

Flavone 유도체들의 Tyrosinase 저해활성화 반응에서 Hydroxyl 치환기들의 역할

박준호¹ · 성낙도^{2*}

¹카나다 퀸스대학교 생물학과, ²충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학과

The Roles of Hydroxyl Substituents in Tyrosinase Inhibitory Activation of Flavone Analogues

Joonho Park¹ and Nack-Do Sung^{2*}

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

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

Received January 18, 2011; Accepted March 23, 2011

Molecular docking of polyhydroxy substituted flavone analogues (1-25) as substrate molecules to the active site of tyrosinase (PDB ID: Deoxy-form (2ZMX) & Oxy-form (1WX2)) and Free-Wilson analysis were studied to understand the roles of hydroxyl substituents (R_1-R_9) in substrate molecules for the tyrosinase inhibitory activation. It is founded from Free-Wilson analysis that the $R_1=\text{hydroxyl}$ among R_1-R_9 substituents had the strongest influence on the tyrosinase inhibitory activity. H-bonds between the hydroxyl substituents of substrate molecules and amino acid residues in the active site of tyrosinase were contributed to make a stable substrate-receptor complex compound. Particularly, it is proposed from the findings that the noncompetitive inhibitory activation would take place via H-bonding between peroxide oxygen (Per404) atom in the active site of tyrosinase and the hydroxyl substituents in substrate molecule.

Key words: flavone analogues, H-bonds, molecular docking, noncompetitive inhibitory activation, tyrosinase inhibition

식물의 2차 대사산물로서 폐놀성 화합물인 flavone은 2-phenylchromone 분자의 골격으로 구성된 flavonoid 유도체 (flavone, flavonol, isoflavone, chalcone, aurone, flavan-3-ol, anthocyanidin 및 leucoanthocyanidin)이며 고등 식물계에 널리 분포하는 색소 물질로서 꽃, 잎 및 뿌리에 많이 함유되어 있을 뿐 아니라, 다양한 생물활성으로 인하여 기능성 식품, 천연물 농약 및 의약품, 등의 용도로 개발 가능성이 잠재된 매우 유용한 화합물이다[Andersen 및 Markham, 2006]. 이들 화합물 중에서 flavone 유도체들의 tyrosinase (EC.14.18.1) 저해반응성을 검토한 사례는 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (nobiletin), 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone (neohesperidin) [Zhang 등, 2007; Itoh 등, 2009], 5,7,2',4'-tetrahydroxyflavone (norartocarpin) [Ryu 등, 2008] 및 5,2',4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (artocarpin) [Arung 등, 2006; Zheng 등, 2008] 등이 있다. 이중에서

norartocarpin은 tyrosinase에 대하여 경쟁적인 저해반응성을 나타내며 kojic acid 보다 10.4배 저해반응성이 높은 것으로 알려져 있다[Ryu 등, 2008].

잘 알려진 tyrosinase 저해제로서 kojic acid는 tyrosinase의 반응점 내 구리 원자와의 배위결합으로 비경쟁적인 저해반응성 [Tokiwa 등, 2007; Neeley 등, 2009]을 나타낸다. 반면에, azelaic acid는 구리 원자와 결합하지 못하고 반응점 주변 아미노산 잔기들과의 수소결합으로 인한 경쟁적인 저해반응성을 나타낸다[Mercedes 등, 2000]. 근래, tyrosinase의 X-ray 결정구조 [Matoba 등, 2006]에 기초한 활성화 메커니즘은 물론[Kim과 Uyama, 2005], tyrosinase 저해제에 관련한 천연물 유래의 연구 [Choi 등, 2008; Chen 등, 2009; Wang 등, 2010], 유기합성적인 연구[Chung 등, 2009; Ghani 과 Ullah, 2010], QSAR 연구[Xue 등, 2008; Sawant 등, 2010] 및 분자설계[Khan, 2007]와 분자도킹[Lam 등, 2010; Sun 등, 2010]] 등에 대한 연구들과 총설[Rendon과 Gaviria, 2005; Solano 등, 2006; Chang, 2009]이 다양하게 보고되고 있다. 또한, 저자들은 alkyl-3,4-dihydroxybenzoates [Sung 등, 2004], oleanolic acids에 의한 tyrosine phosphate 1B의 저해활성에 관한 3D-QSAR [Sung 등,

*Corresponding author
Phone: +82-42-821-6737; Fax: +82-42-825-3306
E-Mail: ndsung15@hanmail.net

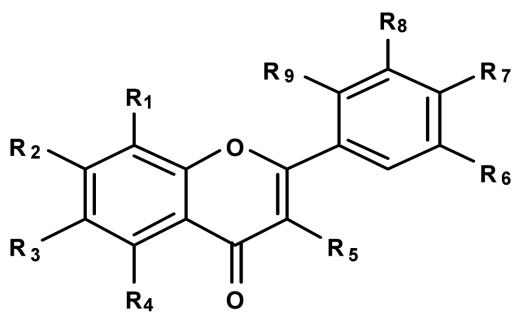


Fig. 1. General structure of polyhydroxy substituted (R_1 - R_9) flavone analogues (1-25) as tyrosinase activity inhibitor.

