

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001024-01
(108073-3)

분자다중화결합 저해를 통한 갈반병 원인독소 톨라신의
독성억제 방안 개발

(Suppression of brown blotch-causing tolaasin toxicity by
the inhibition of molecular multimerization)

연구기관

충북대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “분자다중화결합 저해를 통한 갈반병 원인독소 틀라신의 독성억제 방안 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 6월 24일

주관연구기관명 : 충북대학교

주관연구책임자 : 김 영 기

세부연구책임자 : 임 용 호

세부연구책임자 : 조 유 희

협동연구책임자 : 김 동 은

협동연구기관명 : 한국버섯원균영농조합

협동연구책임자 : 한 용 식

연 구 원 : 최 태 근

연 구 원 : 왕 희 성

연 구 원 : 김 민 희

연 구 원 : 박 성 완

연 구 원 : 김 원 기

연 구 원 : 윤 영 배

연 구 원 : 강 경 래
연 구 원 : 이 영 규
연 구 원 : 이 혜 옥
연 구 원 : 이 은 정
연 구 원 : 우 윤 경
연 구 원 : 이 선 희
연 구 원 : 현 지 예
연 구 원 : 정 현 희
연 구 원 : 이 민 주
연 구 원 : 이 정 우
연 구 원 : 유 용 찬
연 구 원 : 윤 수 진

요 약 문

I. 제 목

분자다중화결합 저해를 통한 갈반병 원인독소 톨라신의 독성억제 방안 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적

갈반병은 느타리버섯의 주된 병해로 *Pseudomonas tolaasii*와 *Pseudomonas agarici*, *Erwinia* sp. 등에 의해서 발병된다고 알려져 있으나, 그중 *P. tolaasii*가 주된 병원균으로 밝혀졌다. 현재까지 갈반병의 발병이나 확산을 막을 수 있는 다양한 방법을 개발하기 위한 노력이 이루어져왔으나 갈반병을 방제할 수 있는 유효한 방법을 개발하지 못하였다. 갈반병은 주로 균사성장기나 자실체 형성 초기에 나타나며, 병의 발생으로 균사나 어린 버섯은 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. 그간에 살균제, 항생제, 염소제, 길항균 등 다양한 화학적, 생물학적 방법들이 시도되었지만, 이들은 부분적인 효과를 보이거나 인체에 독성을 보여 버섯재배에 사용할 수 없었다.

느타리버섯의 갈반병은 *P. tolaasii*에 의해 분비되는 1.9 kDa의 톨라신이라는 작은 펩티드에 의해서 발병한다. 톨라신은 재배버섯의 세포막에 pore를 형성하여 세포를 파괴하는 세균독소이다. 톨라신은 세포독성을 나타내기 위하여 다수의 분자가 결합하는 분자다중화결합에 의하여 활성화됨이 밝혀졌다. 톨라신 분자의 다중화결합은 여러 화학물질에 의하여 저해될 수 있음이 본 연구를 통하여 밝혀졌으며, 이들을 톨라신 저해물질(TIF)로 명명하였다. 본 연구에서는 식품첨가물을 포함한 다양한 화합물을 이용하여 갈반병을 억제할 수 있는 방안을 개발하려고 한다. 더 나아가서 갈반병 원인균의 생물학적 제어를 위하여 갈반병을 사멸할 수 있는 파아지오법을 검토할 예정이다. 파아지는 숙주균을 특이적으로 살균할 수 있는 능력을 가지므로 화학약품보다 우수한 효과를 보일 수 있다.

현재 대부분의 버섯재배 농가는 생산성이나 상품성이 떨어짐에도 불구하고 갈반병에 안전한 병재배, 봉지재배법 등을 이용하여 느타리버섯을 재배하고 있다. 이러한 재배법으로 갈반병의 피해는 줄일 수 있으나, 상대적으로 제품의 품질이 낮아 수익성이 떨어지는 영농법이다. 만약, 갈반병의 발병을 억제할 수 있는 방안이 개발된다면 질적 양적으로 우수한 제품을 생산할 수 있는 균상재배법을 사용함으로써 생산성 및 품질 향상을 통하여 버섯농가의

경쟁력을 상당히 높일 수 있다.

본 연구는 갈반병의 억제를 위하여 현장 적용에 강점을 가진 방안을 개발하는 데 목표를 두고 있다. 톨라신은 느타리버섯에 갈반병을 일으키는 세균성 독소 펩티드로서, 선행연구에서 톨라신은 3단계의 활성화 과정을 통하여 세포독성을 나타냈고, 이중 톨라신 분자 다중화결합은 세포독성에 핵심과정임을 확인하였다. 따라서, 톨라신의 분자다중화를 포함한 활성화과정 저해를 통하여 갈반병 발병을 억제할 수 있는 방안을 개발하는데 첫째 목적을 두며, 이에 병행하여 갈반병 원인균을 근원적으로 제거할 수 있는 파아지를 자연중에서 분리하고 숙주균 제거에 이용하는데 둘째 목적이 있으며, 이들을 상호병행 보완함으로써 완벽한 갈반병 방지 기술을 마련하는데 최종 목적이 있다.

III. 연구개발 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

느타리버섯은 생산량이나 소비면에서 단연 1위를 차지하고 있으며, 일반 작물에 비하여 높은 소득을 보장하는 고소득 작물로 각광을 받고 있다. 느타리버섯 재배는 높은 수익성에도 불구하고, 세균성 병해인 갈반병의 발생으로 매우 조심스럽게 이루어지고 있다. 갈반병은 다양한 인공재배 버섯에도 심각한 피해를 주고 있으며, 국외에서도 'Brown blotch disease'라는 이름으로 세계 각국에서 발생하여 큰 피해를 끼치고 있다. 현재까지도 갈반병의 예방이나 방제방법은 개발하지 못하고 있으며, 갈반병은 일단 발생하면 추가적인 재배가 불가능할 정도로 피해가 극심하여 농가에서 느타리버섯 재배의 주요 기피원인이 되고 있다. 갈반병의 예방은 지하수의 철저한 살균과 재배사의 훈증소독, 비닐멀칭재배, 봉지재배, 병재배 방법에 의해 이루어지나, 일단 발병시 대책이 없는 실정이다. 버섯은 신선한 건강식품으로 항생제나 살균제와 같은 약제의 사용이 허용되지 않고 있다. 이상에서 밝혔듯이 갈반병의 해결은 버섯재배 농가에 안정적이고 지속적인 소득을 보장할 수 있는 긴급한 과제이다.

2. 연구개발의 범위

톨라신 펩티드에 의한 갈반병 발병기작을 밝히고, 병으로부터 버섯을 보호하기 위하여 톨라신의 세포독성 특성을 밝힐 것이다. 갈반병 발병이 3단계의 과정을 통하여 이루어지기 때문에 각 과정별 저해방법을 고안할 것이다. 각 단계별 저해과정의 특성을 밝혀 가장 효과가 큰 방안을 중점적으로 연구하여 톨라신의 세포독성 작용을 억제할 수 있는 실용적인 방법을 개발할 것이다. 이때 효과가 인정된 톨라신 저해제는 재배사에서 느타리버섯을 재배하며 갈반병을 발생시켜 갈반병의 억제효과를 평가할 것이다. 포장실험에서 효과가 입증되면

저해제가 병을 억제하여 최대 효과를 얻도록 처리방안을 개발할 것이며, 저해제의 제재화 방안을 연구할 것이고 유통 및 보관중에 유효성분의 안정성도 검토될 것이다. 톨라신 저해제의 개발과 더불어 근원적으로 병원균의 생물학적 살상효과가 큰 여러 종의 파아지를 순수분리할 것이며, 병원균의 살균효과를 측정할 것이다.

IV. 연구개발결과

1. 갈반병 원인독소 톨라신 저해제 연구

갈반병은 병원균 *P. tolaasii*가 분비하는 톨라신이라는 펩티드 독소에 의해 발생하는 병해로 세계 각국에서 느타리버섯이나 양송이버섯 등 인공재배 버섯에서 널리 발병하고 있다. 본 연구에서는 식품첨가물을 포함하는 다양한 화합물을 이용하여 갈반병 억제능을 측정하였고, 이들을 톨라신 억제인자(tolaasin-inhibitory factor, TIF)라 명하였다. 다양한 TIF 중 글리세린계, 솔비탄계, 자당계, 스테아린계 지방산 에스터 화합물이 micromolar의 낮은 농도에서 좋은 억제 효과를 보였다. TIF들은 톨라신에 의한 세포파괴를 저해하였으며, 온도나 pH의 변화와 무관하게 효과를 보였다. 흥미롭게도 TIF는 톨라신이 세포막에 pore를 성한 후에도 효과를 나타냈다. 다양한 TIF들은 혼합처리시에 톨라신 독성저해에 상승효과를 나타냈다. 자당계 지방산에스터 화합물에 속하는 TIF-9와 폴리글리세린계 지방산에스터인 TIF-16을 동시에 처리시 톨라신 독성 억제효과는 3배 상승하였다. 유사한 상승효과가 TIF들 사이에 동시처리시 관측되었다.

Zn^{2+} 는 톨라신 채널을 효과적으로 저해하는 저해제로 알려져 있다. TIF의 작용기작을 알기위하여 TIF와 Zn^{2+} 의 동시 처리로 경합효과를 측정하였다. TIF-9와 Zn^{2+} 를 같이 첨가하였을 경우, 저해효과는 주로 Zn^{2+} 단독의 저해효과와 유사한 정도를 보였다. 이것은 Zn^{2+} 와 TIF의 결합부위가 위치적으로 매우 가깝거나 또는 Zn^{2+} 의 결합에 따른 구조변화가 TIF의 추가적인 결합을 방해하는 등의 기작을 의미한다. 이러한 실험결과로부터 TIF는 톨라신에 대한 높은 친화력으로 낮은 농도에서 결합하고, Zn^{2+} 는 톨라신 채널에 친화력은 떨어지나 강한 저해제로 작용함을 알 수 있었다.

실용화를 위한 TIF 제품을 제조하기 위하여 TIF의 안정성을 조사하였다. TIF들은 대부분 불포화결합을 갖는 탄소화합물로 산소와 빛의 노출에 민감하였다. 질소를 충전한 용기에서 TIF는 안정하여 3개월 동안 10% 이하의 활성감소를 보였다. 그러나 공기중 산소와 접촉하였을 경우 2주 이내에 약 90%의 활성이 감소하였다. 저장온도도 활성에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러므로, TIF 제제의 유통이나 보관중 안정성을 높이기 위해서는 산소와 빛이 차단된 조건이 되어야 할 것이다.

톨라신 저해제를 찾기위한 simulation 실험에서 리간드결합 실험이 NMR spectroscopy를 통하여 이루어졌다. *In silico* docking 실험에서 약 30,000종의 화합물중 2가지 화합물이 후보물질로 도출되었고, 이들 중 하나는 용혈활성과 리간드결합 실험을 통하여 좋은 후보물질로 밝혀졌다. 또한, 톨라신 채널의 3차 구조를 밝히기 위한 많은 노력이 행해져, 톨라신 채널의 구조를 분자모델링을 이용하여 결정하였고, 이것은 톨라신 분자가 막에 결합하여 이온채널을 형성하는 기작을 설명하는 첫 번째 시도로 의의가 크다.

2. 갈반병균 파아지의 분리 및 특성

갈반병 병원균의 생물학적 방제를 위해 *P. tolaasii*에 특이적인 박테리오파아지를 분리하였다. 총 21 파아지를 분리하였고 이들의 숙주균 살균력을 측정하여 3 종류로 분류하였다. 갈반병에 대한 이들의 유용성을 평가하기 위하여 pitting test를 수행하였다. 병원균에 대한 파아지의 살균력은 파아지 존재하에 병원균에 의해 버섯표면에 만들어지는 괴사부위 즉 갈반의 크기로 평가할 수 있다. 파아지 존재하에 갈반의 형성은 완전히 억제되었다. 이러한 결과는 파아지가 병원균을 완전히 사멸시키며, 파아지가 갈반병 방제에 유용함을 의미한다. 본 연구를 통하여 숙주균 박멸을 위한 파아지의 처리 최적조건을 결정하였다.

파아지 Φ Pto-bp6g는 버섯에 갈반병을 일으키는 톨라시균에 대하여 강한 살균작용을 보였다. 박테리오파아지 Φ Pto-bp6g의 전자현미경 분석 결과 20면체 머리와 긴 꼬리를 가진 Siphoviridae 종의 바이러스임을 알 수 있었다. 배양실험을 통하여 파아지 Φ Pto-bp6g가 lysogenic/lytic switch 생활사를 보임을 알 수 있었다. 고독성 파아지 Φ Pto-bp6g 유전체 염기서열 분석을 완료하여 이를 NCBI GenBank database에 등록하였다 (GenBank ID JN175269). 파아지 Φ Pto-bp6g의 DNA크기는 총 26,499 bp의 선형 DNA로서 GC가 42.7% 포함되어있다. 유전체 분석 결과 ORF(open reading frame) 78개가 동정되었으며, 이중 38개 ORF는 이전의 데이터와 상동성이 발견되지 않았다. 한편 나머지 ORF들은 기존의 파아지들과 상동성(*Siphoviridae* (8 ORFs), *Myoviridae* (13 ORFs), *Podoviridae* (6 ORFs))을 보였다.

파아지 ORF에서 유추한 단백질들은 그 기능에 따라 3 부류로 분류될 수 있었다. 즉, (i) 숙주 톨라시균과의 접촉에 필요한 단백질들, (ii) DNA 복제와 뉴클레오티드 대사단백질들, (iii) 파아지를 구성하는 구조단백질들과 숙주 용균단백질들이다. 질량분석기를 이용한 파아지 단백질체의 분석에 의하여 DNA 삽입과 복제에 관련한 단백질들이 동정되었다. 이는 파아지가 톨라시균을 용해할 때 lysogenic pathway가 존재한다는 것을 암시한다. 본 연구에서 동정한 톨라시 균 용해 파아지를 생물학적 방제에 적용하기 위하여 알려지지 않은 파아지 유전자들의 기능을 파악하는 연구가 요구된다.

3. 결과요약

요약하면 TIF(tolaasin inhibitory factors)는 식품첨가제 계면활성제들로부터 선별되었고 용혈활성을 갖는 톨라신을 효과적으로 저해하였다. TIF는 톨라신 분자에 결합하여 톨라신분자들의 다중체 형성을 억제한다. 버섯 함몰검정법을 통해 TIF가 톨라신으로부터 버섯의 갓부분에 갈반의 형성을 예방하는데 효과가 있으며, 느타리버섯의 균상재배에서도 유사한 효과를 확인하였다. 다양한 TIF를 병원균인 *P. tolaasii*와 동시에 느타리버섯에 처리해도 갈반이 형성되지 않는 것을 확인하였다. TIF를 제품화 하기위해서 보관온도, pH, 항산화제 처리와 같은 다양한 조건에서 TIF의 활성을 조사하였다.

갈반병의 생물학적 방제를 위하여 갈반병균에 특이적인 박테리오파아지를 분리하는 데 성공하였고, 이들은 병원균을 완전히 사멸시켜 균상재배에서 갈반생성을 완전히 억제하였다. 따라서 파아지 처리는 항생제를 사용하지 않고 병원균을 방제할 수 있는 유용한 친환경적 방법임을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- ① 본 연구를 통하여 톨라신 독소의 저해제를 여러 가지 개발하였고, 실제 버섯재배사에서 균상배양을 통하여 효과가 탁월함을 확인하였다. 개발된 TIF들은 특허출원되어 기술을 인정받는 단계에 있다.
- ② 개발한 TIF는 현재 시제품으로 제재화되어 농가실험을 앞두고 있다. 이미 균상재배를 통하여 효과가 입증되었지만 최종 단계인 농가실험을 통하여 제재기술을 확립하면 제품생산이 가능하여 기술을 최종 확립할 수 있을 것이다.
- ③ 새로운 TIF의 추가개발을 위하여 *in silico* docking을 수행하여 후보를 도출하였고, 후보 화합물은 핵자기공명분광실험을 통하여 작용기작을 밝히는 데 기여하였다. 또한 분자모델링 기법을 이용하여 톨라신의 이온채널 형상을 밝혀 앞으로 펩티드 독소 연구의 기반을 확립하였다.
- ④ 병원균의 생물학적 방제를 위한 파아지를 분리하였고, 특성을 밝혔으며, 파아지를 이용한 균상재배에서 갈반병 억제기술을 확립하였다. 다만, 병원균의 변이종이 여럿 존재함이 밝혀졌고, 따라서 각 균종마다 특이적인 파아지의 분리 및 특성구명이 이루어지고 있다.
- ⑤ 병원균을 효율적으로 사멸시키는 독성 파아지의 특성분석으로 파아지 유전자 전체의

염기서열을 결정하였고, 유전체 분석을 통하여 단백질 유전자를 동정하여 용균과 관련한 유전자를 확인하였다.

2. 활용계획

- ① 개발한 TIF는 2009년 특허를 출원하여 현재 등록 직전의 상태이다. 특허가 등록된다면 TIF의 안전성 실험에서 얻은 결과를 근거로 제재화하여 버섯재배농가에서 최종 포장실험을 거친 후 상품화할 예정이다.
- ② TIF를 이용하는 기술은 펩티드 독소를 분비하여 병을 유발하는 식물 및 사람과 동물의 병원균에 응용이 가능하다. TIF 관련 기술을 체계적으로 정리하여 식물과 인축에 발병하는 병원균의 병발생 억제에 응용성을 검토할 것이다.
- ③ 생물학적 방제를 위하여 분리 동정한 파아지는 안정성 실험을 거쳐 갈반병 억제를 위한 제제로 개발하여 농가실험을 수행할 예정이다. 다만, 갈반병 원인균이 예상보다 다양하여 갈반병 원인균을 분류한 후, 그에 맞는 파아지 종을 개발하고 이들을 혼합하여 버섯재배사에 사용할 계획이다.
- ④ 본 연구에서 확립한 파아지를 이용한 병원균 사멸방법은 항생제 내성을 가진 병원균 등에 다양하게 적용이 가능하다. 병원균의 종류가 잘 연구된 작물이나 인축의 병에 응용가능성을 높일 수 있도록 적용기술을 더 발전시킬 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Suppression of brown blotch-causing tolaasin toxicity by the inhibition of molecular multimerization

II. Objects of the Research

Bacterial blotch is a major disease of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and causes serious loss of oyster mushroom production. Pathogenic bacteria were identified as *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas agarici*, and *Erwinia* sp. and the main causal bacterium was *P. tolaasii*. Although many efforts have been made to prevent the disease from spreading, it is very difficult to make a farming house free from the pathogenic bacteria. In order to control *P. tolaasii*, the effects of some chemicals and biological materials, such as disinfectants, antibiotics, chlorine dioxide, and antagonistic bacteria, were investigated. However, these showed limited effects or they were not applicable to mushroom cultivation since these materials may be harmful and toxic to humans.

The brown blotch disease of cultivated oyster mushroom is caused by tolaasin, a 1.9 kDa bacterial lipodepsipeptide toxin. The peptide forms pore in the cellular membranes of cultivated mushrooms. The tolaasin-induced pore formation requires the multimerization of tolaasin molecules. The multimerization of tolaasin can be blocked by the treatment of various chemical compounds, named tolaasin-inhibitory factor (TIF). In this study, various chemical compounds including food additives were investigated to prevent from the brown blotch disease. Furthermore, for the biological control of *P. tolaasii*, the usefulness of phage therapy for preventing the brown blotch was also reevaluated. Since phages are highly specific to host bacteria and have a rapid sterilization effect, they were found to be better than chemical therapy. In this study, various phages of *P. tolaasii* 6264 were isolated and characterized so that these phages could be used to control brown blotch disease.

III. Significance and Scope of the research

1. Significance

Oyster mushroom is top-ranked mushroom in both production and consumption and it is one of the best crops promising high profit to the farmers. However, oyster mushrooms are cultivated carefully because of brown blotch disease. Bacterial blotch disease is the major problem for the cultivation of both domestic and foreign mushrooms including button mushroom (*Agaricus bisporus*). No chemical and biological treatments are available to control the disease. Therefore, preventing the spread of disease is practically difficult. The blotch disease can be spread out through the rural village cultivating oyster mushrooms. Protection of the mushrooms from the disease is performed by disinfecting underground water before use, fumigating cultivation bed with hot air, and covering the bed with plastic films. Paper bag and bottle cultivations are also good ways of protection. Antibiotics and chemical pesticides are not allowed for mushroom cultivation. A successful control of brown blotch disease is urgent project that should be developed to promise consistent and stable incomes to the mushroom-cultivating farmers.

