

# 죽여의 멜라닌 생성 억제 효과 및 관련 단백질 동향 분석

이정현 · 김상범<sup>1</sup> · 변상요\*

아주대학교 대학원 응용생명공학과 화장품과학전공, <sup>1</sup>한국화장품 기술개발연구소

## Inhibitory Melanogenesis of *Bambusae caulis in Taeniam* and Profiling of Related Proteins

Chung Hyun Lee, Sang Bum Kim<sup>1</sup>, and Sang Yo Byun\*

Cosmetic Science Major, Dept of Applied Biotechnology, Graduate School, Ajou University, Suwon, Korea, 443-749

<sup>1</sup>R&D Center, Hankook Cosmetics Co., LTD., Chungcheongbuk-Do, Korea, 369-834

**Abstract** Inhibitory melanogenesis by *Bambusae caulis in Taeniam* (*Phyllostachys nigra var. henonis Stapf*) was studied. Tyrosinase inhibition activities were evaluated with six different extracts. Among them the extract with methanol showed the highest tyrosinase activity inhibition. MTT assay with B16 melanoma showed that the extract was not toxic up to the concentration of 50 ppm. The melanogenesis was clearly inhibited by the extract when it was examined by the melanin content assay in the cell. When the extract was dosed as 10 ppm, the melanogenesis was reduced to 68% in culture medium and 74% in the cell. By the proteome analysis with 2-D electrophoresis, 171 protein spots were found in the control gel and 282 spots were detected in the sample gel. Among 120 spot proteins matched, 12 spots were identified as proteins involved in the melanogenesis mechanism.

**Keywords:** *Bambusae caulis in Taeniam*, inhibitory melanogenesis, proteome profiling

### 서 론

대나무 (*Bamboo*)는 화본과 중 가장 키가 큰 식물로 한국과 일본을 포함한 동남아시아에 주로 분포하고 있다. 세계적으로 약 280여종이 알려져 있으며, 동양에서는 대나무 속 (*Phyllostachys*)과 조릿대 속 (*Sasaalbo*)이 주로 알려져 있다. 우리나라에는 약 70종의 대나무 종류가 자생 또는 재배되고 있다. 죽여 (*BambusaecaulisinTaeniam*)는 대를 꺾어 외피를 제거하고 중간층을 말린 것으로, 성상은 얇은 막편 또는 불규칙한 실모양으로 너비와 두께가 고르지 않으나 두께 1-11 mm의 조각인 것도 있다. 바깥면은 엷은 녹색-황록색 또는 회백색이며 가루로 된 것도 있다. 질은 가볍고 탄력성이 있고 섬유성이다. 동의보감에는 구토 및 해열, 불면증, 거담 등의 증상에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

멜라닌은 피부가 자외선에 노출되면 멜라노사이트의 멜라

노내의 tyrosine이 tyrosinase라고 하는 enzyme에 의해 산화되어 생성되는데 여기에는 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 세포내 조절인자, tyrosinase, dopachrom tautomerase, peroxidase, catalase, glutathione reductase 등의 효소와 구리, 아연, 철 등의 금속이온 및 인터페론 (IFN), 프로스타그란딘 (PG), Cyclooxygenase (COX)등과 같은 mediator가 관여하는 것으로 알려져 있다 [1-3]. 뿐만 아니라, 멜라닌이 생성되어 피부까지 발현되는 과정은 다른 세포와 여러 단백질 간의 긴밀한 관계로 이루어져 있다. 또, tyrosinase 이외에 다른 조절인자가 있지만 아직 그 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않은 상태이다. 프로테오믹스 (proteomics)는 이러한 세포에서 발현되는 모든 단백질의 구조와 기능을 밝히는 기술로써, two-dimensional electrophoresis (2-DE)와 mass spectrometry를 이용하는 방법이 주로 사용되고 있다. 2-DE는 복잡한 protein 복합체들을 동시에 분리하여 분석할 수 있는 기술로서, protein 발현 단계나 이성질체 등으로 인한 protein들의 변화를 그대로 보여 준다 [4].

화장품 산업에서 미백제품의 비중은 점점 커져가고 있으며, 미백 원료의 개발 역시 활발하게 이루어지고 있다.

