

Alkyl-3,4-dihydroxybenzoate와 N-Alkyl-3,4-dihydroxybenzamide 유도체들의 가수분해 반응성과 멜라닌 생성 저해활성에 관한 홀로그램(H) QSAR 분석

성 낙 도* · 정 훈 성* · 김 상 진†

대전보건대학 화장품과학과, *충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부

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

Nack-Do Sung*, Hoon-Sung Jung*, and Sang-Jin Kim†

Department of Cosmetic Science, Daejeon Health Sciences College, 77-3, Gayang 2-dong, Dong-gu, Daejeon 300-711, Korea

*Division of Applied Biological and Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University

요약 일련의 alkyl-3,4-dihydroxybenzoate (A)와 N-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide (B) 유도체들의 치환기(R_1 및 R_2) 변화에 따른 멜라닌생성 저해활성 관계들을 HQSAR 방법으로 분석하였다. 멜라닌생성 저해활성에 관하여 유도된 HQSAR 모델은 매우 양호한 예측성(cross-validated r_{cv}^2 , $q^2 = 0.674$)과 적합성(non-cross-validated, $r_{nev}^2 = 0.936$)을 나타내었다. 멜라닌생성 저해활성과 가수분해 반응성은 공히, (A)가 (B)보다 컸으며($A > B$), R_1 -치환기가 R_2 -치환기보다 저해활성에 의존적인 경향을 나타내었다($R_1 > R_2$). 또한, 경계분자궤도(FMO) 이론에 따라 가수분해 반응은 (A), (B)의 LUMO와 물분자의 HOMO 사이에 강한 상호작용으로 orbital-control 반응인 친핵성 첨가-제거반응(Ad_{N-E})이 주로 일어나는 것을 알 수 있었다.

Abstract: Holographic quantitative structure activity relationships (HQSAR) between the melanogenesis inhibitory activities of alkyl-3,4-dihydroxybenzoate (A) and N-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide (B) derivatives were analyzed and discussed. The statistical results of HQSAR model for the activities showed the best predictability of the activities based on the cross-validated r_{cv}^2 ($q^2 = 0.674$), non-cross-validated, conventional coefficient ($r_{nev}^2 = 0.936$). The melanogenesis inhibitory activities and hydrolytic reactivity of (A) were slightly higher than that of (B) ($A > B$) and the activities depends upon the R_1 -substituents ($R_1 > R_2$). It has been found using frontier molecular orbital (FMO) theory that the hydrolysis reactions of (A) and (B) proceeded to an orbital-controlled reactions, while the nucleophilic addition-elimination reactions (Ad_{N-E}) between LUMO energy of (A) and (B) and HOMO energy of water molecule are occurred.

Keywords: Holographic QSAR analyses, nucleophilic addition-elimination reaction.

1. 서 론

멜라닌 생성을 억제하기 위한 가장 기본적인 방법은 멜라닌이 생성되는 각 단계를 차단, 억제 또는 저해하는 방법이다. 따라서 새로운 미백제를 개발하기 위하여 자외선 차단, melanocyte의 활성억제, 각질제거 및 tyrosinase의 활성저해에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며[1],

분자 수준에서 신호전달을 억제하거나[2-4] tyrosinase 유전자발현 억제에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다[5]. 이러한 다양한 방법들 중 tyrosinase의 활성을 저해하기 위해서는 tyrosinase 활성 부위의 모양과 크기가 같거나 또는 유사한 구조를 갖은 물질로 활성 부위를 차폐하거나 활성부위에 존재하는 Cu(II) 원자와 저해제 사이의 킬레이트 형성을 촉진시키는 방법[6,7]과 비활성상태인 탈산소형 tyrosinase [Cu(0)]가 활성 상태인 산소형 tyrosinase [Cu(II)]로의 전환을 저해시키는 방법[8] 등이 주로

† 주 저자 (e-mail: kimsj@hit.ac.kr)

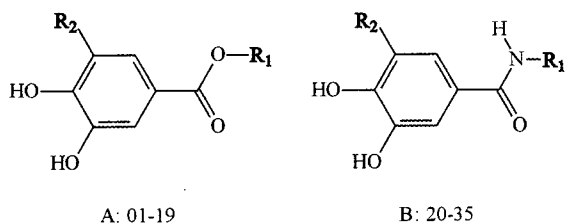


Figure 1. General structures of alkyl-3,4-dihydroxybenzoate (A) and *N*-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide (B) derivatives as substrate molecules.

연구되고 있다.

