

3 β -Hydroxy-12-oleanen-28-oic Acid 유도체들의 PTP-1B 저해활성에 대한 CoMFA 분석과 활성 분자들의 예측

김 상 진[†] · 김 세 곤* · 성 낙 도*

대전보건대학 화장품과학과, *충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부
(2008년 4월 16일 접수, 2008년 4월 28일 채택)

CoMFA Analysis on Inhibitory Effect of 3 β -Hydroxy-12-oleanen-28-oic Acid Analogues on PTP-1B Activity and Prediction of Active Compounds

Sang-Jin Kim[†], Se-Gon Kim*, and Nack-Do Sung*

Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Sciences College, 77-3, Gayang 2-dong, Dong-gu,
Daejeon 300-711, Korea

*Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University,
Daejeon 305-764, Korea

(Received April 16, 2008; Accepted April 28, 2008)

요 약: 기질 화합물로서 3 β -hydroxy-12-oleanen-28-oic acid 유도체들의 치환기(R₁ ~ R₄)가 변화함에 따른 protein tyrosine phosphatase (PTP)-1B의 저해활성에 관한 비교 분자장 분석(CoMFA) 모델을 유도하고 정량적으로 검토하였다. 최적의 CoMFA F1 모델은 가장 높은 예측성과 상관성($r_{cv}^2=0.654$ 및 $r_{ncv}^2=0.995$)을 나타내었다. 저해활성에 관한 CoMFA장 기여비율(%)의 순서는 입체장(53.0%), 정전기장(36.2%) 및 소수성장(10.8%)이었다. 등고도 분석 결과로부터 저해활성은 기질 분자 내 R₄-치환기에 의존적이었으며 특히 melanin 저해활성이 높은 새로운 화합물(P1 및 P2)이 예측되었다.

Abstract: The comparative molecular field analyses (CoMFA) models between the substituents with changing groups (R₁~R₄) of 3 β -hydroxy-12-oleanen-28-oic acid derivatives as substrate molecule and their inhibitory activities (pI₅₀) against protein tyrosine phosphatase (PTP)-1B were derived and discussed quantitatively. The optimized CoMFA F1 model have best predictability and fitness ($r_{cv}^2=0.654$ and $r_{ncv}^2=0.995$). The order of contribution ratio (%) with CoMFA fields on the inhibitory activities was a steric field (53.0%), electrostatic field (36.2%) and hydrophobic field (10.8%). From the analytical results of CoMFA contour maps, the inhibitory activities were dependent on the R₄ group in substrate molecules. Particularly, the new active compounds (P1 & P2) with the inhibitory activity against melanin synthesis were expected.

Keywords: oleanolic acid, protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B, CoMFA, melanin, PLS

[†] 주 저자 (e-mail: kimsj@hit.ac.kr)

1. 서 론

PTP-1B는 인슐린 신호전달을 조절하는 중요한 효소로, 주로 insulin receptor 및 insulin receptor substrate-1을 탈인산화 시키는 인슐린 negative regulator로 작용을 한다[1]. 또한 tyrosine으로부터 DOPA, DOPAquinone 및 DOPAchrome을 거쳐 melanin을 만드는 대사과정 중, 활성을 지니고 있는 oxy-form인 활성형 tyrosinase의 활성을 방해하여 melanin의 형성을 억제하는 작용을 하는 것으로도 알려져 있다[2-5].

Melanin은 화학적으로 매우 안정한 물질이기 때문에 생성된 melanin의 완벽한 제거는 쉽지 않다[6]고 알려져 있는데 자외선을 차단하여 피부를 보호해 주는 순기능을 가지고 있는 반면 melanosome에서 melanin이 비정상적으로 과다 생성되어 원치 않는 기미, 주근깨 및 노인성 검버섯을 만들거나 피부암의 원인이 되는 흑색종을 만들어 내는 역작용 등을 하기도 한다[7]. 지금까지 연구된 tyrosinase 활성 저해물질은 미생물인 actinomycetes 속에서 발견된 melanostatin이나 albocycline[8,9] 등과 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin 및 galbrol, 상백피에서 추출한 mulberine[10], bearberry에서 추출한 arbutin[11]과 누룩에서 추출한 kojic acid[12] 및 이들의 유도체들이 알려져 있다. 이들 중 일부 성분은 미백용 화장품의 주요원료로 사용되고 있지만 활성이 높지 않은 편이기에[13] 안전성이 높으면서 melanin 생합성 저해활성이 높은 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다.

