

## 톨라신의 용혈활성에 대한 Ni<sup>2+</sup>의 저해효과

최태근 · 왕희성 · 김영기\*

충북대학교 농업생명환경대학 농화학과

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

Tae-Keun Choi, Hee-Sung Wang, and Young-Kee Kim\*

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

Received February 12, 2009; Accepted February 19, 2009

The bacterial toxin, tolaasin, causes brown blotch disease on the cultivated mushrooms by collapsing fungal and fruiting body structure of mushroom. Cytotoxicity of tolaasin was evaluated by measuring hemolytic activity because tolaasins form membrane pores on the red blood cells and destroy cell structure. While we investigated the inhibitions of hemolytic activity of tolaasin by Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>, we found that Ni<sup>2+</sup> is another antagonist to block the toxicity of tolaasin. Ni<sup>2+</sup> inhibited the tolaasin-induced hemolysis in a dose-dependent manner and its Ki value was ~10 mM, implying that the inhibitory effect of Ni<sup>2+</sup> is stronger than that of Cd<sup>2+</sup>. The hemolytic activity was completely inhibited by Ni<sup>2+</sup> at the concentration higher than 50 mM. The effect of Ni<sup>2+</sup> was reversible since it was removed by the addition of EDTA. When the tolaasin-induced hemolysis was suppressed by the addition of 20 mM Ni<sup>2+</sup>, the subsequent addition of EDTA immediately initiated the hemolysis. Although the mechanism of Ni<sup>2+</sup>-induced inhibition on tolaasin toxicity is not known, Ni<sup>2+</sup> could inhibit any of following processes of tolaasin action, membrane binding, molecular multimerization, pore formation, and massive ion transport through the membrane pore. Our results indicate that Ni<sup>2+</sup> inhibits the pore activity of tolaasin, the last step of the toxic process.

**Key words:** brown blotch disease, hemolysis, mushroom, Ni<sup>2+</sup>, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin

### 서 론

느타리버섯은 다양한 영양소를 풍부하게 함유하고 있는 우수한 식재료이며, 높은 수익성을 보장하는 작물로 인정되고 있다. 농가는 느타리버섯의 재배를 통하여 소득증대를 희망하고 있으나 병발생 등 재배상 어려움으로 적극적인 노력은 이루어지지 않고 있다. 느타리버섯의 주된 병해는 세균성 갈색무늬병으로 알려진 갈반병과 푸른곰팡이병이 있다. 갈반병은 Tolaas[1915]에 의해 양송이버섯 재배시 나타나는 피해가 가장 큰 세균병으로 최초 보고되었으며, *Pseudomonas tolaasii*가 병원균임이 확인되었다. *P. tolaasii*는 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)뿐만 아니라 양송이버섯 및 팽이버섯 등에도 큰 피해를 주고 있으며, 새송이버섯에도 감염됨이 확인되었다. 특히, 갈반병은 느타리버섯을 주된 품종으로하는 국내 버섯재배 농가에 심각한 피해를 입히는 것으로 알려져 있다[Kim 등, 1994].

갈반병은 주로 버섯의 자실체 형성 초기에 나타나며, 병의 발생으로 어린 버섯의 경우는 조직 전체가 괴사하여 녹아내리거나, 성장한 버섯에서는 갓 조직에 갈색반점을 형성하고, 이어서 버섯조직 전체를 진한 갈색으로 변화시켜 상품성을 없애버린다. 갈반병의 심각성은 세균병으로 재배상 전체에 빠르게 퍼지며, 재배단지 전체에도 피해를 일으킬 수 있다는 것이다. 갈반병을 예방하거나 방제하기 위한 방안은 다각적으로 모색되어왔음에도 현재까지 효과적인 방법은 개발되지 않았다. 다만, 오염원이 될 수 있는 농용지하수의 살균과 재배상 전체의 장시간 가열에 의한 훈증소독 등의 방법이 주로 사용되어 어느 정도 예방효과를 보고 있다[Wong과 Preece, 1985; Geels 등, 1991]. 방제 대책으로는 생물학적 방법으로 길항균[Munsch와 Oliver, 1995; Soler-Rivas, 1999]의 사용과 항생제[Geels, 1995]의 사용 등이 제안되었지만, 특히 항생제의 사용은 식용으로 하는 버섯의 특성과 신선상품으로서의 가치를 잃으며, 법적으로도 허용되지 않고 있어 현재로는 유력한 현장적용 방안이 없는 실정이다.

