

# 특집: 신물질 탐색 연구동향(VI)

## 멜라닌 생합성 저해물질의 탐색

이충환 · 고영희  
KIST 생명공학연구소

멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀 류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 우리 주변에서 멜라닌 합성은 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출 되었을 때 발생하는 갈변이나, 동물의 외피, 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서 관찰된다. 멜라닌의 기능은 각 개체에 따라 다양하며 그 주요 기능은 다음과 같이 요약할 수 있다(1,2).

- 1) 미생물에서 멜라닌은 자외선 조사, 전파, 건조, 극한온도 등에 대한 생존능력을 높여준다.
- 2) 동물에서 피부나 머리의 멜라닌은 자기보호를 위한 위장수단의 기능을 한다.
- 3) 무척추동물이나 곰팡이에 존재하는 멜라닌은 미생물에 대한 면역체계의 역할을 수행한다.
- 4) 인체에서의 멜라닌은 아민, 유기기, 금속이온 등과 같은 세포독성 물질에 대한 제거제로 작용하여 세포를 보호한다.
- 5) 인체의 피부에 존재하며 자외선에 대한 보호기능을 수행한다.
- 6) 커피, 차, 담배 등의 질 향상에 기여한다.

그러나 멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고, 피부노화를 촉진하며, 피부암의 유발에 관여하는 것으로 알려졌으며, 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 질을 저하시키기도 한다(3).

멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase(EC 1.14.18.1)의 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되고 있다(4). Tyrosinase에 의해 생성이 촉매되는 동물 멜라닌은 노란색-적갈색의 pheomelanin과 갈색-검은색의 eumelanin으로 구분된다. 1980년대까지 멜라닌은 L-tyrosine으로부터 dopa(L-3,4-dihydroxy-phenylalanine)를 거치는 Raper-Mason pathway를 통해 생합성되는 것으로 생각되었다. 이 경로에 의하면 L-tyrosine으로부터 dopa로 hydroxylation, dopa에서 dopaquinone으로의 산화, dopaquinone에서 leucochrome으로의 산화, leucochrome의 산화에 의한 dopachrome의 생성, dopachrome에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로의 전환, dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과 결합을 통해 최종적으로 멜라닌을 합성한다. 1980년대 이후의 멜라닌 생합성 경로에 대한 연구는 피부암 관련 연구그룹에 의해 집중적으로 연구되었으며, 그 결과 생체 내에서 dopachrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 dopachrome tautomerase(EC 5.3.2.3) 작용에 의해

DHICA(5,6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다(Fig. 1). Dopachrome에서 DHICA를 거쳐 멜라닌을 합성하는 경로는 세포가 멜라닌 생성 중간 대사물질의 독성으로부터 자신을 보호하기 위한 파생 경로로 추정되고 있다(5-8).

Kameyama 등(1993)은 포유류의 멜라닌 생성이 tyrosinase 이외에 tyrosinase-related protein(TRP1), dopachrome tautomerase(TRP2), 그리고 세포가 가지고 있는 melanogenic inhibitor 등의 상호작용 및 melanocyte-stimulating hormone(MSH)에 의해 조절된다는 사실을 보고하였다(9).

Tyrosinase는 phenolase, monophenolase, monophenol oxidase, cresolase, monophenol monooxygenase 등으로 불리며, catechol oxidase(diphenol oxidase, *o*-diphenolase, polyphenol oxidase, tyrosinase, EC 1.10.3.1)와는 기능이 유사하여 혼용되기도 한다. Tyrosinase는 한 쌍의 구리이온을 함유하고있는 금속단백질 군에 속하며, monophenol의 ortho hydroxylation(cresolase activity)과 catechols의 *o*-quinone으로의 산화(catecholase activity)의 두 가지 반응을 촉매 한다. 양송이(*Agaricus bisprus*)의 tyrosinase는 분자

