을 아세틸화(acetylation) 하거나 C 말단을 아미드화(amidation) 하는 방법 등이 연구되고 있다[29].

본 연구자들은 멜라닌 합성 저해 활성을 보이는 펩타이드 소재를 확보하기 위해, 소속기관에서 보유한 2 ~ 20 개 아미노산으로 이루어진 펩타이드 라이브러리를 확보 및 탐색하였고, 이 중 탁월한 효능을 보이는 헥사펩타이드를 발굴하였다. 본 연구에서는 이 헥사펩타이드의 멜라닌 합성 억제 기전을 밝히고자 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

펩타이드 합성 과정에서 사용한 2-CTC Resin은 BeadTech (Korea)사의 제품을 사용하였고 Fmoc-아미노산, hydroxybenzotriazole (HOBt), N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hexafluorophosphate (HBTU)는

CSBio Co. (USA) 제품을 사용하였다. Dimethylformamide (DMF), N,N-diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, trifluoroacetic acid (TFA), thioanisole, phenol, ethane dithiol (EDT), triisopropyl silane (TIS), diethyl ether 와 같은 합성에 사용된 시약은 대정화금(Korea)의 제품을 구입하여 사용하였다.

세포 실험에서 사용한 fetal bovine serum (FBS) 및 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) powder는 thermo fisher scientific (USA)에서 구입하였고 penicillin/streptomycin 은 웰진(Korea)에서 구입하였다. Sodium bicarbonate, sodium hydroxide, arbutin, 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-Dopa)는 Sigma-Aldrich (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. Rab27A, melanophilin, MITF, tyrosinase, TYRP1, actin에 대한 항체는 Santa cruz biotechnology (USA)에서 구입하였고, p-CREB, p-ERK에 대한 항체는 cell signaling technology (USA)에서 구입 하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 펩타이드 합성

Capacity 0.84 mmol/g인 CTC resin을 DMF 용매를 포함한 반응기에서 팽윤 반응을 실시한다. 위의 반응기에 2 당량 Fmoc-Proline 과, 2.5 당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2 h 동안 반응 실시한다. 카이저 테스트 키트 (Sigma Aldrich, USA)로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 세척 완료 된 resin에 20% piperidine / DMF를 2 회 가하여 아미노산의 Fmoc을 제거 한다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 이 후 arginine, leucine, phenylalanine, proline, tryptophan 순서로 다음 과정을 반복한다. 2 당량 Fmoc-아미노산과 2 당량 HBTU, 2 당량 HOBT, 2.5 당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2 h 동안 반응 실시한다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 세척 완료 된 resin에 20% piperidine / DMF를 2 회 가하여 아미노산의 Fmoc을 제거 한다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 최종 합성 완료 후, cleavage solution (TFA : H₂O : thioanisole : phenol : EDT : TIS = 81.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5 : 1)을 사용하여 펩타이드를 레진에서 분리 하고, diethyl ether를 이용하여 침전 시킨 후 원심분리기를 이용한 세척을 5 회 실시한다. 이 후 건조를 진행하여 펩타이드 최종 생성물을

회수하였다.

합성된 펩타이드의 순도를 HPLC (U-3000, Thermo fisher scientific, USA) 분석을 통해 확인하였으며, C18 (Pursuit XRs, 250 * 4.65 mm 100 Å, Agilent, USA) 컬럼을 이용하여 이동상 0.1% TFA in water / 0.1% TFA in acetonitrile gradient 하에 유속 1 mL/min 조건으로 UV 214 nm 에서 검출하여 확인 하였다.

분자량 확인을 위해 LC-MS/MS(3200 Q-trap, AB SCIEX, USA) 분석을 진행하였으며 C18(Pursuit XRs 100 * 2.05 mm 100 Å, Agilent, USA) 컬럼을 이용하여 이동상 0.1% formic acid in water / 0.1% formic acid in acetonitrile gradient 하에 유속 0.25 mL/min 조건으로 MS/MS로 검출 확인 하였다. MS/MS 분석 조건은 ESI Positive mode, Source/Gas : CUR = 20, CAD = High, IS = 5500, TEM = 350, GS1 = 50, GS2 = 50/ Compound DP = 50 ~ 80, EP = 10, CE = 10 ~ 50, CES = 1 ~ 10로 확인 하였다(Table 1, Figure 1).

Table 1. Synthesized Hexapeptide

Name	Sequence	Purity (%)	M.W. (Da)
Hexapeptide	NH ₂ -WPFRLP-OH	99	814.9

2.2.2. 세포 배양

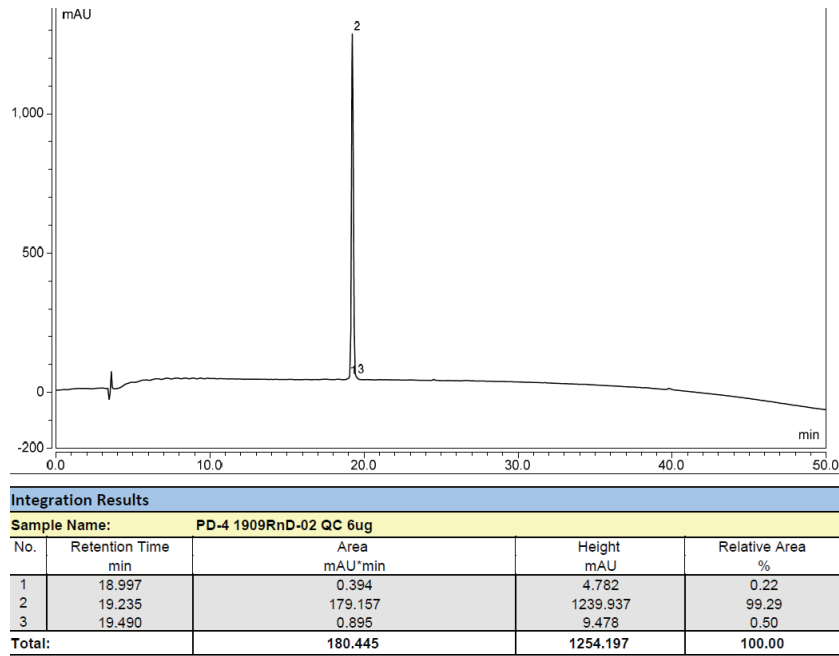
실험에 사용한 B16F10 melanoma 세포주는 ATCC (Virginia, USA)에서 구입하였고 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1.5 g/L sodium bicarbonate을 포함한 DMEM 배지로 37 °C, 5% CO₂조건 하에서 배양한다.