2007] 및 분자도킹 조건에서 flavone 유도체들의 tyrosinase 저해활성에 관한 3D-QSAR 분석[Park과 Sung, 2010], 등에 관련한 연구들을 보고하였다.

본 연구에서는 tyrosinase 저해활성화 반응에 관여하는 기질 분자로서 flavone 유도체(1-25) 중 치환기(R_1 - R_9 =OH)들의 역할을 정량적으로 이해하기 위하여 분자도킹 분석을 실행하고 그 결과들을 검토하였다.

재료 및 방법

Free-Wilson 분석. Polyhydroxy 치환된(R_1 - R_9 =OH) 기질분자로서 flavone 유도체(Fig. 1) (1-25)의 tyrosinase 저해활성값 (Obs.pI_{50})은 전보[Park과 Sung, 2010]의 값을 인용하였으며[Kim 등, 2006] Free-Wilson 분석(Kubinyi, 1993)은 SAS 프로그램 (Ver. 3.3)으로 계산하였다. 이 분석은 약물의 구조 등에 관련한 특성이 복수개의 정성적인 자료로 표현되었을 경우에 이것을 binary scale (0-1형)의 특성수량으로 변환하여 설명변수로서 사용하는 수량화 이론이다. 생물활성과 같은 외적기준이 계량척도로 주어진 경우에 사용하는 유용한 방법이 수량화 이론 1류에 해당한다. 중회귀분석에서는 여러 독립 변수중에 어느 독립 변수가 종속변수의 결정에 가장 크게 기여하는지를 알아보기 위하여 종속변수와 모든 독립변수를 표준화 시킨 다음에 이를 표준화된 변수를 가지고 중회귀분석을 실행하였다. 그리고 분배계수에 관련한 소수성상수(ClogP)는 Sybyl (Ver. 8.1.1) 프로그램으로 계산하였다.

분자도킹 분석. 수용체로서 tyrosinase의 X-선 결정구조는 2009년초에 수정된 대장균(*Streptomyces castaneoglobisporus*: *E. coli*) 유래의 것으로 RCSB protein data bank (PDB)로부터 탐색된 deoxy-form (2ZMX)과 oxy-form (1WX2) 2가지를 이용하였다[Matoba 등, 2006]. Deoxy-form은 반응지점에 2개의 구리원자(Cu) 만이 존재하는 형태이고 oxy-form은 2개의 구리원자 사이에 산소원자가 과산화물 형태로 존재하는 구조이다. tyrosinase의 반응점에 대한 기질분자들의 도킹은 Sybyl 프로그램 [Tripos Inc., 2008] 중 Surflex-Dock 모듈(Sybyl. Ver. 8.1.1)로 이루어 졌다. 이 모듈은 수용체 내부의 active site 설정에 고유의 protomol-based 방법을 사용한다[Patrick 등, 2008]. 또한, docking score (DS)는 scoring function을 사용하며 이는 X-선 결정구조와 단백질-리간드 착화합물의 결합 친화력(Kd)에 기

초한다[Jain, 2003]. 도킹시에는 tyrosinase내에 모든 물 분자와 Caddie protein (ORF378)을 제거하고 flavone 유도체(1-25)를 도킹한다. 또한, 기질-수용체 상호작용과 활성화에 큰 영향을 미치는 수소결합장은 MOLCAD (molecular computer aided design) 프로그램(Sybyl Ver. 8.1)으로 실행하여 제시하였다.

결과 및 고찰

치환기의 영향. Flavone 유도체(1-25)의 기질분자 내 치환기 (R_1 - R_9 =OH)가 변화함에 따른, Free-Wilson metrix와 관측된 tyrosinase 저해활성값(Obs.pI_{50}) 및 소수성상수(ClogP)를 Table 1에 정리하였다. 앞서와 같이, 기질분자 중 hydroxyl-치환기들은 수용체의 반응점 내 구리원자와의 배위결합으로 인한 비경쟁적인 저해반응[Neeley 등, 2009]과 반응점 주변의 아미노산 잔기들 사이의 수소결합으로 인한 경쟁적인 저해반응[Mercedes 등, 2000]에 관여하여 안정한 기질-수용체 착화합물 형성에 기여한다. 그러나 구체적으로 기질분자 중, 어떤 치환기(R_1 - R_9)가 tyrosinase의 저해활성에 가장 큰 영향을 미치는지 그 기여순서를 파악하고자 Free-Wilson 분석을 실시하여 다음 (1)식을 얻었다.

