J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 37, No. 3, September 2011, 275-282

cAMP 신호전달과정을 통한 신규 천연유래물질 펩타이드 유도체의 미백 효능 연구

이 혜 숙 · 신 경 훈 · 류 근 석 · 지 경 엽 · 조 인 식 · 김 한 영†

애경산업(주) 중앙연구소

(2011년 9월 8일 접수, 2011년 9월 15일 수정, 2011년 9월 19일 채택)

Whitening Efficacy Study of Natural Compounds-Peptide Derivatives via cAMP Signaling Pathway

Hye Suk Lee, Kyong Hoon Shin, Geun Seok Ryu, Kyung Yup Jee, In Shik Cho, and Han Young Kim†

Central Research, Aekyung R&D Center, 217-2, Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-345, Korea

(Received September 8, 2011; Revised September 15, 2011; Accepted September 19, 2011)

요 약: MC1R의 길항제 역할을 하는 펩타이드와 tyrosinase를 저해하는 효능을 가지는 천연유래 물질을 유도체화하여 신규 미백소재를 개발하였다. 또한 이러한 새로운 기작에 의한 미백 효능을 평가할 수 있는 방법을 cAMP 신호전달 과정을 활용하여 제시하였다. 총 24종의 유도체를 합성하였고, cAMP assay의 결과를 통해 11종의 유도체를 선별하였으며, 선별된 유도체에 대하여 멜라닌 형성 억제 효능을 평가하여 본 평가 방법의 유효성을 확인하였다. 이 과정에서 RW를 서열에 포함하는 펩타이드 유도체가 특별히 멜라닌 형성 억제 효능이 높은 것을 알 수 있었다. 또한, cAMP assay는 MC1R의 antagonist라는 특정 타겟 물질을 디자인한 소재의 스크리닝 방법에는 활용할 수 있음을 알 수 있었다. 하지만, 미백소재로서의 가능성을 확인하기 위해서는 멜라닌 생성저해 시험과 병행하여야 할 것으로 판단된다.

Abstract: Novel whitening agents were prepared using peptide-Natural origin compound derivatives. The peptide could be an antagonist of MC1R and Natural origin compound were well-known material as a Tyrosinase inhibitor. We also suggest the new assay method which could evaluate the Antagonistic effectiveness to MC1R using cAMP signaling pathway. 24 candidates were synthesized and 11 peptide derivatives were selected by cAMP assay method. To evaluate cAMP assay, the selected peptide derivatives were assayed to evaluate their melanogensis inhibitory activity. At this work, we could know that the sequences which include -RW- have a melanogensis inhibitory activity, and cAMP assy could use as a evaluating method of MC1R antagonist. But, to evaluate the whitening activity of some material, cross-checking with melanin inhibitory assay method was recommended.

Keywords: *α-MSH, MC1R, antagonist, cAMP, melanogenesis*

1. 서 론

피부에서 멜라닌은 멜라닌형성세포(melanocyte) 내의 멜라닌소체(melanosome)에서 생성, 축적되며, 성숙된 멜라닌소체는 인접 각질형성세포(keratinocyte)에 전달되어 피부의 색을 나타내게 된다. 과색소침착은 이러한 멜라닌이 과다하게 축적된 피부에서 나타나며, 기미, 주근깨 등으로 피부에 나타나기도 한다[1].

멜라닌형성세포에서 멜라닌의 생성을 촉진하는 물질 중의 하나는 proopiomelanocortin (POMC)의 분해산물인 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)이 있다. 멜라닌 생성 과정에서 α-MSH는 멜라닌형성세포에 존재하는 melanocortin receptor 1 (MC1R) 수용체에 특이적으로 결합하여[2] G-protein을 통해 adenylate cy-

† 주 저자 (e-mail: hans73@aekyung.kr)

clase를 활성화시키고, 이 효소는 adenosine triphosphate (ATP)를 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)로 전환시킨다[3]. 이 cAMP는 protein kinase A (PKA)를 활성화시키고, PKA는 cAMP responsive element binding protein (CREB)을 인산화시켜 활성화시킨다[4-7]. 그 다음에 CREB는 microphthalmia transcription factor (Mitf)의 M promoter에 있는 cAMP responsive element (CRE) domain에 결합하고[8-10], Mitf의 발현이 증가함으로써 tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP)-1과 TRP-2의 발현이 증가한다[6,11,12]. 발현이 증가된 tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다.

기존에는 이러한 tyrosinase의 활성을 억제하는 정도를 스크리닝하여 미백소재를 개발하는 경우가 많이 있었지만, 최근에는 tyrosinase 활성 억제 뿐만 아니라 멜라닌 생성, 이동, 축적 등 여러 단계에서의 기작을 조절함으로써 다양한 메커니즘 연구를 통해 보다 효능이 우수한 미백소재의 개발하려는 경우가 증가하고 있다.