2.2.3. 세포 독성 실험

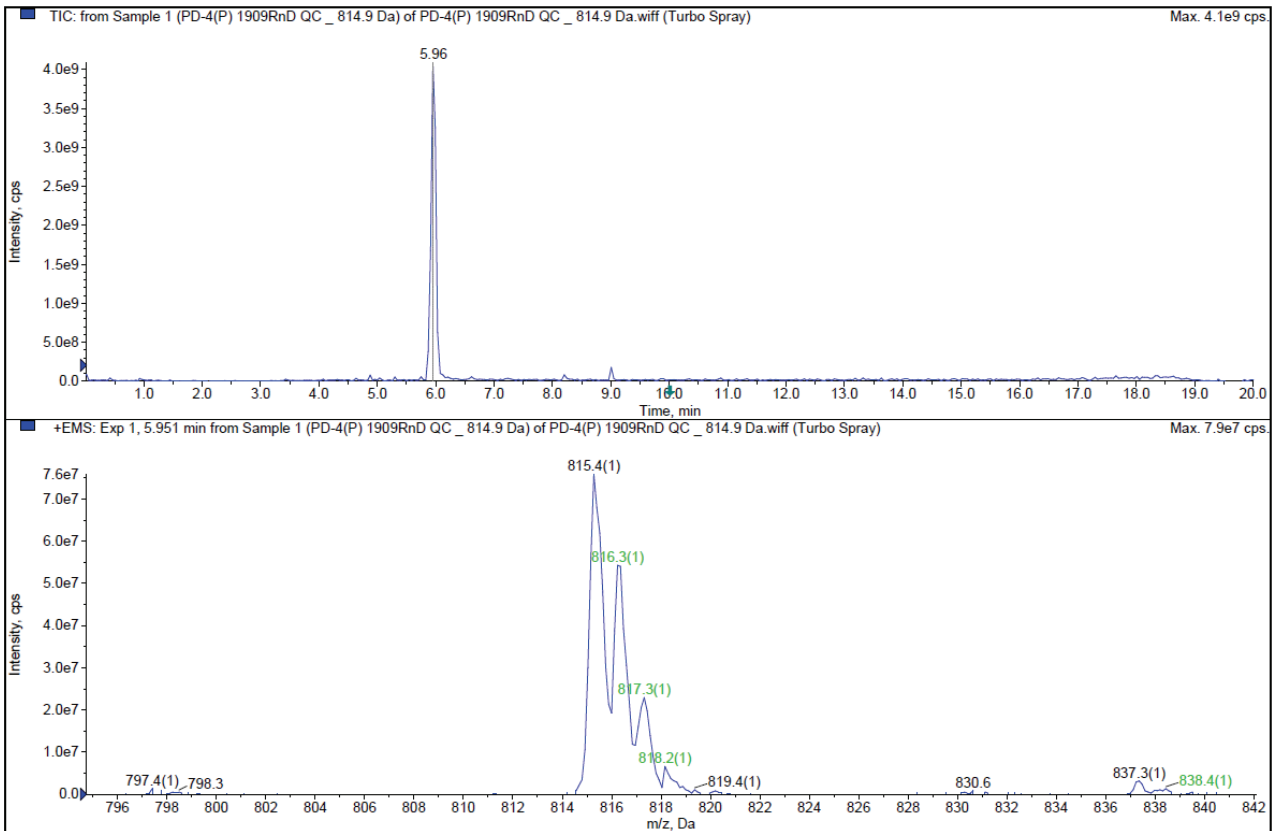
B16F10 세포를 8 × 10³ cells/well 밀도로 48 well plate 에 분주하여 1 일간 배양 후 2% FBS를 포함한 배지 조건에서 헥사펩타이드를 농도별로 처리하여 3 일간 배양한다. 4 mg/mL MTT를 각 well에 20 μL씩 첨가하고 4 h 동안 37 °C 조건에서 배양을 진행한 후 배지를 제거하고 DMSO 500 μL를 처리하여 포마잔(formazan)을 녹여낸다. 분광광도계(SpectraMax M2e, Molecular device, USA)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정한다.

2.2.4. 멜라닌 생성량 확인 실험

B16F10 세포를 5 × 10⁴ cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 1 일간 배양 후 2% FBS를 포함한 배지 조건에



A



B

Figure 1. Analysis of synthetic hexapeptide. (A) The purity of hexapeptide was confirmed by HPLC analysis and it was more than 99%. (B) The estimated molecular weight of hexapeptide was confirmed by LC-MS/MS analysis.

서 핵사펩타이드를 농도별로 처리하여 3 일간 배양 한다. 멜라닌 생성 유도를 위해 100 ng/mL α -MSH를 동시 처리 하고 양성 대조군으로는 200 μ M 알부틴을 사용 한다. 배양 종료 후 세포를 회수하고 1M NaOH를 200 μ L씩 처리 하여 용해한다. 분광광도계로 용해물에 대한 490 nm 흡광도를 측정한다.

