

## Zn<sup>2+</sup>에 의한 Tolaasin의 용혈활성 저해효과

조광현 · 김성태 · 김영기\*

충북대학교 농업생명환경대학 농화학과

## Inhibitory Effect of Zn<sup>2+</sup> on Tolaasin-induced Hemolysis

Kwang-Hyun Cho, Sung-Tae Kim and Young-Kee Kim\*

Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea

Received September 27, 2006; Accepted November 2, 2006

**Tolaasin, a pore-forming toxin, is a 1,985 Da peptide produced by *Pseudomonas tolaasii* and causes a brown blotch disease on cultivated mushrooms. Tolaasin forms pores on the plasma membrane of various cells including fungi, bacteria, plant as well as erythrocytes, and destroys cell structure. Zn<sup>2+</sup> has been known to block the tolaasin activity by an unknown mechanism. Thus, we investigated the inhibitory effects of Zn<sup>2+</sup> on the tolaasin-induced hemolysis to understand the molecular mechanism of tolaasin-induced pore formation. Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> inhibited the tolaasin-induced hemolysis in a dose-dependent manner and their Ki values were 170 μM and 20 mM, respectively. The effect of Zn<sup>2+</sup> was reversible since the subsequent addition of EDTA chelates Zn<sup>2+</sup> and removes the inhibitory effect of Zn<sup>2+</sup>. When an osmotic protectant, PEG 2000, was added, the tolaasin-induced hemolysis was not observed. After the removal of osmotic protectant by centrifugation, resuspended erythrocytes with fresh medium were immediately hemolyzed, while the addition of Zn<sup>2+</sup> prevented from hemolysis, implying that tolaasin-induced pores on the membrane were already formed in the medium containing osmotic protectant. These results suggest that Zn<sup>2+</sup> inhibits the activity of tolaasin pores and it has minor effects on the membrane binding of tolaasin and the formation of pore.**

**Key words:** brown blotch disease, hemolysis, pore-forming toxin, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin, Zn<sup>2+</sup>

### 서 론

갈반병은 푸른곰팡이에 의한 병과 함께 우리나라의 느타리버섯 재배 농가에 가장 심각한 피해를 주고 있는 세균병이다. 갈반병은 1915년에 최초로 보고되었으며,<sup>1)</sup> 병원균은 *Pseudomonas tolaasii*로 동정되었다. 이 균은 양송이버섯, 느타리버섯, 팽이버섯 등에 갈반병을 일으키며, 재배 버섯의 수확량 손실 원인들 중 가장 심각한 생물학적 요인으로 보고되었다.<sup>2)</sup>

*P. tolaasii*의 병원성은 tolaasin이라는 펩티드 독소의 분비에 의하며, tolaasin 분자는 Peng<sup>3)</sup>에 의해서 처음 분리되었다. Nutkins 등<sup>4)</sup>은 펩티드의 1차구조를 분석하여 18개 아미노산으로 구성된 lipodepsipeptide임을 확인하였고, tolaasin I(Tol-I)과 tolaasin II(Tol-II)의 두 가지 이성체를 분리하였으며, 이들 각각의 분자량이 1,985와 1,941 Da 임을 확인하였다. Tol-II는 Tol-I의 homoserine이 glycine으로 치환된 이성체이며, Tol-I이 주된 성분이다. Tolaasin의 N-말단에는 β-hydroxyoctanoic acid가

acylation되어 결합하고 있으며, C-말단의 lysine은 14번째의 D-allo-threonine과 lactone을 형성하여 환상결합하고 있는 것이 밝혀졌다. Tolaasin은 또한 *P. reactans*와 대치배양시 white line inducing principle(WLIP)인 흰색침강선 생성의 원인물질로 확인되었다.<sup>5)</sup>

최근 Shirata 등<sup>6)</sup>은 일본에서 분리한 *P. tolaasii* 6041R에서 8가지 tolaasin 이성체를 분리하였으며, 이들 중 Nutkins 등이 보고한 Tol-I과 Tol-II가 모두 존재하였고, 전체 성분 중 Tol-I의 함량이 85% 이상으로 주성분임을 확인하였다. Bassarello 등<sup>7)</sup>도 Tol-I 및 Tol-II와 더불어 5가지의 이성체를 분리하였다. 지질막 환경에서 tolaasin의 2차구조는 Ser3에서부터 Val8까지 여섯 개의 연속적인 D-아미노산의 배열에 의해 좌선성 α-helix를 형성함이 밝혀졌다.<sup>8-10)</sup> 또한, tolaasin 분자는 C-말단 부근에 양전하를 갖는 극성아미노산을 함유하고 있어, 극성과 비극성을 모두 함유한 양친매성(amphipathic)의 구조적 특성을 갖는다.<sup>9)</sup>

