

세균 바이러스 증식에 대한 Fumonisin B1의 영향

이 길 수

한림대학교 자연과학대학 생물학과

Effect of Fumonisin B1 on the Bacterial Virus Multiplication

Kil-Soo Lee

Department of Biology, College of Natural Science, Hallym University Chunchon 200-702, Korea

(Received May 9, 1996)

(Accepted May 22, 1996)

ABSTRACT : The effect of Fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* on bacterial viruses P1 and Lambda, was investigated by the virus plaque assay. Fumonisin B1 inhibited the P1 viral multiplication in the concentration range from 100 µg/ml to 400 µg/ml. The inhibition was Fumonisin B1 concentration-dependent. Another bacterial virus Lambda multiplication was also inhibited by lower concentration of Fumonisin B1 (10 µg/ml~50 µg/ml). This inhibition was dependent on Fumonisin B1 and on virus-Fumonisin B1 reaction time. Sensitivity of bacteriophage Lambda to Fumonisin B1 was higher than that of P1 virus. Lambda viral DNA was treated *in vitro* with Fumonisin B1 at various concentration. Significant DNA fragmentation by Fumonisin B1 was observed in the agarose gel electrophoresis. Lambda viral DNA was partially digested even in the Fumonisin B1 10 µg and the level of its fragmentation was dependent on Fumonisin B1 amount up to 30 µg per assay.

Key Words : Fumonisin B1, P1 virus, Lambda virus, Viral DNA fragmentation

I. 서 론

비교적 최근에 발견된 진균독소 중의 하나로서 *Fusarium moniliforme* 으로부터 생성되는 2 차 대사산물인 Fumonisin B1(Scott, 1993)은 남아프리카 공화국의 Gelderblom(1988, 1994) 등에 의하여 말에서 Leucoencephalomalacia(LEM) 또는 실험쥐에서 Hepatocarcinogen이라는 보고가 있는 후 많은 연구가 진행되고 있다.

Fumonisin 계열의 진균독소 중 Fumonisin B1이 가장 독성을 뚜렷하게 나타내고 있으며, 환경에서 비교적 안정성을 가지는 구조로 되어 있고, Sphingolipid와 비슷한 분자구조로 되어 있다. 따라서 eucaryotic cell에서의 Sphingolipid 대사를 저해한다는 보고가 있다(Schroeder *et al.* 1994, Yoo, 1995). Fumonisin B1은 Sphingosine N-acyltransferase와 Sphingolipid *de novo* 생합성을 저해한다고 한다(Merill *et al.*, 1993). 또한 실험 쥐에서는 Fumonisin B1이 쥐의 뇌의 norepinephrine과 dopamine의 불균형을 초래한다는 보고도 있다(Porter *et al.*, 1993). Fumonisin B1의 동물세포에

대한 실험의 결과로서 유추할 수 있는 cancer causing agent, tumor promotor 또는 enzyme inhibitor로서의 작용을 bacterial virus를 사용하여 분자수준의 연구를 하게 되었다. 따라서 본 연구는 진핵세포에서보다는 원핵세포에서 세균 바이러스 증식에 대한 Fumonisin B1의 영향을 연구하였고, carcinogen이나 mutation causing agent로서 또는 tumor promotor로서의 가능성을 확인하기 위하여 *in vitro*에서 viral DNA에 대한 Fumonisin B1의 영향을 실험하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세균균주 및 바이러스

Lambda 바이러스, P1 바이러스 그리고 이들의 숙주 세포인 *E. coli* CSH 142, *E. coli* CSH 110은 Cold Spring Harbor Laboratory에서 구입하여 사용하였다. 세균 바이러스로서는 NK 1316(Lambda phage lysate from *E. coli* CSH 110), CSH 127(P1 virus lysate from *E. coli* CSH 142)들이 사용되었고, 이들 바이러스의 숙

주로서 *E. coli* CSH 110(*E. coli* host strain for lambda virus), *E. coli* CSH 142(*E. coli* host strain for P1 virus)가 이용되었으며, Bacteriophage lambda lysogen으로서 *E. coli* CSH 44가 사용되었다.

