

## 2-Phenyl-1,4-benzopyrone 유도체 (Flavones)의 Tyrosinase 저해활성에 관한 3D-QSARs 분석과 분자도킹

박준호<sup>1</sup> · 성낙도<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>카나다 퀸스대학교 생물학과, <sup>2</sup>충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학과

### 3D-QSARs analyses for Tyrosinase Inhibitory Activity of 2-Phenyl-1,4-benzopyrone (Flavones) Analogues and Molecular Docking

Joonho Park<sup>1</sup> and Nack-Do Sung<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Queen's University Kingston, ON, K7L-3N6 Canada

<sup>2</sup>Department of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764 Korea

Received October 1, 2010; Accepted December 16, 2010

To understand the inhibitory activity with changing hydroxyl substituents (R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub>) of polyhydroxy substituted 2-phenyl-1,4-benzopyrone analogues (1-25) against tyrosinase (PDB ID: oxy-form; 1WX2), molecular docking and the three dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSARs: Comparative molecular field analysis (CoMFA) & Comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA)) were studied quantitatively. The statistically best models were CoMFA 1 and CoMSIA 1 model from the results. The optimized CoMSIA 1 model with the sensitivity of the perturbation and the prediction produced ( $dq^2/dr^2_{yy}=1.009$  &  $q^2=0.511$ ) by a progressive scrambling analysis were not dependent on chance correlation. The inhibitory activities with optimized CoMSIA 1 model were dependent upon electrostatic factor (51.4%) of substrate molecules. Contour mapping the 3D-QSAR models to the active site of tyrosinase provides new insight into the interaction between tyrosinase as receptor and 2-phenyl-1,4-benzopyrone analogues as inhibitor. Therefore, the results will be able to apply to the optimization of a new potent tyrosinase inhibitors.

**Key words:** 2-phenyl-1,4-benzopyrone (Flavones) analogues, 3D-QSARs (CoMFA & CoMSIA), molecular docking, tyrosinase inhibition

Tyrosinase(EC 1.14.18.1)는 식물 및 동물에 널리 분포되어 있는 금속 단백질로 monohydroxyphenol을 quinone으로 전환하는 산화반응을 촉매한다. 그 결과로 생성된 dopachrome이나 indolequinone, 등이 중합체를 형성하여 갈색, 흑갈색 또는 흑색의 멜라닌(melanin) 색소를 생성한다[Tollesona, 2005]. 이 결과 식물에서는 갈변 현상으로 나타나 채소나 과일의 품질을 저하시키기도 하지만, 커피 또는 차, 등에서는 품질을 더욱 향상시키는 요인으로 작용하기도 한다[Ogunnariwo와 Hamilton-miller, 1975].

피부색을 형성하는 멜라닌 색소는 자외선으로부터 피부를 보호하며 피부에 발생하는 reactive oxygen species(ROS)를 제거

하여 피부보호에 필수적인 요소이나 멜라닌이 피부에 축적되면 피부미용에는 나쁜 영향을 미칠 뿐만 아니라, 피부암을 초래하기도 한다[Hill 등, 1997]. 이때, 멜라닌 색소의 전구물질인 tyrosine은 그의 수용체인 tyrosinase(polyphenol oxidase)에 의한 멜라닌 생합성 과정에서 두 가지의 촉매작용을 나타낸다. 첫째로 tyrosine의 hydroxylation 반응을 촉매하여 L-DOPA(L-3,4-dihydroxy-phenylalanine)로의 전환작용, 그리고 두 번째로는 다시 L-DOPA를 L-Dopaquinone으로 산화시키는 diphenolase 작용으로 멜라닌 합성을 조절한다[Kim과 Uyama, 2005]. 따라서 Tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 차단하는 방법으로는 주로 3가지 방법이 이용되고 있다. 즉, tyrosinase의 반응접내 활성형 Cu(II)원자를 비활성 환원형 Cu(I)원자 상태로 유지하는 방법[Matoba 등, 2006], tyrosine 유사물질을 Cu원자와 착 화합물을 형성시켜 tyrosine과의 반응을 차단하는 비경쟁적 저해방법 및 tyrosine 유사물질을 활성부위의 아미노산 잔기들과 수소결합을 형성하여 tyrosine과의 반응을 방해하는 경쟁적

\*Corresponding author

Phone: +82-42-821-6737; Fax: +82-42-821-6731

E-Mail: ndsung15@hanmail.net

doi:10.3839/jabc.2010.040

저해방법, 등이 있다[Mercedes 등, 2000]. Tyrosinase 저해제로 오랫동안 사용된 Kojic acid는 tyrosinase의 반응점 중, Cu원자와 착 화합물을 생성하는 대표적인 비경쟁적 저해제이다[Tokiwa 등, 2007; Neeley 등, 2009]. 한편, 경쟁적 저해제로 잘 알려진 arbutin 및 azelaic acid, 등은 화합물의 형태가 tyrosine과 유사하여 기질 특이성을 나타내고 있다[Briganti 등, 2003]. 또한, tyrosinase의 활성부위에 대한 분자도킹으로 저해제를 탐색하는 연구도 이루어지고 있으며[Lam 등, 2010] tyrosinase의 X-ray 결정구조에 기초하여[Matoba 등, 2006] 그의 활성화 메커니즘이 폭 넓게 연구되고 있다[Kim과 Uyama, 2005].