국내에서는 갈반병의 원인 분석을 위하여 병원독소 tolaasin의 특성연구가 꾸준히 진행되어 왔다. Cho 등[2007]은 *P. tolaasii* 6264로부터 순수분리한 tolaasin의 분자량을 질량분석계를 통하여 측정하였고, 분자량이 각각 1,987 Da과 1,943 Da인

\*Corresponding author

Phone: +82-43-261-2560; Fax: +82-43-271-5921

E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

두 가지 이성체를 얻었으며, 이들이 Nutkins 등[1991]에 의해 유럽에서 처음 발견된 tolaasin I과 II임을 확인하였다. 또한, 이 두 가지 이성체는 Shirata 등[1995]과 Bassarello 등[2004]의 tolaasin 구조분석 결과 밝혀낸 여러 이성체 중의 성분과도 일치하였다. Tolaasin I과 II의 구조상 차이점은 tolaasin I의 homoserine<sup>16</sup> 잔기가 glycine으로 치환된 것이며, tolaasin I은 갈반병 발병에 주된 독소성분으로 작용한다. Tolaasin의 세포독성은 pH 6.5-7.0에서 최대활성을 보였으며, 최적온도는 40°C 전후에서 얻어졌고, Zn<sup>2+</sup>가 용혈활성을 저해함이 알려져있다 [Rainey 등, 1993]. Tolaasin의 버섯세포막 파괴에 대한 자세한 기작은 밝혀지지 않았으나 다른 펩티드들과 유사한 작용과정 [Shai, 1999]을 거칠 것으로 여겨지고 있다. 즉, tolaasin 펩티드의 세포막 결합 및 유입, 막에서의 다중화결합에 따른 pore 형성, 이를 통한 삼투압 교란의 결과가 버섯 세포의 파괴로 이어져 결국 버섯조직 전체가 괴사하는 것으로 생각되고 있다 [Brodey 등, 1991]. Cho와 Kim[2003]은 지질이중막에서의 tolaasin이 pore를 형성함을 이온통로 활성을 측정하였다. Tolaasin은 0.6 HU 농도에서 뚜렷한 단일 이온통로활성을 보여 주었고, 저해제로 알려진 Zn<sup>2+</sup>에 의해 농도의존적인 이온통로 활성감소를 보였다.

본 연구에서는 갈반병 원인독소 tolaasin의 작용특성을 밝히고, 버섯세포파괴를 억제할 수 있는 방안을 마련하여 갈반병의 피해를 경감시키고자 갈반병 원인독소 tolaasin의 이온통로 형성을 억제할 수 있는 저해제를 금속이온들에서 찾던 중, 기존에 효과가 인정된 Zn<sup>2+</sup>에 더하여 Ni<sup>2+</sup>이 tolaasin의 세포독성을 저해함을 발견하고, tolaasin의 용혈활성에 대한 Ni<sup>2+</sup>의 저해기작을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**균주의 분리 및 보관.** *P. tolaasii* 6264 균주는 갈반병에 감염된 느타리버섯의 갓조직을 멸균수에 넣고 분쇄한 후, 이 현탁액을 희석하여 약 200 µL PAF (Bacto-peptone 10 g, Bactotryptone 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g, glycerol 10 mL, agar 15 g per liter) 평판배지위에 도말하고, 25°C에서 1-2일간 배양하여 얻었다. 이렇게 얻은 세균 중에서 형광성의 균주를 선발하고, 흰색침강선 생성검정 및 버섯조직 함몰 검정을 통하여 병원성을 평가한 후, 세균학적 특성을 확인하였다. 분리한 세균은 PAF 액체배지 80%와 glycerol 20%를 함유한 저장배지 1.5 mL에 현탁시켜 -80°C에서 보관하였다.

