

N-Linked Glycosylation 저해에 의한 닭의장풀 추출물의 미백효능

박 선 희 · 이 방 용 · 이 승 현 · 한 창 성 · 김 진 국 · 김 경 태 · 김 기 호 · 김 영 희[†]

(주)바이오랜드 생명공학연구소

(2009년 3월 2일 접수, 2009년 3월 10일 수정, 2009년 3월 15일 채택)

Whitening Effect of Dayflower (*Commelina communis* L.) Extract by Inhibition of N-Linked Glycosylation Process and Melanogenesis

Sun Hee Park, Bang Yong Lee, Seung Hyun Lee, Chang Sung Han, Jin Guk Kim, Kyoung Tae Kim, Ki Ho Kim, and Young Heui Kim[†]

R&D center, Bioland Ltd., 39-4, Songjung-ri, Byongchon-myon, Chonan-si, Chungnam 330-860, Korea

(Received March 2, 2009; Revised March 10, 2009; Accepted March 15, 2009)

요약 닭의장풀(*Commelina communis* L., Dayflower) 추출물의 미백효능을 확인하기 위하여 B16 melanoma 세포를 이용하여 melanin 생성에 관련된 다양한 실험을 실시하였다. 닭의장풀 추출물은 버섯 tyrosinase 활성 실험에서 저해 효과를 보이지 않았으나, melanin 생성 저해효과를 나타내었다. B16-F10 멜라노마 세포를 이용한 활성시험 결과에서, 닭의장풀 추출물은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 32 %의 멜라닌 생성을 억제하였으며, 세포내 티로시나제 활성 억제 능도 우수하여 닭의장풀 추출물 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 50 % 이상의 저해 효과를 보였다. 추출물의 melanin 생성 기작에 대한 영향을 조사한 결과, melanin 합성의 key protein인 tyrosinase 발현의 우수한 저해 능력을 보였고, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)의 발현 억제와 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 N-glycosylation 억제를 통해 melanin 합성이 억제되는 것으로 분석되었다. 따라서 닭의장풀 추출물은 melanin 합성에 필수적인 효소(tyrosinase, TRP-1)의 발현 저해 및 TRP-2의 N-glycosylation 억제를 통해 미백 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며, 이에 따라 본 추출물은 melanin 합성의 효소 경로를 저해하는 미백 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: In order to investigate the potential of a Dayflower (*Commelina communis* L.) extract as an active ingredient for whitening cosmetics, we prepared aqueous *Commelina communis* L. extract. We measured its mushroom tyrosinase inhibitory activity, cellular tyrosinase activity, and melanin synthesis inhibitory activity in B16 melanoma cells. It did not show inhibitory activity against mushroom tyrosinase but showed melanin synthesis inhibitory activity. In a melanin synthesis inhibition assay using mouse B16-F10 melanoma cell, it suppressed melanin production up to 32 % at a concentration of 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ without cytotoxicity, and also reduced cellular tyrosinase activity to above 50 % above the concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In study on the melanogenic protein expressions, it had especially influence on expression of tyrosinase protein, which is a well-known key protein on melanogenesis, and tyrosinase expression was gradually decreased in a dose-dependent. Dayflower also blocked N-glycosylation of TRP-2, but affected on the expression of TRP-1 rather than on blocking of N-glycosylation processing. Therefore, this result suggests that aqueous *Commelina communis* L. extract could be used as an active ingredient for whitening cosmetics.

Keywords: *Commelina communis*, B16-F10 melanoma, anti-pigmentation, tyrosinase, N-glycosylation

1. 서 론

피부 속에 존재하는 melanin 함량에 의해 피부색이 결

정되게 되며, 표피에 존재하는 melanin은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 melanin이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 melanin이 피부에 침착되게 된다. 이러한 색소 침착은 기미, 주근깨 등과 같은 다

[†] 주 저자 (e-mail: yhkim1st@biolandkorea.com)

