

느타리버섯 갈반병 원인독소 Tolaasin의 용혈특성

조광현 · 박경선 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

초 록 : 재배버섯에 갈색의 침물성 반점으로 나타나는 갈반병(brown blotch disease)은 *Pseudomonas tolaasii*의 펩티드성 독소인 tolaasin에 의해서 유발된다. Tolaasin은 18개의 아미노산으로 구성된 분자량 1,985 Da의 lipodepsipeptide이며, 생체막에 pore를 형성하여 버섯세포 뿐만 아니라 세균, 곰팡이, 식물 및 동물세포를 파괴한다. Tolaasin의 활성은 용혈성 독소의 활성측정에 널리 쓰이는 적혈구를 이용하여 독소의 용혈활성을 측정함으로써 이루어졌다. Tolaasin의 용혈활성은 적혈구의 파괴시 방출되는 헤모글로빈 양을 420 nm에서의 흡광도 증가로 측정하거나, 잔존하는 적혈구에 의한 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다. *P. tolaasii* 배양액의 용혈활성은 배양중 정체가 초기에 증가하기 시작하여 정체가 후기에서 최대로 나타났다. Tolaasin의 용혈활성은 개와 쥐의 적혈구에서 높게 나타났으며, 상대적으로 토끼와 닭의 적혈구에서는 낮았다. Tolaasin의 용혈활성에 미치는 양이온들의 효과에서 Zn^{2+} 뿐만 아니라, Cd^{2+} 과 La^{3+} 이 tolaasin의 용혈활성을 저해하였으며, 음이온의 경우 CO_3^{2-} 가 용혈활성을 지연시켰고, 반면 PO_4^{2-} 의 경우 용혈활성을 증가시켰다. (2000년 7월 6일 접수, 2000년 8월 5일 수리)

서 론

느타리버섯의 재배는 여러 가지 장점과 높은 수익성에도 불구하고 농가에서는 매우 조심스럽게 이루어지고 있다. 느타리버섯 재배시 가장 큰 어려움 들은 푸른곰팡이병과 세균성 갈색무늬병으로 알려진 갈반병(褐斑病)의 발병이며, 이중 특히 갈반병은 발병시 그 피해가 매우 심각하다.^{1,2)} 갈반병은 버섯의 자실체 형성 초기에 *Pseudomonas tolaasii* 세균의 감염과 이 균에 의해 생성되는 독소 tolaasin의 작용에 의하여 발생한다. Tolaasin은 아미노산 18개로 구성된 분자량 1,985 Da의 lipodepsipeptide로, N-말단이 β -hydroxyoctanoic acid와 acylation되어있으며, C-말단의 lysine은 14번째의 threonine과 lactone을 형성하여 환상결합을 하고있는 복잡한 구조의 2차 대사산물임이 밝혀졌다.³⁾ 감염된 버섯에서 tolaasin의 자세한 작용기작은 밝혀지지 않았으나, tolaasin의 세포막 유입과 이에 따른 세포막에 pore 형성, 세포내외의 삼투압 교란의 결과로 버섯 세포가 파괴되며 결국 버섯조직의 괴사를 유발함이 알려졌다.^{4,5)}

갈반병은 버섯조직 전체를 진한 갈색으로 변화시키고, 성장을 중지시키거나, 버섯의 갓조직에 갈색 반점을 형성하여 상품성을 없애 버리는 등 치명적인 경제적 손실을 유발한다. 또한 빠른 속도로 전파되어 재배상 또는 재배농가, 나아가 재배단지 전체로 번지는 특성을 갖고 있다. 갈반병의 예방은 철저한 지하수의 살균과 재배사의 훈증소독 등으로 이루어지고 있으며,^{6,7)} 생물학적 방제로서 길항균 등이 사용되기도 하였다.^{8,9)} 갈반병의 대책으로 일단 발병시에 항생제¹⁰⁾ 등이 사용될 수 있으나, 버섯은 식품으로서 방제를 위한 약제의 사용이 용이하지 않다.