근래, tyrosinase 저해제에 관련한 천연물 유래의 연구[Parvez 등, 2007; Chen 등, 2008; Wang 등, 2009; Choi 등, 2010], 유기합성적인 연구[Chung 등, 2009; Ghani와 Ullah, 2010], QSARs 연구[Xue 등, 2008; Sawant 등, 2010] 및 분자설계[Khan, 2007]가 이루어지고 있다. 그리고 저자는 alkyl-3,4-dihydroxybenzoates 유도체[Sung 등, 2004]의 melanogenesis 및 oleanolic acids 유도체에 의한 tyrosine phosphate 1B의 저해활성에 관한 3D-QSARs 분석 결과들을 보고한 바 있다[Sung 등, 2007]. 현재, 수많은 천연물질이나 유기합성물질이 tyrosinase 저해제로 연구되어 미백용으로 사용중에 있으나 멜라닌 생합성을 억제하는 수단으로 미백 약제들은 멜라닌 형성세포(melanocytes)에 선택적인 저해활성과 독성 및 부작용이 없어야 하고 영구적인 효과를 유지할 수 있는 새로운 형태의 미백제 개발이 필요하다[Maeda와 Fukuda, 1991; Seiberg와 Paine, 2000].

본 연구에서는 다루어진 바 없는 기질분자로서 polyhydroxy 치환된 2-phenyl-1,4-benzopyrone 유도체(관용명; Flavones)와 그의 수용체로서 tyrosinase의 oxy-form(PDB ID; 1WX2)[Matoba 등, 2006] 사이의 분자도킹과 tyrosinase 저해활성에 관한 3차원적인 정량적 구조-활성관계(3D-QSARs: 비교분자장 분석(CoMFA) 및 비교분자 유사성지수 분석(CoMSIA))[Klebe 등, 1994]로부터 기질-수용체 사이의 상호작용에 대하여 정량적으로 검토하였다.

## 재료 및 방법

**분자도킹과 정렬.** 기질분자로서 polyhydroxy 치환된 2-phenyl-1,4-benzopyrone(관용명; Flavones) 유도체(1-25)(Fig. 1)들의 tyrosinase에 대한 저해활성은 문헌값[Kim 등, 2006]을 이용하였으며 대조물질로는 Kojic acid[Chen 등, 1991]와 Arbutin [Yagi 등, 1987]을 인용하였다. 여기에서 저해활성값  $IC_{50}(\mu M)$ 은 L-tyrosine에 대한 tyrosinase의 monophenolase활성을 490 nm에서 측정되는 dopachrome의 변화로부터 측정된 것이며 다음의 식( $pI_{50} = -\log(IC_{50}/\text{분자량} \times 1000)$ )에 적용하고  $pI_{50}$ 값으로 전환하여 사용하였다. Tyrosinase의 반응점에 대하여 기질분자들의 분자도킹을 실시하기 위하여 수용체, tyrosinase(PDB ID: oxy-form; 1WX2)[Matoba 등, 2006] 내에 물 분자와 Caddie protein(ORF378)을 제거하고 도킹스코어(Docking score; DS=5.02)가 제일 높았던 기질 화합물(18)을 에너지 최적화하여 주형분자(template)로 설정한 다음에 2-phenyl-1,4-benzopyrone 유

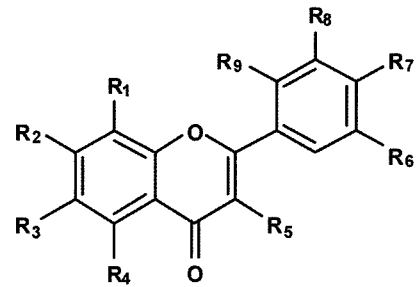


Fig. 1. General structure of polyhydroxy substituted 2-phenyl-1,4-benzopyrone analogues (Flavones) (1-25) as substrate molecule.



Fig. 2. Probable binding conformations of the 2-phenyl-1,4-benzopyrone analogues displayed inside the active site pocket (green) of the tyrosinase (PDB ID: oxy-form; 1WX2). The  $\alpha$ -helix were shown as helices or cylinders, while the loop regions were shown as tubes.

도체들을 대상으로 “align database”를 사용하여[Patrick 등, 2008] 정렬한 결과를 Fig. 2에 제시하였다. Tyrosinase의 반응점 주변의 리본 구조에서  $\alpha$ -helix 구조는 튜브 형태로, 그리고  $\beta$ -sheet 구조는 선 형태로 각각 표시하였다. 또한, 기질 분자들의 도킹은 Surflex-Dock 프로그램(Sybyl, Ver. 8.1.1)으로 실행하여 Flexible docking 방법으로 이루어 졌다[Tripes Inc., 2008].