본 연구에서는 melanin 생합성 저해활성이 우수한 새로운 물질을 탐색하기 위하여 산수유(*Cornus officinalis* Sieb.)의 열매로부터 분리된 3 β -hydroxy-12-oleanen-28-oic acid를 위시하여 합성된 그 유도체들의 구조와 PTP-1B 저해활성관계(3D-QSAR)[14]에 관한 비교분자장분석(CoMFA)[15] 모델을 검토하고 melanin 저해활성이 높은 새로운 분자를 예측하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 분자의 모델링

분자 모델링은 Syby 1 (Ver. 8.0) 프로그램(Tripos Inc.)을 사용하여 수행되었다. 기질 화합물로서 3 β -hydroxy-12-oleanen-28-oic acid (oleanolic acid) 유도체(Figure 1)들의 치환기(R₁ ~ R₄)의 변화에 따른 PTP-1B 저해활성 (Obs. pI₅₀)은 문헌 값[14,17]을 사용하여 CoMFA 모델을 유도하였다. 예측성을 검토하기 위하여 data set 화

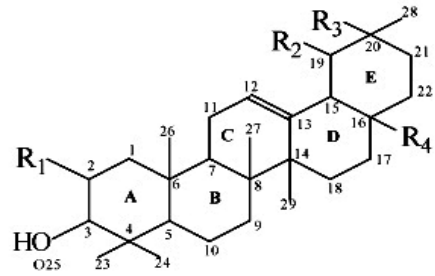


Figure 1. General structure and numbering scheme of 3 β -hydroxy-12-oleanen-28-oic acid analogues as PTP-1B inhibitor.

합물(n = 30) 중, 정렬(alignment)에서 벗어나는 화합물로 선택된 6개의 test set 화합물을 제외한 training set 화합물(n = 24)에 대하여 CoMFA 모델을 유도하였다. 그리고 test set 화합물을 대상으로 앞서 유도된 CoMFA 모델들의 예측성을 평가하였다. 위치 에너지가 최소화 된 가장 안정한 형태는 simulated annealing 방법[18]으로 탐색하여 전보[19]의 방법에 따라 CoMFA 계산을 실시하였다. 가장 안정한 형태에서 수소원자를 제외한 구조를 기본 분자틀(template)로 정하여 atom based fit (A) 방법과 field fit (F) 방법으로 3차원 공간상에 각각 정렬하였으며 그 한 예로 Figure 2에는 F 정렬 상태를 나타내었다.

2.2. 부분 최소자승 분석

3차원 공간상에 정렬된 화합물들의 구조적 특징에 관한 설명인자와 PTP-1B 저해활성(Obs. pI₅₀) 사이의 상관관계를 부분 최소자승(PLS) 방법[20]으로 분석하였다. CoMFA 장으로는 입체장(St) 및 정전기장(E) 이외에 부가적인 설명인자로서 소수성장(Hy)[21] 등, 3가지 특성장의 조합으로 구성된 모델을 유도하였다. 또한, 최적의 성분수(NC)를 결정하기 위하여 leave-one-out (LOO) 교차확인 과정을 실행하여 예측성(q² 또는 r²_{cv})과 성분수를 탐색하였다. 이를 근거로 비교차확인 과정으로 다음과 같은 조건에서(Scaling: CoMFA standard 및 column filtering: 2.0 Kcal/mol) 상관성(r²_{ncv}) 값을 얻었다. 교차확인 결과로부터 squared prediction errors의 합인 predictive residual sum of squares (PRESS) 값을 계산하여 예측성을 판단하였다.