Tyrosinase 활성 저해제를 탐색하기 위하여 멜라닌 합성의 출발 물질인 tyrosine과 유사한 구조이거나 비슷한 작용을 하는 물질들이 주로 탐색 대상물질로 거론되고 있는데 이는 tyrosine의 hydroxyl-기가 tyrosinase의 Cu(II) 원자와 chelate를 형성하여 DOPA, DOPA-quinone을 거쳐서 멜라닌이 합성되기 때문이다. 따라서 tyrosinase 활성 저해제의 탐색은 tyrosinase 활성 부위에 존재하는 Cu(II) 원자와 tyrosine의 결합을 차단시키기 위하여 Cu(II) 원자와 결합 가능한 hydroxyl-기나 carboxyl group을 지닌 물질인 kojic acid, arbutin [9,10], ascorbic acid 및 hydroxy benzoic acid [11,12] 등이 활성 저해제로 사용되고 있다.

본 연구에서는 분자 내에 2개의 hydroxyl-기를 지니고 있어 tyrosinase 활성 부위의 Cu(II) 원자와 강력한 chelate를 형성하여 높은 멜라닌생성 저해 활성을 나타낼 것으로 예상되는 일련의 alkyl-3,4-dihydroxybenzoate와 *N*-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide 유도체들의 가수분해 반응성과 치환기(R_1 및 R_2) 변화에 따른 멜라닌생성 저해활성 사이의 관계를 약물설계(drug design) 방법상 가장 강력한 도구중의 하나인 홀로그램(H) QSAR 방법으로 분석하고[13] 검토하였다.

2. 실험 방법

2.1. 멜라닌 생성 저해활성의 측정

기질화합물로 alkyl-3,4-dihydroxybenzoate (A)와 *N*-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide (B) 유도체들을 위시하여 용매 및 무기염류 등은 Sigma, Fluka 및 Gibco life technology사의 제품을 사용하였다. Mouse melanoma cell은 생명공학연구원에서 제공받았으며 흡광도의 측정은 Shimadzu 모델 UV-1601 PC를 사용하였다.

멜라닌생성 저해활성은 다음과 같은 방법으로 구하였다. 먼저, Dulbecco's modified Eagle's media 배지에 37 °C와 5% CO₂ 조건에서 10% fetal bovine serum, 100 nm의 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate와 1 nm cholera

toxin을 첨가하고 100 cells/well이 될 때까지 mouse melanoma cell을 배양하였다. 세포의 부착을 확인한 다음, 세포 배양액 10 mg/L의 시험물질을 가하여 3일간 배양한 후 배양액을 제거하고 Dulbecco's phosphate buffered saline으로 세척하고 생성된 멜라닌을 1 N-NaOH로 용해하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 값은 같은 방법으로 시험 물질을 첨가하지 않은 mouse melanoma cell에서의 흡광도(control)와 비교하였다. 멜라닌생성 저해활성 값은 시험 물질들의 흡광도로부터 Lambert-Beer's 식에 따라 흡광계수(ϵ)를 구하고 50% 저해시의 흡광도를 대입하여 50% 저해농도(IC₅₀, mg/L = 0.250/ $\epsilon \times 1$)를 얻은 다음, mole 농도로 환산하고 역의 대수를 취하여 식[$pI_{50} = -\log(IC_{50}/\text{분자량} \times 1000)$]로 멜라닌 생성저해 활성값(Obs.pI₅₀)을 구하였다[14].

분자궤도(MO)함수, highest occupied molecular orbital (HOMO) 및 lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) 에너지(e.v.)는 분자를 가장 안정한 형태(conformer)로 최적화한 다음 Hyper-Chem 프로그램(Ver. 6.02)을 사용하여 AM1방법[15]으로 계산하였다.

2.2. 기질 분자와 저해활성

분자모델링과 통계(partial least square, PLS) 분석은 Tripos사의 Sybyl (Ver. 6.91) 분자 모델링 소프트웨어 (Tripos Inc.)를 사용하여 수행하였다[16]. 저해활성은 alkyl-3,4-dihydroxybenzoate 유도체(A: 1~19)와 *N*-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide 유도체(B: 20~35)의 공통부분인 *C*-phenyl 고리상 meta-위치에 R_2 -치환체 그리고 carbonyl 탄소원자의 산소와 질소 원자에 R_1 -치환체가 치환되어 있는 총 35개 화합물(Figure 1)들의 멜라닌 생성 저해활성 값(Obs. pI₅₀)을 사용하였다. 이들 화합물 중, 30개 화합물을 training set로 설정하여 HQSAR 모델을 유도하였으며 5개 화합물 집단을 test set로 선정하여 모델의 예측성을 평가하였다.