### \*Corresponding author

Tel: +82-31-219-2451, Fax: +82-31-219-1610

e-mail: sybyun@ajou.ac.kr

본 연구에서는 전라남도 담양에서 채취하여 얻은 죽여를 이용하여 여러 가지 방법으로 추출한 후 *in vitro* 미백활성을 평가하여 피부에 안전하고 효과가 뛰어난 천연추출물의 효능을 확인하고자 하였다. 또한 더 나아가 proteome profiling 기술을 응용하여, 죽여추출물 투여에 따른 멜라닌 합성 저해 및 이와 관련된 protein들의 변화를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에서는 전라남도 담양지역의 솜대에서 얻은 죽여를 구매하여 분쇄하여 사용하였다. 사용된 시약은 Sigma aldrich (USA)로부터 구입하여 사용하였고, arbutin은 Bioland (Korea)로부터 구입하였다. 세포 배양에 필요한 시약들은 WelGENE Inc. (Korea)로부터 구입하였다. 그 외 2-DE 실험에 사용한 시약들은 HPLC 등급으로, Sigma aldrich (USA)와 GE Healthcare (USA)에서 구입하였다.

### 죽여 추출

죽여를 분말화하여 얻은 가루 10 g에 물 (실온), 열수 (70°C), 99% 메탄올, 70% 메탄올, 95% 에탄올, 70% 에탄올, 30% 부틸렌글라이콜, 핵산을 각각 100 mL를 섞은 후 12시간 동안 추출하였다. 추출 후 얻어진 용액은 여과한 후 감압 농축하여 추출물을 얻었다.

### Tyrosinase 활성 억제 실험

각 추출물을 phosphate buffered saline (PBS, 0.175 M, pH 6.8)으로 1%로 희석하여 사용하였으며, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)을 1.5 mM 농도로 PBS에 녹인 solution 80  $\mu$ L와 희석한 추출용액 100  $\mu$ L, tyrosinase (320 unit/mL) 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계 (iMark microplate reader, Bio-rad Laboratories, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 L-DOPA solution 80  $\mu$ L와 추출용액 100  $\mu$ L, PBS 20  $\mu$ L를 반응시킨 것이고, control은 L-DOPA solution 80  $\mu$ L와 PBS 100  $\mu$ L, tyrosinase (320 unit/mL) 20  $\mu$ L를 반응시킨 것으로, 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity} = \left(1 - \frac{S_{ABS} - B_{ABS}}{C_{ABS}}\right) \times 100 (\%)$$

( $S_{ABS}$ : Absorbance of sample,  $B_{ABS}$ : Absorbance of blank,  $C_{ABS}$ : Absorbance of control)

### 세포독성 확인 실험 (MTT assay)

세포의 생존율을 알아보기 위해서 세포독성 확인 실험을 실행하였다. 먼저 tyrosinase 활성 억제 실험을 통해, 효과가 확인된 추출방법을 통한 죽여 추출물을 선정하였다. 선택된 추출물의 용매를 제거 한 후, dimethyl sulfoxide (DMSO)로 농도별로 희석 하여 sample을 만들었다. B16 melanoma cell을 well당  $5 \times 10^3$ 개 96 well plate에 접종하고 24시간 배양한 후, 각 sample이 포함된 배지로 갈아주어 3일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)로 2회 세척한 다음 2 mg/mL thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) solution 50  $\mu$ L씩 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 incubation 하였다. MTT solution을 제거하고 (D-PBS)로 세척한 다음, 생성된 formazan crystal에 DMSO를 200  $\mu$ L씩 넣어 용해시키고 분광광도계를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다 [5].

### Melanin contents assay

세포 내에 있는 melanin과 세포 밖 배지에 존재하는 melanin 함량을 측정하기 위해서 실험을 수행하였다. B16 melanoma cell을 96 well plate에  $1.0 \times 10^5$  cells/well의 농도로 접종하여 24시간 배양한 다음, 죽여 추출물을 0, 0.5, 1, 5, 10 ppm이 포함된 phenol red가 없는 배지로 교체하여 2일간 배양하였다. 배지는 모두 회수하여 원심분리 (4500 rpm, 10 min)한 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 밖으로 방출된 melanin 양을 계산하였다. Plate에 붙어있는 세포는 D-PBS로 2회 세척한 다음 trypsin-EDTA로 처리하, 회수하여 원심분리 하였다. Cell pellet에 10% DMSO가 들어있는 1 N NaOH solution을 넣어 80°C에서 1시간 동안 멜라닌을 녹인 다음 96-well plate에 넣고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 [6].