2.3. 등고도 분석과 예측

최적의 CoMFA 모델이 가지고 있는 기질분자의 구조와 PTP-1B 저해활성에 관련한 정보에 따른 기질 분자

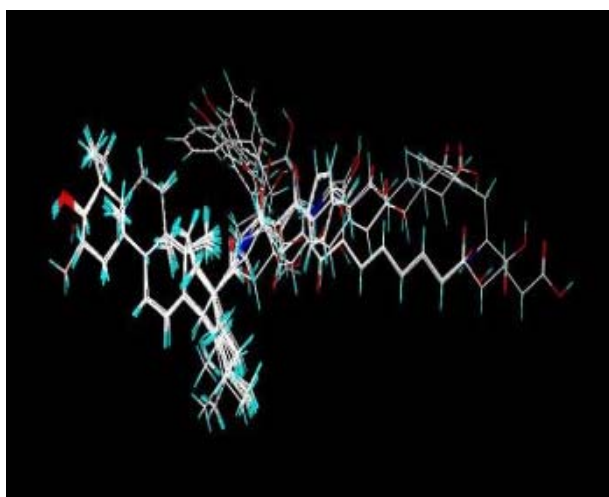


Figure 2. Alignment of the potential energy minimized substrate structures according to a least-squares field fit (training set compounds).

내 저해활성 발현 부위에 대한 구조적인 특징들을 시각적으로 분석하기 위하여 최적화 된 모델들이 가지고 있는 CoMFA 장의 특성을 3차원 공간상에 등고도로 표현하였다. 가장 높은 저해활성(Obs. pI_{50})을 나타낸 치환체 (14)의 구조를 등고도상에 나타내었으며 기질 분자의 구조적인 특성과 저해활성과의 관계를 확인하였다. 여기서 favor : disfavor의 비율(stdev*coeff)은 80 : 20의 비율로 각각 나타내었다. 그리고 등고도를 만족하는 높은 저해활성 분자의 예측은 optimized QSAR tool을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PTP-1B 저해 활성값

Oleanolic acid 유도체들의 치환기($R_1 \sim R_4$)가 변화함에 따르는 training set 화합물의 치환체별로 관측된

Table 1. Observed PTP-1B Inhibitory Activity (Obs. pI_{50}) of Oleanolic Acid Analogues, Predicted Activity (Pred. pI_{50}) by CoMFA Models and Their Deviation for Training Set

No.	Substituents (R)				Obs. pI_{50}	A1		F1	
	R_1	R_2	R_3	R_4		Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
1	H	H	Me	CO ₂ H	4.66	4.75	-0.09	4.71	-0.05
2	H	Me	H	CO ₂ H	4.87	4.99	-0.12	4.97	-0.10
3	Me	Me	H	CO ₂ H	5.52	5.37	0.15	5.42	0.10
4	OH	Me	H	CO ₂ H	5.54	5.45	0.09	5.45	0.10
6	H	H	Me	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	5.09	5.04	0.05	5.07	0.03
7	H	H	Me	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	5.84	5.87	-0.03	5.86	-0.02
8	H	H	Me	(CH ₂) ₈ CO ₂ H	5.45	5.45	0.00	5.50	-0.05
9	H	H	Me	(CH ₂) ₁₂ CO ₂ H	5.25	5.22	0.03	5.20	0.06
10	OH	Me	H	(CH ₂) ₃ CH(Bz)CO ₂ H	6.96	7.00	-0.04	6.98	-0.02
12	H	H	Me	(CH ₂) ₄ C(=O)NHCH(Bz)CO ₂ H	6.43	6.40	0.03	6.43	0.00
13	H	Me	H	(CH ₂) ₄ C(=O)NHCH(Bz)CO ₂ H	6.74	6.75	-0.01	6.75	-0.01
14	OH	Me	H	(CH ₂) ₄ C(=O)NHCH(Bz)CO ₂ H	7.00	7.01	-0.01	6.99	0.01
15	H	H	Me	CHCHCO ₂ H	5.54	5.55	-0.01	5.53	0.01
16	H	H	Me	CHCH(CH ₂) ₂ CO ₂ H	5.41	5.44	-0.03	5.41	0.00
17	H	H	Me	(CHCHCH ₂ CH ₂) ₂ CO ₂ H	5.91	5.93	-0.02	5.94	-0.03
18	H	H	Me	(CHCHCH ₂ CH ₂) ₃ CO ₂ H	5.50	5.48	0.02	5.48	0.02
19	H	H	Me	C(=O)NHCH(Bz)CO ₂ H	5.33	5.31	0.02	5.31	0.02
20	H	H	Me	C(=O)NHCH(4-OHBz)CO ₂ H	5.43	5.38	0.05	5.45	-0.02
21	H	H	Me	C(=O)NHCH(i-Pr)CO ₂ H	5.55	5.56	-0.01	5.59	-0.04
22	H	H	Me	C(=O)NHCH(CO ₂ H)CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	4.79	4.83	-0.04	4.83	-0.04
23	H	H	Me	C(=O)NHCH(4-CO ₂ HPh)CO ₂ H	5.47	5.49	-0.02	5.43	0.04
26	H	H	Me	C(=O)NH(CH ₂) ₁₀ CO ₂ H	5.82	5.83	-0.01	5.82	0.00
27	H	H	Me	C(=O)NH(CH ₂) ₁₄ CO ₂ H	6.11	6.10	0.01	6.08	0.03
28	H	H	Me	C(=O)NH(CH ₂) ₁₀ C(=O)NHCH(Bz)CO ₂ H	6.39	6.40	-0.01	6.44	-0.05
ARTS ^{c)} (PRESS ^{d)})						0.06(0.07)		0.06(0.05)	