**적혈구 분리.** 마취한 쥐의 대정맥으로부터 채혈한 혈액은 멸균한 glass bead가 담긴 삼각 플라스크에 옮기고, 약 1시간 동안 저속으로 교반하여 fibrin을 제거하였다. 얻어진 혈액은 4°C에서 보관하였으며, HBS 완충액(150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.4)으로 10배 희석하여 사용하였다. 채취한 혈구는 약 3주간 실험에 사용하였으며, 필요시 HBS 완충액에서 원심분리하여 파괴된 적혈구 세포들을 세척하였다.

**Tolaasin의 분리 및 정제.** Tolaasin의 순수분리는 Cho 등 [2007]의 방법으로 이루어졌다. 간략히 서술하면, *P. tolaasii* 균

주를 PAF 액체배지에 접종하여 18시간 진탕배양한 후, 원심분리하여 세균을 제거하고 배양액을 얻었다. 배양액은 30% ammonium sulfate를 가하여 4°C에서 1시간 동안 정치한 후, SW 28 rotor(Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 20,000 rpm(60,000×g)에서 1시간 동안 초고속원심분리하였다. 침전으로 얻은 crude tolaasin은 HBS 완충액에서 4시간 투석하여 glass-Teflon homogenizer로 균질화한 후, Sephadex G-75로 충전한 column에서 순수분리하였다. 얻어진 분획은 Cho 등[2007]의 결과에서 보였듯이 tolaasin I을 주성분으로 하며 tolaasin II가 약간 섞인 시료이다. 순수분리한 tolaasin은 자외선 분광광도계(U-2000, Hitachi Ltd., Tokyo)를 이용하여 220 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 적혈구를 이용한 용혈활성을 측정하였으며, 용혈활성을 갖는 분획을 순수분리하였다.

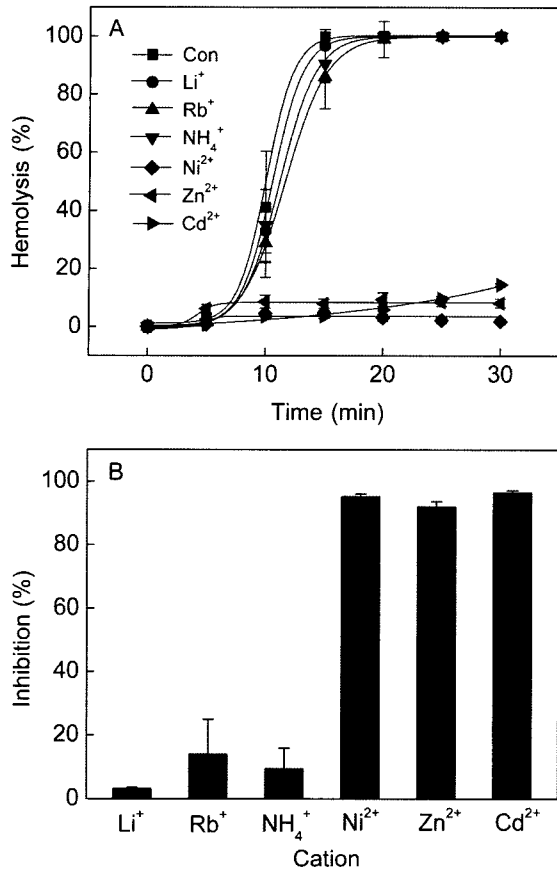
**용혈활성 측정.** Tolaasin의 용혈활성은 Rainey 등[1993]의 방법에 따라 쥐의 적혈구를 이용하여 측정하였다. 용혈활성 측정에 사용한 적혈구는 사용직전에 멸균한 HBS 완충액으로 10배 희석하였고, 이것을 최종반응액에 10%가 되도록 첨가하였다. 용혈활성 측정시 1% 적혈구를 37°C에서 30분 이내에 모두 용혈시키는 tolaasin의 농도를 1 hemolytic unit(HU)으로 정하여 사용하였다. 용혈활성은 분광분석계를 사용하여 600 nm에서 흡광도 변화로 측정하였다. 양이온효과는 각 양이온의 염화물을 HBS완충액에 처리농도의 10배 되도록 녹여서 농축액을 만든 후, 총 반응액의 10%가 되도록 첨가하여 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