2.3. 분자 홀로그램의 생성

HQSAR은 암호화된 홀로그램 중의 분자조각들과 생물 활성과의 상관성을 계산하는 것으로[13] 구조적인 분자 조각들과 분자 홀로그램 구성 파라미터는 분자조각 크기와 분자조각 특징으로 나누어진다. 구체적인 과정은 다음과 같다. 즉, 2D-구조의 기질분자(A 및 B)에 대하여 분자조각 수를 2~10 원자 크기의 범위로 생성시키고 분자 cyclic redundancy check (CRC) algorithm을 사용하여 분자 홀로그램 길이 53~401을 모두 선택하여 통계분석을 실행하였다. 분자조각의 특징은 atoms/bonds, connectivity/hydrogen 및 chirality를 기본적으로 선택한[17] 다음에 분자조각 수를 결정하게 되는데 여기에서는 조각의

수가 4~7일 때 가장 양호한 통계 값을 얻을 수 있었다. 따라서 분자조각의 수는 4~7을 기준으로 하고 hologram lengths를 151로 고정한 다음 fragment distinction이 connectivity/hydrogen 조건에서 최종적으로 가장 좋은 통계 값(q^2 및 r^2)을 갖는 HQSAR 모델을 탐색하였다.

2.4. HQSAR-PLS의 계산

PLS 분석[18]은 생물활성에 대한 설명인자 변수들과의 관계를 통계적인 모델로 나타내는데 활용되며 적정한 수의 성분(component)을 선택하기 위하여 홀로그래프 길이는 가장 높은 q^2 (best crossvalidated r^2_{cv}) 값을 필요로 한다. 적정한 수의 성분은 표준오차가 가장 적은 예측결과를 유도해 내며, 예측력은 leave one out (LOO) cross validation 과정에 의하여 q^2 값으로 결정될 수 있다. 다음에는 적정한 주성분의 수를 사용하여 cross-validation을 하지 않고(ncv) 유도되는 모델에 대하여 최종 PLS 분석을 실행하였다. 각 분자 조각 중에 포함된 정보는 기본적으로 H 원자와 키랄성(chirality)이 제외된 채로 atom, bond 및 connections들이 홀로그래프를 생성하는데 사용되며, training set로부터 유도된 모델들은 test set에 의하여 모델의 저해활성이 체계적으로 예측되게 된다. 결과적으로 QSAR 모델의 질(quality)은 예측성($q^2 > 0.50 =$ predictive ability)과 저해활성과의 상관성($0.90 > r^2 =$ goodness of fit)에 의해 결정될 수 있다[19]. 따라서 HQSAR 결과는 최종 PLS 분석결과로부터 얻어진 가장 큰 저해활성(Pred. $p_{50} = 4.85$)을 나타낸 분자(16)와 가장 적은 저해활성(Pred. $p_{50} = 3.38$)을 나타낸 분자(30)의 중요한 분자 조각들의 기여도(contribution map)를 암호화 된 색깔로 나타낼 수 있었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 기질분자의 가수분해 반응성

화학물질과 생체와의 반응이나 생체 내 흡수와 이행에는, 물질을 구성하는 분자의 소수성효과(hydrophobic effect)와 전자 전달효과(electronic effect) 및 입체효과(steric effect)에 따른 물 분자와의 반응이 필연적이다. 기질 화합물로서 동일한 치환기가 치환된($R_1 = C_3H_7$ & $R_2 = CH_3O$) alkyl 3,4 dihydroxybenzoate, A(03) 및 N-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide, B(21) 분자와 물 분자 사이의 가수분해 반응성을 비교하고자 섭동이론[20]에 의한 경계분자 궤도함수(FMO: frontier molecular orbital) 상호작용[21]에 관련된 MO diagram을 Figure 2에 나타내었다.