$$\begin{aligned} \text{Obs.pI}_{50} = & 0.213(\pm 0.149)\mathbf{R}_1(\mathbf{OH}) - 0.011(\pm 0.142)\mathbf{R}_2(\mathbf{OH}) - 0.020 \\ & (\pm 0.134)\mathbf{R}_3(\mathbf{OH}) + 0.054(\pm 0.118)\mathbf{R}_4(\mathbf{OH}) + 0.164(\pm 0.123)\mathbf{R}_5(\mathbf{OH}) \\ & - 0.143(\pm 0.153)\mathbf{R}_6(\mathbf{OH}) - 0.086(\pm 0.127)\mathbf{R}_7(\mathbf{OH}) + 0.091(\pm 0.116) \\ & \mathbf{R}_8(\mathbf{OH}) - 0.922(\pm 0.172)\mathbf{R}_9(\mathbf{OH}), \\ & (n=25, F=10.670, s=2.052, R^2=0.873) \end{aligned} \quad (1)$$

(1)식의 유도과정에서 변수들을 표준화시키는 이유는 회귀계수의 대소가 그 독립변수의 측정단위에 따라서 크게 달라지기 때문이다. 따라서 표준변량을 가지고 구한 회귀계수를 표준 편 회귀계수라고 하며 이 값의 대소에 따라 각 독립변수의 종속변수에 대한 기여도를 측정할 수 있다(Kubinyi, 1993). 그러므로 통상, 이 식은 기울기가 O점을 지나기 때문에 절편을 표기하지 않는다. 이 식으로부터 각 치환기들(R_1 - R_9)의 tyrosinase 저해활성에 대한 기여 순서는 $\mathbf{R}_1 >> \mathbf{R}_5 > \mathbf{R}_8 \geq \mathbf{R}_4$ 이었다. 그러므로 \mathbf{R}_1 =hydroxyl-치환기가 제일 큰 영향을 미쳤으며 나머지 치환기들은 기여하지 않는 경향이었다. 이 결과에 따르면, benzopyrone 고리상 치환기(R_1 - R_9 =OH)들이 2-phenyl 고리상 치환기(R_6 - R_9 =OH)들보다 비교우위적으로 저해활성에 영향을 미치고 있음을 시사하고 있다.

기질분자의 소수성. 소수성은 분자간 수소결합, 이온화 정도 및 분자의 입체성, 등과 깊은 관련이 있는 요소로서 유기화합물이 생체내로의 침투와 목표분자에 도달하기까지의 경로상에 제일 중요한 영향을 미치는 분배계수의 크기이다. 그러나 여기에서는 기질분자의 소수성(ClogP)과 저해활성(pI_{50}) 사이의 상관성은 매우 낮았다. 이는 기질-수용체 착화합물이 형성되므로서 발현하는 저해활성이 정전기적, 입체적 및 소수성적 상호작용으로 진행됨에 있어서 소수성이 의한 의존성이 상대적으로 낮음을 의미한다. 이같은 사실은 이들 기질분자들의 tyrosinase 저해활성에 관한 3D-QSAR 분석에서 시사된 바 있었으며[Park과 Sung, 2010] 소수성장의 기여비율은 19%이었다.

Table 1. Matrix for Free-Wilson analysis, observed tyrosinase inhibitory activity (*Obs.pI₅₀*) and hydrophobicity (ClogP) of flavone analogues (1-25)

No	Substituents (R) ^a									<i>Obs.pI₅₀</i>	ClogP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
1	1	1					1	1		6.61	1.481
2		1		1	1		1			4.91	4.910
3		1		1					1	4.50	2.605
4		1			1		1			4.48	1.838
5		1							1	4.30	4.300
6	1	1					1			4.32	4.320
7		1		1			1	1		4.21	2.311
8		1					1	1		4.05	1.988
9		1						1		3.63	2.575
10		1				1				3.63	2.575
11		1		1			1			3.56	2.905
12			1			1				3.41	2.575
13		1		1	1		1		1	3.48	1.134
14		1					1			3.33	2.575
15		1		1						3.27	3.563
16			1		1		1		1	3.31	0.874
17			1				1	1		3.19	1.988
18		1	1	1			1			3.21	2.337
19					1		1			3.16	2.408
20		1			1		1	1		3.20	1.244
21					1	1	1			3.09	1.820
22		1	1							3.03	2.733
23		1		1	1	1	1	1		3.06	0.837
24	1	1	1	1			1	1		3.01	0.915
25				1			1			2.81	3.475
26 ^b	Kojic acid									4.01	-1.387
27 ^c	Arbutin									3.83	-0.508

^aR₁-R₉=OH(1), ^bEC₅₀=14 μM, ^cEC₅₀=40 μM.**Table 2. Characteristic of amino acid residues around binding site of tyrosinase^a**

Characteristic	Amino acid residues
Poalr, charged (acidic; 1)	Glu182
Poalr, charged (basic; 3)	Arg55, Arg185, Arg192
Polar, uncharged (11)	Asn93, Asn191, Gln200, Ser56, Ser206, Thr37, Thr203, His 38, His54, His190, His194
Nonpolar, hydrophobic (16)	Ala202, Val193, Val195, Val205, Leu181, Ile42, Ile189, Pro207, Phe41, Met43, Met201, Trp184, Trp196, Gly53, Gly183, Gly204

^aRCSB protein data bank (PDB): Deoxy-form (2ZMX) & Oxy-form (1WX2).