^{a)}Predicted values by the optimized CoMFA models, ^{b)}different between observed value and predicted value, ^{c)}average residual of training set, ^{d)}predictive residual sum of squares of the training set.

PTP-1B 저해활성값(Obs. pI_{50})[16]을 Table 1에 정리하였다. 그리고 최적화된 CoMFA 모델(A1 및 F1)에 의하여 예측된 저해활성값(Pred. pI_{50}) 및 관측값과 예측값의 차이값(Dev.)을 요약하였다. $R_1 = OH$, $R_2 = Me$, $R_3 = H$, $R_4 = HO_2C(Bz)CHNHC(=O)(CH_2)_4$ -치환체(14)가 제일 높은 PTP-1B 저해 활성값($pI_{50} = 7.00$)을 그리고 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = Me$, $R_4 = HO_2C$ -치환체(1)가 가장 낮은 저해 활성값($pI_{50} = 4.66$)을 나타내었으므로 저해활성은 R_4 -치환기에 의존적임을 확인하였다. 또한 A1 모델에 있어서 편차값(Dev.)의 평균값 ARTS. = 0.06 그리고 관측값과 예측값 사이 제곱편차의 합에 관한 PRESS = 0.07 그리고 F1 모델의 오차값은 ARTS. = 0.06 및 PRESS = 0.05이었다. 이들 값에 기초하여 최적 모델인 F1 모델의 예측성이 가장 양호함을 잘 설명하고 있다.

3.2. CoMFA 모델

두 정렬(A 및 F)과 grid (1.5 ~ 3.0 Å) 변화 및 CoMFA장의 조합에 따른 모델들 중, A 정렬에서 유도된 모델들(A1 ~ A5)의 예측성은 $r_{cv}^2 = 0.511 \sim 0.585$ 그리고 상관성은 $r_{ncv}^2 = 0.953 \sim 0.993$ 이었고, F 정렬에서 유도된 모델들(F1 ~ F5)의 예측성은 $r_{cv}^2 = 0.494 \sim 0.589$ 그리고 상관성은 $r_{ncv}^2 = 0.956 \sim 0.995$ 이었다. 이들 10개의 모델 중에서 가장 양호한 두 모델(A1 및 F1)의 통계값을 Table 2에 정리하였다. F1 모델($r_{cv}^2 = 0.564$ 및 $r_{ncv}^2 = 0.995$)이 가장 양호한 최적의 모델이었으며 다음으로 양호한 모델은 A1 모델($r_{cv}^2 = 0.564$ 및 $r_{ncv}^2 = 0.995$)이었다. 각 모델들의 기여도를 보면 A1 모델에 있어서 입체장, 정전기장 및 소수성장의 기여비율(%)은 각각 54.3 %, 37.0 % 및 8.7 %이었으며 F1 모델은 53.0 %, 36.2 % 및 10.8 %이었다. 그러므로 두 모델 모두 입체장, 정전기성, 소수성의 순서로 입체장이 가장 높은 기여비율(%)을 나타내고 있음을 알 수 있었다. Figure 3에는 기질 유도체들에 대한 관측된 PTP-1B 저