2.2.5. Tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포를 5×10^4 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 1 일간 배양 후 2% FBS를 포함한 배지 조건에서 핵사펩타이드를 농도별로 처리하여 3 일간 배양 한다. 멜라닌 생성 유도를 위해 100 ng/mL α -MSH를 동시 처리 하고 양성 대조군으로는 200 μ M 알부틴을 사용 한다. 배양 종료 후 well에 lysis buffer (Sigma-Aldrich, USA) 200 μ L 처리하여 용해물을 회수하고 BCA kit (ThermoFisher Scientific, USA)으로 단백질 정량 후 90 μ g씩 각 처리군의 단백질을 96 well plate에 옮겨 담는다. 10 mM L-DOPA를 각 well에 20 μ L씩 처리하고 37 $^{\circ}$ C 조건에서 30 min 동안 반응 후 분광광도계로 475 nm 흡광도를 측정한다.

2.2.6. 유전자 발현 분석(RT-PCR)

B16F10 세포를 5×10^4 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 1 일간 배양 후 2% FBS를 포함한 배지 조건에서 핵사펩타이드를 농도별로 처리하여 3 일간 배양 한다.

Table 2. Primer Sequences

Gene	Primer
<i>RAB27A</i>	Forward 5'- GAAAATAGCGCCAAGCACCC -3'
	Reverse 5'- CCTCTTTCCTGCCCCTCTGG -3'
<i>MLPH</i>	Forward 5'- ACGATGTCAGGGGCAAACAT -3'
	Reverse 5'- CTCTCTGTGTCAGCACTGG -3'
<i>MYO5A</i>	Forward 5'- TTCTACATTGTGGGCGCCAT -3'
	Reverse 5'- TCCTCCAGGTTGGTCAATCG -3'
<i>MITF</i>	Forward 5'- CCAGCTGGCGATCATGTCAT -3'
	Reverse 5'- GGTCTGGACAGGAGTTGCTG -3'
<i>TYR</i>	Forward 5'- GGCCAGCTTTCAGGCAGAGG -3'
	Reverse 5'- TGGTCTTCATGGGCAAAAT -3'
<i>TYRP1</i>	Forward 5'- TCTGTGAAGGTGTGCAGGAG -3'
	Reverse 5'- CCGAAACAGAGTGAAGGTT -3'
<i>GAPDH</i>	Forward 5'- GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG -3'
	Reverse 5'- CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT -3'

멜라닌 생성 유도를 위해 100 ng/mL α -MSH를 동시 처리 하고 양성 대조군으로는 200 μ M 알부틴을 사용 한다. 배양 종료 후 세포를 회수하고 RNA extraction kit (Qiagen, Germany)을 이용해 RNA를 분리한 후 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 cDNA 합성을 진행한다. 이후 PCR premix (iNtRON Biotechnology, Korea) 및 각 유전자 별 프라이머 (Table 2)를 이용하여 샘플 준비 후, PCR 장비(Vapo. Protect, Eppendorf, Germany)를 이용한 PCR 진행하고 전기영동을 통해 발현 양상을 확인 한다.

2.2.7. 단백질 발현 분석(Western Blotting)

멜라닌 생성 및 멜라노솜 이동 관련 단백질들의 발현을 관찰하기 위한 처리 조건은 다음과 같다. B16F10 세포를 5×10^4 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 1 일간 배양 후 2% FBS를 포함한 배지 조건에서 농도별 핵사펩타이드 및 양성대조군인 200 μ M 알부틴을 처리하여 3 일간 배양한다. 멜라닌 생성 유도 조건의 경우 100 ng/mL α -MSH를 동시 처리한다.

MITF 조절 관련 단백질들의 인산화 수준을 관찰하기 위한 처리 조건은 다음과 같다. B16F10 세포를 3×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 1 일간 배양 후 2% FBS를 포함한 배지 조건에서 핵사펩타이드를 농도별로 처리하여 3 일간 배양 한다. 멜라닌 생성 유도를 위해 100 ng/mL α -MSH를 동시 처리 하고 양성 대조군으로는 200 μ M 알부틴을 사용 한다.

배양 종료 후 세포를 회수하고 lysis buffer로 세포를 용해한 후 BCA kit을 이용한 단백질 정량을 진행한다. 각 처리군의 단백질 양을 맞춰 샘플 준비 후 polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) 및 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로의 transfer 진행한다. 0.5% Tween20을 포함한 phosphate buffered saline (PBS) 에 녹인 5% 탈지분유로 이 후 blocking 및 각 인자들에 대한 항체 부착 과정을 진행한다. 항체에 부착된 horseradish peroxidase (HRP) 를 western detection reagent (Elpisbiotech, Korea)와 반응한 후 필름 노출을 진행하고 이 후 Gel Doc (Gel Doc TM XRT, Bio-Rad, USA)으로 이미지 분석을 진행한다.

2.2.8. 통계

본 연구에서 시행된 실험은 총 3 회 이상 반복되었고 데이터의 통계적 유의성 검정은 student's t-test로 시행 되

Table 3. Inhibitory effects of peptide candidates on melanogenesis

Peptide (200 μ M)	Amino acid sequence	Melanin contents (Inhibition rate, %)	Tyrosinase activity (Inhibition rate, %)
Pep-1	NH ₂ -WPFLRP-OH	26.8	23.1
Pep-2	NH ₂ -SYHRKIKR-OH	15.3	14.8
Pep-3	NH ₂ -GHHSLSHYVDIHH-OH	15.3	-
Pep-4	NH ₂ -KRRHPKHHHDHH-OH	22.6	-

었다. 결과 값은 mean \pm standard deviation (SD)으로 나타내었고 p value 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유효 펩타이드 선별

2 ~ 20개 아미노산으로 이루어진 펩타이드 라이브러리 중 약 300 종의 원료에 대한 멜라닌 생성 억제 실험을 진행하였고 후보 물질 4 가지를 선별하였다(Table 3). 이 중 멜라닌 생성 억제 및 tyrosinase 활성 억제 효과가 가장 높은 본 논문의 헥사펩타이드(Pep-1)를 유효 펩타이드로 선정 후 멜라닌 생성 억제 추가 확인 및 관련 기전 연구를 진행 하였다.

