

Kojic Acid Derivatives, Have Tyrosinase Inhibitory Activity to Suppress the Production of Melanin in the Biosynthetic Pathway

Jung Youl Park^{1*}, Ha Neul Lee², Meng Yang Hu² and Jeong Ho Park^{2*}

¹Department of Applied Chemistry, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea

²Department of Chemical & Biological Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

Received April 4, 2019 / Revised July 15, 2019 / Accepted July 17, 2019

Kojic acid (KA) is produced by *Aspergillus oryzae*-sort of like mushrooms, which is commonly called as *koji* in Japan. KA is used as a chelation agent and a preservative preventing oxidative browning of fruits. KA also shows antibacterial and antifungal properties. Because KA stops the production of melanin by inhibiting tyrosinase in the biosynthetic pathway from tyrosine to melanin in skin, it has been applied as a skin lightening ingredient in cosmetics. Since some animal studies have shown that high amounts of KA had side effects such as in liver, kidney, reproductive, cardiovascular, gastrointestinal, respiratory, brain, and nervous system, more efficient KA derivatives are needed to be developed in order to safely apply as a skin lightening ingredient. A series of KA derivatives via conjugated with triazole by click reaction were synthesized and their *in vitro* tyrosinase inhibitory activities were evaluated. Most of all KA derivatives have shown in moderate tyrosinase inhibitory activities. In case of KA-hybrid compound, **1-3** have shown tyrosinase inhibitory activities about 50~10,000 times more effective tyrosinase inhibitor compared to KA itself. Specifically, the IC₅₀ value of KA-hybrid compound, **2** was 0.0044±0.74 μM against tyrosinase. It is about 10,000 times more effective tyrosinase inhibitor compared to KA itself (IC₅₀ = 45.2±4.6 μM).

Key words : Antioxidant, Kojic acid, melanin, tyrosinase inhibitory activity, tyrosine

서 론

최근 인구의 노령화, 레이저 활동을 즐기는 인구의 증가로 인하여, 자외선에의 노출 빈도 증가, 사회적 스트레스의 증가, 그리고 환경오염에 의한 오존층의 파괴에 따른 자외선 조사량이 증가함에 따라 피부의 색소침착 이상 현상을 일으킬 수 있는 가능성이 증대되고 있다. 이러한 변화에 따라 피부 미백에 관한 관심도 증대되고 있다. 이러한 피부 미백에 대한 사회적 수요가 증가함에 따라 생체친화적이면서도 미백 활성이 높은 피부 미백 물질을 개발하는 것이 중요한 기술적 과제로 대두되고 있다.

사람의 피부색은 혈액내의 적혈구, 카로틴 및 멜라닌[2, 5]에 의해서 복합적으로 결정된다. 특히, 인종간의 피부색 차이나 기미, 주근깨 등의 과색소증[3, 10, 13]은 멜라닌의 영향으로 발생하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌은 피부 표피 내 기저층

에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트 내에 존재하는 티로시나아제(tyrosinase)에 의하여 티로신(tyrosine)으로부터 도파(DOPA), 도파퀴논(dopaquinone)으로 변환된 후 비효소적인 산화 반응을 통해 생성되며, 피부에서 자유 라디칼(free radical) 생성이 많아지거나, 염증반응이 있거나 또는 자외선 등에 지속적으로 노출되면 생성이 증가한다. 내외부의 스트레스적 자극에 의해 생겨난 멜라닌은 스트레스가 사라져도 피부 각질화를 통해서 외부로 배출되지 않는 안정한 물질로서, 과잉 생산된 멜라닌은 기미, 주근깨 등을 유발하는 등 문제가 되고 있다[4, 10, 12].

기미, 주근깨는 연속적인 자외선 조사를 받으면 표피 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)에서 성장인자 분비를 촉진시키고, 이러한 멜라노사이트(Melanocyte) 성장인자(growth factor)는 멜라닌 색소를 증가시키고 색소의 병리 현상을 일으켜 부분적인 색소 침착을 유발한다.

이러한 자외선에 대한 피부 장애 인자로서 활성 산소가 큰 역할을 한다는 것은 많은 연구를 통하여 밝혀지고 있다. 활성 산소 중에서도 가장 안정한 형태인 과산화수소(hydrogen peroxide)는 멜라노마(melanoma) 세포의 티로시나아제(tyrosinase)의 활성을 상승시키는 것으로 알려져 있고, 히드록실 라디칼인 경우는 멜라닌 생성의 첫 번째 합성 단계인 티로시나아제(tyrosinase)에 의한 티로신(tyrosine)이 도파(DOPA)의 수산화 반응 및 도파퀴논(dopaquinone)의 산화반응에서 촉진 역할을 하는 것으로 알려져 있다[7-9, 17].