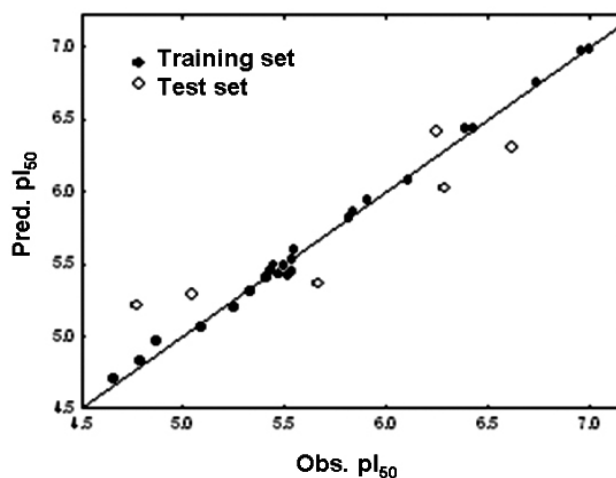


Figure 3. Relationships between observed PTP-1B inhibitory activities (Obs. pI_{50}) and predicted activities (Pred. pI_{50}) by CoMFA model F1 (Training set: Pred. $pI_{50} = 0.995 \times$ Obs. $pI_{50} + 0.029$, $n = 34$, $s = 0.046$, $F = 4393.78$, $r^2 = 0.995$ & $q^2 = 0.995$).

해 활성값(Obs. pI_{50})과 최적 모델인 F1 모델에 의한 예측값(Pred. pI_{50}) 사이의 관계를 나타내었으며 비례관계식(Pred. $pI_{50} = 0.995 \times$ Obs. $pI_{50} + 0.029$, $n = 34$, $s = 0.046$, $F = 4393.78$, $r^2 = 0.995$ 및 $q^2 = 0.995$)으로부터 F1 모델의 상관성이 양호함을 알 수 있었다.

한편, A1 및 F1 모델의 예측성을 검토하기 위하여 Table 3에는 test set 화합물들의 관측된 PTP-1B 저해 활성값과 두 모델에 의하여 예측된 저해활성값 그리고 이들 두 값들의 차이값(Dev.)들을 정리하고 평균 차이값(Ave.) 및 PRESS값을 각각 정리하였다. 즉, A1 모델은 ARTS. = 0.58, PRESS = 2.23 그리고 F1 모델은 ARTS. = 0.31, PRESS = 0.75이었다. 또한, training set 화합물에 대한 경우(Table 1)로부터, 최적 모델인 CoMFA F1 모델의 예측성이 양호함을 알 수 있었다.

Table 2. Summary of the Statistical Results for the Optimized CoMFA Models in Several Different Field Combinations with Two Alignment and Contribution Ratio (%)

Models	PLS analyses						Contribution (%)		
	Grid (Å)	NC	r_{cv}^2 ^{a)}	r_{ncv}^2 ^{b)}	SE _{ncv} ^{c)}	F	St	E	Hy
A1	2.0	5	0.582	0.993	0.060	512.083	54.3	37.0	8.7
F1 ^{d)}	2.0	5	0.564	0.995	0.051	719.551	53.0	36.2	10.9

Abbreviation: NC = number of component, St = steric, E = electrostatic, Hy = hydrophobic, F = fraction of explained versus unexplained variance, ^{a)}cross-validated r_{cv}^2 , ^{b)}non-cross-validated r_{ncv}^2 , ^{c)}standard error estimate, ^{d)}optimized CoMFA model.

