

## 마우스 흑색종세포에서 Purpurogallin의 멜라닌 생성 억제 효과

- 연구노트 -

김한혁<sup>1</sup> · 김태훈<sup>2</sup>

<sup>1</sup>경북테크노파크 첨단메디컬융합섬유센터

<sup>2</sup>대구대학교 식품공학과

### Antimelanogenic Effect of Purpurogallin in Murine Melanoma Cells

Han-Hyuk Kim<sup>1</sup> and Tae Hoon Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Advanced Medical Fusion Textile Center, Gyeongbuk Technopark Foundation

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University

**ABSTRACT** Melanin is one of the most important factors affecting skin color. Melanogenesis is the bioprocess of melanin production by melanocytes in the skin and hair follicles and is mediated by several enzymes, such as tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1, and TRP-2. Convenient enzymatic transformation of the simple phenol pyrogallol with polyphenol oxidase originating from pear to an oxidative product, purpurogallin, was efficient. The structure of the pyrogallol oxidation product was identified on the basis of spectroscopic methods. The biotransformation product purpurogallin showed significant inhibitory effects against both melanin synthesis and tyrosinase activity in a dose-dependent manner in B16 melanoma cells. In addition, purpurogallin significantly attenuated melanin production by inhibiting TRP-1, and TRP-2 expression through modulation of their corresponding transcription factors, and microphthalmia-associated transcription factor in B16 cells. Consequently, purpurogallin derived from convenient enzymatic transformation of pyrogallol might be a beneficial material for reducing skin hyperpigmentation.

**Key words:** biotransformation, polyphenol oxidase, antimelanogenesis, oxidation product

### 서 론

피부세포는 자외선과 환경오염 및 그 밖의 요인에 의한 자극의 방어 기전으로 포유동물의 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)의 멜라노좀에서 tyrosine이 tyrosinase 효소에 의해 멜라닌을 생성한다(1). 멜라닌 생성과 관련하여 잘 알려진 효소로는 tyrosinase 외에도 tyrosinase related protein-1(TRP-1)과 dopachrome tautomerase(DCT) 등이 있다. 그러나 이 중에서 tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 결정 단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)으로 전환시키는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화시키는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. 또한 TRP-1은 mouse에서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소로 작용하나, human TRP-1은 이러한 활성이 없는 것으로 보고되었다(2). 과거 DCT는 tyrosinase related protein-2(TRP-2)로

불렸던 효소로 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 능력을 가지고 있는 효소이다. 그중 tyrosinase 효소는 eumelanin과 pheomelanin의 합성에 반드시 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(3,4).

자외선(ultraviolet)에 의한 피부 손상이나 노화 또는 발암으로부터 신체를 보호하기 위한 멜라닌의 생성은 색소의 합성이나 분포의 기능에 장애가 있을 경우 다양한 피부 질환을 유발하게 되며, 과도한 색소의 침착은 흑색종, 주근깨, 노인성 검버섯 등을 생성시키는 것으로 알려져 있다. 최근에 사람들의 미적 욕구와 건강에 대한 관심이 증가하면서 화장품업계에서는 멜라닌의 생성을 억제하는 기능성 화장품의 개발에 대한 관심이 점점 높아지고 있다(5,6). 최근에는 melanin 과잉 생성을 억제하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 지금까지 알려진 tyrosinase의 저해제로 hydroquinone, arbutin 및 kojic acid 등이 있다. 그러나 피부 안전성 및 제품 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있으며(7), 이에 따라 melanin 합성을 감소시키고 동시에 부작용이 없는 천연소재 개발이 주목을 받고 있다.

녹차에는 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG) 등 다량의 폴리페놀이 함유되어 있는데 이들 화합물은 녹차 잎에 존재하는 polyphenol oxidase에 의해 카테킨의 catechol

Received 10 August 2015; Accepted 7 September 2015  
Corresponding author: Tae Hoon Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38453, Korea  
E-mail: skyey7@daegu.ac.kr, Phone: +82-53-850-6533

과 pyrogallol 부분이 산화되고 benzotropolone의 새로운 구조를 가진 theaflavin과 같은 축합물을 생성한다(8). 본 연구에서는 이전 연구에서 보고한 폐놀성 화합물의 효소반응 산화생성물의 항염증 효능 평가를 수행한 실험과 동일한 방법(9)으로 배 유래의 polyphenol oxidase를 효소원으로 하여 폐놀성 화합물인 pyrogallol이 산화반응에 의해 형성되는 purpurogallin의 피부 미백 활성을 위한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