Tolaasin에 의한 갈반병의 발생은 버섯 세포막에 유입된 tolaasin 분자의 이온통로 형성과 물질이동 및 이에 따른 세포 내 삼투압의 교란을 통한 세포막의 파괴, 조직의 괴사 등의 과정을 통하여 이루어짐이 알려졌다.<sup>11,12)</sup> Rainey 등은 tolaasin의 세포독성을 적혈구를 이용한 용혈활성 측정방법으로 연구하였

\*Corresponding author  
Phone: +82-43-261-2560; Fax: +82-43-271-5921  
E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

으며, 용혈현상이 일어나는 최적 pH 및 온도 등을 밝혔고, 2가 양이온이 용혈활성을 저해함을 보고하였다.<sup>12)</sup> Cho 등<sup>13)</sup>도  $Zn^{2+}$ 과  $Cd^{2+}$ 에 의해 tolaasin의 용혈활성이 억제됨을 보고하였다. Tolaasin은 인공지질 이중막에서 이온통로를 형성하며,<sup>11,14)</sup> 이온통로의 활성은  $Zn^{2+}$  농도에 의존적으로 저해되었다. 그림에도 불구하고,  $Zn^{2+}$ 의 저해효과에 관한 자세한 기작은 밝혀지지 않았다.  $Zn^{2+}$ 는 이온통로 형성독소의 세포막 유입이나, 막에서의 이온통로형성 및 다중결합과정, 형성된 이온통로의 여단힘 과정 등 특정 단계에 대하여 억제 효과를 갖을 것이다.<sup>15)</sup> 뿐만 아니라,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  등도 이온통로 형성독소의 작용을 억제함이 알려졌으며, 이중에서도  $Zn^{2+}$ 가 가장 낮은 농도에서 효율적으로 독소에 의한 세포의 파괴를 억제함이 알려졌다.<sup>15)</sup> 따라서, 다양한 이온통로 형성독소들에서 보고된  $Zn^{2+}$ 의 용혈억제 특성을 통하여, tolaasin의 이온통로 형성기작을 이해할 수 있을 것이다.

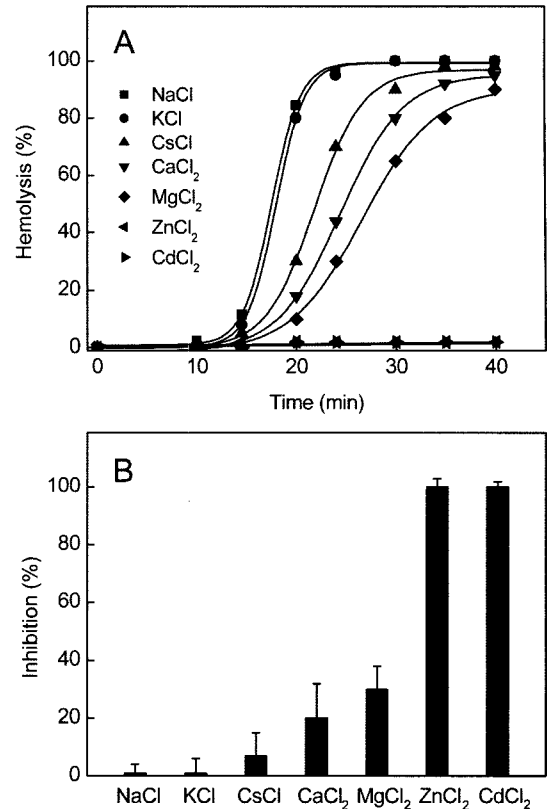
본 연구는 갈반병 원인독소 tolaasin의 생체막 이온통로 형성에 관련한 작용특성을 밝히고, 이온통로의 형성을 억제할 수 있는 방안을 마련하여 갈반병의 피해를 경감시키는 데 장기적 목적이 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 적혈구를 이용하여 tolaasin에 의한 용혈활성 특성 및  $Zn^{2+}$ 의 용혈활성 억제의 기작을 조사하였다.