이에 우리는 지난 연구에서 α-MSH 자체의 발현을 억제하여 tyrosinase의 발현을 저해하는 기작을 접목한 신규한 미백소재를 개발하여 발표하였다[13]. Tyrosinase의 발현을 저해하는 펩타이드인 melanostatin (PLG-NH_2) 유래 아미노산 서열에[14-16] tyrosinase 활성 저해 스크리닝을 통해 선정된 caffeic acid, coumaric acid를 도입하였으며, 이는 coumaric acid 혹은 melanostatin 단독으로 사용했을 때보다 더 향상된 효능을 보였다.

이번 연구에서는 MC1R의 antagonist 효능을 가지는 펩타이드 서열을 활용하여 새로운 유도체를 개발하고자 하였다. α-MSH의 핵심서열로 알려져 있는 HFRW를 기본으로 하여[17] 그와 유사한 아미노산으로 일부를 대체하거나 순서를 변경하여 caffeic acid와 coumaric acid를 결합하여 펩타이드 유도체를 합성하였다. 이는 MC1R의 agonist인 α-MSH의 핵심서열을 활용하여 그 친화도를 유지하면서 α-MSH와는 다른 구조를 가지도록 설계하여 오히려 antagonist의 역할을 하도록 한 것이다.

Tyrosinase의 발현은 MC1R의 활성화를 통해 이루어진다. MC1R은 MC2R, MC3R, MC4R, MC5R과 함께 G-protein-coupled receptor (GPCR)에 속하는 수용체로서, cAMP pathway를 자극시킨다. 따라서, cAMP assay는 타겟 물질이 agonist 혹은 antagonist의 성질을 갖는지 확인하는 데 적용될 수 있으며, 우리는 MC1R의 antagonist 효능을 갖는 신규 미백소재를 효과적으로 검증하기 위해서 cAMP를 이용한 평가법을 도입하여 시료를 스크리닝 하였다. 또한, 실험에 사용한 세포주는 B16F1 murine melanoma cells로서, 이 세포주는 MC1R을 자연적으로 발현하고 있기 때문에[18] cAMP assay 실험에 적합하다.

우리는 이번 논문에서 새로이 제조된 펩타이드 유도체를 활용하여 개발된 평가법의 유효성을 확인하고, 미백효능을 가지는 신규 펩타이드 유도체를 선별하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

시험에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co (St. Louis, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였고, 배지로 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Grand Island, USA)를 사용하였다. Adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate (cAMP) 생성량은 R&D Systems (Minneapolis, USA)의 immunoassay kit를 이용하여 정량하였다. B16F1 murine melanoma cell은 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였다.

FMOC 아미노산은 BeadTech (Seoul, Korea)사의 제품을 구입하여 사용하였으며, benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent), Hydroxybenzotriazole (HOBt), diisopropylethylamine (DIEA)는 TCI (Tokyo, Japan)사의 제품을 사용하였고, rink amide resin, 2-Chlorotrityl (CTC) resin은 GLS (shanghai, China)사의 제품을 사용하였다. 합성에 사용된 천연유래물질인 caffeic acid, coumaric acid는 TCI (Tokyo, Japan)사의 제품을 사용하였고, 천연유사물질인 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid는 Acros (New Jersey, USA)사의 제품을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 세포 배양

실험에는 B16F1 murine melanoma 세포주를 사용하였다. 세포주는 DMEM 배지에 10 % heat inactivated FBS와 1 % streptomycin/penicillin을 첨가한 것을 기본 배지로 하여, 37 ℃에서 5 % CO_2 조건 하에서 세포가

plate 바닥에 80 % 부착될 때까지 배양한다.

2.2.2. cAMP 생성량 측정

세포의 cAMP 생성량을 측정하기 위해서 B16F1 murine melanoma cell을 5×10^4 cell/well의 농도로 24-well plate에 분주하여 1일간 배양한 후, 각 시료들을 일정 농도로 처리하였다. 20 min 시료를 처리한 다음에 배지를 제거하고 세포를 PBS (phosphated buffer saline)로 세척한 후, cAMP immunoassay kit (R&D systems, USA)에 동봉된 cell lysis buffer (1X)를 이용하여 freeze-thaw 방법으로 세포를 용해하였다. 세포가 완전히 용해된 후, cellular debris를 제거하기 위해 600 × g에서 10 min 원심분리하여 상층액 내의 cAMP 양을 kit를 이용하여 정량하였다. 생성된 cAMP의 양은 cAMP standard를 사용하여 작성된 표준 직선을 이용하여 정량하였다.