분자간의 결합생성 반응에서 HOMO 에너지는 분자가 전자쌍 주개인 lewisbase로 작용하는 친핵성(nucleophilicity)의 척도이며 LUMO 에너지는 분자가 전자쌍 받개인

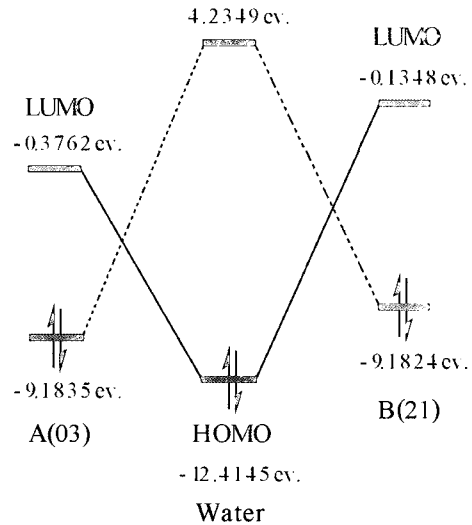


Figure 2. Frontier molecular orbital (FMO) interaction between water molecule and $R_1 = C_3H_7$ & $R_2 = CH_3O$ substituted benzoate, A(3) & benzamide, B(21) by AM1 calculation method.

Lewis-acid로 작용하는 친전자성(electrophilicity)의 척도이다.

MO diagram (Figure 2)으로부터 (A)의 LUMO와 물 분자의 HOMO 사이의 에너지 차(ΔE)는 -12.0383 eV.이고 (A)의 HOMO와 물 분자의 LUMO 사이의 에너지 차이는 -13.4184 eV.이었다. 그리고 (B)의 LUMO와 물 분자의 HOMO 사이의 에너지 차이는 -12.2797 eV.이고 (B)의 HOMO와 물 분자의 LUMO 사이의 에너지 차이는 -13.4173 eV.이었다. 따라서 (A), (B)의 HOMO와 물 분자의 LUMO 사이에는 에너지 차이가 크기 때문에 이들 간에는 약한 상호작용에 따른 coulombic interaction으로 hardhard한 전하조절(charge-control) 반응인 친전자성 반응이 약하게 일어날 것이다. 그러나 (A), (B)의 LUMO와 물 분자의 HOMO 사이의 에너지 차이가 작으므로 이들 간에는 강한 상호작용에 따른 soft-soft한 궤도조절(orbital-control) 반응인 전형적인 친핵성[21] 첨가-제거 반응(Ad_E)이 빠르게 일어난다. 또한 (A), (B)의 LUMO와 물 분자의 HOMO 사이의 에너지 차이 [ΔE : A(03) = -12.0383 eV. 및 B(21) = -12.2797 eV.]로부터 (A)가 (B)에 비하여 반응성이 크다($A > B$)는 사실을 잘 설명하고 있다.

3.2. 기질분자의 멜라닌생성 저해 활성

멜라닌생성 저해제의 탐색은 tyrosinase 활성 부위에 존재하는 Cu(II) 원자와 티로신의 결합을 차단하는 방법으로 Cu(II) 원자와 결합 가능한 hydroxyl 및 carboxyl 치환체들을 활성 저해제로 활용하는 것이 좋은 방법일

Table 1. Observed Melanogenesis Inhibitory Activities (MIA) (Obs. pl_{50}) and Predicted Melanogenesis Inhibitory Activities (Pred. pl_{50}) by HQSAR Models and Deviations (Dev.) for Training Set

No.	R ₁	R ₂	Obs.	Pre. ^{a)}	Dev. ^{b)}
01	H	OCH ₃	3.98	3.96	0.02
02	CH ₃	OCH ₃	4.05	4.02	0.03
04	CH ₂ CHC(CH ₃) ₂	OCH ₃	4.40	4.36	0.04
05	CH ₃	OC ₂ H ₅	3.99	4.05	-0.06
06	CH ₃	OC ₃ H ₇	4.07	4.16	-0.09
07	CH ₃	OC ₄ H ₉	4.51	4.34	0.17
08	CH ₃	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	4.49	4.43	0.06
10	CH ₃	OH	4.18	4.11	0.07
11	CH(CH ₃) ₂	OH	3.95	4.05	-0.10
12	C ₂ H ₅	H	4.43	4.32	0.11
13	CH(CH ₃) ₂	H	4.29	4.31	-0.02
14	C ₃ H ₇	H	4.45	4.40	0.05
15	C ₄ H ₉	H	4.51	4.56	-0.05
16	C ₆ H ₁₃	H	4.61	4.85	-0.24
18	3,7-(CH ₃) ₂ -C ₈ H ₁₇	H	4.80	4.78	0.02
19	C ₆ H ₅	H	4.56	4.53	0.03
20	C ₂ H ₅	OCH ₃	3.80	3.85	-0.05
21	C ₃ H ₇	OCH ₃	3.53	3.84	-0.31
22	C ₄ H ₉	OCH ₃	4.19	4.18	0.01
23	C ₅ H ₁₁	OCH ₃	4.56	4.37	0.19
24	C ₆ H ₁₃	OCH ₃	4.66	4.51	0.15
25	C ₇ H ₁₅	OCH ₃	4.70	4.66	0.04
26	C ₈ H ₁₇	OCH ₃	4.72	4.80	-0.08
27	CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	3.77	3.70	0.07
28	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	OCH ₃	4.01	4.02	-0.01
30	C ₂ H ₄ OH	OCH ₃	3.38	3.38	0.00
31	C ₃ H ₆ OH	OCH ₃	3.50	3.51	-0.01
32	C ₂ H ₄ -C ₆ H ₅	OCH ₃	4.49	4.58	-0.09
33	C ₃ H ₅ -C ₆ H ₅	OCH ₃	4.67	4.66	0.01
35	C ₆ H ₄ - <i>m</i> -OH	OCH ₃	3.43	3.38	0.05
Ave. ^{c)}					0.074

