

효모에서 분리한 멜라닌 생성 억제 물질의 세포분화 억제

최 태 부[†] · 이 승 선 · 정 호 권* · 오 철

건국대학교 화학생물공학부, *참존 생물소재 연구소
(2005년 2월 24일 접수, 2005년 3월 7일 채택)

Inhibition of Melanoma Differentiation by Melanogenesis Inhibitor Isolated from Yeast

Taeboo Choe[†], Seungsun Lee, Hokwon Jung*, and Oh Chul

Division of Chemical and Biological Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong 1, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
*Charmzone Cosmetics

(Received February 24, 2005; Accepted March 7, 2005)

요약: 본 연구에서는 효모에서 분리한 melanoston이라고 명명된 멜라닌 생성을 억제하는 물질의 작용 기전을 밝히기 위한 것이다. α -MSH를 처리한 B16 melanoma 세포에서 melanoston은 tyrosinase mRNA 발현양을 10% 정도 저해되는데 그쳤으며 western blotting을 이용한 단백질 측정에서도 이와 비슷한 정도의 단백질 생성 억제를 보였다. 그러나 B16 세포 배양액에 melanoston을 첨가할 경우 세포내 tyrosinase 활성이 30%까지 감소되는 것으로 나타나 melanoston이 tyrosinase inhibitor는 아니지만 세포내 tyrosinase 활성화(activation) 과정을 억제하는 것으로 추측할 수 있었다. 또한 광학 현미경을 이용한 morphology 관찰에서 α -MSH를 처리한 세포에서는 많은 dendrite가 형성되면서 세포분화가 일어나는 반면 melanoston을 처리한 경우에는 dendrite가 감소하면서 세포형태가 대조군과 비슷하게 회복되는 것을 알 수 있었다. 또 FITC-anti-tyrosinase-Ab를 이용한 형광 염색을 통해서 α -MSH만 처리한 세포에서는 tyrosinase의 분포가 dendrite를 포함한 세포 전체로 퍼져나가는 것을 관찰할 수 있었고 α -MSH와 melanoston을 동시에 처리한 세포에서는 대조군과 비슷하게 tyrosinase가 핵 주변에서만 관찰 되어 melanoston이 B16 melanoma 세포의 분화과정에서 이를 억제하는 효과를 주고 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 melanoston은 α -MSH에 의해 진행되는 B16 세포의 분화를 억제하고 이 과정에서 멜라닌 생성의 주된 효소인 tyrosinase의 활성화를 억제하며 결과적으로는 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 사료된다.

Abstract: Melanocytes synthesize melanin within discrete organelle termed melanosomes which are transferred to the surrounding keratinocytes and can be produced in varying sizes, numbers and densities. Skin whitening products have become increasingly popular in the past few years. The most successful natural skin whitening agents are: arbutin, vitamin C, kojic acid, and mulberry, which are all tyrosinase inhibitors. In this work, melanoston, a melanogenesis inhibitor isolated from yeast was studied to understand its mechanism of melanogenesis inhibition. It was found that melanoston was not a tyrosinase inhibitor, while when melanoston was applied to the B16 melanoma cell culture media, the intracellular tyrosinase activity was decreased by more than 30%. When B16 melanoma was stimulated with α -MSH, cell morphology was dramatically changed to have lots of dendrites on the cell membrane surface. On the other hand, B16 was treated with α -MSH and melanoston, simultaneously, the change of cell morphology was not so great. This inhibitory effect of melanoston was found to be related to the inhibition of intracellular activation and transportation of tyrosinase, which was observed by immunostaining of B16 melanoma using anti-tyrosinase antibody. From these results, melanoston was regarded as an inhibitor to the differentiation of melanoma cells.

Keywords: melanogenesis inhibition, melanoma, cell differentiation, UV radiation, tyrosinase

1. 서 론

피부의 기저층에 존재하는 melanocyte는 자외선의 자

극을 받으면 멜라닌을 합성하여 피부를 보호한다. 지금까지 알려진 멜라닌 생성 기전은 다음과 같다. 먼저 자외선 자극을 받은 keratinocyte가 α -MHC와 같은 사이토카인을 분비하고 사이토카인이 melanocyte의 수용체를 활성화

[†] 주 저자 (e-mail: tbchoe@konkuk.ac.kr)

화시키면 이로 인해 melanocyte내 cAMP가 증가하며 증가된 cAMP에 의한 PKA (Protein kinase A) 활성화, MITF (microphthalmia associated transcription factor) 생성, tyrosinase 합성증가로 이어진다[1-5]. Endoplasmic reticulum에서 합성된 tyrosinase는 golgi body에서 glycosylation을 거친 후 melanosome으로 이동하게 되는데 여기서 다시 PKC (Protein kinase C)에 의한 활성화(activation)과정을 거쳐야 비로소 멜라닌 합성이 시작된다. 또한편으로 melanocyte는 세포골격 단백질인 actin filament의 재구성에 의해 많은 수지상돌기(dendrite)를 갖는 dendritic cell로 세포형태가 바뀌게 되는데 이러한 형태변화를 거쳐야 주위에 있는 keratinocyte로 생성된 멜라닌들을 내 보낼 수 있게 된다.