*Corresponding authors

Tel : +82-42-280-4975, Fax : +82-42-280-4967

E-mail : jypark0908@dju.kr (Jung Youl Park)

Tel : +82-42-821-1548, Fax : +82-42-821-1593

E-mail : jhpark@hanbat.ac.kr (Jeong Ho Park)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

현재 유통되고 있는 피부 미백제는 멜라닌 색소가 생성되는 것을 억제하는 성분과 각질 등에 이미 침착돼 있는 멜라닌 색소를 제거하는 성분 등이 함유돼 있다. 멜라닌 색소의 형성을 억제하는 미백 성분으로는 알부틴, 코직산, 아스코르빈산 등이 있으며, 색소가 침착된 각질을 제거하는 물질로는 AHA (alpha hydroxyl acid), BHA (butylated hydroxyanisole), 레티노이드 등이 있다[1, 14]. 이러한 기준을 만족시키는 미백제를 합성하기 위해서 당 업계에서는 기존의 미백 활성이 있는 것으로 알려진 물질에 생체친화적인 물질을 도입시켜 미백 활성과 생체친화성을 적절히 조절하는 것과 동시에 저장 안정성을 확보하기 위한 노력을 해왔다.

현재까지 알려진 티로시나아제(tyrosinase)의 활성 억제제로 사용할 수 있는 미백 물질은 티로신의 가지에 있는 페놀과 유사한 구조를 가지는 환원성을 가지는 물질들이며, 코직산, 알부틴, 아스코르빈산 등이 이에 속한다.

코직산(Kojic acid)은 티로시나아제 활성을 억제하는 작용이 있다는 것이 밝혀졌다[6, 15]. 코직산의 멜라닌 생성 억제 작용은 크게 세 가지로 설명하고 있으며, 그 첫번째는 티로신으로부터 도파 및 도파퀴논(DOPA-quinone)으로의 산화를 촉진하는 티로시나아제(tyrosinase)의 불활성화이고, 다른 하나는 도파크롬(DOPACHrome)으로부터 5,6-디히드록시인돌-2-카르본산(HD12C)의 생성을 억제하는 작용이다. 상기 두 반응 모두 구리 이온과 같은 2가의 금속이온을 필요로 하며, 코직산이 구리 이온을 킬레이트화시켜 결과적으로 멜라닌 생성을 억제한다고 생각된다[11, 16]. 그리고 코직산은 DH12C 등의 멜라닌 단량체로부터의 멜라닌 생성도 억제한다.

그러나 코직산은 빛과 열, 그리고 pH에 대한 안정성 등이 좋지 않아 화장품 원료로 배합이 어렵다는 단점이 있다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 코직산-비타민C 복합체, 코직산-아미노산 복합체, 코직산-코직산 복합체(WO02/053562), 코직산-신남산 복합체(US5,486,624), 코직산-옥소티아졸리딘 복합체(US5,968,487), 코직산 모노지방산 에스테르(일본특허공개 소60-9722), 코직산 디지방산 에스테르(일본특허공개 61-60801), 코직산 배당체(일본특허공개 평6-56872) 등의 코직산 유도체가 개발된 바 있다.

따라서 티로시나아제(tyrosinase)를 효과적으로 저해하는 코직산과 항산화 기능을 갖는 항산화제 유도체를 클릭 반응을 통해 트리아졸로 연결하여 컨쥬게이트시킨 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물을 제조하여 항산화 기능과 함께 티로시나아제(tyrosinase)의 저해 활성을 동시에 가짐을 발견하고

효과에 대한 연구를 하였다.

재료 및 방법

코직산 컨쥬게이트 화합물 및 합성 방법

코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물

본 연구에 사용된 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물은 Fig. 1과 같이 코직산(KA)-Azide와 항산화제 유도체의 클릭 반응(Click reaction)을 통해 합성하였다. 이 유도체들은 항산화 기능과 함께 티로시나아제(tyrosinase)의 저해 활성을 동시에 가지고 있어 활성산소에 의한 피부의 손상을 방지할 뿐만 아니라 멜라닌 생성 억제에 따른 노화방지 및 미백효과를 나타내었다.

일반적인 클릭 반응으로 코직-아자이드 화합물을 아세톤에 용해시킨 후, 항산화제 유도체 및 Cu(PPh₃)₃Br (0.013 mmol)을 가하고 상온에서 밤새도록 반응시켰다. 반응 완료 후, 감압농축기로 반응 용매를 제거한 후 디클로로메탄(dichloromethane)으로 녹였다. 물로work-up한 후, 얻어진 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 여과 및 감압 농축하였다. 얻어진 crude 물질을 극소량의 디클로로메탄(dichloromethane)으로 녹인 후 디에틸에테르(diethyl ether)로 재결정하여 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물은 흰색 분말형태로 수득하였다. 클릭 반응을 통해 합성한 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물을 Fig. 2에 나타내었다.