양한 색소 침착을 유발한다[1,2]. Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 melanosome에서 생합성되며, melanocyte의 수지상 돌기를 통하여 주위의 표피세포로 전달되고, 피부 각질층으로 옮겨진다[3]. Melanosome 내의 melanin 생성 과정은 melanin 생성의 주요 단백질인 tyrosinase에 의해 tyrosine이 도파, 도파퀴논으로 산화됨으로써 시작되고, 이들은 tyrosinase 관련효소(tyrosinase related protein-1, TRP-1)와 도파크롬 토모라제(DOPAchrome tautomerase, DCT, TRP-2)의 효소작용 및 자동 산화 반응에 의해 도파크롬(DOPAchrome), 인돌카르복실산(indole carboxylic acid), 인돌퀴논(indole quinone) 등으로 대사되어 melanin이 합성된다[4]. Melanin은 흑갈색의 eumelanin과 적노랑색의 pheomelanin이 있으며, melanin 합성 효소 중 tyrosinase는 두 가지 melanin 합성에 필요하고 TRP-1과 TRP-2는 eumelanin 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 미백 물질의 탐색 방법으로 기존의 tyrosinase 활성을 억제하는 물질 연구뿐만 아니라 melanin 생성 기전에 관련된 단백질 발현을 조절하는 물질, melanosome 이동을 억제하는 물질, α -melanocyte 자극 호르몬(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 길항제, N-glycosylation 억제와 같은 melanogenesis 기전을 방해하여 미백 효과를 나타내는 물질 연구도 많은 진행이 되고 있다[5-8].

단백질은 활성 기능을 보유하기 위하여 한 가지 혹은 그 이상의 다양한 조절 경로를 이용하고 있다. 이러한 조절 경로에는 단백질의 특정 위치에서 절단(cleavage), 삭제(deletion), 첨가(addition), 곁사슬(side chain)의 전환(conversion) 또는 변형(modification) 등 다양한 방법이 있고, 이 중에서 glycosylation은 아스파라긴(asparagine), 하이드로리신(hydrolysine), 세린(serine), 트레오닌(threonine)에 당기(glycosyl group)를 부가시켜 당단백질을 형성하는 변형과정으로 막단백질, 분비단백질 등에서 주로 발생하며 enzyme-directed site specific 과정이다. N-Glycosylation는 단백질 발현과 동시에 소포체 막에 존재하는 돌리콜(dolichol)의 14-당 전구체(Glc3 Man9 GlcNAc2)가 Asn-X-Ser/Thr 단백질 서열의 아스파라긴으로 옮겨지면서 시작된다. 이후 효소 활성 과정은 소포체에서 14-당 전구체 말단의 α -1,2-linked glucose를 제거하는 α -glucosidase I에 의해 개시되고, 이어서 α -glucosidase II에 의해 남겨진 2개의 포도당이 제거된다[9,10]. 탈당화 N-glycan (deglycosylated N-glycan)은 소포체(endoplasmic reticulum, ER)에서 ER α

-mannosidase I에 의해 1개의 mannose가 제거되고 골지로 옮겨져 골지 mannosidase I과 II에 의해 말단의 mannose가 제거되므로 포도당과 mannose trimming 과정은 종결되며[9], 이후 N-acetylglucosamine transferase, glucose transferase, N-acetylneuraminic acid (NANA) transferase에 의해 완전한 당단백질이 형성된다. N-Glycosylation의 glucose trimming 과정은 DNJ, N-butyl-deoxyjirimycin (NB-DNJ)과 같은 α -glucosidase 저해제에 의해 억제되며[11], 이로 인해 단백질 구조는 변형되고 불활성 형태로 melanosome으로 이동하게 되어 melanogenesis가 억제된다[12]. 또한 소포체의 mannosidase와 골지체의 mannosidase 효소 활성에 의한 mannose trimming 과정은 α -1,2-mannosidase 저해제인 DNJ에 의해 억제된다[13-15].

