

궁궁이(*Angelica polymorpha* MAXIM)로부터 분리한 Coumarin 계열 화합물의 Melanin 생합성 억제 활성

백승화 · 김진희 · 김현아 · 이상명 · 이찬용¹ · 고영희 · 이충환*
한국생명공학연구원, 1대전대학교 이과대학 미생물학과

Melanin Biosynthesis Inhibitory Activities of Coumarins Isolated from *Angelica polymorpha* MAXIM. Baek, Seung-Hwa, Jin-Hee Kim, Hyun-A Kim, Sang-Myung Lee, Chan-Yong Lee¹, Yung-Hee Kho and Choong-Hwan Lee*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, ¹Department of Microbiology, Daejeon University – During the screening for inhibitors of melanin biosynthesis from plant extract, *Angelica polymorpha* MAXIM which showed a high level of inhibition was selected. The inhibiting substances were purified from methanol extract of *Angelica polymorpha* MAXIM followed by silica gel column chromatography and HPLC. The inhibitors were identified as heraclenin, isosaxalin and heraclenol 3'-Me ether, by spectroscopic methods of ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMQC and HMBC. These compounds did not have mushroom tyrosinase inhibitory activity, but showed a highly potent melanin biosynthesis inhibition zone in the plate culture of *Streptomyces bikiniensis*, a bacterium used as an indicator organism in this work. These compounds did not show any growth inhibition against *S. bikiniensis* at the same concentration of melanin biosynthesis test.

Key words: Melanin biosynthesis, inhibition zone, *Streptomyces bikiniensis*, *Angelica polymorpha* MAXIM

Melanin은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 동·식물, 미생물 등에 존재하는 melanin은 생육이나 발달에 필수적이진 않지만 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질로 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출되었을 때 발생하는 갈변이나, 동물의 외피, 깃털, 피부, 머리, 눈 등에서 관찰된다[1, 6].

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소 침착은 표피 내에서의 melanin 색소의 이상적 증가에 기인하며, 표피 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소 세포내의 melanosome에서 생합성 된다. Melanin 생합성에 key enzyme으로 알려진 tyrosinase는 melanosome 내에서 아미노산의 일종인 tyrosine을 산화시켜 dopa, indole-5,6-quinone으로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 melanin polymer를 생성하는 것으로 되어 있다[3,19].

피부에서의 melanin 생합성에는 필수 효소인 tyrosinase를 비롯하여 TRP-1(tyrosinase related protein-1) 및 TRP-2(dopachrome tautomerase)가 관련되는 것으로 알려져 있다 [5]. 또한 자외선이나 estrogen, testosterone, glucocorticoid,

prostaglandin 등과 같은 다양한 호르몬에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며[14, 20], 이외에도 dopachrome conversion factor, interferon(IFN), cyclic AMP 또는 melanocyte stimulation hormone(MSH), Vit D30, hitsamine 등이 melanin 생합성에 관여하는 것으로 보고되어 있다[13, 18, 21].

Melanin 생성 억제물질은 크게 두 가지 type으로 분류되고 있다. 하나는 melanin 생성의 key enzyme인 tyrosinase 효소자체를 직접 억제하는 type이고, 나머지 하나는 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제를 나타내지 않지만 색소 세포 내에 있어서의 melanin 생성을 억제하는 type이다[16]. 그 외에 melanin 색소 침착 방지를 위해 동물의 melanin 생합성 장소인 melanocyte의 기능을 저하시키기 위한 세포 독성 또한 중요 요인이 될 수 있다[6, 25]. 이처럼 melanin 생성 mechanism이 복잡하고 다양하기 때문에 tyrosinase 저해 실험 결과만으로 melanin 생성 억제를 말하기에는 부족하다. 그러므로 *in vitro*방법인 tyrosinase 저해 실험과 배양색소세포를 이용한 실험은 신규 melanin 생성억제물질을 효율적으로 탐색하는 수단으로써 필수적이다. 따라서 melanin 생합성 연구는 tyrosinase 억제 활성 연구뿐만 아니라 여러 가지 인자에 대한 다각적인 연구가 필요하다. 본 연구팀에서는 일차적 screening 단계로 tyrosinase 억제 활성 연구뿐만 아니라 *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 형성 억제 연구를 병행하여 검색하여왔다[7-10]. 자생식물 추출물 1000여종을 검색한 결과 미나리과의 여러해살이풀인

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4294, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: chlee@kribb.re.kr

궁궁이(*Angelica polymorpha* MAXIM) 추출물이 melanin 생성 억제 효능을 나타내었으며, 이 추출물로부터 coumarin 계열의 화합물 3 종을 분리하였다. 본 연구에서는 궁궁이 추출물로부터 비tyrosinase 저해성 melanin 생합성 저해물질을 분리하여 그 구조를 동정한 바 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 궁궁이(*Angelica polymorpha* MAXIM)는 2001년 8월경에 지리산 일원에서 채집하였다.