그러나 지나친 멜라닌의 생성은 미적으로나 피부 건강상 문제를 야기할 수도 있으므로 최근에는 멜라닌에 의한 피부 착색을 회피하거나 완화시키는 기능성 화장품들이 개발되고 있다. 현재까지 개발된 미백물질들은 작용기전에 따라 자외선 흡수제나 산란제, vitamin C나 kojic acid, 알부틴 등과 같은 tyrosinase 저해제, 활성 산소종을 소거하는 토크페롤 등으로 분류할 수 있다. 그러나 이러한 물질들은 피부 알려지나 독성을 나타내기도 하고, 쉽게 분해되어 안정성이 떨어지는 등 화장품 원료로서의 사용이 어려운 점이 있어 새로운 미백물질의 개발이 필요하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 효모에서 분리한 멜라닌 생성 억제 물질인 melanoston의 작용 기전을 밝히기 위한 것이다. Melanoston의 작용기전으로는 tyrosinase의 발현 억제, glycosylation 억제, melanosome 표면에서 tyrosinase 활성화억제, 생성 멜라닌 분비억제 등을 생각할 수 있으나 본 연구에서는 B16 melanoma 세포를 이용하여 주로 tyrosinase 발현과 활성화 및 세포 형태변화를 중점적으로 조사하였으며 그 결과 melanoston이 B16 세포의 형태변화와 tyrosinase 활성화를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 melanoston은 α -MSH에 의한 B16 세포 분화 억제와 melanosome에서의 tyrosinase 활성화를 억제함으로써 결과적으로 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보인다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 세포주 및 재료

실험에 사용한 melanoma 세포주 B16F10은 한국세포주은행으로부터 분양받았다. 세포주는 Dulbecco's modified essential medium (DMEM), 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL) (Gibco BRL, USA)을 첨가한 것을 기본배지로 하여 humidified 5% CO₂, 37°C incubator에서 계대 배양하며 실험에 사용

하였다.

Melanoston은 유산균추출물로서 조정계 과정을 거친 후 (주)참존 생물소재연구소로부터 제공받았으며 α -MSH, arbutin, LY, Y, L-3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA), synthetic melanin, sodium azide, sodium dodecyl sulfate (SDS), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, Nonidet P-40 (NP-40), ρ -nitrophenyl- α -glucopyranoside (PNPG), isopropanol, DMSO, NaOH, HCl 등은 Sigma (USA)제품을 사용하였다.

Mouse tyrosinase와 TRP-1의 carboxy terminus로 합성한 polyclonal antibody α PEP7과, α PEP1 그리고 human dopachrome tautomerase (DCT, TRP-2)의 carboxy terminus antibody인 α PEP8h를 Dr. Vincent J. Hearing (NIH, Bethesda, MD)으로부터 제공받아 western blotting에 사용하였다[6].

2.2. 멜라닌 함량 측정

세포 멜라닌 함량 측정을 위하여 6-well plate에 1×10^4 이 되게 세포를 plating하고 1일 경과 후 각 물질을 농도별로 첨가하여 배양하였다. 배양이 끝난 후 1,200 rpm에서 5 min 동안 원심분리를 실시하여 약 2×10^6 정도의 세포를 회수하였다. 세포를 1.5 mL capped tube로 옮기고 phosphate buffered saline (PBS)로 수세, 원심분리를 2회 실시하였다. 상등액을 제거하고, 물에 불용성을 나타내는 멜라닌의 액화를 일으키기 위하여 1 N NaOH/10% DMSO를 첨가한 다음 65°C 수조에서 2 h 동안 처리하였다. 이후 405 nm에서 흡광도를 측정하고 synthetic melanin을 이용한 standard curve와 비교하여 멜라닌 함량을 정량하였다. B16 mouse melanoma에서 α -MSH만을 첨가하였을 때와 저해제인 arbutin, melanoston을 동시에 첨가하였을 때 나타나는 melanin 합성의 상대적 변화량을 조사하였다[7].

2.3. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 DOPA oxidase 활성을 측정하는 것으로 나타내었다. 멜라닌 함량 측정실험과 같은 방법으로 세포를 배양한 후 trypsin으로 세포를 떼어내고 원심분리를 실시하였다. 회수한 세포를 PBS로 2회 수세, 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 single detergent lysis buffer [50 mM Tris · Cl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide 0.1% SDS, 100 μ g/mL PMSF, 1 μ g/mL aprotinin, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate]를 첨가하여 4°C에서 20 min간 반응시켜 세포를 lysis시켰다. 원심분리하여 얻은 cell lysate 1 mL와 reaction mixture [0.1% DOPA in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)] 3 mL를 혼합하여 상온에서 60 min간 반응시켰다. 반응이

끝난 후 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 dopa-chrome의 양을 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적 tyrosinase 활성으로 나타내었다.

2.4. Western Blotting을 이용한 단백질 측정

세포를 100 mm dish에 1×10^5 cells이 되도록 plating하여 24 h이 지나면 각 물질들을 첨가하여 2일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 lysis buffer를 첨가하고 4°C에서 20 min 반응시켰다. Cell scraper로 완전히 lysis되도록 하여 1.5 mL tube로 옮긴 다음, 12,000 rpm에서 5 min 동안 원심분리를 실시해 cell debris 등을 제거하였다. 시료내 단백질의 정량은 bicinchoninic acid (BCA) 방법으로 실시하였으며, 총단백질 50 μ g을 이용하여 10% SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 nitrocellulose membrane (0.45 μ m, Schleicher & Schuell)을 사용하여 electrotransfer (50 mA for overnight)하였다. Electrotransfer가 끝나면 blotting하기에 앞서 Ponceau S를 사용하여 transfer가 올바르게 되었는지 확인하였다. Nitrocellulose membrane을 blocking solution [PBS-T with 5% skim milk]으로 실온에서 1 h 반응시켰다. Primary antibody는 mouse tyrosinase와 TRP-1, human DCT의 polyclonal antibody (from rabbit)인 각각 α PEP7, α PEP1, 그리고 α PEP8h를 이용하였다. Membrane을 blocking solution에 1:1000이 되게 희석한 각각의 primary antibody와 실온에서 2 h 반응을 실시하였다. PBS-T로 15 min씩 4회 수세하였고, anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody를 blocking sol'n에 1:2000로 희석하여 1 h 반응시켰다. 반응이 끝나 후 PBS-T로 20 min씩 4회 수세하였다. Protein band는 enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Pharmacia Biotech, UK)와 photographic film (Kodak, UK)를 이용하여 나타낸 후 Bio-Rad Fluor-S system을 이용하여 정량화하였다[8-9].

