

## 5-Hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron 에 의한 티로시나제의 경쟁적 저해

임 세 진<sup>#</sup>

동덕여자대학교, 약학대학

(Received May 24, 2000)

### Competitive Inhibition of Tyrosinase by 5-Hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron

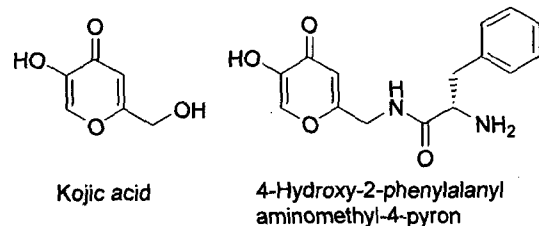
Sejin Lim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract** — The inhibition mode of 5-hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron ( $IC_{50}=24.6 \mu M$ ) on mushroom tyrosinase was investigated using L-tyrosine as a substrate. This inhibitor is the kojic acid derivative, where the C-7 hydroxyl of kojic acid was replaced by amino group and coupled to the carboxyl of L-phenylalanine. The kinetic data obtained show a competitive inhibition pattern.

**Keywords** □ 5-Hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron kojic acid, tyrosinase, competitive inhibition.

티로시나제(EC. 1.14.18.1)는 활성부위에 Cu이온을 지니며,<sup>1,2)</sup> monophenol을 *o*-diphenol로 히드록실화하는 반응과 *o*-diphenol을 *o*-quinone으로 산화하는 반응에 촉매로서 작용한다.<sup>3)</sup> 이 효소는 자연계에 널리 분포되어 있으며, 식물의 갈변과 동물의 멜라노화에 관여한다.<sup>4)</sup> 인간피부의 과도한 색소침착은 멜라닌 색소의 과잉생성에 기인하는데, 멜라닌 생합성 과정에 가장 중요한 역할을 하는 티로시나제를 저해하여 피부미백효과를 보고자 하는 시도가 꾸준히 있어왔다.<sup>5-8)</sup> 수많은 티로시나제 저해제가 자연계에서 발견되었으며, 피부미백효과를 지니고 있음이 입증되었다. *Aspergillus*속의 발효대사산물로부터 분리된 kojic acid(5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyron)은<sup>9)</sup> tyrosinase의 저해제로서<sup>10,11)</sup> 피부미백제로 널리 사용되고 있다.<sup>12,13)</sup> 그러나 kojic acid는 열, 빛 및 pH변화에 의해 불안정하고 산도로 인해 피부를 자극하는 단점이 지녀 이를 개선



**Scheme 1** – Structures of kojic acid and its derivative, 4-hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron.

할 수 있는 유도체의 설계 및 합성이 연구되었다.<sup>14-20)</sup> kojic acid의 7번탄소 수산기를 아민기로 전환한 후 L-페닐알라닌과 커플링한 5-hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron이 본 연구진에 의해 합성되었는데(Scheme 1) 이 화합물의 티로시나제 저해작용( $IC_{50}=24.6 \mu M$ )이 kojic acid( $IC_{50}=22.9 \mu M$ )만큼 강력하였다.<sup>21)</sup> 본 연구에서는 5-hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron의 저해기전을 연구하여 보고하고자 한다.

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-940-4526 (팩스) 02-940-4195

## 실험방법

### 시약 및 기기

5-Hydroxy-2-L-phenylalanylaminomethyl-4-pyrone은 본 연구실에서 합성한 것을 사용하였으며, L-티로신과 mushroom 티로시나제는 미국 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 완충용액은 pH 6.8의 초산완충액을 사용하였고, 그 외의 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다. 흡광도는 UV/VIS Spectrophotometer (JASCO V-530)로 측정하였다.

### 티로시나제 저해활성 측정

초산완충액(0.05 M, pH 6.8)은 0.05M 초산 저장용액 10 mL에 0.05 M 초산나트륨(6.850 g/L) 저장용액을 가하여 pH를 6.8로 맞춘 후 냉장 보관하여 사용하였다. 기질인 L-티로신의 용액(0.9 mg/mL)은 L-티로신을 초산완충액에 녹여서 조제한 후, 냉장 보관하여 사용하였다. 효소용액(480 units/mL)은 3,400 units/mg 활성을 갖는 티로시나제 5 mg을 초산완충액 5 mL에 녹여 저장용액을 만든 후, 희석하여 조제하였다. 효소용액은 -70°C 냉동 보관하였고 사용직전에 해동하여 사용하였다. 30°C에서 10분간 미리 배양한 pH 6.8의 초산완충액 1.05 mL와, 0.9 mg/mL농도의 L-티로신용액 1 mL, 초산완충액에 녹인 5-hydroxy-2-L-phenylalanylaminomethyl-4-pyrone용액 0.9 mL를 큐벳에 넣고 혼합하였다. 여기에 480 units/mL의 효소용액 0.05 mL를 넣고 마이크로피펫으로 잘 혼합한 후 30°C에서 10분간 배양한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control에서는 시료용액 대신 완충용액을 사용하였으며, 다음 식에 의해 IC<sub>50</sub>값을 계산하였다:

$$\% \text{ 활성} = 100 / (1 + [I] / IC_{50})$$

% 활성은 여러가지 농도의 저해제를 가하여 얻은 효소활성값을 control의 효소활성에 대한 백분율로 표시한 값이며, [I]은 저해제의 농도이다. IC<sub>50</sub>값은 Marquardt algorithm을 이용하여 non-linear least squares regression으로 구하였다.<sup>22)</sup>