코직-아자이드 화합물

클릭 반응에 사용되는 코직-아자이드 화합물을 합성하기 위해 Fig. 3과 같은 방법으로 합성하였다. 코직산(KA)을 디클로로포름알데히드(Dichloroformaldehyde)에 용해시킨 후, Oil bath를 설치하고 K₂CO₃, PMB-Cl을 첨가하고 80도에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 물과 디클로로메탄(dichloromethane)을 첨가하여 추출하고 얻어진 유기층을 무수 MgSO₄로 건조시킨 후 여과 및 감압 농축하였다. 얻어진 crude 물질을 극소량의 디클로로메탄(dichloromethane)으로 녹인 후 디에틸에테르(diethyl ether)로 재결정하여 코직산-PMB 화합물을 갈색 고체상태로 수득하였다. IR (KBr, v, cm⁻¹): 3434 (alcohol, OH); ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.49(s, 1H), 7.30(d, J=9.2Hz, 2H), 6.87(d, J=9.2Hz, 2H), 5.00(s, 2H), 6.47(s, 1H), 4.44(d, J=5.6Hz, 2H), 3.79(s, 3H). 얻어진 코직산-PMB 화합물을 디클로로메탄(dichloromethane)에 녹인 후 0

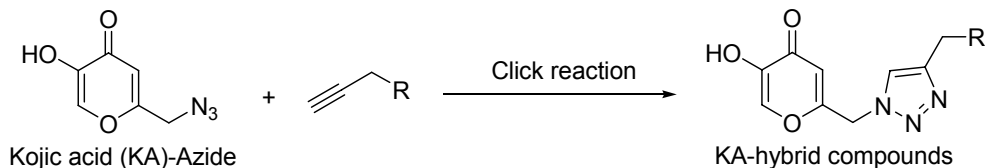


Fig. 1. General Click reaction.

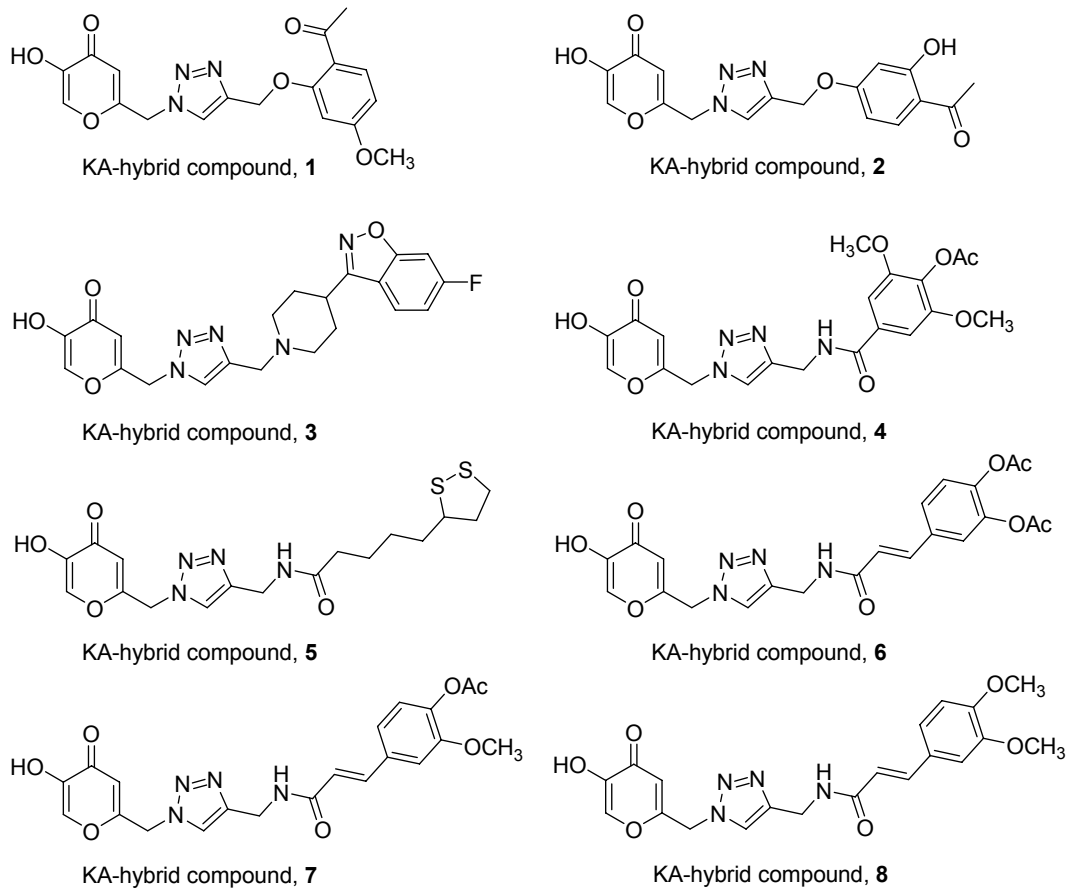


Fig. 2. Kojic acid (KA) conjugated compounds.