Tyrosinase 효소 활성을 위하여 사용된 dimethyl sulfoxide(DMSO), L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 및 pyrogallol은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 HyClone(Logan, UT, USA)에서 구입하였고 Haemacytometer는 Paul Marienfeld GmbH & Co. KG(Lauda-Königshofen, Germany) 제품을 구입하여 사용하였으며, microphthalamic associated transcription factor(MITF), TRP-1, TRP-2, tyrosinase primary antibody와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santa Cruz(Texas, CA, USA)에서 구입하였다.

HPLC는 LC-10A(Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 화합물의 구조결정을 위하여  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR과  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HSQC, HMBC 스펙트럼은 CD<sub>3</sub>OD 용매( $\delta_{\text{H}}$  3.35,  $\delta_{\text{C}}$  49.0)를 이용하여 600 MHz FT-NMR spectrometer(Varian VNS600, Varian, Palo Alto, CA, USA)로 측정하였으며, 분석 및 column chromatography

용 용매는 특급시약을 사용하였다. Column chromatography 용 고정상은 YMC gel ODS AQ 120S(YMC Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 순수물질 분리를 하였다.

### Purpurogallin 제조

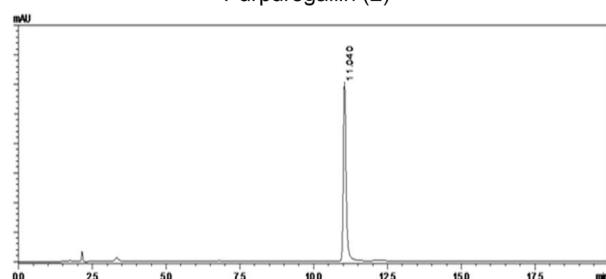
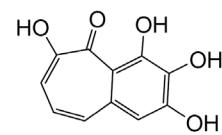
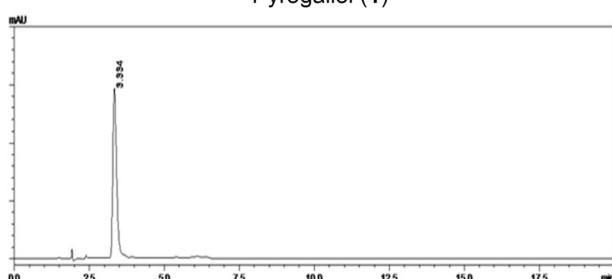
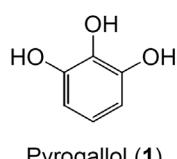
경산에서 생산된 배(280 g)를 중류수 280 mL에 넣어 잘게 마쇄한 후 균질화하고 5겹의 거즈로 여과한 다음 이 균질 혼탁액(160 mL)에 중류수(40 mL)로 녹인 pyrogallol(200 mg)을 첨가하고 실온에서 3시간 동안 교반시킨다. 이 여과액을 10% 메탄올(100 mL)에 혼탁시킨 후 EtOAc로 분획하여 EtOAc 가용분획 205.1 mg을 얻었고, 역상 HPLC로 분석하여 화합물의 생성을 확인하였다.

### Purpurogallin의 분리

EtOAc 가용분획 100 mg을 YMC gel ODS AQ 120S(1.1 cm i.d.×37 cm)를 이용한 칼럼크로마토그래피를 수행하여 50% MeOH 용리액에서 purpurogallin(83.5 mg;  $t_{\text{R}}$  11.0 min)을 순수 분리하였다(Fig. 1). 이동상 용매로는 0.1% HCOOH(solvent A)와 acetonitrile(solvent B)을 사용하여 gradient elution을 다음과 같이 수행하였다. 0~1 min, 100% A; 95% B로 물질 분석 및 분리를 하였으며 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 280 nm에서 화합물을 검출하였다. HPLC 분석용 칼럼은 YMC-Pack ODS A-302 column(4.6 mm i.d.×150 mm; YMC Co., Ltd.)을 사용하여 분석하였다.

