

균독소, Patulin의 DNA 손상作用에 관하여

李 吉 洙

한림대학 생물학과

최근 들어서 환경으로부터 오염된 물질에 대한 관심이 한층 높아지고 있으며, 이들 물질의 대부분은 산업이나 기술개발의 산물로서 특히 우리의 환경내에 존재하는 독성물질 mycotoxin을 들 수 있다. Mycotoxin은 곰팡이에 의하여 생성되는 소위 2次대사산물로서 정의되며, 그의 특성은 항생물질과 유사하다. 그러나 mycotoxin이 항생물질과 다른점은 미생물에 대하여만 특이하게 작용하는 것이 아니고 고등동물이나 인간에게도 해를 미치는 점이다. 그중에서 가장 잘 알려진 mycotoxin은 aflatoxin으로서 이 물질은 이미 발암성물질로 판명된 바 있다. 그외에도 수많은 유사한 mycotoxin이 있으며, 아직 그의 작용기작이 잘 밝혀지지 않았으나 역시 위험한 독소임에는 틀림없다. Patulin (4-hydroxy-4-H-furo(3,2c)pyran-2(6H)one)도 이러한 부류에 속하는 mycotoxin이며 무색투명한 결정체로서 자외선최대흡광도는 276nm이다. Patulin은 최초에 1943년 *Penicillium patulum* 으로부터 추출되어 항생제로 알려진 후 감기에 사용되곤 하였으나, 그후 독성문제 때문에 사용이 중지된바 있다. 그후 연구결과 mouse에 대한 LD₅₀는 10-35mg/kg이며 기타 동물생체 실험에서도 독성을 나타내었다. 세계의 몇몇 나라에서는 가축들의 연이은 죽음이 있었는데 이 죽음의 원인은 patulin을 함유한 사료에서 비롯되는 것으로 알려진바 있다. Patulin은 lactone 계열의 균독소로서 *Penicillium*, *Aspergillus* 또는 *Byssochlamys* 로 부터도 생성된다. 그의 생合成과정은 4분자의 acetate가 6-methyl salicylic acid로 축합되며 다시 탈카복실화되어서 m-cresol로 되고 이어서 gentisaldehyde를 거쳐서 patulin이 형성된다. *Penicillium* 균류를 산성배지에서 배양시키면 patulin이외에도 as-

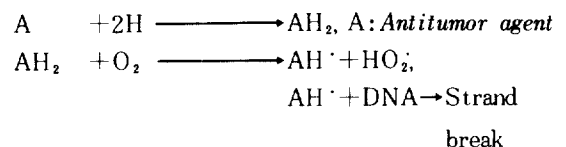
cladiol이나 deoxy patulin이 생성될 수 있다. 최근에는 patulin의 이성체로서 neopatulin이 생성된다는 보고도 있다. Patulin 생성균주들은 매우 osmophilic하기 때문에 비교적 높은 삼투압물질 즉, 당(sugar)의 존재하에 잘 성장할 수 있다. 그러므로 과일이나 과일즙은 이러한 곰팡이류의 좋은 배양배지라고 할 수 있다. 갈변사과의 50%정도는 patulin을 함유하고 있으며 그 농도는 갈변사과 1kg당 거의 1g으로서 막대한량의 patulin을 생성한다고 보고된바 있다. 본 실험에서는 patulin의 생성 및 분리방법으로서 시판용사과즙스에 *Penicillium patulum*을 접종시켜서 수 gram에 해당하는 patulin을 수확할 수 있었으며, 그외의 patulin생성배지들은 이보다 좋은 결과를 나타내지 못하였다. Patulin의 생성량은 배양액 1liter당 3.5g이었으며, 이로부터 추출되어 TLC(thin layer chromatography)로서 분리하여 MBTH(3-methyl-2-benzothiazolinon hydrazon HCl)로서 발색하르로서 정성, 정량될 수 있었고, 0.5μg/ml 이하의 농도도 위의 발색시약으로서 충분히 정성적으로 확인할 수 있었다. Patulin의 분리, 순화 또는 patulin의 확정실험으로서는 HPLC나 GC가 사용되었다. Patulin은 미국과 캐나다의 사과즙에서 또는 불란서의 사과즙에서 이미 검출되었던 바, 시판사과즙스의 3분의 1 정도가 patulin에 오염되었다고 보고된 바 있다. 이러한 patulin의 과일음료에의 오염문제는 patulin의 작용기작과 그의 독성문제를 일으키고 있다. Patulin은 SH-함유물질이나 NH₂-함유물질과 잘 반응한다. 그러므로 patulin은 거의 모든 단백질과 핵산에 반응할 수 있으므로 그의 작용기작연구에 많은 난점이 생기게 되었다. Patulin의 SH-함유물질 즉, 효소와의 용