2. Scope of the research

In order to understand the molecular mechanism of brown blotch formation and develop the method of protecting mushrooms from the disease, the cytotoxicity of tolaasin will be investigated. Since the disease is developed by three steps of tolaasin activation, the way of inhibiting each step will be designed. The most effective method will be evaluated and this will be focused with the main research activity. The methods developed as a practical method to inhibit the cytotoxicity of tolaasin. The tolaasin inhibitor, named TIF, will be tested during the bed cultivation of oyster mushroom in the culture house. Once a TIF is successful for the prevention of the disease, the way of maximizing the effect of TIF will be investigated, such as optimum temperature and pH, and the formulation of TIF will be investigated to increase the stability of active compounds during the commercial delivery and storage. In addition to the developing TIF and its commercial products, various bacteriophages will be isolated for the biological control of pathogenic bacteria and their sterilization effects will be also evaluated. If bacteriophages will be used with TIF for the protection of mushrooms from

the disease, disease-free cultivation of oyster mushroom could be possible.

IV. Results of the Research

The brown blotch disease caused by the peptide toxin, tolaasin, secreted by *Pseudomonas tolaasii*. It is a world-wide problem for the cultivations of various mushrooms, including oyster mushroom and agaricus mushroom. Various chemical compounds, mostly food additives, were investigated to prevent from the brown blotch disease and these compounds named tolaasin-inhibitory factor(TIF). Among TIF's, glycerin esters of fatty acids, sorbitan esters of fatty acids, sucrose esters of fatty acids, and stearin esters of fatty acids blocked effectively the tolaasin-induced hemolysis. These compounds were generally effective at very low concentrations micromolar. TIF's blocked hemolytic activity of tolaasin and their activities were not dependent on temperature and pH. Interestingly, after tolaasin molecules formed pores on the erythrocyte membrane, TIF's showed inhibitory effect, suggesting the inhibition of pre-formed tolaasin pores. The synergic effect on the inhibition of tolaasin was measured by simultaneous additions of various TIF's. When TIF-9, sucrose fatty acid esters, and TIF-16, a polyglyceryl fatty acid ester, were added, tolaasin-induced hemolysis was effectively inhibited. In the presence of both TIF's, the inhibition was increased by 3 times.

Zn^{2+} is a potent tolaasin inhibitor known to bind to tolaasin pore. In order to understand the working mechanism of TIF, competition effect between Zn^{2+} and TIF was investigated. When Zn^{2+} and TIF-9 were added simultaneously, no additive effects were observed at various concentration combinations. The inhibition was dominated by Zn^{2+} concentration. Based on these results, we suggest that TIF has high affinity to tolaasin channel than Zn^{2+} although Zn^{2+} is a strong inhibitor.

In order to make a commercial product of TIF, the store conditions were studied to keep TIF stable during the storage period. Since TIF's are unsaturated carbon compounds, they were sensitive to the air exposure and light irradiation. In the nitrogen-filled air tight containers, TIF's were stable and less than 10% activity were decreased for three months. However, more than 90% of TIF activity was suppressed by two weeks in the presence of oxygen. Room light also decreased the TIF activity by two times. Temperature did not show any significant effects on the stability of TIF. Therefore, in order to make the

storage period longer, container should be designed to be oxygen- and light-free.

In simulation experiments, effective inhibitors against tolaasin were searched. *In silico* docking, host-ligand binding experiments using nuclear magnetic resonance spectroscopy, and hemolysis measurements were carried out. Of more than 30,000 compounds screened using *in silico* experiments, two compounds were selected and one of them was considered to be a candidate as an inhibitor against tolaasin toxin based on *in vitro* binding and hemolysis experiments. Many efforts also have been made to elucidate the three dimensional structure of ion channels formed by tolaasin. In this study, the structure of the tolaasin ion channel was determined *in silico* based on data obtained from nuclear magnetic resonance experiments. This is the first time trial to show how tolaasin molecules form ion channel shape in the membrane.

For the biological control of the disease, virulent bacteriophages of *P. tolaasii* were isolated. Twenty-one phages were isolated and they were divided into 3 categories on the basis of their toxicities to host bacteria. In order to test if these phages can be used for the biological control of mushroom diseases, a pitting test was performed. Phage toxicity was analyzed by measuring the size of the blotches formed by the pathogenic bacteria in the presence of bacteriophages. The formation of blotches was completely blocked by co-incubated phages. These results show that phages can sterilize pathogenic bacteria and be useful for the biological control of brown blotch disease. The optimum conditions for the bactericidal activity of these phages were also determined.

The lytic bacteriophage, Φ Pto-bp6g, exhibited strong bactericidal activity against *P. tolaasii*. Analysis of phage morphology revealed that Φ Pto-bp6g belongs to the family *Siphoviridae*, having icosahedral head and a long tail. Latency analysis indicated a putative lysogenic/lytic switch of Φ Pto-bp6g during bacterial growth. The whole genome was completely sequenced and registered in the data base (GenBank ID JN175269) with a length of 26,499 bp and a G+C content of 42.7%. A total of 78 open reading frames (ORFs) were identified and annotated, but 38 ORFs possessed no homologs. The proteins of several ORFs showed homology with proteins of a diverse group of phages, including *Siphoviridae* (8 ORFs), *Myoviridae* (13 ORFs), and *Podoviridae* (6 ORFs). Phage proteins were grouped into three categories based on their predicted functions: (i) host interaction, (ii) DNA replication and nucleotide metabolism, and (iii) phage particle formation and host lysis. Future studies revealing unknown gene functions are needed to provide better

insights into the practical use of bacteriophages as a biological control of brown blotch disease among mushrooms.

In summary, TIF's were selected from food additives and they were very effective on the inhibition of tolaasin toxicity. TIF binds to tolaasin molecules and suppresses their molecular multimerization. In the pitting test, TIF's were successful to prevent from blotch formation on the cap structure of cultivated mushrooms. Similar results were obtained from the bed culture of oyster mushrooms. No blotches were formed after the spray of pathogen, *P. tolaasii*, in the presence of various TIF's. Various conditions were investigated for the production of TIF commercial products, such as storage temperature, pH, and the effects of antioxidants. For the biological control of pathogen, bacteriophages specific to *P. tolaasii* were isolated and they were also able to suppress the blotch formation by sterilizing host bacteria completely. Therefore, phages are useful for the control of bacterial disease without using antibiotics.

CONTENTS

SUMMARY.....4

- I. Title
- II. Objects of the Research
- III. Significances and Scope of the Research
- IV. Results of the Research

CONTENTS.....15

Chapter 1. Outlines of research project.....24

Section 1. Purpose of research.....24

Section 2. Significance and Scope of research.....25

1. Significance of research.....25

2. Scope of research.....26

Chapter 2. Current status of domestic and foreign technology.....28

Section 1. Foreign technology.....28

Section 2. Domestic technology.....29

Chapter 3. Contents of the research and results.....30

Section 1. Cytotoxicity of tolaasin and the effects of tolaasin inhibitor TIF.....30

1. Evaluation of putative tolaasin inhibitory materials.....30

(1) Brown blotch disease and the description of the research.....30

(2) Search for TIF and evaluation.....31

(3) Inhibitory concentration of TIF.....33

(4) Conditions for the maximum activity of TIF.....35

(5) Evaluation of TIF by pitting test.....39

(6) Effect of TIF on tolaasin channel activity	40
(7) Simultaneous treatment of Zn ²⁺ and TIF	41
(8) Synergic effect of TIF mixture	42
(9) Synergic effect measurement by pitting test	44
2. Characterization of tolaasin-induced hemolysis	45
(1) Inhibitors on cytotoxicity of tolaasin	45
(2) Inhibition of tolaasin channel by Ni ²⁺	46
(3) Additive effect of Ni ²⁺ and Zn ²⁺	47
(4) Importance of Ni ²⁺ effect on tolaasin cytotoxicity	50
3. Increase in tolaasin-induced hemolysis by phospholipids composed	
of short-chain fatty acids	51
(1) Effects of phospholipids on tolaasin toxicity	51
(2) Effect of DDPE on the cytotoxicity of tolaasin	52
(3) Preincubation of DDPE and RBC	53
(4) Preincubation of phospholipid and tolaasin	54
(5) Preincubation of DDPE and tolaasin	55
(6) Increase in tolaasin channel activity by DDPE	56
4. Studies on stability of TIF for commercial application	57
(1) Effect of oxygen on the stability of TIF	57
(2) Effect of storage temperature the stability of TIF	58
(3) Effect of light irradiation on the stability of TIF	60
(4) Effect of antioxidant on the stability of TIF	61
(5) Manufacture of TIF laboratory product	67
Section 2. Evaluation of bacteriophages for the biological control of brown blotch	68
1. Characterization of bacteriophages	68
(1) Isolation of bacteriophages	68
(2) Bactericidal effect of phages	69
① Bacteriolytic activities of various phages	69
② Bacteriolysis dependent on the amount of phage inoculation	70
③ Effect of inoculation time on bacteriolytic activity	71
④ Effect of temperature on bacteriolytic activity	72
⑤ Increase in tolaasin production by phages	73

⑥ Evaluation of phage effect by pitting test	74
2. Evaluation of phage effect during the mushroom cultivation	76
(1) Conditions for brown blotch disease development	76
(2) Control the blotch disease by phages	77
(3) Effects of phage and TIF during bed cultivation of mushroom	78
① Facilities for the bed cultivation of oyster mushroom	78
② Bed cultivation of oyster mushroom	79
③ Control the disease by TIF and phages	80
(4) Analysis of pathogens for phage therapy	83
① Analysis and classification of pathogens of blotch disease	84
② Isolation and classification of phages	89
Section 3. Search for TIF by in silico analysis and the determination of tolaasin	
channel structure	90
1. Search for TIF by in silico docking	90
2. Binding studies of tolaasin to TIF by NMR	94
3. Binding studies of tolaasin to cation by NMR	100
4. Three dimensional structure of tolaasin channel	105
Section 4. Characterization of bacteriophages of blotch disease	112
1. Isolation of bacteriophages	112
2. Purification of bacteriophages	112
3. Evaluation of bactericidal activity	113
4. Morphological studies of the isolated phages	115
(1) Genome analysis of virulent phages	118
(2) Genomic libraries of <i>P. tolaasii</i> mutants	119
(3) Screening of phage-resistant pathogen	120
(4) Screening of less-toxic pathogen	121
(5) Genome analysis of less-toxic mutant	122
(6) Genome sequence by GS FLX	124
Section 5. Phage genome studies	125
1. Plaque and EM analysis of virulent phages	125
2. Bactericidal evaluation of isolated phages	126
3. Bacteriolytic activity analysis of the isolated phages	128

4. Genome analysis of Φ Pto-bp6g	130
5. Proteome analysis of Φ Pto-bp6g	135
Chapter 4. Achievement and contribution of the research	139
Section 1. Annual achievement of research	139
Section 2. Contribution to related area	142
1. Application	142
2. Technical aspects	143
3. Economical and industrial aspects	143
Section 3. Review and recommendations for the industrial application	144
Chapter 5. Application of the results	145
Section 1. Industrial application	145
Section 2. Educational and Commercial applications	145
Section 3. Patent, Commercial product and Paper publication	145
1. Patent pending	145
2. Commercial product	145
3. Paper publication and preparation	145
(1) Publication	146
(2) Paper accepted and submitted	146
(3) Paper in preparation	146
Section 4. Further study and application to other studies	147
1. Further study in phage application	147
2. Further study in the usage of recombinant proteins of bacteriolysis	147
Chapter 6. Research information collected during research progressing	148
Chapter 7. References	148

목 차

제 출 문	2
요 약 문	4
1. 제목	
2. 연구개발의 목적	
3. 연구개발 필요성 및 범위	
4. 연구개발 결과	
5. 연구성과 및 성과 활용계획	
SUMMARY	10
CONTENTS	15
목 차	19
제 1 장. 연구개발과제의 개요	24
제 1 절. 연구개발의 목적	24
제 2 절. 연구개발의 필요성 및 범위	25
1. 연구개발의 필요성	26
2. 연구개발의 범위	26
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	28
제 1 절. 국외의 기술개발 현황	28
제 2 절. 국내의 기술개발 현황	29
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	30
제 1 절. 톨라신의 세포독성 및 톨라신 저해제(TIF)의 효과	30
1. 톨라신 저해제(TIF)의 탐구 및 저해효과 검증	30
(1) 갈반병의 특성 및 연구진행 내용	30
(2) 톨라신 저해제 TIF 탐색 및 효과검증	31
(3) TIF의 톨라신 저해농도 측정	33

(4) TIF의 처리조건에 따른 효과	35
(5) 버섯함몰검정법에 의한 TIF 효과	39
(6) 톨라신 채널에 대한 TIF의 효과	40
(7) Zn ²⁺ 와 TIF 동시 처리 효과	41
(8) TIF 종류별 혼합에 따른 상승효과	42
(9) 버섯함몰검정법에서의 상승효과 측정	44
2. 톨라신의 용혈활성 특성조사	45
(1) 톨라신의 세포독성 저해제 탐구	45
(2) Ni ²⁺ 에 의한 톨라신 이온통로 저해효과	46
(3) Ni ²⁺ 과 Zn ²⁺ 의 상호작용	47
(4) Ni ²⁺ 효과 발견의 중요성	50
3. 짧은 지방산으로 구성된 인지질에 의한 톨라신의 용혈활성 증가	51
(1) 톨라신의 용혈활성에 대한 지질의 효과	51
(2) 톨라신의 용혈활성에 미치는 DDPE의 농도 효과	52
(3) DDPE의 적혈구와 사전배양에 의한 효과	53
(4) 인지질과 톨라신의 사전배양 효과	54
(5) DDPE와 톨라신의 사전배양 효과	55
(6) DDPE에 의한 톨라신 채널 활성 증가	56
4. 시제품 제작을 위한 TIF의 안정성, 저장성 연구	57
(1) 산소 접촉 유무에 따른 TIF 안정성	57
(2) 보관온도에 따른 TIF의 안정성 실험	58
(3) 햇빛의 조사에 따른 TIF 효과 안정성	60
(4) 항산화제 첨가에 따른 TIF의 안정성 실험	61
(5) TIF 시작품의 조제	67
제 2 절. 갈반병 생물학적 방제를 위한 파아지 효과분석	68
1. 파아지의 분리 및 특성 분석	68
(1) 톨라시를 숙주로 하는 파아지의 분리	68
(2) 파아지의 안정성 및 살균특성 분석	69
① 파아지의 종류에 따른 용균력의 차이	69
② 파아지 접종량에 따른 용균효과 측정	70

③ 파아지의 접종 시간에 따른 용균력	71
④ 온도변화에 따른 파아지의 용균력	72
⑤ 파아지에 의한 숙주균의 톨라신 독소 생산증가	73
⑥ 버섯조직함몰검정법에 의한 파아지 효과 검증	74
2. 버섯재배 실험을 통한 파아지 효과검증 및 적용조건 설정	76
(1) 파아지 효과 확인을 위한 갈반병 발병조건 확립	76
(2) 파아지의 갈반병 억제 효과	77
(3) 느타리버섯 균상재배를 통한 파아지 및 TIF 효과 검증	78
① 느타리버섯 균상재배 시설	78
② 느타리버섯 균상재배	79
③ TIF와 파아지 처리를 통한 갈반병 억제 효과 확인실험	80
(4) Phage therapy를 위한 병원균 특성 분석	83
① 갈반병 원인 균주의 분석 및 분류	84
② 갈반병 원인균 분류에 따른 파아지의 분리 및 분류	89
 제 3 절. In silico 방법을 이용한 TIF 탐색 및 톨라신 채널 구조결정	90
 1. In silico docking을 이용한 tolaasin 저해제의 도출	90
2. NMR을 이용한 톨라신과 TIF 결합연구	94
3. 핵자기공명분광법을 이용한 톨라신과 양이온 사이의 결합에 대한 연구	100
4. 톨라신에 의해 형성된 이온채널의 3차구조 결정	105
 제 4 절. 갈반병 병원균의 파아지 돌연변이 연구	112
 1. 환경시료로부터의 파아지 분리	112
2. 톨라시균 파아지의 순수 분리 및 정제	112
3. 발굴한 파아지의 살상능력 분석	113
4. 발굴한 8종 파아지의 형태분석	115
(1) 고독성 파아지의 유전체 분석	118
(2) 톨라시균 돌연변이 라이브러리 제조	119
(3) 돌연변이 라이브러리로부터 파아지 내성 변이균 스크리닝	120
(4) 돌연변이 라이브러리로부터 독력 감소 변이균 스크리닝	122

(5) 독립 감소 변이군의 관련 유전자 확인	122
(6) 454 GS FLX를 이용한 유전체 염기서열 결정	124
제 5 절. 파아지의 유전체 연구	125
1. 고독성 파아지의 용균반 형성과 전자현미경 형태분석	125
2. 파아지의 톨라시균 용균 살상능력 분석	126
3. 선별한 파아지의 톨라시균 세포 용해 활성 분석	128
4. 파아지 Φ Pto-bp6g의 유전체 분석	130
5. 파아지 Φ Pto-bp6g의 단백질 분석	135
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	139
제 1 절. 연구개발목표의 달성도	139
제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도	142
1. 활용계획	142
2. 기술적 측면	143
3. 경제, 산업적 측면	143
제 3 절. 산업화를 위한 검토 및 개선점	144
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획	145
제 1 절. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	145
제 2 절. 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획	145
제 3 절. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	145
1. 특허등록(또는 출원)	145
2. 상품화	145
3. 논문발표 및 준비중 논문	145

(1) 논문발표	146
(2) 수리된 논문	146
(3) 준비중 또는 투고된 논문	146
제 4 절. 추가연구, 타연구에 활용 계획	147
1. 파아지를 이용한 추가연구 계획	147
2. 파아지의 용균활성 재조합 단백질을 이용한 추가 연구 계획	147
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	148
제 7 장. 참고문헌	148

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

느타리버섯의 주된 병해는 세균성 갈색무늬병으로 알려진 갈반병과 푸른곰팡이병 등이 있다. 갈반병은 양송이버섯 재배시 나타나는 피해가 가장 큰 세균병으로 Tolaas에 의해 1915년에 처음 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 작목으로 하는 국내 버섯재배 농가에 심각한 피해를 입히는 것으로 알려져 있다. 갈반병은 주로 버섯의 자실체 형성 초기에 심각하게 나타나며, 균사에서 어린 버섯, 성장한 버섯에 광범위하게 발병한다. 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 않았으나, 농용지하수의 살균과 재배사의 훈증소독 등이 주로 사용되어 어느 정도 예방효과를 보고 있다. 방제 대책으로는 생물학적 방법으로 길항균의 사용과 항생제의 사용 등이 제안되었지만, 항생제의 사용은 식용으로 하는 버섯의 특성과 신선상품으로서의 가치를 잃으며, 법적으로도 허용되지 않고 있어서 현재로는 유력한 현장적용 방안이 없는 실정이다. 현재 대부분의 버섯재배 농가는 생산성이나 상품성이 떨어짐에도 불구하고 갈반병에 안전한 병재배, 봉지재배법 등을 이용하여 느타리버섯을 재배하고 있다. 이러한 재배법으로 갈반병의 피해는 줄일 수 있으나 이것은 상대적으로 제품의 품질이 낮아 수익성이 떨어지는 영농법이다. 또한, 최근에 대단위 병재배 농가에서도 갈반병의 심각한 발병이 보고되어 병재배 방법도 더 이상 안전하다고 할 수 없다. 만약, 갈반병의 발병을 억제할 수 있는 방안이 개발된다면 질적 양적으로 우수한 제품을 생산할 수 있는 균상재배법 등을 사용함으로써 생산성 및 품질 향상을 통하여 버섯재배농가의 경쟁력을 상당히 향상시킬 수 있다.

본 연구에서는 갈반병의 억제를 위하여 현장 적용에 강점을 가진 방안을 개발하는 데 목표를 두고 있다. 톨라신은 느타리버섯에 갈반병을 일으키는 세균성 독소 펩티드로서, 3단계의 활성화 과정을 통하여 세포독성을 나타냈고, 이중 톨라신 독소 여러 분자가 결합하여 활성화하는 분자다중화 반응은 세포독성의 핵심과정임을 확인하였다. 본 연구에서는 톨라신의

분자다중화를 포함한 활성화과정 저해를 통하여 갈반병 발생을 억제할 수 있는 방안을 개발하는데 첫째 목적을 두며, 이에 병행하여 갈반병 원인균을 근원적으로 제거할 수 있는 파아지를 자연중에서 분리하고 병원균 제거에 이용하는데 둘째 목적이 있으며, 이들을 상호병행 보완함으로써 완벽한 갈반병 방지 기술을 마련하는데 최종 목적이 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

○버섯은 다량의 생리활성 물질을 함유하고 있어 성인병 예방 및 항암효과가 높고, 열량이 낮아 다이어트 식품으로, 다기능 신선 식재료로 인정받고 있다. 그중 느타리버섯은 생산량이나 소비면에서 단연 1위를 차지하고 있으며, 일반 작물에 비하여 농가에 높은 소득을 보장하고 있어, 고소득 작물로 각광을 받고 있다. 1990년대 들어 생활수준 향상으로 느타리버섯의 수요가 증가하면서 재배면적과 생산량이 급격하게 증가하였으며, 1999년도에는 총 재배면적 780 ha에서 76,869톤의 느타리버섯을 생산하였다. 이 같은 생산량 증가는 계속되어질 것으로 예측되었으나, 이후 재배면적 및 생산량은 오히려 감소추세로 돌아섰다. 실제로 2009년도에 재배면적은 251 ha로 1999년도 최대치에 비하여 약 68%가 감소하였고, 생산량도 39,160 M/T으로 약 50%가 감소하였다(농림부 농림업주요통계).

