

Phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) 유도체의 Tyrosinase 저해활성에 관한 HQSAR 분석

김 상 진* · 김 영 옥** · 조 윤 기*** · 최 원 석 · 성 낙 도[†]

충남대학교 응용생물화학과, *대전보건대학 화장품과학과, **케모리랩 연구소, ***스카이솔루션(주) 연구소
(2010년 8월 22일 접수, 2010년 9월 2일 수정, 2010년 9월 10일 채택)

HQSAR Analyses on the Tyrosinase Inhibitory Activity of Phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) Analogues

Sang-Jin Kim*, Young-Ok Kim**, Yoon-Ki Cho***, Won-Seok Choi, and Nack-Do Sung[†]

Department of Applied Biology and Chemistry, Chungnam National University,
79 Daehangno, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Sciences College

**Chemolee Lab Corporation R&D Center

***Sky Solution Inc. R&D Center

(Received August 22, 2010; Revised September 2, 2010; Accepted September 10, 2010)

요 약: 기질 화합물로서 일련의 phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) 유도체(**1-22**)들의 치환기(R_1 및 R_2)가 변화함에 따른 tyrosinase 활성저해에 대한 분자 홀로그래피적인 정량적 구조-활성관계(HQSAR) 모델을 유도하였다. 그리고 tyrosinase 저해활성에 미치는 구조상 요소들의 분석결과에 근거하여 높은 tyrosinase 저해활성을 보이는 새로운 tyrosinase 저해활성 분자를 설계하였다. 또한, 통계적으로 양호한 E-2 모델(상관성: $r^2 = 0.929$ 및 예측성: $q^2 = 0.564$)을 유도하였으며 설계된 화합물, **P1** ($Pred.p_{50} = 5.48$)는 기준물질로 사용된 kojic acid에 비하여 약 13.4배 높은 저해활성을 나타낼 것으로 예측되었다.

Abstract: The structure-activity relationships (SARs) between a series of phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) analogues (**1-22**) as substrate molecules and their inhibitory activity against tyrosinase were studied quantitatively using molecular hologram quantitative structure-activity relationships (HQSARs). Based on the results, new compounds with the increased tyrosinase inhibitory activity were designed. In addition, statistically favored E-2 model ($q^2 = 0.564$ & $r^2 = 0.929$) was derived. It is predicted that the activity of the most potent one (**P1**) of compounds newly designed by the optimized HQSAR E-2 model was $Pred.p_{50} = 5.48$ and the predicted inhibitory activity was about 13.4 fold higher than that of the kojic acid used as standard compound.

Keywords: phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) analogues, tyrosinase inhibitor, HQSAR analysis

1. 서 론

Tyrosinase는 동식물에 널리 퍼져있으며 monophenol oxidase, diphenol oxidase, polyphenol oxidase, catechol oxidase, phenolase로 언급되기도 한다. Tyrosinase는 활

성부위에 2개의 구리원자를 함유하고 있는 금속단백질로 mono-hydroxyphenol을 dihydroxyphenol으로 그리고 다시 quinone으로 산화시키는 촉매작용을 한다[1]. 그 결과로 생성된 dopachrome이나 indolequinone 등이 폴리머를 형성하여 갈색, 흑갈색 또는 흑색의 멜라닌을 형성하는데[2], 식물에서는 갈변을 일으켜 채소나 과일의

[†] 주 저자 (e-mail: ndsung15@hanmail.net)

품질을 저하시키기도 하지만 커피나 차 등에서는 품질을 더욱 향상시키기도 한다[3]. 그러나 동물에서는 멜라닌 색소의 생성을 촉진하여 모발, 눈동자, 상처부위를 검게 만들어 인체를 보호하거나 아름답게 보이게 하기도 하고 자외선으로부터 피부를 보호하기도 하지만 피부를 칙칙하고 탁하게 보이게도 하여 기피의 대상이 되기도 한다[4]. 따라서 tyrosinase의 활성저해에 대한 연구는 다양한 분야에서 주요한 연구의 주제가 되고 있다.