국내에서의 느타리버섯 갈반병에 관한 연구는 갈반병에 의한 경제적 손실에 비하여 미흡한 실정이다. 그간에 수행된 갈반병 원인균 분리, 동정 및 특성연구에서 Shin 등¹¹⁾은 느타리와 팽이버섯에서 병원균으로 *P. agarici*를 분리하였고, 흰색침강선 형성검정법(white line test), 버섯조직 함몰검정법 등을 이용하여 병원균으로 *P. tolaasii*와 *P. agarici*를 분리하였으며, 전자가 병원성의 주 원인균임을 확인하였다.^{11,12,13)} 최근 국내외에서는 병원균의 세균학적, 병리학적 특성들에 더하여 병원균이나 병원독소 tolaasin과 관련된 유전자의 연구가 수행되고 있다.^{14,15)}

Tolaasin의 독성평가에는 일반적으로 양송이버섯을 이용한 버섯조직 함몰검정법이 이용되나, 이 방법은 12~24 시간이 소요되고, 독성의 정량적인 평가도 어렵다. 그러나, 적혈구를 이용한 30분 이내의 정량적 독성판정법인 용혈활성 검정법은 버섯조직의 함몰검정법과 정성적, 정량적으로 유의성이 있어 tolaasin의 독성 검정법으로 이용될 수 있다.¹³⁾ 본 연구에서는 갈반병 피해의 경감방안을 모색하기 위한 기초연구로서 갈반병 원인독소인 tolaasin의 용혈작용 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

*Pseudomonas tolaasii*의 분리 및 균주보관

갈반병에 감염된 느타리버섯의 갓 조직 약 1 cm² 정도를 멸균된 칼로 잘라내어, 10 ml의 멸균수에 넣고 약 20분간 마쇄한 후, 이 현탁액을 멸균 증류수를 이용하여 10¹⁰배까지 희석시켰다. 희석액 약 200 μ l를 *Pseudomonas* Agar F(PAF 배지; Bacto-tryptone 10 g, Bacto-proteose peptone 10 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄ 1.5 g, glycerol 10 ml, agar 15 g per liter) 평판 배지 위에 도말하고, 25°C에서 2~3일간 배양하여 세균을 얻었다. 배양된 여러 가지 세균들 중에서 *P. tolaasii*의 분리는 흰색침강선 형성검정법과 버섯조직 함몰검정법을 통하여 이루어졌다.¹⁴⁾ 이와 같이 분리한 *P. tolaasii* 6264는 nutrient broth

찾는말 : tolaasin, 용혈작용, pore-forming toxin, 갈반병, 느타리버섯

*연락처 : Tel : 82-43-261-2560; Fax : 82-43-271-5921
E-mail: ykkim10@cbucc.chungbuk.ac.kr

80%와 glycerol 20%가 함유된 세균저장배지 1.5 ml에 현탁시켜 -70°C에서 보관하였다.

적혈구분리

실험동물로부터 채혈한 혈액을 멸균된 glass bead를 포함한 삼각 플라스크에 옮긴 후, 약 30분간 교반하여 fibrin을 제거하였다. 이와 같이 처리한 혈액을 4°C에서 보관하며, 필요시 HBS 완충액(HEPES-buffered saline; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, pH 7.4)으로 10배 희석하여 사용하였다. 채취 혈구는 약 3주간 실험에 사용할 수 있으며, 필요시 HBS 완충액에서 원심분리하여 파괴된 적혈구 세포들을 세척하였다.

Tolaasin의 분리 및 농축

PAF 액체배지에서 25°C, 18시간동안 정체기에 도달하도록 진탕 배양한 세균을 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 제거하고 배양 여액을 얻었다. 배양 여액에 30%의 ammonium sulfate를 가하고, 4°C에서 1시간동안 냉각 배양한 후, SW 28 rotor(Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 20,000 rpm에서 1시간 동안 초원심분리를 하여 침전을 얻었다. 침전중의 tolaasin을 HBS 완충액으로 녹여낸 다음, HBS 완충액에서 투석하였고, glass-Teflon homogenizer로 균질화 한 후, 액체질소에서 순간 냉동시켜 사용 전까지 -70°C의 deep freezer에 보관하였다.

용혈활성 측정

Rainey 등¹⁶⁾은 말에서 채취한 적혈구를 이용하여 순수분리한 tolaasin의 용혈활성을 보였으며, 본 논문에서는 이들의 방법을 이용하여 쥐의 적혈구에 대한 tolaasin의 용혈활성을 측정하였다. 용혈활성 측정에 사용된 적혈구는 사용직전에 멸균한 HBS 완충액으로 10배 희석하였고, 이것을 최종 반응용액 HBS에 10%가 되도록 첨가하였다. Tolaasin은 실험에 따라 배양여액 혹은 농축액이 사용되었고, 배양 여액의 경우 최종 농도가 전체 반응액의 10%가 되도록 첨가하였고, 농축된 tolaasin의 경우는 반응액의 0.5%가 되도록 첨가하였다. 용혈활성은 준비된 최종 반응용액을 37°C의 항온수조에서 시간별로 배양한 후, spectrophotometer(U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도 감소로서 평가하였다.