○느타리버섯의 생산감소는 여러 가지 원인에 기인하나 중요한 이유 중의 하나가 갈반병의 빈번한 발생이다. 느타리버섯 재배는 높은 수익성에도 불구하고, 세균성 병해인 갈반병의 발생으로 매우 조심스럽게 이루어지고 있다. 갈반병은 양송이버섯이나 새송이버섯(큰느타리버섯), 팽이버섯 등에도 심각한 피해를 주고 있으며, 근래 개발된 각종 식용버섯중 조직이 부드러운 버섯류에도 피해가 예상되고 있다. 갈반병은 국내에서 세균성 갈색무늬병, 버섯 갈변병, 세균성 갈반병, 갈색점무늬병 등으로 불리고 있으며, 국외에서도 'Brown blotch disease'라는 이름으로 세계 각국에서 발생하며, 양송이를 주로한 인공재배 버섯에서 큰 피해를 끼치고 있다. 현재까지도 완벽한 갈반병의 예방이나 방제방법은 개발되지 않았으며, 갈반병은 일단 발생하면 추가적인 재배가 불가능할 정도로 피해가 극심하여 농가에서 느타리재배의 주요 기피원인이 되고 있다. 갈반병의 예방은 지하수의 철저한 살균과 재배사의 훈증소독, 비닐덮개 재배, 봉지재배, 병재배 방법에 의해 이루어지나, 일단 발병시 대책이 없는 실정이다. 다만, 실험적으로 버섯을 제거한 균상에 아그립토부라마이신 등 살균제나 항생제를 몇가지 사용한 예가 있으나, 버섯은 신선한 건강식품으로 항생제나 살균제와 같은 약제의 사용이 허용되지 않고 있다.

○본 연구중에 충북 음성군과 경기도 평택시, 화성시 등 지역의 버섯농가들을 방문하여 갈반병에 관련한 현장의 애로사항 및 문제점들을 파악하였다. 근래들어 병재배나 봉지재배를 통하여 갈반병의 발병이 크게 감소하였으나, 이러한 영농법으로 품질이 낮은 버섯을 생산함으로 오히려 재배농가는 소득이 낮아져 경영의 지속여부를 고민하는 단계에 있었다. 즉, 농가는 갈반병에 의한 느타리재배에 피해가 매우 심각하기 때문에 가격이나 생산성 면에서 불리함에도 병발생이 적은 병재배, 봉지재배 방법을 선택한 결과이다. 이것은 2000년 이후 생산량의 감소와도 연관이 있는 것으로 병재배 방법에 의해 생산한 느타리버섯은 기존의 균상재배법에 비교하여 줄기가 가늘고 색도가 떨어지며, 납품단가는 균상재배 제품의 1/3 수준으로 수익성에서 불이익이 심각한 형편이다. 그럼에도 불구하고, 병재배 영농법이 널리 사용되는 것은 가압멸균과정을 거침으로써 갈반병에 대한 안정성이 확보되기 때문이다. 물론 병재배 방법은 수확시기를 일정하게 조절할 수 있다는 장점이 있으나, 반면 1회의 수확으로 그친다는 단점이 있다. 그러나, 균상재배는 굵은 줄기와 짙은 버섯색, 좋은 맛과 질감, 5주기 수확을 통한 단위면적당 약 3배의 높은 수확량이 가능하며, 버섯농가의 수익을 이론적으로 9배이상 증가시킬 수 있다. 예로서, 수한느타리 품종은 가장 상품성이 우수하여 높은 수익이 보장되나 균상재배시 갈반병에 가장 민감한 품종이기도 하다.

○이상에서 밝혔듯이 갈반병의 해결은 버섯재배 농가에 안정한 소득을 보장할 뿐만아니라 나아가 수출을 포함하는 국제경쟁력을 높이는 방법이 될 것이다. 본 연구에서는 톨라신의 세포독성 작용에 필수적인 3단계 진행과정을 저해할 수 있는 방안을 마련함으로써, 갈반병 발병이나 확산을 억제하고 농민이 안전하게 느타리버섯을 재배하여 소득을 증대할 수 있도록 하려고 한다. 톨라신의 세포독성은 버섯세포막에 pore(이온채널)를 형성함으로써 나타난다. 따라서 pore 형성에 필수적인 톨라신 분자의 다중화(multimerization)를 억제하는 방법은 효과적인 세포독성 억제방안이다. 이 방법에 더불어 근원적으로 병원균의 생물학적 살상효과가 큰 여러 종의 박테리오파아지를 순수분리하였으며, 이들을 톨라신 독소 억제 방법과 병행하여 버섯재배사에서 사용한다면 완벽한 갈반병의 방제가 가능할 것이다.

2. 연구개발의 범위

○본 연구실에서는 갈반병의 발병원인을 밝히고, 발병억제 방안을 마련하기 위하여 톨라신 독소펩티드의 작용특성을 연구하여왔다. 갈반병은 *Pseudomonas tolaasii*라는 세균의 감염과 세균에 의해 생성되는 독소 펩티드인 톨라신의 버섯세포막에서 pore 또는 이온채널 형성, pore를 통한 물질의 확산이동, 이어지는 삼투압 교란으로 버섯 세포가 파괴되며, 결국

버섯조직을 괴사시키는 것으로 확인되었다. 갈반병은 병 발생 예측이 매우 어렵고, 한번 발생하면 빠르게 전파하여 재배상 또는 재배농가, 나아가 재배단지 전체로 번질 수 있는 특성을 갖고 있어, 심각한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못할 뿐만 아니라, 재배상의 오염과 폐기로 장기간 버섯재배를 불가능하게 한다.

○서구에서는 100여년 전부터 양송이버섯의 갈반병이 연구되어 왔다. 1991년 원인독소인 톨라신의 구조가 밝혀진 후, 톨라신은 세포막에 이온채널을 형성하여 세포를 파괴한다는 세포독성 작용기작이 제안되었다. 본 연구실에서는 2003년도에 처음으로 갈반병 원인독소 톨라신이 두 가지의 이온채널(pore)을 형성함을 증명하였다(Cho와 Kim, 2003). 이후 톨라신에 의하여 형성된 이온채널의 여러 가지 특성을 밝혀냈으며, 이 결과는 톨라신 펩티드가 버섯의 세포막에 이온채널을 형성하여 조직을 괴사시킨다는 그간의 제안에도 불구하고, 국제적으로 톨라신의 이온채널 형성에 관한 직접적인 증거를 보이지 못한 상황에서, 본 연구팀이 처음 전기생리학적 방법을 통하여 증명하였다는 데 그 의의가 크다고 할 수 있다.

○본 연구에서는 톨라신의 독성진행과정을 저해할 수 있는 방안을 마련함으로써 갈반병 발병이나 확산을 억제하여 농민이 안전하게 느타리버섯을 재배하여 소득을 증대할 수 있도록 하려고 한다. 특히 이온채널 형성을 위한 톨라신 분자의 다중화(multimerization)를 억제하는 물질들을 TIF(tolaasin inhibitory factor)라 명명하고 이들을 이용한 강력한 톨라신 독작용 억제방법을 개발하려고 한다. 더불어 근원적으로 병원균의 생물학적 살상효과가 큰 파아지를 순수분리하고 균상 및 재배사 환경에 적용한다면 병원균의 밀도를 병발생 유효농도 이하로 낮추어 병발생을 지속적이고 근원적으로 억제할 수 있을 것이다.

○본 연구를 통하여 개발한 TIF는 제재화하여 제품으로 개발할 예정이다. 이를 위하여 TIF의 작용특성을 분자수준에서 밝히고, 갈반병 원인균을 처리한 느타리버섯의 균상재배에서 갈반병이 억제되는 조건을 확인하며, 효과가 높은 TIF 물질에 대한 특허를 획득한 후, TIF를 시작품으로 개발할 것이다. 특히 제품개발을 위해서는 TIF의 보관, 운송중 안정성을 높여 활력을 지속적으로 유지할 수 있도록 산소나 빛, 온도, pH 등 외부 인자들의 효과를 측정하고 최적 조건을 결정할 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외의 기술개발 현황

○병원 세균인 *P. tolaasii*에 의해서 분비되는 톨라신의 일차 구조는 1991년 Nutkins 등에 의하여 처음으로 결정되었다(Nutkins 등, 1991). 이들은 톨라신 분자의 isoform으로 Tol-I 과 Tol-II를 분리하였고, 각각의 분자량은 1,985 Da과 1,941 Da이며 18개 아미노산으로 구성된 lipodepsipeptide임을 확인하였다. 톨라신은 N-말단이 β -hydroxyoctanoic acid와 acylation되어 봉쇄되어 있으며, C-말단의 lysine은 14번째의 D-allo-threonine과 lactone을 형성하여 환상결합하고 있는 것이 밝혀졌고, *P. reactans*과 대치배양시 흰색침강선(WLIP) 생성의 원인물질로 확인되었다. 이후 Shirata 등은 *P. tolaasii* 6041R에서 8가지 톨라신 동위체를 분리하였다(Shirata 등, 1995).

○톨라신의 이차구조 연구는 자외선분광분석계와 nmr을 이용하여 이루어졌으며, Ser³에서부터 Val⁸까지의 여섯 개의 연속적인 D-아미노산의 서열에 의해 지질막 환경에서 좌선성의 α -helix를 형성함이 밝혀졌다(Jourdan 등, 2003). C-말단 부근은 친수성의 아미노산을 포함하며, 이러한 서열특성으로 인해 톨라신의 α -helix가 극성 및 비극성의 양쪽성 특성을 갖는다. 이렇게 형성된 α -helix들은 생체막에 이온채널의 형성, 그리고 막구조의 파괴 등에 깊이 연관되어 있다. 현재, 유럽의 여러 나라에서 병원균에 관한 세균학적 연구와 2차 산물인 톨라신 독소 생성을 위한 유전자 특성 등의 다양한 연구가 진행되고 있다.

○파아지를 이용한 병원균 방제방법(phage therapy)은 최근 항생제내성 병원세균의 빈발에 따라 저항성 세균의 발생을 막기위해 나타난 친환경적 방제방법으로 고안되어 다양한 연구가 진행되고 있다(Matsuzaki 등, 2005). 파아지를 이용한 병원세균의 방제는 1980년대 많은 연구가 진행되었으나, 숙주병원균에 대한 파아지의 친화력이 너무 특이적이라서 병원균의 변이주 발생시에는 사용할 수 없다는 단점이 있어 널리 응용되지 못하였다. 최근 세균의 항생제 내성 증가와 함께 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법으로 파아지의 유용성이 부각되고 있다. 파아지는 유효한 항생제가 없는 병원세균에 효과가 있을 뿐만아니라 다당류의 biofilm을 형성하여 항생제의 침투가 용이하지 않은 세균도 효율적으로 사멸시킨다. 또한 항생제를 사용할 수 없는 식중독균인 *Listeria* 균(Leverentz 등, 2004)이나 *E. coli*. O157 균의 멸균에도 FDA로부터 사용이 허용되었다.

제 2 절 국내의 기술개발 현황

○노타리버섯의 갈반병 연구는 몇몇 연구실에서 수행되어 왔으나 효과적인 해결방안은 마련하지 못하였다. 특히, 병원균과 경합하는 길항균을 이용한 갈반병의 억제방안이 연구되었으나 비닐멀칭 재배법과 같이 효과는 크지 않았다. 그러나, 재배법의 개선으로 습도나 온도 조절을 통하여 발병이 억제되는 방안이 제안되었으며, 이 방법은 안전을 보장하지 못하였지만 병재배에 적용시 효과적이었다. 따라서 필요성에 의해 병재배 방법을 개발하였고, 병재배 방법은 갈반병의 예방에 큰 효과를 보였으나 품질 및 생산성의 저하로 소득이 감소하는 단점이 있다.

○갈반병의 근원적 해결을 위한 병원균의 방제방법은 다양하게 시도되었지만 신선식품인 버섯에 항생제등의 투여가 용인되지 않아 해결점을 찾지 못하고 있다. 본 연구실에서는 식품첨가물중에서 다양한 TIF를 개발하여 특허를 신청하였고, 이를 이용한 발병억제를 시도하여 병원균주의 타입에 따라 긍정적인 효과를 확인하였다. 이들 TIF성분은 ppm 단위의 미량이 이용되어 갈반병균의 독소를 무독화할 수 있었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 톨라신의 세포독성 및 톨라신 저해제(TIF)의 효과

1. 톨라신 저해제(TIF)의 탐구 및 저해효과 검증

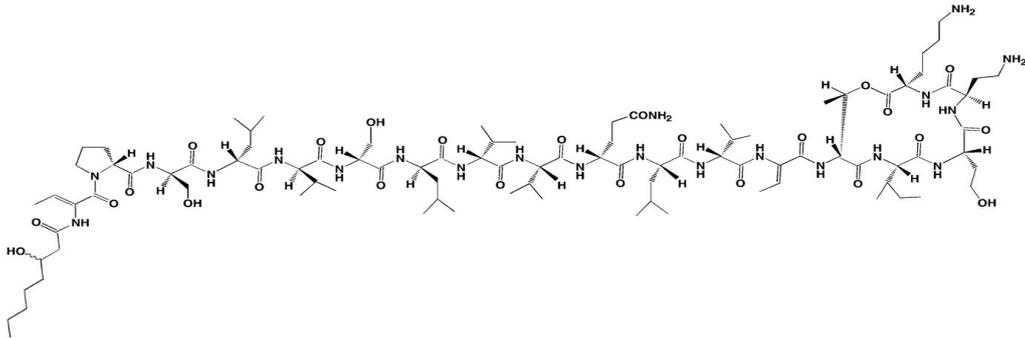
(1) 갈반병의 특성 및 연구진행 내용

톨라신에 의한 버섯조직의 괴사기작은 버섯세포막에 pore를 형성하여 삼투압을 교란함으로써 세포를 파괴하는 데 기인한다. 톨라신의 구조는 1991년 Nutkins 등에 의하여 처음으로 결정되었다<그림 1>. 최근 Shirata 등은 *P. tolaasii* 6041R 균주에서 8가지 tolaasin isoform(엄격히 analogue)을 분리하였다. 이들 톨라신 isoform들은 다른 생체막 pore-형성 독소펩티드들과 유사한 작용과정을 거쳐 세포독성을 나타내는 것으로 여겨지고 있다.

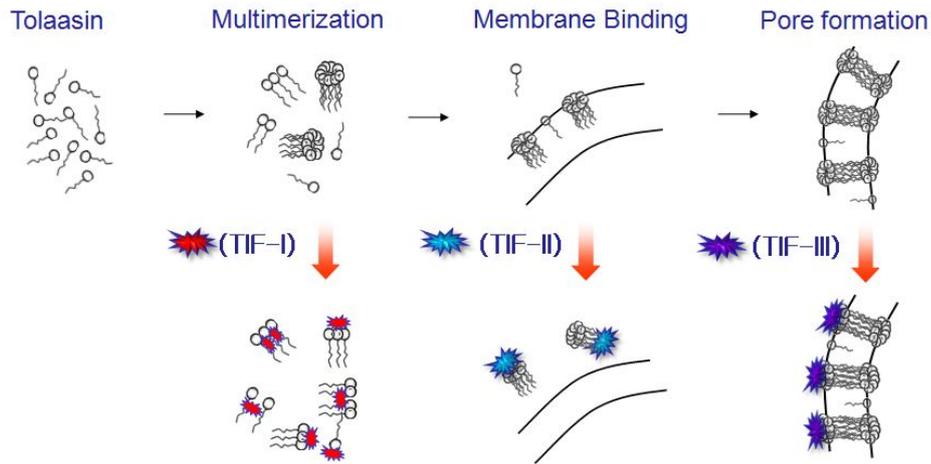
제 1 세부과제 연구에서는 제 2 세부과제와 연계하여 톨라신의 작용특성을 밝히고, 버섯조직 파괴를 억제할 수 있는 방안을 마련하여 갈반병의 피해를 경감시키는데 목적을 두고 수행되었다. 즉, 톨라신의 세포독성 작용에 필수적인 3단계 진행과정을 저해할 수 있는 물질을 탐구하였고, 특히 톨라신의 세포독성에 필수적인 이온채널 형성을 위한 톨라신 분자의 다중화(multimerization)를 억제하는 물질이 강력하게 톨라신의 세포독성을 억제하는 것을 발견하였으며, 이들의 효과를 검증하고 특허를 출원하였다.

제 1 세부과제와 제 3 세부과제는 근원적으로 병원균을 재배사 주변에서 제거하거나 밀도를 낮추기 위하여 병원균을 특이적으로 살상하는 여러 종의 파아지를 순수분리하였으며, 이들을 버섯재배사에서 병원균과 함께 처리하였을 때, 갈반병 방제에 우수한 효과가 있음을 확인하였다. 2년차 연구를 진행하던 중, 제 3세부과제 책임자의 퇴직에 따른 세부연구과제 중단으로 협동과제의 형태로 세부책임자를 변경하여 연구를 계속 진행하였다. 결과적으로 분리한 파아지의 병원균 사멸효과는 생각보다 탁월하게 평가되었기에 실용화를 기대하였으나, 파아지를 현장에 적용하기 위해서는 몇 가지 해결하여야 하는 문제점이 나타났다. 파아지를 성공적으로 실용화하기 위해서는 무엇보다도 파아지의 숙주병원균에 대한 높은 특이성이 문제가 된다. 즉, 파아지의 효과는 오직 특이적인 숙주병원균에만 나타나기 때문에 실용화를 위해서는 갈반병 및 이와 유사한 병을 유발할 수 있는 모든 병원균의 특성을 파악하고, 각각의 병원균에 특이적인 파아지들을 분리하여 혼합사용하는 것이 필수적이며, 이에 대한 연구를 진행하고 있다.

본 연구를 통하여 얻어진 두 가지 연구결과인 톨라신 저해제와 병원균 사멸용 파아지는 모두 균상재배에서의 버섯재배를 통하여 효과가 탁월함을 확인하였다. 파아지의 실용화는 좀더 변이균들의 종류에 따른 추가적인 연구가 수행되어야 하나, 톨라신 저해제는 보관 및 유통과정 중 안정성까지 검토되고 특허 등록을 앞두고 있으며 시제품을 이미 제작하여 실용화에 근접하여 있다.



<그림 1> 톨라신(Tolaasin I)의 구조.



<그림 2> 톨라신 작용기작과 각 단계를 저해하는 TIF 모델.

(2) 톨라신 저해제 TIF 탐색 및 효과검증

톨라신에 의한 버섯세포나 적혈구 세포막 파괴(용혈활성)는 갈반병균에 의해 분비되는 펩티드 독소인 톨라신이 버섯의 세포막에 결합하고 막에서 다중체를 형성하여 이온채널로 발전하면서 이루어지는 과정이다. 용액중 수용성으로 존재하는 톨라신 펩티드 독소는 세포막에 도달하면 소수성 부분이 막에 유입된다. 버섯세포막에서 톨라신은 이온채널을 형성하고, 막을 경계로 이온이동을 유발하며, 삼투압을 교란하여 세포를 파괴하는 순서로 세포독성을 보인다. 그간에 본 연구실에서 밝힌 톨라신의 막결합 및 이온채널 형성은 다음의 3 단계를 통하여 일어남을 확인하였다<그림 2>.

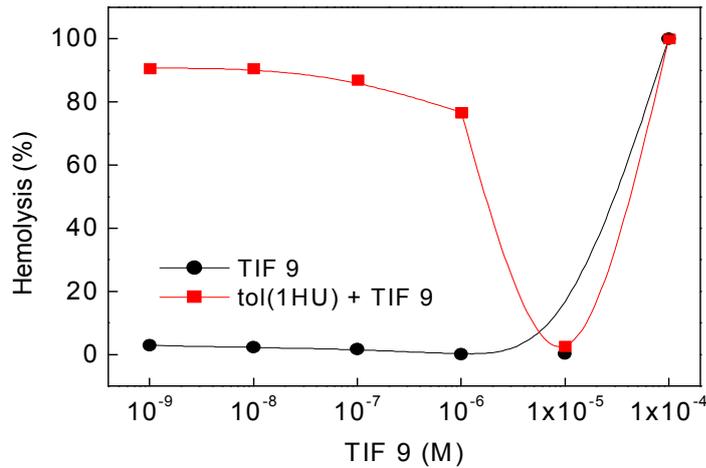
- ① 톨라신 monomer들의 용액 내 다중체 형성 (multimerization).
- ② monomer나 다중체 상태로 막에 결합 (membrane binding).
- ③ 막에 유입된 톨라신의 재조합으로 이온채널 형성 (pore formation).