Tyrosinase의 활성저해 방법으로는 활성부위에 존재하는 활성형 Cu(II)원자를 비활성형 Cu(I)로 환원시키는 방법과 비활성형 Cu(I)가 다시 활성형 Cu(II)로 산화되는 것을 막아주는 방법[5], 구리와 킬레이트(chelate)를 형성하여 tyrosine과 반응하는 것을 막아주는 비경쟁적 저해 및 tyrosine과 구조가 비슷한 물질을 활성부위에 넣어주는 경쟁적 저해방법 등이 있다[6]. tyrosinase 저해제로 오랫동안 사용되어왔던 kojic acid는 tyrosinase의 반응점 중 구리원자와 킬레이트를 생성하는 가장 대표적인 비경쟁적 저해제이며, 화장품의 안정성을 향상시키기 위하여 사용되는 EDTA 등이 때로는 비경쟁적 저해제의 역할을 하기도 한다[7]. 한편, 경쟁적 저해제의 대표적 물질인 arbutin 등은 화합물의 형태가 tyrosine과 매우 유사하여 효소의 기질 특이성에 잘 일치하고 있다[8]. 이런 이유로 인하여 최근 들어 tyrosinase의 활성부위 형태에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며 더 나아가 활성부위에 화합물을 docking시켜 최적의 저해제를 탐색하는 연구가 시작되고 있다[9]. 그러므로 저해제로 예측되는 화합물의 skeleton과 moiety가 어떠한 구조를 구비하여야 우수한 저해작용을 나타낼 수 있는지를 미리 알아내는 활성분자의 예측과 설계는 활성저해제의 탐색과 개발에 소요되는 시간과 경비를 크게 절약하는 주요한 대안이다.

근래, 저자들은 Oleanolic acid 유도체의 Protein Tyrosin Phosphatase-1B에 대한 2D-QSAR 및 HQSAR 분석과 CoMFA분석, 일련의 기질분자로서 Alkyl-3,4-dihydroxybenzoate와 N-Alkyl-3,4-dihydroxybenzamide 유도체의 피부감작성과 독성에 대한 HQSTR 및 HQSAR 분석결과 등을 보고한 바 있다[10-13]. 본 연구에서는 phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) 유도체 (**1-22**)의 tyrosinase 저해활성을 검토하기 위하여 치환기(R_1 - R_2)가 변화함에 따른 tyrosinase 저해활성에 대한 분자 홀로그래피적인 정량적 구조-활성관계(HQSAR)에 관한[14] 회귀분석 모델을 유도하여 tyrosinase 저해활성에 미치는 구조상 요소들을 분석하고 새로운 유력한

tyrosinase 저해활성 분자를 설계하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. HQSAR 모델의 유도

기질분자로서 phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) 유도체 (**1-22**)들의 tyrosinase에 대한 저해활성은 문헌값[15]을 이용하였다. 그리고 저해활성값(IC_{50} ; μM)에 역의 대수(-log)를 취하여 관측된 저해활성값($Obs.pI_{50}$)으로 환산하였으며, 대조물질로는 kojic acid가 사용되었다. HQSAR의 실행 및 PLS (partial least square) 분석은 Sybyl (Ver. 8.1.1) 프로그램(Tripes Inc.)을 사용하였다[16]. 통계적으로 상관성이 큰 최적모델을 얻는 것이 선결과제이므로 저해활성값과 분자조각 크기 및 특징사이의 관계로부터 상관성에서 벗어나는 화합물들(test set = 6)을 제외하고 training set ($n = 16$) 화합물들을 대상으로 HQSAR 모델을 유도하였다. 적절한 HQSAR 모델들을 유도하기 위하여 홀로그램 길이를 53 ~ 500 bin으로, 분자 조각의 수를 2 ~ 10으로 넓게 선택한 후, 다양한 분자조각 특징(atoms, bonds, chirality 및 connections)들을 조합하여 최적화된 HQSAR[14] 모델을 유도하였다. 모델의 통계값으로 r 은 상관계수, r^2 는 유의성, q^2 는 예측성, F 는 상관율이며 s 는 표준편차를 각각 나타낸다.

2.2. 부분최소자승(PLS) 계산

HQSAR 모델을 유도하기 위한 PLS 계산[18]은 기질 분자의 조각 수와 분자의 홀로그램 길이를 선택하여 실시하였다[14]. HQSAR 모델의 예측성(q^2)은 LOO (leave-one-out) 교차확인 과정에 의하여 결정하며 적절한 주성분의 수를 사용하여 교차확인하지 않고 유도되는 모델에 대한 최종 PLS 분석을 실행하여 예측성 값을 얻는다. 예측성 값이 q^2 값(r^2_{cv}) = 0.50 이상이고 상관성이 r^2_{ncv} = 0.90 이상일 경우를 최적화된 모델로 간주하며 교차확인 결과로 얻어지는 squared prediction error의 PRESS (predictive residual sum of squares) 값이 작을수록 양호하다고 판단한다[19]. 최적화된 HQSAR 모델이 가지고 있는 분자구조와 저해활성에 관한 정보를 시각적으로 표현하여 저해활성에 대한 해당 골격의 기여 정도에 따라 색깔로 나타낸다. 즉, 녹색(green)으로 표시된 부분은 가장 큰 활성을 나타내는 부위이며, 청록색(cyan)은 그 다음으로 높은 활성을, 노란색(yellow)은 보통보다 약간 높은 활성을, 그리고 회색(gray)은 보통 평균수준