Table 3. Observed PTP-1B Inhibitory Activities (Obs. pI₅₀), Predicted Activities (Pred. pI₅₀) by CoMFA Models with Two Alignments and Their Deviations for Test Set

No.	Substituents				Obs. pI ₅₀	A1		F1	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
5	OH	Me	Me	CO ₂ H	5.60	5.01	0.59	5.35	0.25
11	H	H	Me	(CH ₂) ₃ CH(Bz)CO ₂ H	6.27	6.30	-0.03	6.21	0.06
24	H	H	Me	C(=O)NHCH ₂ CO ₂ H	4.70	5.09	-0.39	5.20	-0.50
25	H	H	Me	C(=O)NH(CH ₂) ₃ CO ₂ H	5.09	5.31	-0.22	5.28	-0.19
29	H	Me	H	C(=O)NH(CH ₂) ₁₀ C(=O)NHCH(Bz)CO ₂ H	6.60	5.78	0.82	6.07	0.53
30	H	H	Me	C(=O)NH(CH ₂) ₁₀ C(=O)NHCH(4-OHBz)CO ₂ H	6.28	5.28	1.00	5.95	0.33
ARTS ^{c)} (PRESS ^{d)})						0.58 (2.23)		0.31 (0.75)	

^{a)}Predicted values by the optimized CoMFA models, ^{b)}different between observed value and predicted value, ^{c)}average residual of test set, ^{d)}predictive residual sum of squares of the test set.

Table 4. Predicted Activities (Pred. pI₅₀) of Designed Compounds with the Optimized QSAR

No.	Substituents (R)				Pred. ^{a)}
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
P1	NHCoph	<i>n</i> -C ₁₂ H ₂₅	NHCO ₂ C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	7.23
P2	<i>n</i> -C ₄ H ₉	<i>n</i> -C ₁₀ H ₂₁	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉ O	CH(CH ₃) ₂	7.20
P3	CCl ₃	Cph ₃	CH ₂ Ph	Cyclobutyl	7.12
P4	<i>n</i> -C ₁₂ H ₂₅	NHCSNH ₂	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	Coph	7.10
P5	NHCoph	<i>n</i> -C ₁₂ H ₂₅	NHCO ₂ C ₂ H ₅	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	7.09

^{a)}Predicted inhibitory activity by optimized CoMFA F1 model **17** (pI₅₀ = 7.00).

3.3. 등고도 및 활성 분자의 예측

최적의 CoMFA F1 모델이 가지고 있는 기질분자의 치환기(R₁ ~ R₄) 변화에 따른 PTP-1B 저해활성에 관한 정보를 가장 활성이 높은 **14**번 화합물의 구조상에 등고도(Figures 4 ~ 6)로 나타내었다. 먼저, 입체장(Figure 4)의 경우에 R₁ 및 R₂-치환기는 입체적으로 큰 치환기(green) 그리고 R₃ 및 R₄-치환기는 입체적으로 작은 치환기(yellow)가 저해활성을 증가시킬 것으로 예상되었다. 특히, R₄-치환기는 결사슬이 길지 않고 짧은 큰 입체성을 가지는 치환기가 이상적일 것으로 판단되었다. 정전기장(Figure 5)의 경우에는 R₄-치환기의 첫 부분과 끝부분은 양하전(blue)을, 그리고 중간 부분은 음하전(red)을 띠는 치환기가 저해활성을 증가시킬 것으로 기대되었다. 그리고 소수성장에 관한 CoMFA HINT 등고도(Figure 6)의 경우[21] R₂-치환기는 적은 부분이, 그리고 R₄-치환기는 대부분 소수성이 클수록(purple) 저해활성이 증대 될 것으로 나타났다. 그러나 R₄-치환기의 소수성은 기질분자 모체의 가까운 넓은 영역에 걸쳐서