## 재료 및 방법

***Pseudomonas tolaasii*의 분리 및 균주보관.** 본 연구에 사용된 *P. tolaasii* 균주는 Cho 등<sup>13)</sup>의 방법으로 분리하였다. 간략히, 갈반병에 감염된 느타리버섯의 갓 조직으로부터 세균을 얻은 후, 흰색침강선 형성검정법과 버섯조직 함몰검정법을 통하여 *P. tolaasii*를 분리하였다.<sup>13,16)</sup> 분리한 *P. tolaasii* 6264 균주는 nutrient broth에 glycerol을 20% 첨가한 배지 1.5 ml에 현탁시켜  $-70^{\circ}C$ 에서 보관하였다.

**Tolaasin의 분리 및 농축.** *Pseudomonas* agar F (PAF) broth에서  $25^{\circ}C$ , 18시간 동안 정체기에 도달하도록 진탕 배양한 *P. tolaasii* 6264 균주를 8,000 rpm(10,000 × g)에서 30분간 원심분리하여 제거한 후, Cho 등<sup>13)</sup> 및 Park<sup>17)</sup>의 방법으로 세균의 배양 상정액으로부터 tolaasin을 분리하였다. 분리한 tolaasin 분획은 HBS 완충액(HEPES-buffered saline; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM  $MgSO_4$ , pH 7.4)으로 녹여낸 다음, glass-Teflon homogenizer로 균질하여, 액체질소에서 순간 냉동시켜 사용 전까지  $-70^{\circ}C$ 의 초저온냉동고에 보관하였다.

**적혈구분리 및 용혈활성 측정.** 적혈구의 채취 및 용혈활성의 측정은 Cho 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라서 이루어졌다. 쥐(Sprague-Dawley rat, Samtako Co., Korea)로부터 채취한 혈액을 defibrination한 후,  $4^{\circ}C$ 에서 보관하였으며, 실험에 사용하기 직전 HBS 완충액으로 10배 희석하였다. 필요시 HBS 완충액을 가한 후 원심분리하여 파괴된 적혈구 세포들을 세척하였다. 위의 적혈구 희석액은 용혈활성 측정을 위한 최종 반응용액에 10%가 되도록 처리하였다. 따라서, 적혈구의 농도는 최종용액의 1%가 되도록 사용하였다. 분리한 tolaasin은 1 HU(hemolytic unit)의 농도로 용혈활성 측정에 사용하였다. Tolaasin의 활성단위 1 HU는 1%

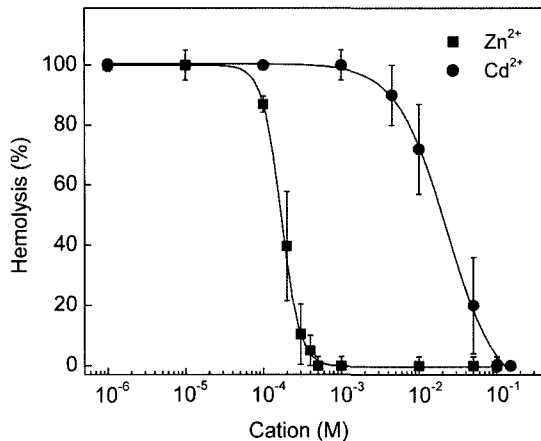


**Fig. 1. Effects of various cations on the tolaasin-induced hemolysis.** (A) Time course of hemolysis in the presence of indicated cations. Each cation was added to HBS buffer and hemolytic activity was measured. The concentration of each cation was 100 mM. (B) Inhibitory effects of various cations measured at 30 min of incubation.

적혈구 1 ml를  $37^{\circ}C$ 에서 30분 이내에 모두 용혈시키는 양으로 정의하였다. 이렇게 준비된 최종 반응용액을  $37^{\circ}C$ 의 항온수조에서 시간별로 배양한 후, spectrophotometer(Hitachi U-2000, Tokyo, Japan)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도 감소로서 용혈 활성을 평가하였다.

## 결과 및 고찰

**Tolaasin의 용혈활성에 대한 양이온의 효과.** 생체막에 이온통로를 형성하는 펩티드성 독소들의 활성측정에는 적혈구를 이용한 용혈활성 검정법이 널리 이용된다.<sup>12,13,18,19)</sup> Tolaasin의 용혈활성은 600 nm에서 적혈구 파괴에 따른 흡광도 감소를 시간에 따라 측정함으로써 이루어졌으며, 150 mM NaCl을 포함하는 대조구에서는 30분 이내에 100%의 용혈활성을 보였다 (Fig. 1). Tolaasin의 작용특성을 조사하기 위하여 용혈활성에 대한  $K^{+}$ 과  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  등의 양이온 효과를 측정하였다. HBS 완충액에 다양한 양이온을 100 mM 농도로 첨가하여 시간에 따라 tolaasin의 용혈활성을 측정하면, 용혈활성은  $K^{+}$ 과  $Cs^{+}$ 의 첨가시 대조실험과 유사하였으나,  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 의 처리시 약간 지연되었고,  $Cd^{2+}$ 과  $Zn^{2+}$ 의 첨가시 거의 관측되지 않았다. 배양시간 30분에서 측정된 용혈활성의 저해 정도는  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 의 처리시 20-30%로 나타났으며,  $Cd^{2+}$ 과  $Zn^{2+}$ 는 100%로 확인되었다