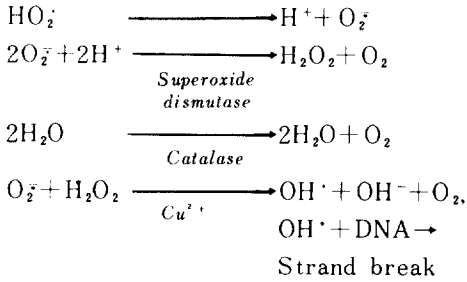
이한 반응때문에 여러가지 효소에서 효소의 활성을 저해한다는 보고가 있었다. 그외에 patulin은 동물실험에서 teratogenicity 또는 carcinogenicity를 유발한다고 알려졌다. 특히 HeLa cell에서 DNAstrand break을 야기시키며 이러한 DNA손상은 회복되지를 않는다는 보고가 있었다. 이상과 같은 patulin의 효소 및 동물체에 대한 실험보고는 보다 더 근본적인 분자수준에서의 patulin의 세포내에서의 target는 과연 무엇인가 하는 문제를 제거하게 되었다. 그러므로 patulin의 작용기작이 주로 세균에서의 돌연변이성에 맞추어졌고, 돌연변이 유발물질을 검증하는 두가지의 실험방법 즉, Ames-Test와 rec-Test가 도입되었다. Ames-Test는 *Salmonella typhimurium*의 his auxotroph을 사용하여 mutagen처리에 의한 revertant의 양을 측정하여 돌연변이 유발성을 검증하는 방법으로서 patulin은 이 test에서 반응을 나타내지 않았으나, *Bacillus subtilis*의 rec⁻ mutant에서 mutagen에 의한 recombination능력을 시험하는 rec-Test에서 patulin은 양성을 나타내었다. 이러한 두가지 test에서의 결과의 불일치성 때문에 patulin의 세균에 대한 돌연변이성은 확실한 결론을 찾을 수 없게 되었다. 본 실험에서는 *in vivo*와 *in vitro*에서의 DNA 손상여부를 확인하므로써 patulin의 돌연변이 유발성에 대해서 연구되었다. *In vivo* 실험으로는 mutagen처리에 의하여 *E. coli* lysogen에서 DNA손상이 생겼을 경우 "SOS"-response에 의하여 rec A protein이 생성되며 이 rec A protein은 prophage의 CI₈₅₇ gene으로부터 생성되는 λ-repressor를 inactivation시키므로써 phage induction을 할 수 있다는 점에서 phage induction test(Inductest)와 *E. coli*염색체 DNA의 strand break실험이 수행되었으며, *In vitro* 실험으로서는 투과성세포(permeabilized cell)를 이용한 macromolecule 합성에서의 patulin의 영향 및 직접적인 방법으로서 *in vitro*에서 patulin에 의한 Col E1 plasmid DNA와 λ-phage DNA의 손상을 조사하였다. Phage induction test에서는 두가지의 미생물균주, 온도감수성 *E. coli* λ-lysogen과 *B. megaterium*