2.5. mRNA 측정

Melanogenesis에 관여하는 효소인 tyrosinase, TRP-1, DCT 등의 mRNA level에서 melanoston에 의한 변화를 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

2.5.1 RNA Extraction

6-Well plate에 1×10^4 cells이 되게 plating하고 48 h 경과 후 아무것도 첨가하지 않은 것을 (-) control로, melanogenesis stimulating agent인 α -MSH를 처리한 것을 (+) control로 하고 측정하고자 하는 저해제를 처리하여 24 h 더 배양하였다. Total RNA 분리는 RNA gents[®] total RNA isolation system kit (Promega, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 세포배양을

마친 다음 PBS로 수세하고 denaturing sol'n 400 μ L를 첨가하여 세포를 용해시킨 후, 1.5 mL tube에 옮겨 2 M sodium acetate (pH 4.0) 30 μ L를 첨가하였다. RNA의 분해가 일어나지 않도록 조심스럽게 혼합하고 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 용액 300 μ L를 첨가한 후 10 s 동안 강하게 vortex해주고 얼음에서 15 min 동안 대기하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 20 min 동안 원심분리를 실시한 다음 상층액을 회수하였다. Isopropanol을 동량(v/v) 첨가한 후 4°C, 12,000 rpm에서 다시 10 min 동안 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. DEPC 처리 75% ethanol로 수세를 한 다음 nuclease-free water에 pellet을 녹였다. RNA의 순도와 정량은 Hitachi U-2000 Spectrophotometer (Tokyo, Japan)를 사용하여 A_{260}/A_{280} ratio로서 확인하였다.

2.5.2. RT-PCR

First strand cDNA 합성은 total RNA 2 μ g, $1 \times$ M-MLV reaction buffer, 0.2 mM dNTP, 200 units의 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), 100 pM oligo-dT₁₆가 되도록 혼합하고 총 volume 50 μ L로 조정 한 후 PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)을 이용하여 extension: 37°C 60 min, denaturation: 95°C 5 min을 실행하였다. PCR은 cDNA 2 μ L, $1 \times$ amplification buffer, 0.2 mM dNTP, 1 unit의 super-therm DNA polymerase (Hoffmann-La-Roche, Canada), oligonucleotides를 각각 1 μ L, 총 volume 50 μ L로 조정하여 실행하였다. PCR 조건은 denaturation: 95°C 50 s, annealing: [tyrosinase와 TRP-1: 56°C, TRP-2: 64°C] 20 s, extension: 72°C 20 s로 총 30 cycle을 실행하였다. PCR products는 1.5% agarose gels에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide (Et-Br) staining을 하여 UV illuminator (Vilber Lourmart, France)로 확인하였다. RNA의 integrity는 mouse β -actin mRNA에 대한 primer를 이용하여 확인하였다[10-11].

2.5.3. PCR-ELISA

PCR에서 증폭된 cDNA 양을 정량하기 위하여 PCR-ELISA라는 방법을 개발하여 사용하였다. 이 방법은 증폭 시 5' biotinylated primers과 digoxigenin-11-dUTP를 동시에 사용하여 PCR products를 합성하였고 곧바로 항체만을 이용해서 detection하는 방법이다. 합성된 cDNA를 $10 \times$ buffer, 10 mM dNTPs, 0.5 mM digoxigenin-11-dUTP (Roche), 1 U Taq DNA polymerase and tyrosinase primers과 섞어 최종 volume이 50 μ L가 되도록 하였다. 그 다음 과정은 위에서 실행한 PCR method와 동일하게 수행하였다. Coating buffer에 50 μ g/mL로 avidin을 녹인 후 Microplate (Maxisorp Nunc)에 37°C에서 2 h

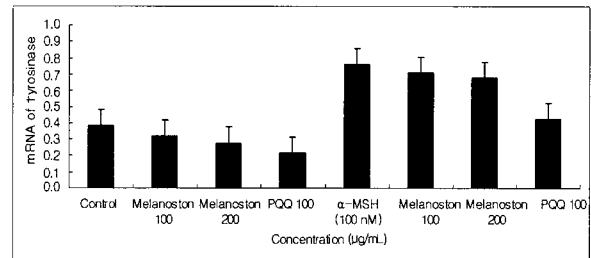
Table 1. Inhibition of Melanin Synthesis by Arbutin or Melanoston in the B16 Melanoma

	Control	α -MSH (100 nM)	Arbutin ($\mu\text{g/mL}$) + α -MSH					Melanoston($\mu\text{g/mL}$) + α -MSH				
			13	27	136	272	1360	13	27	136	272	1360
Melanin content ($\mu\text{g/mL}$)	80	304	356	181	256	131	130	361	214	206	171	111