### 세포배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin(100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. Melanoma(B16F10) 세포에 시료용액의 여러 농도(2.5, 5, 10, 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) 또는 양성 대조군을 1시간 전 처리한 후  $\alpha$ -MSH(10 nM/mL)를 처리하고 48시간 배양



**Fig. 1.** HPLC chromatograms of oxidative product by pear polyphenol oxidase and structures of pyrogallol (1) and purpurogallin (2).

하였다.

#### MTT assay에 의한 세포생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael(10)의 방법에 따라 측정하였다. 세포주 melanoma(B16F10)를 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

#### Melanoma cell(B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 측정

피부 멜라노마 세포로부터의 tyrosinase 활성 측정은 Martinez-Esparza(11)의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100 mm culture dish에  $2 \times 10^6$  cells/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하였다. Lysis buffer를 200 μL씩 분주한 후 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 lysis 시켰다.

#### Western blot을 이용한 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 저해 활성을 측정

미백 관련 mechanism인 MITF, TRP1, TRP2, tyrosinase 활성을 보기 위하여 melanoma cell인 B16F10 cell suspension을 100 mm culture dish에 각 well당  $2 \times 10^4$  cells/mL로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 PP-1을 농도별(2.5, 5, 10, 25 μM)로 처리한 배지로 48시간 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Lysis buffer 100 μL로 용해해서 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액만을 모은다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 20 μL의 단백질을 10%의 SDS-polyacrylamide에 전기 영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer cell(Bio Rad, Seoul, Korea)을 이용하여 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 MITF(Santa Cruz, 1:1,000), TRP-1(Santa Cruz, 1:1,000), TRP-2(Santa Cruz, 1:1,000), tyrosinase(Santa Cruz, 1:1,000), β-actin(Santa Cruz, 1:1,000) 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night 한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세정하고 mouse anti-rabbit IgG HRP, bovine anti-goat IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안

배양하였다. 3회 washing 한 뒤 암실에서 ECL(Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) 용액으로 반응시키고 LAS4000 chemiluminescence detection system(Fuji, Tokyo, Japan)을 이용하여 밴드를 확인하고 density를 측정하였다.

#### 통계처리

실험 결과는 SPSS package program(version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 실험군 간 차이의 유의성은 one-way ANOVA와 Student *t*-test에 의하여 *P*<0.05 수준에서 검증하였다.

#### 결과 및 고찰

#### Polyphenol oxidase에 의한 pyrogalloi의 생물 전환 및 purpurogallin의 구조 결정

페놀성 화합물은 인간이 섭취하는 과일, 야채 및 주스, 차, 커피, 와인 등의 음료에 풍부하게 존재하는 천연 항산화 물질이며, 그중에서 pyrogallol은 벤젠에 세 개의 수산기를 가지는 단순 페놀로 잘 알려져 있다(12). 최근의 연구에서는 차 및 커피에 존재하는 gallic acid가 장내에서 변화하여 pyrogalloi이 생성되며 이들 화합물이 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으나(13), pyrogallol의 산화반응물에 대한 효능에 대한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 천연에 광범위하게 존재하는 성분인 pyrogallol에 대해서 배의 polyphenol oxidase를 활용하여 간편한 효소적 산화반응을 유도한 후 1% formic acid 및 MeCN을 이동상으로 하여 280 nm에서 역상 HPLC를 활용하여 분석한 결과 pyrogalloi 3.34 min에서 검출되었으며, polyphenol oxidase에 의해 반응하여 생물 전환된 화합물이 11.04 min에서 확인되었다(Fig. 1).

Polyphenol oxidase에 의해 생성된 화합물의 구조를 결정하기 위하여 산화반응물을 EtOAc로 분획하여 당을 제거하고 ODS gel을 이용한 column chromatography를 수행하여 순수한 물질을 얻었으며, 얻어진 화합물의 구조 결정을 위하여 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C의 1D NMR과 DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HMQC 등의 2D NMR을 측정하여 단일물질의 구조를 결정하였다.

Purpurogallin(2): Orange-red powder; positive FAB-MS: *m/z* 221 [M+ H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> 7.27(1H, d, *J*=11.0 Hz, H-3), 7.05(1H, d, *J*=9.0 Hz, H-5), 6.83(1H, s, H-6), 6.70(1H, t, *J*=10.2 Hz, H-4); <sup>13</sup>C-NMR(150 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub> 183.8(C-1), 156.2(C-2), 152.8(C-7), 152.6(C-9), 135.9(C-5a), 135.6(C-5), 135.2(C-8), 124.6(C-4), 116.8(C-3), 116.3(C-9a), 111.4(C-6).