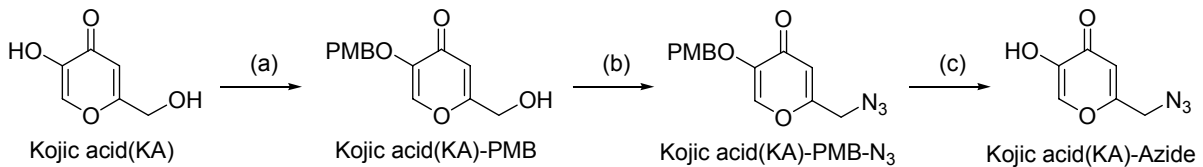


Fig. 3. Synthesis of Kojic acid (KA)-Azide. a) K_2CO_3 , PMB-Cl, DMF, reflux, b) MsCl, DIPEA, DCM, rt, then NaN_3 , MeCN, c) TFA, DMF, rt.

도에서 DIPEA (N,N-diisopropylethylamine)와 Mesyl chloride를 가하고 12시간 동안 반응시켰다. 반응 완결 후 물과 디클로로메탄(dichloromethane)을 첨가하여 추출하고 얻어진 유기층을 무수 $MgSO_4$ 로 건조시킨 후 여과 및 감압 농축하였다. 얻어진 crude물질을 실리카겔컬럼 크로마토그래피로 정제하여 코직산-PMB-메실 화합물을 갈색 분말형태로 수득하였다. 계속해서 얻어진 코직산-PMB-메실 화합물을 아세트나이트릴에 녹이고 소듐아자이드(Sodium azide, NaN_3)를 가하고 밤새도록 교반하였다. 반응 완결 후, 감압농축기로 반응 용매를 제거하고, 물과 디클로로메탄(dichloromethane)을 첨가하여 추출하고 얻어진 유기층을 무수 $MgSO_4$ 로 건조시킨 후 여과 및 감압 농축하였다. 얻어진 crude물질을 실리카겔컬럼 크로마토그래피로 정제하여 코직산-PMB-아자이드 화합물을 갈색

고체상태로 수득하였다. IR (KBr, v , cm^{-1}): 2098(azide, N_3); 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ 7.54(s, 1H), 7.32(d, $J=8.8Hz$, 2H), 6.90(d, $J=8.8Hz$, 2H), 6.42(s, 1H), 5.02(s, 2H), 4.14(s, 2H), 3.81(s, 3H). 마지막으로 PMB protecting group을 제거하기 위해 코직산-PMB-아자이드 화합물을 DMF에 녹이고 과량의 TFA (trifluoroacetic acid)를 첨가하고 30분간 반응시켰다. 반응 완결 후, 감압농축기로 반응 용매를 제거하고, 물과 디클로로메탄(dichloromethane)을 첨가하여 추출하고 얻어진 유기층을 무수 $MgSO_4$ 로 건조시킨 후 여과 및 감압 농축하였다. 얻어진 crude물질을 극소량의 디클로로메탄(dichloromethane)으로 녹인 후 헥산(Hexane)으로 재결정하여 코직-아자이드 화합물을 갈색 분말상태로 수득하였다. IR (KBr, v , cm^{-1}): 2115(azide, N_3), 3435(alcohol, OH); 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ 7.82(s,

1H), 6.45(s, 1H), 4.17(s, 2H).

코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물의 ¹H NMR 및 Mass data

KA-hybrid compound, 1. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 12.67(s, 1H), 7.80(s, 1H), 7.62(s, 1H), 7.57(d, J=9.6Hz, 1H), 6.62(d, J=9.6Hz, 1H), 6.57(s, 1H), 6.38(s, 1H), 5.44(s, 2H), 5.32(s, 2H), 3.86(s, 3H), 2.53(s, 3H); ESI-MS: m/z 372.3[M+H]⁺(calcd 371.3).