lysogen을 사용하여 patulin에 의한 그의 phage induction rate를 조사한 바 patulin은 *E. coli* lysogen에서 phage induction을 야기시켰으며, 최적농도는 10μg/ml이었다. 더 높은 농도에서는 λ-phage합성까지 저해하므로 유의성이 없었다. 한편 *B. megaterium*에서도 patulin 처리 후 phage induction에 의한 cell lysis를 관찰할 수 있었다. 그의 최적농도는 15μg/ml이었다. *E. coli*에서 mutagen처리에 의하여 "SOS" response가 유도되며, 이에따라 sfi gene에 영향을 주어 세포는 filamentous form으로 된다. 그러므로 *E. coli* lysogen에 patulin을 처리한 후 검경하므로써 세포는 filamentation될 뿐 세포분열은 하지 않았다는 것이 확인되었다. *In vivo*에서 DNA strand break은 *E. coli* DNA를 표지하기 위하여 ³H-thymidine을 첨가, 배양시키고 난 후 patulin으로 처리하였으며 sucrose gradient centrifuge에 의하여 알카리 sucrose (pH 12)에서는 DNA가 denaturation되는 성질을 이용하여 DNA single strand break을 확인하였으며, 중성 sucrose에서는 DNA위의 손상이 DNA 이중나선상에서 비교적 가까운 위치에 놓여있을 경우 double strand break을 관찰할 수 있으므로 DNA 이중나선의 단편들을 검증할 수 있었다. 이실험으로부터 patulin은 현저히 DNA single strand break 및 높은 농도에서는 double strand break을 유발하였다. 그러므로 patulin은 *in vivo*에서 *E. coli*의 염색체 DNA를 손상시키는 균독소이며, DNA의 손상회복(DNA-repair)은 patulin에 의하여 지연될 뿐 근본적으로 손상회복이 저해되는 않았다. 이상과 같은 *in vivo*에서의 patulin의 DNA 손상유발의 결과 *in vitro*에서의 patulin의 DNA에 대한 영향을 실험하게 되었다. *In vitro*에서의 patulin의 작용기작을 연구하기 위하여 *E. coli*를 재료로 하여 toluene 또는 sucrose로서 각각 투과성세포를 만들고, 이 투과성세포내에서 세가지의 macromolecule 합성에 대한 patulin의 영향을 조사하였다. *E. coli*세포를 위의 두가지 방법으로 투과성 세포로 만들고 그의 viable cell을 측정한 결과 단지 0.35%만이 colony를 형성하였다. 투과성세

포를 이용한 *in vitro*에서의 macromolecule 합성의 특이점은 DNA 합성, RNA 합성 및 단백질 합성에서의 상관된 조절기작을 제거함으로써 각각의 합성을 단독적으로 수행할 수 있다는 것이다. 그러므로 투과성세포를 이용한 macromolecule 합성을 A. Kornberg는 *in vivo* 상태도 아니고 *in vitro* 상태도 아닌 *in vitro* 라고 서술한 바 있다. DNA 합성은 *E. coli* pol A⁻ mutant를 사용하므로써 두가지 합성의 종류를 각각 측정할 수 있으며 기타 mRNA 합성이나 단백질 합성으로 부터의 영향을 배제할 수 있다. DNA 합성에서 pol A⁻ mutant를 사용하므로써 DNA 손상에 의한 repair synthesis를 제거할 수 있으므로 단지 DNA 복제합성(replication synthesis)만이 측정될 수 있었고, DNA 손상회복합성은 *E. coli* pol A⁺를 사용하였고 ATP 의존적이 아니므로 4가지의 DNA 전구물질을 제공하므로써 수행되었다. DNA 복제합성은 ATP와 NAD 의존적 합성이며 투과성세포는 이미 세포막의 손상때문에 염색체 DNA의 새로운 DNA replication initiation은 일어나지 않고, 단지 이미 합성된 replication fork에서의 DNA 합성만이 이루어지며 그 합성율은 3종의 DNA 전구물질과 동위원소로 표시된 ³H-dTTP (deoxythymidine-5'-triphosphate)를 첨가하므로써 측정되었다. DNA 손상회복합성(DNA repair synthesis)은 *E. coli* pol A⁺에 4가지의 DNA 전구물질을 사용하여 nick translation의 방법으로 수행되었고, 역시 ³H-dTTP의 첨가율로서 측정되었다. DNA 복제합성에서 patulin은 대조군으로 사용된 DNA 복제저해제 nalidixic acid와 같은 영향을 보였으며, patulin 농도 50 μg/ml에서 DNA 복제합성을 100% 저해시켰고, 이러한 저해율은 nalidixic acid보다 4배이상의 복제저해능력을 뜻한다. DNA 손상회복합성에서는 DNA repair를 지연시켰을 뿐, 그후 모든 DNA는 합성되었다. 그러므로 patulin은 DNA 손상회복을 저해하지 않았다. DNA 합성이외에 RNA 합성에 대한 patulin의 영향은 3가지의 nucleotide와 ³H-UTP의 첨가율을 측정하므로써 수행되었고 patulin은 RNA 합성에 영향을 주지 않았다. 투과성세포의