을 또한, 붉은색(red)은 최저의 저해활성을 나타내는 부위임을 각각 의미한다. 활성이 가장 높은 화합물(15)의 구조식에 기여도를 나타내었으며 Favor : disfavor의 비율은 80 : 20 %이었다.

3. 결과 및 고찰

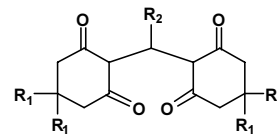
3.1. Tyrosinase 활성 저해값

기질분자인 phenyl-2,2'-methylenebis(cyclohexane-1,3-dione) 유도체들(1-22)의 치환기(R₁ 및 R₂)가 변화함에 따라 관측된 tyrosinase 활성저해값(*Obs.pI*₅₀)과 가장 양호한 통계값을 보인 HQSAR E-2 모델로 예측한 활성저해값(*Pred.pI*₅₀) 및 이들 두 값들의 차이(ΔpI_{50}), 그리고 기질분자들의 피부침투 및 이행에 영향을 미치는 소수성 상수(*ClogP*)를 함께 Table 1에 정리하였다. 기질분자 중에서 R₁ = H, R₂ = 2-OCH₃ph 치환체(6)가 가장 낮은 tyrosinase 저해활성(*Obs.pI*₅₀ = 4.24)을 나타낸 반면에, R₁ = CH₃, R₂ = 3-NH₂ph 치환체(15)가 가장 높은 tyrosinase 활성저해(*Obs.pI*₅₀ = 5.27)를 나타내었으며 활성저해값의 차이는 $\Delta Obs.pI_{50} = 1.03$ 이었다. 관측한 tyrosinase 활성저해값(*Obs.pI*₅₀)과 최적화된 HQSAR E-2 모델로 예측한 활성저해값(*Pred.pI*₅₀)과의 상관관계는 Figure 1에서와 같은 비례관계식($Pred.pI_{50} = 0.927Obs.pI_{50} + 0.349$, $n = 16$, $s = 0.084$, $F = 186.515$, $r^2 = 0.930$ 및 $q^2 = 0.917$)으로부터 유의성이 $r^2 > 0.90$ 이고 예측성이 $q^2 > 0.50$ 을 나타내어 관측값과 예측값의 상관성이 매우 양호함을 잘 설명하고 있다.

3.2. 소수성과 저해활성

유기화합물의 소수성은 생체 내 침투이행에 제일 중요한 영향을 미치는 자유 에너지의 척도로서 분배계수의 크기로 규정되며 분자간 수소결합, 이온화 정도 및 분자의 크기와 밀접한 관련성을 가진다[20, 21]. 기질 화합물들 중에서(Table 1) 계산된 소수성 상수값은 *ClogP* = -1.054 ~ 3.149 범위의 값이었으며, 소수성이 가장 큰 화합물(16; *ClogP* = 3.149)과 가장 작은 화합물(2; *ClogP* = -1.054) 사이의 차이는 $\Delta ClogP = 4.203$ 이었다. 예측된 화합물(Table 5) 중에서 *ClogP*값이 가장 큰 화합물(P4; *ClogP* = 1.857)과 가장 작은 화합물(P2; *ClogP* = -2.243) 사이의 차이는 $\Delta ClogP = 4.100$ 으로 화합물 사이의 소수성 차이가 큰 편이었다. 대체로 기질 유도체들보다 표준물질인 kojic acid나 l-mimosine의 극성이 더 큰 화합물이었다. 여기에서 화합물의 소수성값이 음의

Table 1. Hydrophobicity of Phenyl-2,2'-Methylenebis(Cyclohexane-1,3-Dione) Analogues and Their Observed Inhibitory Activity (*Obs.pI*₅₀) Against Tyrosinase and Predicted Inhibitory Activity (*Pred.pI*₅₀) by the Optimized HQSAR Models for Training Set