시약 및 기기

실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약특급을 사용하였다. 물질분리 및 확인에 사용한 silica gel은 Merck사(Germany)의 silica gel 60(63-200 μm)을, HPLC column은 Shisheido사(Japan)의 제품을 사용하였다. 각 정제단계 및 column chromatography에 사용된 methanol, hexane, ethyl acetate, chloroform 등의 용매는 일반시약을, HPLC 용매는 Baxter(Burdick & Jackson, USA) 제품을 사용하였고, NMR용 CD_3OD 은 CIL(Cambridge Isotope Laboratories, Inc)사의 제품을 사용하였다. 배지류는 Difco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, tyrosinase assay에 사용된 기질 및 효소 등은 Sigma 제품을 사용하였다.

활성물질의 분리 정제

저해 물질은 Silica gel 60(63-200 μm), ODS-AM HPLC column(Shisheido-Capcell Pak C18 UG120, 250 \times 10 mm, Japan) 등을 사용하여 분리하였다. HPLC는 Hitachi사(Japan)의 L-7100 pump, L-7200 UV detector를 사용하였다.

이화학적 특성 및 구조분석

Mass 스펙트럼은 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA)를 사용하여 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 Varian UNITY 300(USA)를 이용하였고, 용매는 CD_3OD 를 사용하였다.

Streptomyces bikiniensis melanin 생합성 저해

Streptomyces bikiniensis NRRL B-1049를 Papavizas' VDYA agar slant 배지(V-8 juice 200 ml, glucose 2 g, yeast extract 2 g, CaCO_3 1 g, agar 20 g, 증류수 800 ml, pH 7.2)에서 2주간 28°C로 배양시켜 포자를 생성시킨 후 멸균수로 포자 현탁액을 만들었다. 0.2%의 yeast extract를 첨가한 ISP No.7 배지에 포자 현탁액 0.2 ml씩을 도포 한 후 배지표면에 sample을 적신 paper disc를 올리고 28°C에서 48시간 배양 후 생성된 zone의 melanin 생합성 저해 여부를

관찰하였다[23,24].

Tyrosinase 활성 억제 실험

96 well plate(SPL, Korea)에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 150 μl , 1.5 mM L-tyrosine solution 38 μl 와 2100 unit/ μl mushroom tyrosinase(pH 6.5) 10 μl 을 넣은 후, sample을 3 μl 처리하여 25°C에서 1시간 반응시킨 후, microplate reader(Bio-Rad 3550)를 사용하여 optical density를 470 nm에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율(%)은 다음 식에 의하여 계산하였으며, IC_{50} 값은 저해물질 효소 활성의 50%를 저해하는 sample 농도를 환산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D-C)-(B-A)}{D-C} \times 100$$

- A: 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도
- B: 저해제를 넣은 것의 반응 후 흡광도
- C: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도
- D: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후 흡광도

결과 및 고찰

궁궁이(*Angelica polymorpha* MAXIM)로부터 melanin 저해 물질 분리

한국식물추출물은행의 자생식물 methanol 추출시료 1000 여개를 대상으로 tyrosinase 활성 억제와 *S. bikiniensis* melanin 생합성 저해 활성을 측정된 결과, 최종적으로 궁궁이를 선별한 후 저해물질을 분리하였다. 궁궁이 2.4 kg를 실온에서 methanol로 추출하고 여과한 methanol 추출액 102.3 g을 감압 농축한 후 증류수에 현탁하여 chloroform으로 추출하여 21.9 g를 얻었다. 이 추출물을 silica gel chromatography (hexane : ethyl acetate = 2 : 1)를 실시하여 활성 fraction을 얻었다. 각 fraction을 HPLC(Shisheido-Capcell Pak C18 UG120, 250 \times 10mm, UV 220 nm)를 통해 45% aqueous acetonitrile 조건으로 3개의 물질을 분리하였다(Fig. 1).