3.2. 세포 독성 여부 확인 실험

헥사펩타이드의 B16F10 세포에 대한 세포 독성 여부를 확인하기 위해 0.1, 1, 10, 50, 100, 200, 500 μ M로 농

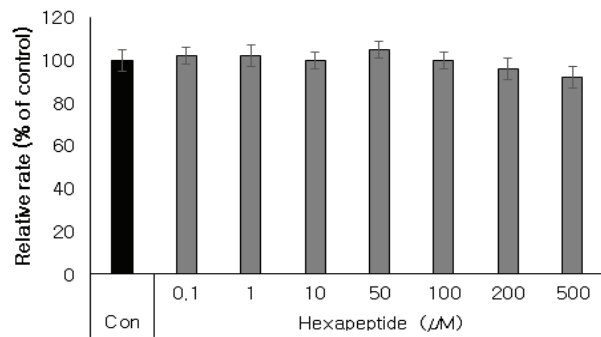


Figure 2. Effects of hexapeptide on B16F10 cell viability. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h and cell viability measured by MTT assay. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments.

도별 처리를 진행한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 전체 처리 농도에서 유의한 생존율 감소가 관찰되지 않았다(Figure 2). 이 중 선행 연구 결과에서 멜라닌 생성 억제가 뚜렷하게 관찰된 10 μ M 이상의 농도와 양성 대조군 알부틴 처리 농도인 200 μ M 이하의 농도로 농도 구간을 정해 추가 실험을 진행 하였다.

3.3. 멜라닌 생성 억제 실험

헥사펩타이드의 멜라닌 합성 억제 효과를 확인하기 위해 10, 50, 100, 200 μ M 농도로 B16F10 세포에 처리한 후 멜라닌 생성율을 비교 하였다. 그 결과 헥사펩타이드에 의한 농도 의존적인 멜라닌 생성 억제가 관찰되었다. 저해율은 최저 농도인 10 μ M 처리 조건에서 9%, 최고 농도인 200 μ M 처리 조건에서 27% 수준이었다. 이를 통해 헥사펩타이드의 유의한 멜라닌 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 3).

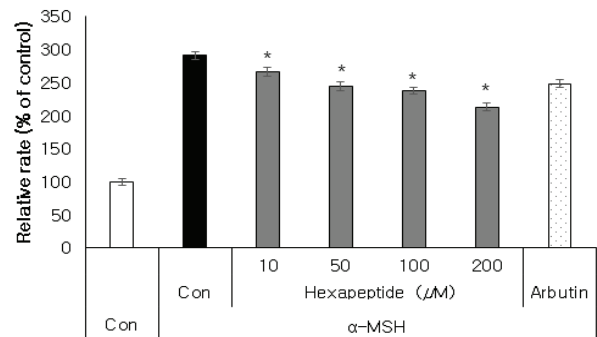


Figure 3. Effects of hexapeptide on melanin contents in α -MSH stimulated B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h. Arbutin was used as a positive control. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. * $p < 0.05$.

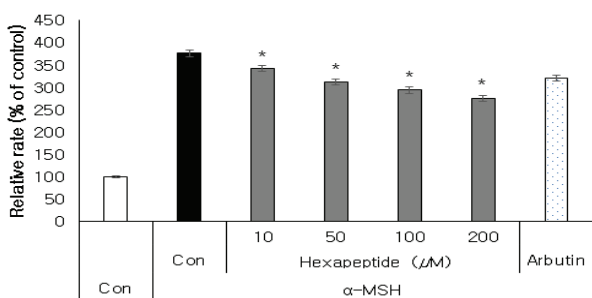


Figure 4. Effects of hexapeptide on tyrosinase activity in α -MSH stimulated B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h. Arbutin was used as a positive control. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. * $p < 0.05$.

3.4. Tyrosinase 활성 억제 실험

헥사펩타이드의 멜라닌 생성 억제 효과가 멜라닌 생성 과정의 주요 효소인 tyrosinase 활성 억제에 의한 것인지 확인하기 위해 세포 내 tyrosinase 활성 억제 실험을 진행

하였다. 그 결과 헥사펩타이드에 의한 농도 의존적인 tyrosinase 활성 억제가 관찰되었다. 저해율은 최저 농도인 10 μ M 처리 조건에서 9%, 최고 농도인 200 μ M 처리 조건에서 27% 수준이었다. 이를 통해 헥사펩타이드의 유의한 tyrosinase 활성 억제 효과를 확인할 수 있었다 (Figure 4).

3.5. 멜라닌 생성 억제 기전 확인 실험

헥사펩타이드의 멜라닌 합성 억제 기전 확인을 위해 멜라닌 생성 과정의 주요 효소인 tyrosinase, TYRP1 및 이들의 발현을 유도하는 전사인자인 MITF의 발현 및 세포 내 수준을 관찰 하였다. B16F10 세포에 10, 50, 100, 200 μ M 농도로 헥사펩타이드를 처리한 결과 α -MSH에 의해 증가된 MITF, TYR, TYRP1 유전자의 mRNA 발현이 유의한 수준으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었으며 (Figure 5A), MITF, tyrosinase 단백질의 수준도 유의한 감소를 나타내었다(Figure 5B). 또한 α -MSH 유도 조건이