2. 바이러스 Lysate 제조

Cold Spring Harbor Laboratory에서 구입한 NK 1316 Lambda 바이러스와 CSH 127 P1 바이러스는 희석하여 R-top agar(Miller, 1992)에서 plaque를 형성시킨 후 이 plaque에 있는 바이러스를 액상배지의 숙주세포에서 증식시킴으로서 바이러스 lysate를 얻었다. Lambda 바이러스는 10^8 pfu/ml가 되도록 희석한 후 0.1 ml를 취하여 *E. coli* CSH110 (5×10^8 cell/ml) 0.2 ml 및 0.1 M $MgSO_4$ 50 μ l와 37°C에서 20분간 preincubation 하였다. 여기에 R-top agar 3 ml를 첨가하고 R-plate에 부은 후 37°C에서 8시간 배양하였다. Top-agar를 긁어낸 후 LB배지(Miller, 1992) 1 ml와 섞고 chloroform 200 μ l를 처리하고 진탕한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. P1 바이러스는 *E. coli* CSH 142를 host로 사용하였고, host cell 1 ml에 10^8 pfu/ml되는 P1 바이러스 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 20분간 preincubation한 후 Lambda 바이러스 lysate 제조와 같은 방법으로 실시하였다.

3. 바이러스에 대한 Fumonisin B1 처리

바이러스 lysate에 Fumonisin B1을 여러 농도(0~400 μ g/ml)를 처리한 후, 각 시간별로 37°C에서 incubation 하였다. 처리된 바이러스 lysate를 바이러스-숙주세포의 흡착, 감염을 위하여 20분간 37°C에서 host cell과 preincubation한 후 45°C의 top agar 3 ml와 혼합한 후 R-plate에 붓고 37°C에서 8시간 배양하여 plaque-forming unit를 측정하였다.

4. Lambda 바이러스 DNA에 Fumonisin B1 처리

Lambda lysogen *E. coli* CSH44로부터 Miller(1992)의 방법에 따라 Lambda 바이러스 DNA를 분리한 후, 분광광도 측정과 agarose gel 전기 영동으로 DNA의 농도와 순도를 확인하였다. Lambda DNA(final concentration 0.08 μ g/assay)에 여러 농도의 Fumonisin B1을 처리하고 3시간동안 37°C에서 반응시켜 0.8% agarose gel 전기영동을 하였다. Gel은 30분 동안 ethidium bromide로 염색하고, 1시간 동안 탈색한 후 사진 촬영하였다.

II. 결과 및 고찰

세균 바이러스 P1과 Lambda에 대한 Fumonisin B1의 영향을 실험하고자 여러 농도의 Fumonisin B1을 처리하였을 때 이들 바이러스의 plaque-forming 능력의 변화를 관찰하였다. P1 바이러스에 대한 Fumonisin B1의 저해는 농도 의존적으로 이루어졌으며 400 μ g/ml Fumonisin에서는 plaque 형성능력이 거의 10배 이상 저하되었다(Fig. 1).

Fumonisin 400 μ g/ml 이상에서도 P1 바이러스의 plaque 형성능력은 계속적으로 농도에 의존하여 저해되는 것으로 보아 P1 바이러스에 Fumonisin B1이 직접 영향을 줌으로서 숙주세포 내에서의 이 바이러스의 증식에 영향을 받는 것으로 판단된다. 한편 Fig. 1에서 최초의 의미 있는 저해를 나타내는 농도인 200 μ g/ml Fumonisin B1을 P1바이러스와 각기 다른 반응 시간에 대하여 실험하였다(Fig. 2).

P1 바이러스와 Fumonisin B1의 반응시간이 길수록 숙주세포에서의 P1 바이러스 증식은 억제되고 있음을 알 수 있다. 따라서 P1바이러스에 대한 Fumonisin B1의 영향은 P1 바이러스 plaque 형성능력을 측정하였던 바 Fumonisin B1에 의하여 현저히 저해되었다.