결 과

*P. tolaasii*의 생장에 따른 tolaasin 생성

본 실험에서는 독성 병원물질 tolaasin을 얻기 위하여 사용한 *P. tolaasii* 6264 균주를 갈반병에 감염된 버섯조직에서 분리하였으며, 생리생화학적인 대사활성, 영양요구성 및 기타 균주 특성들과 *Pseudomonas reactans*와의 흰색침강선 형성반응, 양송이 버섯(*Agaricus bisporus*)과 느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*)에서의 버섯 합물검정 등을 통하여 기존에 보고된 병원성 *P. tolaasii* 균주와 일치함을 확인하였다.¹⁷⁾

*P. tolaasii*의 생장에 따른 독성 검증을 위하여 *P. tolaasii*를

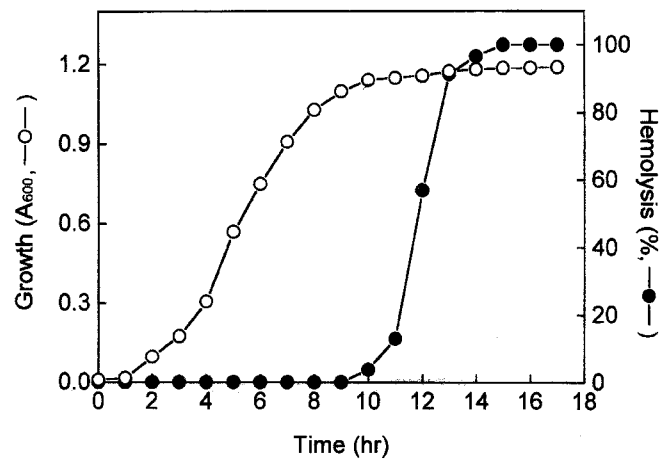


Fig. 1. Relationship between the growth of *Pseudomonas tolaasii* and the production of tolaasin. Bacterial growth was measured by observing the increase in absorbance at 600 nm (○). The hemolytic activity of culture supernatant was measured at the indicated time (●). Culture supernatant of *P. tolaasii* was added to red blood cells and incubated for 30 min. Hemolysis was measured by observing the decrease in absorbance at 600 nm.

PAF 액체배지에 배양하면서 생장을 600 nm에서의 흡광도 증가로 측정하였고, 배양 시간에 따른 tolaasin 분비 및 이에 따른 독성증가는 배양 여액을 적혈구에 처리하여 용혈활성을 측정함으로써 확인하였다. *P. tolaasii* 배양 여액의 용혈활성은 세균의 정체기 초기에서 증가하기 시작하여, 정체기 2~3시간 후에 급격히 증가하였다(Fig. 1). 최대의 용혈활성은 정체기 5~6시간 이후에 나타났으며, 이때 5% 배양 여액인 약 20배 희석액도 100%의 용혈활성을 보였다. 배양에 따라 사멸기에서도 tolaasin의 용혈활성은 감소하지 않았다(미제시 자료).

여러 가지 적혈구의 tolaasin 감수성

생체막에 pore를 형성하는 펩티도성 독소들의 검증에는 적혈구를 이용한 용혈활성 검정법이 널리 이용된다.^{4,16)} 본 연구에서는 tolaasin의 용혈활성 검정법을 확립하기 위하여 다양한 동물들에서 적혈구를 채취하였고, 이들에 대한 tolaasin의 용혈활성 특성을 조사함으로써 각 적혈구의 민감성을 측정하였다.

적혈구의 tolaasin에 대한 용혈활성 감수성은 tolaasin과 적혈구를 함께 배양하면서 시간에 따라 적혈구의 파괴로 유출되는 헤모글로빈의 양을 측정하여 결정하였다(Fig. 2). 개와 쥐, 토끼, 닭에서 채혈된 각각의 혈액에서 적혈구를 분리하여, 최종 반응액에 10%가 되도록 첨가하였다. 이 반응액은 37°C의 항온수조에서 30분 동안 배양한 다음, 잔존하는 적혈구들을 3,000 rpm에서 원심분리하여 제거한 후, 반응액의 헤모글로빈 유출량을 420 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 초기에는 거의 모든 반응용액들의 흡광도가 낮았으나, 시간이 지남에 따라 적혈구로부터 유출되는 헤모글로빈의 양이 증가하여 흡광도의 증가를 보였다. 개와 쥐의 적혈구에서 흡광도는 각각 10분, 30분 후에 최대로 나타나 tolaasin에 대한 감수성이 크게 나타났으나, 닭과 토끼의 경우에는 용혈활성이 약 50분 후에 최대로 나타났다. 이상의 결과로 tolaasin에 대한 용혈활성의 감수성 정도는 개>쥐>토끼>닭의 적혈구 순서임을 확인하였다.