### Protein extraction

5 ppm의 죽여 추출물이 처리된 B16 melanoma cell을 3일 배양하여 회수한 후 10배 희석한 D-PBS로 washing하였다. Cell pelet을 500  $\mu$ L lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% carrier ampholyte, 4% PIC, 0.002% bromo phenol blue)에 넣고 1 min 동안 sonication 한 후 30°C에 5시간 동안 추출하였다. 그 후 13500 rpm으로 10 min 동안 원심분리하고, protein이 녹아있는 상등액을 얻어 냉동보관 하였다. 단백질 정량은 Bradford method를 이용하였다 [7].

### Two-dimensional electrophoresis

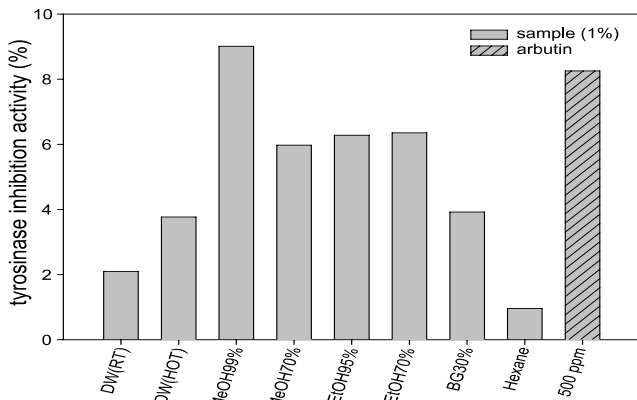
Isoelectric focusing은 rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 2% carrier ampholyte, 10% glycerol, 0.002% BPB) 450  $\mu$ L로 Immobiline DryStrip

(24 cm, pI 3-10NL)을 12시간 이상 rehydration 한 후 cup roading법을 이용하여 100 µg 단백질을 roading하였다. Focusing은 500 V에서 500 Vhr, 1000 V에서 800 Vhr, 10000 V에서 16.5 KV, 10000 V에서 37.7 KV에 도달할 때까지 Ettan IPGphor를 이용하여 실시하였다. IEF가 끝나면 equilibrium solution (7 M urea, 2 M thiourea, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 30% glycerol) 10 mL에 1% DTT를 첨가하여 strip을 넣은 후 1차로 15 min 동안 shaking을 시켰다. 그 후 동일한 equilibrium solution에 2.5% iodoacetamide를 첨가하여 strip을 넣고 2차로 15 min 동안 shaking을 시켰다. Second-dimension SDS-PAGE는 25×20 cm, 10.5%의 acrylamide homogenous gel을 만들어 40 mA/gel로 5시간 동안 실행하였다 [8]. Gel은 silver nitrate를 사용하여 staining 한 후 4°C에 보관하였고 gel pattern을 비교하기 위해서 ImageMaster2D program을 이용하였다 [9].

**결과 및 고찰**

**Tyrosinase 활성 억제**

피부 미백의 기본이라 하는 melanin 생성 억제 메커니즘의 첫단계인 tyrosinase 활성 억제를 통하여 melanin 생성 억제 효과 및 궁극적인 미백효과를 가름해볼 수 있다. 다양한 용매를 이용하여 다양한 방법으로 추출된 죽여 추출물을 대상으로 tyrosinase 활성억제 실험을 하였다. 99% 메탄올을 이용하여 추출했을 때의 억제효과가 가장 높게 수치를 보였고, 상대적으로 알부틴을 대조군으로 사용하여 비교해 본 결과, 99% 메탄올 추출물의 tyrosinase 활성억제 효과는 알부틴 1000 ppm과 유사한 수준임을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이 결과는 물론 mushroom tyrosinase를 이용한 melanin 생성 억제 효과이지만, 상당히 우수한 melanin 생성 억제효과를 보일 것으로 추측하는 기초 자료임을 알 수 있었다.