기질 화합물들의 계산된 소수성 상수값은 ClogP=0.837-4.320 범위로 표준물질인 kojic acid (ClogP=-1.387)보다 소수성이 큰 화합물들이었다. 여기에서 화합물의 소수성 값이 음의 값 (ClogP<0)을 나타낼 경우에는 극성이며 양의 값(ClogP>0)을 나타낼 경우에는 비극성임을 의미한다. 그러나 사람피부에 대한 *in-vitro* 실험결과, 최대흡수를 나타내는 최적의 소수성은 대략 ClogP=2.0 부근으로[Natsch 등, 2009], 이 값보다 크거나 작으면 피부에 대한 흡수효율이 감소한다. 이같은 기준값에 근거하여 여기에서 다룬 flavone 유도체(1-25) 대부분은 적정한 소수성을 유지하고 있음을 알 수 있다. Table 2에는 tyrosinase 반응 점 주변에 위치한 아미노산 잔기들의 특성을 요약하였다. 극성 아미노산 잔기(15개)와 비극성 아미노산 잔기(16개)의 구성 비율이 1:1로 어느 쪽에도 치우쳐 있지 않은 특성으로 인하여

tyrosinase 저해활성에서 소수성장의 기여비율(19%)이 크지 않았던 것으로 예상되었다.

기질-수용체 상호작용. Deoxy-form의 반응점에 가장 높은 DS 값을 나타낸 화합물(16; DS=5.85)과 아미노산 잔기들과의 수소 결합 상호작용을 Fig. 2에 나타내었다. Tyrosinase의 반응점 주변의 리본 구조에서 α-helix 구조는 튜브 형태로, 그리고 β-sheet 구조는 선 형태로 각각 표시하였다[Matoba 등, 2006]. 2-phenyl 고리상 R₇=hydroxyl H 원자는 잔기 His190의 imidazol 고리상 질소원자와 수소결합(2.73Å)을 형성하고 있다. 그리고 R₆=hydroxyl (또는 R₈) 산소 원자는 잔기 Ser206의 hydroxyl H 원자와 수소결합(1.89Å)을 각각 형성하고 있다. 여기에서 R₇=hydroxyl 치환기와 구리원자 사이의 거리(1.97Å)로 미루어 이들 사이에는 배위결합 형성이 가능하여 비경쟁적인 저해반응

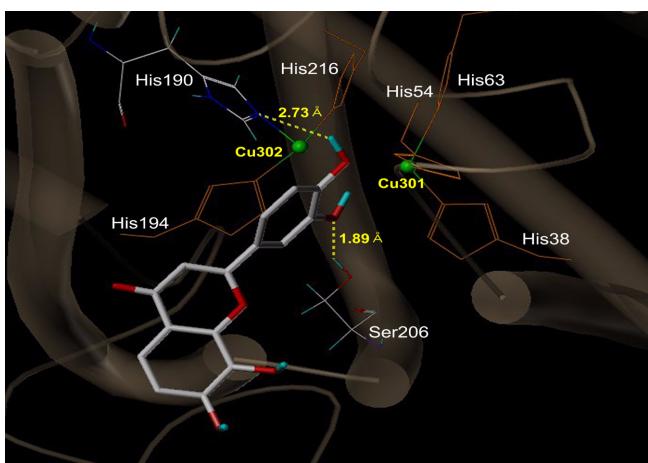


Fig. 2. H-bonding (yellow dot line) interactions between substrate molecule (16) and amino acid residues in active site of tyrosinase (Deoxy-form; 2ZMX): The α -helix were shown as helices or cylinders, while β -sheets were shown as arrows and the loop regions as tubes.

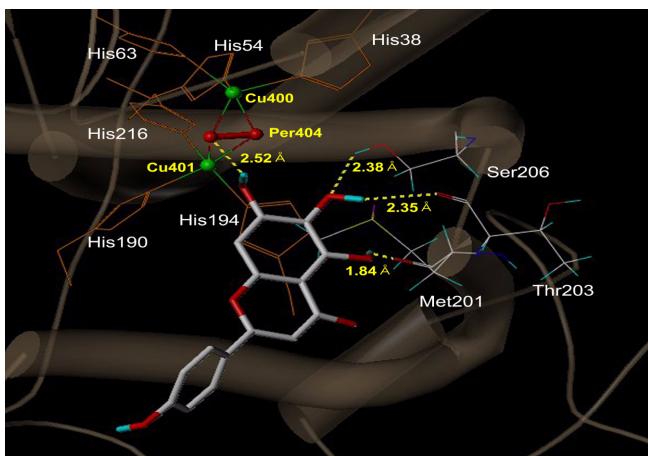


Fig. 3. H-bonding (yellow dot line) interactions between substrate molecule (18) and amino acid residues in active site of tyrosinase (Oxy-form; 1WX2).