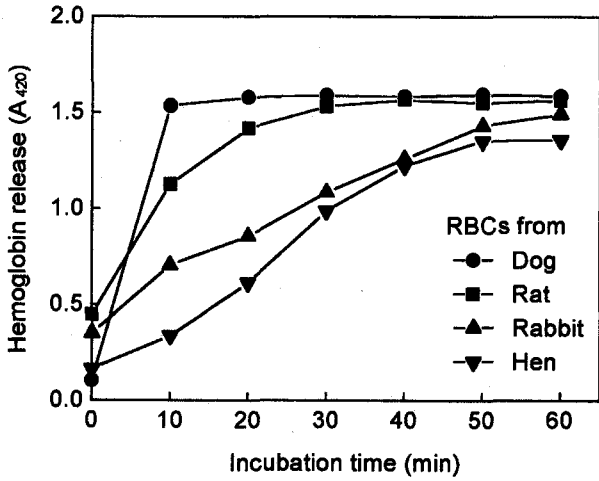


Fig. 2. Susceptibilities of various erythrocytes to tolaasin. Erythrocytes obtained from four different animals were incubated with tolaasin-containing culture medium and hemolysis was measured by the time-dependent release of hemoglobin from the erythrocytes. The release of hemoglobin was determined by measuring the increase in absorbance at 420 nm.

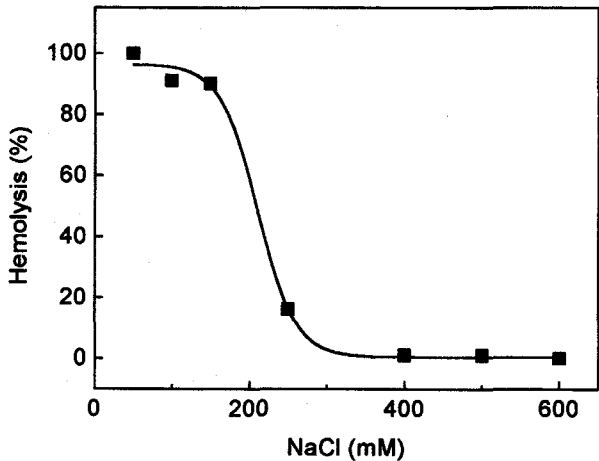


Fig. 3. Osmotic suppression of tolaasin-induced hemolysis by high salt solution. Hemolysis was measured in HBS buffer added with indicated concentrations of NaCl.

삼투압 변화에 따른 용혈효과

Tolaasin에 의한 용혈활성은 세포막에 pore 형성과 pore를 통한 세포의 삼투압 교란, 이에 따른 세포의 파괴로 나타날 것이라는 제안¹⁶⁾을 확인하기 위하여 반응용액의 NaCl 양을 높여가면서 tolaasin에 의한 용혈활성을 측정하였다. 만약 tolaasin의 작용 기작이 삼투압 교란에 기인한다면 tolaasin에 의한 용혈활성은 오직 저장액에서 관측될 것이며, 고장액에서는 tolaasin에 의한 pore 형성시에도 용혈현상이 관측되지 않을 것이다. Fig. 3에서는 HBS 원충액에 NaCl을 150 mM 이하로 첨가하였을 때, 90% 이상의 용혈활성을 나타내지만, 200 mM 이상의 NaCl을 첨가하였을 때는 용혈활성이 감소하여, 용혈현상이 원충액의 염농도에 의존적임을 보여준다. 이러한 결과는 저장액에서 tolaasin의 세포막 pore형성과 이에 따른 세포의 용적증가, 그리고 세포의 파괴로 나타나는 기작을 설명하는 것이다.