cAMP inhibition rate (%) = [(A-B)/(A-C)]*100

A : α-MSH만 처리했을 경우 cAMP 생성량
B : antagonist 첨가시 cAMP 생성량
C : 무처리군의 cAMP 생성량

2.2.3. 멜라닌 생성량 측정

세포의 멜라닌 생성량을 측정하기 위해서 B16F1 murine melanoma cell을 6-well plate에 1×10^5 cell/well의 농도로 분주하여 1일간 배양한 후, 각 시료들을 일정농도로 처리하였다. 시료 처리 후 3일째에 세포를 PBS로 세척하고 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 바닥에서 떼어내어 수득하였다. 2500 rpm, 10 min, 4 ℃ 조건으로 원심분리한 후 상층액을 버리고 인산완충용액으로 재 새척한 후 추가로 원심분리를 진행하여 상층액을 제거하였다. 수득된 세포를 60 ℃ 오븐에서 건조한 후, 1 N NaOH + 10 % DMSO 용액 200 μL을 추가한 후 60 ℃에서 1 h 동안 중탕하여 멜라닌을 녹였다. 멜라닌을 녹인 용액을 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 합성멜라닌을 사용하여 작성된 표준 직선을 이용하여 정량하였다.

멜라닌 녹인 용액의 단백질 농도 확인을 위하여 멜라닌 용액 10 μL와 PBS buffer 90 μL, advanced protein assay reagent를 100 μL을 반응하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 이용하여 표준 곡선을 작성하여 정량하였다.

Melanin inhibiton rate (%) = [(C-S)/C]*100

C : α-MSH만 처리했을 경우 흡광도 값
S : antagonist 첨가시 흡광도 값

2.2.4. Rink Amid 레진에서 펩타이드 유도체 합성 방법

치환율이 0.5 mM/g인 rink amid 레진을 반응기에 가하고 n-methyl-2-pyrrolidone (NMP) 용매에서 2 h 동안 팽윤시켜준 뒤, 20 % piperidine/NMP를 가하여 30 min 반응하여 레진의 FMOC보호기를 제거한다. 용액을 제거한 뒤, 20 % piperidine/NMP를 레진이 들어있는 반응기에 다시 가하고 1 h 동안 반응시켜 준다. 다시 용액을 제거한 뒤, 레진을 NMP, methanol (MeOH), dichloromethane (DCM)으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하여 잉여의 반응용액을 제거한다. 이 과정을 2회 반복하여 FMOC 보호기를 확실히 제거한다.

위의 반응기에 FMOC으로 아민 말단이 보호된 아미노산(치환기의 2당량)과, BOP reagent, HOBt, DIEA을 각각 아미노산의 1당량, 1당량, 1.1당량을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 3 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다[26]. 반응기의 용액을 모두 제거하고 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하였다. 세척이 완료된 레진에 20 % piperidine/NMP를 가하고 앞서 설명한 방법과 동일한 반응을 진행하여 FMOC 보호기를 제거하였다. 뒤에 이어서 다른 1 ~ 3종의 FMOC아미노산을 같은 방법으로 레진에 도입한다.

위와 같이 peptide가 도입된 레진에 천연유래(유사)물질(치환기의 2당량), BOP reagent (아미노산 시약과 동량), HOBt (아미노산 시약과 동량), DIEA(아미노산 시약의 1.1 당량)을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 24 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다.

상기와 같이 rink amide 레진 위에서 제조된 최종생성물인 펩타이드 유도체를 reagent K를 이용하여 알려진 방법으로 레진에서 분리하였다[27]. 분리된 펩타이드 유도체는 cold ether를 이용하여 침전시킨 후, 0 ℃에서 원심분리하여 용액과 분리하였다. 분리된 펩타이드 유도체는 동일 조건에서 cold ether를 20 mL 가하여 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 불순물을 제거하였다. 최종 생성물을 원심분리가 끝난 펩타이드 유도체를 24 h 동안 동결건조(FDU-2200, EYELA, Japan)하여 최종생성물을 얻었다.

2.2.5. 2-CTC 레진에서 펩타이드 유도체 합성 방법

치환율이 0.5 mM/g인 rink amid레진을 반응기에 가하고 NMP 용매에서 2 h 동안 팽윤시켜준 뒤, FMOC으로 아민 말단이 보호된 아미노산(치환기의 2당량), DIEA (아미노산 시약의 1.1 당량)을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 2 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test를 이용하여 확인하였다. 반응기의 용액을 모두 제거하고 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하였다. 세척이 완료된 레진에 20 % piperidine/NMP를 가하고 1 h 동안 반응시켜 준다. 다시 용액을 제거한 뒤, 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하여 잉여의 반응용액을 제거한다. 이 과정을 2회 반복하여 FMOC 보호기를 확실히 제거한다.