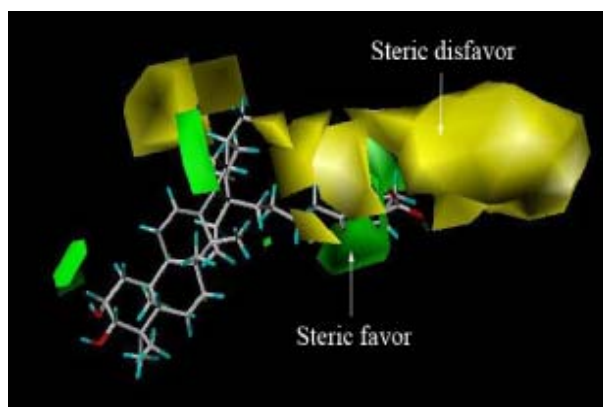


Figure 4. Steric contour map on PTP-1B inhibitory activity (stdev*coeff) with CoMFA F1 model. The most active compound (**14**) is shown in capped sticks.

분포되어 있으며 치환기 끝의 작은 부분에는 친수성이 분포되어 있다. 그러므로 PTP-1B에 대하여 저해활성을 가장 크게 미치는 R₄-치환기가 입체적으로 크다는 사실은 수용체인 PTP-1B의 작용점이 표면상에 존재한다는

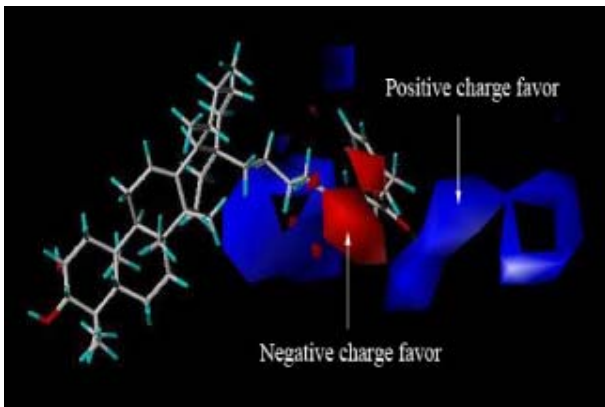


Figure 5. Electrostatic contour map on PTP-1B inhibitory activity (stdev*coeff) with CoMFA F1 model. The most active compound (**14**) is shown in capped sticks.

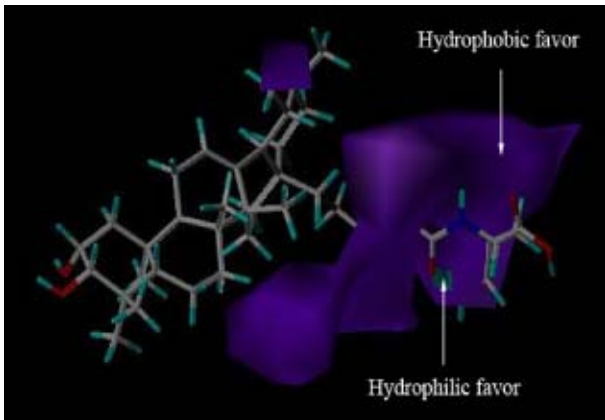


Figure 6. CoMFA-HINT contour map on the PTP-1B inhibitory activity (stdev*coeff) by CoMFA F1 model. The most active compound (**14**) is shown in capped sticks.

연구결과와 잘 부합하는 것으로 판단된다[22].

이상과 같이 기질 분자 내 특성장의 분포를 만족할 수 있는 분자를 설계하기 위하여 Table 4에는 기질분자의 치환기($R_1 \sim R_4$) 변화에 따른 고효성 분자를 예측하여 여기에서 다른 화합물 중에서 가장 높은 저해활성을 나타내는 화합물(**14**: Obs. $pI_{50} = 7.00$)보다 더 높은 저해활성을 나타내는 5개의 화합물을 요약하였다. 이에 따르면 가장 높은 저해활성을 나타내는 화합물인 **P1** ($R_1 = \text{NHCOph}$, $R_2 = n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$, $R_3 = \text{NHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ 및 $R_4 = n\text{-C}_8\text{H}_{17}$)과 **P2** ($R_1 = n\text{-C}_4\text{H}_9$, $R_2 = n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$, $R_3 = n\text{-C}_9\text{H}_{19}\text{O}$ 및 $R_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$)의 저해활성은 각각 Pred. $pI_{50} = 7.23$ 및 7.20으로 예상되었다.