**3D-QSARs 모델링.** 3D-QSARs 분석은 PLS(partial least square) 방법으로[Wold 등, 1993] Sybyl(Ver. 8.1.1) 프로그램 (Tripos Inc.)을 실행하여 이루어졌다[Patrick 등, 2008]. Data set의 규모가 작기 때문에 통계적으로 상관성이 큰 최적모델을 얻기 위하여 상관성에서 벗어나는 화합물들을 test set( $n=7$ )으로 설정하고 training set( $n=18$ ) 화합물들을 대상으로 전보의 조건에서[Soung 등, 2010] 3D-QSARs 모델을 유도하였다. 이때 교차확인 결과로 얻어지는 PRESS(predictive residual sum of squares) 값이 작을수록 예측성이 양호한 모델로 판단한다. 또한, 3D-QSARs 모델의 우연 상관성(chance correlation)을 검토하기 위하여 주성분 수(2.5)와 다음의 조건(최대: 4 bins, 최소: 2 bins 및 임계점: 0.85)에서 순차 혼합화 분석(progressive scrambling analysis)을 실행하여[Clark와 Fox, 2004] 모델의 예측성( $q^2$ ), 계산된 교차확인 표준오차(cSDEP; calculated cross-validated standard error of prediction) 및 섭동의 감도( $dq^2/dr_{yy}^2$ ) 등, 3종의 통계값들을 얻었다.

**부분최소자승(PLS) 계산.** 최적화된 3D-QSARs 모델을 선택하기 위하여 기질 유도체 별, tyrosinase에 대한 저해활성( $pl_{50}$ )과 특성장 사이의 부분최소자승(PLS; partial least squares) 분석을 실시하였다[Wold 등, 1993]. 먼저, 최적의 성분수를 결정하기 위하여 교차확인 과정에서는 예측성,  $r^2_{cv}$ 값(또는  $q^2$ )을 얻게 되며 비교차 확인과정을 통하여 상관성,  $r^2_{ncv}$ 값을 얻는다. 그 결과, 최적화 모델의 기준값으로 상관성이  $r^2_{ncv}$  0.90, 그리고 예측성이  $r^2_{cv}$ (또는  $q^2$ ) 0.50 이상의 값에 이르는 모델들이 안정성과 바람직한 예측성을 갖는다고 판단한다. Tyrosinase에 대한 저해활성에 관련한 최적화된 모델의 정보를 분석하기 위하여 도킹 스코어가 큰 화합물(18)의 구조상에 CoMFA 및 CoMSIA 특성장[Klebe 등, 1994]을 등고도로 표시하고 disfavor한 부분보다 favor부분을 명확하게 이해하기 위하여 favor: disfavor의 비율(%)을 80:20으로 각각 차별화하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**3D-QSARs 모델.** Tyrosinase 저해로서 polyhydroxy 치환된 2-phenyl-1,4-benzopyrone 기질 유도체들(1-25)은 plant catechol oxidase(PDB code; 1bt3) 및 octopus hemocyanin(PDB code; 1js8)에 대하여 분자도킹 연구들이 이루어졌으나[Kim 등, 2006], tyrosinase의 oxy-form(PDB ID; 1WX2)[Matob 등, 2006]에 대하여는 다루어진 바 없다. 그러므로 여기에서는 기질 유도체들의 치환기( $R_1$ - $R_9$ =OH)들이 변화함에 따라 관측된 tyrosinase 활성 저해값(Obs. $pl_{50}$ )과 tyrosinase의 oxy-form에 대하여 도킹된 조건에서[Patrick 등, 2008] 실행된 3D-QSARs 결과들을 분석 검토하였다. 그 결과, Table 1에는 관측값과 가장 양호한 통계값을 보인 CoMFA 1 및 CoMSIA 1 모델로 예측한 저해활성

값(Pred. $pl_{50}$ ) 및 이들 두 값들의 차이값( $\Delta pl_{50}$ )을 각각 정리하였다. 가장 높은 저해활성을 나타낸 화합물은  $R_1=R_2=R_7=R_8=R_9$ =OH 치환체(1; Obs. $pl_{50}$ =6.61), 그리고 가장 낮은 경우는  $R_4=R_7$ =OH 치환체(25; Obs. $pl_{50}$ =2.81)이었으며 그 차이는  $\Delta pl_{50}$ =3.80이었다. 또한, 기질분자들은 대체로 대조물질인 Kojic acid( $pl_{50}$ =4.01)[Chen 등, 1991]와 Arbutin( $pl_{50}$ =3.83)[Yagi 등, 1987]에 비하여 유사한 수준의 저해활성 값들을 나타내었다.