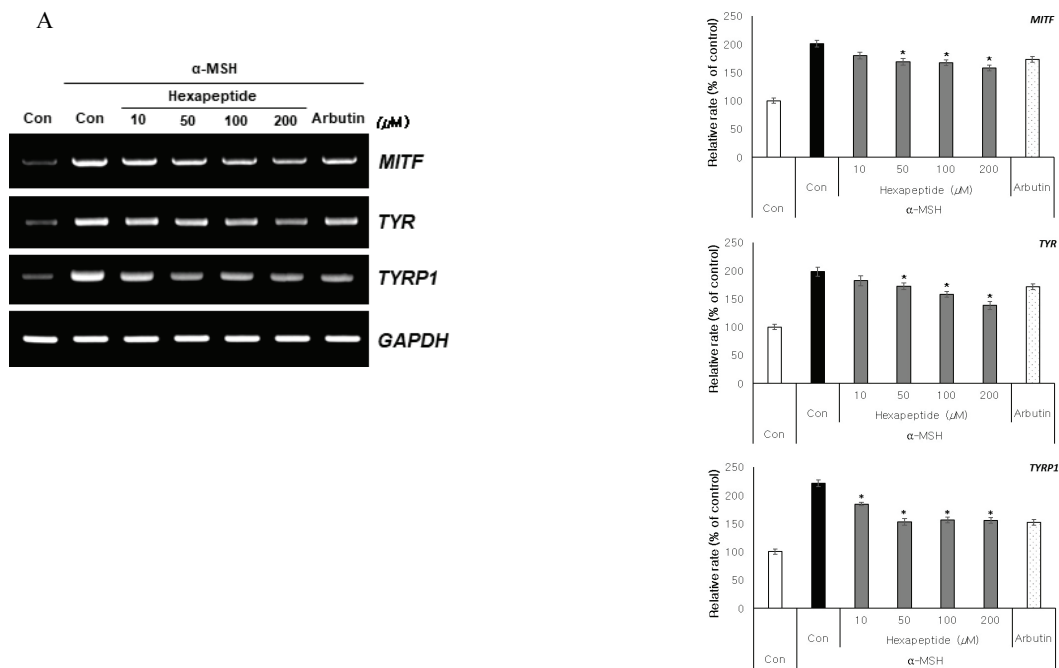


Figure 5. Inhibitory effect of hexapeptide on the expression of melanogenesis-related genes and proteins in B16F10 cells. (A) Effects of hexapeptide on the expression of melanogenesis-related genes in α -MSH stimulated B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h. Arbutin was used as a positive control. (B)(C) Effects of hexapeptide on the expression of melanogenesis-related proteins in B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h with or without α -MSH. Arbutin was used as a positive control. (D) Effects of hexapeptide on the phosphorylation of CREB and ERK in α -MSH stimulated B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 30 m. Arbutin was used as a positive control. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. * $p < 0.05$.

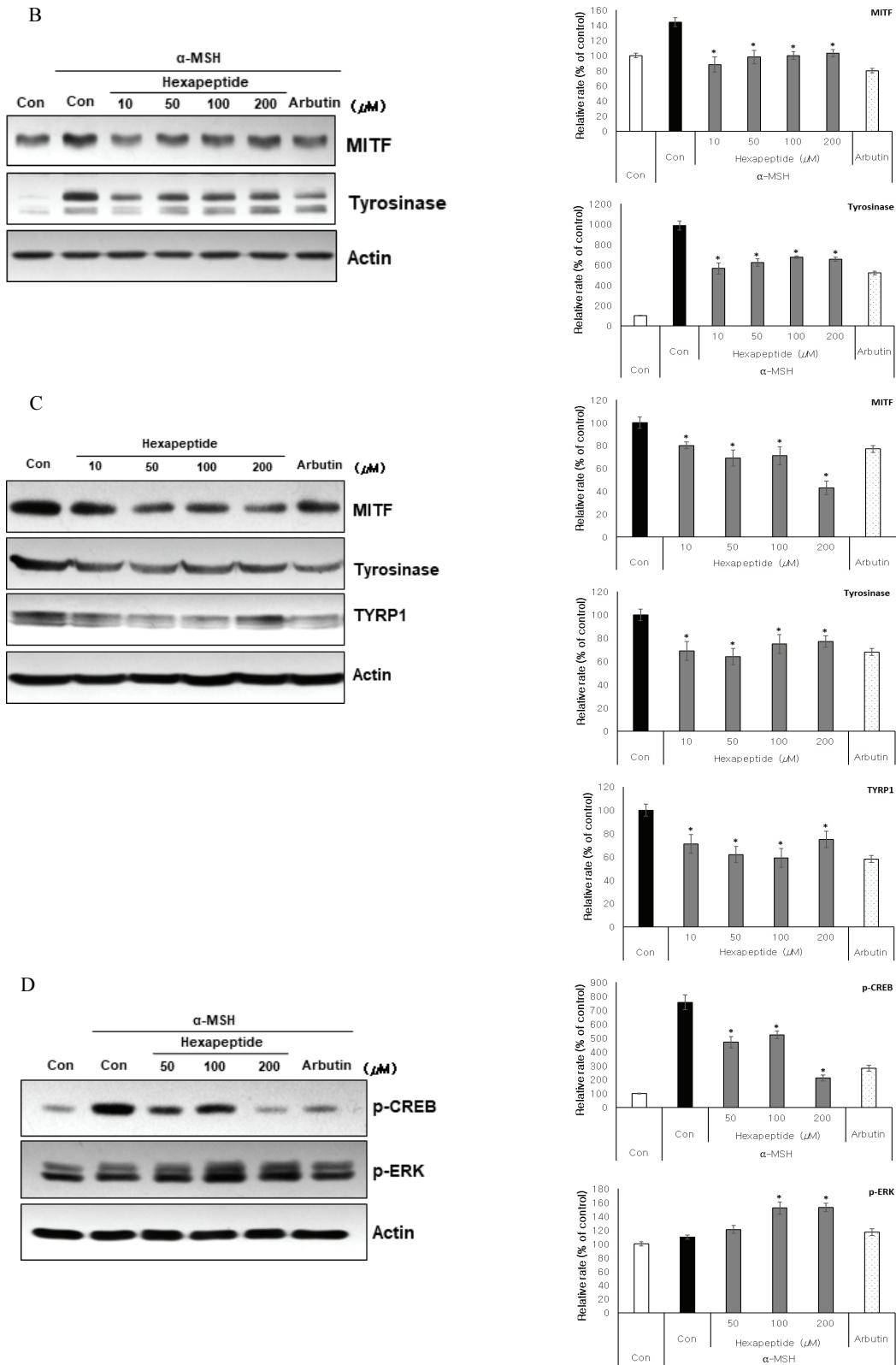


Figure 5. (Continued)

주어지지 않은 상황에서도 헥사펩타이드 처리에 의해 MITF, tyrosinase, TYRP1 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되는 결과를 확인할 수 있었다(Figure 5C).