### 실험결과 및 고찰

티로시나제 저해활성은 dopachrome방법<sup>23)</sup>에 준하여 측정하였다. Michaelis-Menten 상수(K<sub>m</sub>)값과

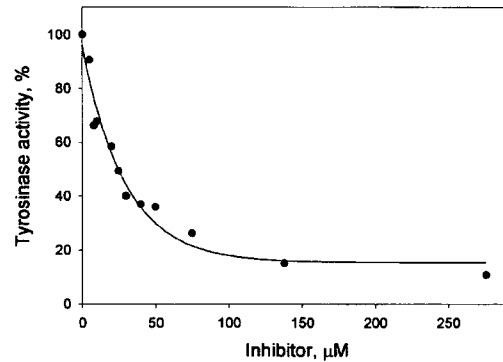


Fig. 1 - Dose-response curve for 4-hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyrone on mushroom tyrosinase.

저해제의 IC<sub>50</sub>값을 구하기 위한 반응시간은 time-course curve를 구하여 초기반응시간인 10분으로 정하였다. 실험방법의 신뢰도를 평가하기 위하여 기질농도의 변화에 대한 티로시나제의 초기반응속도를 측정하여 double-reciprocal plot을 얻었고 이로부터 K<sub>m</sub>값을 구하여 문헌과 비교하였다. 얻어진 K<sub>m</sub>값은 1.03 mM이었으며, 문헌<sup>24)</sup>의 K<sub>m</sub>값(0.69 mM)과 큰 차이를 보이지 않았다. 신뢰도를 평가하기 위한 또 다른 방법으로 kojic acid의 IC<sub>50</sub>값을 측정하여 문헌과 비교하였다. 실험을 통해 얻은 값은 22.90 μM이었으며 이는 문헌<sup>14,15)</sup>의 값(22.94 μM)과 유사하였다.

5-Hydroxy-2-L-phenylalanylaminomethyl-4-pyrone을 초산완충용액에 녹여 저해제 저장용액을 만들고 기질인 L-티로신 1.66 mM존재 하에 저해제의 여러 농도에서 티로시나제의 활성을 측정하였다(Fig. 1) 얻어진 데이터를 Marquardt algorithm을 이용하여 다음 식<sup>25)</sup>에 적용하여 non-linear least squares regression하여 24.6 μM의 IC<sub>50</sub>값을 얻었다:

$$V_0 = k_{cat} E_r \frac{[S]_0}{[S]_0 + k_m}$$

V<sub>0</sub>는 초기반응속도, k<sub>cat</sub>는 효소촉매상수, [S]<sub>0</sub>는 기질농도, E<sub>r</sub>는 효소농도, 그리고 K<sub>m</sub>은 Michaelis-Menten 상수이다.

5-Hydroxy-2-L-phenylalanylaminomethyl-4-pyrone의 저해기전을 구하기 위하여 1.66, 3.32, 4.98, 그리고 8.30 mM의 기질농도에서 이 화합물의 저해효과를 측정하였다. 사용한 저해제의 농도는 8, 20, 40, 및 138 μM이었으며 각 기질농도에서 반응속도를 측정하여

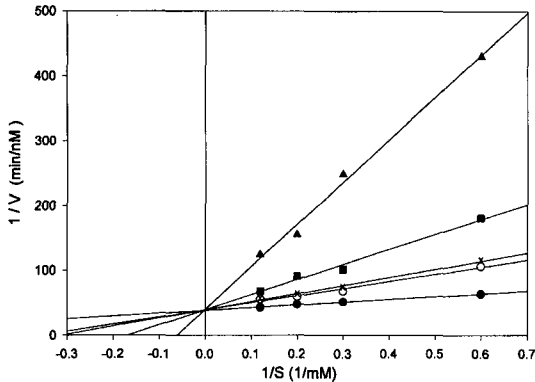


Fig. 2 - Lineweaver-Burk plot for tyrosinase inhibition of 4-hydroxy-2-phenylalanylaminomethyl-4-pyron. (●), control; (○), 8  $\mu$ M; (×), 20  $\mu$ M; (■), 40  $\mu$ M; (▲), 138  $\mu$ M.

Lineweaver-Burk plot으로 나타내었다(Fig. 2). 1/기질 농도(1/S)와 1/반응속도(1/V)를 구한 후 각 저해제 농도에서 linear regression으로 직선식을 얻어 나타낸 결과 y축에서 접하였다. 이는 이 화합물이 티로시나제를 경쟁적으로 저해제함을 의미하는 것으로서,<sup>25)</sup> 효소의 활성부위에 결합할 때 기질인 L-티로신과 경쟁함을 보여준다.