특징은 toluene 또는 sucrose에 의하여 세포막에 투과성이 생기므로써 세포질내의 작은 분자들(ATP, NAD 또는 아미노산 등)은 세포를 투과성화시키는 과정에서 유출되었으나 세포질내에는 macromolecule을 합성하는 기관들은 그대로 존재하므로 아미노산의 존재여부에 따라서 mRNA 합성과 rRNA, tRNA 합성을 분리, 측정할 수 있다. 즉, 20종의 아미노산이 없는 상태에서는 단지 mRNA만이 합성될 것이며, 아미노산이 모두 주어진다면 단백질합성이 일어나며 그에 수반된 rRNA와 tRNA가 합성될 것이다. 아미노산의 부재하에 우선 mRNA를 합성시킨후 그 합성의 종결시기에 20종의 아미노산을 제공하므로써 단백질합성이 시작되고 이에 따라 rRNA 및 tRNA 합성이 이루어진다. Patulin은 mRNA 합성 및 rRNA, tRNA 합성을 저해하지 않았다. 그러므로 투과성세포를 이용한 *in vitro* macromolecule 합성에서 patulin은 특이적으로 DNA 복제합성만을 저해하는 replication inhibitor라고 생각된다. 이러한 patulin의 DNA에 대한 특이성때문에 또다른 종류의 DNA에 대한 직접적인 영향을 조사하였다. 최근 *in vivo*에서 DNA를 손상시키는 antitumor agent들은 세포내에서 일단 환원형으로 변화된 후 DNA에 대한 공격능력을 가진다는 보고가 있다. Streptonigrin은 환원되어 그의 quinone부분이 semiquinone화 되므로써 DNA strand break를 유발한다고 한다. 또한 DNA 나선절단에 직접적으로 관여하는 요인은 유리상태의 OH radical이라고 보며, 유리의 OH기는 H₂O₂와 superoxide radical로부터 Cu²⁺이온의 존재하에 생성되며, 또는 직접적으로 ionizing radiation에 의한 H₂O의 radiolysis에 의하여 발생된다. 생성된 OH기는 직접 DNA의 염기와 반응하여 염기와 deoxyribose사이의 N-glycosidic 결합을 불안정화 시키므로써 염기가 제거되어 depurination된다. OH기 발생과 환원반응은 다음과 같다.





DNacin B₁, adriamycin 등의 *in vitro*에서의 DNA 손상에 대한 연구결과는 낮은 농도의 Cu²⁺ 이온 및 환원제로서 NADPH 존재하에 DNA가 손상될 수 있다고 한다. 이러한 관점에서 patulin도 환원제와 Cu²⁺ 이온의 존재하에 *in vitro*에서 DNA를 절단할 수 있는 능력의 여부를 실험하였다. ColE1 Plasmid DNA, λ-phage DNA 및 합성 poly(dG-dC)와 poly(dA-dT)를 patulin과 반응시킨 후 0.6% agarose gel 전기영동 (slab gel, submarine method)을 하므로서 DNA strand scission을 판별할 수 있었다. ColE1 Plasmid DNA는 supercoil form (Form I)으로서, double strand 중 한쪽 strand에 nick이 생기면 relaxation되며, 양쪽 strand 위의 nick의 위치가 비교적 가까이 있게 되면 linearization되므로 이상의 세가지 형태의 DNA는 0.6% agarose gel 전기영동으로 쉽게 분리되며, ethidium bromide로 염색하여 U. V.로 각각의 band를 확인할 수 있었다. 이 실험에서 patulin의 낮은 농도에서는 relaxed form이 관찰되었고 보다 높은 농도에서는 linear form을 볼 수 있었다. 즉, Patulin의 농도에 따라 먼저 relaxation 다음이 linearization이 일어난 것으로 보아서 patulin은 Plasmid DNA를 농도의존적으로 절단할 수 있다는 것이 확인되었다. Patulin의 λ-phage에 대한 영향도 낮은 농도의 Cu²⁺ 이온과 NADPH 존재하에 실험되었으며 비교적 높은 농도의 patulin (100 μg/ml)에서 DNA는 모두 절단되어 전기영동 gel 상에서 관찰될 수가 없었다. Superoxide dismutase 또는 catalase 및 OH radical scavenger로서 dimethyl sulfoxide 들은 patulin에 의한 DNA strand scission을 저해하였다. 이러한 patulin의 ColE1 Plasmid DNA 및 λ-