No	Substituents (R)		<i>ClogP</i>	<i>Obs.pI</i> ₅₀	HQSAR E-2	
	R ₁	R ₂			<i>Pred.pI</i> ₅₀	ΔpI_{50} ^{a)}
1	H	Ph	0.210	4.68	4.78	-0.10
2	H	3,4-(OH) ₂ ph	-1.054	4.45	4.46	-0.01
3	H	3-OCH ₃ , 4-OHph	-0.608	4.32	4.36	-0.04
4	H	2-OC ₂ H ₅ , 4-OHph	-0.079	4.50	4.45	0.05
5	H	4-OCH ₃ ph	0.129	4.85	4.90	-0.05
6	H	2-OCH ₃ ph	-0.271	4.24	4.21	0.03
7	H	4-NO ₂ ph	-0.047	4.87	4.93	-0.06
8	H	3-NO ₂ ph	-0.047	4.72	4.65	0.07
9	H	3-NH ₂ ph	-1.017	5.19	5.09	0.10
10	CH ₃	ph	-1.017	5.15	4.94	0.21
11	CH ₃	4-OHph	2.286	4.97	4.99	-0.02
12	CH ₃	4-OCH ₃ ph	2.205	5.03	5.06	-0.03
13	CH ₃	3-OCH ₃ ph	2.205	4.49	4.47	0.02
14	CH ₃	4-NH ₂ ph	1.059	4.98	5.08	-0.10
15	CH ₃	3-NH ₂ ph	1.059	5.27	5.24	0.03
16	CH ₃	3-Brph	3.149	4.55	4.67	-0.12
		kojic acid	-1.387	3.93	-	-
		l-mimosine	-3.178	4.73	-	-

^{a)} difference between observed activity and predicted activity.

값(*ClogP* < 0)을 나타낼 경우에는 극성이며 양의 값(*ClogP* > 0)을 나타낼 경우에는 비극성임을 시사한다. 그러나 사람피부에 대한 *in vitro* 실험결과, 최대흡수를 나타내는 최적의 소수성은 대략 *ClogP* = 2.0 부근으로, 이 값보다 크거나 작으면 피부에 흡수가 줄어든다고 알려져 있다[22]. 그러므로 설계된 화합물(P1-P4) 중에서 P4번 화합물이 *ClogP* = 2.0에 가까운 소수성을 나타내므로 양호한 tyrosinase 활성저해를 나타낼 것으로 예측된다.

3.3. 최적화된 HQSAR 모델

적정한 HQSAR 모델들을 유도하기 위하여 다양한 분자조각 크기(hologram)와 조각의 특징(atoms, bonds,

Table 2. HQSAR Analysis for the Influence of Various Fragment Sizes on the Key Statistical Parameters Using the Best Fragment Distinction (Atom, Bonds and Connections)

Model No.	Best length		PLS analyses				
	Fragment size	Hologram (bin)	r_{cv}^2 (q^2)	SE _{cv}	r_{ncv}^2	SE _{ncv}	NC
A	2 ~ 5	83	0.248	0.298	0.539	0.233	3
B	3 ~ 6	257	0.300	0.299	0.772	0.171	3
C	4 ~ 7	151	0.503	0.252	0.879	0.124	3
D	5 ~ 8	199	0.591	0.229	0.899	0.113	3
E ^{a)}	6 ~ 9	59	0.592	0.229	0.928	0.096	3
F	7 ~ 10	61	0.616	0.222	0.863	0.132	3

Notes: SE_{cv}., cross-validated standard error., SE_{ncv}., noncross-validated standard error, NC., number of component, ^{a)}The best of fragment size.

Table 3. HQSAR Analysis for Various Fragment Distinction on the Key Statistical Parameters Using Fragment Size Default (6-9)

Model No.	Best length		PLS analyses				
	Fragment distinctions	Hologram (bin)	r_{cv}^2 (q^2)	SE _{cv}	r_{ncv}^2	SE _{ncv}	NC
E-1	Atom/bond	59	0.558	0.238	0.886	0.121	3
E	Connectivity (Con)	59	0.592	0.229	0.928	0.096	3
E-2 ^{a)}	Hydrogen atom (H)	401	0.564	0.236	0.929	0.095	3
E-3	Con-H	401	0.496	0.254	0.876	0.126	3
E-4	Chirality	53	0.544	0.242	0.862	0.133	3

Notes: SE_{cv}., cross-validated standard error., SE_{ncv}., non-cross validated standard error, NC., number of component, ^{a)}The optimized model.