KA-hybrid compound, 2. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 12.67(s, 1H), 7.80(s, 1H), 7.70(s, 1H), 7.62(d, J=9.6Hz, 1H), 6.50(d, J=9.6Hz, 1H), 6.49(s, 1H), 6.34(s, 1H), 5.39(s, 2H), 5.22(s, 2H), 2.53(s, 3H); ESI-MS: m/z 358.3[M+H]⁺(calcd 357.3).

KA-hybrid compound, 3. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 7.67(m, 1H), 7.62(s, 1H), 7.24(m, 1H), 7.05(m, 1H), 6.36(s, 1H), 5.41(s, 2H), 3.78(s, 2H), 3.09(m, 1H), 3.08(m, 2H), 2.30(m, 2H), 2.08(m, 4H); ESI-MS: m/z 426.4[M+H]⁺(calcd 425.41).

KA-hybrid compound, 4. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 7.81(s, 1H), 7.74(s, 1H), 7.01(s, 2H), 6.88(s, 1H), 6.35(s, 1H), 5.37(s, 2H), 4.71(d, J=5.6Hz, 2H), 3.84(s, 6H), 2.33(s, 3H); ESI-MS: m/z 445.4[M+H]⁺(calcd 444.39).

KA-hybrid compound, 5. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 8.24(s, 1H), 7.99(s, 1H), 7.94(s, 1H), 6.29(s, 1H), 5.50(s, 2H), 4.24(d, J=5.6Hz, 2H), 3.52(m, 1H), 3.06(m, 2H), 2.33(m, 1H), 2.04(t, 2H), 1.80(m, 1H), 1.59(m, 2H), 1.46(m, 2H), 1.29(m, 2H); ESI-MS: m/z 411.5[M+H]⁺(calcd 410.51).

KA-hybrid compound, 6. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 7.81(s, 1H), 7.70(s, 1H), 7.56(d, J=15.2Hz, 1H), 7.35(d, J=9.6 Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 7.29(s, 1H), 7.18(d, J=9.6Hz, 1H), 6.34(s, 1H), 6.32(d, J=15.2Hz, 1H), 5.28(s, 2H), 4.64(d, J=4.8Hz, 2H), 2.31(s, 6H); ESI-MS: m/z 469.4[M+H]⁺(calcd 468.42).

KA-hybrid compound, 7. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 7.83(s, 1H), 7.72(s, 1H), 7.59(d, J=15.6Hz, 1H), 7.09(d, J=8.0Hz, 1H), 7.07(s, 1H), 7.03(d, J=8.0Hz, 1H), 6.35(s, 1H), 6.34(d, J=15.6Hz, 1H), 6.24(s, 1H), 5.38(s, 2H), 4.66(d, J=6.0Hz, 2H), 3.85(s, 3H), 2.32(s, 3H); ESI-MS: m/z 427.4[M+H]⁺(calcd 426.38).

KA-hybrid compound, 8. ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): 7.81(s, 1H), 7.70(s, 1H), 7.56(d, J=15.6Hz, 1H), 7.07(d, J=8.0Hz, 1H), 6.84(d, J=8.0Hz, 1H), 6.33(s, 1H), 6.26(d, J=15.6Hz, 1H), 6.21(s, 1H), 5.36(s, 2H), 4.65(d, J=5.6Hz, 2H), 3.89(s, 6H); ESI-MS: m/z 413.4[M+H]⁺(calcd 412.4).

Cell cytotoxicity in MRC5 cell 측정

정상세포에서 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물의 세포 독성을 확인하기 위하여 MRC5 cell (human lung fibroblast, normal cell) 을 이용하여 측정하였다. Standard MTT

protocol로서 MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazolium Bromide], cell number: 4,000 cells/well (96well plate), Media: DMEM + 5% FBS +1% PS, compound treatment time: 72 hr, 5 mg/ml MTT solution을 각 well에 10 µL첨가한 후 2시간을 추가 incubation시킨 후에 media를 모두 제거하고 100 µl의 DMSO를 첨가하여 형성된 formazan을 녹여서 540 nm에서 absorbance를 측정하였다.

티로시나아제(tyrosinase) 억제 효과 측정

티로신(Tyrosine)이 도파(Dopa)로 산화되는 과정과 다음 단계인 도파가 도파퀴논(Dopaquinone)으로 산화되는 과정의 두 단계의 반응을 통해 티로신(Tyrosine)으로부터 멜라닌의 형성을 촉진하는 티로시나아제의 억제 효과를 측정하였다. 시료는 다음과 같이 준비하였다.