phage DNA에서의 DNA strand scission의 결과, Patulin은 DNacin B₁, adriamycin, streptonigrin 또는 mitomycin과 같이 특이적으로 *in vitro*에서 Cu²⁺ 이온과 NADPH 존재하에 DNA를 절단할 수 있다는 것이 확인되었다. 그러나 4종의 DNA 염기에 대한 특이성은 밝혀지지 않았으므로 본 실험에서는 합성 nucleotide를 재료로 하여 patulin의 DNA 염기에 대한 특이성이 조사되었다. 이러한 합성 nucleotide에서 strand 절단은 찾아볼 수 없었다. 이상과 같은 *in vivo* 실험 (λ-phage induction과 *E. coli* 염색체 DNA의 strand break)과 *in vitro* 실험 (투과성세포를 이용한 macromolecule 합성 및 agarose gel 전기영동을 이용한 DNA의 절단 확인)을 하므로서 patulin은 세균과 virus에서 특이적으로 DNA를 손상시키는 균독소라는 결론을 얻었다. 돌연변이 유발물질의 검증법으로 쓰이는 Ames-test나 rec-test 이외에 최근에 개발된 또 하나의 실험 방법으로서 "SOS"-chromotest가 본 실험에 도입되었다. 이 test는 *E. coli* 균주에 phage Mu를 이용하여 *sfi*-gene과 *lacZ*-gene을 도입시키므로서 돌연변이 물질에 의한 "SOS"-response에 따라 β-galactosidase의 induction을 측정하는 방법인 것이다. 이 균주에서 alkaline phosphatase는 유도효소가 아니고 constitutive로서 mutagen에 의한 "SOS" response만을 측정하기 위하여 사용된 대조구의 역할을 한다. 돌연변이 유발물질로 잘 알려진 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide)는 이 균주에서 상당한량의 β-galactosidase를 생성시키므로서 mutagen으로 확증되었으나, 효소 생성을 유도하기 위한 그의 농도의 한계는 매우 좁은 것이기 때문에 여타의 돌연변이 유발 가능 물질에서도 적정 농도를 찾는 데는 상당한 어려움이 있다는 것이 본 실험에서 밝혀졌다. Patulin은 이 "SOS" chromotest에서 β-galactosidase를 induction시키지 않았다. 이러한 negative result는 효소 생성을 유도하기 위한 patulin의 최적 농도를 찾는 데에서의 난점 때문인지, 아니면 patulin 자체가 이러한 system에서 negative인지는 확인할 수 없었다. 서두에서 서술한 바와 같이 patulin은 SH- 및 NH₂-