활성 물질의 구조 분석

Heracleol 3'-Me ether. ESI-MS 분석결과 m/z 341에서 $(\text{M}+\text{Na})^+$, 635에서 $(2\text{M}-\text{H})^-$ 피크가 관찰되어 분자량이 318로 확인되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ data로부터 163.3 ppm에서 carbonyl group과 159.8 ppm, 153.8 ppm, 150.4 ppm, 115.6 ppm에서 4개의 quaternary carbones, 94.6 ppm(CH), 106.3 ppm(CH), 112.0 ppm(CH), 141.7 ppm(CH), 164.7 ppm(CH)에서 5개의 aromatic carbon peaks가 관찰되었고, $^1\text{H-NMR}$ data로부터 8.38 ppm(1H, d, $J=9.6$) 6.28 ppm(1H, d, $J=9.6$)과 7.14 ppm(1H, s), 7.79 ppm(1H, d, $J=2.4$), 7.18 ppm(1H, d, $J=2.4$)의 5개의 proton peaks가 관찰되어 coumarin 계열의 골격을 가진 화합물임을 알 수 있었다. Coumarin 골

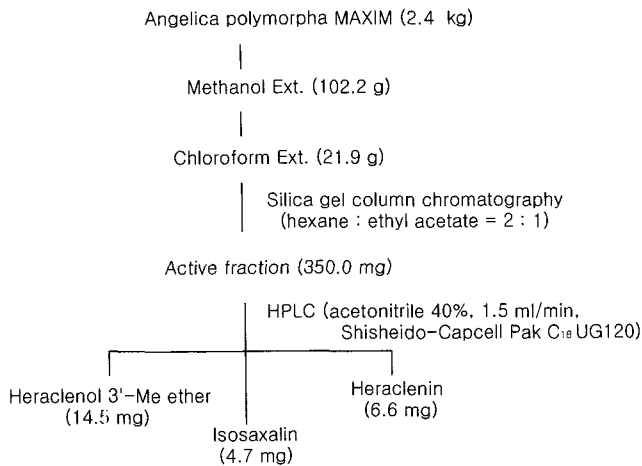


Fig. 1. The isolation of active compounds from *Angelica polymorpha* MAXIM.

격에 해당하는 peak 이외에 ^{13}C -NMR data에서 20.2 ppm, 22.5 ppm에서 2개의 methyl기가 49.8 ppm에서 methoxyl기가 관찰되었으며, 75.7 ppm(CH_2), 76.9 ppm(CH)에서 carbon peaks가 관찰되었다. ^1H -NMR에서 1.27 ppm(3H), 1.23 ppm(3H), 3.27 ppm(3H), 3.88 ppm(1H, dd, $J=2.4, 8.4$), 4.35 ppm(1H, t, $J=8.4$), 4.73 ppm(1H, dd, $J=2.4, 8.4$)의 proton peaks가 관찰되어 side chain의 구조를 추정하였다. 분자량과 NMR data를 바탕으로 구조식이 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 로 결정되었고, 이러한 결과를 바탕으로 data base 검색결과 heraclenol 3'-Me ether로 동정되었다[4,17,22](Fig. 2a).

Isosaxalin. ESI-MS 분석결과 m/z 345에서 $(\text{M}+\text{Na})^+$, 321에서 $(\text{M}-\text{H})^-$ 피크가 관찰되어 분자량이 322로 확인되었다. ^{13}C -NMR data에서 coumarin 계열의 골격을 가진 화합물에 해당하는 peak 이외에 28.3 ppm과 30.5 ppm에서 methyl기가 관찰되었고, 75.9 ppm(CH_2), 78.3 ppm에서 carbon peaks가 관찰되었다. ^1H -NMR data에서 1.66 ppm(3H), 1.52 ppm(3H), 4.0 ppm(2H, m), 4.45 ppm(1H, dd, $J=7.8, 9.6$)의 proton peaks가 관찰되었다. MS data 분석 결과 $(\text{M}+2)$ peak가 $(\text{M}+\text{Na})^+$ peak 크기의 대략 3분의 1정도를 나타내어[10] chlorine의 존재를 확인하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 구조식을 $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClO}_5$ 로 결정한 후, data base 검색결과 isosaxalin으로 동정하였다(Fig. 2b).

Heraclenin. ESI-MS 분석결과 m/z 309에서 $(\text{M}+\text{Na})^+$ 피크가 관찰되어 분자량이 286로 확인되었다. ^{13}C -NMR data에서 coumarin 계열의 골격을 가진 화합물에 해당하는 peak 이외에 19.2 ppm과 24.8 ppm에서 methyl기가 관찰되었고, 73.9 ppm(CH_2), 62.8 ppm(CH), 59.7 ppm에서 carbon peaks가 관찰되었다. ^1H -NMR data에서 1.36 ppm(3H), 1.31 ppm(3H), 3.30 ppm(1H, m), 4.42 ppm(1H, dd, $J=6.9, 11.4$), 4.75 ppm(1H, dd, $J=4.2, 11.4$)의 9개의 proton peaks가 관찰되었다. heraclenol 3'-Me ether에서 관찰된 75.7 ppm