위의 반응기에 FMOC으로 아민 말단이 보호된 아미노산(치환기의 2당량), BOP reagent (아미노산 시약과 동량), HOBt (아미노산 시약과 동량), DIEA (아미노산 시약의 1.1 당량)을 가하고 NMP를 용매로 가한 뒤, 3 h 동안 반응한다. 반응의 종결은 kaiser's ninhydrin test 를 이용하여 확인하였다. 반응기의 용액을 모두 제거하고 레진을 NMP, MeOH, DCM으로 각각 3회 세척한 뒤, 마지막에 NMP로 다시 세척하였다. 세척이 완료된 레진에 20 % piperidine/NMP를 가하고 앞서 설명한 방법과 동일한 반응을 진행하여 FMOC 보호기를 제거하였다. 이렇게 레진 위에서 합성된 dipeptide를 그대로 활용하거나 뒤에 이어서 다른 1 ~ 2종의 FMOC 아미노산을 상기와 같은 방법으로 레진에 도입한다.

위와 같이 2-CTC 레진 위에 peptide가 도입된 이후에는 2.2.3의 rink amide 레진과 같은 방법으로 진행하여 펩타이드 유도체를 얻었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 천연물 펩타이드 유도체 합성

Coumaric acid와 caffeic acid에 펩타이드를 도입하여 24종의 천연유래 물질 펩타이드 유도체를 합성하였다 (Table 1). 합성된 천연유래물질 펩타이드 유도체의 순도와 분자량은 HPLC (Shimadzu LC-10Avp system, Shimaju, Japan)와 MALDI-TOF-MS (Kratos Kompact matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, Shimaju, Japan)를 이용하여 분석하였다(Figures 1, 2). HPLC에서 컬럼은 ODS column (4.6 × 250 mm; Shim-pack)을 사용하였으며, gradient 조건은 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) H_2O에서 0.1 % TFA Acetonitrile 농도를 30 min 동안 5 %에서 65 %로 늘리는 것으로 하였으며 유속은 1 mL/min로 하였다. MALDI-TOF는 일반적인 펩타이드의 matrix인 α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA)를 이용하여 측정하였다.

Table1. Synthesized Coumaric Acid and Caffeic Acid Peptide Derivatives

No.	Sample	M.W.	Purity (%)
1	Caffeic acid-HSRW-NH2	745.8	96.549
2	Caffeic acid-SRW-NH2	608.3	97.745
3	Caffeic acid-HFRW-NH2	806.8	98.878
4	Caffeic acid-FRW-NH2	669.2	98.835
5	Caffeic acid-RW-NH2	521.4	96.327
6	Caffeic acid-RS-NH2	423.2	96.556
7	Caffeic acid-HSRW-OH	746.7	97.274
8	Caffeic acid-SRW-OH	609.9	98.844
9	Caffeic acid-HFRW-OH	806.8	98.053
10	Caffeic acid-FRW-OH	669.7	97.316
11	Caffeic acid-RW-OH	522.8	97.226
12	Caffeic acid-WRS-OH	609.9	97.601
13	Caffeic acid-WRSH-OH	746.6	96.348
14	Coumaric acid-HSRW-NH2	729.7	96.109
15	Coumaric acid-SRW-NH2	592.3	98.846
16	Coumaric acid-HFRW-NH2	790.8	98.645
17	Coumaric acid-FRW-NH2	652.3	98.761
18	Coumaric acid-RW-NH2	505.7	98.385
19	Coumaric acid-HSRW-OH	730.3	98.740
20	Coumaric acid-SRW-OH	593.9	98.602
21	Coumaric acid-HFRW-OH	790.7	96.877
22	Coumaric acid-FRW-OH	653.8	99.299
23	Coumaric acid-RW-OH	506.8	99.236
24	Coumaric acid-RS-OH	407.8	97.632

3.2. α-MSH 조건별 cAMP 생성량 변화

MC1R의 antagonist를 스크리닝하기 위해서 cAMP 생성량을 측정하였다. MC1R은 G-protein coupled receptor (GPCR)로서, cAMP pathway를 거친다. 우리는 이 기작을 활용하여 이번 연구에서 개발된 유도체를 보다 효과적으로 평가할 수 있도록 평가법을 확립하였다. 이를 위해 melanocyte에서 MC1R과 결합하여 멜라닌 생

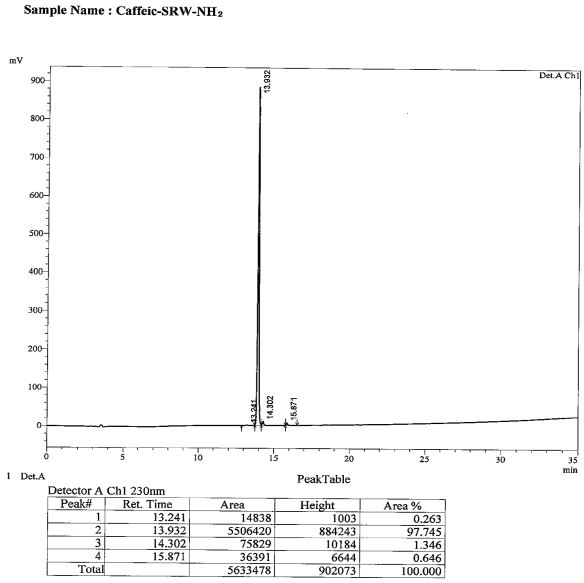

Figure 1. Caffeic acid-SRW-NH_2 HPLC data. Purity of caffeic acid-PLG-NH2 is more than 97.7 %.