닭의장풀(*Commelina communis* L.)은 옛날부터 닭장 주변에서 잘 자란다고 하여 붙여진 이름으로 닭의밀싹개, 달개비, 압척초라고도 불린다. 높이 20 ~ 90 cm 되는 한해살이풀이다. 예부터 전초를 열내림약, 오줌내기약, 염증약으로 민가에서 사용되고 있으며[16], 민간요법으로 당뇨증에도 사용되어왔으며, 최근에는 장내 당분해 소화 효소인 α -glucosidase를 억제하여 혈액 내 포도당 농도를 저하시키는 혈당 강하 효과를 나타낸다고 보고된바 있다[15,17]. 본 연구에서는 닭의장풀 추출물을 화장품의 새로운 미백소재로 이용하고자 *in vitro* tyrosinase 효소 실험 및 세포수준에서 melanin 생성과 관련된 실험을 하였으며, 닭의장풀 추출물이 melanogenesis 기전과 관련하여 미백관련 효소(tyrosinase, TRPs)의 발현 억제와 N-glycosylation 억제 효과에 의해 미백 효과가 있음을 확인하고 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시약

Mouse B16-F10 melanoma (CRL-6475)는 America type culture collect (ATCC, USA)로부터 구입하였으며, 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Invitrogen (USA), Sigma (USA), Nunc (USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정은 Tecan (Austria)의 Infinity M200 microplate reader를 사용하여 측정하였다. Western blot을 위해 Bio-rad (USA)의 Western blot kit 및 semi-dry transfer system을 사용하였고 image analysis system (Bio-rad, USA)으로 결과를 확인하였다. 항체는 Santa Cruz Biotech (USA)에서 구입하였다. 닭의장풀은 경동

시장에서 구입하였으며, 음건하여 세절하여 사용하였다.

2.2. 닭의 장풀 추출물의 제조

음건 후 세절한 닭의장풀 1 kg에 정제수 20 kg의 정제수를 첨가하여 100 °C에서 4 h 동안 가열 추출한 후 250 mesh와 whatman 여과지로 여과하였다. 여과액을 양이온 교환수지를 통과하고 얻어진 용액을 활성탄 처리 후 감압 농축하여 갈색의 닭의장풀 추출액 43 g (고형분 대비 수율 약 2.1 %)을 수득하였다.

2.3. Mouse B16-F10 Melanoma에서 Melanin 합성 억제 효과 측정

Melanin 생성량과 세포 생존율을 동시에 측정하였으며, 모든 농도는 3배수로 준비하였다. Mouse B16-F10 melanoma를 10 % 우태아 혈청(FBS)과 1 % 항생제를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 1×10^5 세포 밀도로 6 well 세포 배양판에 접종하고 5 %, CO₂, 37 °C에서 1일 동안 배양하였다. 새로운 DMEM으로 교환하고 닭의장풀 추출물을 처리하여 3일 동안 배양한 후 melanin 생성량 측정 및 세포 생존율을 측정하였다. Melanin 측정은 세포를 PBS로 세척하고 1 N NaOH를 처리하여 세포를 파괴한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 세포에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액(2.5 mg/mL in PBS)을 처리하여 5 %, CO₂, 37 °C에서 4 h 동안 배양한 후 DMSO로 생성된 포르마잔 유도체를 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Mouse B16-F10 Melanoma에서 Tyrosinase 활성 억제 효과 측정

Mouse B16-F10 melanoma를 10 % FBS와 1 % 항생제를 첨가한 DMEM에 5×10^5 세포 밀도로 100 mm 디쉬에 접종하고 5 %, CO₂, 37 °C에서 1일 동안 배양하였다. 새로운 배지로 교환한 후 닭의장풀 추출물을 농도별로 처리하여 3일 동안 배양하였으며 모든 농도는 3배수로 준비하였다. 3일 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하여 1.5 mL microtube로 옮기고 세포 파쇄 버퍼(0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 1 % Triton X-100, 1 mM phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 초음파 세포 파쇄기로 세포를 파괴하였다. 4 °C에서 15,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리하고 상층액을 수거하여 1.5 mM

L-tyrosine과 반응시킨 후 생성된 melanin을 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 단백질 발현 조사(Western Blot)