^{a)}Predicted values, ^{b)}difference of observed (Obs. pl_{50}) values and predicted (Pred. pl_{50}) values, ^{c)}average residual of training set, A = 1~19, B = 20~35.

것이라는 예상에 따라[9-12] 분자 내 2개의 hydroxyl기로 인하여 tyrosinase 활성 부위의 Cu(II) 원자와 강력한 킬레이트를 형성하여 높은 멜라닌 생성 저해 활성을 나타낼

Table 2. The HQSAR Analyses for the Influence of Various Fragment Sizes on the Key Statistical Parameters Using the Best Fragment Distinction (Atoms, Bonds & Connectivity)

Fragment size	Best length	Statistical parameters				
		$r^2_{cv.}(q^2)$	SE _{cv.} ^{a)}	$r^2_{ncv.}$	SE _{ncv.} ^{a)}	NC ^{b)}
2-5	97	0.544	0.309	0.897	0.147	5
3-6	353	0.502	0.323	0.885	0.155	5
4-7^{c)}	71	0.542	0.310	0.903	0.143	5
5-8	199	0.564	0.302	0.864	0.169	5
6-9	71	0.595	0.291	0.857	0.173	5
7-10	199	0.473	0.331	0.848	0.178	5

^{a)}Standard error estimate: in case of crossvalidated (cv.) and non cross-validated (ncv.), ^{b)}optimum number of component. ^{c)}the best fragment size.

것으로 추측되는 일련의 기질 유도체(A 및 B)들에 대하여 관측된 멜라닌 생성저해 활성값(Obs. pl_{50})과 training set로부터 유도된 HQSAR 모델에 의하여 예측된 저해 활성값(Pred. pl_{50}) 및 두 값의 차이(Dev.)를 Table 1에 정리하였다.

Benzoate (A)에서 *O*-phenyl 고리상 R₂-치환체(R₂ = H) (12~19)들이 R₁-치환기의 탄소사슬이 증가함에 따라 저해활성이 증가하는 경향을 나타낸다는 사실과 R₂ = OH 치환체(10 및 11)가 평균 수준의 저해활성을 나타내는 것으로 보아 R₂-치환기는 tyrosinase 활성부위의 Cu(II) 원자와 결합하지 않는 것으로 예상된다.

Benzamide (B) 역시, R₂ = CH₃O 치환기로 고정되어 있고 R₁-치환기의 탄소사슬이 증가함에 따라 저해활성이 증가하는 (A)와 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 R₂-치환기에 hydroxyl group이 존재하는 경우(30, 31 및 35)에는 저해활성이 현저히 작은 경향을 나타내었다.

3.3. 저해 활성에 관한 HQSAR 모델

HQSAR 방법으로[13] 분자들의 구조적인 특성과 저해 활성 사이의 관계를 분석하기 위하여 부분 최소자승(PLS)법으로 계산된 HQSAR 모델의 유도과정은 다음과 같다. 먼저, 분자 조각의 크기(fragment size)가 2-5~7-10으로 변화함에 따른 통계치를 검토한 결과를 Table 2에 정리하였다.

분자 조각의 크기가 4-7일 경우에 best length는 71, 그리고 적정 성분의 수가 5인 조건에서 cross-validated r^2_{cv} 즉, $q^2 = 0.542$ (SE_{cv.}: 0.310), 그리고 non-cross-validated $r^2_{ncv} = 0.903$ (SE_{ncv.}: 0.143)으로 가장 양호한 통계값을 나타내었다.