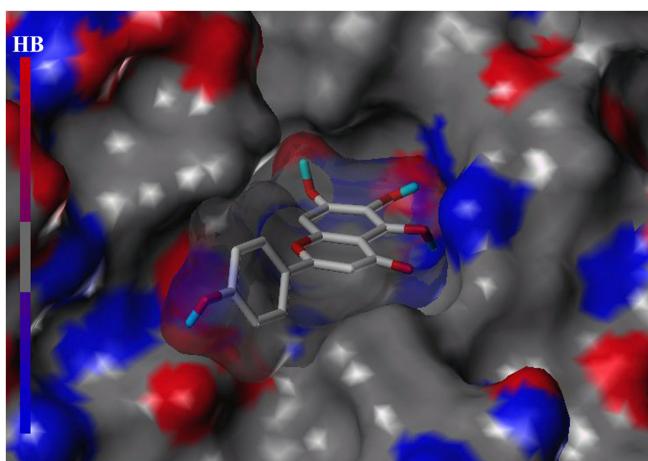


Fig. 4. Surface representation of the highest docking scored compound (18) and active site of tyrosinase (Oxy-form; 1WX2): The color ramp for H-bonding (HB) site ranges from red (H donors) to blue (H acceptors). This image was generated with the MOLCAD program in SYBYL 8.1.

성을 생각할 수 있다. 그러나 oxy-form에서는 $R_5=$ hydroxyl 치환기와 구리원자 사이의 거리(4.32Å)로 미루어 이들 사이에 배위결합 형성은 불가능하다.

한편, Fig. 3에는 oxy-form에 대하여 화합물, **18** (DS=5.02)의 도킹된 모습을 나타내었다. 즉, $R_2=$ OH의 H원자는 구리원자 (Cu^A401 및 Cu^B400)에 결합된 peroxide (Per 404) 산소원자와의 수소결합(2.52Å)으로 R_2 -치환기가 구리원자와 배위결합이 가능하여 비경쟁적인 저해반응이 예상되었다. 또한, $R_3=$ OH는 2개의 수소결합(Thr203 잔기; 2.35Å 및 Ser205 잔기: 2.38Å) 그리고 $R_4=$ OH는 Met201과 수소결합(1.84Å) 등, 4개의 수소결합을 형성하였다. 이처럼 Fig. 2 및 3에서 기질분자가 다르게 도킹되는 이유는 구리원자에 결합된 peroxide의 존재에 따른 여러 복합적인 요소들에 의하여 도킹된 그 상태가 제일 안정한 형태이기 때문이다. 기질 유도체들의 tyrosinase 저해활성에 관한 3D-QSAR 관계에서 최적화 모델의 H-bond 반계장(HA)이 가장 큰 기여비율(26.1%)을 나타내었다는 근거에 따라[Park 및 Sung, 2010] Fig. 4에는 MOLCAD기법을 적용하여 한 예로, 화합물, **18**의 H-bond 반계장(HA)에 도킹된 모습을 제시하였다. 이에 따르면 기질 화합물의 hydroxyl-치환기가 밀집되어 수소결합 가능성성이 큰 부분들($R_2=R_3=R_4=$ OH)이 tyrosinase의 반응지점 입구(왼쪽)보다 구리원자가 위치한 peroxide 부근(오른쪽)에 가까이 위치함으로서 Fig. 3과 같은 도킹 모습을 나타내고 있다.

분자도킹 분석. 도킹스코어(DS)는 Van der Waals 표면간의 거리 2Å 이내에서 상호 영향을 주고 받는 수용체의 잔기들과 기질분자의 atom pair들을 기반으로 Score를 다룬다[Patrick 등, 2008]. Table 3에는 tyrosinase의 두 형태(deoxy-form 및 oxy-form)에 대한 기질 유도체들의 DS는 물론, 도킹시 구리원자 사이의 거리 및 반응점 주변의 기질-수용체 사이의 결합환경을 정리하였다. 대체로 deoxy-form에 대한 기질분자들의 DS, crash(음) 및 polar 값들은 oxy-form에 대한 값들보다 큰 값을 나타내었다. 이는 기질분자들이 deoxy-form에 도킹이 잘 이루어지나 반응점에서 벗어나는 정도가 크다는 의미이다.