0.1M Pi 완충액(PH 6.8)의 제조: Pi acid form (NaH₂PO₄, 8.199g)과 Pi base form (Na₂HPO₄, 4.6 g)을 1 l의 증류수에 용해시킨 후, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

L-티로신(0.1mg/ml)의 제조: L-티로신(0.81 mg)를 0.1M Pi 완충액(PH 6.8)으로 용해시킨 후, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

티로시나아제 수용액의 제조: 티로시나아제는 1715 유닛(unit)을 사용하였다. 티로시나아제(1.16 mg)을 0.1M Pi 완충액(PH 6.8, 1.16 ml)로 용해시킨 후, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어 1715 유닛의 티로시나아제를 수용액 상태로 제조한다.

10% DMSO의 제조: 삼차수(9 ml)와 DMSO (1 ml)를 섞어 준다.

코직산 용액(대조군): 코직산 1 mg 당 1 ml의 10% DMSO 로 녹여준 후, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

코직산 컨쥬게이트 화합물 용액: 용해도가 좋은 경우 코직산과 같은 방법으로 용해시키고, 용해도가 좋지 않은 경우 1.04 mg의 코직산 컨쥬게이트 화합물을 먼저 DMSO (134 µl)에 용해시킨 후, 삼차수(1,206 µl)를 넣어준 다음, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

시료의 흡광도 측정을 위해 다음과 같이 각각의 시료(sample)을 준비하였다.

대조군(control): micro tube를 준비하여 0.1M Pi 완충액(PH 6.8) 400 µl, L-티로신(0.1mg/ml) 300 µl 그리고 티로시나아제 수용액 200 µl를 넣어준 후, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

시료(1 mg당 1 ml로 녹인 KA와 각 시료(sample)들을 사용하여 만든다.): 코직산 또는 코직산 컨쥬게이트 화합물 용액 100 µl, 0.1M Pi 완충액(PH 6.8) 400 µl, L-티로신(0.1 mg/ml) 300 µl 그리고 티로시나아제 수용액 200 µl를 넣어준 후, 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

Table 1. Cell cytotoxicity in MRC5 cell

Compounds	1.6	8	40	200	1,000	5,000	GI50(μM)
Kojic acid(KA)	103.5	107.3	104.7	104.0	102.6	79.2	> 5,000
Kojic acid(KA)-Azide	103.1	102.0	99.4	96.7	76.8	65.3	> 5,000
KA-hybrid compound, 1	100.5	97.7	97.0	95.9	81.8	82.0	> 5,000
KA-hybrid compound, 2	102.6	101.5	101.5	97.1	84.7	63.2	> 5,000
KA-hybrid compound, 3	100.4	94.2	83.2	74.0	24.8	-	> 1,000
KA-hybrid compound, 4	101.5	104.4	103.1	68.0	63.4	45.6	> 5,000
KA-hybrid compound, 5	101.4	105.9	107.3	96.0	12.6	-	> 1,000
KA-hybrid compound, 6	102.8	107.0	97.5	64.8	57.9	39.5	> 5,000
KA-hybrid compound, 7	102.3	103.7	90.6	58.5	49.5	30.2	> 5,000
KA-hybrid compound, 8	102.3	101.3	80.5	46.6	42.3	34.1	> 5,000

시료(sample) 자체: 코직산 또는 코직산 컨쥬게이트 화합물 용액 100 ml와 0.1 M Pi 완충액(PH 6.8) 900 μl를 볼텍스믹서(voltex mixer)를 이용하여 잘 섞어준다.

결과 및 고찰

Cell cytotoxicity in MRC5 cell 측정

정상세포인 MRC5 cell (human lung fibroblast, normal cell) 을 이용하여 코직산(KA), 코직산-아자이드, 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물의 세포 독성을 측정한 결과, 코직산(KA)과 유사한 결과를 나타내었다. 즉, 5 μM까지 정상세포에서의 독성을 나타내지 않았다. 다만, KA-hybrid compound 3, 5번은 1 μM부터 약간의 침전이 생기며, 5 μM에서는 세포 생존율을 측정할 수 없을 정도로 심각한 침전이 관찰되었다. 이 실험 결과로 미루어볼 때 유도체 화합물의 화학적 구조에 따른 용해도 차이로 인한 결과로 보이며, 이후에 용해도에 대한 연구를 이어갈 계획이다.