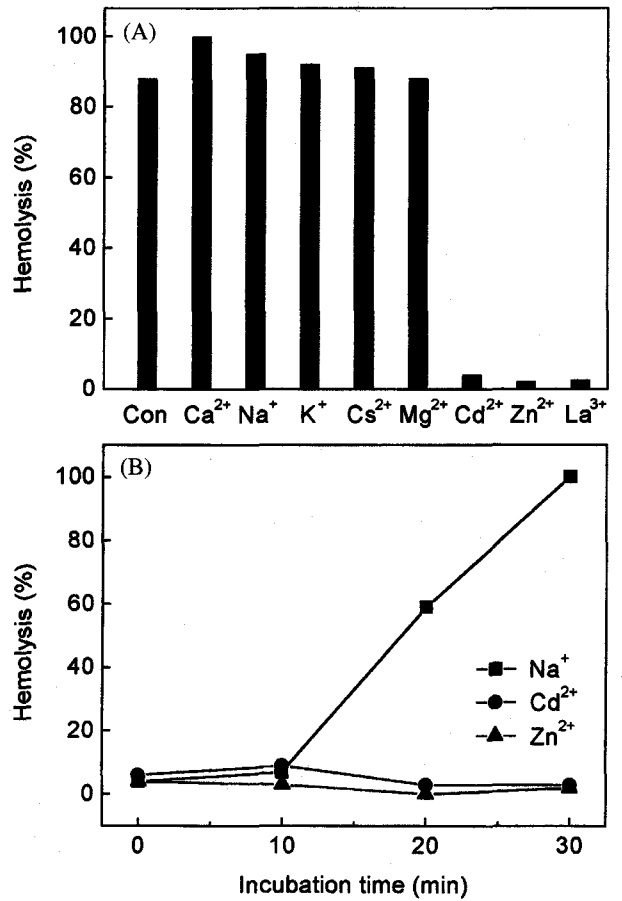


Fig. 4. Effects of various cations on the tolaasin-induced hemolysis. (A) Each cation of 100 mM was added in HBS buffer and hemolytic activity was measured. (B) Time-dependence of tolaasin-induced hemolysis in the presence of indicated cations.

Tolaasin의 용혈활성에 대한 양이온 효과

Tolaasin의 작용특성을 구명하는 기본적인 조사중의 하나로서 용혈활성에 대한 K⁺과 Mg²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ 등의 양이온 효과를 측정하였다(Fig. 4). Tolaasin의 용혈활성은 600 nm에서의 적혈구 파괴에 따른 흡광도 감소로 측정하였으며, 150 mM NaCl을 포함하는 대조구에서는 대략 90% 정도의 용혈활성을 보였다. HBS 원충액에 다양한 양이온을 100 mM의 농도로 첨가하여 측정된 tolaasin의 용혈활성은 Ca²⁺과 K⁺, Cs⁺, Mg²⁺의 경우에는 대조구와 유사한 용혈활성을 관측하였지만, Cd²⁺이나 Zn²⁺를 포함하는 반응 용액에서는 용혈활성이 거의 완전히 저해되어 5% 미만으로 나타났다. 이것은 Rainey 등¹⁶⁾의 보고와 일치하는 결과로서 Zn²⁺가 tolaasin의 용혈작용에 대한 저해제임을 보여주며, 또한 Cd²⁺도 tolaasin의 용혈활성을 저해함을 보여준다(Fig. 4A).

Cd²⁺과 Zn²⁺에 의한 tolaasin의 용혈활성 저해를 조사하기 위하여 시간에 따른 용혈활성을 대조구인 Na⁺과 비교하여 조사하였다(Fig. 4B). Tolaasin에 의한 용혈활성은 Na⁺을 첨가한 용액에서 시간에 따라 증가하여 약 30분 후에 최대로 나타났으나, Cd²⁺이나 Zn²⁺를 첨가한 조건에서는 시간경과에 따른 용혈활성은 전혀 관측되지 않았다.

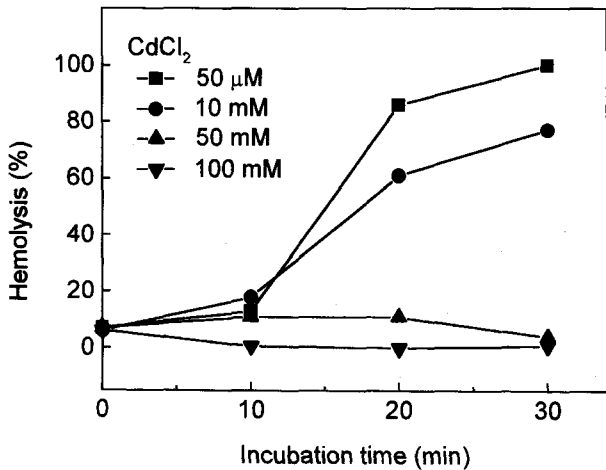


Fig. 5. Dose-dependent effect of Cd²⁺ on the tolaasin-induced hemolysis. RBCs obtained from rat were incubated with tolaasin in the presence of Cd²⁺. The hemolytic activity of tolaasin was measured after 30 min incubation.