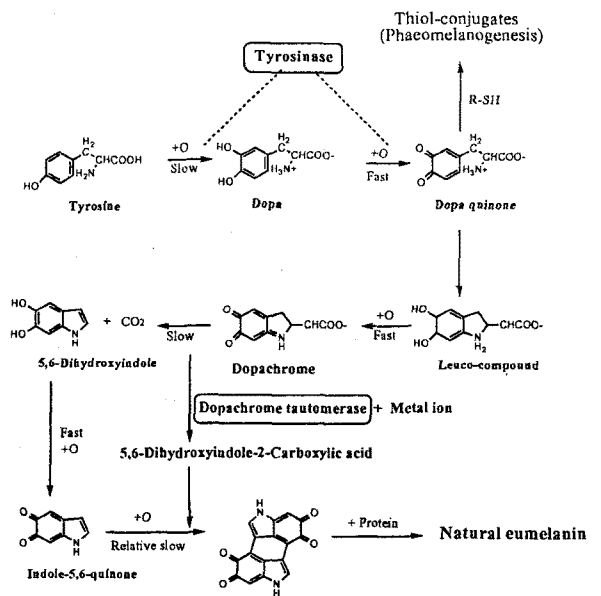


Fig. 1. Melanin synthesis pathway.

량  $1.2 \times 10^5$ 의  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  세 개의 동위효소로 구성되고, 분자 당 2개씩 존재하는 활성부위에는 각각 한 쌍의 구리이온이 존재한다(10). 활성부위의 구리이온은 deoxytyrosinase [ $\text{Cu}^{1+}\text{Cu}^{1+}$ ] 상태에서 산소와 반응하여, oxytyrosinase [ $\text{Cu}^{2+}\text{Cu}^{2+}\text{O}^2$ ]를 형성한다(11). Oxytyrosinase는 기질인 tyrosine의 hydroxylation 및 산화과정을 촉매 한 후 deoxytyrosinase 상태로 환원된다. 1994년 Conrad 등은 이러한 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화 및 benzoic acid에 의한 저해 메커니즘을 보고하였다(12).

**연구목적**

멜라닌 생합성 대사는 피부암과의 관련성 때문에 최근 집중적인 연구대상이 되어 tyrosinase(EC 1.14.18) 이외에 몇몇의 조절인자가 발견되었으나, 아직 정확한 대사가 규명되지 못한 상태이다. 멜라닌 생합성 저해제는 의약품, 화장품, 식품 등에서 피부질환 치료제, 피부 미백제, 식품 갈변방지제 등에 적용되고 있으며, 최근 그 수요가 증가하고있다. Tyrosinase 저해제로 잘 알려진 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone 등은 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 보이지만 색소세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내며, kojic acid, arbutin 등은 이미 상품화되어 화장품, 식품 등에 미백제로 사용되고 있지만 활성 및 안전성에 문제점이 있는 것으로 나타났다. 따라서 세포독성이 낮고 멜라닌 생합성 저해활성이 높은 저해물질의 개발이 요구되고있다. 그러므로 이러한 멜라닌의 생성을 저해하는 새롭고도 강력한 멜라닌 생합성 저해물질을 발견한다면 생체 내의 멜라닌 관련 대사의 기초연구 뿐만 아니라 기존 멜라닌 생합성 저해제의 대체물질로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

**연구동향**

멜라닌생성 저해제는 화장품 및 의약품 산업에서 기미, 주근깨 치료 등의 미백제 원료로, 식품산업에서는 갈변 방지제 등으로 개발되어왔다. 특히 피부에서의 색소 침착 방지는 주로 다음의 세 가지 관점에서 연구되어 왔다.

- 1) 멜라닌 합성의 주효소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위하여 tyrosinase 합성 저해물질이나, tyrosinase의 기질에 대한 길항물질(antagonist)을 개발한다.
- 2) 동물의 멜라닌 생합성 장소인 melanocyte의 기능을 저하시키기 위하여 melanocyte에 독성을 나타내는 물질을 개발한다.
- 3) Dopa의 산화방지를 위해 dopa 환원 물질을 개발한다.