Training set( $n=18$ )을 대상으로 조성수(NC), Grid(Å) 및 특성장의 변화조건에서 가장 좋은 통계값을 보인 4개의 3D-QSARs 모델들을 유도하여 Table 2에 정리하였다. CoMFA 2 모델을 제외한 CoMFA 1 및 CoMSIA 1 모델이 양호한 통계값을 나타내었다. Table 3에는 test set( $n=7$ )의 관측값(Obs. $pl_{50}$ ) 및 예측값(Pred. $pl_{50}$ ) 그리고 이들 두 값의 차이값( $\Delta$ )을 나타내었다. Table 4에는 3D-QSARs 모델들의 특성장에 대한 기여비율(%)과 training set(Table 1) 및 test set(Table 3)에 대한 3D-QSARs 모델들의 평균오차(Ave.)와 PRESS값을 요약하였다. 전체적으로 모든 모델은 training set의 오차값이 test set의 오차값들 보다 작으므로 예측성보다 상관성이 큰 모델이었다. 이는 앞서 모델의 유도부분에서 언급한 바와 같이, 상관성이 큰 모델을 유도하기 위한 조치의 결과이다. 그러므로 통계적으로 가장 양호한 CoMFA 1 모델의 특성장에 대한 기여비율(%)은 정전기장 67.5%, 입체장 25.4% 및 소수성장 7.1%의 순이었으며, CoMSIA 1 모델은 정전기장 51.4%, H-bond 받게장 26.1%, 소수성장 19.0% 및 입체장 3.5% 순으로 두 모델 모두가 공통적으로 정전기장이 저해활성에 가장 크게 기여하는 요소이었다.

**순차 혼합화 분석.** 양호한 통계값을 나타낸 CoMFA 1 및 CoMSIA 1 모델의 우연상관성에 관한 감도를 평가하기 위하여 주성분 수, 2-5의 조건에서 leave-one-out(LOO) 교차확인

**Table 1.** Observed tyrosinase inhibitory activity (Obs. $pl_{50}$ ) of polyhydroxy substituted 2-phenyl-1,4-benzopyrones, and predicted inhibitory activity (Pred. $pl_{50}$ ) by the 3D-QSARs models for training set

No	Substituents (R)									Obs. $pl_{50}$	CoMFA 1		CoMSIA 1 <sup>a)</sup>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		Pred. $pl_{50}$	$\Delta$ <sup>b)</sup>	Pred. $pl_{50}$	$\Delta$ <sup>b)</sup>
1	OH	OH	H	H	H	H	OH	OH	H	6.61	6.65	-0.04	6.62	-0.01
3	H	OH	H	OH	H	H	H	H	OH	4.50	4.26	0.24	4.29	0.21
5	H	OH	H	H	H	H	H	H	OH	4.30	4.37	-0.07	4.43	-0.13
6	OH	OH	H	H	H	H	OH	H	H	4.32	4.17	0.15	4.32	0.00
8	H	OH	H	H	H	H	OH	OH	H	4.05	3.83	0.22	3.72	0.33
9	H	OH	H	H	H	H	H	OH	H	3.63	3.83	-0.20	3.69	-0.06
10	H	OH	H	H	H	OH	H	H	H	3.63	3.52	0.11	3.60	0.03
11	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	H	3.56	3.42	0.14	3.38	0.19
13	H	OH	H	OH	OH	H	OH	H	OH	3.48	3.63	-0.15	3.63	-0.15
14	H	OH	H	H	H	H	OH	H	H	3.33	3.60	-0.27	3.50	-0.17
16	H	H	OH	H	OH	H	OH	H	OH	3.31	3.19	0.12	3.37	-0.06
17	H	H	OH	H	H	H	OH	OH	H	3.19	3.16	0.03	3.28	-0.09
18	H	OH	OH	OH	H	H	OH	H	H	3.21	3.00	0.21	3.00	0.21
19	H	H	H	H	OH	H	OH	H	H	3.16	3.07	0.09	2.95	0.21
21	H	H	H	H	OH	OH	OH	H	H	3.09	2.98	0.11	2.99	0.10
22	H	OH	OH	H	H	H	H	H	H	3.03	3.23	-0.20	3.21	-0.18
23	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	OH	H	3.06	3.33	-0.27	3.18	-0.12
25	H	H	H	OH	H	H	OH	H	H	2.81	3.03	-0.22	3.13	-0.32

Notes: Kojic acid;  $EC_{50}$ =14  $\mu$ M (Obs. $pl_{50}$ =4.01), Arbutin;  $EC_{50}$ =40  $\mu$ M (Obs. $pl_{50}$ =3.83)., <sup>a)</sup>Optimized model, <sup>b)</sup>difference between observed activity and predicted activity.

**Table 2. Summary of the statistical parameters (PLS Analyses) of 3D-QSARs models**

Models No.	Grid (Å)	NC	$r_{cv}^2$ <sup>a)</sup>	$r_{ncv}^2$ <sup>b)</sup>	SE <sub>ncv</sub> <sup>c)</sup>	F
CoMFA 1	2.0	3	0.603	0.959	0.197	108.317
CoMFA 2	2.0	3	0.473	0.958	0.199	106.028
CoMSIA 1 <sup>d)</sup>	3.0	3( $\alpha=0.3$ )	0.590	0.957	0.200	105.041
CoMSIA 2	3.0	3( $\alpha=0.3$ )	0.572	0.957	0.202	103.187

Notes: AF, atom-based fit; FF, field fit; NC, number of component; F, fraction of explained versus unexplained variance; attenuation factor, a; <sup>a)</sup>cross-validated  $r^2$ , <sup>b)</sup>non-cross-validated  $r^2$ , <sup>c)</sup>standard error estimate, <sup>d)</sup>optimized model.