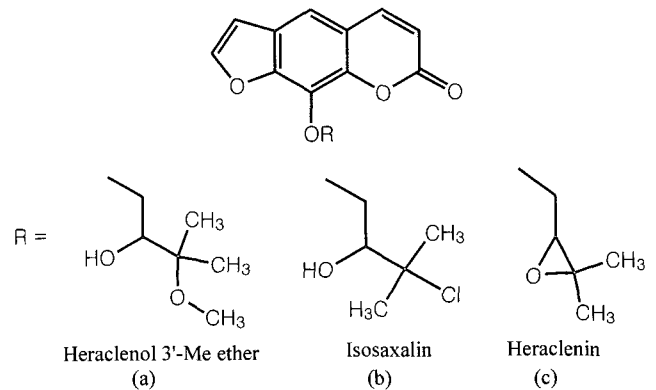


Fig. 2. Structures of heraclenol 3'-Me ether, isosaxalin and heraclenin from *Angelica polymorpha* MAXIM.

(CH_2), 76.9 ppm의 carbon peaks가 각각 62.8 ppm(CH), 59.7 ppm에서 나타나 epoxy의 존재가 확인되어 구조식이 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 로 결정되었고, 이러한 결과를 바탕으로 data base를 검색한 결과 heraclenin으로 동정되었다[2, 12, 15](Fig. 2c).

분리 물질의 melanin 저해 활성

궁궁이로부터 분리된 활성물질에 대한 저해 활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 그 결과 3가지 물질이 tyrosinase 억제 활성이 전혀 나타나지 않는 반면 *S. bikiniensis* melanin 생합성 저해 효과를 나타내었다. heraclenin이 paper disc 당 30 μg 농도에서 25 mm, 20 μg 농도에서 15 mm, 10 μg 농도에서 5 mm 직경의 저해환을 나타내어 가장 높은 저해 활성을 보여주었으며, isosaxalin은 30 μg 농도에서 20 mm, 20 μg 농도에서 10 mm의 저해환이 확인되었으며, heraclenol 3'-Me ether는 30 μg 농도에서 10 mm, 20 μg 농도에서는 6 mm의 직경의 melanin 생합성 저해환이 나타났다. 이처럼 melanin 저해 활성은 key enzyme인 tyrosinase 억제 활성이 있어야만 나타나는 것이 아니며, tyrosinase 활성과는 관계없이 여러 가지 다른 복합적인 요인에 의하여 melanin polymer의 생성이 억제되는 것을 알 수 있다.

본 실험에서 분리된 3가지 화합물은 이전에 미나리과 식물에서 보고된 coumarin 계열의 물질로서 melanin 생합성

Table 1. Inhibitory activities against mushroom tyrosinase and melanin biosynthesis of *Streptomyces bikiniensis*.

	Mushroom tyrosinase IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	<i>S. bikiniensis</i> melanin biosynthesis inhibition zone (mm)		
		30 μg	20 μg	10 μg
Heraclenol 3'-Me ether	>100	10	6	-
Heraclenin	>100	25	15	5
Isosaxalin	>100	20	10	-

- : not determined.

저해 활성이 나타나는 것으로 본 실험에 밝혀졌다. 또한 *S. bikiniensis* melanin 생합성 저해 실험 시 disc 주변의 미생물 생육에 전혀 영향을 미치지 않고 melanin 형성만을 저해시켰다(data not shown). 따라서 분리한 compound들이 세포독성이 없으면서 melanin 형성만을 저해하는 것으로 사료된다. 따라서 이 compound들은 tyrosinase 억제와는 상관없는 다른 melanin 생합성 mechanism을 억제하는 것으로 추정되며 더 진보적인 mechanism 연구가 필요하겠다.

요 약

Melanin 생합성에 key enzyme인 tyrosinase 억제가 melanin 색소 억제에 주된 요인으로 알려져 있지만, 생합성 기작에는 여러 다른 요인들이 작용하기 때문에 일차적인 탐색 단계에서 tyrosinase 저해 활성뿐만 아니라 *S. bikiniensis*의 melanin 생합성 억제 연구를 병행하여 천연물을 탐색하였다. 그 중 선택된 궁궁이(*Angelica polymorpha* MAXIM)에서 3가지 물질을 분리하였으며, 3가지 물질 모두가 100 µg/ml 이상 농도에서도 tyrosinase 억제 활성이 나타나지 않는 반면, *S. bikiniensis* melanin 생합성 저해 효과를 보여 주었다. 동일 농도에서 *S. bikiniensis*의 생장에는 영향을 미치지 않았다.