화합물 2는 오렌지색의 붉은 분말상 물질로 얻어졌으며, FAB-MS 측정 결과 *m/z* 221 [M+ H]<sup>+</sup>에서 ion peak를 확

인하여 분자식인  $C_{11}H_8O_5$ 를 추정하였다.  $^1H$ -NMR 스펙트럼에서는 aromatic proton 영역  $\delta_H$  6.83(1H, s, H-6)에서 고립된 방향족 수소가 관찰되었으며,  $\delta_H$  7.27(1H, d,  $J=11.0$  Hz, H-3), 7.05(1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-5), 6.70(1H, t,  $J=10.2$  Hz, H-4)에서 3개의 olefinic 수소 시그널이 관찰되었다. 위의  $^1H$ -NMR 스펙트럼과 함께  $^{13}C$  NMR 스펙트럼의  $\delta_C$  183.8(C-1)에서 한 개의 carbonyl 탄소,  $\delta_C$  156.2(C-2), 135.6(C-5), 124.6(C-4), 116.8(C-3)에서 네 개의 olefinic 탄소가 관찰되었으며,  $\delta_C$  152.8(C-7), 152.6(C-9), 135.9(C-5a), 135.2(C-8), 116.3(C-9a), 111.4(C-6)에서 벤젠유래의 탄소가 관찰되었다. 이상의 1D NMR 결과와 함께 2D NMR( $^1H$ - $^1H$  COSY, HMQC, HMBC)을 측정하여 본 화합물은 pyrogallol 두 분자가 산화 축합된 pyrogallol 유도체임을 시사한다. 이상의 결과 및 문헌치(14)와 비교하여 본 화합물은 purpurogallin으로 동정하였다.

#### MTT assay에 의한 세포생존율을 측정

세포생존율을 확인하기 위한 MTT 검색법은 96 well plate를 사용하였으며, 측정 결과를 ELISA reader를 이용하여 많은 시료를 편리하게 평가할 수 있어 세포독성 검색법으로 널리 사용하고 있는 방법 중의 하나이다(15). 피부 흑색종의 경우 대사 과정에서 미토콘드리아 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색의 수용성 MTT formazan으로 환원시키며, 이 물질의 흡광도는 550 nm에서 최대 흡수파장을 가지는 것을 이용하여 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 파악할 수 있다. 먼저 pyrogallol의 polyphenol oxidase에 의해 생물 전환된 화합물인 purpurogallin에 의한 melanoma 세포의 생존율을 확인한 결과를 Fig. 2와 같이 나타내었다. Purpurogallin을 2.5, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M의 농도를 처리한 결과 50  $\mu$ M의 농도에서 60% 세포생존율을 나타내어 독성을 나타내었지만, 2.5, 5, 10, 25  $\mu$ M에서는 80% 이상의 높은 세포생존율을 나타내었다. 따라서 purpurogallin은 B16F10 cell에서 높은 생존율을 가지는 것을 확인하였고 본 화합물의 농도 설정은 2.5, 5,

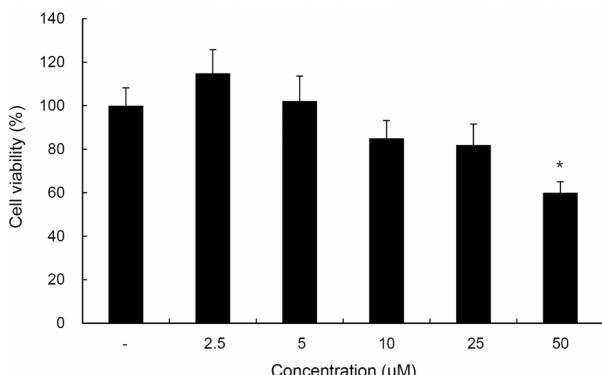


Fig. 2. Cell viability of purpurogallin (2) on melanoma cell (B16F10). Results were expressed as % of control and data were mean $\pm$ SD of at least three determinations. \* $P<0.05$  vs. control.

10, 25  $\mu$ M로 수행하였다.