Oxy-form보다 deoxy-form에 대하여 상대적으로 polar값이 크다는 사실은 deoxy-form의 경우, 반응점의 전기양성적인 구리원자에 음하전을 띠는 과산화 산소원자들이 존재하지 않으므로 기질분자의 전기음성적인 치환기들의 구리원자에 이끌리는 정도가 크기 때문으로 설명된다. 이에 기초하여 구리원자와 치환기들 사이의 거리는 oxy-form보다 deoxy-form에 대하여 매우 짧은 거리를 나타내었다. 왜냐하면, 음하전을 띠는 peroxide의 산소원자(Per404)와 치환기들 사이의 반발력이 존재하는 oxy-form의 경우에는 구리원자와 치환기 사이의 거리가 멀고 peroxide가 존재하지 않는 deoxy-form의 경우에는 구리원자와 치환기 사이의 거리가 가깝게 위치하기 때문이다. 따라서 oxy-form에서 구리원자와 치환기 사이의 거리가 약 3Å 이내의 경우에 해당하는 kojic acid (**26**)를 위치한 화합물 **18**, **21** 및 **22**, 등은 치환기와 구리원자 사이에 캔레이트를 형성하는 비경쟁적인 저해활성 반응이 일어날 것이다. 그 이외 대부분의 화합물들은 구리원자와 치환기 사이의 거리가 약 3Å 보다 먼 거리를 유지하여 치환기와 구리원자 사이에 배위결합 캔레이트 형성

Table 3. Docking scores (DS) of flavone analogues in binding site of tyrosinase and their binding environment

No.	Deoxy-form (2ZMX)				Oxy-form (1WX2)			
	DS	Crash	Polar	Distance (Å) ^a	DS	Crash	Polar	Distance (Å) ^a
1	4.75	-0.83	3.32	1.93(7), 2.81(8)	4.85	-0.73	2.97	4.49(2)
2	5.25	-1.20	3.72	2.15(2), 4.82(4)	4.30	-0.67	2.06	4.34(5)
3	4.99	-1.17	3.26	2.09(2), 4.74(4)	3.86	-0.50	2.79	4.40(2)
4	4.89	-0.62	2.24	1.91(7)	4.32	-1.15	2.25	4.43 ^b
5	4.56	-0.79	2.27	2.06(2)	3.84	-0.90	1.17	3.86(2), Per404
6	5.23	-0.86	2.11	1.99(7)	5.20	-0.57	3.11	4.51(2)
7	5.02	-1.18	3.27	2.07(2), 4.74(4)	3.64	-0.53	2.80	4.36(2)
8	5.53	-1.61	3.33	2.08(7), 4.99(6)	4.07	-1.26	2.54	4.45(7)
9	5.40	-1.32	2.12	1.96(8)	4.03	-1.21	1.99	7.07(6)
10	4.97	-0.51	2.78	2.00(7)	4.12	-0.76	2.06	4.49(8)
11	5.36	-0.80	3.08	2.03(7)	5.09	-0.92	1.98	4.32(4)
12	5.38	-1.14	1.84	1.95(8)	4.18	-0.73	1.83	4.47(3)
13	5.50	-0.80	3.85	1.94(7)	3.81	-0.56	2.87	4.39(2)
14	5.44	-1.21	2.32	2.01(7)	4.04	-0.72	2.00	4.47(7)
15	5.35	-1.01	3.27	2.07(7)	4.16	-0.93	1.92	4.23(4)
16	5.85	-1.00	3.74	1.92(7), 4.52(9)	4.12	-0.86	2.25	4.32(5)
17	5.34	-1.33	3.29	2.06(7), 4.64(9)	4.12	-0.78	2.20	4.39(6)
18	5.21	-0.51	3.31	1.94(7)	5.02	-1.27	2.41	2.52(2), Per404
19	5.23	-0.75	2.97	1.93(7)	3.85	-0.67	2.16	3.74(7), Per404
20	5.34	-0.81	4.03	1.96(2)	4.09	-1.89	3.08	4.60(5)
21	4.94	-1.73	3.30	2.04(7)	3.75	-1.19	1.90	2.63(7), Per404
22	5.05	-0.81	3.27	-	4.52	-1.35	1.89	2.95(2), Per404
23	4.52	-1.32	3.47	2.07(2), 4.73(4)	4.68	-1.51	3.24	4.65(5)
24	4.41	-1.00	3.26	2.87(8), 1.94(7)	4.21	-0.48	3.01	5.05(5)
25	5.81	-0.75	2.97	1.93(7)	4.04	-1.11	0.97	6.36(4)
26 ^c	5.40	-0.88	3.31	1.80	4.67	-0.37	2.08	2.97, Per404
27 ^d	7.42	-0.82	4.26	2.05	5.92	-1.11	3.83	5.10