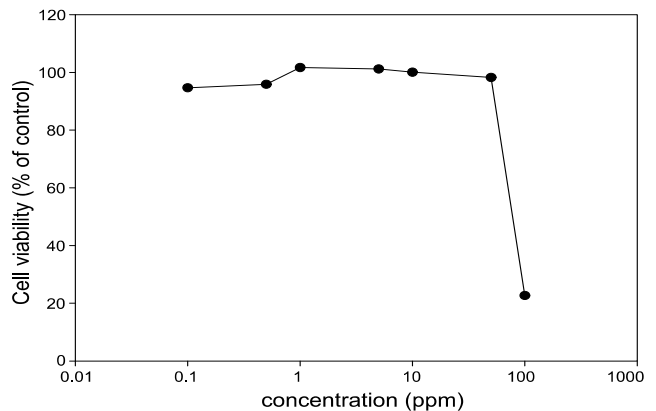


**Fig. 1.** Comparison of mushroom tyrosinase inhibition activity (%) of extracts with various extraction methods from *Bambusae caulis in Taeniam* & Arbutin. The dose concentration of each extract is 1% of saturated extract concentration.

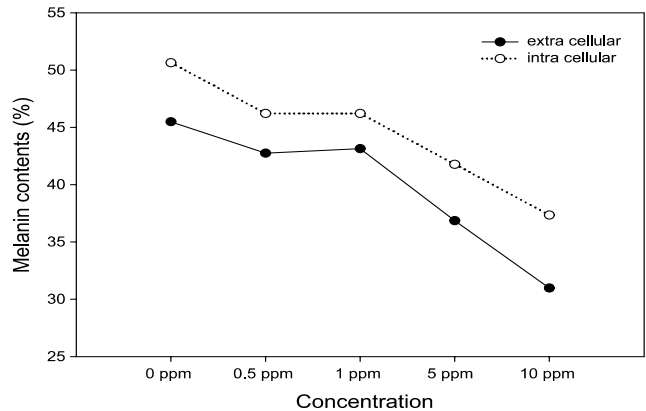
용매에 따른 추출물을 비교 해 보았을 때, 물 추출물 보다 알코올 용매에서 더 높은 효과를 보이는 것으로 보아, tyrosinase 활성을 억제하는 유용성분은 당화합물일 확률은 그다지 높지 않아 보인다. 하지만 메탄올은 대표적인 양매성 용매이기에 추출의 폭이 넓어 유용성분의 특성을 가름하기 쉽지 않다. 한편 hexan 추출물은 가장 낮은 효과를 보였는데, 이로 미루어 tyrosinase 활성억제에 비중 있게 작용하는 유용성분은 친수성일 것이라는 추측은 가능해진다.

**세포 melanin 생성 억제**

세포 수준에서 죽여 추출물의 melanin 생성 억제 효과를 알아보기 위해서 B16 melanoma 세포를 이용하였다. 우선 죽여 추출물이 세포에 대한 독성을 확인하였다. B16 melanoma 세포에 죽여 추출물의 농도를 높여 투여하면서 세포의 생존율을 측정하였다. 이러한 MTT assay를 이용한 독성 실험 결과, Fig. 2에서 보듯이 죽여 추출물의 경우 50 ppm의 농도 범위 내에서는 세포 독성이 거의 나타나지 않으며 그 이상의 농도에서는 세포독성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 2.** Cell viability of B16 melanocyte treated with methanol extract from *Bambusae caulis in Taeniam*.



**Fig. 3.** Melanin content of B16 melanocyte treated with methanol extract from *Bambusae caulis in Taeniam*.

피부 미백의 가장 직접적인 원인이라 하는 melanin 생성을 억제하는 추출물을 찾기 위한 노력이 계속되면서, melanin 생성 억제 효과를 직접적으로 측정하는 것이 정확하면서 예측 가능한 피부 미백 효과를 설명하는 방법이 될 수 있다. 죽여 추출물을 B16 melanoma 세포에 투여하고 그로 인하여 melanin 생성 양의 증감을 직접적으로 측정하여 분석하였다. B16 melanoma 세포에 독성을 나타내지 않는 농도 별로 죽여 추출물을 투여하고, 일정시간 배양 후 세포 내 melanin 생성 양을 비교하였다. 보다 정확한 억제 효과를 측정하기 위하여 B16 세포 내 (Intra cellular) 외에도, 배지에 존재하는 (Extra cellular) melanin 함량을 측정하였다. 그 결과 농도에 따른 melanin의 함량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 10 ppm 농도로 추출물을 넣어 주었을 때의 cell을 보면, intra cellular의 경우 control 대비 melanin이 74% 감소하였으며, extra cellular 역시 68%로 감소하였다. Extra cellular와 intra cellular 모두에서 sample 농도에 의존하는 추세를 보였는데, 이를 보아 죽여 추출물은 melanin 합성 후 각질형성세포로 transfer하는 기작에 관련하는 것이 아니라, melanin 합성 전이나 합성 중에 관련된 메커니즘에 주로 영향을 미치는 것을 추측할 수 있었다.