티로시나아제(tyrosinase) 억제 효과 측정

티로시나아제 억제 효과 측정은 상기와 같은 흡광도 측정 방법에 따라 각각의 시료(sample)을 대해서 480 nm에서 측정하고 아래의 식을 이용하여 티로시나아제 활성 효과를 구하였으며, 티로시나아제 효소 활성의 50%를 저해하는 값을 나타내는 IC₅₀으로 나타내었다. 대부분의 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물에서 티로시나아제 활성을 저해하는 효과가 나타났으며 Kojic acid보다도 높은 억제 효과를 나타내었다. 특히 compound, 1~3번은 Kojic acid보다 50~10,000배 정도의 억제 효과를 보였고 compound, 2번의 경우에는 Kojic acid보다 10,000배의 억제 효과를 보였다. 높은 티로시나아제 억제 효과를 보이고 있는 compound, 3번의 경우에 화학구조적인 용해도 개선을 통해 더 높은 활성을 기대할 수 있으며, 추가적인 연구를 통해 compound, 1~2번과 더불어 높은 티로시나아제 억제능을 가지는 소재로서 각광 받을 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이 연구를 통해서 화학구조적으로 코직산 모체로

부터 사슬이 짧은 경우(compound, 1~3번)에 티로시나아제 억제 효과가 높은 것으로 나타났으며, 상대적으로 사슬이 긴 경우에는 코직산과 유사한 티로시나아제 억제 효과를 보이고 있다.

멜라닌 생합성 작용은 여러 복잡한 신호망에 의해 엄격히 규제된다. 신호 네트워크 중에서 티로시나아제, TPR1, TPR2, MITF, CREB 및 ERK1/2는 멜라닌 합성에 있어서 잘 알려진 주요 규제인자이다[2, 4, 7, 8, 11, 14, 16]. 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물은 하이드록실화에 의해 L-타이로신의 L-도파로의 변환에 따른 멜라닌 생합성을 유도하는 티로시나아제의 발현과 활성을 억제한다. 더구나 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물은 티로시나아제, TRP1, TRP2 [14]의 대상 유전자의 인코딩 발현을 촉진하는 마스터 전사 요인인 MITF의 발현과 전사활성을 억제하는 것으로 보인다. 게다가 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물은 메커니즘으로 보아 CREB의 전사활동뿐만 아니라 ERK1/2와 CREB의 인산화도 억제할 것으로 기대된다. ERK/CREB신호는 MITF의 전사와 인산화를 규제하는 데 중요한 역할을 한다. 우리의 연구결과는 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물이 멜라닌 항-유도

$$\left(1 - \frac{\text{sample 흡광값} - \text{sample 자체 흡광값}}{\text{control값}}\right) \times 100 = \%$$

Table 2. Inhibitory effect of the Kojic acid (KA)-hybrid compounds on melanin production

Compounds	IC50 (μM)
Kojic acid (KA)	45.2±4.6
KA-hybrid compound, 1	0.88±0.39
KA-hybrid compound, 2	0.0044±0.74
KA-hybrid compound, 3	0.43±0.74
KA-hybrid compound, 4	1.52±0.73
KA-hybrid compound, 5	17.8±2.51
KA-hybrid compound, 6	37.79±0.12
KA-hybrid compound, 7	11.13±4.96
KA-hybrid compound, 8	12.75±4.31