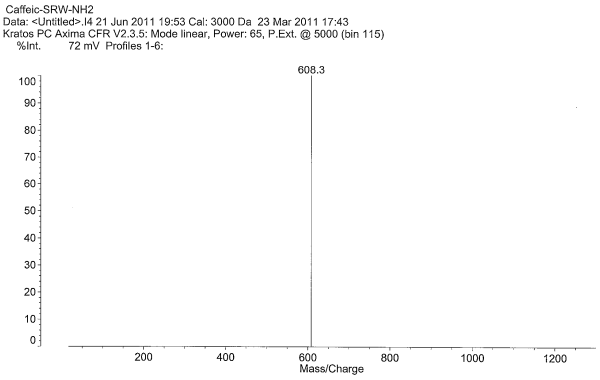

Figure 2. Caffeic acid-SRW-NH_2 MALDI-TOF data. The molecular weight of caffeic acid-PLG-NH2 is 608.3 g/mol.

성을 증가시키는 대표적 물질인 α-MSH를 처리하여, cAMP가 최대로 생성될 때의 α-MSH 처리 조건을 확인하였다.

B16F1 murine melanoma cell에 α-MSH를 1, 10, 50, 100, 500 nM의 농도로 처리하고, 각 농도별 처리 시간을 20, 40, 60 min으로 하여 각각의 조건에 따른 cAMP 생성량을 측정하였다. 두 번의 반복실험 결과, α-MSH를 100, 500 nM로 각각 20 min 처리했을 때 cAMP 생성량이 매우 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$). α-MSH 처리 농도 및 처리 시간에 따른 cAMP 생성량을 Figure 3에 나타내었다.

Table 2. cAMP Inhibition Rate of Peptide Derivatives at 10 μM

No.	Sample	cAMP inhibition rate (%)
1	Caffeic acid-HSRW-NH2	37.3
2	Caffeic acid-SRW-NH2	38.0
3	Caffeic acid-HFRW-NH2	13.7
4	Caffeic acid-FRW-NH2	1.2
5	Caffeic acid-RW-NH2	-15.4
6	Caffeic acid-RS-NH2	-13.9
7	Caffeic acid-HSRW-OH	-17.0
8	Caffeic acid-SRW-OH	-0.2
9	Caffeic acid-HFRW-OH	-20.1
10	Caffeic acid-FRW-OH	20.8
11	Caffeic acid-RW-OH	7.1
12	Caffeic acid-WRS-OH	14.8
13	Caffeic acid-WRSH-OH	41.1
14	Coumaric acid-HSRW-NH2	24.5
15	Coumaric acid-SRW-NH2	-6.2
16	Coumaric acid-HFRW-NH2	-5.3
17	Coumaric acid-FRW-NH2	-1.1
18	Coumaric acid-RW-NH2	-15.8
19	Coumaric acid-HSRW-OH	-5.9
20	Coumaric acid-SRW-OH	-2.5
21	Coumaric acid-HFRW-OH	-15.1
22	Coumaric acid-FRW-OH	11.0
23	Coumaric acid-RW-OH	19.0
24	Coumaric acid-RS-OH	-8.5

3.3. 천연물 펩타이드 유도체의 cAMP 생성 억제효과

합성한 24종의 천연유래 펩타이드 유도체가 MC1R의 antagonist 효과를 갖는지 확인하기 위해 cAMP 생성 감소 효과를 측정하였다. B16F1 murine melanoma cell에 펩타이드 유도체 10 μM와 α-MSH 100 nM를 20 min 처리한 후에 세포를 수득하여 cAMP 생성량을 확인한 후, α-MSH를 단독으로 처리했을 때의 cAMP 생성량 대비 감소율을 구하였다(Table 2 & Figure 3). 펩타이드 유도체의 농도는 세포독성을 갖는 농도인 50 μM 이하에서 임의 농도를 설정하여 처리하였으며, 총 24종의 펩타이드 유도체 가운데 α-MSH 단독으로 처리했을 때보다 cAMP 생성량이 감소한 시료가 11종, 반대로 cAMP 생성량이 증가한 시료가 13종이었다. cAMP 생성량 감소를 보인 11종의 시료(Table 2의 음영 부분)는 MC1R의

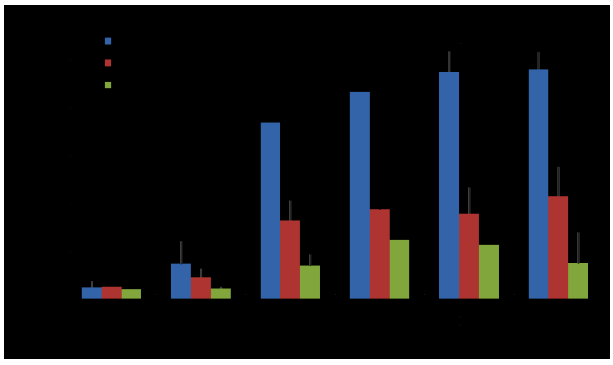

Figure 3. Influence of α-MSH on generation of cAMP in B16F1 murine melanoma cell. The error bars indicate S.E.M. (n = 2); *p < 0.05; **p < 0.01.