Mouse B16-F10 melanoma를 10 % FBS와 1 % 항생제를 첨가한 DMEM에 5×10^5 세포 밀도로 100 mm dish에 접종하고 5 %, CO₂, 37 °C에서 1일 동안 배양하였다. 그 후 새로운 배지로 교환하고 닭의장풀 추출물을 농도별로 처리하여 3일 동안 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 세척하여 1.5 mL microtube로 옮기고 세포 파쇄 버퍼(40 mM Tris-Cl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 세포를 파괴한 후 4 °C에서 15,000 rpm으로 10 min 동안 원심 분리하고 상층액을 회수하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 Sigma의 BCA 방법에 따라 정량한 후 SDS-PAGE를 진행하였다. SDS-PAGE 겔을 PVDF막으로 옮긴 후 일차 항체와 퍼옥시다제가 결합된 2차 항체를 이용하여 단백질을 표지하고 Western blot detection kit (Intron, Korea)를 사용하여 X-ray 필름에 감광한 후 단백질 발현 정도를 분석하였다.

2.6. N-Glycosylation 억제 효과 측정

Mouse B16-F10 melanoma를 10 % FBS와 1 % 항생제를 첨가한 DMEM에 1×10^6 세포 밀도로 100 mm 디쉬에 접종하고 5 % CO₂, 37 °C에서 1일 동안 배양한 후 새로운 배지로 교환하고 시료를 농도별로 처리하여 1일 동안 배양하였다. Western blot 실험의 단백질 분리법과 같은 방법으로 단백질을 분리하고 정량한 후 50 µg의 단백질을 endoglycosidase H (Endo H) kit (New England BioLabs, USA)을 사용하여 함께 제공되는 메뉴얼 방법대로 Endo H assay를 수행하였다. 50 µg의 단백질을 denaturing buffer와 섞어 100 °C에서 10 min 동안 반응 후 Endo H 효소와 반응 버퍼를 첨가하여 37 °C에서 1 h 동안 반응시켰다. 반응물은 Western blot을 수행하여 fully-glycosylated protein과 naked protein을 image analysis system으로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Melanin 생성 저해 효과 및 세포 독성

In vitro 버섯 tyrosinase 억제 효능 평가실험결과, 닭의장풀 추출물은 버섯 tyrosinase에 대한 억제능을 나타내

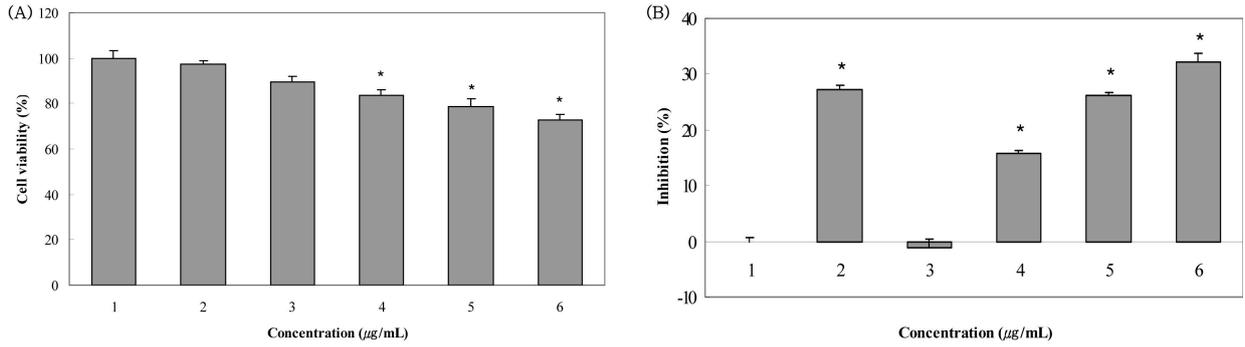


Figure 1. Effect of *Commelina communis* L. extract on (A) cell viability and (B) inhibitory effect of melanin formation in mouse B16-F10 melanoma. The data were expressed as mean ± S.D. of three independent experiments (* $p < 0.005$), 1: Control, 2: Arbutin 250 µg/mL, 3 ~ 6: *Commelina communis* L. extract (3: 100 µg/mL, 4: 250 µg/mL, 5: 500 µg/mL, 6: 1,000 µg/mL).