### 멜라닌 생성 억제 proteome profiling

죽여 추출물이 melanogenesis에 어떠한 변화를 주는지 확인하기 위하여 2-DE를 이용해 proteome 조절 동향을 분석하고 proteome profiling을 실시하였다. Profiling을 위하여 추출물을 처리하지 않고 배양한 B16 melanoma 세포 내 proteome 2-DE의 gel image를 대조군으로 하고, 한편으로는 죽여 추출물을 처리한 후 48시간 배양 한 B16 melanoma 세포의 gel image를 비교하였다. Gel image 분석 결과 대조군에서는 총 171개의 spots을, 추출물을 처리한 것은 총 282개의 spots을 확인 할 수 있었으며 그중 총 120개의 spots이 matching되었다. Matching spot의 pI값과 molecular weight를 비교해 본 결과, 대표적 미백 관련 단백질 12개의 spot을 확인할 수 있었다 (Table. 1).

확인된 12가지 단백질을 토대로 죽여가 미백 메커니즘에

어떻게 작용하는지 추측해 볼 수 있다. 우선 melanin contents assay 결과를 보면, extra cellular와 intra cellular 모두에서 sample 농도에 dependent한 추세를 보였다. 이를 보면 죽여 추출물은 멜라닌 합성 후 각질형성세포로 transfer하는 기작에 관련하는 것이 아니라, 멜라닌 합성 전이나 합성 중 기작에 관련하는 것이라고 볼 수 있다. 그 결과는 2D분석에서도 확인할 수 있다. 분석된 단백질은 합성 전, 혹은 합성 중에 관련된 단백질이었고, PAR-2와 같은 합성 후 과정에 관여하는 단백질의 변화는 확인해 볼 수 없었다. 실험 결과 ACTH와  $\alpha$ -MSH의 양이 줄어든 것으로 보아, 죽여 추출물이 1차적으로 ACTH의 발현을 막고, 이에 따라 연쇄적으로  $\alpha$ -MSH의 발현이 줄어들어 melanin 형성이 억제되었다고 추측할 수 있다. 또, negative 역할을 하는 DKK1의 양은 늘어 합성 전 단계에서 tyrosinase나 melanosom 합성을 저해한 것으로 보인다. 이와 더불어 합성 중 과정에서의 ET-1 단백질과 PKC- $\beta$ 의 양이 줄어든 것을 확인하였는데, 이는 PKC와 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 경로에 관여하는 것으로 알려진 ET-1 단백질의 양이 줄어들어 따라 melanin 합성 signal을 차단시키는 역할을 하여 melanin의 양이 줄어든 것으로 보인다. 또 아직 그 메커니즘이 확실히 밝혀지지 않은 bFGF, LAMP 1, flotillin 1, flotillin 2, MCH의 영향까지 고려 해 보아야 한다. 이처럼 melanin 합성 과정은 단순히 몇 개의 단백질이 관여하는 것이 아니라, 여러 단백질의 복합적인 작용을 통해 일어나는 것을 확인할 수 있었다 [10-14]. 본 연구를 통하여 분석된 단백질은 합성 전, 혹은 합성 중에 관련된 단백질이었으며, 여러 단백질의 복합적인 작용을 통해 일어나는 것을 알 수 있었다. 따라서 죽여 추출물의 미백 및 항산화 효과는 천연물로서의 그 기능적인 이용에 충분히 이용 가능할 것으로 추측되며, 화장품 원료로의 가능성을 검토하고, 제형 적용 연구 등을 통한 기능성 화장품 개발에 응용할 수 있을 것으로 기대 할 수 있다.