**Table 3. Observed tyrosinase inhibitory activity (Obs.PI<sub>50</sub>) of polyhydroxy substituted 2-phenyl-1,4-benzopyrones and predicted inhibitory activity (Pred.PI<sub>50</sub>) by the 3D-QSARs models for test set**

No	Substituents (R)									Obs.PI <sub>50</sub>	CoMFA 2		CoMSIA 1 <sup>a)</sup>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		Pred.PI <sub>50</sub>	$\Delta$ <sup>b)</sup>	Pred.PI <sub>50</sub>	$\Delta$ <sup>b)</sup>
2	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	4.91	4.05	0.86	5.11	-0.20
4	OH	H	H	OH	H	H	H	OH	H	4.48	4.10	0.38	4.06	0.43
7	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	4.21	4.02	0.19	4.27	-0.06
12	H	H	OH	H	H	H	H	H	OH	3.41	3.97	-0.56	4.22	-0.81
15	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	3.27	3.80	-0.53	4.33	-1.06
20	OH	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	3.20	4.20	-1.00	4.44	-1.24
24	OH	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	H	3.01	4.25	-1.24	4.20	-1.19

<sup>a)</sup>Optimized model, <sup>b)</sup>difference between observed activity and predicted activity.

**Table 4. Summary of field contribution, Ave. and PRESS of training set and test set by 3D-QSARs models.**

Model No.	Field Contribution ratio (%)					Training set		Test set	
	S	E	Hy	HD	HA	Ave.	PRESS	Ave.	PRESS
CoMFA 1	25.4	67.5	7.1	-	-	0.158	0.542	0.681	4.063
CoMFA 2	39.0	49.6	11.4	-	-	0.151	0.554	0.690	4.658
CoMSIA 1 <sup>a)</sup>	3.5	51.4	19.0	-	26.1	0.173	0.589	0.710	4.942
CoMSIA 2	-	53.0	19.8	-	27.2	0.152	0.569	0.672	4.387

Notes: S: steric, E: electrostatic, Hy: hydrophobic, HD: H-bond donor field, HA: H-bond accept field, Ave.: average residual, PRESS: Predictive residual sum of squares., <sup>a)</sup>optimized model.

**Table 5. Model stability test for optimized 3D-QSARs models by progressive scrambling**

Component Number	CoMFA 1			CoMSIA 1 <sup>a)</sup>		
	$q^{2b)}$	cSDEP <sup>c)</sup>	$dq^2/dr_{yy}^{2d)}$	$q^{2b)}$	cSDEP <sup>c)</sup>	$dq^2/dr_{yy}^{2d)}$
2	0.318	0.779	0.266	0.383	0.739	0.623
3 <sup>a)</sup>	0.361	0.791	1.121	0.511	0.696	0.828
4	0.489	0.786	0.252	0.603	0.674	1.624
5	0.618	0.789	-0.805	0.430	0.809	2.545

<sup>a)</sup>Optimized model, <sup>b)</sup>predictivity of the models,  $q^2=1-(sSDEP)^2$ , <sup>c)</sup>calculated cross-validated standard error as function of correlation coefficient between the true values (y) of the dependent variables and the perturbed values (y') of the dependent variables., <sup>d)</sup>slope of  $q^2$  (cross-validated correlation coefficient from Sybyl) with respect correlation of the original dependent variables versus the perturbed dependent variables.

[Cramer 등, 1988]과 순차 혼합화 분석결과들로부터 섭동 예측성( $q^2$ ), 종속변수의 섭동값(y)과 참값(y) 사이 상관계수의 함수(cSDEP) 및 고유 종속변수들과 섭동종속 변수들( $dq^2/dr_{yy}^2$ ) 사이의 상관성에 대한  $q^2$ (교차 확인된 상관계수)의 기울기 값들을 계산하여 Table 5에 각각 정리하였다. 여기에서 한 모델의 예측성이  $q^2 > 0.5$  및 섭동의 감도가  $dq^2/dr_{yy}^2 = 0.81-1.2$ 의 값을 가질 경우에는 우연상관성을 나타내지 않는 최적화된 모델이라고 판단한다. 이 기준에 따라서 주성분 수, 3의 조건에서, CoMFA 1 모델은  $q^2=0.361$  및  $dq^2/dr_{yy}^2=1.121$ 을 나타낸 반면에, CoMSIA 1 모델은  $dq^2/dr_{yy}^2=1.009$  및  $q^2=0.511$ 을 나타내었으므로[Clark

등, 2004] CoMSIA 1 모델이 우연상관성에 저촉되지 않는 최적화 모델임을 잘 설명하고 있다. 그러므로 Fig. 3에는 관측값(Obs.PI<sub>50</sub>)과 최적화된 CoMSIA 1 모델에 의한 예측값(Pred.PI<sub>50</sub>) 사이의 관계를 제시하였다. 이 비례식,  $Pred.PI_{50}=0.960Obs.PI_{50}+0.148$ , ( $n=18$ ,  $s=0.176$ ,  $F=390.676$ ,  $r^2=0.961$  및  $q^2=0.951$ )으로부터 CoMSIA 1 모델도 예측성보다는 상관성이 양호함을 나타내고 있다. 여기에서 test set 화합물들이 직선상에서 벗어나는 이유는 앞서 3D-QSARs 모델링에서 설명한 바와 같이, 상관성이 큰 최적화된 모델을 얻기 위하여 상관성에서 벗어나는 화합물들을 test set( $n=7$ )으로 설정하였기 때문이다.