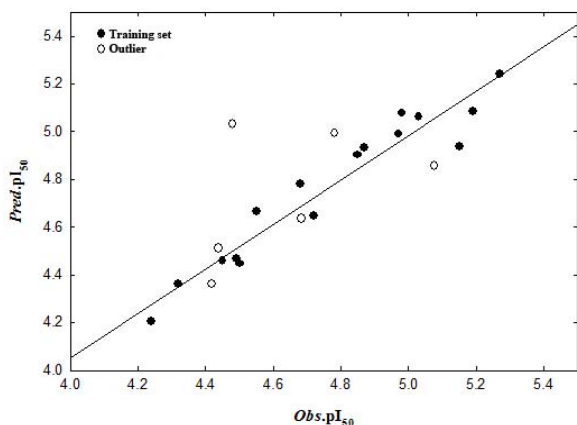


Figure 1. Relationship between observed inhibitory activity ($Obs.PI_{50}$) and predicted inhibitory activity ($pred.PI_{50}$) by the optimized HQSAR E-2 model (For training set: $Pred.PI_{50} = 0.927Obs.PI_{50} + 0.349$, $n = 16$, $s = 0.084$, $F = 186.515$, $r^2 = 0.930$ & $q^2 = 0.917$).

chirality 및 connections)의 조건에서 유도된 모델들의 통계값들을 Table 2에 정리하였다. 그 결과, 홀로그램 길

이를 59 bin, 그리고 분자 조각의 수를 6-9로 선택한 조건에서 가장 상관성이 양호한 HQSAR 모델($r^2 = 0.928$)을 유도하였다. 다시 분자 조각의 수(6-9)에서 조각의 특징(atoms, bonds, chirality 및 connections)들을 조합하여 유도된 모델들의 통계값들을 Table 3에 정리하였다. 여기에서 가장 좋은 통계값을 갖는 최적화된 모델은, Hologram이 401 bin이고 조각특징이 Hydrogen atom인 조건에서 유도된 HQSAR E-2 모델($r_{cv}^2(q^2) = 0.564$ 및 $r^2 = 0.929$)이었다. 그리고 모델의 예측성을 판단하기 위하여 test set에 대한 활성저해값($Pred.PI_{50}$) 및 이들 두 값들의 차이(ΔPI_{50}), 그리고 소수성 상수(ClogP)를 Table 4에 정리하였다. 따라서 오차값으로 training set ($n = 16$)은 평균오차, Ave. = 0.06 및 PRESS = 0.110, 그리고 test set ($n = 6$)은 Ave. = 0.223 및 PRESS = 0.513이었다. test set의 오차값보다 training set의 오차값이 작으므로 HQSAR E-2 모델은 예측성보다는 상관성이 큰 모델이었다. 이는 앞서의 설명에서와 같이 저해활성과 분자조각 크기 및 특징사이의 관계로부터 상관성에서 벗어나는 화합물들을 test set으로 선정하였기 때문이다.

Table 4. Hydrophobicity of the Substrates and Their Observed Inhibitory Activity ($Obs.pI_{50}$) Against Tyrosinase and Predicted Inhibitory Activity ($Pred.pI_{50}$) by the Optimized Models for Test Set

No	Substituents (R)		ClogP	Obs. pI_{50}	HQSAR ^{a)}	
	R ₁	R ₂			Pred.	ΔpI_{50} ^{b)}
17	CH ₃	3-OCH ₃ , 4-OHph	1.468	4.45	4.52	-0.07
18	CH ₃	3-OC ₂ H ₅ , 4-OHph	1.997	4.67	4.61	0.06
19	CH ₃	2-OCH ₃ ph	1.805	4.41	4.36	0.05
20	CH ₃	4-NO ₂ ph	2.029	4.80	5.09	-0.29
21	CH ₃	4-N(CH ₃) ₂ ph	2.451	4.49	5.07	-0.58
22	CH ₃	3-Clph	2.999	5.10	4.82	0.28

^{a)}Out linear compounds, ^{b)}difference between observed activity and predicted activity.