**Tolaasin 용혈활성에 대한 양이온의 영향.** Tolaasin의 용혈활성은 적혈구 파괴에 따른 흡광도 감소를 측정하여 평가하였으며, 1 HU의 tolaasin을 첨가한 대조구의 경우 30분 이내에 100%의 용혈활성이 관측되었다(Fig. 1A, Con). Tolaasin의 작용특성을 조사하기 위하여 용혈활성에 대한 Li<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 및 Cd<sup>2+</sup>의 효과를 측정하였다. 각각의 양이온을 20 mM 농도로 처리하였을 때, 1가 양이온인 Li<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>과 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 등은 대조 실험과 유사한 용혈활성이 관측되었고, 2가 양이온인 Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 및 Cd<sup>2+</sup>의 경우는 tolaasin의 용혈활성을 거의 100% 저해하였다(Fig. 1B).

2가 양이온중 Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>이 용혈활성을 저해하는 것은 Cho 등[2006]의 결과와 일치하였으나, Ni<sup>2+</sup>의 경우도 tolaasin의 용혈활성을 완전히 저해하였다. Ni<sup>2+</sup>에 의한 tolaasin 용혈활성의 저해는 국제적으로 보고된 바 없어, tolaasin의 저해제로서 Ni<sup>2+</sup>의 효과를 확인하기 위하여 Ni<sup>2+</sup>의 농도를 2.5 mM에서 50 mM까지 증가시키며 용혈활성 변화를 측정하였다(Fig. 2). HBS 완충액에서 Ni<sup>2+</sup>의 농도가 증가할수록 tolaasin의 용혈활성은 감소하였으며, 50 mM 이상에서 용혈활성은 완전히 저해되었다. 위의 결과로부터 톨라신의 용혈활성을 저해하는 Ni<sup>2+</sup>의 Ki 값은 10 mM 전후로 측정되었다. 이 결과는 Cho 등[2006]이 보고한 Zn<sup>2+</sup>의 저해효과와 비교할 때, 결합친화력이 Zn<sup>2+</sup>의 약 1/10 수준이며, Cd<sup>2+</sup>과 비교할 때는 약 10배 좋은 효과를 보인다.

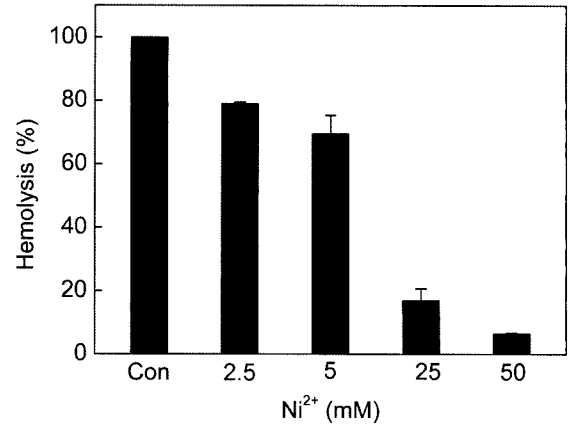
**Tolaasin의 용혈활성에 대한 Ni<sup>2+</sup>의 저해특성.** Tolaasin의 용



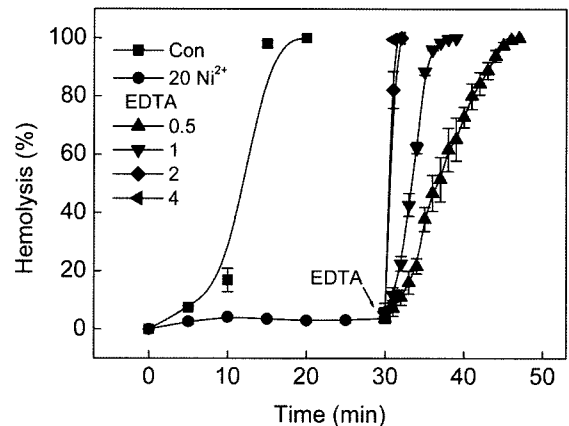
**Fig. 1. Inhibition of tolaasin-induced hemolysis by various cations.** (A) Time course of hemolysis in the presence of the indicated cation at 20 mM. (B) Inhibitions of hemolysis by 20 mM cations measured after 15 min incubation.