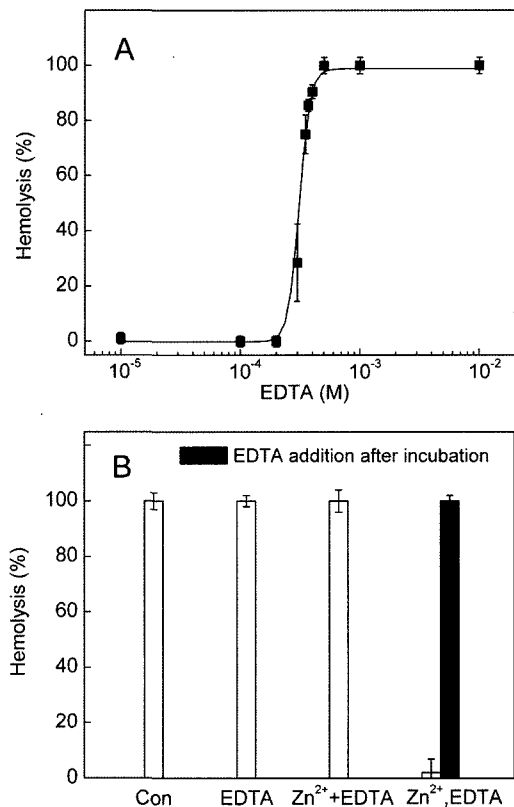
**Fig. 2.** Inhibitions of tolaasin-induced hemolysis by Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> were added and hemolyses were measured in HBS buffer. Concentrations of these cations were adjusted to 1  $\mu$ M-100 mM.

(Fig. 1B). 이러한 결과는 2가 양이온이 tolaasin의 용혈활성을 저해한다는 Rainey 등<sup>12)</sup>과 Cho 등<sup>13)</sup>의 결과와 일치하였다. 또한, 용혈활성에 대한 1가 양이온의 억제효과는 Bashford 등<sup>20)</sup>의 결과와 마찬가지로 그 효과가 매우 낮았다.

Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>에 의한 tolaasin 용혈활성 저해를 확인하기 위하여 Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>의 농도에 따른 용혈활성 변화를 측정하였다 (Fig. 2). 반응완충액에 Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>의 농도가 증가할수록 tolaasin의 용혈활성은 감소하는데, 먼저 Zn<sup>2+</sup>는 100  $\mu$ M 이상의 농도에서 용혈활성 저해 효과를 보였으며, 500  $\mu$ M 이상에서는 tolaasin의 용혈활성을 완전히 저해하였다. Cd<sup>2+</sup>은 2 mM 이상의 농도에서 저해효과를 보였으며, 80 mM 전후에 완전히 저해하였다. 위의 결과로부터 tolaasin의 용혈활성을 저해하는 Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>의 Ki 값은 각각 170  $\mu$ M, 20 mM로 얻어졌다. 즉, 이들 2가의 양이온에 의한 용혈활성 저해는 Zn<sup>2+</sup>가 Cd<sup>2+</sup>보다 117배 높은 효과를 보였다. Zn<sup>2+</sup>의 저해효과는 다른 펩티드 독소에서 밝혀졌으며, cytolysin의 대한 Zn<sup>2+</sup>의 Ki 값은 10-20  $\mu$ M,<sup>20)</sup> melittin은 30  $\mu$ M,<sup>21)</sup>  $\alpha$ -toxin은 100  $\mu$ M,<sup>22)</sup> 등으로 보고되었다. 따라서, 용혈성 펩티드에 대한 Zn<sup>2+</sup>의 억제효과는 펩티드독소의 종류에 따라 차이가 있으나 매우 낮은 농도에서 나타남을 알 수 있다.