#### Melanoma cell(B16F10)에서의 tyrosinase 저해 활성 평가

Tyrosinase는  $Cu^{2+}$ 와 결합한 효소로 동식물, 미생물 및 사람 등에 광범위하게 존재하는 polyphenol oxidase로 멜라닌 합성과정에서 반응 속도를 제한하는 등 멜라닌 생합성의 중요한 조절단계의 효소이다. 또한 멜라닌세포에서 멜라닌을 합성하는 주요 기전은 tyrosinase가 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하면서 시작된다(16). 본 실험에서는 pyrogallol로부터 산화 축합 생성된 purpurogallin에 대해서 이러한 활성을 검증하기 위하여 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. Purpurogallin의 경우 2.5, 5, 10, 25  $\mu$ M에 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 25  $\mu$ M의 경우 20% 이상의 tyrosinase 활성 저해능을 나타내며, purpurogallin은 tyrosinase의 활성을 직접적으로 저해함으로써 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 판단된다.

#### Melanoma cell(B16F10)에서의 melanin 생합성 측정

멜라닌은 세포 내의 소기관인 ribosome에서 tyrosinase 작용에 의해서 합성되며, 이 효소의 작용으로 아미노산인 tyrosine은 몇 단계의 과정을 거쳐 피부 기저층의 멜라닌세포의 흑색소포 표면에 침착하여 검고 갈색의 작은 melanin 입자가 형성된다(17). 배 유래의 폴리페놀 산화효소를 활용한 pyrogallol 산화생성물인 purpurogallin에 대해 멜라닌세포에서 멜라닌의 생합성을 측정하였다(Fig. 4). Purpurogallin의 경우 2.5, 5, 10, 25  $\mu$ M에 농도 의존적으로 melanin 생합성이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 25  $\mu$ M의 농도에서 purpurogallin의 경우 20% 이상의 melanin 생합성 저해 활성을 나타내며, 이는 대조군인 kojic acid가 2.5  $\mu$ M

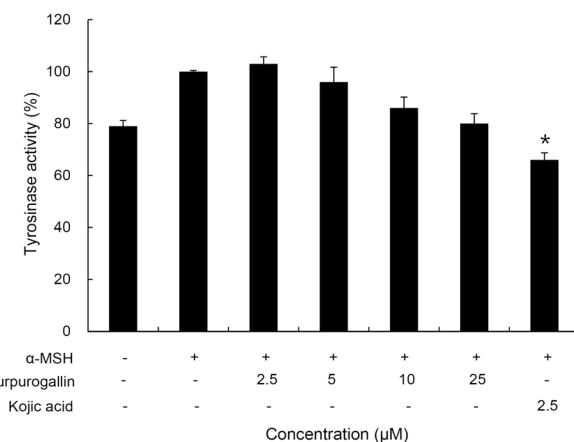


Fig. 3. Tyrosinase activity of purpurogallin (2) on melanoma cell (B16F10). Results were expressed as % of control and data were mean $\pm$ SD of at least three determinations. \* $P<0.05$  vs. control.

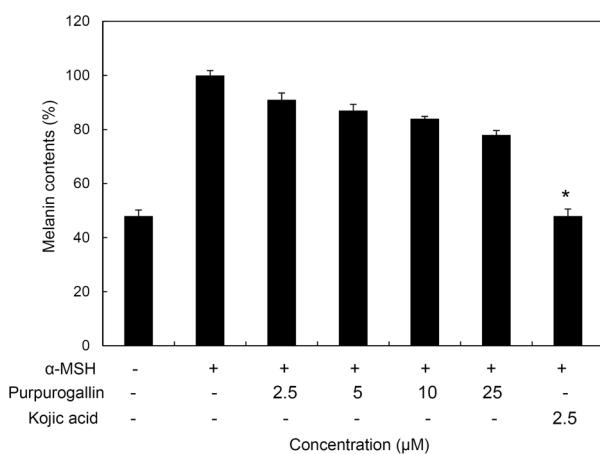


Fig. 4. Melanin contents of purpurogallin (2) on melanoma cell (B16F10). Results were expressed as % of control and data were mean $\pm$ SD of at least three determinations. \* $P<0.05$  vs. control.

에서 약 50%의 melanin 생합성 저해 활성을 나타내는 것과 비교할 수 있음을 확인하였다.