혈활성에 대한 Ni<sup>2+</sup> 저해효과의 특성을 밝히기 위하여, 먼저 Ni<sup>2+</sup> 효과의 가역성 여부를 EDTA를 이용하여 조사하였다. 만약, Ni<sup>2+</sup>의 결합이 가역적이라면 2가 양이온을 chelation하는 EDTA는 Ni<sup>2+</sup>의 저해효과를 제거할 수 있을 것이다. Fig. 3의 대조실험에서 톨라신은 약 20분 후에 적혈구를 완전히 파괴하였으나, 여기에 Ni<sup>2+</sup>을 20 mM 처리하였을 때는 tolaasin의 용혈활성이 저해되었다. Tolaasin의 독성이 완전히 저해된 상태에서 EDTA의 농도를 500 μM에서 4 mM까지 다양하게 첨가하면 tolaasin의 용혈활성이 농도의존적으로 회복되었다. Ni<sup>2+</sup> 첨가후 배양시간이 30분 경과한 시점에서 500 μM EDTA를 처리하였을 때, 100% 용혈활성이 일어나는데 18분 정도 소요되었으나, EDTA의 농도를 2 mM 이상으로 높였을 때는 2분 이내에 100% 용혈을 확인하였다(Fig. 3).

Tolaasin 처리후 용혈이 왕성하게 진행되는 중에 Ni<sup>2+</sup>에 의한 저해가 가능한지 여부를 조사하였다. 대조구에서 tolaasin 1 HU의 용혈활성은 10분 이후 급격히 증가하여 25분에 용혈활성이 100% 일어남을 확인하였다(Fig. 4 Con). 처음부터 반응용액에 Ni<sup>2+</sup>(\* marked)을 첨가하여 tolaasin의 용혈활성을 저해한 조건과 배양시간이 10분 정도 경과한 후 반응용액에 Ni<sup>2+</sup>을 첨가한 두 조건에서 모두 Ni<sup>2+</sup>의 첨가시 즉시 용혈활성이 저해됨을 확인하였다. 이어서 배양시간이 30분 경과한 이후 EDTA를 첨가하면서 용혈활성의 회복속도를 조사하였을 때, EDTA를 첨가하



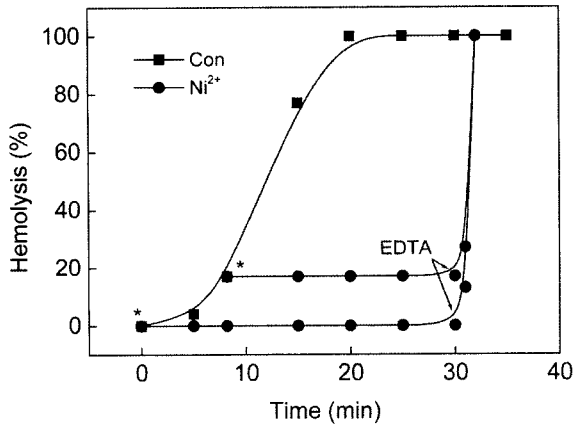
**Fig. 2. Dose-dependent effect of Ni<sup>2+</sup> on tolaasin-induced hemolysis.** Hemolysis obtained in the presence of Ni<sup>2+</sup> at various concentration. The concentration of Ni<sup>2+</sup> was adjusted from 2.5 to 50 mM.



**Fig. 3. Reversible effect of Ni<sup>2+</sup> on tolaasin-induced hemolysis.** Hemolysis was suppressed by 20 mM Ni<sup>2+</sup> (●). EDTA (0.5-4 mM) was added at 30 min to chelate Ni<sup>2+</sup>.