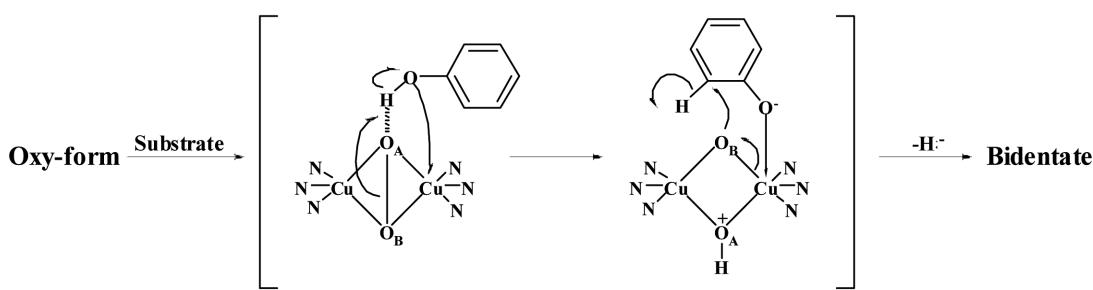
^aSpacial distance from the closest located oxygen atom of OH groups to the copper atoms, The figures in a parenthesis are a number of substituents (R_1-R_9), ^bquinone part, ^ckojic acid, ^darbutin.

가능성이 적으로 반응점 주변의 아미노산 잔기들과의 수소결합성[Etter, 1990]에 의한 경쟁적인 저해활성 반응이 주로 일어날 것으로 예상된다. 여러 가지 유형의 수소결합중에서 제일 강한 -O-H...N-의 결합에너지는 29 kJ/mol, 그리고 Cu-O 배위결합 에너지는 343(± 63) kJ/molⁱ이다. 그러므로 이들 결합들의 상대적인 결합에너지 비율은 약 1:12이다. 따라서 수소결합성이 절대적으로 크지 않는 한, 수소결합으로 인한 경쟁적인 반응과 구리원자와의 배위결합에 따르는 비경쟁적인 반응이 동시에 일어날 혼합화반응의 가능성은 흔치 않을 것으로 예상된다.

비경쟁적 반응경로. Tyrosinase의 반응에서 전형적인 비경쟁적인 반응성을 나타내는 것으로 알려진[Neeley 등, 2009] 내부 표준물질인 kojic acid의 oxy-form에 대한 도킹된 모습으로부터 kojic acid의 meta-hydroxyl H원자는 peroxide (Per404)의 O원자(2.49Å), meta-hydroxyl O원자는 Ser206 잔기(2.02Å) 및 methylhydroxyl H원자가 Asn191잔기(1.99Å)와 3개의 수소결합을 각각 형성하고 있었으며 치환기와 구리원자와의 거리가 2.97Å으로(Table 3) 퀄레이트 형성이 가능함을 잘 설명하고 있다. kojic acid의 경우 뿐 아니라, 한 예로, Fig. 3에서와 같이 18번 화합물의 $R_2=\text{hydroxyl}$ H원자와 peroxide (Per404)의 O원자 사이에 형성되는 수소결합에 기초하여 Scheme 1에는 tyrosinase oxy-form과 tyrosine과 같은 phenol성 기질 화합물과

의 반응으로 bidentate까지 진행되는 일련의 비경쟁적인 저해반응 경로를 제안하였다.

수소결합에 기초한 비경쟁적 반응의 첫 단계는 peroxide O_A원자가 기질로서 phenol 분자 중 hydroxyl group의 H원자간 수소결합이 형성된 전이상태에서 peroxido rotation과 강한 butterfly distortion으로 인하여[Deeth 및 Diedrich, 2010] peroxide 결합(O-O)이 끊어지면서 O_A원자에 양성자화가 일어난다. 동시에 O-H 사이의 결합전자가 phenol 분자의 hydroxyl O 원자로 이동하여 hydroxyl group의 탈 양성자화로 음하전이 증가된 phenoxy anion^o Lewis acid로 작용하는 구리원자를 향한 친핵성 반응으로 구리원자에 phenoxy group^o이 결합되어 6배위자 구리 착화합물 중간체가 생성된다. 그 결과, 전기양성도가 큰 구리원자에 의한 배위결합(O-Cu)을 경유하는 강한 inductive effect로 인하여 기질분자의 hydroxyl group^o이 결합되었던 인접 *ortho*-위치의 탄소원자(C_A)가 큰 양하전을 띠게된다. 이어지는 다음 단계의 반응에서는, peroxide O_B원자가 *ortho*-위치의 방향족 고리상 탄소원자(C_A)에 대한 친핵성 치환반응(S_NAr)에 의하여 새로운 결합이 생성된다(C_A-O). 이때 이탈되는 hydride anion(H⁻)은 양하전을 띠는 oxonium ion (=⁺O_AH)이 받아드림으로서 안정한 7원자 고리형태의 bidentate를 생성하는 일련의 경로로 비경쟁적인 저해반응이 진행될 것이다.



Scheme 1. Proposed the noncompetitive inhibitory activation pathway via H-bonding between peroxide oxygen (Per404) atom in the active site of tyrosinase and the hydroxyl substituents in substrate molecule.