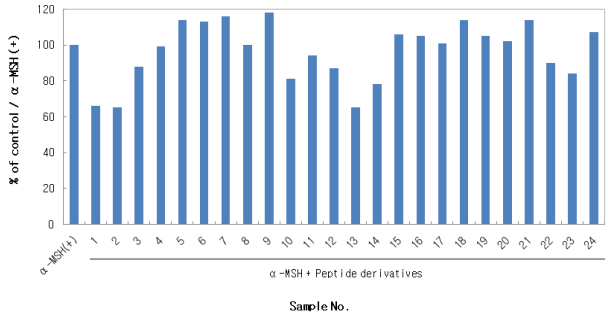

Figure 4. Effects of peptide peptide derivatives on cAMP generation (The concentration of each peptide derivative is 10 μM).

antagonist로 작용하여 cAMP 생성 억제효과를 보인 것으로 판단되며, 추가적으로 멜라닌 생성 억제효과 실험을 통해 멜라닌 생성에도 영향을 주는지 확인하였다.

3.4. 천연물 펩타이드 유도체의 멜라닌 생성 억제효과

합성한 24종의 천연물 펩타이드 유도체가 미백제로서의 효능을 갖는지 확인하기 위해 B16F1 murine melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 억제효과를 확인하였다. B16F1 murine melanoma cell에 펩타이드 유도체 50 μM와 α-MSH 1 μM를 3일간 처리한 후에 세포를 수득하여 멜라닌 생성량을 흡광도로 측정하여 구하였다. 모든 펩타이드 유도체들은 50 μM 이상의 농도에서만 세포독성을 나타내어, 펩타이드 유도체 처리 농도를 최고 농도인 50 μM로 설정하여 실험하였으며, α-MSH는 멜라닌 생성이 최대로 되는 농도인 1 μM를 사용하였다. α-MSH 단독으로 처리한 군을 기준으로 펩타이드 유도체를 처리한 군의 상대적 멜라닌 생성 감소 정도를 Table 3에 나타내었으며, 기존에 미백효과가 있다고 알려진 kojic acid와 멜라닌 생성 감소 정도를 비교하였다. 24종의 펩타이드 유도체 가운데, cAMP 생성 감소 효과와 멜라닌 생성 억제 효과가 동시에 있는 펩타이드 유도체가 6종이었으며(Figure 5), kojic acid와 멜라닌 생성 억제 효과가 유사하거나 우수한 5종을 선별하였다(Table 3의 음영 부분). 이들은 MC1R의 antogonist로 작용하여 cAMP 신호전달 과정을 통해 멜라닌 생성을 저해할 가능성이 높다. 이들 펩타이드 유도체는 RW(WR)서열을 포함하며, 여기서 RW(WR)서열이 α-MSH가 MC1R에 접근성을 갖도록 하는 핵심서열임을 예측할 수 있었다.

Table 3. Melanin Inhibition Rate of Peptide Derivatives (The Concentration of Each Peptide Derivative and Kojic Acid is 50 μM)

No.	Sample	Melanin inhibition rate (%)
1	Caffeic acid-HSRW-NH2	-7.7
2	Caffeic acid-SRW-NH2	20.3
3	Caffeic acid-HFRW-NH2	29.4
4	Caffeic acid-FRW-NH2	53.9
5	Caffeic acid-RW-NH2	61.8
6	Caffeic acid-RS-NH2	7.8
7	Caffeic acid-HSRW-OH	9.7
8	Caffeic acid-SRW-OH	28.4
9	Caffeic acid-HFRW-OH	-38.6
10	Caffeic acid-FRW-OH	-18.0
11	Caffeic acid-RW-OH	-4.1
12	Caffeic acid-WRS-OH	6.6
13	Caffeic acid-WRSH-OH	14.8
14	Coumaric acid-HSRW-NH2	18.6
15	Coumaric acid-SRW-NH2	-8.5
16	Coumaric acid-HFRW-NH2	55.8
17	Coumaric acid-FRW-NH2	12.2
18	Coumaric acid-RW-NH2	-18.5
19	Coumaric acid-HSRW-OH	-10.6
20	Coumaric acid-SRW-OH	-19.0
21	Coumaric acid-HFRW-OH	-2.3
22	Coumaric acid-FRW-OH	-40.3
23	Coumaric acid-RW-OH	-2.2
24	Coumaric acid-RS-OH	0.0
Control	Kojic acid	13.8