여 Ni<sup>2+</sup>을 제거시키면 즉시 100% 용혈활성이 다시 나타남을 확인하였다(Fig. 4). 이상으로 tolaasin이 세포막에 이온통로를 형성하여 삼투압을 교란하는 시점에서 Ni<sup>2+</sup>의 용혈활성 저해가 이루어지며, 처리한 EDTA가 Ni<sup>2+</sup>을 제거하면 이미 생성된 이온통로의 활성화에 따라 용혈이 대조실험보다 빠르게 진행됨을 확인하였다. 이러한 결과는 EDTA가 Ni<sup>2+</sup>에 의해 저해되었던 tolaasin의 용혈활성을 신속하게 회복시켜 주는 것으로, Ni<sup>2+</sup>이 tolaasin에 가역적으로 결합하는 것을 보인다.

**Tolaasin 이온통로 활성화에 대한 Ni<sup>2+</sup>의 저해효과.** 세포막에 이온통로를 형성하는 독소들은 일반적으로 삼투압을 교란하는 colloid osmotic lysis 기작을 통하여 세포를 파괴한다고 알려져 있다. Menestrina 등[1994]은 입자의 크기가 pore의 직경보다 큰 유기화합물은 용질이 pore를 통과하지 못하게 하여 삼투압 교란을 막아주며, 이들이 세포의 외부에서 pore를 막거나 농도가 높을 경우 외부삼투압을 높여 세포의 osmotic lysis를 억제한다고 알려져 있다. 이러한 경우 삼투억제제에 의한 용혈의 저해는 이들이 tolaasin의 이온통로 형성과정을 저해하지 않으나, 이온통로를 통한 이온의 이동만을 저해하기 때문에 나타난다. 특히 Cho[2003]는 PEG 1000(수화 입자반지름 0.9 nm)을 첨가

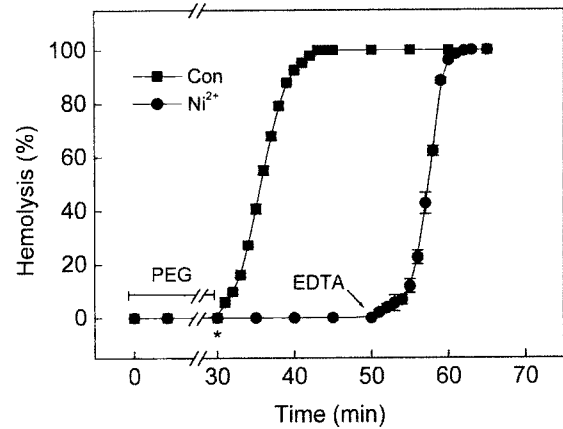


**Fig. 4. Inhibitory effect of Ni<sup>2+</sup> on the preformed tolaasin pore.** While erythrocytes were hemolyzed by tolaasin, Ni<sup>2+</sup> was subsequently added (\* marked). EDTA was added to chelate Ni<sup>2+</sup> at 30 min of incubation. The concentrations of Ni<sup>2+</sup> and EDTA were 20 mM and 2 mM, respectively.

하였을 때, tolaasin에 의한 용혈활성이 현저하게 저해되며, PEG 2000(수화 입자반지름 1.4 nm)의 경우에는 용혈이 완전히 저해됨을 확인하였다. 이것은 적혈구의 세포막에 생성된 tolaasin pore의 반경이 0.9-1.4 nm 범위에 속함을 보여준다.

Tolaasin에 의해 생성된 이온통로가 얼마나 빠르게 용혈현상을 일으키는지 측정하기 위하여, 먼저 적혈구 현탁액에 tolaasin을 가하고 tolaasin의 pore를 막기 위하여 30 mM PEG 2000 [Lo Cantore 등, 2006]을 가했다. 이 용액에 tolaasin을 가하면 배양시간 30분이 경과하여 tolaasin에 의한 이온통로가 적혈구 세포막에 생성되었음에도 용혈활성은 나타나지 않았다. 이때, 원심분리를 통하여 PEG 2000을 포함하는 상정액을 제거하고, 침전된 적혈구를 신선한 HBS 반응용액에 현탁하면 용혈활성은 신속히 나타나고 적혈구는 배양 15분에 이내에 완전히 용혈되었다(Fig. 5, Con). PEG 2000으로부터 분리한 적혈구가 빠른 용혈활성을 보인 것은, PEG 2000이 배양중 tolaasin의 세포막 결합 및 이온통로 형성과정을 억제하지 않음을 보여준다. 한편, 원심분리 후 20 mM Ni<sup>2+</sup>을 가한 HBS 용액으로 적혈구를 현탁한 경우에도 용혈활성은 억제되었다(Fig. 5, Ni<sup>2+</sup>). 여기에 EDTA를 첨가하여 Ni<sup>2+</sup>을 제거하면 용혈현상이 즉각 관측된다. 이것은 Ni<sup>2+</sup>이 이미 생성된 tolaasin의 이온통로를 저해하는 것을 보여준다. 이상의 결과를 종합할 때, Ni<sup>2+</sup>는 tolaasin의 적혈구 세포막 결합 및 이온통로 형성과정을 저해하지 않으나, 형성된 이온통로의 활성을 저해함을 알 수 있다.