**Zn<sup>2+</sup>에 의한 용혈활성의 가역적 저해.** Zn<sup>2+</sup>에 의한 tolaasin의 용혈활성 저해기작을 조사하기 위하여, 양이온을 chelation 할 수 있는 EDTA를 이용하여 Zn<sup>2+</sup>의 활성저해 효과를 측정하였다. 먼저, 500  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>을 포함하는 반응완충액에 EDTA의 농도를 10  $\mu$ M에서 10 mM까지 첨가하였을 때, Zn<sup>2+</sup>에 의한 용혈활성 억제 효과는 EDTA의 농도 증가에 따라 점차 감소하였다 (Fig. 3A). 처리한 EDTA의 농도가 약 300  $\mu$ M일 때, Zn<sup>2+</sup>의 용혈활성 저해효과는 약 50% 감소하였으며, EDTA의 농도를 1 mM 이상으로 증가시키면 Zn<sup>2+</sup>가 완전히 제거되어 적혈구는 100% 용혈되었다.

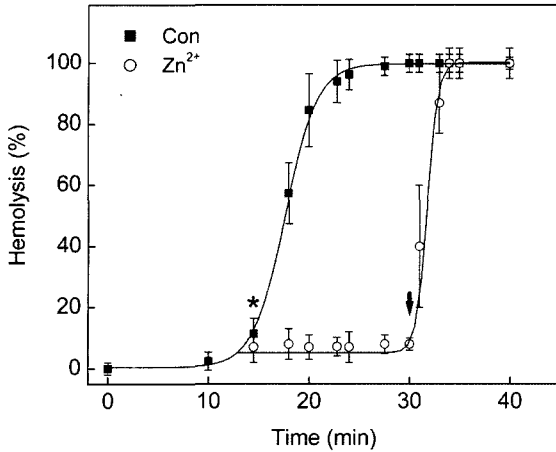
Zn<sup>2+</sup>에 의한 저해효과의 가역성 여부는 EDTA를 이용하여 측정하였다(Fig. 3B). 대조실험에서 반응완충액에 tolaasin(Con) 또는 EDTA만을 처리하였을 때, 적혈구는 완전히 용혈되었다. 또



**Fig. 3.** Recovery of tolaasin-induced hemolysis by chelation of Zn<sup>2+</sup>. (A) Effect of EDTA on the Zn<sup>2+</sup>-induced inhibition of hemolysis. The hemolytic activity of tolaasin was measured in the presence of 500  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> at various concentrations of EDTA. Values are means  $\pm$  SD ( $n$  = 3). (B) Recovery of Zn<sup>2+</sup>-induced inhibition by EDTA. Hemolytic activity was measured under the indicated conditions. The concentration of EDTA and Zn<sup>2+</sup> were 1 mM and 500  $\mu$ M, respectively. After incubation for 30 min with tolaasin and erythrocytes in the presence of Zn<sup>2+</sup>, EDTA was subsequently added (Zn<sup>2+</sup>, EDTA).

한, Fig 3A의 경우와 같이 Zn<sup>2+</sup>와 EDTA를 동시에 처리하였을 경우(Zn<sup>2+</sup>+EDTA)에도 Zn<sup>2+</sup>의 저해효과는 나타나지 않고 적혈구는 완전히 용혈되었다. Tolaasin에 의한 용혈활성을 500  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>로 저해한 후, 30분간 배양하고 1 mM EDTA를 첨가하면, 용혈활성은 대조실험과 같이 100%로 관측되었다 (Zn<sup>2+</sup>, EDTA). 이것은 tolaasin의 용혈작용을 저해하고 있던 Zn<sup>2+</sup>가 EDTA에 의해 제거될 수 있어, Zn<sup>2+</sup>에 의한 용혈활성저해가 가역적임을 보여준다.

**Zn<sup>2+</sup>의 tolaasin 저해특성.** Tolaasin 분자의 용혈작용은 먼저, 분자의 막결합, 막에서의 다중체형성, 다중체의 이온통로형성, 형성된 이온통로의 열림, 이온이동에 따른 삼투압교란, 세포의 팽창 및 파괴의 순으로 이루어지며, Zn<sup>2+</sup>에 의한 용혈활성 저해기작은 밝혀지지 않았으나 위 과정의 하나 또는 그 이상을 저해하여 이루어질 것이다.<sup>15,20-22)</sup> Zn<sup>2+</sup>에 의한 tolaasin 활성의 저해특성을 밝히기 위하여 tolaasin의 용혈작용 단계별 진행과정 중 Zn<sup>2+</sup>의 저해단계를 조사하였다. 이를 위하여 Zn<sup>2+</sup>를 첨가하여 tolaasin의 용혈활성을 저제한 조건에서 EDTA의 첨가 후, 용혈활성의 회복속도를 조사하였다(Fig. 4). 대조실험에서 tolaasin에 의한 용혈은 13분 이후부터 급격히 증가하여 약 25