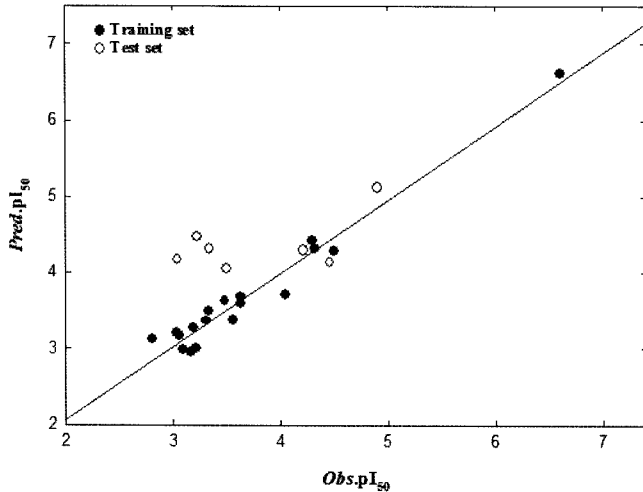


Fig. 3. Relationships between observed inhibitory activity (Obs.pI<sub>50</sub>) and predicted inhibitory activity (Pred.pI<sub>50</sub>) by the optimized CoMSIA 1 model.

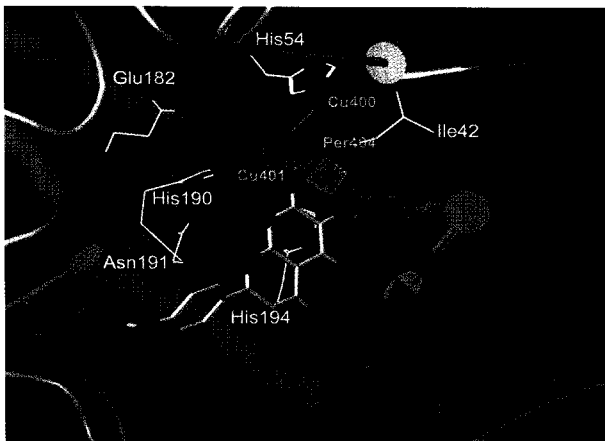


Fig. 4. The contour maps for the steric field (Green; favor & Yellow; disfavor) and electrostatic field (Blue; positive charge favor & Red; negative charge favor) by the CoMFA 1 model.

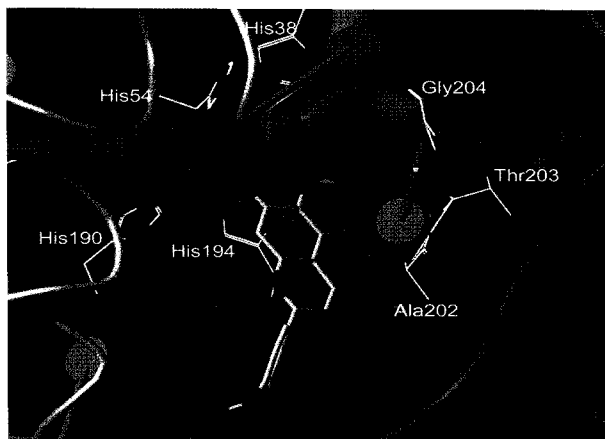


Fig. 5. The contour maps for the positive charge favor field (Blue), hydrophobic favor field (Yellow) and H-bond acceptor favor field (Green) by the optimized CoMSIA 1 model.

특성장에 관한 등고도 분석. Tyrosinase 저해활성에 미치는 3D-QSARs 특성장을 시각적으로 분석하기 위하여 Fig. 4에는

tyrosinase 반응점내에 저해활성이 가장 큰 화합물(1)의 도킹된 구조상에 CoMFA 1 모델의 입체장과 정전기장에 관한 등고도, 그리고 기질분자로부터 3Å 이내에 위치한 아미노산 잔기들을 나타내었다. 아미노산 잔기, His54, Glu182 및 His190 인접에 존재하는 긴 공간사이의 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>-치환기 부분 및 R<sub>4</sub>-치환기의 외곽 부분은 정전기장으로 양하전(blue)을, 그리고 benzopyrone 고리상 carbonyl oxygen 원자가 위치한 부분과 R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>-치환기 부분의 작은 영역에는 음하전(red)을 선호하는 치환체가 저해활성을 증가시키는 요소로 작용할 것이며 이 R<sub>4</sub>-치환기 부분에는 반응점의 입구부분에 위치하여 아미노산 잔기가 존재하지 않았다. 또한, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>-치환기 사이의 작은 영역에는 입체적으로 큰 치환기(green)가 저해활성을 증가시킬 것으로 예상된 반면에 R<sub>2</sub>-치환기는 입체적으로 작아야(yellow) 할 것이다. 특히, R<sub>2</sub>=OH 치환기는 tyrosinase의 반응점 부분인 구리원자(Cu401) 및 과산화 산소원자(Per404)에 가까이 위치하여 Cu401 원자와의 배위결합이나 Per404의 산소 원자와 수소결합의 가능성이 예상되었으나 양하전(blue)의 정전기장으로 인하여 Cu401 원자 보다는 음하전을 띠는 과산화 산소원자와 수소결합성이 우수할 것으로 판단되었다.