Cd²⁺의 농도에 따른 용혈활성 저해를 측정하기 위하여 반응 완충액의 Cd²⁺농도를 변화시키면서 시간에 따른 용혈활성 변화를 측정하였다(Fig. 5). Cd²⁺의 농도가 증가할수록 tolaasin의 용혈활성은 감소하는데, 반응 완충액의 Cd²⁺농도가 50 μM일 때는 용혈활성에 영향을 주지 않았으나, 50 mM 이상의 Cd²⁺은 tolaasin의 용혈활성을 거의 완전히 저해하였다. Cd²⁺이나 Zn²⁺에 의한 tolaasin의 용혈활성 저해기작은 자세히 밝혀지지 않았으나, 이들이 tolaasin에 의해 생성된 세포막 pore의 활성저해와 관련이 있을 것으로 생각된다.⁴⁾

음이온 효과

여러 가지 음이온들이 tolaasin에 의한 용혈활성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 동일한 농도의 Na⁺ 이온을 갖는 조건에서 반응 용액의 각 음이온 농도를 100 mM로 조절하여 용혈활성을 시간별로 조사하였다(Fig. 6). Tolaasin의 용혈활성은 HCO₃⁻와 CO₃²⁻에 의해 지연되어 대조구에 비하여 약 10분 이상 용혈현상이 늦어졌으나, 시간의 경과에 따라 용혈효과는 80% 이상 관측되었다. 반면, H₂PO₄⁻에 의해서는 용혈현상이 빠르게 나타나 배양 직후부터 용혈효과가 관측되었다. 그리고, NO₃⁻의 경우는 Cl와 마찬가지로 대조구와 유사한 결과를 보였다.

고찰

*P. tolaasii*는 버섯재배시 세균성 갈반병을 유발하는 원인세균으로 독소물질인 tolaasin을 분비하여 병원성을 나타낸다. *P. tolaasii*의 동정에는 고행배지에서 비병원성 세균인 *P. reactans*와 대치배양시 나타나는 흰색 침강선 형성 여부를 확인하는 white line test가 주로 이용되고 있으나, 최근에 Kim 등¹²⁾의 보고에 의하면 *P. tolaasii*에는 *P. reactans*와의 대치배양에서 흰색 침강선을 형성하는 균과 형성하지 않는 균이 존재함이 밝혀졌다. 따라서 본 실험에서 병원균으로 사용한 *P. tolaasii* 6264 균주는 흰색 침강선 검정법과 영양요구성, 버섯조식 함몰검정법(rapid pitting test)등을 이용하여 동정하였으나 병원균 검색

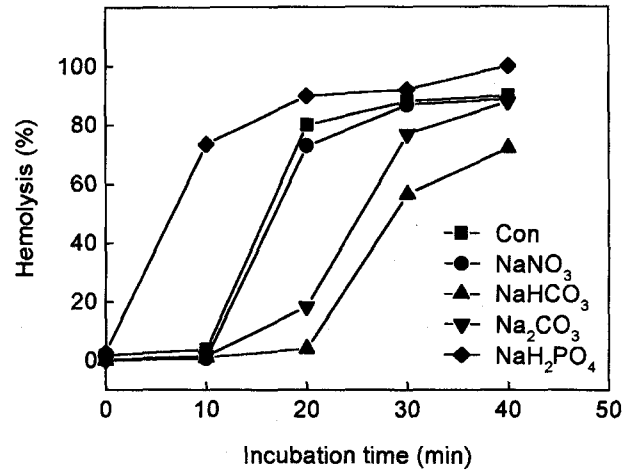


Fig. 6. Effects of various anions on the tolaasin-induced hemolysis. Time course of hemolysis was measured in the presence of each anion. The concentration of each anion (sodium salt) was 100 mM.

에 쓰이는 이러한 다양한 검정법은 하루 이상의 시간이 요구되며, 병원균의 독성 평가에도 효율적이지 못하다는 단점이 있다. 본 연구에서는 pore 형성 독소의 독성평가에 널리 쓰이는 용혈활성 검정법을 이용하여 tolaasin의 용혈독성 특성을 조사하였고, 이러한 용혈활성 검정은 30분 이내에 판정이 가능하여 신속한 독성검정에 성공적으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

Rainey 등¹⁶⁾은 *P. tolaasii*에 의한 tolaasin의 생성은 대수기 증가까지는 일어나지 않으나, 대수기 후기부터 정지기 후기의 전체에 걸쳐서 증가한다고 보고하였으며, 본 실험에서도 유사한 결과를 얻었다(Fig. 1). 그러나 병원균 성장에 따른 tolaasin 활성의 증가는 접종된 균의 상태와 배지 및 배양 조건 등 여러 가지의 요인에 의해 영향을 받는다는 것을 확인하였다. 본 실험에서는 가능한 활성이 좋은 상태의 균을 이용하여 tolaasin을 생산하였고, tolaasin 첨가 후 30분 이내에 용혈활성을 확인할 수 있었다.