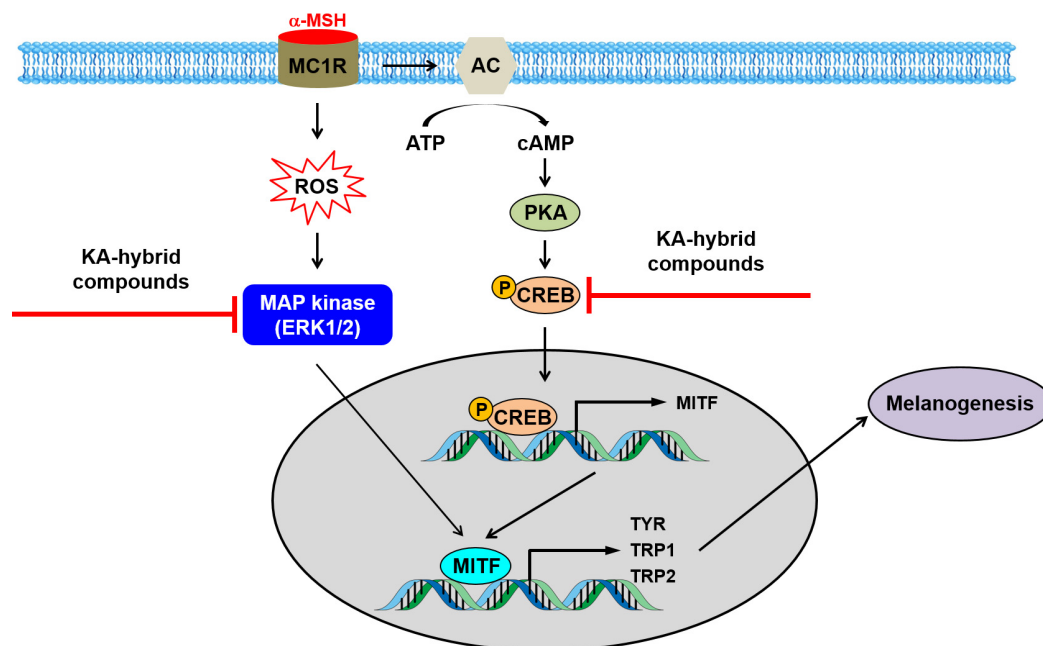


Fig. 4. A schematic diagram illustrating the proposed action mechanisms of KA-hybrid compounds. KA-hybrid compounds specifically targets the ERK/CREB signaling, thereby inhibiting MITF and MITF-regulated target genes including those encoding tyrosinase, TRP1, and TRP2. AC, adenylylate cyclase; α -MSH, alpha-melanocyte stimulating hormone; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CREB, cAMP response element-binding protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MC1R, melanocortin receptor type 1; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; PKA, protein kinase A; ROS, reactive oxygen species; TRP, tyrosinase-related protein; TYR, tyrosinase.

활성이 ERK/CREB신호의 억제와 연관되어 있으며, 따라서 티로시나아제, TRP1 및 TRP2인코딩이 포함된 MITF와 MITF-규제 유전자의 발현을 목표로 하고 있다(Fig. 4).

References

- Bonaventure, J., Domingues, M. J. and Larue, L. 2013. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 316-325.
- Costin, G. E. and Hearing, V. J. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976-94.
- Davis, E. C. and Callender, V. D. 2010. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **3**, 20-31.
- D'Mello, S. A., Finlay, G. J. and Baguley, B. C. and Askarian-Amiri, M. E. 2016. Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1144.
- EIObeid, A. S., Kamal-Eldin, A., Abdelhalim, M. A. K. and Haseeb, A. M. 2017. Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **120**, 515-522.
- Gunia-Krzyżak, A., Popiol, J. and Marona, H. 2016. Melanogenesis Inhibitors: Strategies for Searching for and Evaluation of Active Compounds. *Curr. Med. Chem.* **23**, 3548-3574.
- Hearing, V. J. 2011. Determination of melanin synthetic pathways. *J. Invest Dermatol.* **131**, E8-E11.
- Ito, S., Wakamatsu, K. 2008. Chemistry of mixed melanogenesis - pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **84**, 582-592.
- Lin, J. Y. and Fisher, D. E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843-850.
- Niu, C. and Aisa, H. A. 2017. Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: potential agents for vitiligo. *Molecules* **22**, E1303.
- Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. and Gilchrist, B.A. 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 1493-1506.
- Pillaiyar, T., Manickam, M. and Jung, S. H. 2017. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal.* **40**, 99-115.
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M. and Jung, S. H. 2018. Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *J. Med. Chem.* **61**, 7395-7418.
- Schiaffino, M. V. 2010. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1094-1104.
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M. and Ghanem, G. 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* **19**, 550-571.
- Videira, I. F., Moura, D. F. and Magina, S. 2013. Mechanisms

regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* **88**, 76-83.
17. Wolf Horrell, E. M., Boulanger, M. C. and D'Orazio, J. A.

2016. Melanocortin 1 receptor: structure, function, and regulation. *Front Genet.* **7**, 95.

초록 : 생체 내 경로에서 멜라닌 생성을 억제하는 타이로신 억제제로서의 코직산 유도체

박정열^{1*} · 이하늘² · 후맹양² · 박정호^{2*}

(¹대전대학교 응용화학과, ²국립한밭대학교 화학생명공학과)

코직산(Kojic acid)은 생리활성물질로서 많이 알려져 있으며 antibacterial, antifungal과 같은 효능을 나타낸다. 또한 티로시나아제(tyrosinase) 억제제로서 작용하여 멜라닌 생성을 저해시키기 때문에 화장품 산업에 있어서도 미백효과를 가지는 중요한 소재로서 각광받고 있다. 본 연구에서는 독립적으로 항산화 효과를 나타내는 유도체와 코직산(Kojic acid)을 연결하여 새로운 기능성을 가지는 신규 화합물을 발굴하고자 하였으며, 클릭 반응(Click reaction)을 통해 트리아졸(triazole)로 연결하여 신규 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물을 합성하였다. 먼저 신규 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물의 티로시나아제(tyrosinase) 억제 효과에 대해서 연구한 결과 대부분의 화합물이 코직산(Kojic acid)보다 우수한 티로시나아제(tyrosinase) 억제 효과를 나타냈다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 신규 코직산 컨쥬게이트(conjugated) 화합물은 항산화용 건강보조식품 조성물 및 항산화 소재, 노화방지 및 미백 기능을 가진 피부외용제 조성물의 유효성분으로 개발될 가능성이 매우 높다고 사료된다.