코팅시켰다. 3번 수세 후 blocking을 위하여 coating buffer에 만든 2% blocking solution으로 실온에서 2 h 동안 방치시켰다. Biotinylated PCR products를 3% bovine serum albumin을 포함한 PBS (PBS-B)로 희석하여 loading하고 실온에서 1 h 동안 반응시켰다. PBS-T (0.05% Tween-20 포함)로 세 번 수세한 뒤 PCR method 1의 경우 0.25 M NaOH로 상온에서 10 min간 방치하여 denaturing을 시켰다. 수세 후 10 pmol/mL digoxigenin-labelled probes을 포함한 hybridization buffer를 well당 100 μL 씩 loading하여 42°C에서 2 h 동안 반응시켰다. 그 후 Anti-digoxigenin AP-conjugated antibody (Sigma)를 PBS-B에 1:3000으로 희석시켜 첨가한 후 37°C에서 1 h 동안 반응시켰다. 1 M diethanolamine buffer에 녹인 0.1% pNPP로서 상온에서 30 min간 방치하고 405 nm에서 ELISA reader를 사용하여 optical density를 측정하였다. PCR method 2의 경우에는 denaturing과 hybridization의 과정을 없애고 직접 anti-digoxigenin AP-conjugated antibody를 처리하였으며 그의 방법과 그 뒤 과정은 위에서 실행한 PCR method와 동일하였다.

2.6. 형광현미경 관찰

세포형태의 변화를 관찰하기 위하여 25T-flask에 5×10^4 이 되게 세포를 plating하고 24 h이 경과된 후 melanoston과 arbutin이 첨가된 배지로 교환하여 48 h 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS로 2회 수세한 후 현미경으로 관찰하였다[12]. 형광현미경 관찰을 위해서는 다음과 같이 처리하였다. 24 well plate에 plate당 10,000개씩 cell을 loading한 후 48 h 후에 실험하였다. 먼저 배지를 제거하고 PBS로 3회 washing한다. 이어서 PBS에 paraformaldehyde와 Sucrose를 각각 4% 농도로 녹이고 37°C로 pre-warming한 후 10~15 min간 상온에서 fixation한다. 다시 PBS로 5 min씩 3회 흔들어 주면서 washing한다. 0.25% Triton X-100으로 5 min간 처리하고 다시 PBS로 5 min씩 3회 washing한다. Blocking은 goat serum을 10%로 희석해서 30 min간 실시하고 1st antibody (PEP7-Polyclonal rabbit antisera to mouse tyrosinase)는 3% goat serum solution에 1/400로 희석해서 4°C에 overnight한다. 다시 PBS로 5 min씩 3회 washing 후 2nd antibody (Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate)를 3% goat serum solution에 1/50로 희석해서 30

**Figure 1.** Effect of melanoston on the expression of tyrosinase mRNA by the α -MSH treated B16 melanoma.

min간 상온에 incubation한다. 2nd antibody를 처리하면서 동시에 DAPI를 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리, counter staining을 해준다. 마지막으로 PBS로 5 min씩 3회 washing을 하고 증류수에 살짝 한 번 더 washing한다. Mounting media를 사용해 mounting을 한다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 멜라닌 합성 저해

B16 세포 배양에서 기본배지만을 사용한 것을 control로 하고 100 nM의 α -MSH만을 첨가한 것, 그리고 α -MSH를 첨가한 배지에 arbutin, melanoston을 농도별로 첨가하였을 때 멜라닌 합성 저해 정도를 측정하여 Table 1에 나타내었다. Melanogenesis stimulating agent인 α -MSH를 처리한 경우 B16에 의해 생성된 멜라닌 농도는 control에 비해 80 $\mu\text{g/mL}$ 에서 304 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가하였으며 여기에 저해제인 arbutin과 melanoston을 배양액에 첨가하였을 경우 1.36 mg/mL의 농도에서 각각 130 $\mu\text{g/mL}$ 과 111 $\mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 α -MSH에 의해 증가된 멜라닌 양의 70% 정도가 감소할 정도로 멜라닌 합성 저해능이 우수한 것으로 나타났다.

3.2. 멜라닌 합성 관련효소의 유전자 발현량 변화

선행연구에서 melanoston을 배양액에 첨가하였을 경우 tyrosinase 활성이 감소하였으나 배양 후 세포 파쇄액에 직접 첨가한 경우에는 tyrosinase 활성에 대한 저해를 나타내지 않는 것으로 나타났다. 따라서 melanoston은 tyrosinase의 저해제가 아닐 것으로 판단되므로 melanoston에 의한 멜라닌 생성 억제체는 tyrosinase 관련 효

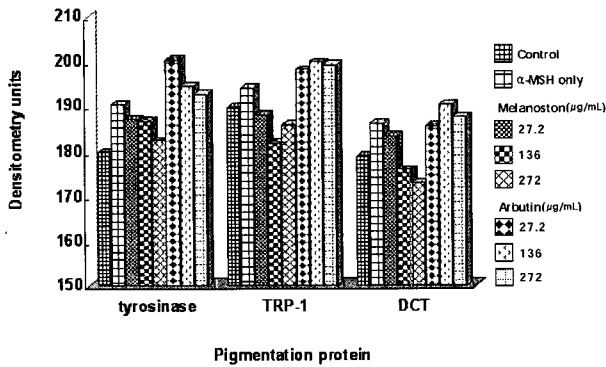


Figure 2. Western blot analysis of the expression of tyrosinase, TRP-1, DCT in B16 melanoma treated with arbutin or melanoston. Histogram shows the result of densitometric scans of immunoblots of proteins extracted from the B16 melanoma.