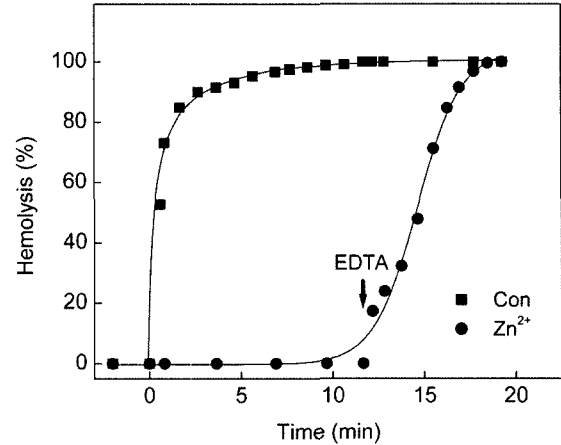


**Fig. 4. Time course of hemolysis and the effect of subsequently added  $Zn^{2+}$ .** Tolaasin-induced hemolysis was measured in the absence (Con) or presence ( $Zn^{2+}$ ) of  $Zn^{2+}$ . Erythrocytes were incubated with tolaasin and  $Zn^{2+}$  was subsequently added (\* marked). EDTA was added in the same solution at 30 min of incubation (↓ marked). The concentrations of  $Zn^{2+}$  and EDTA were 500  $\mu$ M and 1 mM, respectively.

분에 최대 100%에 도달하였다. Tolaasin에 의해 용혈이 시작됨을 확인한 후, 곧이어 반응용액에  $Zn^{2+}$ 를 첨가하면(Fig. 4, \* marked), 용혈현상은 완전히 저해되었다. 이어서, 배양시간이 30분 경과한 후, 반응용액에 EDTA를 첨가하면(Fig. 4, ↓ marked) 용혈은 매우 빠른 속도로 나타났다.

이러한 결과는 tolaasin에 의한 용혈이 시작되는 시점, 즉 세포막에 이온통로가 만들어져 삼투압이 교란되는 시점에서  $Zn^{2+}$ 가 용혈활성을 저해함을 보여주며, 연이어 처리한 EDTA가  $Zn^{2+}$ 를 제거하면 저해되었던 용혈활성을 대조실험보다 빠르게 진행됨을 보였다(Fig. 4, open circle). 이것은  $Zn^{2+}$ 가 tolaasin의 활성을 저해한 상태에서도 tolaasin에 의한 이온통로의 형성은 계속되는 것을 보여주는 것으로,  $Zn^{2+}$ 의 제거시 급격한 용혈의 증가가 그 증거이다. 따라서  $Zn^{2+}$ 의 작용은 tolaasin의 이온통로 형성 이후에 이온통로의 활성을 저해하는 것으로 생각된다.

**이온통로 형성 후  $Zn^{2+}$ 의 저해효과.** Tolaasin에 의한 용혈활성은 PEG 2000 또는 이보다 큰 분자량을 갖는 수용성 삼투억제제(colloid osmotic protectant)에 의해서 저해된다.<sup>12)</sup> 삼투억제제에 의한 용혈의 저해 효과는 이들 물질이 tolaasin의 이온통로 형성과정을 저해하지 않으며, 이온통로를 통한 이온의 이동을 저해하기 때문에 얻어진다. Fig. 5에서는 tolaasin에 의해 생성된 이온통로가 얼마나 빠르게 용혈현상을 일으키는지를 측정하는 것이다. 먼저 적혈구를 PEG 2000과  $Zn^{2+}$ 가 포함된 반응용액에 넣은 후 tolaasin을 가하였다. 배양시간 30분이 경과하여 tolaasin에 의한 이온통로가 적혈구 세포막에 만들어져도 PEG 2000을 포함한 반응용액에서는 용혈활성은 나타나지 않았다. 이때, 원심분리로 적혈구를 회수하여 용액중 PEG 2000과 결합하지 않은 tolaasin을 제거하고, 적혈구를 신선한 HBS 용액에 현탁하면 용혈활성은 신속히 나타나고 적혈구는 배양 4분에 이내에 완전히 용혈되었다(Fig. 5, Con). 적혈구가 신속한 용혈활성을 보인 것은, PEG 2000이 배양중 tolaasin의 세포막 결합 및 이온통로 형성과정을 억제하지 않음을 보여준다.