Tolaasin의 용혈활성이 적혈구의 종류에 따라 감수성에 차이가 나는 이유는 적혈구의 세포막을 구성하고 있는 지질이나 단백질의 구성 및 조성에서 차이가 tolaasin의 막결합이나 친화력에 영향을 주기 때문이다(Fig. 2). *Gardnerella vaginalis*에 의해 생산되는 cytolyisin과 *Fusobacterium necrophorum*의 hemolysin과 같은 독소들의 용혈활성도 적혈구의 종류에 따라서 다르게 나타나는 특성이 있음이 알려져있다.¹⁸⁾ Cytolyisin의 경우는 지질막에 존재하는 cholesterol이나 막표면의 음전하가 독소의 지질막 결합에 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다. 특히 cholesterol은 cytolyisin의 용혈활성을 저해하는 효과를 가지고 있어, 사람의 적혈구의 경우 PS/cholesterol이 1:1의 비율로 존재할 때 cytolyisin의 용혈활성은 거의 저해된다고 알려져있다.¹⁹⁾ *Aeromonas* 속의 균주에 의해서 생성되는 aerolysin에 의한 용혈현상은 쥐의 적혈구가 다른 포유동물의 적혈구보다 더 민감하였는데, 이 경우는 쥐의 적혈구가 다른 종류의 적혈구보다 aerolysin에 친화력이 높은 단백질 수용체를 포함하고 있기 때문인 것으로 확인되었다.²⁰⁾ 이러한 보고들을 고려할 때, tolaasin에 의한 용혈활성이 개나 쥐의 적혈구에서 높게 나타나는 자세

한 기작은 알 수 없으나, 이들 적혈구에 특이한 결합단백질 또는 지질조성 등이 토끼나 닭의 적혈구와 다를 가능성을 보여 준다.

세포막에 pore를 형성하는 독소들에 의한 세포의 손상은 세포막을 경계로 한 전기화학적 기울기의 붕괴에 의해 유발되며, tolaasin에 의한 전기화학적 기울기의 붕괴는 세포막 자체의 파괴보다는 이온채널 형성을 통한 염류의 수동확산에 원인이 있다. Fig. 3에서 tolaasin은 HBS에 가해진 염농도가 150 mM 이하로 낮을 때는 용혈활성을 보이나, 염농도가 200 mM 이상으로 높아지면 용혈활성이 억제됨을 보인다. 이러한 결과는 tolaasin에 의한 용혈활성이 세포막에 pore 형성과 이에 따른 세포의 삼투압 교란에 의해 이루어짐을 의미하며, tolaasin에 의한 막구조 자체의 파괴에 의하지 않음을 알 수 있다.

Tolaasin에 의한 용혈활성은 Zn^{2+} 와 Cd^{2+} , La^{3+} 등에 의해서 저해되었다(Fig. 4). 이들 양이온들의 작용 기작은 밝혀지지 않았으나, 이들의 효과는 tolaasin 분자의 막유입이나, 막에서의 pore형성, 형성된 pore의 열림, 이온채널 형성을 위한 분자의 다중결합 과정 등에서 하나 이상을 저해하기 때문일 것이다. Bashford 등²¹⁾은 Zn^{2+} 등의 이온이 pore 형성 독소에 의해 형성된 pore 근처의 인지질과 같은 막성분에 결합하여 독소의 작용을 저해한다고 보고하였다. 또한 벌독의 주요 구성분인 melittin역시 Zn^{2+} 에 의해 용혈활성이 저해되는데, 이 경우에는 Zn^{2+} 가 펩티드와 막의 상호작용시 초기단계에서 펩티드의 막결합 작용과 경쟁적으로 작용하기 때문임을 밝혔다.²²⁾ 다가 양이온들에 의한 tolaasin의 용혈작용 저해 기작은 tolaasin의 막결합 과정 자체를 저해하기보다는 형성된 pore의 기능을 저해하는 것으로 보인다.

느타리버섯의 재배에서 tolaasin에 의한 갈반병의 발병기구를 이해하고 예방을 위한 방안을 마련하기 위해서는 tolaasin의 작용 기작에 관한 기초 연구가 선행되어야 할 것이다. 본 연구를 통하여 이용 가능성이 확인된 용혈활성 측정법은 tolaasin의 pore 형성기작을 이해하고 세포독성을 평가하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 현재 진행하고 있는 지질막에서 tolaasin에 의해 생성되는 pore의 전기생리학적 특성구명과 더불어 tolaasin에 의한 갈반병 발병기작의 이해에 기여할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다(선도연구과제, KRF-99-41-G00051).