Table 3. HQSAR Analyses for Various Fragment Distinctions on the Key Statistical Parameters Using Fragment Size Default (4-7)

Fragment distinctions	Best length	Statistical parameters				
		$r_{cv}^2 (q^2)$	$SE_{cv}^{a)}$	r_{ncv}^2	$SE_{ncv}^{a)}$	$NC^{b)}$
Atom/bond ^{c)}	257	0.484	0.329	0.898	0.146	5
Connectivity	71	0.542	0.310	0.903	0.143	5
Hydrogen	257	0.611	0.285	0.914	0.134	5
Con-H^{d)}	151	0.674	0.261	0.936	0.116	5
Chirality ^{e)}	151	0.629	0.279	0.931	0.120	5

^{a)}Standard error estimate: in case of cross-validated (cv.) and non cross-validated (ncv.), ^{b)}optimum number of component., ^{c)}In all case, the atoms and bonds flags are turned on., ^{d)}the best model, ^{e)}This option is used by combining with connectivity (con)-hydrogen (H).

이 같은 결과에 따라 분자 조각 크기가 4-7일 때의 분자 조각 특성을 탐색하여 Table 3에 요약하였다. 분자 조각 특성이 connectivity-hydrogen인 조건에서 best length가 151이고 주성분 수가 5일 때 cross-validated r_{cv}^2 즉, $q^2 = 0.674$ (SE_{cv} : 0.261), 그리고 non-cross-validated $r_{ncv}^2 = 0.936$ (SE_{ncv} : 0.116)으로 가장 양호한 통계 값을 나타내었다. 따라서 이 조건에서 유도된 모델을 A, B 유도체들에 의한 멜라닌생성 저해활성에 관련한 가장 높은 예측성과 상관성을 나타내는 H-QSAR 모델로 선택하였다.

이 모델의 예측성을 검토하기 위하여 test set에 대한 관측값(Obs.)과 모델로 예측한 값(Pred.) 그리고 이들 두 값의 차이 값(Dev.)을 Table 4에 요약하였다.

Table 4에서 볼 수 있는 바와 같이 평균편차가 0.246 (Ave.)을 나타내었으므로 이들 모델은 양호한 모델로 판단된다. 이 같은 결과에 기초하여, 관측된 멜라닌생성 저해활성 값(Obs.)과 유도된 모델에 의하여 계산된 예측값(Pred.)과의 관계를 Figure 3에 나타내었다.

Figure 3에서와 같이 이들 화합물들은 양호한 직선성의 비례관계를 보이므로 예측성이 좋은 무난한 모델임을 알 수 있으며 유도된 HQSAR 모델 (Table 3) 뿐만 아니라, 직선 관계식 ($Pred. pl_{50} = 0.936 (Obs. pl_{50}) + 0.272$, $n = 30$, $s = 0.103$, $F = 412.719$, $r^2 = 0.936$ 및 $q^2 = 0.925$)으로부터 미지 물질의 $Pred. pl_{50}$ 을 예상할 수 있었다. 이와 같이 HQSAR 모델은 선택하는 홀로그래프 길이에 기초하여 가장 낮은 표준편차(SE_{cv})를 최소화하거나 가장 높은 예측도(q^2)를 찾음으로서 높은 멜라닌 생성 저해활성을 나타내는 분자의 구조를 설계할 수 있다.

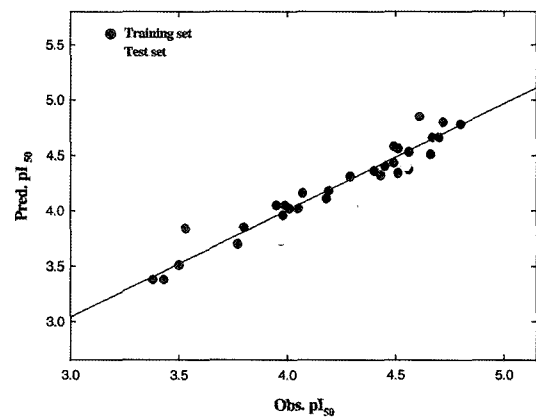
3.4. 기여도와 고활성 분자의 조건

유도된 모델에 근거한 기질분자(A), (B)에 관한 기여

Table 4. Observed Activities (Obs. pl_{50}), Predicted Activities (Pred. pl_{50}) by HQSAR Model and Deviations (Dev.) for Test Set in Melanogenesis Inhibitory Activities

No.	R ₁	R ₂	Obs.	Pred. ^{a)}	Dev. ^{b)}
03	C ₃ H ₇	OCH ₃	4.35	4.05	0.30
09	CH ₃	OCH ₂ -C ₆ H ₅	4.55	4.40	0.15
17	C ₈ H ₁₇	H	4.71	5.14	-0.43
29	OH	OCH ₃	3.97	3.73	0.24
34	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OH	OCH ₃	3.43	3.54	-0.11
Ave ^{c)}					0.25

^{a)}Predicted values, ^{b)}difference of observed (Obs. pl_{50}) values and predicted (Pred. pl_{50}) values, ^{c)}average residual of test set.