다른 한편 Lambda바이러스에 대한 Fumonisin B1의 직접적인 영향도 실험하였으며, P1 바이러스보다는 약 10배의 낮은 농도에서도 저해되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). Fig. 3에서 Fumonisin B1에 의하여 농도 의존적으로 Lambda 바이러스 plaque 형성능력이 감소

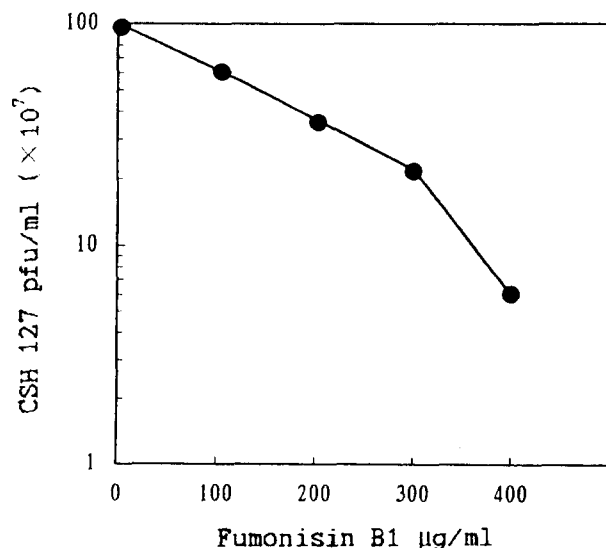


Fig. 1. Inhibition of P1 virus plaque forming activity by Fumonisin B1. Plaque assay of P1 virus was performed as appeared in Material and Method.

되고 있음을 알 수 있었고, Fumonisin B1은 P1 바이러스보다는 Lambda 바이러스에서 바이러스 증식을 더욱 억제하는 것으로 판단된다.

Fumonisin B1 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 Lambda 바이러스와의 반응시간은 0-120분까지 여러 가지 실험을 하였고, 60분 후에 Fumonisin B1의 영향이 나타나고 최대 저해는 90분에 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 4). 반응 시간에 따른 Lambda 바이러스의 저해가 증가되는 것을 관찰할 수 있으므로, Fumonisin B1은 Lambda 바이러스의 plaque 형성능력을 감소시킨다고 할 수 있다.

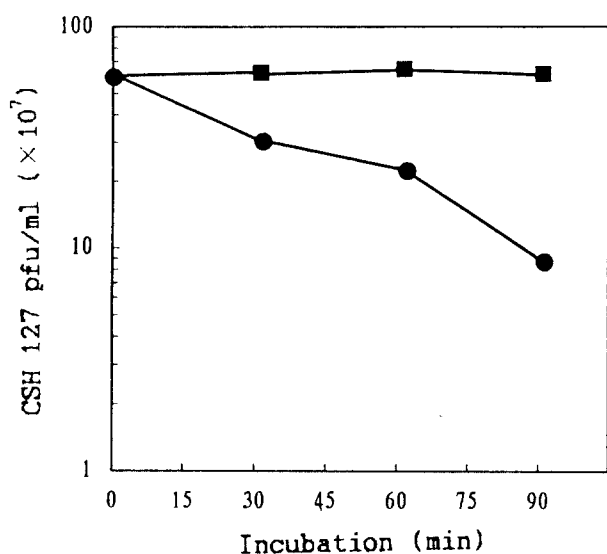


Fig. 2. Effect of Fumonisin B1 reaction time on the P1 virus plaque forming activity. control (■), Fumonisin B1 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (●).