함유물질과 매우 친화성이 있으므로 patulin과 이들 group을 가지고 있는 세포내의 물질과의 반응을 실험하였다. 즉, *E. coli*의 tRNA에는 몇가지의 희귀염기(rare base)가 존재하는데 그중에서 4-thiouracil의 경우 patulin과의 반응성을 *in vitro*에서 검토하므로써 *E. coli* tRNA에 대한 patulin의 영향을 조사하였다. Patulin을 동위원소로 표지하기 위하여 *Penicillium patulum* 배양으로부터 생성된 mycelia에 ^{14}C -acetate를 첨가하여 replacement culture하므로써 ^{14}C -patulin을 얻을 수 있었으며, *E. coli* cell을 ^3H -uracil로 표지하여 MAK-column chromatography로서 ^3H -tRNA를 분리, 추출할 수 있었다. 이 두가지의 동위원소로 표지된 ^{14}C -patulin과 ^3H -tRNA를 *in vitro*에서 반응시켜서 Sephadex-column chromatography하므로써 반응생성물질을 분획, 정성하였다. 실험결과 반응생성물질은 patulin에 SH-기가 첨가된 것임을 확인할 수 있었다. 이어서 ^{14}C -patulin과 4-thiouracil의 반응실험에서 ^3H -uracil을 marker로 사용하여 그의 반응을 실험하였던 바 4-thiouracil로부터 uracil이 생성됨을 알 수 있었다. 또한 아미노산중에서 SH-group을 가진 cysteine이 patulin과 반응하여 alanine을 생성한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 patulin의 SH-chelating 능력은 tRNA^{cys}의 cysteine charging에서 patulin에 의하여 hybrid alanyl-tRNA^{cys}가 형성될 수 있지 않은가하는 예견을 할 수도 있다. 그러므로 합성된 단백질의 아미노산서열에서 cysteine 자리에 alanine이 올 수도 있으므로 합성된 단백질은 불활성화될 수도 있을 것이다. 이상과 같은 *in vitro*에서의 SH-함유세포물질과의 반응실험으로서 patulin은 거의 모든 단백질과 반응할 수 있다는 보고를 확인할 수 있었다. 이러한 면에서 본 실험에서는 patulin의 *in vitro*에서 aminoacyl tRNA형성반응에 대한 영향을 *E. coli* tRNA^{phe}, phenylalanyl tRNA synthetase 및 ^3H -phenylalanine을 이용하여 조사하였던 바, Patulin은 이 아미노산의 tRNA^{phe}에의 charging에 저해작용을 하지 않았다. 대조구로 사용된 parafluorpheny-

lalanine은 *E. coli*의 phenylalanyl tRNA^{phe}형성을 저해하였다. 이상과 같은 결과로서 *in vitro*에서 patulin은 SH-group과 잘 반응할 수 있으나, 반응의 생성물 즉, Patulin-Adduct의 돌연변이유발성에 대하여는 연구보고가 없는 상태이므로 이러한 방향으로 앞으로의 연구가 진행되어야 할 것이며, patulin은 본 실험의 결과 특이적으로 *in vivo*와 *in vitro*에서 DNA복제를 저해하는 inhibitor이며 이러한 현상은 patulin이 DNA strand break를 유발할 수 있는 능력에서 기인한 것으로써 현재 DNA sequencing analysis(Maxam and Gilbert method)에 의하여 wild type phage M13과 그의 mutant에서의 patulin에 의한 DNA strand break이 조사되고 있으며 특히 어떠한 nucleotide에 특이적으로 영향을 미치는가 하는 문제가 해결될 것으로 생각된다. 한편 SH-group 또는 NH₂-group을 함유한 세포내의 물질과의 반응에서 생성된 Patulin-Adduct의 순수한 분리 및 동물생체에 대한 실험 또는 세균에서의 돌연변이유발성은 앞으로 남은 연구과제가 아닐 수 없다. 또한 patulin이 세포내로 transport될 때 어떤 기작에 의하여 이루어지며, 운반과정에서 patulin의 inactivation문제, 특히 세포내의 수많은 효소에 의한 patulin의 불활성화의 결과 발생하는 효소의 불활성기작이 연구되어야 할 것으로 생각된다. Patulin의 동물생체실험에서 사용되는 반복투여 또는 patulin의 투여량에서 보는 바와 같이 일시적으로 소량을 투여하였을 경우 실험동물체에 영향을 미치지 못하지만 장기적인 동물체내로의 투여 또는 인체와의 접촉은 결국 돌연변이를 일으킬 수 있는 하나의 요인이 될 수 있다고 생각되므로 patulin의 돌연변이유발성실험은 세균세포나 virus에서 이 mycotoxin이 DNA의 strand를 절단할 수 있다는 결과를 기초로하여 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

본 실험은 부분적으로 독일연방정부 과학재단(DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft)의 research grant에 의하여 수행되었음.