3.4. 독성값의 예측

최적화된 HQSAR E-2 모델로부터 예측되어 설계된 높은 저해활성값을 나타내는 분자들의 독성값은 Health Design사(accelrys, USA)에서 개발한 TOPKAT (HDI) 프로그램(Ver. 6.2)을 이용하여[23] 미국 연방식품의약품국이 규정한 랫드의 발암성(FDA), Ames 돌연변이성(AM), 피부 감작성(SI), 잠재독성값(DPT) 및 랫드의 경구 독성값(LD₅₀: g/kg) 등 5가지 독성값을 예측하여[24] Table 5에 정리하였다. 여러 독성유형의 경우에 독성발현 가능성 기준은 다음과 같다. 즉, 대부분의 독성값이 0.3 이하는 발암성이 없고 0.7보다 크면 발암성이 있는 것으로 간주한다. 또한, 경구 독성값(LD₅₀)은 적은 양일수록 독성이 크다는 사실을 시사한다. 이렇게 예측되는 독성들은 QSAR에 기초한 판별분석(discriminant analysis)으로 이루어지며 교차확인(crossed-validated)에 의하여 평균 87.5 %의 정확성을 나타내는 것으로 알려졌다[25].

Table 5. Predicted Toxicities of Designed Compounds (P1-P4) and Kojic Acid by the HQSAR Model

No.	FDA ^{a)}	AM ^{b)}	DTP ^{c)}	LD50 ^{d)}	SI ^{e)}
P1	1	0	0.971	0.46	0
P2	1	0	1	0.16	0
P3	1	1	0	1.50	0
P4	1	0	1	1.60	0
Kojic acid	1	0.994	0	0.90	0.208

^{a)}FDA Rodent carcinogenicity. Non-carcinogen: FDA < 0.3, carcinogen: FDA > 0.7 ^{b)}Ames mutagenicity. Non-mutagen: AM < 0.3, mutagen: AM > 0.3 ^{c)}Developmental toxicity potential. No potential for developmental toxicity: DTP < 0.3, potential for developmental toxicity: DTP > 0.7 ^{d)}Rat oral LD₅₀ (g/kg) ^{e)}Rabbit skin irritancy. Non-skin irritancy: SI < 0.3, skin irritancy SI > 0.7.

3.5. 고활성 화합물과 등고도

Optimized QSAR 방법으로(Cycle: 600 및 Hit: 400) 각 치환기(R₁-R₂)의 위치에 300개의 작용기들을 조합방식으로 HQSAR E-2 모델의 정보(Table 3)에 기초하여 고활성 분자를 설계하고 그 결과를 Table 6에 정리하였다. 이로부터 tyrosinase 저해활성이 가장 높을 것으로 예측되는 화합물은 **P1** ($Pred.pI_{50} = 5.48$)이었다. 하지만 kojic acid나 l-mimosine의 ClogP값이 비교적으로 큰 음의 값을 감안할 때, 이들 화합물보다 **P4** 화합물의 저해활성이 매우 높을 것으로 예측되며 최적화된 HQSAR E-2 모델의 상관성($r^2_{ncv} = 0.929$)에 기초하여 예측값의 이론적인 적중확률은 92.9 %에 이를 것으로 기대된다[26]. 한편, 유기 화합물의 인체 피부침투 및 이행에 영향을 미치는 소수성 상수를 감안한다면 ClogP = 2.0에 가까운 화합물, **P4** ($Pred.pI_{50} = 5.34$, ClogP = 1.857)가 **P1**보다 활성값은 다소 낮지만 적절한 소수성 상수를 나타내므로 실질적으로는 화합물, **P4**가 이상적인 화합물이다. 그리고 **P4**는 kojic acid에 비하여 약 13.4배 높은

Table 6. Hydrophobicity and Predicted Inhibitory Activity of Designed Phenyl-2,2'-Methylenebis(Cyclohexane-1,3-Dione) Analogues by the Optimized HQSAR E-2 Model

No.	Substituents (R)		ClogP	Inhibitory activity (pI_{50})		
	R ₁	R ₂		Pred.	EC ₅₀ ^{a)}	Rel. ^{b)}
P1	CH ₃	2,4-(NH ₂) ₂ ph	-0.168	5.48	1.32	13.4
P2	H	2,4-(NH ₂) ₂ ph	-2.243	5.32	1.64	10.8
P3	CH ₃	2,4-(NH ₂), 3-N(CH ₃) ₂ ph	-0.003	5.42	1.68	10.5
P4	CH ₃	2-NH ₂ , 3-CH ₃ CH ₂ Oph	1.857	5.34	1.95	9.1

^{a)}Convert pI_{50} values into EC₅₀ (ppm), ^{b)}relative inhibitory activity ratio to Kojic acid (EC₅₀ = 16.7 ppm).