한편, Fig. 5에는 최적화된 CoMSIA 1 모델의 정전기장, H-bond 받게장 및 수소성장에 관한 등고도를 나타내었다. 아미노산 잔기, His216, His190 및 Thr203 인접의 R<sub>2</sub> 및 잔기 Ala202 근처 R<sub>4</sub>-치환기 부분은 음하전(blue)을 선호하며 CoMFA장의 경우와 매우 유사하였다. 또한, Ala202 근처 R<sub>4</sub>-치환기 부분은 소수성을 선호하는(yellow) 영역임을 설명하고 있다. 잔기 Thr203 부근에 R<sub>4</sub>-치환기 그리고 His38, His34 잔기 주변 R<sub>3</sub>=OH의 산소원자는 H-bond 받게(green)로, 그리고 H-bond 받게장 부근의 아미노산 잔기중 작용기는 H-bond 주개로 작용하여 이들 사이에 H-bond가 형성되어 tyrosinase의 경쟁적인 저해활성화[Mercedes 등, 2000]가 예상되었으며 특성장들의 disfavor field는 나타나지 않았다. 그러므로 기질분자들은 tyrosinase의 반응점 중, Cu원자와 착 화합물을 생성하는 비경쟁적 저해제[Neeley 등, 2009; Tokiwa 등, 2007]로 작용할 가능성은 희박해 보인다. 여기에서 R<sub>2</sub>-치환기가 위치한 양하전을 선호하는 정전기장(Blue) 영역에는 구리원자(Cu401 및 Cu400)가 존재하는 tyrosinase의 활성화 부분으로 R<sub>2</sub>-치환기는 과산화 산소원자(Per404)와 H-bond를 형성할 것으로 예상된다. 그러므로 이상과 같은 3D-QSAR 특성장을 만족하는 polyhydroxy 치환된 2-phenyl-1,4-benzopyrone 유도체(1-25)들의 구조적인 특성들이 tyrosinase에 대한 저해활성화 요소로 작용할 것이다.

## 초 록

기질분자로서 polyhydroxy 치환된 2-phenyl-1,4-benzopyrone 유도체(Flavones)(1-25)들의 hydroxyl 치환기(R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub>)가 변화함에 따른 Tyrosinase(PDB ID: oxy-form; 1WX2)에 대한 저해활성을 이해하기 위하여 분자도킹과 3차원적인 정량적 구조-활성관계(3D-QSARs: CoMFA 및 CoMSIA)가 연구되었다. 그 결과, 통계적으로 CoMFA 1 및 CoMSIA 1 모델이 가장 양호한 3D-QSARs 모델이었다. 또한, 순차 혼합화 분석결과로부터

CoMSIA 1 모델( $dq^2/dr^2_{yy}=1.009$  및  $q^2=0.511$ )이 우연상관성에 저촉되지 않는 최적화 모델이었으며 최적화된 CoMSIA 1 모델의 tyrosinase에 대한 저해활성은 기질분자의 정전기장(51.4%)에 의존적이었다. Tyrosinase의 반응점에 대한 3D-QSAR 모델의 등고도는 수용체로서 tyrosinase과 저해제로서 2-phenyl-1,4-benzopyrone 기질분자 사이의 새로운 상호작용 관계를 이해하는 계기가 되었다. 그러므로 이 결과들은 새로운 잠재적인 tyrosinase 저해제의 최적화에 적용될 수 있을 것이다.

**Key words:** 3D-QSARs(CoMFA & CoMSIA), 2-phenyl-1,4-benzopyrone 유도체(Flavones), 분자도킹, tyrosinase 저해활성

### 감사의 글

이 논문은 (주) 코스비전의 연구비 지원에 의하여 이루어진 연구입니다.