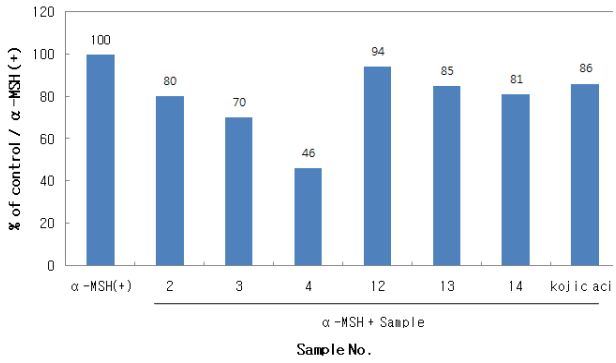

Figure 5. Effects of peptide derivatives screened by cAMP assay on melanogenesis inhibition (The concentration of each peptide derivative and kojic acid is 50 μM).

4. 결 론

α-MSH는 UV 자극으로 인하여 각질형성세포(keratinocyte)와 멜라닌형성세포(melanocyte)에서 생성이 촉진되어, autocrine과 paracrine 작용으로 멜라닌형성세포에서 멜라닌 생성에 중요한 역할을 한다. α-MSH는 멜라닌형성세포에서 멜라닌 형성(melanogenesis) 뿐만 아니라, 세포의 증식(proliferation), 세포 보호작용(cytoprotection), 돌기형성(dendricity) 등에도 영향을 끼친다. 멜라닌형성세포에서 α-MSH와 결합하는 melanocortin receptor는 MC1R로서, 멜라닌 형성세포에는 MC1R ~ 5R 중에서 MC1R 형태만 존재하고 있다.

이번 연구에서는 MC1R의 antagonist 효능을 가지는 펩타이드 서열을 활용하여 미백 효능을 가지는 새로운 유도체를 개발하고자 하였다. MC1R의 antagonist 효능을 가지는 펩타이드로는 α-MSH의 핵심서열을 활용하였다. 이는 agonist 역할을 하는 펩타이드의 일부를 변형하거나 순서를 바꾸어 antagonist로 활용하는 방법으로 일반적인 방법의 하나이다[19,20]. 우리는 지난 연구에서 선정된 천연유래물질인 caffeic acid, coumaric acid [13]에 α-MSH의 핵심서열 유래 펩타이드들을 도입하여 신규 펩타이드 유도체 24종을 합성하였다.

MC1R의 antagonist 효능을 갖는 신규 미백소재를 효과적으로 검증하기 위해서 cAMP를 이용한 평가법을 도입하여 시료를 스크리닝 하였으며, 24종의 천연유래 펩타이드 유도체에 대해서 α-MSH에 의해 생성된 cAMP의 발현을 저해하는 메커니즘을 가지면서, 기존에 미백효과가 있다고 알려진 kojic acid와 멜라닌 생성을 억제 정도가 유사하거나 우수한 시료 5종을 선별하였다. 선별된 모든 펩타이드 유도체는 RW (WR)서열을 포함한다. 여기서 RW (WR)서열이 α-MSH가 MC1R에 접근성을 갖도록 하는 핵심서열임을 알 수 있다. 즉, 이 두 개의 아미노산을 기본으로 하여 유도체화를 더 심도있게 진행한다면 이번 연구에서 밝혀진 유도체보다 더욱 효과적인 미백소재의 개발이 가능할 것이다. 우리는 이러한 내용을 특허로 출원 중이다. 또한, 추가적으로 우리는 선별된 펩타이드 유도체에 대해서 tyrosinase 발현 억제, MC1R 발현 억제에 대한 연구도 진행할 예정이다.

이번 연구에서 cAMP 생성 억제효과를 갖지만, 멜라닌 생성 억제에 효과가 없는 펩타이드 유도체의 경우에는 cAMP 신호전달과정을 통하지만, Ras/MAPK signaling pathway, PKC signaling pathway, Wnt/β-catenin signaling pathway 등 멜라닌형성세포 내에서 다른 신호전달과정으로 영향을 주었을 가능성을 고려해 볼 수 있다. 또한, 합성한 펩타이드 유도체가 MC1R이 아닌 endothelin receptor, Frizzled 등의 G-protein-coupled receptor (GPCR)에 결합하여 cAMP 생성에 영향을 주면서 멜라닌 생성은 저해하지 않았을 가능성도 있어 이를 추가적으로 확인해 보아야 할 필요성이 있다.

또한, cAMP 생성 억제효과는 갖지 않지만 멜라닌 생성 억제 효과가 있는 펩타이드 유도체의 경우 cAMP 신호전달 과정이 아닌 다른 매커니즘으로 멜라닌 생성에 영향을 주는지 확인해 볼 필요성이 있다.