<표 1> 톨라신 용혈활성 저해 특성을 갖는 다양한 종류의 식품첨가물 및 TIF 종류.

종류	TIF
자당유도체	TIF-9, TIF-11, TIF-12, TIF-13
폴리글리세린유도체	TIF-4, TIF-10, TIF-14, TIF-16
글리세린지방산유도체	TIF-6, TIF-7
소르비탄지방산유도체	TIF-1, TIF-2, TIF-3
스테아린지방산에스테르계	TIF-8
중쇄지방산트리글리세라이드	TIF-15
유기산모노글리세라이드	TIF-5

제 1차 년도의 연구를 통하여 위의 단계별 저해요인을 발굴하였고, 이들을 Tolaasin Inhibitory Factor(TIF)라 명명하였으며, 각 단계별 저해물질을 선별하여 TIF-I, II, III로 구별하고 각각의 저해특성을 조사하였다. 버섯은 식품으로서 화학물질의 사용이 금지되어있기 때문에 TIF 후보물질의 선별은 우선적으로 식품에 사용이 가능한 식품첨가물을 대상으로 하였으며, 각 단계별 기작 특성에 따라 효과를 보이는 총 7종류의 식품첨가물을 선별하였다. 2차 년도의 연구에서는 이들 물질이 톨라신을 저해하는 특성을 자세히 조사하였고, 이들의 상호 상승작용을 조사하여 시너지 효과가 있음을 확인하였다. 이 결과를 통하여 TIF의 유효 농도를 크게 낮출 수 있었고, 이것으로 실용화를 위한 효율증대 효과를 얻었다. 3차 년도의 연구에서 느타리버섯을 재배하며 갈반병을 유발하고, 동시에 처리한 TIF의 효과를 검증하여 좋은 결과를 확인하였다. 가장 좋은 효과는 주로 톨라신 다중체형성을 저해하는 작용을 갖는 물질들에서 얻어졌으며, 사용농도는 매우 낮은 농도였다. 톨라신의 활성화 단계별 사용한 TIF 후보물질은 다음 세가지 부류로 나누어졌고, 이들중 가장 효과가 높은 식품첨가물들과 TIF 명칭을 아래의 <표 1>에 정리하였다.

- (1) 식품첨가물, 유기화합물 등.
- (2) 식품첨가물, 유기산, 염기 물질 등.
- (3) 이온성 물질, 고분자 식품첨가물질 등.

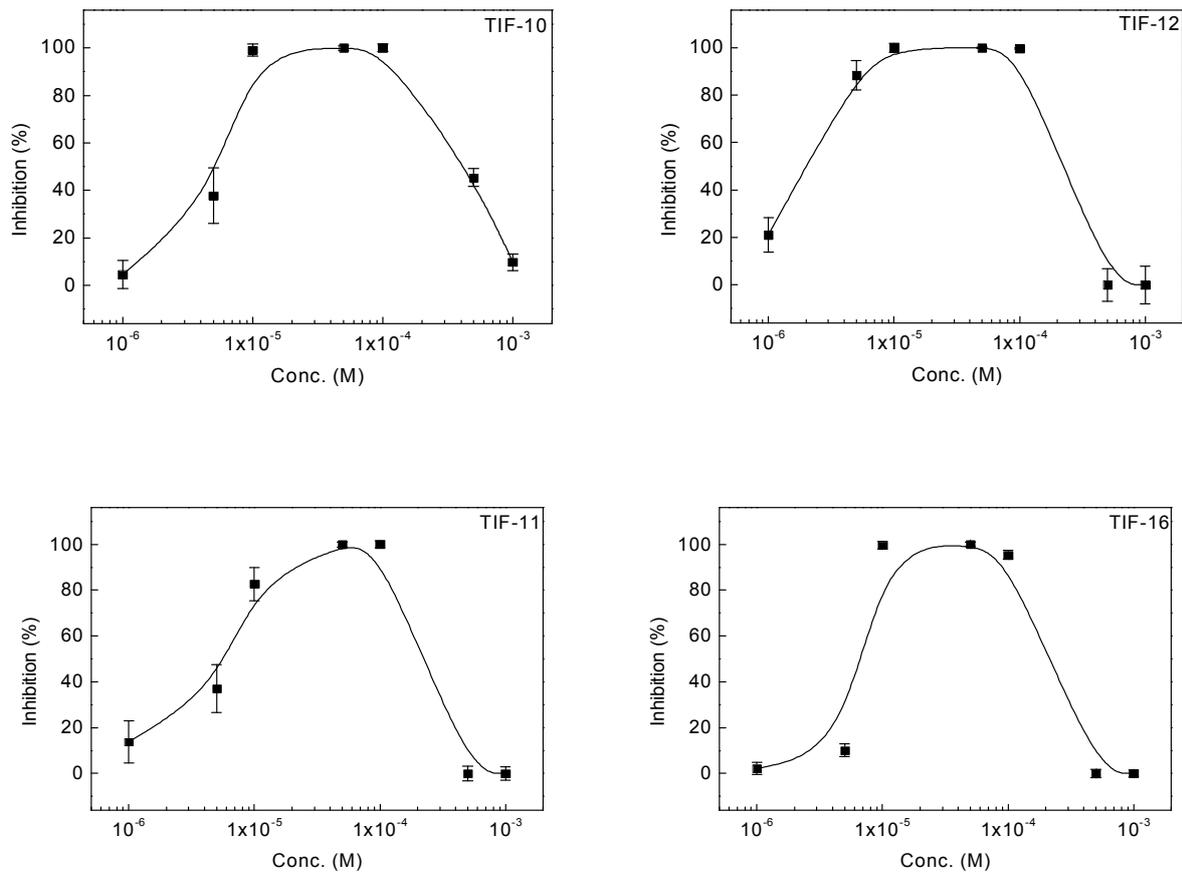


<그림 3> TIF에 의한 톨라신 용혈활성 저해.

(3) TIF의 톨라신 저해농도 측정

톨라신을 저해하는 TIF의 저해농도를 측정하기 위하여 각각의 TIF를 10^{-3} 에서 10^{-9} M까지 희석하며 TIF농도에 따른 톨라신의 용혈활성 저해여부를 측정하였다. 톨라신의 활성을 저해할 것으로 예측되었던 첨가물들은 모두 저해효과를 보였지만, 톨라신 저해의 강도는 성분에 따라 약간의 차이를 보였다. 그러나 대부분 10^{-4} - 10^{-5} M의 농도범위에서 톨라신의 세포독성을 저해하였으며, 10^{-4} M에서는 톨라신의 독성을 거의 완전히 저해하였고, 종류에 따라 최저 10^{-3} M에서 최고 10^{-6} M의 유효농도 범위를 나타내었다. TIF 후보물질은 종류에 따라 10^{-3} M 이상의 농도에서 오히려 용혈현상이 더 크게 일어나기도 하였는데, 이는 식품첨가물인 TIF 후보물질이 고농도에서는 오히려 적혈구 세포막의 구조를 파괴하거나 세포를 죽이는 용혈을 일으킴으로써 나타나는 현상이다.

<그림 3>은 TIF 후보물질이 톨라신의 독성을 저해하는 효과를 나타냈다. TIF-9는 10^{-5} M의 농도로 처리하였을 때, 톨라신의 용혈활성을 완벽하게 저해하였다(■). 이러한 TIF의 효과는 갈반병을 유발하는 톨라신의 세포독성을 완전히 저해하는 것으로 기대가 컸으나, 10^{-4} M 이상의 농도에서는 오히려 TIF 자체가 세포막을 교란하여 용혈을 유발하였다(●). 따라서 TIF-9의 경우는 톨라신의 활성저해제로서 적합성이 떨어지는 것으로 판정하였다. 좀 더 넓은 농도범위에서 톨라신의 독성을 저해할 수 있는 TIF 후보물질을 탐색하였고, 자당유도체 식품첨가물인 TIF-11과 TIF-12, 폴리글리세린 유도체인 TIF-10과 TIF-16의 4종류를 선발하였다.

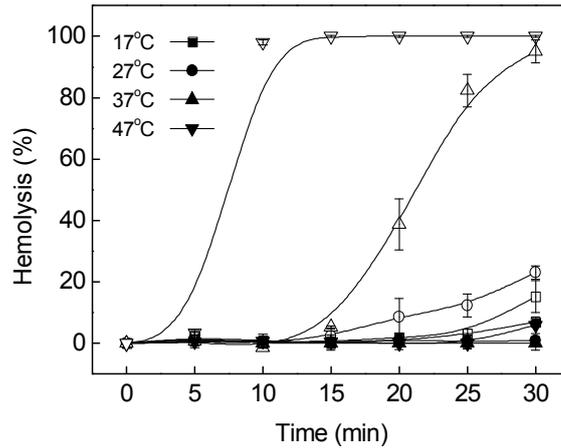


<그림 4> TIF 종류에 따른 톨라신 용혈활성 저해효과.

<그림 4>는 선발한 4가지 TIF들의 농도에 따른 톨라신 저해활성을 나타냈다. 톨라신 독소의 세포독성을 저해하는 TIF의 유효농도를 측정하기 위하여 각각을 10^{-3} 에서 10^{-6} M까지 희석하며 톨라신의 용혈활성 저해여부를 측정하였을 때, 저해의 강도는 TIF에 따라 차이를 보였다. 그러나, 대부분 10-100 μ M (10^{-4} - 10^{-5} M)의 농도범위에서 톨라신의 세포독성을 저해하였으며, 10^{-4} M에서는 톨라신의 독성을 거의 완전히 저해하였고, 종류에 따라 최저 10^{-3} M에서 최고 10^{-6} M의 유효농도 범위를 나타내었다. TIF-12의 경우 가장 넓은 범위의 농도인 5-100 μ M에서 100% 저해효과를 보였다. 그러나, 모든 종류에서 농도를 높였을 때, 효과는 급격히 감소하였는데, 이것은 TIF 후보물질이 식품첨가용 계면활성제로서 높은 농도에서 적혈구 세포막을 불안정하게 함으로써 나타나는 현상이다. 그러나, TIF를 생육한 버섯에 처리시 버섯 세포는 적혈구와 달리 세포벽 등의 역할로 TIF의 고농도효과는 감소된 것으로 여겨진다.

이와 같은 방법으로 위의 <표 1>에서 제시한 식품첨가물들의 효과를 측정하였으며, 이들

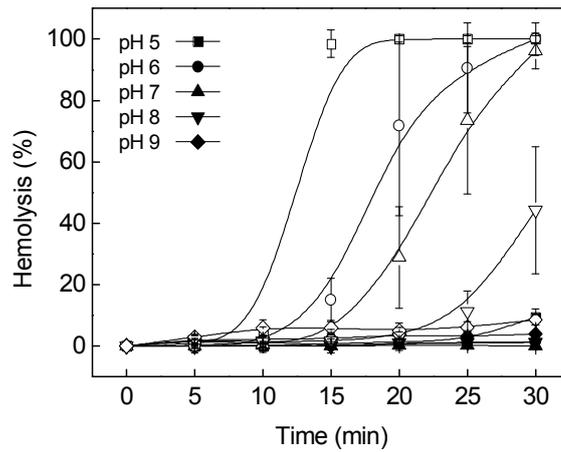
중 다수가 TIF로서 가능성을 보였다. 만약 이들을 버섯재배사에서 처리할 때 처리 조건과 환경을 변화하여 준다면 더 낮은 농도에서 특이성 높게 톨라신의 독성을 저해할 수 있을 것으로 여겨진다.



<그림 5> 온도 변화에 따른 TIF-16의 용혈활성 저해효과.
(open symbol, tolaasin only; filled symbol, tolaasin+TIF)

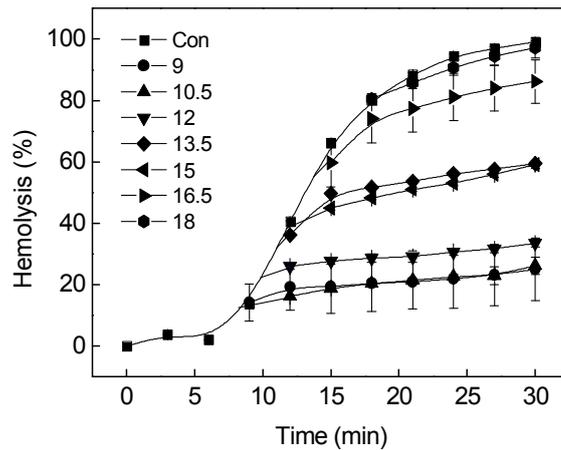
(4) TIF의 처리조건에 따른 효과

톨라신의 세포독성 저해효과를 나타내는 여러 가지 TIF 중에서 우수한 효과를 보이는 TIF-16을 대상으로 온도와 pH 변화에 따른 용혈활성 저해효과를 측정하였다. 용혈을 100% 저해하는 농도인 10^{-5} M의 TIF-16을 처리하였을 경우, 온도와 pH의 변화에도 일정하게 용혈현상을 저해하는 안정적인 효과를 보였다. 먼저, <그림 5>에서 톨라신 1 HU를 온도별로 처리하였을 경우, 27°C 이상의 온도에서 용혈활성이 관측되었으며(open symbol), 온도가 높아질수록 톨라신의 용혈활성이 높아지며 낮은 온도에서는 용혈활성이 낮아짐을 확인하였다. 이것은 기존의 연구에서 낮은 온도에서 톨라신의 막결합 성질이 감소하여 나타난 것으로 확인하였다(Cho 등, 2010). 한편, 톨라신과 TIF-16을 동시에 처리하였을 때, 톨라신에 의한 용혈활성은 완전히 저해되어 가장 큰 용혈활성을 보였던 47°C에서도 용혈이 저해되었고, 측정된 모든 온도범위에서 TIF-16의 저해효과가 나타났다(filled symbol).



<그림 6> pH 변화에 따른 TIF-16의 톨라신 용혈활성 저해효과.
 (open symbol, tolaasin only; filled symbol, tolaasin+TIF-16)

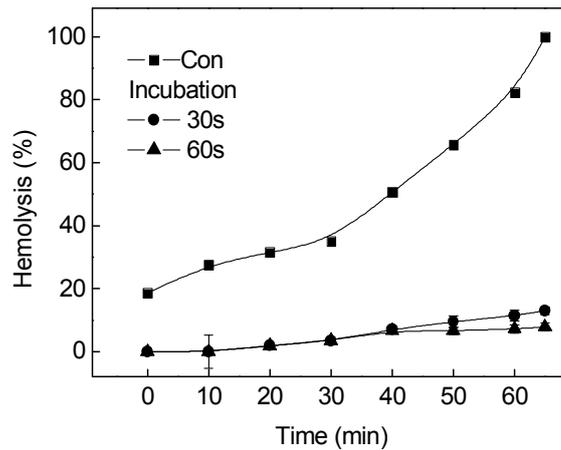
한편, pH 변화에 따른 TIF 효과 측정에서는 pH 9를 제외한 모든 pH 조건에서 톨라신의 세포독성이 관측되었으나(open symbol), TIF 처리시 모든 pH 범위에서 용혈활성은 관측되지 않아 TIF가 완벽하게 톨라신의 독성을 저해함을 확인하였다<그림 6>. 톨라신의 세포독성은 pH가 낮을수록 증가하나, pH 5에서는 적혈구 스스로 용혈되는 것을 관측하여 톨라신의 효과라고 볼 수는 없다(Kim 등, 2007). 그러나 본 결과에서는 TIF-16을 가하였을 때, 낮은 pH에서 적혈구 자체의 용혈도 저해됨을 확인할 수 있었다. 이것은 TIF가 낮은 농도에서 pH가 낮을 때 세포막을 안정화시킬 수 있다는 가능성을 보인 것이다. 결론적으로 본 결과는 TIF-16이 온도와 pH에 관계없이 톨라신의 용혈활성을 저해하며, TIF-16을 이용한 시제품 생산과 현장적용에 있어 높은 효과를 기대할 수 있음을 보여준다.



<그림 7> TIF-16의 처리 시점에 따른 톨라신 용혈활성 저해시험.

TIF-16의 처리 시점에 따른 용혈활성 저해효과를 측정하였다. 톨라신과 적혈구를 사전 배양하여 톨라신이 적혈구 막에 완전히 결합하게 한 후, 용혈이 일어나기 시작하는 시점인 처리 후 9분부터 1.5분 간격으로 TIF-16을 첨가하여 TIF처리 시점 변화에 따른 용혈저해 효과를 측정하였다. <그림 7>에서 관측되었듯이 TIF 처리 전 사전배양에 의하여 톨라신이 적혈구 막에 채널을 형성하였고, 이미 용혈현상이 일어나고 있음에도 불구하고, 약 50% 미만의 용혈이 진행된 경우까지는 TIF-16을 처리하였을 때, 즉시 용혈이 중지되고 더 이상 일어나지 않는 저해를 보였다. 용혈이 약 60% 이상 진행시에는 TIF 처리에 의하여 용혈이 중지되지는 않았으나 대조실험에 비하여 지연됨을 확인할 수 있었고, 80%이상의 용혈이 진행된 경우에는 TIF의 처리효과는 나타나지 않았다.

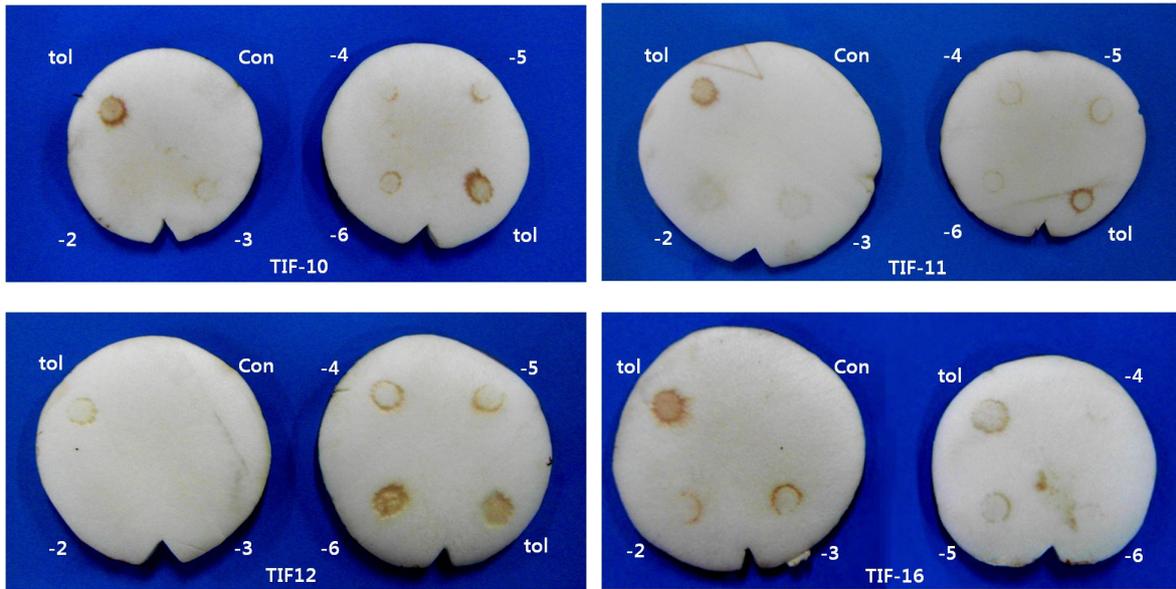
이러한 결과는 TIF-16이 톨라신의 다중체 형성과정이나, 형성된 톨라신 다중체가 적혈구 막에 결합하는 과정은 물론 이미 형성된 이온채널의 활성을 막는 다는 것을 의미한다. 자세한 분자기작은 더 많은 연구를 필요로하나 TIF-16은 제 2 세부과제의 결과에서 보였듯이 톨라신 분자와 결합하여 단일체의 다중체 형성을 막고, 기 형성된 다중체와 결합하여 다중체를 해체하는 방법으로 톨라신의 독성을 막을 것이다. 다만, 이미 세포막에 결합하여 pore를 형성한 톨라신 다중체는 다중체를 막내부에서 해체하거나 기존에 생성된 pore의 어느 부분에 결합함으로써 pore의 이온통로를 변형시키거나, 또는 통로부분에 직접결합하여 통로를 plugging 방법에 의해 저해할 수도 있을 것이다.