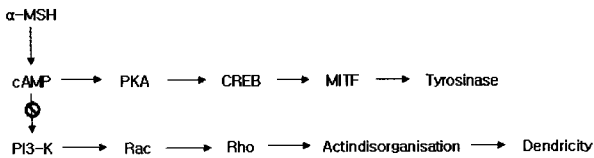


Figure 3. Metabolic pathway that may be occurred in the α -MSH treated B16 melanoma.

소들의 발현량 감소에 의한 것인지를 확인하고자 하였다. 먼저 tyrosinase의 mRNA 발현 양을 측정하기 위하여 PCR-ELISA법으로 4회 반복 실험하여 얻은 결과는 Figure 1과 같다. B16에 100 nM의 α -MSH를 처리하였을 때 tyrosinase 발현량이 198% 가량 증가하였다(control과 α -MSH 비교). 그리고 melanoston을 100 μ g/mL의 농도로 배양액에 첨가했을 경우 tyrosinase mRNA의 발현량은 약 7.2%가 감소했고 200 μ g/mL에서는 약 10.9%가 감소하였다. PQQ란 화학물질은 tyrosinase 유전자 발현을 억제하는 물질로 알려져 있으며 본 실험에서 100 μ g/mL의 농도로 배양액에 첨가했을 경우 tyrosinase mRNA의 발현량이 약 44% 감소했고 이러한 감소현상은 α -MSH를 처리하지 않은 경우에도 나타났으며 100 μ g/mL의 농도로 배양액에 첨가했을 경우 역시 44%의 발현량 감소가 나타났다. Figure 2는 B16에 α -MSH를 처리 하였을 때 멜라닌 합성에 관련된 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1) 및 dopachrome tautomerase (DCT, TRP-2)의 단백질 발현량 변화를 알아보기 위하여 세포 파쇄액을 western blotting한 후 protein band를 Bio-Rad Fluor-S system을 이용하여 정량화한 것이다. Tyrosinase와 DCT의 경우는 α -MSH에 의해 발현량이 증가하였으며 TRP-1은 control과 큰 차이를 나타내지 않

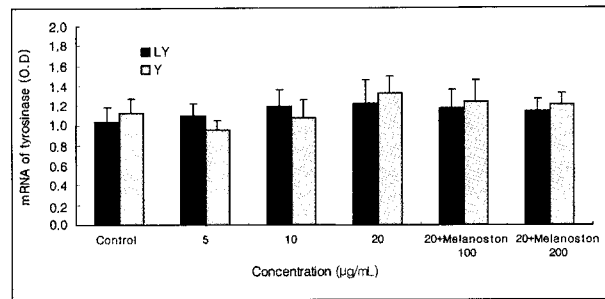


Figure 4. Effect of melanoston on the expression of tyrosinase mRNA by the PI3-K inhibitor(LY) or Rho kinase inhibitor (Y) treated B16.

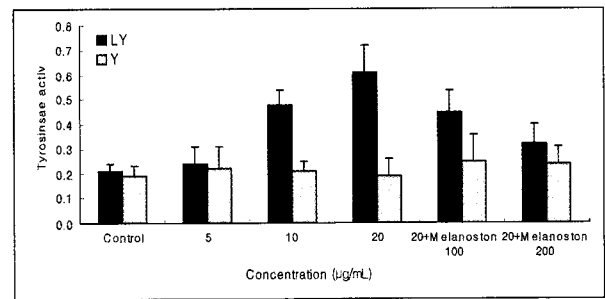


Figure 5. Effect of melanoston on the tyrosinase activity of the PI3-K inhibitor (LY) or Rho kinase inhibitor (Y) treated B16.

음을 알 수 있었다. Melanoston의 경우, 첨가한 양에 따라 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 발현량이 15% 정도 감소하는 것으로 나타났으며, TRP-1은 육안상으로 보는 것과 달리 melanoston에 의해 발현량이 감소하는 것처럼 나타났으나 α -MSH에 의해 증가된 수치가 적기 때문에 그 저해효과는 낮았다. DCT는 tyrosinase와 비슷한 변화를 보여 melanoston을 272 μ g/mL 첨가한 경우 처리하지 않은 control보다도 낮은 값을 나타냈다. Arbutin의 경우는 관련 효소의 발현과 상관없는 tyrosinase competitive inhibitor이기 때문에 세 효소들에 대하여 유의성 있는 발현량의 감소를 찾아볼 수 없었다. 이상의 실험결과를 종합하여보면 B16 배양액에 melanoston을 200 μ g/mL 농도로 처리할 경우 10~20% 내외의 유전자 및 단백질 발현 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 적은 양의 유전자 발현 억제가 melanin 생성을 70% 이상 억제한다고 보기 어려운 점이 있어 다음 실험을 진행하였다.