추가적으로 MITF의 유전자 발현 및 단백질 수준 저해에 대한 기전 분석을 위해, MITF promoter에 결합하여 발현을 증가시키는 전사인자 중 하나로 알려진 CREB의 인산화 수준을 관찰 하였고 MITF 단백질의 인산화에 따른 프로테아좀 분해를 유도하는 것으로 알려진 ERK의 인산화 수준을 확인 하였다. B16F10 세포에 α -MSH를 처리한 음성대조군의 경우 MC1R 시그널 활성화에 따라 p-CREB 수준이 증가되었고 동시에 50, 100, 200 μ M 농도로 헥사펩타이드를 처리한 처리군에서는 CREB 인산화 저해가 관찰 되었다. 또한 ERK의 경우 음성대조군에 비해 헥사펩타이드 처리군에서 인산화 수준 증가가 관찰 되었다(Figure 5D).

이를 통해 헥사펩타이드가 CREB 인산화 저해를 통한

MITF 유전자 발현 감소 및 ERK 인산화 증가를 통한 MITF 단백질 분해 촉진을 유도하며 이에 따라 MITF 활성 저해를 가져와 멜라닌 생성 관련 주요 효소들의 발현을 억제하는 것임을 확인할 수 있었다.

3.6. 멜라노솜 이동 관련 인자들의 발현 억제 실험

헥사펩타이드가 MITF 조절을 통한 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냄에 따라 멜라노솜 성숙 과정에서 보이는 세포 내 이동에도 영향을 주는지 확인하기 위해 B16F10 세포에 10, 50, 100, 200 μ M 농도로 헥사펩타이드를 처리하여 이동 단백질 복합체 구성 인자의 발현 및 세포 내 수준의 변화를 관찰 하였다. 그 결과 α -MSH에 의해 증가된 RAB27A, MLPH, MYO5A 유전자의 mRNA 발현이 유의한 수준으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었으며(Figure 6A), Rab27A, melanophilin 단백질의 수준도 유의한 감소를 나타내었다(Figure 6B). 또한 α -MSH 유도 조건

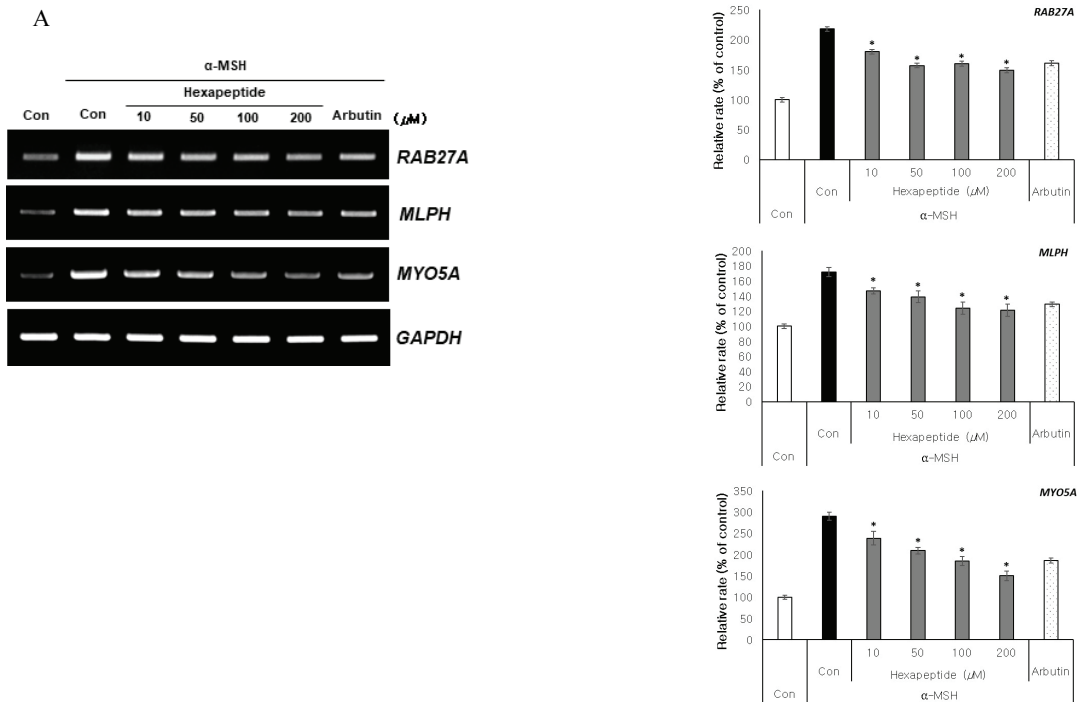


Figure 6. Inhibitory effect of hexapeptide on the expression of melanosome transport-related genes and proteins in B16F10 cells. (A) Effects of hexapeptide on the expression of melanosome transport-related genes in α -MSH stimulated B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h. Arbutin was used as a positive control. (B)(C) Effects of hexapeptide on the expression of melanosome transport-related proteins in B16F10 cells. Cells were treated with various concentrations of hexapeptide for 72 h with or without α -MSH. Arbutin was used as a positive control. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. * $p < 0.05$.