참고문헌

- Jin, K. S., Kim, J. J., Jeon, C. S. and Lee, E. J. (1994) Characteristical differentiation on isolation and identification of mushroom bacterial brown blotch pathogens *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas agarici*. *RDA. J. Agri. Sci.* **36**, 343-348.
- Kim, J. W., Kwon, S. I. and Kang, H. J. (1995) Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial diseases of cultivated mushrooms in Korea: 2. Bacteriological characteristics of *P. tolaasii* causing mushroom brown blotch and white line reacting organism. *Kor. J. Plant Pathol.* **11**, 353-360.
- 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 lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* paine. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2621-2627.
- 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 lipodepsipeptide toxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 407-411.
- Nair, N. G. and Fahy, P. C. (1973) Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* paine. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 509-512.
- Wong, W. C. and Preece, T. F. (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.
- Geels, F. P., van Griensven, L. D. and Rutjens, A. J. (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., USA.
- Guillaumes, J., Houdeau, G., Germain, R. and Oliver, J. M. (1988) Amelioration de la lutte biologique contre *Pseudomonas tolaasii* utilisation de bacteriophages. *Bull. OEPP/EPPO* **18**, 77-82.
- Munsch, P., Oliver, J. M. and Houdeau, G. (1991) Experimental control of bacterial blotch by bacteriophages. In 'Science and Cultivation of Edible Fungi,' Maher Ed., Vol. 1., pp. 389-396, Balkema Pub., USA.
- Geels, F. P. (1995) *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 38-42.
- Shin, G. C. and Jeon, N. B. (1991) Identification of yellow blotch bacteria of oyster mushroom and its biological by antagonistic bacteria. *Res. Rep. RDA* **34**, 1-10.
- 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.
- Lee, H. I., Lee, S. D., Park, K. S., Kim, Y. K. and Cha, J. S. (1997) Pathogenicity of bacterial isolates from brown blotch-diseased oyster mushrooms in Chungcheungbuk-do. *J. Agr. Sci., Chungbuk Nat'l Univ.* **14**, 121-132.
- 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.
- Han, B., Pain, A. and Johnstone, K. (1997) Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol. Microbiol.* **25**, 211-218.
- Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. (1991)

- Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 57-70.
17. Park, K. S. (1998) Increase Hemolytic and Channel-forming Activities of Tolaasin by Multimerization. M. S. Thesis. Chungbuk National University.
18. Amoako, K. K., Goto, Y., Misawa, N., Xu, D. L. and Shinjo, T. (1997) Interactions between *Fusobacterium necrophorum* hemolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 101-106.
19. Cauci, S., Monte, R., Ropele, M., Missero, C., Not, T., Quadrioglio, F. and Menestrina, G. (1993) Pore-forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolyisin. *Mol. Microbiol.* **9**, 1143-1155.
20. Parker, M. W., Goot, F. V. D. and Buckley, J. T. (1996) Aerolysin-the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol. Microbiol.* **19**, 205-212.
21. Bashford, C. L., Rodrigues, I. and Pasternak, C. A. (1989) Protection of cells against membrane damage by haemolytic agents: Divalent cations and protons act at the extracellular side of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **983**, 56-64.
22. Rudenko, S. V. and Nipot, E. E. (1996) Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin, [ala-14]melittin and whole bee venom. *Biochem. J.* **317**, 747-754.

Hemolytic Properties of Tolaasin Causing the Brown Blotch Disease on Oyster Mushroom

Kwang-Hyun Cho, Kyoung-Sun Park and Young-Kee Kim*(Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea)

Abstract : Tolaasin is a peptide toxin produced by *Pseudomonas tolaasii* and causes a brown blotch disease forming brown, slightly sunken spots and blotches on the cultivated mushrooms. It is a lipodepsipeptide consisting of 18 amino acids and its molecular mass is 1,985 Da. It forms a pore in plasma membranes, resulting in the disruption of membranes of fungal, bacterial, plant, and animal cells as well as mushroom tissue. In order to measure the toxicity of tolaasin, erythrocytes of blood were used to evaluate the tolaasin-induced hemolysis. Hemolytic activity of tolaasin was measured by observing the absorbance change either at 420 nm, representing the release of hemoglobins from red blood cells(RBCs), or at 600 nm, representing the density of residual cells. The hemolytic activity of culture-extract of *P. tolaasii* increased at early-stationary phase of growth and was maximal at late-stationary phase. The hemolytic activity of tolaasin appeared high in the RBCs of dog and rat. The RBCs of rabbit and hen were less susceptible to tolaasin. The effects of various cations were also measured. Cd^{2+} and La^{3+} as well as Zn^{2+} appeared inhibitory to the tolaasin-induced hemolysis. The effects of various anions on tolaasin-induced hemolysis were measured and carbonate showed the greatest inhibition to the hemolysis. However, phosphate stimulated the tolaasin-induced hemolysis and no effects were observed by chloride and nitrate.

Key words: tolaasin, hemolysis, pore-forming toxin, brown blotch disease, oyster mushroom.

*Corresponding author