<그림 8> 사전배양으로 생성된 톨라신 채널에 처리한 TIF-16의 비가역적 결합.

앞에서 TIF는 톨라신 이온통로에 결합하여 이온확산을 차단하고 톨라신의 독성을 저해함을 밝혔다. TIF의 톨라신 통로결합이 가역적인지 여부를 확인하기 위하여 TIF-16을 톨라신 통로에 결합시킨 후, washing이 가능한가를 측정하였다. 먼저, 톨라신과 적혈구를 사전 배양하여 톨라신이 적혈구에 완전한 결합을 이루도록 하고, 10^{-5} M의 TIF-16를 첨가하여 각각 30초, 60초간 결합하도록 하였다. 각 배양시간 후, 원심분리하여 상정액을 제거함으로써 적혈구와 결합되지 않은 여분의 톨라신 및 TIF-16을 모두 제거하고, 적혈구를 새로운 완충액에 재현탁하여 시간에 따른 적혈구 파괴를 관찰하였다<그림 8>.

TIF를 처리하지 않은 경우, 신선한 완충액에 톨라신이 결합한 적혈구를 재현탁하면 시간의 경과에 따라 적혈구가 점차 파괴되어 용혈현상이 나타났다. 그러나, TIF-16을 30초와 60초간 사전 결합하게 하였을 때는 새로운 완충액에 톨라신과 TIF가 결합한 적혈구를 현탁하여도 용혈현상은 거의 완벽하게 저해되었다. 이는 일시적으로 톨라신이 생성한 이온통로를 막으나, 원심분리 시 제거되어 그 기능을 상실하는 PEG-2000의 효과와는 다른 것이다(Cho 등, 2010). 즉, TIF-16은 톨라신에 의해 생성된 세포막의 톨라신 통로를 일시적으로 막는 것이 아니라 통로에 비가역적으로 결합하여 지속적인 톨라신 저해효과를 내는 것이며, 또한 그 결합은 매우 빠를 것으로 생각된다.

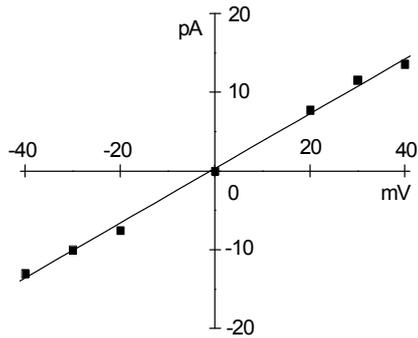


<그림 9> 버섯조직 함몰검정법을 이용한 TIF의 톨라신 저해효과.

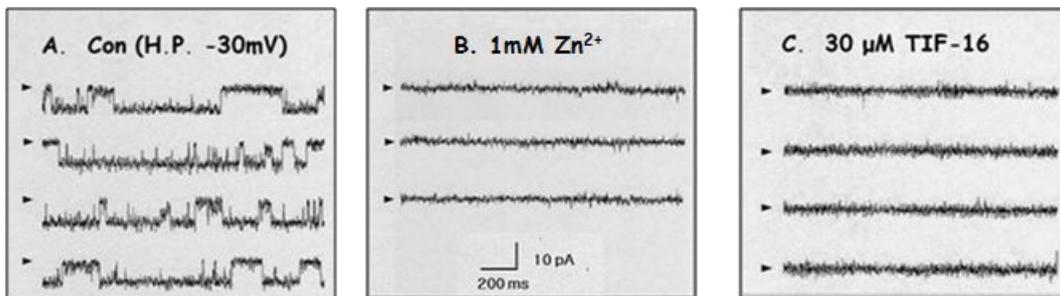
tol, tolaasin only. TIF-16 처리농도 10 mM에서 1 μ M 범위를 -2에서 -6까지로 표기함.

(5) 버섯함몰검정법에 의한 TIF 효과

적혈구를 이용한 용혈활성 측정에서, TIF는 10-100 μ M 농도범위에서 톨라신의 세포독성을 100% 저해함을 확인하였다. TIF의 우수한 세포독성 억제작용이 실제 버섯조직에서 나타나는지 여부를 버섯조직 함몰검정법(Pitting test)으로 확인하였다<그림 9>. 양송이버섯의 자실체 상부를 잘라 평면으로 만든 후, 톨라신을 버섯의 절개부위 표면에 처리하였을 때, 해당부위의 조직세포가 파괴되면서 확연하게 갈반이 나타나 버섯표면이 함몰되는 것을 확인하였다(tol). 여기에 TIF를 10^{-2} - 10^{-6} M 농도로 처리하였을 때, TIF-10과 TIF-11의 경우 0.1-10 mM 범위에서 갈반형성이 완전히 저해되었고, 1 μ M까지도 갈반의 형성이 뚜렷하게 저해되었다. TIF-12의 경우는 1-10 mM 범위에서 톨라신에 의한 함몰이 완전히 억제되었다. TIF-16 역시 톨라신을 처리하였을 때, 보다 현저한 갈반의 생성억제를 확인할 수 있었다. 갈반억제능이 가장 우수한 TIF-12의 경우 처리농도로 환산할 때, 톨라신의 세포독성을 저해하여 갈반형성을 완벽하게 막아주는 TIF의 농도는 5-60 ppm 범위로 매우 낮은 농도에서 갈반병을 방제할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이러한 결과는 적혈구를 이용한 용혈활성의 저해효과에서와 마찬가지로 TIF는 버섯표면에서 톨라신에 의한 갈반 및 함몰을 억제하는 능력이 우수함을 나타낸다.



<그림 10> 톨라신 채널의 전류-전압 곡선.



<그림 11> Zn²⁺와 TIF-16의 톨라신 이온채널 저해효과.

(A) 톨라신 채널의 연속기록,

(B) 1 mM Zn²⁺의 저해효과,

(C) 30 μM TIF-16의 저해효과.

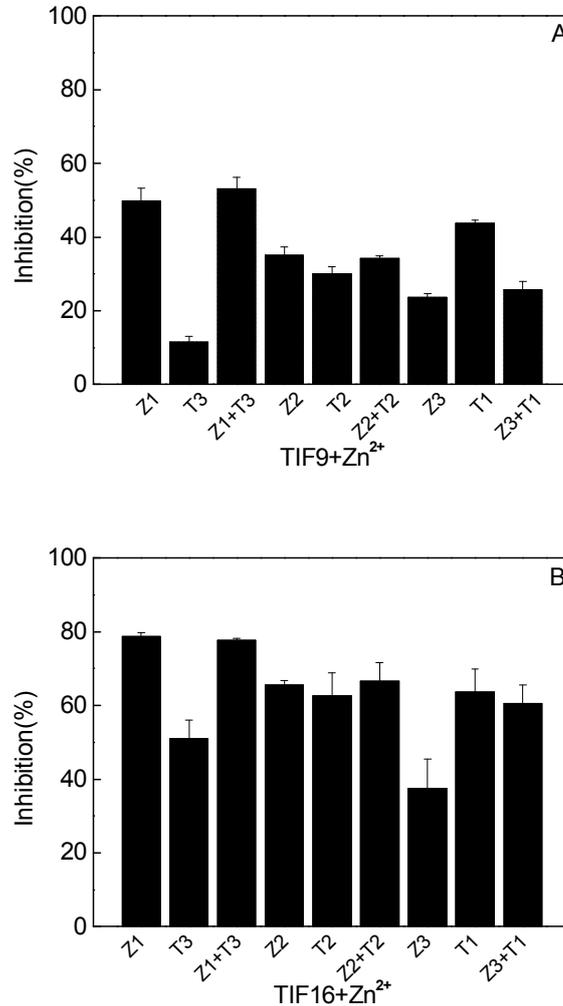
(좌측 화살표는 채널이 닫혀 전류가 흐르지 않는 상태임.

막전위 -30 mV에서 채널전류는 음의 방향 전류임)

(6) 톨라신 채널에 대한 TIF의 효과

본 연구팀은 톨라신이 인공지질이중막에서 전기전도도 100 pS과 500 pS의 두 가지 전도도를 갖는 이온채널을 형성한다는 것을 보고하였다(Cho와 Kim, 2003). 두 가지 채널 모두 유일한 저해제로 알려진 Zn²⁺에 의하여 저해됨을 보였다. <그림 10>은 톨라신에 의하여 생성된 이온채널의 전압변화에 따른 전류변화를 보여준다. 톨라신 이온채널은 이미 보고한 바와 같이 막전압의 증가에 따라 이온채널을 통과하는 이온에 의한 전류가 비례적으로 증가하는 채널이다. 톨라신 이온채널에 Zn²⁺와 TIF-16을 각각 처리할 경우 <그림 11>과 같이 Zn²⁺는 최종농도 1 mM 에서, TIF-16은 최종농도 30 μM에서 채널 활성을 완벽히 저해함을 확인하였다. Zn²⁺와 TIF-16 모두 낮은 농도에서 채널활성을 저해하였지만, 특히, TIF-16의 경우 1/30의 낮은 농도로 톨라신채널 활성을 저해하였으므로, 기존에 알려진 Zn²⁺에 비해서

효과적인 저해제라 할 수 있다.



<그림 12> Zn²⁺와 TIF의 동시 첨가에 따른 톨라신의 용혈활성 저해효과.

Z1, Z2, Z3; 용혈활성을 80, 60, 40% 저해하는 Zn²⁺의 농도.

(A) TIF-9과 Zn²⁺의 동시처리. (B) TIF-16과 +Zn²⁺의 동시처리.

(7) Zn²⁺와 TIF 동시 처리 효과

인공지질이중막에서 관측한 톨라신채널의 활성화는 TIF에 민감하게 저해됨을 확인하였다. 유기화합물인 TIF와 Zn²⁺의 결합부위나 저해기작은 서로 다를 것으로 생각된다. 따라서, Zn²⁺와 TIF의 상호연관성을 조사하였으나, 이들 두 가지 저해제중 한 가지 처리로 톨라신 채널은 쉽게 저해되어 추가적인 처리의 효과를 정량적으로 평가하는데 어려움이 있었다.

Zn²⁺와 TIF 혼합효과에 대한 평가는 적혈구를 이용한 용혈활성 측정으로 이루어졌으며,

결과는 <그림 13>에 보였다. 두 가지 저해제를 혼합하여 처리할 경우 용혈활성의 저해 효과는 주로 Zn^{2+} 에 의하여 좌우되는 것을 확인하였다. 톨라신 용혈활성 저해를 나타내는 Zn^{2+} 와 TIF의 다양한 농도를 각각 Z1, Z2, Z3 와 T1, T2, T3로 나타내어 Z1+T3, Z2+T2, Z3+T1의 조합으로 혼합할 때 저해효과를 상호 비교하였다. 실험 결과의 경향을 분석하여 보면, Zn^{2+} 와 TIF의 혼합처리 시, 저해효과는 주로 Zn^{2+} 단독의 저해효과와 유사한 정도를 보였다. 즉, TIF의 저해 효과가 Zn^{2+} 에 비해 현저히 우수하다더라도, Zn^{2+} 와 동시 처리하였을 경우 톨라신 용혈활성 저해효과는 Zn^{2+} 만을 첨가하였을 때와 매우 유사하게 나타남을 확인할 수 있다. 이 경우에는 Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 에서 관측되었던 부가적이거나 상승적 효과는 나타나지 않았다.

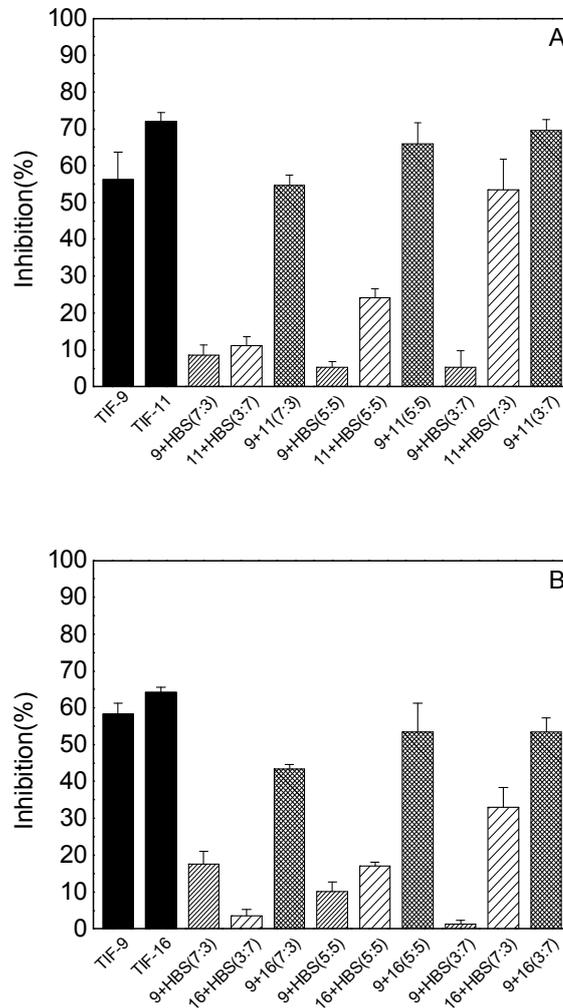
이러한 결과는 Zn^{2+} 와 TIF의 톨라신 분자와의 결합부위가 위치적으로 매우 가깝거나 또는 Zn^{2+} 의 결합에 따른 톨라신의 구조변화가 TIF의 추가적인 결합을 방해하는 등의 기작을 의미하는 것이다. Zn^{2+} 와 여러 TIF 종류별 혼합처리 효과를 분석하였을 때, 톨라신 채널에 대한 친화력은 Zn^{2+} 가 가장 큰 것을 알 수 있었다. Zn^{2+} 혼합에 따른 TIF 자체 저해효과의 크기로 볼 때, Zn^{2+} 에 의해 가장 영향을 많이 받은 TIF-9이 톨라신 채널에 대한 친화력이 가장 약하다는 것을 유추할 수 있다. Zn^{2+} 와 TIF의 동시 처리를 통하여 확인한 톨라신 채널에 대한 TIF의 결합친화력 순서는 $Zn^{2+} > TIF-11, TIF-16 > TIF-9$ 이었다.

(8) TIF 종류별 혼합에 따른 상승효과

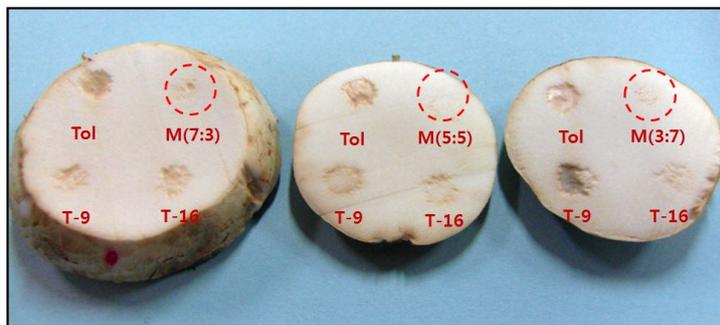
종류가 다른 2가지 TIF를 혼합하여 처리함으로써 톨라신의 세포독성을 보다 효과적으로 저해할 수 있는지 여부를 TIF의 저해효과를 정량적으로 분석하여 평가하였다. <그림 13A>는 TIF-9와 TIF-11, <그림 13B>는 TIF-9와 TIF-16을 혼합하여 처리하였을 경우 각각을 개별적으로 처리할 경우보다 훨씬 효과적으로 톨라신의 용혈활성을 저해하였다. TIF-9는 9, TIF-11은 11, TIF-16은 16로 나타냈으며, TIF의 혼합에 따른 상승효과를 확인하기 위하여 처리농도를 용혈활성의 50-70%를 저해하는 TIF 농도 구간으로 하였다. TIF의 최종 처리량은 10으로 표기하였고, 3, 5, 7은 상대적 처리량이다. 예를 들어, <그림 13A>의 경우, 용혈활성의 약 55%를 저해하는 TIF-9의 양을 10이라 하고 이것의 0.7배를 처리하였을 때를 9(7)로 나타내었으며, 이때 두 번째 TIF를 첨가하지 않는 경우 해당량에 맞는 DDW를 30% 첨가하여 약 55%를 저해하는 TIF-9의 양의 70%와 같게 하였다.

결과를 살펴보면, 9(10)는 약 55%의 용혈활성 저해 효과를 나타내는데 반하여, 9(7)은 10%이내의 약한 용혈저해효과를 보였다(9+HBS, 7:3). 그러나 약 10%의 약한 용혈활성저해를 나타내는 11(3)을 혼합하였을 때는 각각의 용혈활성 저해도를 더한 약 20%를 넘어서는 55% 정도의 큰 저해효과를 나타냈으며, 혼합비를 달리하였을 때도 공통적으로 TIF 효과의 상승작용을 확인할 수 있었다. 즉, TIF가 톨라신에 결합하는 부위나 기작이 종류마다 차이가

있어 서로 보완적이며, TIF-9와 TIF-11, TIF-9와 TIF-16은 톨라신 저해작용에서 서로 상승작용을 나타냄을 확인하였다.



<그림 13> TIF의 혼합에 따른 상승작용.



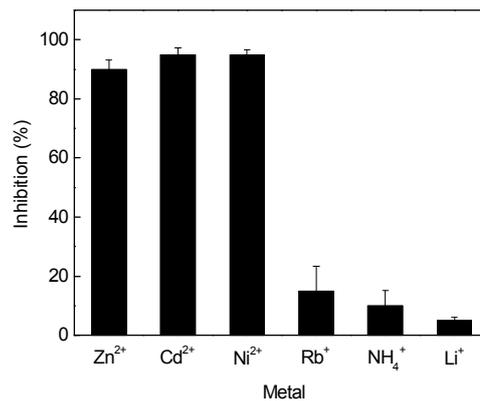
<그림 14> 버섯함몰검정법을 통한 TIF의 혼합에 따른 상승작용.

원 내부는 두 가지 TIF를 혼합하여 처리시 갈반이 억제된 모양임.

(9) 버섯함몰검정법에서의 상승효과 측정

용혈활성 저해에서 TIF 혼합처리에 따른 상승효과는 버섯함몰검정법(Pitting Test)을 통해서도 확인하였다. <그림 14>는 TIF-9와 TIF-16을 각기 다른 비율로 혼합 처리하여 툴라신의 버섯세포독성 저해실험을 한 것으로, 각각을 처리하였을 때보다 혼합하여 처리하였을 때 현저한 갈반 억제를 확인할 수 있다. TIF-9와 TIF-16을 7:3, 5:5, 3:7의 조합으로 혼합하여 처리한 경우에 버섯표면에서 툴라신에 의하여 발생하던 갈반이 크게 감소함을 사진에서 확인할 수 있다. 이러한 결과는 포장실험 또는 농가에서 TIF의 사용량을 경감시킬 수 있어 경제성을 높일 뿐만 아니라, 혹시 한 가지 TIF를 사용하였을 때 나타날 수 있는 TIF 효과의 불완전성을 극복하여 제품의 신뢰성을 높이는 데 크게 기여할 것이다.

2. 툴라신의 용혈활성 특성조사

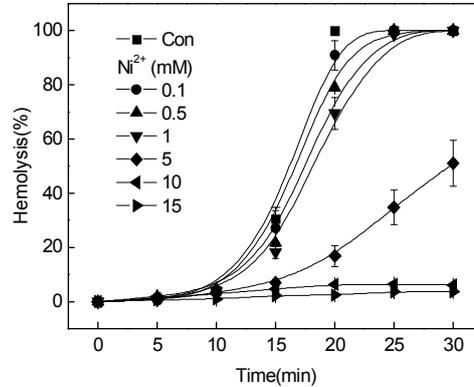


<그림 15> 다양한 양이온에 의한 툴라신의 활성저해.

(1) 툴라신의 세포독성 저해제 탐구

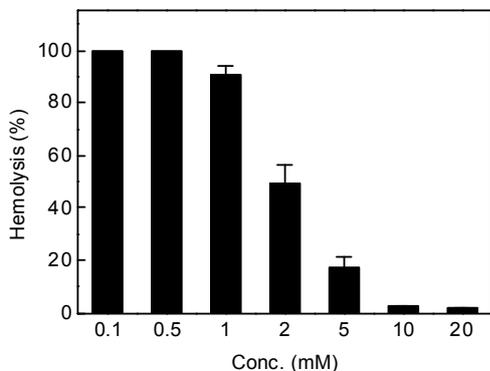
툴라신에 의한 용혈활성은 적혈구 세포막에 툴라신이 pore를 형성한 후 세포의 삼투압을 교란하고 세포파괴의 과정을 통하여 이루어진다. 툴라신의 용혈활성은 분광분석기를 사용하여 600 nm에서 적혈구 파괴에 따른 흡광도 감소를 시간에 따라 측정하여 이루어 졌다. HBS 완충액으로만 이루어진 대조구의 경우 1 HU 툴라신에 의해 30분 이내에서 100%의 용혈활성이 관측되었다. 툴라신의 작용특성을 조사하기 위하여 용혈활성에 대한 저해효과를 다양한 양이온들로 Li⁺과 Rb⁺, NH₄⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺의 효과를 측정하였다. <그림 15>에서 HBS 완충액에 각각의 양이온을 10 mM 농도로 처리하여 시간에 따른 툴라신의 용혈활성을 측정하면, 1가 양이온인 Li⁺과 Rb⁺, NH₄⁺ 첨가 시 대조실험과 유사하거나 약간 저해하는 것으로 나타났지만, 2가 양이온 Ni²⁺과 Zn²⁺, Cd²⁺의 경우 용혈활성 억제가 거의 100%로 확인되었다. Zn²⁺과 Cd²⁺이 용혈활성을 저해하는 것은 기존의 결과와 일치하며, Ni²⁺의 경우

새로이 용혈활성을 저해하는 것이 관측되었다.