다음 연구로는 PTP-1B에 대하여 높은 저해활성을 나타내는 화합물들을 합성하고, 합성된 화합물의 독성과

멜라닌 생성 저해활성을 평가하여 화장품으로서의 활용성에 관련된 연구를 시도하고자 한다.

참 고 문 헌

- O. Ukkola and M. Santanielmi, Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities, *J. Intern. Med.*, **251**, 467 (2002).
- L. Wu and Z. Y. Zhan, Probing the function of the Asp128 in the low molecular weight protein tyrosine phosphatase catalyzed reaction A presteady state and steady state kinetic investigation, *Biochemistry*, **35**, 5426 (1996).
- H. S. Raper, The anaerobic oxidases, *Physiol. Rev.*, **8**, 245 (1928).
- D. Lu, Agouti protein is an antagonist of the melanocyte stimulating hormone receptor, *Nature*, **371**, 799 (1994).
- G. Prota and R. H. Thompson, Melanin pigmentation in mammals, *Endeavor.*, **35**, 2 (1976).
- S. W. Jung, D. S. Han, S. J. Kim, and M. J. Chun, Fermentation of tyrosinase inhibitor in mushroom media, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 227 (1996).
- A. B. Lerner and T. B. Fitzpatrick, Biochemistry of melanin formation, *Physiol. Rev.*, **30**, 19 (1950).
- Y. Ishihara, M. Oka, M. Tsunakawa, K. Tomota, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konish, and T. Oki, Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, *J. Antibiot.*, **44**, 25 (1991).
- S. Takamatsu, M. C. Rho, M. Hayashi, K. Komiyama, H. Tanaka, and S. Omura, New inhibitors of melanogenesis, OH-3984 K1 and K2, II, physico-chemical properties and structural elucidation, *J. Antibiot.*, **46**, 1526 (1993).
- S. H. Lee, S. Y. Kim, J. J. Km, T. S. Jang, and S. R. Chung, The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **30**(4), 397 (1999).

11. S. Akiu, Y. Suzuki, T. Asahara, Y. Fujinuma, and M. Fukuda, Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis, *Jpn. J. Dermatol.*, **101**, 609 (1991).
12. J. S. Chen, C. Wei, and M. R. Marshall, Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1897 (1991).
13. K. N. Tomita, N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki, A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *J. Antibiotics*, **12**, 1601 (1990).
14. L. Hu, J. Li, D. Hong, and Q. Ye, Triterpenes type protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors and the preparation method and the use, China Patent, WO 2006/0609499 A1 (2006).
15. M. Akamatsu, Current state and perspectives of 3D-QSAR, *Curr. Topics Med. Chem.*, **2**, 1381 (2002).
16. R. D. III, Cramer, D. E. Patterson, and J. E. Bunce, Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5959 (1988).
17. H. Lihong, Drug discovery based on traditional Chinese medicine, Proceedings of international symposium on development of Chinese cosmetic technology, *Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31**, 3 (2005).
18. R. Kerr, Parallel helix bundles and ion channels: molecular modeling via simulated annealing and restrained molecular dynamics, *Biophys. J.*, **67**, 1501 (1994).
19. N. D. Sung, T. Y. Yoon, J. H. Song, and H. S. Jung, Three dimensional quantitative structure-activity relationship on the fungicidal activities of new novel 2-alkoxyphenyl-3-phenylthioisoidoline-1-one derivative using the comparative molecular field analyses (CoMFA) methodology based on the different alignment approach, *Korean Soc. Appl. Bio. Chem.*, **48**, 82 (2005).
20. R. D. Cramer, J. D. Bunce, and D. E. Patterson, Cross-validation, bootstrapping, and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **7**, 18 (1988).
21. G. E. Kellogg, S. F. Semus, and D. J. Abraham, HINT: A new method of empirical hydrophobic field calculation for CoMFA, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **5**, 545 (1991).
22. C. K. Kim, K. A. Lee, H. Zhang, H. Cho, and B. S. Lee, Docking studies on formylchromone derivatives as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) inhibitors, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 1141 (2007).