### 참고문헌

- Briganti S, Camera E, and Picardo M (2003) Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res* **16**, 101-110.
- Chen YR, Chiou RY, Lin TY, Huang CP, Tang WC, Chen ST and Lin SB (2009) Identification of an alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an inhibitor of tyrosinase and melanogenesis. *J Agric Food Chem* **57**, 2200-2205.
- Chen JS, Wei CI and Marshall MR (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* **39**, 1897-1901.
- Choi MY, Song HS, Hur HS and Sim SS (2008) Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16 melanoma cells. *Arch Pharm Res* **31**, 1166-1171.
- Chung SW, Ha YM, Kim YJ, Song S, Lee H, Suh H and Chung HY (2009) Inhibitory effect of 6-(3-hydroxyphenyl)-2-naphthol on tyrosinase activity and melanin synthesis. *Arch Pharm Res* **32**, 289-294.
- Clark RD and Fox PC (2004) Statistical variation in progressive scrambling. *J Comput-Aided Mol Design* **18**, 563-576.
- Cramer RD, Bunce JD and Patterson DE (1988) Crossvalidation, bootstrapping and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies. *Quant Struct Act Relat* **7**, 18-25.
- Ghani U and Ullah N (2010) New potent inhibitors of tyrosinase: Novel clues to binding of 1,3,4-thiadiazole-2(3H)-thiones, 1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thiones, 4-amino-1,2,4-triazole-5(4H) thiones, and substituted hydrazides to the dicopper active site. *Bioorg Med Chem* **18**, 4042-4048.
- Hill H Z, Li W, Xin P and Mitchell DL (1997) Melanin; A two edged sword? *Pigment Cell Res* **10**, 158-161.
- Kim YJ and Uyama H (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1707-1723.
- Khan MTH (2007a) Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure Appl Chem* **79**, 2277-2295.
- Kim D, Park J, Kim J, Han C, Yoon J, Kim N, Seo J and Lee C (2006) Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: A fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem* **54**, 935-941.
- Klebe G, Abraham U and Mietzner T (1994) Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem* **37**, 4130-4146.
- Lam KW, Syahida A, Haq ZU, Rahman MBA and Lajis NH (2010) Synthesis and biological activity of oxadiazole and triazolo-thiadiazole derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 3755-3759.
- Maeda K and Fukuda M (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* **42**, 361-368.
- Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H and Sugiyama M (2006) Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase is Flexible during Catalysis. *J Biol Chem* **281**, 8981-8990.
- Mercedes J, Soledad C, Josefa E, Juana C and Francisco GC (2000) Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J Agric Food Chem* **49**, 4060-4063.
- Neeley E, Fritch G, Fulle A, Wolfe J, Wright J and Flurkey W (2009) Variations in IC<sub>50</sub> values with purity of mushroom tyrosinase. *Int J Mol Sci* **10**, 3811-3823.
- Ogunnariwo J and Hamilton-miller JMT (1975) Brown- and red-pigmented pseudomonas: Differentiation between melanin and pyorubrin. *J Med Microbiol* **8**, 199-203.
- Patrick AH, Jonathan BC and John OT (2008) Molecular docking of interactions and groove-binders to nucleic acids using autodock and surflex. *J Chem Inf Model* **48**, 1602-1615.
- Parvez S, Kang MK, Chung HS, Bae HS. (2007) Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res* **21**, 805-816.
- Sawant R, Lanke P, Jadhav G and Bhangale L (2010) QSAR analysis of structurally similar 1,3,4-oxadiazoles as enzyme tyrosinase inhibitors. *Drug Invention Today* **2**, 169-172.
- Seiberg MC and Paine MS (2000) Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol* **115**, 162-167.
- Soung MG, Kim JH, Kwon BM and Sung ND (2010) Synthesis and ligand based 3D-QSAR of 2,3-bis-benzylidenesuccinaldehyde derivatives as new class potent FPTase inhibitor, and prediction of active molecules. *Bull Korean Chem Soc* **31**, 1355-1360.
- Sung ND, Jung HS and Kim SJ (2004) 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 Scientists Korea* **30**, 491-497.
- Sung ND, Chung YH, Jang SC and Kim SJ (2007) 2-D QSAR and HQSAR on the inhibition activity of protein tyrosine phosphate 1B with oleanolic acid analogues. *J Appl Biol Chem* **50**, 52-57.
- Tokiwa Y, Kitagawa M and Raku T (2007) Enzymatic synthesis of

- arbutin undecylenic acid ester and its inhibitory effect on mushroom tyrosinase. *Biotechnology Letters* **29**, 481-486.
- Tollesona WH (2005) Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ Sci Health, Part C* **23**, 105-161.
- Tripos Inc (2008) Sybyl molecular modeling and QSAR software on CD-Rom, (Ver.8.1.1) Theory and manual. St Louis, Missouri.
- Wang HM, Chen CY, Ho ML, Chou YT, Chang HC, Lee CH, Wang CZ and Chu IM (2010) (-)-N-Formylanonaine from *Michelia alba* as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant, *Bioorg. Med Chem* **18**, 5241-5247.
- Wold S, Johansson E and Cocchi M (1993) PLS-partial least squares projections to latent structures. In *3D-QSAR in drug design: Theory, Methods and Applications* (Kubinyi H ed.), pp. 523-550. ESCOM, Leiden.
- Xue CB, Luo WC, Ding Q, Liu SZ and Gao XX (2008) Quantitative structure-activity relationship studies of mushroom tyrosinase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* **22**, 290-309.
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1987) Inhibition of mushroom tyrosinase by Aloe extract. *Planta Med* **53**, 515-517.