지금까지의 연구는 주로 tyrosinase 저해제 개발에 집중되어 왔으며, 그 결과 밝혀진 저해제는 tyrosinase 활성부위의 구리이온에 대한 킬레이트 형성물질, quinone 류를 phenol 류로 환원시키는 작용을 하는 ascorbic acid 등의 환원제, 그리고 tyrosinase

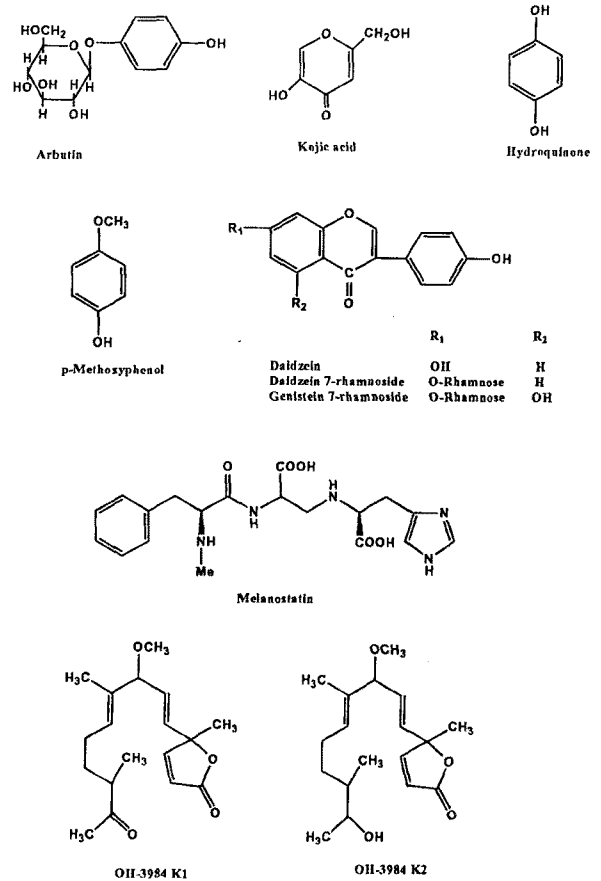


Fig. 2. Structures of melanin biosynthesis inhibitors.

자체를 변성시키는 bisulfites 제제 등이 대표적이다(13).

현재까지 다양한 미백제가 개발되어 사용되고 있으나, 여러 가지 문제점이 제기되고 있다. 4-hydroxyanisole(Fig. 2) 및 hydroquinone(Fig. 2) 등은 기미, 주근깨, 반점 및 임신기 hyperpigmentation과 같은 과잉 색소증 치료에 국부적으로 사용되고 있다. 그러나 이들 화합물은 강력한 멜라닌 생성 저해활성을 보이지만 색소 세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타낸다. 특히 hydroquinone 계열은 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내어 미백용 크림으로 개발되었으나, 세포 독성으로 인한 피부 자극과 피부병을 유발하여 일부 국가에서만 사용이 허가되고 있는 실정이다(14).

Kojic acid[5-hydroxy-2-(hydroxymethyl- $\gamma$ -pyrone)] (Fig. 2)는 *Aspergillus*, *Penicillium* 등이 생산하는 곰팡이 대사산물로 갈변에 필요한 산소의 전달을 방해하고, o-quinone류를 diphenol로 전환시키며, 금속이온에 대한 킬레이트 형성능 등의 작용 메커니즘이 보고되고 있으며, 버섯, 감자, 사과 및 새우 등 다양한 종류의 tyrosinase에 대해 저해활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(3). Kojic acid는 현재 arbutin(hydroquinone- $\beta$ -D-

glucopyranoside) (Fig. 2), ascorbic acid 등과 함께 식품의 갈변 방지제, 화장품, 의약품용 미백제 성분으로 사용되고 있으며, 세정제, 세안제, 욕류 갈변 방지제, 항산화제, 선도 유지제 등의 기능도 보고되고 있다. 특히 연간 1 천억 엔의 일본 미백 화장품 시장에서 주요 활성성분으로 첨가되고 있다. 1992년 일본의 kojic acid 생산량은 8~10 ton 정도로 이중 7~9 ton이 식품산업에서 사용되었고, 500~700 kg이 화장품 산업에서 사용되었다. 그러나 kojic acid의 낮은 저해활성, 사용중의 변색, 물질자체의 불안정성 등의 문제점이 제기되고있다(14).