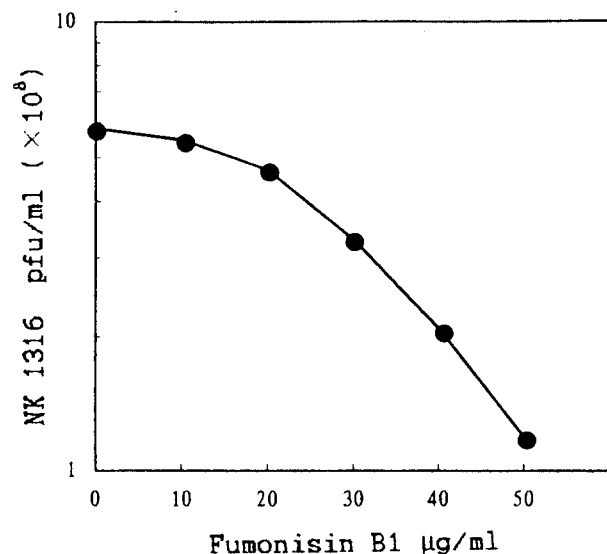


Fig. 3. Inhibition of Lambda virus plaque forming activity by Fumonisin B1 in different concentration. Plaque assay was carried out as described in Material and Method.

특히 Fumonisin B1은 P1 바이러스보다는 Lambda 바이러스에 더 효과적인 결과를 나타냄으로서 Lambda 바이러스에 대하여 특이성이 있다고 생각된다. 따라서 이러한 Lambda 바이러스에 대한 Fumonisin B1의 영향을 좀 더 분자수준으로 접근, 연구하고자 하여 *E. coli* CSH44 Lambda lysogen으로부터 Lambda DNA를 추출하여 이 DNA에 대한 Fumonisin B1의 *in vitro* 반응을 실험하게 되었다. Fumonisin B1은 그 분자구조에서 여러 개의 -OH, -NH₂ 또는 -CH₃ group이 존재하므로 이들 group이 DNA base의 functional group과 반응하므로서 DNA에 damage를 주어 Lambda DNA를 fragmentation시킬 수 있을 것이므로 Lambda DNA(0.08 $\mu\text{g}/\text{assay}$)에 여러 농도의 Fumonisin B1을 반응시켜 본 결과 농도 의존적인 DNA fragmentation이 관찰되었다(Fig. 5).

Fumonisin B1 10 μg (lane 3)에서부터 30 μg (lane 7)까지 농도 의존적이었으나 30 μg 이상의 농도에서는 더 이상의 fragmentation이 관찰되지 않는 것(data not shown)으로 보아 functional saturation이 된 것으로 생각되고, 특히 *in vitro*에서의 Fumonisin B1에 의한 Lambda DNA fragmentation은 *in vivo*에서의 mutagenicity(Lee and Kim, 1994) 나아가서는 carcinogenicity와도 correlation이 있을 것으로 생각된다. 또한 Fumonisin B1의 세균 바이러스의 증식저해의 원인 중 하나로서 Lambda 바이러스 DNA의 *in vitro* 실험 결과에서와 같이 Fumonisin B1의 DNA손상에서 그 이유를 유추할 수 있을 것이라고 생각된다. 한편, 이러한 *in*

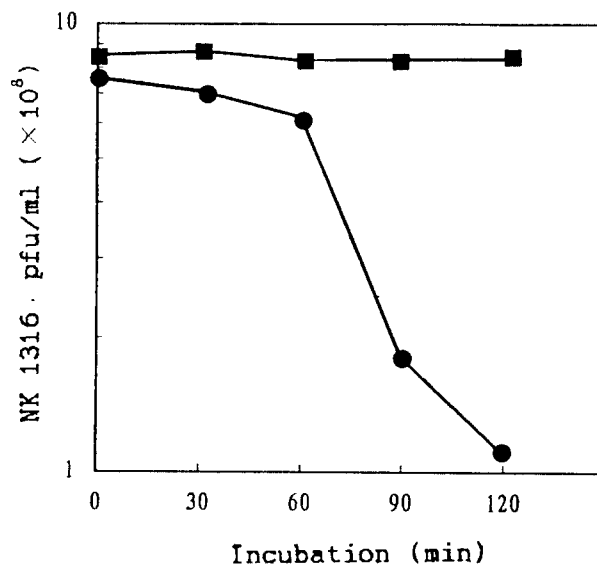


Fig. 4. Effect of Fumonisin B1 reaction time on Lambda virus plaque forming activity. control (■), Fumonisin B1 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (●).