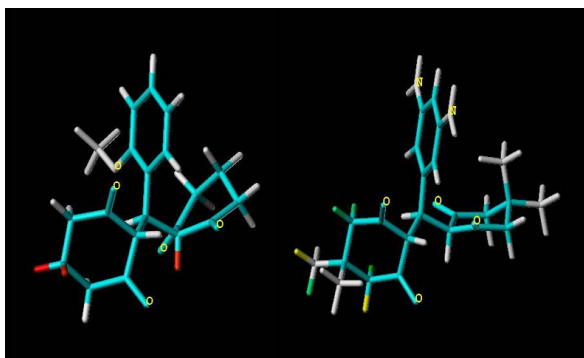


Figure 2. Atomic contributions to the tyrosinase inhibitory activity of the lowest potent compound (**6**; left) and designed the most potent compound (**P1**; right) (contribution: green: greatest, cyan: great, gray: average and red: lowest).

저해활성을 나타낼 것으로 예측되었으며, 랫드의 경구 독성값(LD₅₀; g/kg)이 **P1** = 0.46, **P4** = 1.60 및 Kojic acid = 0.90으로 예측되어 **P4**가 Kojic acid보다 독성도 낮고 활성도 비교적 우수한 저해활성제로 예측되었다.

한편, Figure 2에는 tyrosinase 저해활성에 미치는 구조상 치환기별 특이성을 시각적으로 분석하기 위하여 저해활성 차이가 큰 두 화합물(**6** 및 **P1**)의 기여도를 나타내었다. 즉, 기질유도체(**1-22**) 중에서 저해활성이 가장 낮은 R₁ = H, R₂ = 2-OCH₃ph 치환체(**6**: Obs.pI₅₀ = 4.24)를 왼쪽에, 설계된 화합물 중에서 가장 높은 저해활성이 예측되는 R₁ = methyl, R₂ = 2,4-diaminophenyl 치환체(**P1**)를 오른쪽에 배치하고 기여도를 색깔로 구분하여 나타내었다. 즉, 기질분자(**6**)의 R₂ = 2-OCH₃ph 치환기에서 2-OCH₃-기 부분은 회색(gray)으로 평균 수준의 기여를, 그리고 골격부분은 청록색(cyan)을 나타내어 저해활성에 매우 크게 기여하지만, R₁ = H 부분은 붉은색(red)으로 저해활성에 매우 기여하지 않는 부분임을 시사하고 있다. 반면에 설계된 화합물(**P1**)에서 모든 치환기 부분은 평균 수준의 기여를, 그리고 골격부분은 화합물 **6**에서와 같이 청록색을 나타내어 저해활성에 매우 크게 기여함을 알 수 있다. 그러나 하나의 R₁ = methyl-기 부분 끝의 작은 부분은 녹색(green)을 나타내어 활성에 크게 기여함을 나타내고 있다. 공통적으로 두 화합물 모두 골격부분은 활성에 매우 긍정적으로 기여하고 있음을 암시하였다[27].

다음 연구로는 저해활성에 대한 기질 유도체들의 특성을 이해하기 위하여 비교분자장분석(CoMFA)과 수용체와의 결합성에 큰 영향을 미치는 수소결합성에 관한

비교분자유사성 지수분석(CoMSIA) 등의 3차원적인 정량적 구조-활성관계(3D-QSAR)와 독성 및 감작성에 관한 분자설계를 시도하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 교육인적자원부 교육역량강화사업(Training-G P 프로그램)의 일환으로 일부 지원을 받아 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. S. J. Kim and M. H. Lee, 3D-QSAR analyses on the inhibition activity of 4-(R₁)-benzyl alcohol and 4-(R₂)-phenol analogues against tyrosinase, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(4), 271 (2009).
2. W. H. Tollesona, Human melanocyte biology, toxicology, and pathology, *J. Environmental Science and Health, Part C*, **23**(2), 105 (2005).
3. J. Ogunnariwo and J. M. T. Hamilton-miller, Brown- and red-pigmented pseudomonas: differentiation between melanin and pyorubrin, *J. Med. Microbiol.*, **8**, 199 (1975).
4. J. H. Park and M. H. Lee, A study of skin color by melanin index according to site, gestational age, birth weight and season of birth in korean neonates, *J. Korean Med. Sci.*, **20**, 105 (2005).
5. Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, and M. Sugiyama, Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis, *J. Biol. Chem.*, **281**(13), 8981 (2006).
6. M. Jimenez, S. Chazarra, J. Escribano, J. Cabanes, and F. G. Carmona, Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes, *J. Agric. Food Chem.*, **49**(8), 4060 (2001).
7. E. Neeley, G. Fritch, A. Fuller, J. Wolfe, J. Wright, and W. Flurkey, Variations in IC₅₀ values with purity of mushroom tyrosinase, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 3811 (2009).
8. Y. Tokiwa, M. Kitagawa, and T. Raku, Enzymatic synthesis of arbutin undecylenic acid ester and its inhibitory effect on mushroom tyrosinase, *Biotech-*