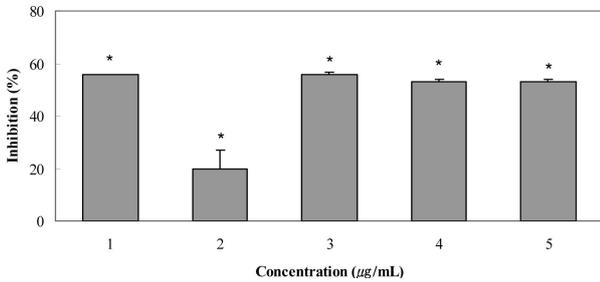


Figure 2. Inhibitory effect of *Commelina communis* L. extract on tyrosinase activity in mouse B16-F10 melanoma. The results were expressed as the mean ± S.D. (* $p < 0.05$), 1: Arbutin 250 µg/mL, 2 ~ 6: *Commelina communis* L. extract (2: 100 µg/mL, 3: 250 µg/mL, 4: 500 µg/mL, 5: 1,000 µg/mL).

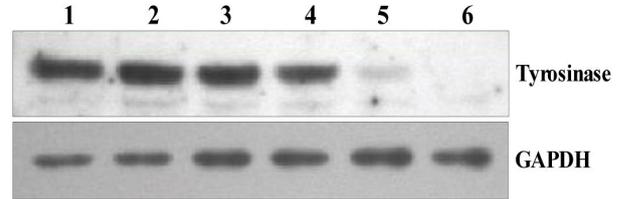


Figure 3. Effects of *Commelina communis* L. extract on tyrosinase expression in mouse B16-F10 melanoma using Western blot assay. 1: Vehicle control, 2 ~ 6: *Commelina communis* L. extract (2: 25 µg/mL, 3: 50 µg/mL, 4: 100 µg/mL, 5: 250 µg/mL, 6: 500 µg/mL).

지 않았다(데이터 미기재). 그러나 닭의장풀 추출물 mouse B16-F10 melanoma 세포에 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양한 후 세포 내 melanin 생성 저해 효과를 분석한 실험에서, 닭의장풀은 mouse B16-F10 melanoma에서 농도가 증가함에 따라 10 ~ 30 %의 세포 증식을 억제할 뿐만 아니라, melanin 생성 또한 감소시켰으며, 1,000 µg/mL에서는 melanin 생성을 약 32 % 억제하는 효과를 보였다(Figure 1).

3.2. Tyrosinase 활성 저해 효과

Tyrosinase는 melanogenesis의 주요 단백질로서 피부 색소 조절 과정 연구에 중요한 지표로 여겨지며, L-tyrosine으로부터 도파민(DOPA)의 전환과정에 관여하고 eumelanin의 중간 대사산물인 DHI를 indole-5,6-quinone으로 전환시키는 과정에 관여하는 단백질이다[18].

Tyrosinase의 활성을 검증하기 위해 닭의장풀 추출물을 mouse B16-F10 melanoma에 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양한 후 단백질을 분리하여 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정하는 결과, 닭의장풀 추출물은 250 µg/mL 이상의 농도에서 약 50 % 이상의 tyrosinase 활성 억제 효과를 보였다(Figure 2). 이는 닭의장풀 추출물이 세포 내 tyrosinase 활성을 저해하거나 발현을 감소시킴으로써 결과적으로 melanin 합성 저해 효과가 있음을 의미한다.

3.3. Melanin 합성 관련 단백질 발현 및 N-Glycosylation 저해 효과

Mouse B16-F10 melanoma에서 닭의장풀 추출물이 melanin 합성 과정에 관여하는 단백질 발현에 미치는 영향을 Western blot을 통해 분석하였다. 그 결과, tyrosinase 발현을 농도의존적으로 저해하는 양상을 보였으며, 그 발현 저해율도 매우 우수한 것으로 나타났다(Figure 3).