**Figure 3.** Relationships between observed melanogenesis inhibitory activities (obs. pl_{50}) and actual predicted activities (pred. pl_{50}) by HQSAR model.

도(contribution map)를 시각적으로 나타내기 위하여 R₁ 및 R₂-치환기가 동일(R₁ = C₃H₇ 및 R₂ = OCH₃)한 A(3) 및 B(21) 분자를 예로 들어 이들에 대한 최종 PLS 분석결과인 등고도를 Figure 4에 제시하였다.

Figure 4는 benzoate (A)에서는 멜라닌생성 저해활성을 방해하는 red 부분이 benzamide (B)보다 적은 경향을 보여주고 있어 (A)가 (B)보다 저해활성에 기여하는 정도가 크다는(A > B) 사실을 잘 설명하고 있다. (A)에 대하여 더 설명하면 R₂-치환체(1~11)는 phenyl 고리 중의 C₃~C₅ 원자 및 그 원자상 치환기들이 저해활성에 기여하지 않았으나(red) R₂ = H인 비치환체(12~19)에서는 분자 전체가 저해활성에 중간적인 경향을 보였고 R₁-치환기의 탄소사슬이 증가하는 경우에는 C₃~C₆ 사슬부분이 저해활성에 기여하는 경향을 나타내었다. 이러한 사실은 미백제로 많이 사용되는 mulberrin, kazinol 및 trichochrome 등에서도 잘 확인된다[22]. 그러나 (B)에 있어서 R₂ = OCH₃-치환체의 경우에는 R₁-치환체(20~28, 32 및 33)



Figure 4. The HQSAR contribution maps for melanogenesis inhibitory activities: $R_1 = C_3H_7$ & $R_2 = CH_3O$ substituted benzoate, A (3) (Obs. $pl_{50} = 4.35$) and benzamide, B (21) (Obs. $pl_{50} = 3.53$) are shown in capped sticks.

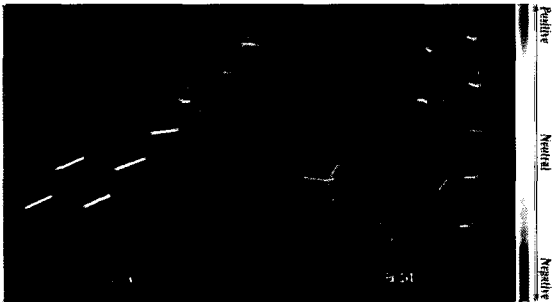


Figure 5. The HQSAR contribution maps for melanogenesis inhibitory activities: Benzoate ($R_1 = C_6H_{13}$ & $R_2 = H$), A (16) (Pred. $pl_{50} = 4.85$) and benzamide ($R_1 = C_2H_4OH$ & $R_2 = CH_3O$), B (30) (Pred. $pl_{50} = 3.38$) are shown in capped sticks.

의 사슬이 증가함에 따라 $C_2 \sim C_6$ 부분이 저해활성에 기여하는 경향인 반면에 benzoyl group은 저해활성에 기여하지 않는 경향을 보였다.

한편, 가장 큰 저해활성을 나타낸 (16)과 상대적으로 가장 저해활성이 작은 (30)을 대상으로 한 등고도(contribution map)를 Figure 5에 나타내어 비교하였다. 이 등고도로부터 (16)의 경우에는 R_1 -치환기의 탄소사슬 중 $C_3 \sim C_4$ 원자간의 결합부분이 저해활성에 기여하는 경향을 보이고 있으나 R_1 -치환기에 hydroxyl group이 도입되었을 경우(30 및 31)에는 분자 전체가 저해활성에 기여하지 않는 특이한 경향을 나타내고 있으므로 R_1 -치환기는 C_5 원자 크기의 알킬기가 무난하며 극성기가 배제되어야 한다는 사실을 알 수 있다.