**Fig. 5. Time course of hemolysis by pre-formed tolaasin channel.** After erythrocytes were incubated with tolaasin and PEG 2000 for 30 min, erythrocytes were collected by centrifugation and supernatant containing PEG 2000 was discarded. After erythrocytes were resuspended in a fresh buffer (Con) or  $Zn^{2+}$ -containing buffer ( $Zn^{2+}$ ), the time course of hemolysis was observed. EDTA was subsequently added at the indicated incubation time (↓).

한편, 원심분리 후 500  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ 를 가한 HBS 용액으로 적혈구를 세척하고 현탁한 경우에는 용혈현상은 나타나지 않았다(Fig. 5,  $Zn^{2+}$ ). 여기에 EDTA를 가하여  $Zn^{2+}$ 를 제거하면 빠른 용혈이 관측되었다. 이것은  $Zn^{2+}$ 가 이미 생성된 tolaasin의 이온통로를 저해하는 것을 보여준다. 이상의 결과 및 이미 보고된  $Zn^{2+}$ 의 tolaasin 이온통로 활성 억제효과<sup>11,14)</sup>를 종합할 때,  $Zn^{2+}$ 는 tolaasin의 적혈구 세포막 결합 및 이온통로 형성과정을 저해하지 않으나, 형성된 이온통로의 활성을 저해함을 확인하였다.

Ishiura 등<sup>23)</sup>은 이온채널 형성 단백질 perforin의 연구를 통하여,  $Zn^{2+}$ 가 perforin의 세포막 결합에는 영향을 미치지 않으나, 이온통로 형성 및 이온통로의 활성을 저해한다고 보고하였다. Tolaasin의 경우에는  $Zn^{2+}$ 가 이온통로의 형성에는 영향이 없었으나, 형성된 이온통로의 활성을 저해함을 확인하였다. 따라서, 이들 두 펩티드에 대한  $Zn^{2+}$ 의 저해기작에 약간의 차이가 있음을 알 수 있다.  $Zn^{2+}$ 에 의한 tolaasin의 활성저해에 대한 자세한 분자기작은 다음의 세가지 가능성으로 설명될 수 있을 것이다. 먼저  $Zn^{2+}$ 가 단순히 tolaasin 중합체의 어느 부분에 결합하여 이온통로의 구조변화를 유발함으로써 이온의 이동을 저해할 가능성, 이온통로의 경로 내부를 직접적으로 막을 가능성, 그리고 이온통로의 입구에 결합하여 통로를 통과하는 양이온의 접근을 정전기적으로 방해할 가능성 등이다. 별다른 melittin의 경우에는  $Zn^{2+}$ 가 직접적으로 이온통로를 저해함에도 불구하고, melittin의 2차구조는 변화시키지 않는 것으로 알려졌다.<sup>21)</sup> 만약,  $Zn^{2+}$ 가 tolaasin의 경우에도 melittin에서와 같은 작용을 한다면, 위의 첫 번째 가능성인 이온통로의 입체적 구조변화를 통한 활성조절보다는 단순히 이온통로를 통과하는 이온의 흐름을 방해하거나, 혹은 통과하는 이온의 결합부위를 방해할 것이다.  $Zn^{2+}$ 에 의한 tolaasin의 활성저해에 대한 자세한 기작을 밝히기 위해서는 위의 가능성을 고려한 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 초 록

Tolaasin은 *Pseudomonas tolaasii*에 의해 생성된 분자량 1,985 Da의 펩티드로서 재배버섯에 갈반병을 유발하는 원인 독소이다. Tolaasin은 곰팡이, 세균, 식물세포 뿐만 아니라 적혈구의 원형질막에 이온통로를 형성하여 세포를 파괴한다. Zn<sup>2+</sup>는 tolaasin의 활성을 저해함이 알려졌으나, 자세한 기작은 밝혀지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 tolaasin의 이온통로 형성에 대한 분자기작을 밝히기 위하여, 적혈구 용혈현상에 대한 Zn<sup>2+</sup>의 저해효과를 조사하였다. Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>은 tolaasin의 용혈활성을 농도의존적으로 저해하였으며, Ki 값은 각각 170 μM과 20 mM 이었다. Zn<sup>2+</sup>의 저해효과는 EDTA의 첨가로 제거되어 Zn<sup>2+</sup>의 효과가 가역적임을 보여준다. 한편, tolaasin과 함께 삼투억제제인 PEG 2000을 가하였을 때, 용혈현상은 나타나지 않았다. 적혈구를 원심분리로 회수하고 PEG 2000을 제거한 후, 신선한 반응용액에 현탁하였을 때, 용혈현상은 즉시 관측되었다. 그러나, 이때에도 Zn<sup>2+</sup>가 존재시에는 용혈현상이 억제되었으며, 이것은 삼투억제제의 처리중에 이미 이온통로가 만들어졌음을 의미한다. 이러한 결과는 Zn<sup>2+</sup>가 tolaasin의 세포막 결합 및 이온통로 형성에는 영향이 적으며, 형성된 이온통로의 활성을 저해함을 보인다.