닭의장풀 추출물의 N-glycosylation 저해 효과를 측정

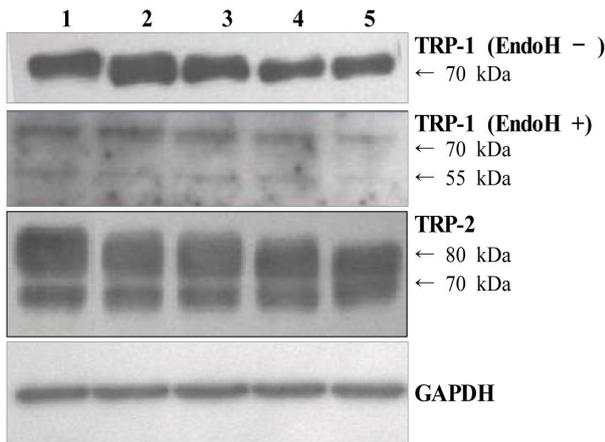


Figure 4. Effect of *Commelina communis* L. extract on *N*-glycosylation processing of TRP-1 and 2 using endoglycosidase H assay and Western blot assay. 1: Vehicle (control), 2 ~ 5; *Commelina communis* L. extract (2: 25 µg/mL, 3: 50 µg/mL, 4: 100 µg/mL, 5: 250 µg/mL), TRP-1 70 kDa (fully *N*-glycosylated TRP-1) TRP-1 55 kDa (naked TRP-1); TRP-2 80 kDa (EndoH resistant), TRP-2 70 kDa (EndoH sensitive).

한 결과, TRP-1 단백질은 Endo H 효소 작용에 의해 검출된 70 kDa와 55 kDa 위치의 단백질 양상을 보면, 모두 농도 의존적으로 감소하는 것을 나타냈으며, Endo H 효소를 처리하지 않은 TRP-1 역시 단백질 양이 감소하는 것으로 나타나며 닭의장풀 추출물에 의해 TRP-1의 *N*-glycosylation 저해보다는 발현이 저해되는 것으로 판단된다(Figure 4). TRP-2는 fully *N*-glycosylated TRP-2 (80 kDa) 단백질이 대조군과 비교하여 감소되는 것으로 나타나 TRP-2는 *N*-glycosylation이 저해되는 것으로 나타났다.

따라서, 닭의장풀 추출물은 tyrosinase, TRP-1의 발현 억제와 TRP-2의 *N*-glycosylation 저해를 통해 melanin 생성을 저해하는 것으로 판단된다.

4. 결 론

닭의장풀 추출물은 mouse B16-F10 melanoma의 melanin 합성 및 세포 내 tyrosinase 활성에서 높은 억제 효과가 나타나 우수한 미백 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 이러한 미백 효과는 melanin 생합성 효소 경로에 필요한 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현 억제 또는 *N*-glycosylation 과정 저해로 인하여 melanin 합성이 저해되는 것으로 확인되었으며, 이는 닭의장풀 추

출물이 L-tyrosine의 산화 과정인 melanin 합성 효소 경로에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 결핍 및 기능 상실로 인해 melanin 합성이 저해됨을 의미한다.

닭의장풀 추출물은 당단백질의 *N*-glycan 합성에 필요한 효소(α -glucosidase, α -mannosidase)의 활성을 저해하여 *N*-glycosylation을 억제하는 것으로 알려져 있으며, melanin 합성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 역시 *N*-당단백질로 *N*-glycan 형성이 저해되면 melanin 합성 과정에서 각각의 단백질 활성이 억제되는 것으로 보고되었다[8,12,19,20]. Tyrosinase의 *N*-glycosylation 저해 효과는 닭의장풀 추출물에 의한 tyrosinase 발현 억제 효과가 매우 우수하여 *N*-glycosylation 저해 효과는 확인될 수 없을 것으로 판단된다. 닭의장풀 추출물은 TRP-2의 *N*-glycosylation 과정을 방해하는 것으로 확인되어, *N*-glycosylation 과정의 α -glucosidase 저해제로 작용하여 미백 작용을 하는 것으로 추측된다.