이상과 같은 검토결과, (A), (B)에 의한 멜라닌 생성 저해활성은 R_2 -치환기보다는 R_1 -치환기의 영향이 더 크게 기여하는($R_1 > R_2$) 것으로 판단된다. 다음 연구로는 (A)와 (B) 유도체들의 구조변화에 따르는 피부 감작성(skin sensitivity)과의 관계를 HQSAR 방법으로 분석하여 보고하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(KOSEF) 우수연구센터(ERC) 지원 연구비(No. R11-2002-100-03002-2)에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Melanocyte biology: Before, during, and after the Fitzpatrick Era, *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 26 (2004).
2. M. Mizoguchi, Melanocyte development: With a message of encouragement to young women scientists, *Pigment Cell Res.*, **17**(5), 533 (2004).
3. H. Saito, K. Yasumoto, K. Takeda, K. Takahashi, H. Yamamoto, and S. Shibahara, Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway, *Pigment Cell Res.*, **16**(3), 261 (2003).
4. K. W. Vance and C. R. Goding, The transcription network regulating melanocyte development and melanoma, *Pigment Cell Res.*, **17**(4), 318 (2004).
5. C. Lin, L. Babiarz, F. Liebel, E. Price, M. Kizoulis, G. Gendimenico, D. Fisher, and M. Seiberg, Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation, *J. Inv. Dermatol.*, **119**(6), 1330 (2002).
6. S. S. Sulaimon and B. E. Kitchell, The biology of melanocytes, *Veterinary Dermatol.*, **14**, 57 (2003)
7. Shimogaki, Tanaka, Tamai, and Masuda, *In vitro* and *in vivo* evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition, *Int. J. Cosmetic Science*, **22**, 291 (2000).
8. G. Prota, Melanins and Melanogenesis, Academic Press, Inc., 42 (1997).
9. M. O. Masse, V. Duvallet, M. Borremans, and L. Goeyens, Identification and quantitative analysis of kojic acid and arbutine in skinwhitening cosmetics, *Int. J. Cosmetic Science*, **23**, 219 (2001).
10. D. I. Jang, B. G. Lee, C. O. Jeon, N. S. Jo, J. H. Park, S. Y. Cho, H. Lee, and J. S. Koh, Proceedings, 2nd scientific conference of the Asian Soc. of Cosmetic Scientists, 296 (1995).
11. Funasaka, Chakraborty, Komoto, Ohashi, and Ichihashi, The depigmenting effect of α -tocopheryl ferulate on human melanoma cells, *British J. Dermatol.*, **141**, 20 (1999).

12. J. C. Espín, R. H. Veltman, and H. J. Wichers, The oxidation of l-ascorbic acid catalysed by pear tyrosinase, *Physiologia Plantarum*, **109**, 1 (2000).
13. T. W. Heritage and D. R. Lewis, In Rational drug design: novel methodology and practical applications: molecular hologram QSAR. Ch. 4., Parrill, A. L. and Reddy, M. R. (eds.) ACS Symposium Series No. 719, Washington, DC. (1999).
14. S. J. Kim, Comparative molecular field analysis (CoMFA) on the melanogenesis inhibitory activity of alkyl-3,4-dihydroxybenzoate and N-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide derivatives, Thesis of Ph. D degree, Graduate School of Paichai University, Daejeon Korea, **26** (2002).
15. M. J. Dewar, E. G. Zolbisch, E. E. Healy, and J. P. Stewart, AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902 (1985).
16. Tripos Associates, Inc., 1699 S. Hanley Road, Suite 303, St. Louis, MO. 63144-2913 U.S.A.
17. W. D. Tong, R. Lewis, R. Perkins, Y. Chen, W. J. Welsh, D. W. Goddette, T. W. Heritage, and D. M. Sheehan, Evaluation of quantitative structure-activity relationship methods for large scale prediction of chemicals binding to the estrogen receptor, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38**, 669 (1998).
18. L. Stahle and S. Wold, Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research, *Prog. Med. Chem.*, **25**, 292 (1988).
19. S. Wold, C. Albano, W. J. Dunn, U. Edlund, K. Esbensen, P. Geladi, S. Hellberg, E. Johanasson, W. Lindberg, and M. Sjostrom, In chemometrics: mathematics and statistics in chemistry multivariate data analysis in chemistry, Reidel, Dodrecht, Netherlands 17 (1984).
20. G. Klopman, Chemical reactivity and reaction paths, Ch. 4., 55, John Wiley & Sons, New York (1974).
21. I. Fleming, Frontier orbitals and organic chemical reactions, Ch 3., John Wiley & Sons, London (1976).
22. G. Prota, Melanins and melanogenesis, Academic Press, Inc., 135 (1997).