결론적으로 cAMP assay 방법은 MC1R의 antagonist와 같이 특정 타겟과 관련된 물질을 디자인한 소재의 스크리닝 방법에는 활용할 가치가 있어 보이며, 미백효과를 증명하기 위해서는 tyrosinase 발현 억제시험, 멜라닌 생성저해 시험 등과 병행하여야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

참 고 문 헌

1. K. Schallreuter, A. Slominski, J. M. Pawelek, K. Jimbow, and B. A. Gilchrest, What controls melanogenesis?, *Exp. Dermatol.*, **7**, 143 (1998).
2. R. D. Cone, D. Lu, S. Koppula, D. I. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. N. Orth, C. Pouton, and R. A. Kesterson, The melanocortin receptors:

agonist, antagonist, and the hormonal control of pigmentation, *Recent Prog. Horm. Res.*, **51**, 287 (1996).
3. S. Im, O. Moro, F. Peng, E. E. Medrano, J. Cornelius, G. Babcock, J. J. Nordlund, and Z. A. Abdel-Malek. Activation of cyclic AMP pathway by a-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation, *Cancer Res.*, **58**, 47 (1998).
4. C. Bertolotto, P. Abbe, T. J. Hemesath, K. Bille, D. E. Fisher, J. P. Ortonne, and R. Ballotti. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes, *J. Cell. Biol.*, **142**, 827(1998).
5. E. R. Price, M. A. Horstmann, A. G. Wells, K. N. Weilbaecher, C. M. Takemoto, M. W. Landis, and D. E. Fisher, α-Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg Syndrome, *J. Biol. Chem.*, **273**, 33042 (1998).
6. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cell Res.*, **13**, 60 (2000).
7. M. Tachibana, MITF: a stream flowing for pigment cells, *Pigment Cell Res.*, **13**, 230 (2000).
8. C. Bertolotto, R. Busca, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J.-P. Ortonne, and R. Ballotti, Different *cis*-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 694 (1998).
9. E. R. Price, H.-F. Ding, T. Badalian, S. Bhattacharya, C. Takemoto, T.-P. Yao, T. J. Hemesath, and D. E. Fisher, Lineage-specific signaling in melanocytes. c-Kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia, *J. Biol. Chem.*, **273**, 17983 (1998).
10. S. Shibahara, K. Takeda, K. Yasumoto, T. Udono, K. Watanabe, H. Saito, and L. Takahashi, Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation, *J. Invest. Dermatol. Symp Proc.*, **6**, 99 (2001).
11. T. Kobayashi, W. D. Vieira, B. Potterf, C. Sakai, G. Imokawa, and V. J. Hearing, Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis, *J. Cell. Sci.*, **108**, 2301 (1995).
12. C. Sakai, M. Ollmann, T. Kobayashi, Z. Abdel-Malek, J. Muller, W. D. Vieira, G. Imokawa, G. S. Barsh, and V. J. Hearing, Modulation of murine melanocyte function *in vitro* by agouti signal protein, *EMBO J.*, **12**, 3544 (1997).
13. K.-H. Shin, J. H. Lee, G. S. Ryu, K. Y. Jee, S. N. Park, J. I. Kim, I. S. Cho, and H.-Y. Kim, Preparation of natural compounds-tripeptides derivatives and their melanogensis inhibitory activity, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36**(3), 233 (2010).
14. T. K. von Almen, G. A. Olson, and R. D. Olson, Behavioral effects of melanocyte stimulating hormone release-inhibiting factor-1, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **7**(2), 257 (1983).
15. WO2007137015A2, Dermatological uses of tri-, tetra-, penta-, and polypeptides.
16. A. M. Lopez-Contreras, J. H. Martinez-Liarte, F. Solano, P. Samaraweera, J. M. Newton, and J. T. Bagnara, The amphibian melanization inhibiting factor (MIF) blocks the alpha-MSH effect on mouse malignant melanocytes, *Pigment Cell Res.*, **9**(6), 311 (1996).
17. T. Brzoska, T. A. Luger, C. Maaser, C. Abels, and M. Bŏhm, α-Melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects *in vitro* and *in vivo* and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases, *Endocrine Reviews*, **29**(5), 581 (2008).
18. S. Froidevaux and A. N. Eberle, Homologous regulation of melanocortin-1 receptor (MC1R) expression in melanoma tumor cells *in vivo*, *J Recept Signal Transduct Res.*, **22**(1-4), 111 (2002).
19. V. J. Hruby, G. Han, and M. E. Hadley, Design and bioactivities of melanotropic peptide agonists and antagonist: Design based on a conformationally constrained somatostatin template, *Letters in Peptide Science*, **5**, 117 (1998).
20. T. Takuji, S. Chikara, O. Kenkichi, and S. Keikichi, Melanocyte-stimulating hormone inhibitor and external preparation containing the same, *European Patent Application*, Publication number EP 0 389 950 A1.