### 요 약

죽여 추출물의 미백 효과를 확인하기 위하여 용매와 추출

**Table. 1.** List of identified B16 melanocyte treated with *Bambusae caulis* in *Taeniam* extract by ImageMaster

Protein	Full name	NCBI number	pI	M.W. (Da)	대조군의 spot Vol%	죽여추출물 투여군의 spot Vol%
ACTH	adrenocorticotropic hormone	Q64326	8.47	33,982	0.7668	0.3444
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone	Q01727	8.9	35,282	0.1829	0.0778
tyrosinase	tyrosinase	P11344	5.74	60,606	0.2649	0.2071
ET-1	endothelin-1	P22387	4.54	22,809	0.6612	0.2362
SCF	stem cell factor	P20826	4.94	30,645	0.1558	0.0488
DKK1	Dickkopf-related protein 1	Q54908	8.64	29,269	0.8039	1.0596
PKC- $\beta$	Protein kinase C beta type	P68404	6.62	76,894	0.1119	0.0670
MCH	melanin-concentrating hormone	P56942	5.92	18,645	0.0490	0.0304
bFGF	basic fibroblast growth factor	P16092	5.88	91,981	1.2579	1.3094
flotillin1	Flotillin-1	Q18917	6.71	47,513	1.3083	0.9828
flotillin2	flotillin2	Q60634	5.31	47,038	1.1804	1.1175
LAMP1	Lysosome-associatedmembrane glycoprotein1	P11438	8.34	43,865	0.1710	0.3583

방법을 달리한 6가지의 추출물을 얻어 tyrosinase 활성 억제 시험을 하였다. 그 결과 메탄올로 추출한 죽여 추출물에서 tyrosinase 활성 억제 효과가 가장 우수한 것을 확인 하였다. 세포 수준에서 죽여 추출물의 melanin 생성 억제 효과를 알아보기 위해서 B16 melanoma 세포를 이용하여 MTT assay 를 실시하였고, 50 ppm의 농도 까지는 세포 독성이 나타나지 않은 것을 확인하였다. 죽여 추출물에 의한 세포 내 melanin 합성 저해 효과를 측정하기 위해 melanin contents assay를 하였고, 10 ppm 추출물을 처리한 extra cellular에서는 control 대비 68%, intra cellular에서는 74% 수준으로 melanin 합성이 저해됨을 확인하였다. 이차원전기영동을 이용하여 B16 melanoma 세포의 proteome을 분석 해 본 결과, 죽여 추출물을 투여하지 않은 대조군에서는 171개, 추출물을 투여한 것에서는 282개의 spot을 확인하였고, 120개의 spot matching 을 확인하였다. 이 중 미백에 관련된 12개의 단백질 동향 분석을 통하여, 죽여 추출물이 melanin 합성 전이나 합성 중에 관련된 메커니즘에 관련하는 것을 알 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 한국연구재단의 일반연구지원사업의 연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 8월 18일, 게재승인 : 2010년 10월 22일

## REFERENCES

1. Maeda, K. and M. Fukuda (1996) Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 765-769.
2. Saruno, R., F. Kato, and T. Ikeno (1979) Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*. *Agric. Biol. Chem.* 43: 1337-1338.
3. Park, J. H., Y. G. Shin, U. K. Shin, S. K. Baek, S. K. Lee, M. H. Chung, and Y. I. Park (1997) Tyrosinase inhibition activity of some herbal drug. *Yakhak Hoiji.* 41: 518-523.
4. Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser, and K. L. Williams (1996) Progress with proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 12: 19-50.
5. Sieuwerts, A. M., J. G. Klijn, H. A. Peters, and J. A. Foekens (1995) The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50 values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33: 813-823.
6. Jimbow, M., H. Kanoh, and K. Jimbow (1982) Characterization of biochemical properties of melanosomes for structural and functional differentiation: Analysis of the compositions of lipids and proteins in melanosomes and their subfractions. *J. Invest. Dermatol.* 79: 97-102.
7. Sulaimon, S. S. and B. E. Kitchell (2003) The biology of melanocytes., *Veterinary Dermatology* 14: 57-65.
8. Bjellqvist, B., R. Westermeier, and W. Postel (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 6: 317-339.
9. Mortz, E., T. N. Krogh, H. Vorum, and A. Görg (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *PROTEOMICS.* 1: 1359-1363.
10. Ken-ichi, Y., V. Julio, M. Jacqueline, D. V. Wilfred, W. Hidenori, S. Jeffrey, J. H. Vincent, F. H. Donald, and A. Ettore (2002) Proteomic Analysis of Early Melanosomes: identification of Novel Melanosomal Poteins. *J. Proteome research.* 2: 69-79.
11. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermal.* 75: 122-126.
12. Sober, A. J. and T. B. Fitzpatrick (1974) Pathophysiology of melanin pigmentation in man. *Prog. Chem. Org. Natural Products.* 31: 521-582.
13. Hosoi, J., E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1-alpha 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45: 1474-1478.
14. Mario, M. B. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.