본 연구를 통하여 밝혀진 Ni<sup>2+</sup>의 tolaasin 세포독성 저해효과는 국내외에서 보고된 바 없으며, 따라서 작용기작도 밝혀지지 않았다. 다만, 본 연구의 Fig. 5에서 보인 바와 같이 Ni<sup>2+</sup>은 tolaasin이 적혈구 세포막에 이온통로를 형성한 후 저해효과를 보이는 것으로 보아 Zn<sup>2+</sup>와 유사하게 tolaasin의 이온통로를 저해하는 것으로 여겨진다. Zn<sup>2+</sup>에 의한 tolaasin의 저해기작은 이미 지질 이중막에서 이온통로의 활성을 전기생리학적으로 측정하고 Zn<sup>2+</sup>를 가했을 때, 통로를 통한 전기적 신호가 농도의존적으로 저해됨을 보였다[Cho와 Kim, 2003]. 이들 두 이온은 tolaasin이 생성한 이온통로의 한 부분에 결합할 것이며, Ni<sup>2+</sup>의



**Fig. 5. Inhibition of preformed tolaasin pore by Ni<sup>2+</sup>.** Erythrocytes were incubated with tolaasin in the presence of PEG 2000, an osmotic protectant. After 30 min incubation, erythrocytes were collected by centrifugation and supernatant containing PEG 2000 was discarded (\* marked). The erythrocytes were resuspended in a fresh buffer (■) and Ni<sup>2+</sup>-containing buffer (●). EDTA (2 mM) was added at the indicated time (↓).

유효농도에 비하여 Zn<sup>2+</sup>의 농도가 1/10 정도 낮은 것으로 보아 Zn<sup>2+</sup>의 결합력이 약 10배 큰 것으로 생각된다. 한편, Cd<sup>2+</sup>은 결합력이 이들 두 이온보다도 작아서 높은 농도에서 tolaasin의 활성저해 효과를 보였다. 이들의 결합력에 차이가 있는 것은 결합부위의 구조 구멍과 함께 연구되어야 할 것이다. 일반적으로 다가 양이온들은 histidine 잔기의 이미다졸기에 결합하는 것을 알려져 있으나[Battistoni 등, 2001], tolaasin I이나 II 모두 histidine 잔기가 없어 금속이온에 대한 결합부위는 알려지지 않고 있다. 다만, tolaasin은 C-말단부위에 lactone 환상구조를 갖고있어 이 구조내 펩티드 결합을 형성하는 여러 개의 carbonyl carbon 산소원자가 금속이온과 결합할 가능성이 있다.