B16 세포에 α -MSH를 처리하면 멜라닌 생성에 관련된 효소인 tyrosinase의 합성이 증가되기도 하지만 이와 동시에 세포골격 단백질의 재구성이 일어난다. 즉, B16세포의 표면에 있는 α -MSH 수용체가 α -MSH에 의해 활성화

Table 2. Effect of Melanoston, Ly and Y on the Production of Tyrosinase Mrna, Protein, Melanin and on the Enzyme Activity

Supplement	mRNA	Protein	Activity	Melanin
Control	100	100	100	100
α -MSH(100 nM)	198	161.2	224.5	380
α -MSH + melanoston (200 μ g/mL)	176.4 (10.9%)	141.4 (12.6%)	157.6 (29.8%)	213 (43.9%)
LY (20 μ g/mL)	118.4	108	290	316
LY + melanoston (200 μ g/mL)	107.2 (9.5%)	95 (12%)	152.3 (47.5%)	126 (60.1%)
Y (20 μ g/mL)	116.8	96	99	144
Y + melanoston (200 μ g/mL)	107 (8.4%)	82 (14.5%)	121 -	127 (11.8%)

화되면 세포내 cAMP의 농도를 증가시키고 따라서 tyrosinase와 관련 효소들의 발현양이 증가하며 골지체에서 당화된 tyrosinase는 melanosome으로 이동하게 된다. 이

때 melanosome 표면에 결합되어 있던 tyrosinase들은 PKC에 의해 활성화되게 되어 멜라닌 합성을 시작한다. 또 한편으로 actin filament들이 재구성되면서 세포골격 (cytoskeleton)이 변화하게 되고 결국 세포 형태가 dendrite가 많은 수지상 세포로 변하여 생성된 멜라닌의 방출을 용이하게 한다(Figure 3). α -MSH와 달리 세포 골격단백질의 형성에 영향을 주는 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)의 저해제인 LY와 Rho kinase의 저해제인 Y가 멜라닌 합성을 유도한다는 보고에 따라 B16 배양액에 LY 혹은 Y를 첨가한 후 tyrosinase mRNA와 효소 활성을 측정하여 보았다(Figure 4-5). LY와 Y 둘다 B16 세포의 tyrosinase mRNA 발현에는 별다른 영향을 주지 않았으며 여기에 melanoston을 첨가하면 약 10% 정도의 발현 억제 현상을 보였다. 반면에 LY를 첨가한 배양액에서 측정된 tyrosinase의 활성은 2.9배, 멜라닌 생성은 3.1배로 증가하였으며 여기에 melanoston을 200 μ g/mL 농도로 처리할 경우 tyrosinase 활성이 40% 이상 감소하였고 생성된 멜라닌의 양도 60% 정도 감소하는 것으로 나타났다

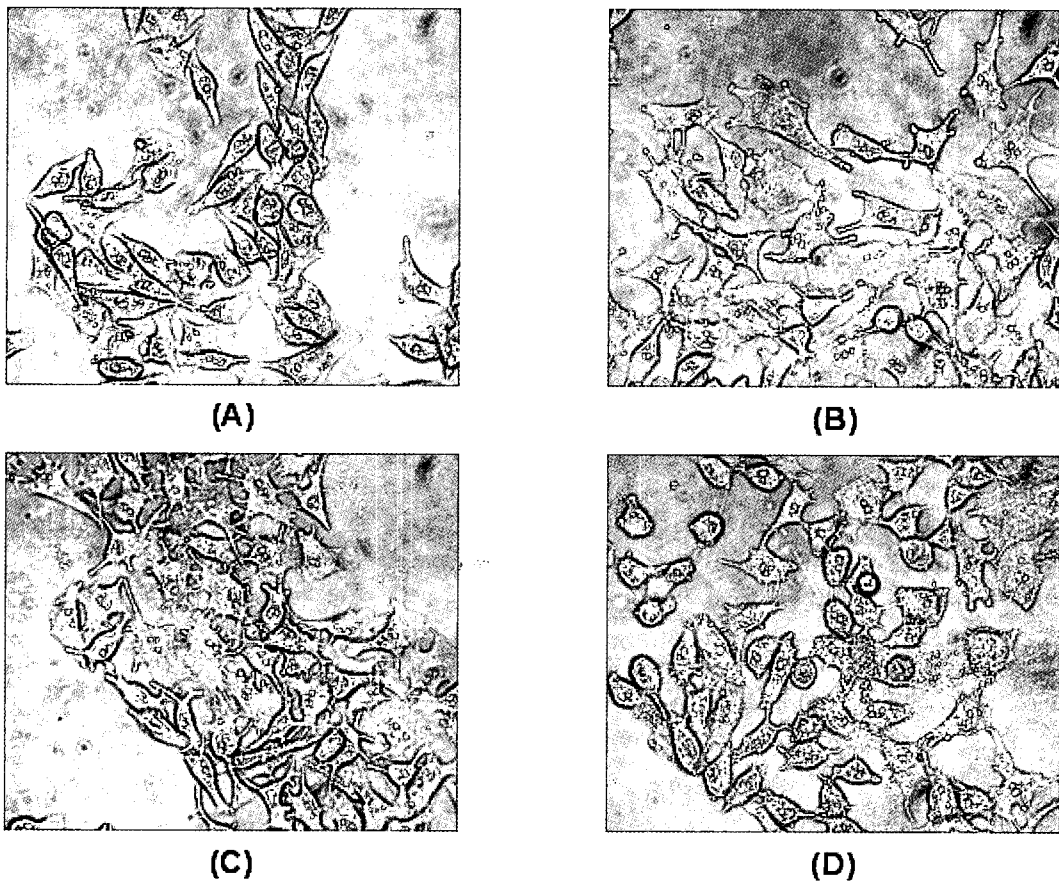


Figure 6. The effect of arbutin or melanoston on the morphology of B16 melanoma (A), Control; (B), 100 nM of α -MSH; (C), α -MSH (100 nM) and arbutin 200 μ g/mL; (D), α -MSH (100 nM) and melanoston 200 μ g/mL.