<그림 16> Ni²⁺ 의 농도에 따른 톨라신 용혈 저해효과.

Ni²⁺에 의한 톨라신 용혈활성의 저해는 국제적으로 보고된 바 없다. Ni²⁺의 효과를 확인하기 위하여 농도를 100 μ M 에서 15 mM 까지 증가시키며 용혈활성 변화를 측정하였다 <그림 16>. HBS 완충액에 Ni²⁺의 농도가 증가할수록 톨라신의 용혈활성은 억제되는데, Ni²⁺의 농도가 500 μ M 이상에서 용혈활성 저해효과가 측정되었고, 10 mM 이상의 농도에서 용혈활성은 완전히 억제되었다. 위의 결과로부터 톨라신의 용혈활성을 저해하는 Ni²⁺의 Ki 값은 18 mM로 측정되었다. 이 결과는 Cho 등이 밝힌 Zn²⁺ 보다는 약 50배 낮은 효과를, Cd²⁺ 보다는 같거나 약간 좋은 효과를 보임을 알 수 있다.

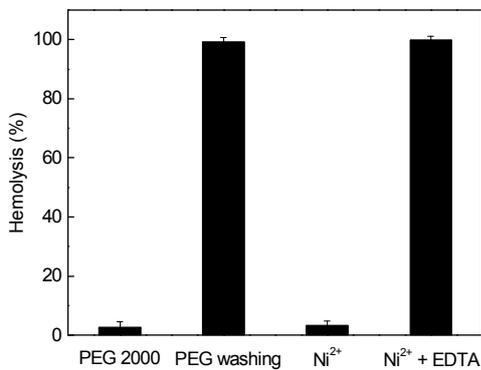


<그림 17> 삼투억제제 PEG 2000의 톨라신 용혈활성 저해효과.

(2) Ni²⁺에 의한 톨라신 이온통로 저해효과

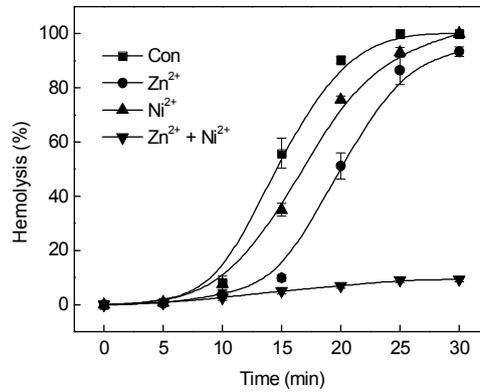
세포막에 이온통로를 형성하는 독소들은 일반적으로 삼투압을 교란하는 colloid osmotic lysis

기작을 통하여 세포를 파괴한다고 알려져있다. 삼투억제제에 의한 용혈의 저해는 이들이 툴라신의 이온통로 형성과정을 저해하지 않으나, 이온통로를 통한 이온의 이동만을 저해하기 때문에 나타난다. 삼투억제제 PEG 2000의 농도에 따른 용혈활성 저해 정도를 알아보기 위하여 PEG 2000을 반응용액에 다양한 농도로 첨가하고 배양시간 30분 후 용혈활성을 측정하였다<그림 17>. PEG 2000은 1 mM 이상의 농도에서 용혈활성을 저해하기 시작하였고, 10 mM 이상의 농도에서는 용혈 활성을 완전히 저해하였다. 이 결과는 PEG 농도에 따른 용혈활성 저해를 보여주며, 50%의 용혈활성을 저해하는 농도는 약 2 mM 전후에서 얻어졌다.



<그림 18> 니켈이온에 의한 사전형성-이온통로의 저해. 배양 30분 후 PEG를 원심분리로 제거하였음. Ni²⁺, 10 mM; EDTA, 2 mM.

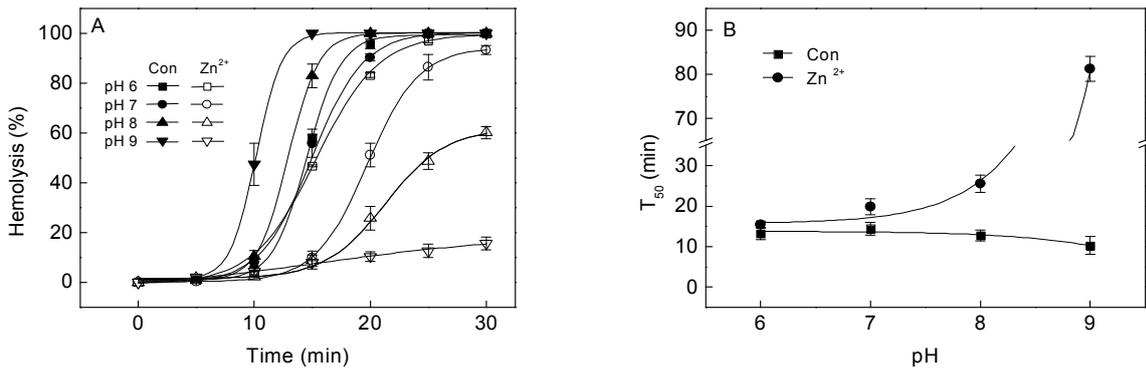
툴라신에 의해 생성된 이온통로가 얼마나 빠르게 용혈현상을 일으키는지 측정하기 위하여, 먼저 적혈구 현탁액에 30 mM PEG 2000을 가하고, 이 용액에 툴라신을 가하였다. 배양시간 30분이 경과하여 툴라신에 의한 이온통로가 적혈구 세포막에 생성되었음에도 불구하고 PEG 2000을 포함한 반응용액에서는 용혈활성이 나타나지 않았다<그림 18>. 이때, 원심분리를 통하여 PEG 2000을 포함하는 상정액을 제거하고, 침전된 적혈구를 신선한 HBS 반응용액에 현탁하면 용혈활성은 신속히 나타나고 적혈구는 배양 15분에 이내에 완전히 용혈되었다. PEG 2000으로부터 분리한 적혈구가 빠른 용혈활성을 보인 것은, PEG 2000이 배양중 툴라신의 세포막 결합 및 이온통로 형성과정을 억제하지 않음을 보여준다. 한편, 원심분리 후 10 mM Ni²⁺을 가한 HBS 용액으로 적혈구를 현탁한 경우에도 용혈활성은 억제되었다. 여기에 EDTA를 첨가하여 Ni²⁺을 제거하면 용혈현상이 즉각 관측된다. 이것은 Ni²⁺이 이미 생성된 툴라신의 이온통로를 저해하는 것을 역시 보여준다. 이상의 결과 및 이미 보고된 Ni²⁺의 툴라신 이온통로 활성 억제효과를 종합할 때, Ni²⁺는 툴라신의 적혈구 세포막 결합 및 이온통로 형성과정을 저해하지 않으나, 형성된 이온통로의 활성을 저해함을 알 수 있었다.



<그림 19> Zn²⁺와 Ni²⁺의 상승작용.

(3) Ni²⁺과 Zn²⁺의 상호작용

톨라신의 용혈활성에 대한 Ni²⁺의 저해효과를 조사하기 위하여 Zn²⁺와 Ni²⁺을 적혈구에 함께 처리하였다. 먼저, 1 HU 톨라신이 적혈구를 30분 이내에 용혈하는 것을 확인한 후 Ni²⁺과 Zn²⁺를 Ki 값보다 낮은 농도인 1 mM과 100 μM로 반응용액에 가하였다. 이러한 조건에서 각각의 이온은 용혈활성을 약간씩 저해하는 것으로 나타났다. 하지만 Ni²⁺과 Zn²⁺를 함께 처리하였을 경우 용혈활성은 거의 완전히 저해되었다<그림 19>.

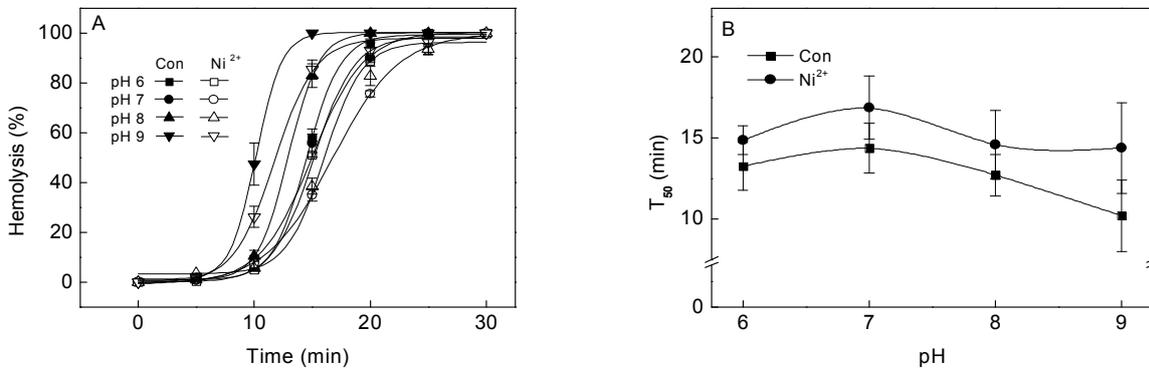


<그림 20> Zn²⁺ 효과의 pH 의존성.

톨라신 분자는 C-말단 근처에 양전하를 띠는 두 개의 amine기를 갖고 있어 용액의 pH에 따라 분자의 전하량이 달라진다. 이것은 반응용액의 pH 변화에 따라 톨라신 분자의 전하상태가 달라질 수 있음을 의미한다. 이러한 사실은 톨라신의 막결합이 중성 pH보다는

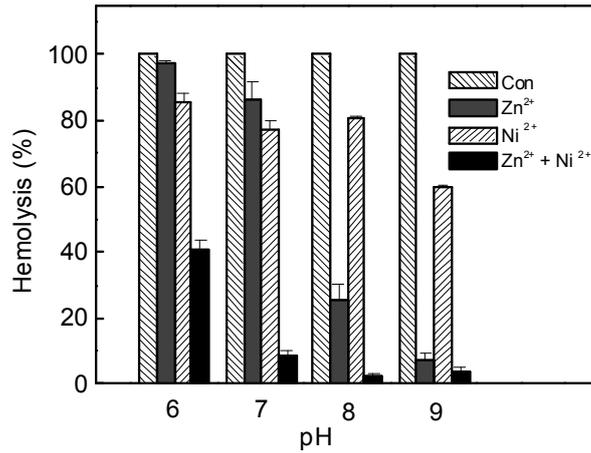
염기성에서 증가한다는 것으로 확인되었으며, 툴라신은 중성에서보다 염기성에서 amine기의 양전하 감소와 이에 따른 세포막 결합력 증가로 용혈활성이 커진다고 알려져 있다.

툴라신의 막결합에서 반응용액의 pH 변화에 따른 Ni^{2+} 과 Zn^{2+} 의 저해특성을 알아보기 위하여, Ni^{2+} 과 Zn^{2+} 를 첨가하고 용혈활성 변화를 측정하였다. 먼저, $100 \mu\text{M}$ Zn^{2+} 의 처리시에는 각 pH에서 대조실험에 비하여 용혈은 매우 늦어지는 것을 확인하였다<그림 20A>. 이것을 용혈활성이 50% 일어나는 시간인 T_{50} 값으로 표시하면, 대조실험구는 중성에서 약간 느리고 pH가 커질수록 빠르게 나타나지만, Zn^{2+} 을 첨가한 실험구에서는 pH가 커질수록 Zn^{2+} 에 의한 저해정도가 크게 나타났다. 특히 pH 9에서는 T_{50} 이 약 70분 정도로 크게 증가하였다<그림 20B>.



<그림 21> Ni^{2+} 효과의 pH 의존성.

한편, 1 mM Ni^{2+} 의 처리시에는 대조실험에 비하여 Zn^{2+} 에 의한 용혈저해는 작게 나타나는 것을 확인하였다<그림 21A>. 이것을 T_{50} 값으로 나타내면, 대조실험구는 염기성에서 용혈이 약간 빨라지지만, Ni^{2+} 의 처리시에는 용혈이 각각의 pH 별로 약 1.5-4분 정도 늦어져 저해되나 큰 차이를 보이지는 않았다<그림 21B>.



<그림 22> Zn²⁺와 Ni²⁺의 상승효과.

pH 변화에 따른 Ni²⁺과 Zn²⁺의 용혈활성 저해효과에서 이들 2가이온의 부가적 또는 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하기 위하여, 1 mM Ni²⁺과 100 μM Zn²⁺을 동시에 처리하였을 때, pH 6-9 모두 2가 이온을 단독으로 처리하였을 때 보다 저해효과가 증가하여 시너지 효과가 나타남을 확인하였다. 특히 pH 6과 7에서는 각각 이온의 저해효과가 크지 않음에도 이들을 동시에 처리할 경우 시너지 효과가 크게 관측되어 단독처리보다 저해효과는 크게 증가하였다. 또한 pH 8과 9에서도 동시처리가 큰 저해효과를 보였으나 알칼리 조건에서는 Zn²⁺의 단독처리 효과가 크게 나타나 동시처리에도 Zn²⁺의 큰 저해효과가 나타남을 알 수 있었다<그림 22>.

(4) Ni²⁺ 효과 발견의 중요성

Ni²⁺에 의한 톨라신 용혈활성 저해는 아직 국내외 보고된 바 없으며, 톨라신의 용혈활성을 여러 양이온들에 대한 저해실험을 통하여 Ni²⁺의 저해를 발견하였다. 톨라신의 용혈활성에 대한 Ni²⁺의 저해효과는 톨라신의 용혈과정 중 일어날 수 있는 여러 작용단계 즉, 톨라신의 세포막 결합, 그리고 막에서의 pore형성, 형성된 이온통로의 열림 저해 등 어느 한 가지 또는 그 이상의 과정을 저해하여 나타날 것으로 예측된다. Ni²⁺에 의한 톨라신의 세포막 결합 저해는 삼투억제제인 PEG 2000을 이용하여 측정하였다. 반응용액에 톨라신과 적혈구와 함께 PEG 2000을 함께 첨가하여 배양하면, 용혈활성이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 그 후 PEG 2000을 제거하면 신속한 용혈을 확인할 수 있어 PEG 2000이 톨라신의 세포막 결합 및 이온통로 형성과정은 억제하지 않으면서, 단지 적혈구의 삼투적 용혈만을 억제함을 보여준다. 그리고 PEG 2000을 제거한 다음, Ni²⁺의 처리에 따른 용혈활성의 억제는 Ni²⁺이 적혈구 세포막에 존재하며 톨라신이 이미 형성한 이온통로의 활성을 억제하여 용혈활성을 저해함을

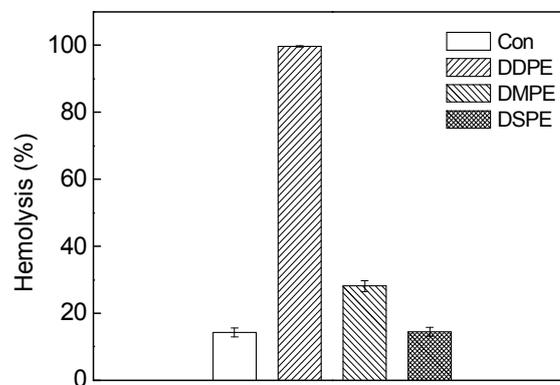
의미한다. 이때 EDTA의 추가적 처리에 따른 용혈활성의 회복은 Ni^{2+} 이 툴라신의 적혈구 세포막 결합 및 이온통로 형성과정과는 무관하며, 막결합 후 형성되는 이온통로의 활성을 가역적으로 저해하고 있음을 보여준다.

툴라신 분자는 C-말단 근처에 양전하의 amine기가 있어서 양친매성 펩티드이며, pH에 따라 툴라신 분자의 전하 상태는 염기성 pH에서 양전하가 감소하고, 분자 전체의 전하가 감소함에 따라 나타나는 극성감소는 툴라신의 세포막 결합력을 증가시켜 용혈활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 반응용액 pH 변화에 따른 Zn^{2+} 의 툴라신 용혈활성 저해효과는 염기성 pH에서 크게 나타났다. 반면에 Ni^{2+} 에 의한 툴라신 용혈활성 저해는 반응용액의 pH 변화에 무관하여 일정하게 나타났다. 이는 pH 변화에 따른 툴라신의 용혈활성 저해에 Ni^{2+} 이 Zn^{2+} 보다 더욱 안정적인 저해효과가 있음을 보여준다. 또한 Ni^{2+} 과 Zn^{2+} 을 함께 첨가할 경우 각각 이온의 단독 처리보다 시너지 효과가 나타나고, <그림 22>의 결과는 툴라신의 용혈활성에 대한 시너지효과는 pH가 증가할수록 감소하고 있음을 보여준다. 이들 2가지 이온이 툴라신의 세포독성 저해에 상승효과를 보인다는 것은 이들의 결합부위가 서로 다름을 의미한다. 이들의 결합부위 및 상승작용의 자세한 기작을 밝혀낸다면 툴라신의 독성기작의 이해에 크게 기여할 것이다.

3. 짧은 지방산으로 구성된 인지질에 의한 톨라신의 용혈활성 증가

(1) 톨라신의 용혈활성에 대한 지질의 효과

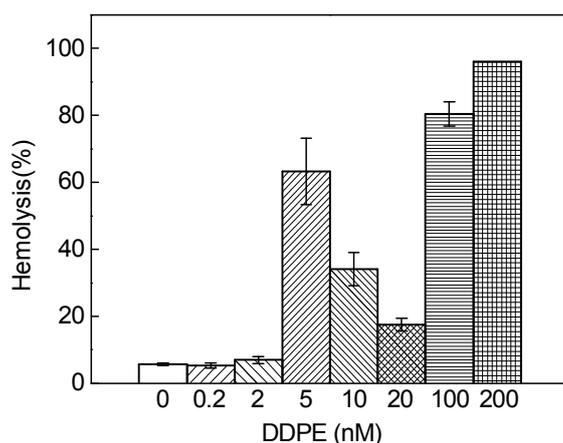
본 연구실에서는 인공지질 이중막을 사용하여 톨라신이 생체막에 이온채널을 형성하여 세포를 파괴하는 것을 밝혔다(Cho와 Kim, 2003). 톨라신의 이온채널 생성능을 확인하기 위하여 인공지질 이중막을 만들었고, 지질막에서 전기생리학 기술을 이용하여 톨라신 펩티드의 이온채널 형성을 확인하였다. 인공지질 이중막에 톨라신을 유입하였을 때, 생성되는 이온채널의 특성은 다양하게 나타났다. 300 pS과 500 pS의 이온채널이 주로 관측되었으나, 그 외에도 몇 가지 채널이 짧은 수명으로 관측되었다. 지질막은 18개의 탄소를 갖은 지방산으로 구성된 phosphatidyl serine과 phosphatidyl ethanolamine을 이용하여 만들어졌으며, 지질막에서 톨라신에 의해 생성된 이온채널은 불안정함을 확인하였다. 톨라신은 N-말단 부위에서 좌선성 α -나선구조가 만들어지며, 이것이 세포막에서 이온채널을 형성하는데 기여함이 알려져 있다(Jourdan 등, 2003; Lee 등, 2009). 그러나 나선구조의 길이나 막에서의 채널형성 기작이 밝혀지지 않아 채널의 활성을 재현성 높게 측정하는 것은 매우 어려운 것으로 알려져 왔다.



<그림 23> 톨라신의 용혈활성에 미치는 짧은 지방산 인지질의 효과.
적혈구 용액에 길이가 짧은 지방산으로 합성된 인지질을
200 nM 첨가한 후 용혈활성을 측정하였다.