- nology Letters*, **29**(3), 481 (2007).
9. K. W. Lam, A. Syahida, Z. U. Haq, M. B. A. Rahman, and N. H. Lajis, Synthesis and biological activity of oxadiazole and triazolothiadiazole derivatives as tyrosinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**(12), 3755 (2010).
 10. Y. H. Chung, S. C. Jang, S. J. Kim, and N. D. Sung, 2D-QSAR and HQSAR on the inhibition activity of protein tyrosine phosphatase 1B with oleanolic acid analogues, *J. Biol. Chem.*, **50**(2), 52 (2007).
 11. S. J. Kim, Y. H. Chung, S. G. Kim, and N. D. Sung, CoMSIA analysis on the inhibition activity of PTP-1B with 3 β -Hydroxy-12-oleanen-28-oic acid analogues, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **51**(3), 171 (2008).
 12. S. J. Kim, N. D. Sung, and H. S. Jung, Holographic quantitative structure-toxicity relationships on the skin sensitization of alkyl-3,4-dihydroxybenzoate and N-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide derivatives, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **31**(1), 91 (2005).
 13. N. D. Sung, H. S. Jung, and S. J. Kim, Hydrolytic reactivity and holographic quantitative structure-activity relationship analyses on the melanogenesis inhibitory activities of alkyl-3,4-dihydroxybenzoate and N-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide derivatives, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **30**(4), 491 (2004).
 14. T. W. Heritage and D. R. Lowis, Molecular hologram QSAR. Ch. 4., In *Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications* (ed. Parrill, A. L. and M. R. Reddy), ACS Symposium Series 719, *American Chemical Society*, Washington, DC (1999).
 15. K. M. Khan, G. M. Maharvi, M. T. H. Khan, A. J. Shaikh, S. Perveen, S. Begum, and M. I. Choudhary, Tetraketones: a new class of tyrosinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(2), 344 (2006).
 16. Tripos Associates, Inc., 1699 S. Hanley Road, Suite 303, St. Louis, MO. 63144-2913, U.S.A.
 17. M. G. Sung, S. M. Joo, A. R. Song, and N. D. Sung, QSAR on the inhibition activity of flavopiridol analogues against breast cancer MCF-7, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **50**(3), 147 (2007).
 18. L. Stahle and S. Wold, Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research, *Progr. Med. Chem.*, **25**, 291 (1988).
 19. S. C. Jang and N. D. Sung, Molecular holographic QSAR analysis on the bonding affinity constants between nicotin acetylcholine receptors and New 3-Benzylidenemyosmine analogues and molecular design, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **50**(2), 127 (2007).
 20. N. D. Sung, Development of new agrochemicals by quantitative structure-activity relationship (QSAR) methodologies. I. The basic concepts and types of QSAR methodologies, *The Korean Journal of Pesticide Science*, **6**(3), 166 (2002).
 21. N. D. Sung, Development of new agrochemicals by quantitative structure-activity relationship (QSAR) methodology. II. The linear free energy relationship (LFER) and descriptors, *The Korean Journal of Pesticide Science*, **6**(4), 231 (2002).
 22. C. K. Smith and H. Sam, Allergic contact dermatitis, chemical and metabolic mechanisms, Taylor and Francis, London and New York (2001).
 23. W. G. Landis and M. H. Yu, Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. Ch. 5, 110. Lewis Publishers, London (1995).
 24. M. J. Prival, Evaluation of the TOPKAT system for predicting the carcinogenicity of chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **37**, 55 (2001).
 25. D. J. Livingstone, Structure property correlation in molecular design, In *Structure-property Correlations in Drug Research* (ed. Waterbeemd HVD), Ch. 4, **95**, Academic Press, R. G. Landes Company, Austin USA. (1996).
 26. M. Akamatsu, Current state and perspectives of 3D-QSAR. *Curr. Topics Med. Chem.*, **2**(12), 1381 (2002).
 27. W. S. Choi, Master's thesis dissertation, Chungnam National Univ., Daejeon Korea (2010).