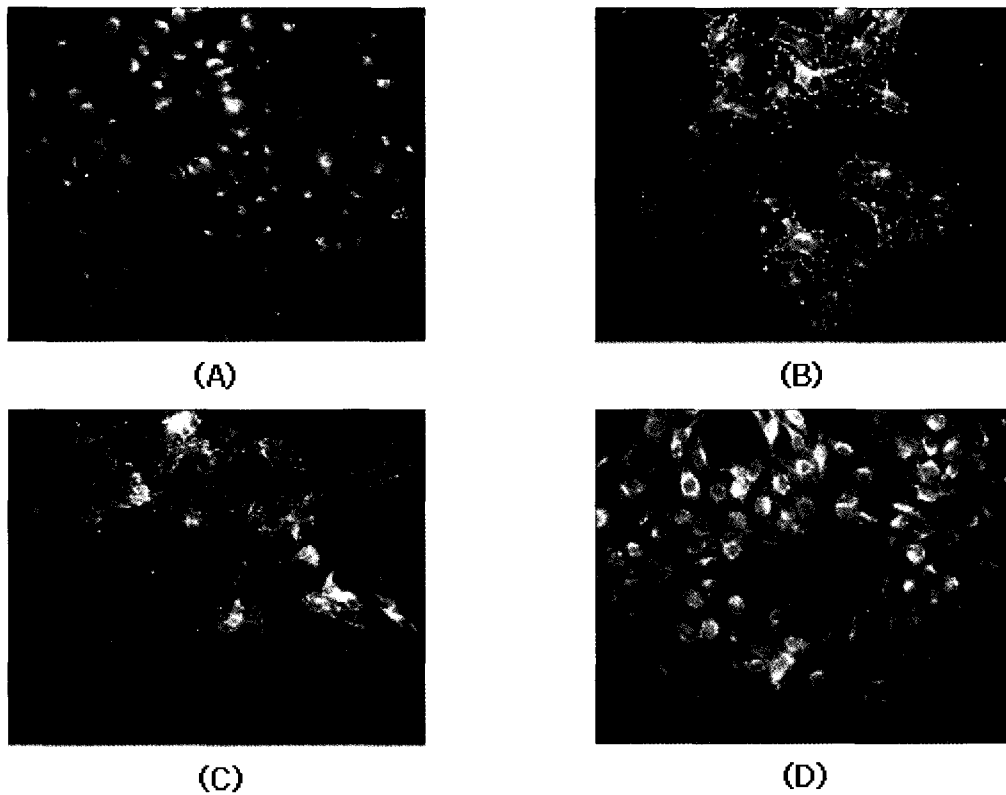


Figure 7. Fluorescence staining of tyrosinase in B16 melanoma treated with arbutin or melanoston. (A), Control; (B), 100 nM of α -MSH; (C), α -MSH(100 nM) and arbutin 200 μ g/mL; (D), α -MSH(100 nM) and melanoston 200 μ g/mL.

(Table 2). Rho kinase의 저해제인 Y의 경우에는 이러한 현상이 나타나지 않았다. Table 2는 이 결과들을 정리한 것으로, α -MSH를 처리한 B16 세포 배양액에 melanoston을 첨가할 경우 tyrosinase나 관련 효소들의 발현 양에는 별다른 영향을 미치지 못하지만 tyrosinase 활성을 현저히 억제하여 결과적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 보여주고 있다.

3.3. 세포분화에 따른 형태 변화

위의 실험에서 melanoston이 세포분화와 관련된 효소들을 억제함으로써 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 나타났으므로 melanoston이 이러한 분화 과정에 어떠한 영향을 미치는지 보기위해 B16을 24 h 동안 배양한 뒤 저해제가 첨가된 배지로 교환하여 48 h 동안 배양한 후 세포 형태를 관찰하였다. Control과 100 nM의 α -MSH, 그리고 저해제인 arbutin과 melanoston을 136 μ g/mL가 되도록 첨가한 네 가지 경우의 세포형태를 Figure 6에 나타내었다. 시약을 처리하지 않은 control의 경우, 수지상 돌기를 거의 나타내지 않은 spindle 형태의 모습을 나타냈으며 멜라닌의 합성이 거의 나타나지 않은 흰색을 보였다 (A). 반면에, 100 nM의 α -MSH를 처리한 경우는 많은

수지상 돌기를 보여 멜라닌이 합성되면 주변 말피기세포로 전달하기 위하여 이런 dendricity가 증가한다는 발표들과 일치하였다(B). 100 nM의 α -MSH와 arbutin(C)과 melanoston(D)를 136 μ g/mL의 농도로 첨가한 경우에는 세포 형태에서 많은 차이를 나타내었다. 즉 arbutin은 α -MSH에 의해 유도된 돌기에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었으나, melanoston의 경우 돌기의 수가 많이 감소한 모습을 나타내어 세포가 전체적으로 원형을 나타내었다. 따라서 melanoston이 멜라닌 합성을 억제하는 작용기전 중 하나는 세포의 형태를 결정하는 세포골격 단백질 합성에 영향을 주거나 세포 분화에 영향을 주는 것이라 사료된다.