## 초 록

세균독소인 톨라신은 재배버섯에서 버섯균사 및 자실체의 구조를 파괴하여 갈반병을 일으킨다. 톨라신의 세포독성은 톨라신이 적혈구의 세포막에 pore를 형성하여 세포구조를 파괴하기 때문에 용혈활성을 측정하여 평가한다. 저자들은 Zn<sup>2+</sup>와 Cd<sup>2+</sup>에 의한 톨라신의 용혈활성 저해효과를 측정하는 중에 Ni<sup>2+</sup>이 또 다른 저해제로 톨라신의 독성을 억제하는 것을 발견하였다. Ni<sup>2+</sup>에 의한 톨라신 용혈활성의 저해는 농도의존적이었으며, Ki 값은 대략 10 mM이었고, 이것은 Ni<sup>2+</sup>이 Cd<sup>2+</sup>에 비하여 저해효과가 높음을 의미한다. 용혈활성은 50 mM 이상의 Ni<sup>2+</sup> 농도에서 완전히 제거되었으며, Ni<sup>2+</sup>의 효과는 EDTA 첨가에 의해 가역적임을 확인하였다. 톨라신에 의한 용혈활성이 20 mM Ni<sup>2+</sup>에 의해서 완전히 억제된 상태에서 EDTA를 가하면 즉각 용혈활성이 나타났다. Ni<sup>2+</sup>에 의한 톨라신 독성의 저해기작은 알 수 없지만, Ni<sup>2+</sup>은 톨라신의 독성과정인 막결합, 분자중합체 형성, pore 형성, pore를 통한 막대한 양의 이온이동 등에 작용할 수 있을 것이다. 본 연구의 결과는 Ni<sup>2+</sup>이 독성과정의 마지막 단계인 pore를 통한 이온이동 과정을 저해함을 보여준다.

**Key words:** brown blotch disease, hemolysis, mushroom, Ni<sup>2+</sup>, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Bassarrello C, Lazzaroni S, Bifulco G, Lo Cantore P, Iacobellis NS, Riccio R, Gomez-Paloma L, and Evidente A (2004) Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J Nat Prod* **67**, 811-816.
- Battistoni A, Pacello F, Mazzetti AP, Capo C, Kroll JS, Langford PR, Sansone A, Donnarumma G, Valenti P, and Rotilio G (2001) A histidine-rich metal binding domain at the N terminus of Cu,Zn-superoxide dismutases from pathogenic bacteria. *J Biol Chem* **276**, 30315-30325.
- Brodey CL, Rainey PB, Tester M, and Johnstone K (1991) Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**, 407-411.
- Cho KH (2003) Characterization of membrane binding and ion channel formation of a peptide toxin, tolaasin. Ph. D. Thesis. Chungbuk National University. Korea.
- Cho KH and Kim YK (2003) Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 221-226.
- Cho KH, Kim ST, and Kim YK (2006) Inhibitory effect of Zn<sup>2+</sup> on tolaasin-induced hemolysis. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **49**, 281-286.
- Cho KH, Kim ST, and Kim YK (2007) Purification of pore-forming toxin, tolaasin, produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *J Biochem Mol Biol* **40**, 113-118.
- Geels FP, van Griensven LD, and Rutjens AJ (1991) Chlorine dioxide and the control of bacterial blotch on mushrooms, caused by *Pseudomonas tolaasii*. In Science and Cultivation of Edible Fungi (Maher ed.) Vol. 1, pp. 437-442, Balkema Pub., Brookfield, VT, USA.
- Geels FP (1995) *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Appl Bacteriol* **79**, 38-42.
- Kim JW, Kim KH, and Kang HJ (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.
- Lo Cantore P, Lazzaroni S, Coraiola M, Dalla Serra M, Cafarchia C, Evidente A, and Iacobellis NS (2006) Biological characterisation of WLIP produced by *Pseudomonas reactans* strain NCPPB1311. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1113-1120.
- Menestrina G, Moser C, Pellet S, and Welch R (1994) Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicol* **87**, 249-267.
- Munsch P and Oliver JM (1995) Biocontrol of bacterial blotch of the cultivated mushroom with lytic phages: some practical considerations. *Mushroom Science* **14**, 595-602.
- Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Johnstone K, and Williams DH (1991) Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* paine. *J Am Chem Soc* **113**, 2621-2627.
- Rainey PB, Brodey CL, and Johnstone K (1993) Identification of a gene cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Mol Microbiol* **8**, 643-652.
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membrane by  $\alpha$ -helix antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**, 55-70.
- 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.
- Soler-Rivas C, Arpin N, Olivier JM, and Wichers HJ (1999) WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas 'reactans'*, as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J Appl Microbiol* **86**, 635-641.
- Tolaas AG (1915) A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathol* **5**, 51-54.
- Wong WC and Preece TF (1985) *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops effect of sodium hypochloride on the bacterium and on blotch disease severity. *J Appl Bacteriol* **58**, 259-267.