현재 톨라신 채널의 막통과 두께는 밝혀진바 없으나, 막 두께가 채널형성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 길이가 짧은 지방산으로 만들어진 인지질을 이용하여 톨라신의 용혈활성 변화를 관측하고, 이러한 인지질로 형성된 지질막에서 톨라신에 의한 이온채널의 형성을 관측하였

다. 먼저 길이가 짧은 인지질이 톨라신의 용혈활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 지방산 사슬의 길이가 각각 다른 인지질 1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DDPE, 10:0/10:0)와 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE, 14:0/14:0), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE, 18:0/18:0)을 반응용액에 각각 200 nM 첨가하여 톨라신의 용혈활성을 확인하였다<그림 23>. DMPE와 DSPE를 첨가하였을 경우 적혈구 용액에 인지질을 넣지 않은 대조구와 용혈활성에 큰 차이가 없었으나, 길이가 짧은 DDPE를 첨가한 경우 5분 이내에 적혈구 용혈이 모두 일어남을 확인하였다. 이는 DMPE와 DSPE가 적혈구를 구성하는 인지질막의 두께와 큰 차이가 없어 톨라신이 채널을 형성하는데 영향을 주지 못한 반면, 적혈구에 결합한 짧은 길이의 DDPE에서는 톨라신이 훨씬 빠르고 안정적인 채널을 형성할 수 있도록 도와줌을 뜻한다. 이러한 결과는 톨라신이 형성하는 이온채널의 길이가 적혈구 막의 두께보다 짧으며, 적절한 두께의 지질막에서 톨라신은 채널형성이 빨라지고 용혈을 촉진할 가능성을 보인 것이다.



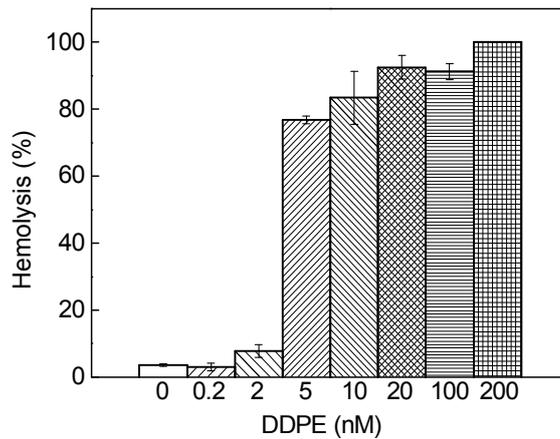
<그림 24> 톨라신 용혈활성에 미치는 DDPE의 농도효과.

(2) 톨라신의 용혈활성에 미치는 DDPE의 농도 효과

톨라신에 의한 용혈활성은 DDPE, DMPE, DSPE 세가지 인지질 중 지방산의 길이가 가장 짧은 DDPE에 의해 크게 증가하였다. 농도에 따른 DDPE 효과를 측정하기 위하여 적혈구 용액에 다양한 농도의 DDPE를 처리하며 톨라신의 용혈활성을 관측하였다. DDPE를 0-200 nM 농도로 처리하였을 때, 2 nM 이상의 DDPE 처리구에서 톨라신에 의한 용혈현상이 빠르게 일어났다<그림 24>. DDPE의 농도를 5 nM로 높였을 때, 용혈시간은 반으로 감소하여 약 15분에 완전한 용혈이 관측되었다. 농도증가에 따른 DDPE의 효과는 100과 200 nM의 농도에서 완전한 용혈이 10분 이내에 관측되어 짧은 사슬의 지방산으로 구성된 인지질이 적혈구 막에서 톨

라신의 이온채널 형성을 촉진하여 용혈활성을 크게 향상시킴을 확인하였다.

다만, 10과 20 nM DDPE를 처리하였을 경우 톨라신의 용혈현상은 10분 이내로 빠르게 나타나, 이후 용혈활성은 천천히 증가하여 30분 후에도 완벽한 용혈은 관측되지 않았다. 이 농도범위 10-20 nM에서 톨라신의 용혈활성이 오히려 늦어지는 것은, DDPE가 마이셀을 형성함으로써 톨라신이 적혈구보다는 DDPE 마이셀에 결합하고, 이것은 적혈구 용액의 톨라신 농도를 낮추는 효과에 기인하는 것으로 여겨진다. 이 부분에 대한 기작은 좀 더 연구되어야 할 것이다.



<그림 25> 톨라신 용혈활성에 미치는 DDPE의 사전배양 효과.

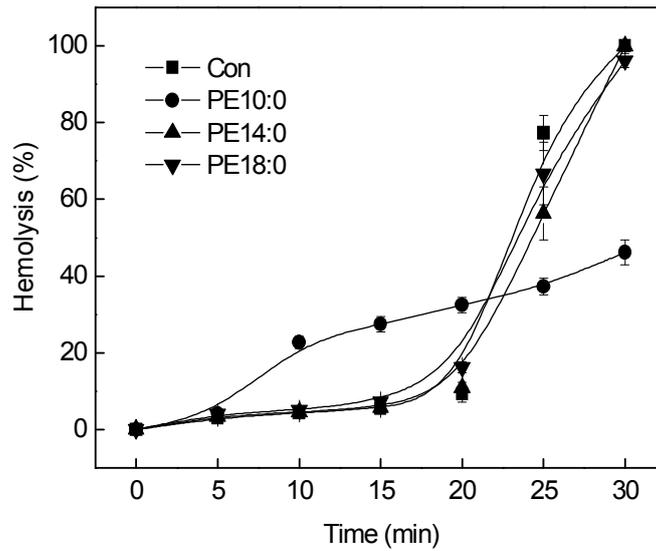
적혈구는 각 농도의 DDPE에서 10분간 처리하고 톨라신을 가하여 용혈활성을 측정하였다.

(3) DDPE의 적혈구와 사전배양에 의한 효과

적혈구를 다양한 농도의 DDPE에 10분간 사전배양 시킴으로써, 적혈구 세포막에 DDPE가 많이 결합하도록 하고 톨라신을 가하여 용혈활성을 측정하였다. DDPE를 0-200 nM 농도로 처리하였을 때, 높은 농도의 DDPE에 사전배양 된 적혈구 일수록 톨라신에 의한 용혈현상이 빠르게 나타났다<그림 25>. 특히 적혈구를 10 nM 이상의 DDPE와 사전 배양한 경우 톨라신에 의한 용혈은 5분 이내에 완결되었다. DDPE를 적혈구와 사전배양 하였을 때, 10과 20 nM DDPE를 처리하였을 경우 관측되었던 톨라신의 용혈 지연현상은 관측되지 않았다.

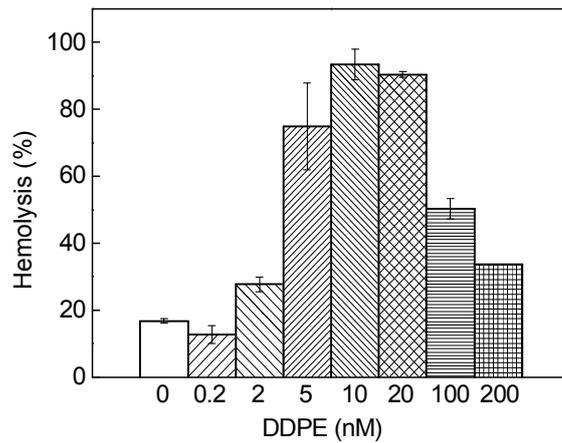
(4) 인지질과 톨라신의 사전배양 효과

앞의 실험에서 DDPE와 적혈구를 10분간 사전 배양하였을 때, 톨라신에 의한 용혈활성이 크게 빨라짐을 확인하였다. 첨가한 짧은 지방산의 인지질이 막에 유입되어 톨라신 주위의 막의 두께를 얇게 함으로써 톨라신의 채널형성을 도운 것으로 여겨진다.



<그림 26> 툴라신과 인지질의 사전배양에 의한 용혈효과.

한편, 인지질과 툴라신 펩티드는 사전에 결합하여 툴라신의 막 유입이나 채널형성을 도울 수 있으므로 툴라신과 인지질의 사전배양 효과를 측정하였다. <그림 26>은 DDPE와 DMPE, DSPE를 200 nM 농도로 툴라신과 사전배양한 후 용혈활성을 측정하는 것이다. DMPE와 DSPE는 인지질을 처리하지 않은 툴라신 대조실험과 동일한 결과를 보여 인지질과 툴라신의 사전배양이 툴라신의 용혈활성에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 그러나, DDPE는 툴라신과 사전배양하였을 때, 대조구에 비하여 초기 용혈활성은 빨라지나 30분이 지나도록 완전한 용혈이 관측되지 않아서, 툴라신의 용혈활성을 오히려 저해하는 결과를 보였다. 즉, DDPE는 동시처리 시 툴라신의 용혈활성을 촉진하였으나, 툴라신과 DDPE를 10분간 사전배양 하였을 경우는 오히려 용혈활성을 40% 정도 저해하였다. 그러나 사전결합의 증가에 따라 용혈이 비례적으로 저해되는 것은 아니었다. 툴라신과 DDPE의 결합은 5분 내외에 완료되었으며, 사전 결합시간을 증가시켜도 용혈을 저해하는데 더 이상의 영향을 주지 않았다. 또한 DMPE와 DSPE는 사전배양의 유무와 관계없이 툴라신에 의한 용혈에 영향을 주지 않았다.

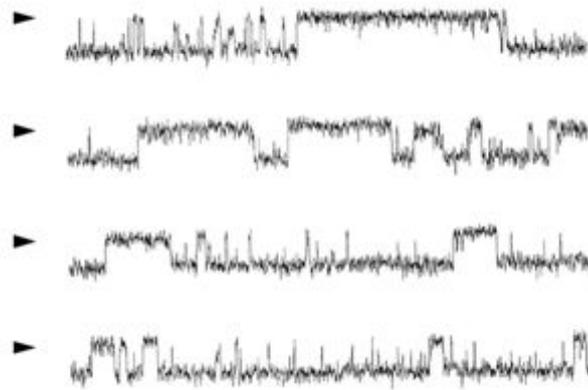


<그림 27> 톨라신과 DDPE의 사전배양 효과.

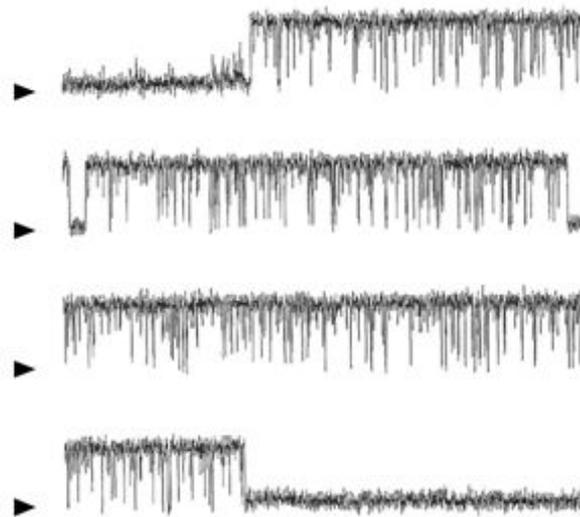
(5) DDPE와 톨라신의 사전배양 효과

톨라신 펩티드를 다양한 농도의 DDPE에 10분간 사전배양하고 용혈활성을 측정하였다. DDPE를 0-200 nM 농도로 처리하였을 때, 높은 농도의 DDPE에 사전배양 된 적혈구 일수록 톨라신에 의한 용혈현상이 빠르게 나타났다<그림 27>. 특히 톨라신을 5-20 nM의 DDPE와 사전 배양한 경우 톨라신에 의한 용혈활성은 증가하였으며, 이러한 결과는 농도증가에 따른 DDPE의 효과를 보여준 <그림 24>와 동일한 결과로 DDPE와 톨라신 사이에 특별한 결합효과가 존재하지 않음을 보인다. 한편, DDPE의 농도 100-200 nM에서 톨라신의 용혈 지연현상이 관측되었으며, 이것은 <그림 24>에서 관측되었던 농도효과와 유사하였다. 이로써 특정 농도의 DDPE는 오히려 용혈을 감소시킴을 알 수 있었다. 사전배양 과정에서 DDPE가 톨라신과 결합하여 적혈구 막에 작용하는 양이 감소함으로써 용혈을 저해하는 DDPE의 농도 범위가 약 10배 높은 곳에서 나타났다.

H.P. - 30 mV (A)



H.P. + 140 mV (B)



10 pA
200 ms

<그림 28> 인공지질 이중막의 인지질 조성에 따른 톨라신 채널활성변화.

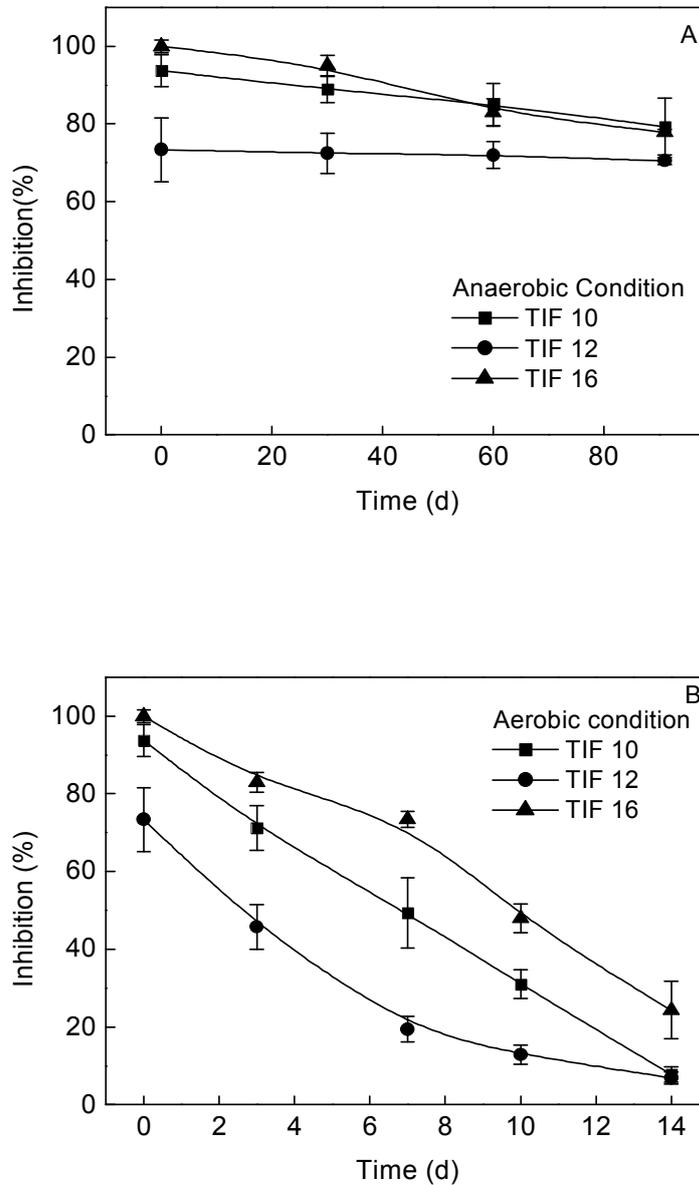
(A) DSPE, (B) DSPE + DDPE.

(6) DDPE에 의한 톨라신 채널 활성 증가

DSPE와 DSPE를 이용하여 만든 지질막과 여기에 짧은 지방산으로 이루어진 인지질 DDPE를 25% 첨가하여 만든 지질막을 준비하여 톨라신의 채널형성 및 활성을 측정하였다. 스테아르산으로 이루어진 PE와 PS 혼합 막에서는 통상적으로 관측하였던 톨라신의 채널이 관측되었다 (Cho와 Kim, 2003). 그러나, DDPE를 25% 첨가한 경우 높은 holding potential에서 안정적인

활성을 보이는 채널의 활성이 관측되었고, 채널의 gating이 활발하며 평균열림 시간도 길어짐을 확인하였다<그림 28>. DDPE를 첨가한 지질막에서 관측된 톨라신 채널의 특성은 전기생리학적으로 연구하여 적혈구의 용혈활성에서 관측하였던 DDPE의 채널 안정화 효과를 구명하여야 할 것이다.

4. 시제품 제작을 위한 TIF의 안정성, 저장성 연구



<그림 29> 공기접촉 유무에 따른 TIF의 활성 감소.

(A) 혐기적 조건에서의 보관중 활성감소.

(B) 호기적 조건에서의 보관중 활성감소.

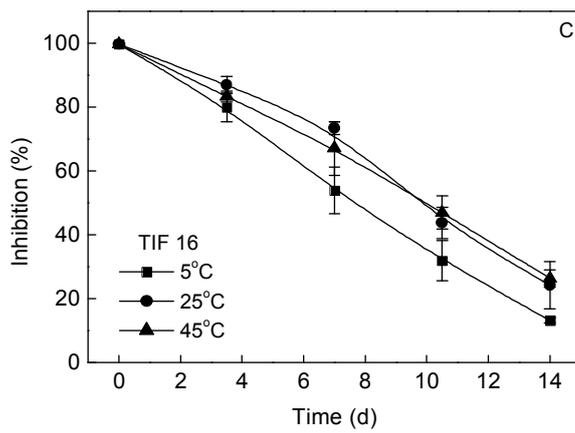
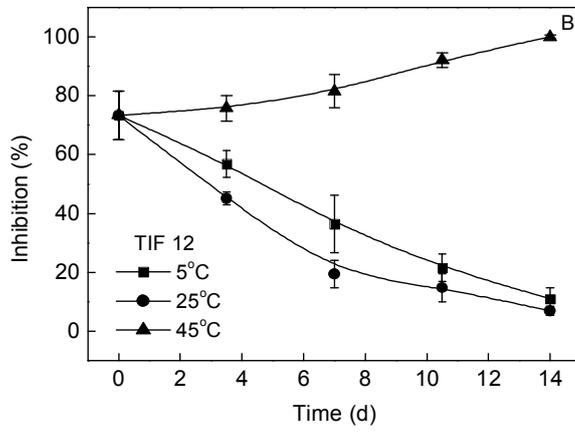
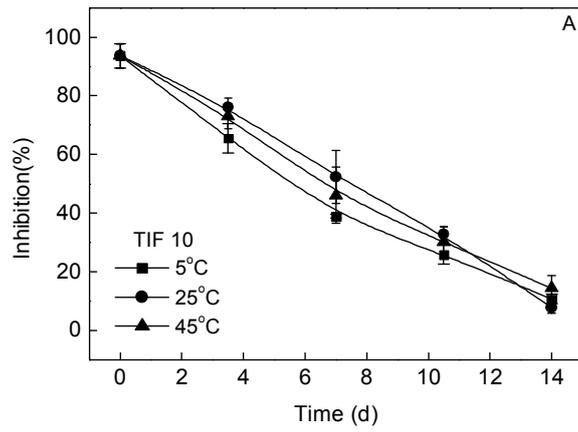
(1) 산소 접촉 유무에 따른 TIF 안정성

TIF는 대부분 불포화 결합을 갖는 탄소화합물로 이루어져 있다. 따라서 TIF는 공기 접촉에 따른 산화에 민감할 것으로 여겨진다. TIF 효과를 최적으로 유지할 수 있는 보관 조건을 조사하기 위하여 공기접촉(산화)의 유무를 달리하여 TIF의 톨라신 용혈활성 저해 효과를

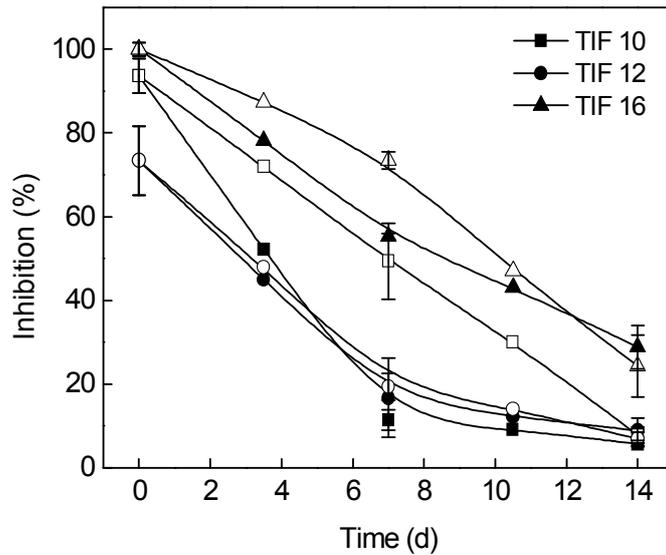
측정하였다. <그림 29A>는 공기가 차단된 조건에서 보관한 TIF의 활성을 측정한 것으로, 3개월이 경과한 후에도 TIF의 활성이 거의 감소되지 않았음을 확인할 수 있다. 반면에 공기에 노출된 조건에서 측정한 TIF 효과를 보인 <그림 29B>는 TIF-16, TIF-10, TIF-12의 순서로 TIF의 용혈활성 저해 효과가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 실험결과로부터 TIF 제품을 개발할 때, 산화에 의한 TIF 효과 감소를 방지하기 위하여 산화방지제를 첨가하거나, 산소의 접촉을 차단할 수 있는 질소충진 용기의 개발이 함께 이루어져야 할 것이다.