3.4. Melanoston이 B16 세포 분화에 미치는 영향

위에서 설명한 대로 melanoston이 B16 세포의 분화를 억제하여 tyrosinase가 melanosome으로 이동하는 과정을 억제하거나 melanosome 표면에 위치한 tyrosinase 활성화(activation) 과정을 억제하고 따라서 melanin 합성을 억제하게 된다는 가설을 좀 더 구체적으로 증명해 보기 위하여 α -MSH를 처리한 세포와 α -MSH 및 melanoston을 동시에 처리한 세포에서 형광현미경을 이용하

여 세포내 tyrosinase 발현 분포의 변화를 조사하였다. 그 결과 Figure 7에서와 같이 α -MSH를 처리하지 않은 B16 세포는 tyrosinase staining시 비교적 핵주위로 tyrosinase가 관찰되었으며 cytosol과 세포막 부근에서는 관찰되지 않았다(A). 그러나 α -MSH를 처리한 B16 세포는 세포형태가 변하여 많은 dendrite를 형성하고 있음을 알 수 있었고 tyrosinase staining시 tyrosinase가 dendrite 전체에 걸쳐 확산되어 있음을 관찰할 수 있었다(B). Arbutin을 처리한 경우 (B)의 경우와 마찬가지로 B16 세포의 dendrite 형성에는 변함이 없고 tyrosinase 발현에도 변함이 없었으며 따라서 arbutin은 B16 세포의 형태 변화와 tyrosinase 발현에 별다른 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 그러나 melanoston 200 μ g/mL를 처리한 경우 (B)의 경우에 비해 B16 세포의 dendrite 형성을 억제함을 알 수 있었다. 이 때 증가된 tyrosinase 발현양은 (B)의 경우에 비해 크게 감소하지 않는 것으로 나타나 위에서 수행한 western blotting을 이용한 단백질 발현 실험 결과와 일치함을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 melanoston은 현재 그 기전을 명확히 설명하기는 어렵지만 B16 세포의 분화과정에 어떤 식으로든 개입하여 α -MSH에 의해 생성이 증가된 tyrosinase가 melanosome으로 이동하는 단계나 melanosome에서 마지막으로 tyrosinase가 활성화하는 단계를 방해하는 것으로 보인다. 이러한 억제효과는 또한 10~20% 정도의 적은 양의 tyrosinase 발현도 억제하는 결과로 나타났으며 따라서 전반적으로는 멜라닌 합성 억제라는 현상으로 나타나게 된 것이다. 또 본 연구 결과에는 나타내지 않았으나 melanoston이 생성된 멜라닌 분비에 미치는 효과를 조사하기 위하여 Clon M3 melanocyte cell에 melanoston으로 처리하고 5일이 경과한 후 세포 내 남아 있는 melanin의 양을 Fontana-Mason staining으로 관찰하여 본 결과 세포내 멜라닌 분비가 melanoston을 처리하였을 때 현저하게 억제됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 산업자원부 공업기반기술과제의 연구지원에 의해 수행된 것입니다.

참고 문헌

1. C. Romero-Graillet, E. Aberdam, M. Clement, J.-P. Ortonne, and R. Ballotti, Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis, *J. Clin. Invest.*, **99**, 1 (1997).
2. B. A. Gilchrest, H. Y. Park, M. S. Eller, and M.

- Yaar, Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 1 (1996).
3. H. Y. Park, J. M. Perez, R. Laursen, M. Hara, and B. A. Gilchrest, Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16470 (1999).
4. C. Romero-Graillet, E. Aberdam, N. Biagoli, W. Massabni, J.-P. Ortonne, and R. Ballotti, Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes, *J. Biol. Chem.*, **271**, 28052 (1996).
5. R. Buscà and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment. Cell. Res.*, **13**, 60 (2000).
6. V. M. Virador, N. Matsunaga, J. Matsunaga, J. Valencia, R. J. Oldham, K. Kameyama, G. L. Peck, V. J. Ferrans, W. D. Vieira, Z. A. Abdel-Malek, and V. J. Hearing, Production of melanocyte-specific antibodies to human melanosomal proteins: expression patterns in normal human skin and in cutaneous pigmented lesions, *Pigment. Cell. Res.*, **14**, 289 (2001).
7. V. M. Virador, N. Kobayashi, J. Matsunaga, and V. J. Hearing, A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation, *Anal. Biochem.*, **270**, 207 (1999).
8. H. Mahalingam, A. Watanabe, M. Tachibana, and R. M. Niles, Characterization of density-dependent regulation of the tyrosinase gene promoter: role of protein kinase C, *Exp. Cell. Res.*, **237**, 83 (1997).
9. K. Smalley and Tim Eisen, The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells, *FEBS Letters*, **476**, 198 (2000).
10. H. Kosano, T. Setogawa, K. Kobayashi, and H. Nishigori, Pyrroloquinoline quinone (PQQ) inhibits the expression of tyrosinase mRNA by α -melanocyte stimulating hormone in murine B16 melanoma cells, *Life Sci.*, **56**, 1707 (1995).
11. C. Bertolotto, R. Buscà, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J.-P. Ortonne, and R. Ballotti, Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and

- of Microphthalmia, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 694 (1998).
12. H. Kosano, T. Kayanuma, and H. Nishigori, Stimulation of melanogenesis in murine melanoma cells by 2-mercapto-1-(β -4-pyridethyl)benzimidazole (MPB), *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1499**, 11 (2000).
 13. B. Sylvia, B. K. Smith, Zhou, and S. J. Orlow, Expression of tyrosinase and the tyrosinase related proteins in the Mitf^{vit} (Vitiligo) mouse eye: implications for the function of the microphthalmia transcription factor (Mitf), *Exp. Eye Res.*, **66**, 403 (1997).