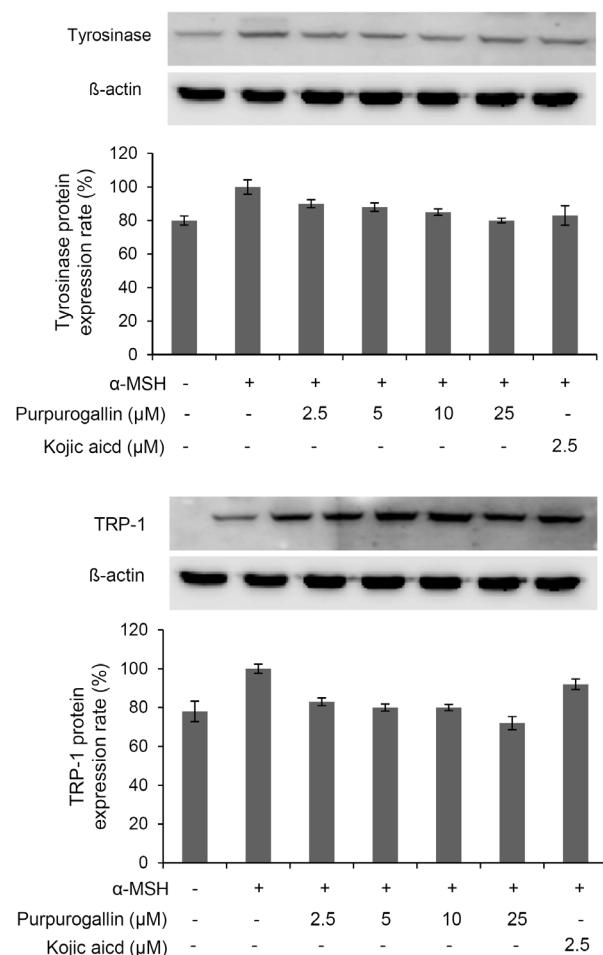
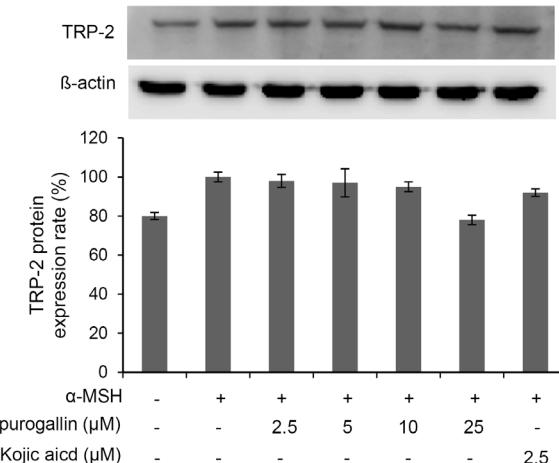
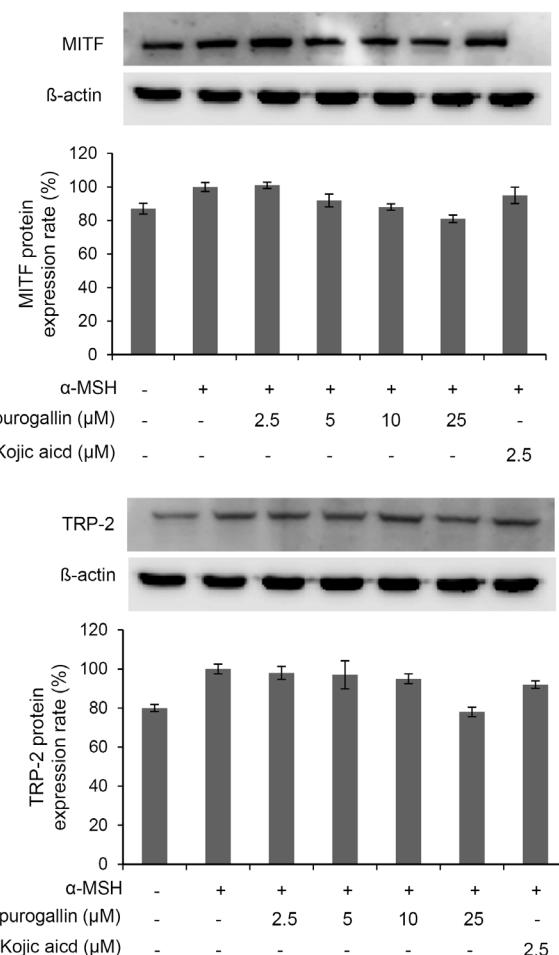


Fig. 5. Purpurogallin (2) caused a dose-dependent inhibition of whitening related protein B16F10 cells. After B16F10 cells ( $1\times 10^6$  cells) were starved in serum free medium for 1 h the cells were treated with 2.5, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$  of acetone and purpurogallin for 48 h. Protein was detected by western blotting analysis with their antibodies, respectively.

#### MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 활성 측정

멜라닌 생합성 신호전달 체계는 매우 다양한 신호전달물질이 관여하고 있다. 멜라닌은 몇 가지 세포 내 신호전달기전을 통하여 합성되며, 그중 cAMP/PKA 경로가 melanin 합성의 주요 경로로 자외선에 피부가 노출되었을 경우 멜라닌세포의 cAMP가 증가하여 하류 신호전달물질인 PKA를 활성화시키며, cAMP-response element-binding protein(CREB)을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다. MITF는 멜라닌 합성과정에서 중요한 전사조절인자로서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다(18,19). Purpurogallin이 melanin 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma 세포에 purpurogallin을 2.5, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 후 48시간 뒤에 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein 발현을 western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인  $\beta$ -actin을 positive control로 사용하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 purpurogallin을 처리하지



않은 B16F10군에서는 각 전사인자의 단백질 발현이 증가하였지만, purpurogallin을 2.5, 5, 10, 25 μM의 농도로 처리한 B16F10군에서는 tyrosinase protein의 발현이 처리하지 않은 군보다 감소하였다. Purpurogallin의 경우 25 μM의 농도에서 tyrosinase의 단백질 발현량을 10% 가까이 저해하였으며, TRP-1, TRP-2 또한 약 25%와 20% 정도 저해하였다. 또한 purpurogallin은 미백 관련 전사인자인 MITF를 25 μM 농도에서 약 15%의 저해 활성을 나타냄으로써 본 화합물은 미백에 관련된 전사인자의 발현에도 효과를 나타냄을 확인하였다. 이상의 결과로부터 purpurogallin은 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하고 melanocyte 세포 수준에서의 활성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 나타났다.

최근 녹차의 polyphenol 산화효소를 활용한 catechin류의 생물전환을 수행하여 quinone 등의 구조를 가진 갈색의 catechin 축합물들이 생성된다고 보고되어 있으며(20,21), 이들과 관련된 catechin 이랑체 화합물은 동물실험에서 강력한 항당뇨 활성을 나타내는 것을 확인하였다(22). 본 연구팀에서도 배 유래의 폴리페놀 산화효소를 활용하여 phenylpropanoid 화합물의 산화반응을 통해 lignan 화합물을 생합성하였고 이들 신규 화합물의 cyclooxygenase-2에 대한 저해 활성의 결과를 보고하였다(9). 본 연구에서는 배 유래의 polyphenol oxidase를 활용하여 pyrogallol의 산화축합반응 생성물인 purpurogallin의 기능성 화장품 소재로서의 가치를 탐색하고자 미백 활성을 평가하였다. 미백 효과를 검증하기 위하여 마우스 흑색세포종 cell line인 B16F10 cell을 이용하여 추출물의 세포 독성 확인 및 melanin 생합성 검증, 멜라닌 생합성에 관련되어 있는 전사 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현을 측정하여 미백 소재 개발을 위한 천연유래 자원 활용 가능성을 확인하였다. 추가적인 연구로 purpurogallin의 미백 활성 기전을 밝히기 위하여 melanin 생합성을 증가시키는 유전자를 조절하는 인자들의 활성 검증 및 청정화학방법을 통하여 약 80% 이상의 합성 수율로 얻어진 본 화합물은 미백 소재 개발을 위하여 천연유래 자원을 활용한 유용한 시도였으며, 추가적인 기술 개발 및 응용 기술개발이 필요하다고 사료된다.