감사의 말

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(PF002109-03)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bell, A. A. and M. H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
- Ezekiel, K. A. 1973. Coumarins and other components of *Afraegle paniculata*. *Phytochemistry* **12**: 2310-2312.
- Hearing, V. J. and T. M. Ekel. 1976. Mammalian tyrosinase. *Biochem. J.* **157**: 549-557.
- Kabouche Z., N. Benkiki, E. Seguin, and C. Buuneau. 2003. A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia* **74**: 194-196.
- Kameyama, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, and S. Nishi-yama. 1993. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 126-132.
- Kim, C. J., H. K. Lee, Y. H. Kim, K. S. Kim, Y. B. Seo, H. S. Lee and B. S. Yun. 1996. *신물질탐색 자유아카데미*: 251-262.
- Lee, C. H., H. K. Chun, Y. B. Seu and Y. H. Kho. 1993. Tyrosinase-inhibiting isoflavonoids produced by *Streptomyces* sp. 20747. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 139-143.
- Lee, C. H., H. K. Chun, M. C. Chung, H. J. Lee, K. S. Bae and Y. H. Kho. 1995. Production of isocyanide inhibitor of melanin biosynthesis by *Trichoderma* sp. MR-93. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 209-213.
- Lee, C. H., M. C. Chung, H. J. Lee, K. H. Lee and Y. H. Kho. 1995. MR304-1, A melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 641-646.
- Lee, C. H., M. C. Chung, H. J. Lee, K. S. Bae and Y. H. Kho. 1997. MR567 and MR566B, new melanin synthesis inhibitors produced by *Trichoderma harzianum* I. taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiotics* **50**: 469-473.
- Lee, C. H., K. Hirotsuki, M. C. Chung, H. J. Lee, J. K. Hong, J. S. Yoo and Y. H. Koh. 1997. MR567 and MR566B, new melanin synthesis inhibitors produced by *Trichoderma harzianum* II. Physico-chemical properties and structural elucidation. *J. Antibiotics* **50**: 474-478.
- Lee, C. K. and W. S. Woo. 1982. Coumarin constituents from the roots of *Anelica koreana* Max. *Kor. J. Pharmacog.* **13**: 10-13.
- Lee, S. H., J. S. Park, S. Y. Kim and S. R. Chung. 1997. The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji* **41**: 456-461.
- Lim, T. W., J. W. Lee and M. H. Lee. 2001. Effects of Licorice extract on proliferation and melanization in cultured normal human melanocytes. *동서의학연구소 논문집* **2000**: 247-254.
- Miftakhoca A. F., G. S. Burasheca, Z. A. Abilov, V. U. and Ahmad, M. Zahid. 2001. Coumarins from the aerial part of *Halocnemum strobilaceum*. *Fitoterapia* **72**: 319-321.
- Mishima, Y., S. Hatta, M. Inazu. 1988. Induction of melanogenesis suppression : Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* **1**: 367-374.
- Narayan, A., G. Dipali and C. Ashim. 1974. Coumarin constituents of *Selinum tenuifolium*. *Phytochemistry* **13**: 235-238.
- Pilar A., U. Kazunori, K. Takeshi, T. Katsuhiko and Hearing, V. J. 1993. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* **268**: 25650-25655.
- Prota, G. 1992. *Melanin and melanogenesis*. Academic Press, New York.
- Roser B. and B. Robert. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**: 60-69.
- Schallreuter, K. U., J. Moore, D. J. Tobin, N. J. Gibbons, H. S. Marshall, T. Jenner, W. D. Beazley and J. M. Wood. 1999. α -MSH can control the essential cofactor 6-terahydrobiop-terin in melanogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**: 329-341.
- Setzer W. N., B. Vogler, R. B. Bates, J. M. Schmidt, C. W. Dicus, P. Nakkiew, and W. A. Haber. 2003. HPLC-NMR/HPLC-MS analysis of the bark extract of *Stauranthus perforatus*. *Phytochem. Anal.* **14**: 54-59.

23. Tomit, K. N., N. Oda, M. Kamei, T. Miyaki and T. Oki. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* **44**: 25-32.
24. Wachi. Y., K. Sode, K. Horikoshi, H. Takeyama and T. Matsunaga. 1995. Screening of melanin biosynthesis inhibitors from marine microalgae using *Streptomyces bikiniensis* bioassay. *Biotechnol. Tech.* **9**: 633-636.
25. Weixiong, L. and Z. H. Helene. 1997. Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* **65**: 480-484.

(Received Feb. 28, 2003/Accepted May 5, 2003)