그밖에 4-hydroxyindole, 4-hexylresorcinol, 2-mercapto-benzo-thiazole, cinnamic acid, p-coumaric acid, salicyl-hydroxamic acid, tropolone, mimosine, methimazole, 2,3-naphthalenediol 등의 물질이 tyrosinase 저해활성을 나타내지만, 대부분의 물질이 암, 돌연변이 등을 유발시키거나, 강한 독성을 나타낸다고 보고되었다(13, 15).

### 연구결과

#### 국 내

*Trichoderma harzianum* MR566 균주의 배양액으로부터 isonitrile 계열의 물질 MR304A, MR304B, MR304C, MR566A, MR566B, MR566C, MR566D 등이 개발되어 보고되었다 (Fig. 3). MR304A, B, C 및 MR566A, B, C, D의 버섯 tyrosinase에 대한 IC<sub>50</sub>값은 각각 47, 1.72, 1.4×10<sup>-3</sup>, 1.72, 36, 4.9, 8.9×10<sup>-2</sup> μM이었고, *S. bik iniensis*의 멜라닌 생성에 대해서는 paper disc 당 30 μg 농도에서 15 mm~60 mm 지름의 저해환을 나타내었다. 또한 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성에 대한 저해활성도 우수하였다(16-18).

이 등(1993)은 방선균 배양액으로부터 tyrosinase 저해활성을 나타내는 3 종류의 isoflavonoids(Fig. 2) (daidzein, daidzein 7-rhamnoside, genistein 7-ramnoside)를 분리하여 보고하였다(19).

#### 국 외

미생물 배양액으로부터 발견된 멜라닌 생합성 저해물질은 kojic acid, feldamycin, verginiamycin, tetracycline 유도체 등이 있다. Ishihara 등(1991)은 *Streptomyces bikiniensis* 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내는 물질을 방선균 배양액으로부터 탐색하여 신규 멜라닌 생합성 저해물질 melanostatin(Fig. 2)을 보고하였으며(20), Imae 등(1991)에 의해 melanostatin 및 그 유도체가 합성되었다(21). Terao 등(1992)에 의한 저해 메커니즘 연구결과 melanostatin은 *in vitro*에서 tyrosinase 저해활성을 나타내지 않고, B16 멜라노마 세포에서의 tyrosinase 단백질 생산과정도 저해하지 않지만, 생성된 tyrosinase의 배당체를 변형시키는 것으로 보고되었다(22). 1993년 Komiyama 등 생물산업

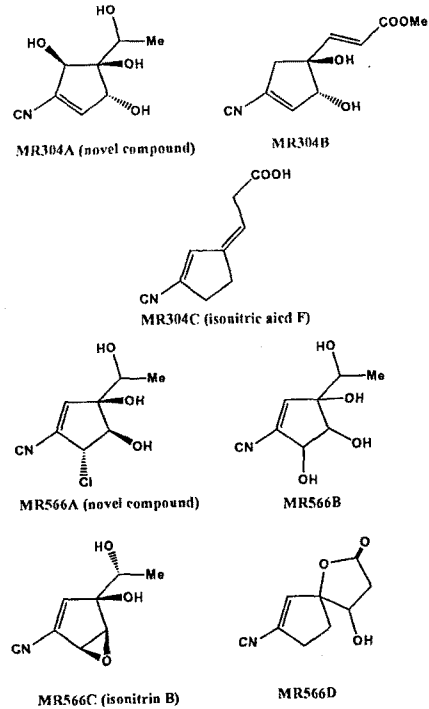


Fig. 3. Structures of isonitrile compounds produced by MR304, MR566 strains (possible stereochemistry).

은 방선균 배양액으로부터 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생합성을 저해하는 물질을 탐색하여 OH-3084 K1, K2(Fig. 2) 등의 신규물질을 보고하였다(23). Hashimoto 등(1994)은 누에의 체액을 이용한 멜라닌 생합성 저해물질 탐색계를 개발하여 *Trichoderma* sp. 배양액으로부터 trichoviridin을 분리 보고하였다(24).