## 결 론

티로시나제는 멜라닌 생성에 있어 핵심적인 역할을 하는 효소로서 L-티로신을 L-도파로 히드록실화한 후 이를 dopaquinone으로 산화시킨다. 티로시나제의 대표적인 억제제의 하나인 kojic acid는 L-티로신을 기질로 하였을 때 경쟁적저해제로 작용한다 알려져 있다.<sup>24)</sup> Kojic acid의 7번 수산기를 아민기로 전환하여 L-페닐알라닌과 아미드결합시킨 5-hydroxy-2-phenylalanyl amino methyl-4-pyron은 강력한 티로시나제 저해효과( $IC_{50}=24.6 \mu$ M)를 나타내었다. 5-hydroxy-2-phenylalanyl amino methyl-4-pyron은 또한 kojic acid처럼 티로시나제의 경쟁적 저해제로 작용하였다.

## 문 헌

- 1) Lerch, K. : *Metal Ions in Biological Systems* Marcel Dekker, Inc., New York, p. 143 (1981).
- 2) Robb, D. A. : *Biochemistry of Fruits and Vegetables*

- Academic Press, London, p. 181 (1981).
- 3) Mason, K. : *Annu. Rev. Biochem.* **34**, 595 (1965).
- 4) Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Ganovas, F. and Garcia-Carmona, F. : Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1 (1995).
- 5) Maeda, K. and Fukuda, M. : Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 765 (1996).
- 6) Morrison, M. E., Yagi, M. J. and Cohen, G. : In vitro studies of 2,4-dihydroxyphenylalanine, a prodrug targeted against malignant melanoma cells *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 2960 (1985).
- 7) Robert, C. H. and Lerch, K. : The inhibition of tyrosinase by pyridinone. *Biochem. J.* **257**, 289 (1989).
- 8) Shirota, S., Miyazaki, K., Aiyama, R., Ichioka, M., Yokokura : Tyrosinase inhibitors from crude drugs *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 266 (1994).
- 9) Parrish, F. W., Wiley, B. J., Simmons, E. G. and Long, L., Jr. : Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium* *Appl. Microbiol.* **14**, 139 (1966).
- 10) Saruno, R., Kato, F. and Ikeno, T. : Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus* *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1337 (1979).
- 11) Chen, J. S., Wei, Ch., Rolle, R. S., Otwell, W. S., Balaban, M. O. and Marshall, M. R. : Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidase *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1396 (1991).
- 12) Obara, Y., Ito, T. and Hizui, Y. : Cosmetic skin whitening by food containing kojic acid and its esters *Jpn. Kokai Tokyo Koho J.P.* **60**, 137,253 (1985).
- 13) Ohyama, Y. : Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism *Fragrance J.* **6**, 53 (1990).
- 14) Kobayashi, Y., Kayahara, H., Tadasa, K., Nakamura, T. and Tanaka, H. : Synthesis of amino acid derivatives of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1745 (1995).
- 15) Kobayashi, Y., Kayahara, H., Tadasa, K. and Tanaka, H. : Synthesis of N-kojic-amino acid and N-konic-amino acid-kojiolate and their tyrosinase inhibitory activity *Bioorg. Medicin. Chem. Lett.* **6**, 1303 (1996).
- 16) Nishimura, T., Kometani, T., Takii, H., Terada, Y. and

- Okada, S. : Comparison of some properties of kojic acid glucoside with kojic acid *J. Jpn. Soc. Food Sci. Tech.* **42**, 602 (1995).
- 17) Tomita, I., Mitsuhashi, K. and Endo, T. : Synthesis and radical polymerization of styrene derivative bearing kojic acid moieties *J. Pol. Sci. Pt. A-Pol. Chem.* **34**, 271 (1996).
- 18) Whitening cosmetic material contains kojic acid and guanosine-3'-5'-cyclic monophosphate. JP 01121206 A 890512 (8925) (1989).
- 19) Kojic acid phosphate(s) for external skin care prep. from 7-hydroxy (un)protected kojic acid halide in organic solvent followed by hydrolysis. JP 61289086 A 861219 (8705) (1986).
- 20) Topical agent having skin whitening and cell growing effects compromises amino acid or peptide derivative of kojic acid, for high stability to metal ion. JP 04187618 A 920706 (1992).
- 21) 김지연, 임세진 : 새로운 코작산 유도체의 합성과 티로시나제 저해활성. *약학회지* **43**, 28 (1999).
- 22) Marquadt, D. W. : An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431 (1963).
- 23) Hearing, V. J. JR. : Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed *Methods in Enzymology* **142**, 154 (1987).
- 24) Chen, J. S., Wei, Ch., Marshall, M. R. : Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897 (1991).
- 25) Segel, I. : *Enzyme Kinetics* John Wiley, New York (1975).