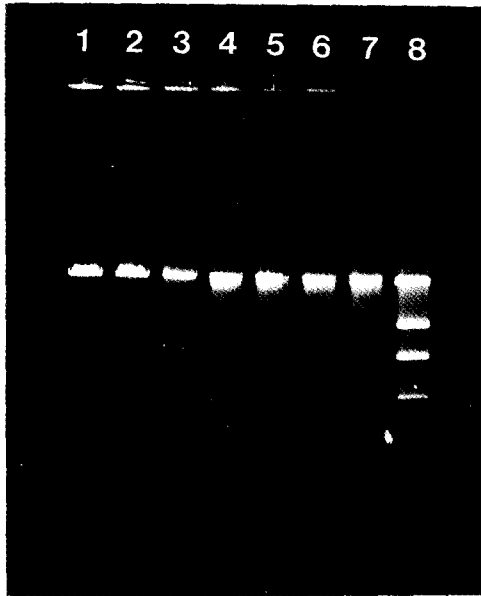


Fig. 5. Lambda DNA damaging pattern by fumonisin B1 *in vitro*. The λ DNA was 0.08 μ g per assay and different amount of Fumonisin B1 was applied (lane 2-lane 7) for 3 hrs. Total reaction volume was 20 μ l. Agarose gel electrophoresis was performed in 0.8% gel at 100 volt, 60 mA for 2 hrs. λ DNA control 0.08 μ g (lane 1), Fumonisin B1 5 μ g (lane 2), 10 μ g (lane 3), 15 μ g (lane 4), 20 μ g (lane 5), 25 μ g (lane 6), 30 μ g (lane 7), λ DNA Hind III digest (lane 8).

*in vitro*에서의 DNA에 대한 작용은 *in vivo* cytotoxicity나 mutagenicity와 관련하여 mutagen으로서의 Fumonisin B1의 가능성을 의미한다고도 볼 수 있다. 따라서 이러한 Lambda DNA damage의 작용 mechanism을 분자수준에서 파악하는 것도 앞으로의 연구의 한 과제라고 할 수 있을 것이다.

감사의 글

이논문은 1994년도 한림대학교 지원 학술연구조성

비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Gelderblom, W.C.A. *et al.* (1994): Fumonisin B1 dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. *Carcinogenesis*, **15**(2), 209-214.
- Gelderblom, W.C.A. *et al.* (1988): Fumonisin B1-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1806-1811.
- Lee, K.S. (1994): *Fusarium moniliforme* 대사산물 Fumonisin B1의 세포 및 유전독성. *Korean J. Toxicol.*, **10**(2), 341-349.
- Merrill, A.H. *et al.* (1993): Fumonisin B1 Inhibits Sphingosine (Sphinganine) *N*-Acyltransferase and *de Novo* Sphingolipid Biosynthesis in Cultured Neurons *in Situ*. *J. Biol. Chem.*, **268**(36), 27299-27306.
- Miller, J.H. *et al.* (1992): A Short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Lab., N.Y.
- Porter, J.K. *et al.* (1993): Neurotransmitters in Rats Fed Fumonisin B1. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **202**, 360-364.
- Schroeder, J.J. *et al.* (1994): Disruption of Sphingolipid Metabolism and Stimulation of DNA Synthesis by Fumonisin B₁. *J. Biol. Chem.*, **269**(5), 3475-3481.
- Scott, P.M. (1993): Fumonisin B₁. *International J. Food Microbiol.*, **18**, 257-270.
- Yoo, H.S. (1995): Disruption of Sphingolipid Metabolism as a Potential Mechanism of Fumonisin Inhibition of Cell Growth in LLC-PK₁ Cells. *Korean J. Toxicol.*, **11**(1), 1-8.