### 참고문헌

1. Bell, A. A. and M. H. Weeler, 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 411-451.
2. Lerner, A. B. and I. B. Fitzpatrick, 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**, 91-126.
3. Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall, 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.
4. Korner, A., and J. Pawelek, 1982. Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**, 1163-1165.
5. Pawelek, J., A. Korner, A. Bergstrom, and J. Bologna, 1980. New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells. *Nature* **286**, 617-619.
6. Pawelek, J. M. 1991. After dopachrome? *Pigment Cell Research* **4**, 53-62.

7. Sugumaran, M. and V. Semensi, 1991. Quinone methide as a new intermediate in eumelanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **266**, 6073-6078.
8. Aroca, P., F. Solano, C. Salinas, J. C. Gracia-Borrón, and J. A. Lozano, 1992. Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J. Biochem.* **208**, 155-163.
9. Kameyama, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing, 1993. Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **2**, 126-131.
10. Menon, S., R. W. Fleck, G. Yong, and K. G. Strothkamp, 1990. Benzoic acid inhibition of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  isozymes of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 27-32.
11. Maddaluno, J. F. and K. F. Faull, 1988. Inhibition of mushroom tyrosinase by 3-amino-L-tyrosine: molecular probing of the active site of the enzyme. *Experientia* **44**, 885-887.
12. Conrad, J. S., S. R. Dawson, E. R. Hubbard, T. E. Meyers, and K. G. Strothkamp, 1994. Inhibitor binding to the binuclear active site of tyrosinase: temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry*. **33**, 5739-5744.
13. Dawley, R. M. and W. H. Flurkey, 1993. 4-hexylresorcinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J. Food. Sci.* **58**, 609-610.
14. Maeda, K. and M. Fukuda, 1991. *In vivo* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 361-368.
15. Tomita, K. N., N. Oda., M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki, 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.* **12**, 1601-1605.
6. 이충환, 전효곤, 서영배, 고영희. 1993. *Streptomyces* sp. 20747 균주가 생산하는 tyrosinase-inhibiting isoflavonoids. 산업미생물학회지 **21**, 139-143.
17. 이충환, 전효곤, 정명철, 이호재, 배경숙, 고영희. 1995. *Trichoderma* sp. MR-93균주가 생산하는 Isocyanide 계열의 Melanin 생성 저해물질. 산업미생물학회지, **23**(2), 209-213.
18. Lee, C. H., H. Koshino, M. C. Chung, H. J. Lee, and Y. H. Kho, 1995. MR-304A, a new melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *J. Antibiotics* **48**(10), 1168-1170.
19. 이충환, 정명철, 이호재, 이계호, 고영희. 1995. *Trichoderma harzianum*이 생산하는 melanin 생성 저해물질 MR-304-1. 산업미생물학회지 **23**(6), 641-646.
20. Ishihara, Y., M. Oka, M. Tsumakawa, K. Yomita, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Komish, and T. Oki, 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. *J. Antibiot.* **44**, 25-32.
21. Imae, K., H. Kamashi, H. Yamashita, T. Okita, S. Okuyama, T. Tsuno, T. Yamasaki, Y. Sawada, M. Ohbayashi, T. Naito, and T. Oki, 1991. Synthesis, stereochemistry, and biological properties of the depigmenting agents, melanostatin, feldamycin and analogs. *J. Antibiot.* **44**, 76-85.
22. Terao, M., K. Tomita, T. Oki, L. Tabe, M. Gianni, and E. Garattini, 1992. Inhibition of melanogenesis by BMY-28565, a novel compound depressing tyrosinase activity in B16 melanoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 183-189.
23. Komiyama, K., S. Takamatsu, Y. Yakahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Iwai and S. Omura, 1993. New inhibitors of melanogenesis, OH-3084 K1 and K2. *J. Antibiot.* **46**, 1520-1525.
24. Hashimoto, R., S. Takahashi, K. Hamano, T. Mori, and A. Nakawa, 1994. New method for screening the melanin biosynthesis inhibitor by using the Larval Haemolymph of the silkworm, *Bombyxmori*, and the inhibitory activity of trichoviridin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1725-1726.