## 요 약

천연 미백소재 개발과 관련하여 많은 연구들이 멜라닌 합성 저해 및 활성 메커니즘을 규명하는 데 초점이 맞춰졌으며, 이러한 이유로 tyrosinase 저해제 개발이 다양하게 이루어져 왔다. 본 연구는 배 유래의 polyphenol oxidase를 이용하여 천연에 존재하는 단순 폴리페놀인 pyrogallol의 산화축합반응을 유도하여 purpurogallin을 효율적으로 생합성하였으며, 본 화합물에 대해서 미백 활성을 평가하였다. 먼저 MTT assay를 통해 세포독성이 없는 농도구간을 설정하-

였으며, purpurogallin은 25 μM 농도의 melanoma 세포 내에서 tyrosinase 활성을 20% 이상 저해하는 것을 확인하였다. 또한 25 μM의 시험 농도에서 purpurogallin은 약 20% 이상의 melanin 생합성 저해 활성을 나타내었다. 미백 관련 전사인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현을 측정한 결과, 본 화합물은 B16F10 melanoma 세포에서 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 단백질 생합성을 두 추출물 모두 억제하는 것을 확인하였다. Tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현을 조절하는 전사인자로는 MITF가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 실제로 MITF는 melanin 생성과 관련된 여러 유전자의 발현을 조절하는 데 중요한 작용을 하고 있다. 따라서 purpurogallin은 melanin 생성과 관련된 중요한 세 가지 단백질의 생합성을 전사단계에서 조절 전사인자인 MITF의 단백질 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 멜라닌 생합성에 있어서 상위 신호단계에 있는 전사인자 MITF의 활성을 억제함으로써 하위 신호전달 과정을 억제하는 것임을 시사하며, 향후 추가적인 겸중작업을 통해 화장품 소재화가 가능할 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- Agar N, Young AR. 2005. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?. *Mutat Res* 571: 121-132.
- Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1247: 1-11.
- Hearing VJ. 1999. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4: 24-28.
- del Marmol V, Beermann F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett* 381: 165-168.
- Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. 1998. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 11: 206-212.
- Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ Jr, Dooley TP. 1992. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol* 57: 663-672.
- Desmedt B, Rogiers V, Courses P, De Beer JO, De Paepe K, Deconinck E. 2013. Development and validation of a fast chromatographic method for screening and quantification of legal and illegal skin whitening agents. *J Pharm Biomed Anal* 83: 82-88.
- Li Y, Shibahara A, Matsuo Y, Tanaka T, Kouno I. 2010. Reaction of the black tea pigment theaflavin during enzymatic oxidation of tea catechins. *J Nat Prod* 73: 33-39.
- Bae JS, Kim TH. 2012. Enzymatic transformation of caffeic acid with enhanced cyclooxygenase-2 inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 793-796.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
- Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Loza-

- no JA, García-Borrón JC. 1998. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255: 139-146.
12. Sies H. 2010. Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 501: 2-5.
13. Yasuda T, Inaba A, Ohmori M, Endo T, Kubo S, Ohsawa K. 2000. Urinary metabolites of gallic acid in rats and their radical-scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *J Nat Prod* 63: 1444-1446.
14. Nonaka GI, Hashimoto F, Nishioka I. 1986. Tannins and related compounds. XXXVI. Isolation and structures of theaflagallins, new red pigments from black tea. *Chem Pharm Bull* 34: 61-65.
15. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 47: 5875-5879.
16. Kwak JH, Seo UK, Han YH. 2001. Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 220-223.
17. Huang HC, Chou YC, Wu CY, Chang TM. 2013. [8]-Gingerol inhibits melanogenesis in murine melanoma cells through down-regulation of the MAPK and PKA signal pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 438: 375-381.
18. Buscà R, Ballotti R. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13: 60-69.
19. Sassone-Corsi P. 1998. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 27-38.
20. Li Y, Shibahara A, Matsuo Y, Tanaka T, Kouno I. 2010. Reaction of the black tea pigment theaflavin during enzymatic oxidation of tea catechins. *J Nat Prod* 73: 33-39.
21. Tanaka T, Miyata Y, Tamaya K, Kusano R, Matsuno R, Tamari S, Tanaka K, Matsui T, Maeda M, Kouno I. 2009. Increase of theaflavin gallates and thearubigins by acceleration of catechin oxidation in a new fermented tea product obtained by the tea-rolling processing of loquat (*Eriobotrya japonica*) and green tea leaves. *J Agric Food Chem* 57: 5816-5822.
22. Miyata Y, Tamari S, Tanaka T, Tamaya K, Matsui T, Nagata Y, Tanaka K. 2013. Theaflavins and theasinensin A derived from fermented tea have antihyperglycemic and hypotriacylglycerolemic effects in KK-A(y) mice and Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem* 61: 9366-9372.