**Key words:** brown blotch disease, hemolysis, pore-forming toxin, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin, Zn<sup>2+</sup>

## 감사의 글

이 논문은 2005학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Tolaas, A. G. (1915) A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathol.* **5**, 51-54.
- Kim, J. W., Kim, K. H. and Kang, H. J. (1994) Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea: 1. on the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**, 197-210.
- Peng, J. T. (1986) Resistance to disease in *Agaricus bisporus* (lange) imbach. Ph.D. Thesis., Dept. Plant Sci., Univ. Leeds., UK.
- Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone, K. and Williams, D. H. (1991) Structure determination of tolaasin, an extracellular lipopeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2621-2627.
- Mortishire-Smith, R. J., Nutkins, J. C., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone, K. and Williams, D. H. (1991) Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprotroph *Pseudomonas reactans*. *Tetrahedron* **47**, 3645-3654.
- Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi, M. and Monde, K. (1995) Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **61**, 493-502.
- Bassarello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., Riccio, R., Gomez-Paloma, L. and Evidente, A. (2004) Tolaasins A-E, five new lipopeptideptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.* **67**, 811-816.
- Mortishire-Smith, R. J., Drake, A. F., Nutkins, J. C. and Williams, D. H. (1991) Left handed  $\alpha$ -helix formation by a bacterial peptide. *FEBS Lett.* **278**, 244-246.
- Jourdan, F., Lazzaroni, S., Mendez, B. L., Lo Cantore, P., de Julio, M., Amodeo, P., Iacobellis, N. S., Evidente, A. and Motta, A. (2003) A left-handed alpha-helix containing both L- and D-amino acids: the solution structure of the antimicrobial lipopeptide tolaasin. *Proteins* **52**, 534-543.
- Coraiola, M., Lo Cantore, P., Lazzaroni, S., Evidente, A., Iacobellis, N. S. and Dalla Serra, M. (2006) WLIP and tolaasin I, lipopeptideptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1713-1722.
- Brodey, C. L., Rainey, P. B., Tester, M. and Johnstone, K. (1991) Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipopeptide toxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 407-411.
- Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. (1991) Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipopeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 57-70.
- Cho, K. H., Park, K. S. and Kim, Y. K. (2000) Hemolytic properties of tolaasin causing the brown blotch disease on oyster mushroom. *J. Kor. Soc. Agricul. Chem. Biotechnol.* **43**, 190-195.
- Cho, K. H. and Kim, Y. K. (2003) Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**, 221-226.
- Pasternak, C. A. (1988) A novel role of Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>: protection of cells against membrane damage. *Biosci. Rep.* **8**, 579-583.
- Lee, H. I. and Cha, J. S. (1998) Cloning of a DNA fragment specific to *Pseudomonas tolaasii* causing bacterial brown blotch disease of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Kor. J. Plant Pathol.* **14**, 177-183.
- Park, K. S. (1998) Increase in hemolytic and channel-forming activities of tolaasin by multimerization. M.S. Thesis. Chungbuk Nat'l Univ.
- Hwang, P. M. and Vogel, H. J. (1998) Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 235-246.
- Saberwal, G. and Nagaraj, R. (1994) Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 109-131.
- Bashford, C. L., Menestrina, G., Henkart, P. A. and Pasternak, C. A. (1988) Cell damage by cytolysin: spontaneous recovery and reversible inhibition by divalent cations. *J. Immunol.* **141**,

- 3965-3974.
21. Alder, G. M., Arnold, W. M., Bashford, C. L., Drake, A. F., Pasternak, C. A. and Zimmermann, U. (1991) Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 111-120.
  22. Bashford, C. L., Alder, G. M., Menestrina, G., Micklem, K. J., Murphy, J. J. and Pasternak, C. A. (1986) Membrane damage by hemolytic viruses, toxin, complement, and other cytotoxic agents; a common mechanism blocked by divalent cations. *J. Biol. Chem.* **261**, 9300-9308.
  23. Ishiura, S., Matsuda, K., Koizumi, H., Tsukahara, T., Arahata, K. and Sugita, H. (1990) Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocyte. *Mol. Immunol.* **27**, 803-807.