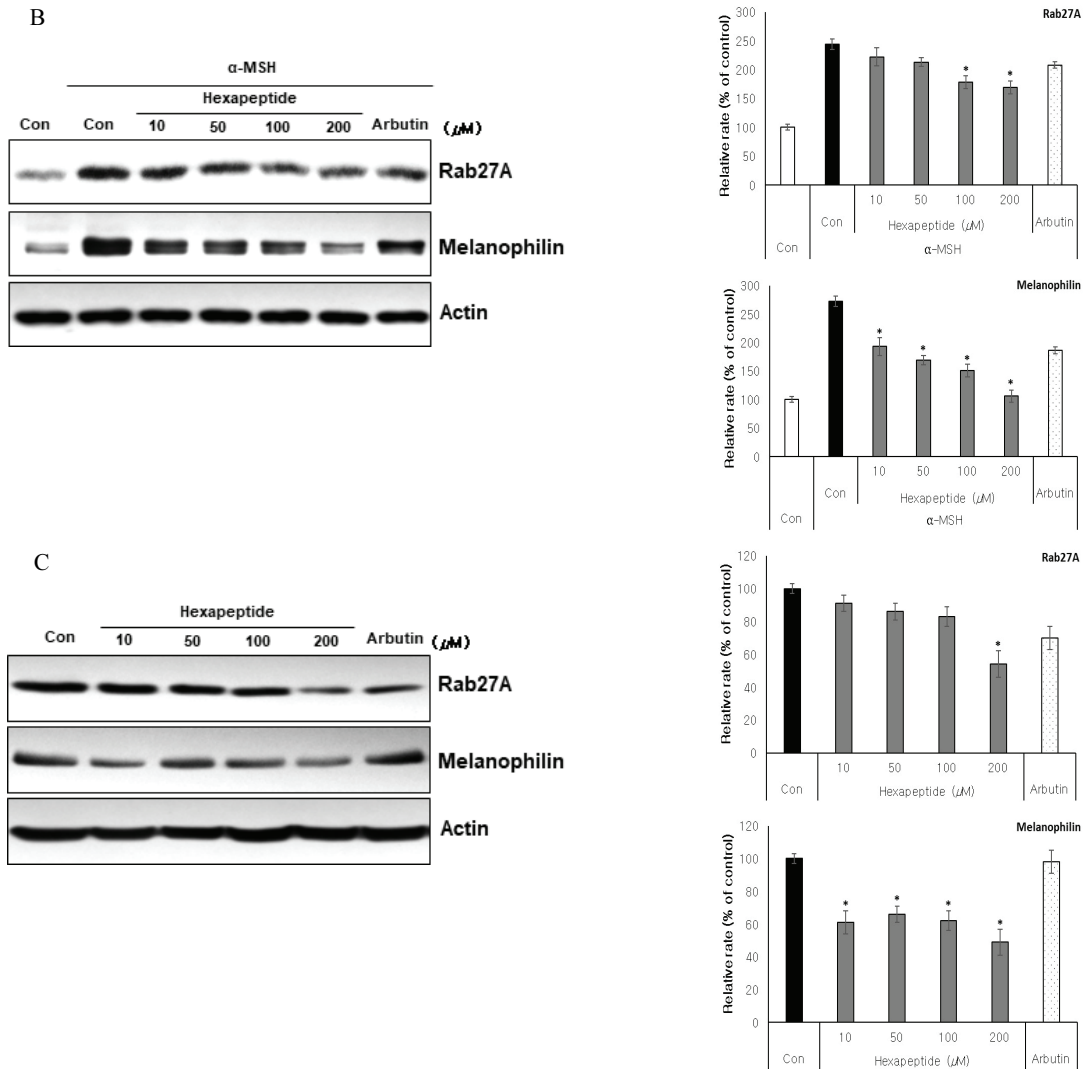


Figure 6. (Continued)

이 주어지지 않은 상황에서도 헥사펩타이드 처리에 의해 Rab27A, melanophilin 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되는 결과를 확인할 수 있었다(Figure 6C). 이를 통해 헥사펩타이드가 MITF 활성 저해를 통해 멜라노솜의 세포 내 이동 관련 인자들의 발현을 억제하여, 멜라닌 생성과 이동이라는 전반적인 멜라노솜 성숙 과정을 저해할 수 있음을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 6 개의 아미노산으로 이루어진 헥사펩타이드의 미백 활성을 확인 해 보았다. 본 연구의 헥사펩

타이드는 멜라닌세포에서 유의한 수준의 멜라닌 생성 억제 및 tyrosinase 활성 억제 기능을 보였으며, 이는 tyrosinase TYRP1 및 이들의 전사인자인 MITF의 유전자 발현과 단백질 수준 저해를 통한 작용임을 확인할 수 있었다. MITF 활성 조절과 관련된 추가 기전 연구를 진행한 결과 MITF promoter에 작용하는 전사인자 중 하나인 CREB의 인산화가 헥사펩타이드 처리에 의해 감소를 보였으며 MITF 인산화에 따른 프로테아좀 분해를 유도하는 것으로 알려진 ERK의 인산화 수준이 헥사펩타이드 처리에 의해 증가됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구의 헥사펩타이드는 MITF 유전자 발현 억제 및 단백질 분해 촉진을 통해, MITF 하위 유전자들인 tyrosinase,

TYRPI 발현을 저해하고 결과적으로 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 보여진다. 또한, 멜라닌 세포 내에서 멜라노솨이 수지상 돌기 끝으로 이동되는 과정에 관여하는 Rab27A / melanophilin / myosinVa 복합체의 발현도 농도 의존적으로 저해시켜 전반적인 멜라노솨 성숙 저해 효과를 나타내는 것으로 보인다. 추가적으로 핵사펩타이드 구조 분석을 통해 멜라닌 생성 관련 인자들과의 상호작용 가능성을 예측해 볼 계획이며, 펩타이드 안정성 및 경피 투과를 높이기 위한 연구도 진행 예정이다. 이를 통해 다양한 미백 기전에 대한 효능을 보이는 신규 핵사펩타이드를 유효한 미백 소재로서 활용 가능할 것으로 기대된다.