결론적으로 알부틴이 tyrosinase의 활성 저해로 인해 melanin 생성 저해 효과를 보이는 것과 달리, 닭의장풀 추출물은 melanin 합성과 관련된 효소 경로에 필요한 단백질의 발현과 *N*-glycosylation 과정 저해를 통한 단백질 효소 활성 상실로 인해 melanin 합성이 저해되는 것으로 판단된다. 따라서 닭의장풀의 melanin 합성 경로에 관여하는 효소를 저해함으로써, 새로운 미백소재로 화장품에 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2005년 보건복지가족부의 건강기능 제품개발 사업 “기능화장품 신소재 개발센터(과제번호 2005-A050432)”의 일환으로 이루어진 것으로, 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged sword?, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
2. B. W. Choi, B. H. Lee, K. J. Lee, E. S. Lee, and N. H. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**(3), 237 (1998).
3. M. Seiberg, L. Babiarz, and C. B. Lin, IL-41 the PAR-2 pathway is differentially expressed in skin

- of color, *Pigment Cell Res.*, **16**, 591 (2003).
4. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigment, *Int. J. Biochem.*, **19**, 1141 (1987).
 5. H. M. Aoki, Identification of a new microphthalmia (Mi)-interacting protein, rKr2, involved in the regulation of melanogenesis, *IFSCC* (1998).
 6. M. Seiberg, C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade Gordon, M. Costanzo, M. Eisinger, and S. S. Shapiro, The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interaction, *Experimental Cell Research*, **254**, 25 (2000).
 7. T. Motogawa, Inhibition of α -MSH induced melanogenesis by *Sophorae radix* extracts, *Fragrance J.*, **9**, 38 (2000).
 8. G. Negroiu, N. Branza-Nichita, A. J. Petrescu, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu, Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells, *Biochem. J.*, **344**, 659 (1999).
 9. R. Kornfeld and S. Kornfeld, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 631 (1985).
 10. B. Winchester and G. W. Fleet, Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists, *Glycobiology.*, **2**, 199 (1992).
 11. S. M. Petrescu, A. J. Petrescu, H. N. Titu, R. A. Dwek, and F. M. Platt, Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome, *J. Biol. Chem.*, **272**, 15796 (1972).
 12. Y. Wang and M. J. Androlewicz, Oligosaccharide trimming plays a role in the endoplasmic reticulum-associated degradation of tyrosinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 22 (2000).
 13. S. Svedine, T. Wang, R. Halaban, and D. N. Hebert, Carbohydrates act as sorting determinants in ER-associated degradation of tyrosinase, *J. Cell Sci.*, **117**, 2937 (2004).
 14. C. I. Popescu, C. Paduraru, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu, Soluble tyrosinase is an endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation substrate retained in the ER by calreticulin and BiP/GRP78 and not calnexin, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13833 (2005).
 15. G. P. Wang, M. Y. Deng, G. X. Zhou, M. Y. Huang, W. C. Ye, and C. L. Ye, Detection for α -glucosidase-inhibiting polyhydroxyalkaloid ingredients of *Commelina communis* L. by ESIMS, *Zhong Yao Cai.*, **30**(2), 157 (2007).
 16. K. S. Moon, Composition and use of a medical plants, *Ilwolseogak*, 786 (1999).
 17. J. Youn, H. Park, and K. Cho, Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of α -glucosidase, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **66**, 149 (2003).
 18. R. Han, H. P. Baden, J. L. Brissette, and L. Weiner, Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay, *Pigment Cell Res.*, **15**, 290 (2002).
 19. G. Negroiu, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu, The inhibition of early N-glycan processing targets TRP-2 to degradation in B16 melanoma cells, *J. Biol. Chem.*, **278**(29), 27035 (2003).
 20. H. J. Choi, S. M. Ahn, H. K. Chang, N. S. Cho, K. Joo, B. G. Lee, I. S. Chang, and J. S. Hwang, Influence of N-glycan processing disruption on tyrosinase and melanin synthesis in HM3KO melanoma cells, *Exp. Dermatol.*, **16**(2), 110 (2007).