이상과 같은 분자도킹 분석으로부터 실제 화합물이거나 또는 가장 화합물의 구조에 대하여 tyrosinase 저해활성 반응의 유형을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 저해활성에 기여하는 flavone 분자내 치환기와 반응점 사이의 상호작용 형태와 구조적인 특성을 이해할 수 있었으며 이에 근거하여 새로운 tyrosinase 저해성 화합물의 최적화는 물론, 분자설계에 유용하게 적용될 수 있다.

초 록

Tyrosinase 저해활성화 반응에 대한 polyhydroxy 치환된 flavone 유도체(1-25) 중, hydroxyl-치환기(R₁-R₉)들의 역할을 이해하기 위하여 Free-Wilson 분석과 tyrosinase (PDB ID: Deoxy-form (2ZMX) 및 Oxy-form; 1WX2)의 활성화 지점에 대한 분자도킹이 연구되었다. Free-Wilson 분석으로부터 R₁-R₉ 치환기중에서 R₁=hydroxyl 치환기가 tyrosinase 저해활성에 가장 큰 영향을 미치고 있음을 알았다. 기질분자의 hydroxyl 치환기들과 tyrosinase의 반응점 내 아미노산 잔기들 사이의 수소결합들은 안정한 기질-수용체 착화합물을 형성하는데 기여하였다. 특히, 수소결합에 기초한 비경쟁적 저해활성화 반응은 기질분자의 hydroxyl 치환기들과 tyrosinase의 반응점 내 peroxide 산소원자(Per404) 사이의 수소결합을 경유하여 일어날 것임을 제안하였다.

Key words: 비경쟁적 저해활성화 반응, 분자도킹, 수소결합, flavone 유도체, tyrosinase 저해활성

감사의 글

이 논문은 (주)코스비전에서 제공한 연구비 지원으로 이루어진 연구입니다.

참고문헌

- Andersen QM and Markham KR (2006) Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Arung ET, Shimizu K, and Kondo R (2006) Inhibitory effect of artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* **29**, 1966-1969.
- Chang TS (2009) An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* **10**, 2440-2475.
- 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 Agri Food Chem* **57**, 2200-2205.
- Choi MY, Song HS, Hur HS, and Sim SS (2008) Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in α-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.
- Deeth RJ and Diedrich C (2010) Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. *J Biol Inorg Chem* **5**, 117-129.
- Etter MC (1990) Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic compounds. *Acc Chem Res* **23**, 120-126.
- 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.
- Itoh K, Hirata N, Masuda M, Naruto S, Murato K, Wakabayashi K, and Matsuda H (2009) Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol Pharm Bull* **32**, 410-415.
- Jain AN (2003) Surflex: fully automatic flexible molecular docking using molecular similarity-based search engine. *J Med Chem* **46**, 499-511.
- Khan MTH (2007) 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.
- 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.
- Kubinyi H (1993) In *QASR: Hansch Analysis and Related Approaches. Applications of Free Wilson Analysis and Related Models*. Mannhold R, Larsen K, and Timmerman H (eds), *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* **1**, 139-147. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- 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.
- 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.
- Natsch A, Emter R, and Ellis G (2009) Filling the concept with data: Integrating data from different *in-vitro* and *in-silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci* **107**, 106-121.
- Neeley E, Fritch G, Fulle A, Wolfe J, Wright J, and Flurkey W (2009) Variations in IC₅₀ values with purity of mushroom tyrosinase. *Int J Mol Sci* **10**, 3811-3823.
- Park J and Sung ND (2010) 3D-QSARs analysis for tyrosinase inhibitory activity of 2-phenyl-1,4-benzopyrone (Flavones) analogues and molecular docking. *53*, 225-231.
- 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.
- Rendon MI and Gaviria JI (2005) Review of skin-lightening agents. *Dermatol Surg* **31**, 886-889.
- Ryu YB, Ha TJ, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Gal SW, and Park KH (2008) Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou* (S.) Koidz. *J Enzyme Inhib Med Chem* **23**, 922-930.
- 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.
- Solano F, Briganti S, Picardo M, and Ghanem G (2006) Hypopigmenting agents: An update review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res* **19**, 550-571.
- Sun J, Cai S, Yan WN, and Mei H (2010) Docking and 3D-QSAR studies of influenza neuraminidase inhibitors using three-dimensional holographic vector of atomic interaction field analysis. *European J Med Chem* **45**, 1008-1014.
- 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.
- 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-dihydroxy benzamide derivatives. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **30**, 491-497.
- Tokiwa Y, Kitagawa M, and Raku T (2007) Enzymatic synthesis of arbutin undecylenic acid ester and its inhibitory effect on mushroom tyrosinase. *Biotechnol Lett* **29**, 481-486.
- 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.
- 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.
- Zhang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, and Wei D (2007) Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanism of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J Enzyme Inhib Med Chem* **22**, 83-90.
- Zheng ZP, Cheng KW, To JT, and Li H (2008) Isolation of tyrosinase inhibitors from *Artocarpus heterophyllus* and use of its extract as antibrowning agent. *Mol Nutr Food Res* **52**, 1530-1538.