Reference

1. T. Hirobe, Keratinocytes regulate the function of melanocytes, *Dermatologica Sinica*, **32(4)**, 200 (2014).
2. A. Hachiya, A. Kobayashi, A. Ohuchi, Y. Takema, and G. Imokawa, The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation, *J. Invest. Dermatol.*, **116(4)**, 578 (2001).
3. T. Hirobe, K. Hasegawa, R. Furuya, R. Fujiwara, and K. Sato, Effects of fibroblast-derived factors on the proliferation and differentiation of human melanocytes in culture, *J. Dermatol. Sci.*, **71(1)**, 45 (2013).
4. E. Schauer, F. Trautinger, A. Köck, A. Schwarz, R. Bhardwaj, M. Simon, J.C. Ansel, T. Schwarz, and T. A. Luger, Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes, *J. Clin. Invest.*, **93(5)**, 2258 (1994).
5. A. K. Chakraborty, Y. Funasaka, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, J. M. Pawelek, and M. Ichihashi, Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B, *Biochim. Biophys. Acta*, **1313(2)**, 130 (1996).
6. K. Wakamatsu, A. Graham, D. Cook, and A. J. Thody, Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor, *Pigment Cell Res.*, **10(5)**, 288 (1997).
7. G. Imokawa, Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders, *Pigment Cell Res.*, **17(2)**, 96 (2004).
8. A. Chakraborty, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, and J. Pawelek, Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **105(5)**, 655 (1995).
9. M. Khaled, L. Larribere, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, R. Ballotti, and C. Bertolotto, Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis, *J. Biol. Chem.*, **277(37)**, 33690 (2002).
10. Y. M. Kim, S. E. Cho, and Y. K. Seo, The activation of melanogenesis by p-CREB and MITF signaling with extremely low-frequency electromagnetic fields on B16F10 melanoma, *Life Sci.*, **162**, 25 (2016).
11. K. Kameyama, C. Sakai, S. Kuge, S. Nishiyama, Y. Tomita, S. Ito, K. Wakamatsu, and V. J. Hearing, The expression of tyrosinase, tyrosinase-related proteins 1 and 2 (TRP1 and TRP2), the silver protein, and a melanogenic inhibitor in human melanoma cells of differing melanogenic activities, *Pigment Cell Res.*, **8(2)**, 97 (1995).
12. G. Raposo, and M. S. Marks, Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8(10)**, 786 (2007).
13. L. D'Alba and M. D. Shawkey, Melanosomes: biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle, *Physiol. Rev.*, **99(1)**, 1 (2019).
14. M. Van Gele, B. Geusens, A. M. Schmitt, L. Aguilar, and J. Lambert, Knockdown of myosin Va isoforms by RNAi as a tool to block melanosome transport in primary human melanocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **128(10)**, 2474 (2008).
15. N. Ohbayashi and M. Fukuda, Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics, *J. Biochem.*, **151(4)**, 343 (2012).
16. J. I. Park, H. Y. Lee, J. E. Lee, C. H. Myung, and J. S. Hwang, Inhibitory effect of 2-methyl-naphtho [1,2,3-de]quinolin-8-one on melanosome transport and skin pigmentation, *Sci Rep*, **6**, 29189 (2016).

17. G. Cardinali, S. Ceccarelli, D. Kovacs, N. Aspite, L. V. Lotti, M. R. Torrasi, and M. Picardo, Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **125**(6), 1190 (2005).
18. J. H. Epstein, Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **9**(4), 487 (1983).
19. R. Speeckaert, M. Van Gele, M. M. Speeckaert, J. Lambert, and N. van Geel, The biology of hyperpigmentation syndromes, *Pigment Cell Melanoma Res*, **27**(4), 512 (2014).
20. M. B. C. Maymone, H. H. Neamah, E. A. Secemsky, and N. A. Vashi, Correlating the dermatology life quality index and skin discoloration impact evaluation questionnaire tools in disorders of hyperpigmentation, *J. Dermatol.*, **45**(3), 361 (2018).
21. T. Pillaiyar, M. Manickam, and V. Namasivayam, Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *J Enzyme Inhib Med Chem*, **32**(1), 403 (2017).
22. M. L. W. Juhasz and M. K. Levin, The role of systemic treatments for skin lightening, *J Cosmet Dermatol*, **17**(6), 1144 (2018).
23. L. Zhang and T. J. Falla, Cosmeceuticals and peptides, *Clin. Dermatol.*, **27**(5), 485 (2009).
24. B. Reddy, T. Jow, and B. M. Hantash, Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I, *Exp. Dermatol.*, **21**(8), 563 (2012).
25. B. Reddy, T. Jow, and B. M. Hantash, Bioactive oligopeptides in dermatology: Part II, *Exp. Dermatol.*, **21**(8), 569 (2012).
26. V. V. Pai, P. Bhandari, and P. Shukla, Topical peptides as cosmeceuticals, *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **83**(1), 9 (2017).
27. S. Marepally, C. H. Boakye, P. P. Shah, J.R . Etukala, A. Vemuri, and M. Singh, Design, synthesis of novel lipids as chemical permeation enhancers and development of nanoparticle system for transdermal drug delivery, *PLoS ONE*, **8**(12), e82581 (2013).
28. H. Kalluri, and A. K. Banga, Transdermal delivery of proteins, *AAPS PharmSciTech*, **12**(1), 431 (2011).
29. A. A. Strömstedt, M. Pasupuleti, A. Schmidtchen, and M. Malmsten, Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**(2), 593 (2009).