(2) 보관온도에 따른 TIF의 안정성 실험

TIF 효과를 최적으로 유지할 수 있는 보관온도를 조사하기 위하여 TIF-10, TIF-12, TIF-16을 각각 5℃, 25℃, 45℃에서 보관하며 2주일에 걸쳐 TIF에 의한 톨라신 용혈 활성 저해 효과를 측정하였다. 이 실험은 극적인 효과를 관찰하기 위하여 공기가 차단되지 않은 상태에서 이루어졌다. <그림 30>에서 TIF-10과 TIF-16은 온도에 관계없이 일정하게 활성이 감소하였으나, TIF-12는 45℃에서 저장 시에 활성이 오히려 증가함이 관찰되었다. 이는 TIF-10과 TIF-16의 원제가 액체상태인 것과는 달리, TIF-12는 분말상태의 제제로 높은 온도에서 용해형태의 변화에 따른 안정화 증가로 톨라신에 의한 용혈 저해효과가 증가되는 것으로 생각된다. 즉, 제제에 따라 용해 방법이나 보관 또는 사용온도를 적절히 설정하여 적용할 경우 갈반병 억제효과를 높일 수 있을 것이다.



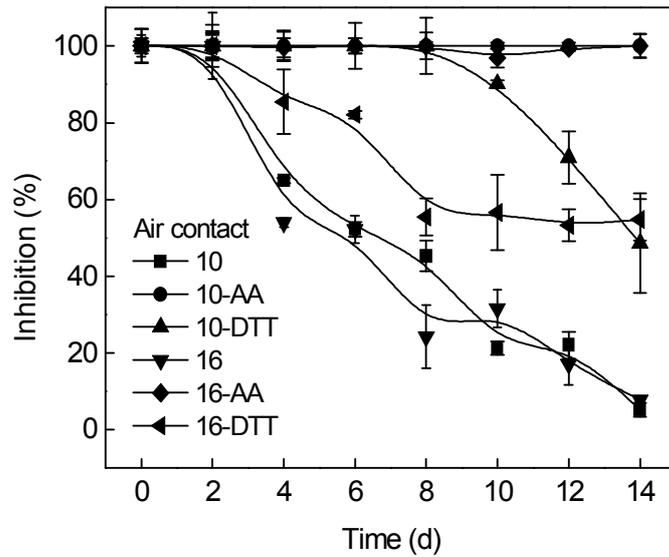
<그림 30> 보관온도에 따른 TIF의 활성 감소.
 (A) TIF 10 (B) TIF 12 (C) TIF 16.



<그림 31> 햇빛의 노출유무에 따른 TIF의 활성 감소.
(Filled symbol 햇빛노출, Open symbol 비노출)

(3) 햇빛의 조사에 따른 TIF 효과 안정성

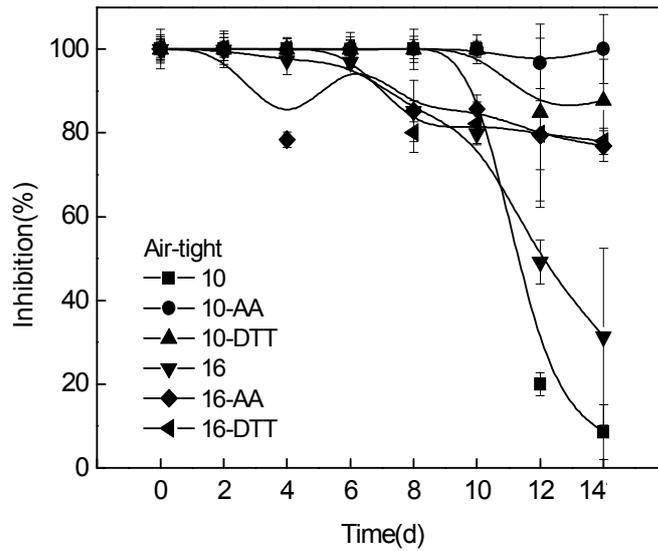
햇빛의 조사에 따른 TIF 효과의 경시적 변화를 측정하기 위하여, 10 mM로 제조한 TIF-10, TIF-12, TIF-16을 각각 은박지를 이용하여 햇빛을 차단한 대조구와 햇빛에 노출시킨 실험구를 동시에 준비하여, 공기가 차단되지 않은 상태에서 2주일동안 TIF 효과 변화를 측정하였다. <그림 31>를 보면 공기가 차단되지 않은 조건에서의 활성감소 경향을 그대로 보임과 동시에 햇빛 조사의 유무에 따라 실험구와 대조구의 TIF효과에 차이를 나타냈다. TIF-10이 햇빛의 노출 유무에 따른 용혈활성 저해 효과의 변화에 가장 큰 차이를 나타냈으며, TIF-16은 약간의 차이를 보였다. 또한 TIF-12는 햇빛 조사의 유무에 따른 TIF 효과의 변화가 거의 없었다. 대체적으로 TIF는 햇빛에 노출 될 경우 톨라신 저해효과가 감소되었으며, TIF를 이용한 제품의 제작 시에는 빛이 투과하지 않도록 보관용기를 제작하여 TIF 안정성을 유지하도록 하여야 할 것이다.



<그림 32> 항산화제에 의한 TIF의 안정성 증가.
AA, ascorbic acid; DTT, dithiothreitol.

(4) 항산화제 첨가에 따른 TIF의 안정성 향상 효과

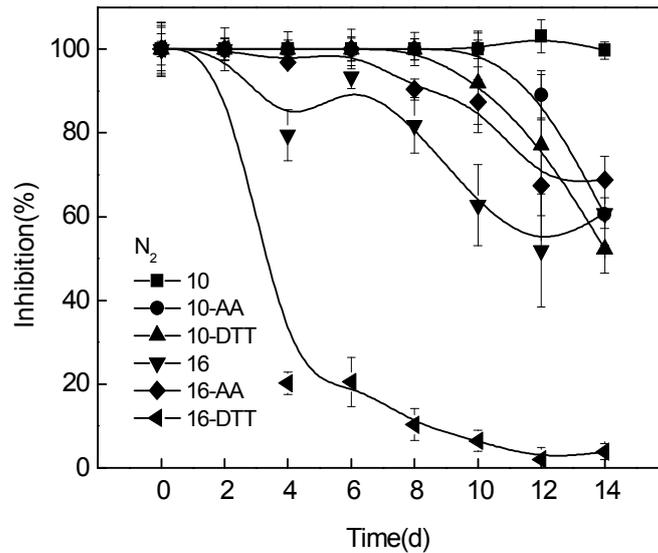
TIF는 공기에 노출되었을 경우 톨라신 독소의 활성저해 효과가 심하게 감소하였다. 이것은 아마도 공기중 산소에 의한 산화작용에 기인하는 것으로 생각된다. 이러한 산화작용을 억제하기 위하여 다양한 항산화제의 효과를 측정하였다. 먼저, TIF를 HBS 완충액에 녹이고, 항산화제로 ascorbic acid와 dithiothreitol을 각각 0.1 mM 농도로 가한 후, 2주일 동안 상온에 보관하며 매 2일마다 톨라신에 의한 용혈활성의 저해효과를 측정하였다. <그림 32>에서 TIF의 톨라신 독성저해 효과는 공기에 2주간 노출하였을 때, 완전히 감소하였다. TIF 활성의 저해는 폴리글리세린 지방산에스테르계 계면활성제인 TIF-10과 TIF-16 두 가지 모두에서 동일하게 나타났다. 그러나, TIF의 활성 유지를 위하여 ascorbic acid를 첨가한 조건에서는 두 가지 TIF 모두 2주 동안 활성감소를 전혀 보이지 않아 공기중 산소에 의한 산화작용을 완전히 차단하였다. 한편, dithiothreitol을 동일하게 첨가한 조건에서는 TIF-10의 경우 8일 이후에 급격한 활성감소를 보였고, TIF-16은 2일 이후 활성감소가 크게 나타났다. 두 경우 모두 항산화제를 첨가하지 않은 대조구에 비하여서 활성감소는 작았지만 14일 이후에 약 40-50%의 활성감소를 보였다. 이상의 결과로부터 장기보관중 공기접촉에 의해서 나타날 수 있는 TIF의 활성감소는 항산화제의 첨가로 방지할 수 있어 TIF의 안정성을 장기간 유지할 수 있음을 확인하였다.



<그림 33> 밀폐조건에서 항산화제에 의한 TIF의 안정성 증가.

AA, ascorbic acid; DTT, dithiothreitol.

항산화제의 효과를 밀폐된 용기에 보관한 TIF에서 측정하였다. <그림 33>은 TIF를 밀폐된 용기에 보관하며 ascorbic acid와 dithiothreitol을 각각 0.1 mM 농도로 가한 후 TIF의 활성을 측정한 결과로, 공기를 차단한 조건에서 항산화제를 첨가하지 않은 대조구는 TIF-10의 경우는 8일 이후에, TIF-16의 경우는 6일 이후에 활성이 감소하였다. 이것은 앞의 결과에 비하여 산소접촉의 차단으로 TIF의 안정성이 크게 향상됨을 보인 결과이다. 여기에 ascorbic acid를 첨가한 조건에서는 TIF-10의 경우 2주 동안 활성감소를 보이지 않아 안정성이 크게 유지되었으나, TIF-16의 경우는 20% 내외의 활성감소를 보여 공기접촉의 조건에 비하여 효과는 오히려 감소하였다. Dithiothreitol의 첨가시에는 TIF-10의 경우 8일 이후에, TIF-16의 경우 6일 이후에 약 20%의 활성감소를 보였다. 이상의 결과로부터 밀폐된 용기에서 TIF는 공기중 노출시보다 안정성이 크게 향상되었고, 항산화제 첨가시 TIF 안정성은 장기적으로 확인되었다.

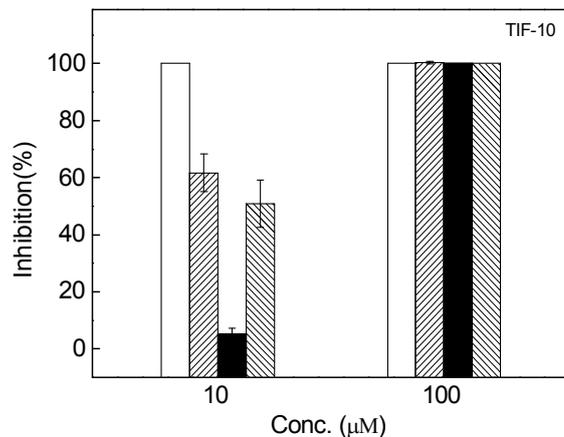
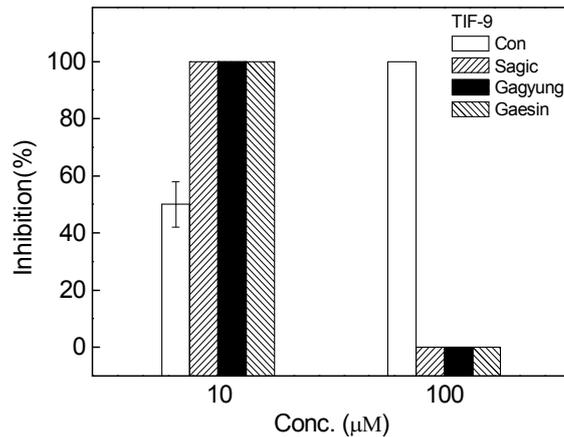


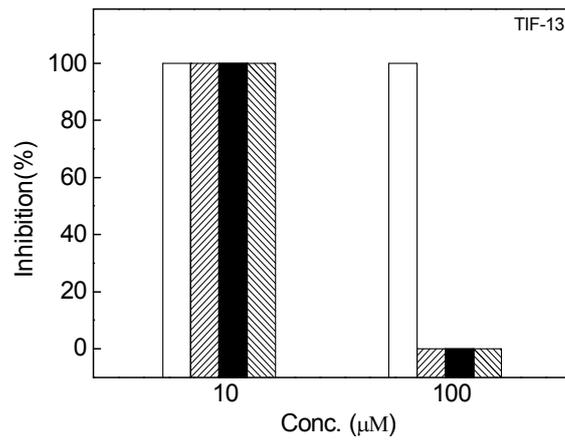
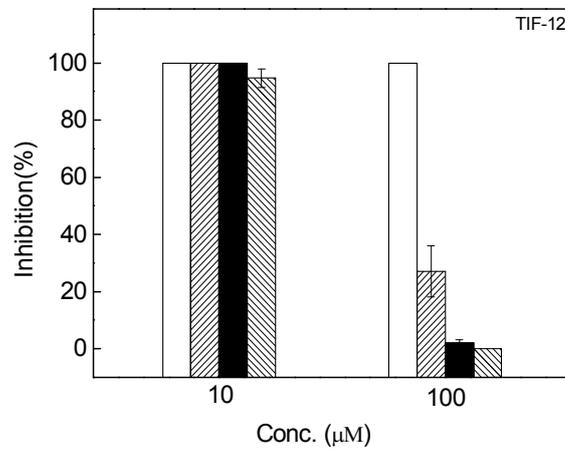
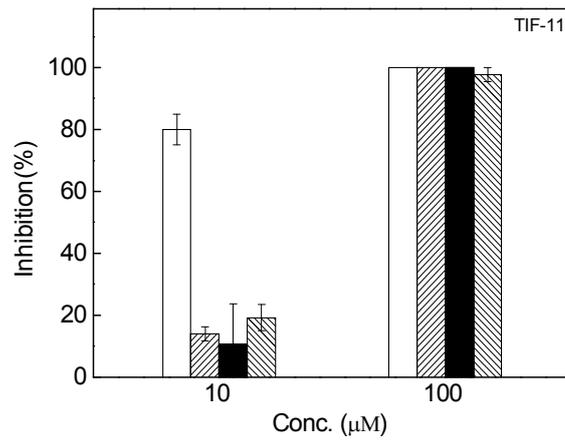
<그림 34> 질소충전 조건에서 항산화제에 의한 TIF의 안정성 증가.
AA, ascorbic acid; DTT, dithiothreitol.

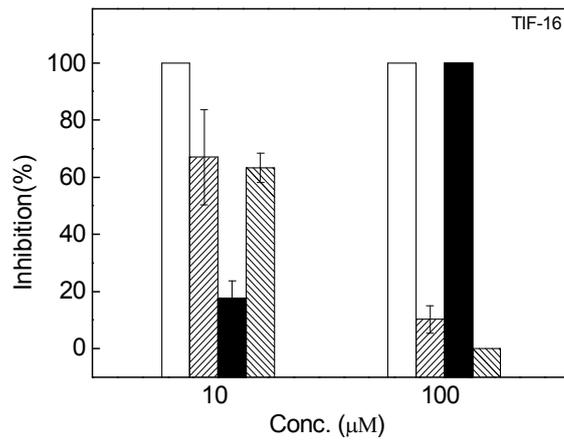
질소가스를 충전한 조건에서 항산화제의 효과를 측정하는 결과는 <그림 34>에 보였다. 질소가스를 충전한 경우 TIF-10의 안정성은 최대로 나타났고, 측정기간인 14일간 안정한 상태가 유지되었다. 그러나, 항산화제를 첨가할 경우 TIF-10의 안정성이 오히려 감소하였다. Ascorbic acid를 처리한 경우에는 10일 이후에, dithiothreitol을 처리한 경우에는 8일 이후에 TIF-10의 활성이 감소하였다. TIF-16의 경우 질소충전에 의해 안정성은 60-80% 증가하였으나 TIF-10에서의 효과에는 미치지 못하였다. Ascorbic acid의 첨가로 안정성은 대조구에 비하여 회복되었으나 약 70%의 활성을 보였다. 이에 반하여 질소를 충전한 조건에서 TIF-16에 dithiothreitol을 가한 경우 급격한 안정성 감소가 일어났고, 4일 이내에 80% 이상의 활성감소가 나타났다.

이러한 결과를 종합하면 TIF의 단기 보관중 안정성은 공기중 산소에 의한 산화도 감소하며, 또한 기전이 밝혀지지 않은 요인에 의해 크게 좌우됨을 확인하였다. 산소에 의한 산화는 항산화제의 첨가로 극복할 수 있었으나, 그 이외의 요인에 의한 안정성 감소는 현재로는 극복이 불가능한 것으로 여겨진다. 이것은 아마도 TIF 분자들의 응집과 이에 따른 마이셀 형성 등으로 추측되며, 제 2 세부과제에서 이 부분의 연구가 진행중이며, 그간의 실험결과에 따르면 저장기간중 측정된 nmr 분석에서 TIF가 polymer를 형성(응집)하는 결과를 얻었다. 결과적으로, TIF 시제품의 제작은 햇빛을 차단하며 공기가 통하는 보통의 용기에 항산화제로 ascorbic acid를 소량 가한 상태가 최적의 조건으로 확인되었다.

TIF 시제품 생산을 위한 수질효과를 측정하기 위하여 각 TIF 성분을 지하수에 녹인 후 톨라신의 세포독성을 저해하는 효과를 측정하였다. 지하수는 청주시내의 3곳에서 채취하였으며 사직동(Sagic)과 가경동(Gagyung)의 지하수는 음용수로 이용되고 있으며, 개신동(Gaesin)의 지하수는 충북대학교 농장의 지하수로 농용수로 쓰이고 있다. TIF의 사용은 효과가 확인된 10 μ M과 100 μ M의 두 농도범위에서 수행하였고, 이 농도는 TIF의 분자량이 1,000 Da 전후이므로 대략 10 ppm과 100 ppm 전후에 해당한다. 각 농도에서 TIF의 처리별 톨라신의 용혈활성 저해효과는 <그림 35>에 보였다. 대조구(Con)는 TIF를 증류수에 녹여 제작하였다. TIF-9와 10, 11, 12, 13, 16을 지하수를 이용하여 시제품을 제조하였을 때, 일반적으로 증류수 완충액을 이용한 경우에 비하여 활성이 낮게 나타났으나, 최소 두 농도구간중 하나에서는 100%의 활성을 보여 시제품의 효과에는 문제가 없었다. 본 예비실험 결과를 통하여 얻은 정보는 낮은 농도범위에서 시제품의 효과를 높이는데 유용하게 쓰일 것이다.







<그림 35> 지하수에 녹인 TIF의 톨라신 독성 억제효과.
Sagic, 사직동 음용지하수; Gagyung, 가경동 음용지하수;
Gaesin, 개신동 충북대학교 농장의 농용지하수.



<그림 36> 갈반병 억제제 TIF의 시작품.

(5) TIF 시작품의 조제

TIF의 갈반병 억제실험을 버섯재배 농가에서 수행하기 위하여, 위에서 연구된 최적활성을

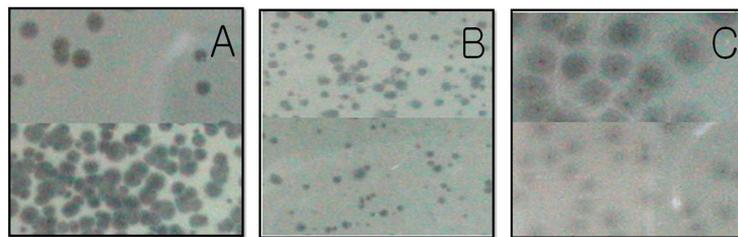
위한 조건을 만족하는 시작품을 제조하였다. 시작품은 TIF-12와 TIF-16의 두 가지를 사용하여 조제하였다<그림 36>. 각 TIF는 100배 농축액인 2 mM로 만들어졌으며 농가에서 희석하여 최종농도 2 μ M (대략 2 ppm)으로 사용하도록 하였다. 용기는 빛을 차단할 수 있는 1 L 용량의 갈색플라스틱 용기가 선택되었고, 항산화제로 ascorbic acid 10 μ M이 첨가되었다. 지하수는 충북대학교 농장의 농용수를 사용하였다.

제 2 절 갈반병 생물학적 방제를 위한 파아지 효과분석

1. 파아지의 분리 및 특성분석

(1) 톨라시를 숙주로 하는 파아지의 분리

숙주균을 선택적으로 공격하는 파아지(bacteriophage)의 특성을 느타리버섯 갈반병 방제에 이용하고자, 느타리버섯 갈반병의 원인 균주인 톨라시균을 숙주로 하는 파아지를 환경시료로부터 분리하였다. 톨라시균과 하수중 채취한 시료를 동시에 평판 배양하여 용균된 용균반(plaque)을 확인하였으며<그림 37>, 갈반병 균에 탁월한 사멸효과를 보이는 20개의 파아지를 선발하여 제 3세부과제(1-2차년도)와 제 1협동과제(3차년도) 연구팀에게 전달하였다. 파아지에 의한 용균반은 크고 선명, 작고 선명, 크고 불투명-3가지의 형태적 특징을 나타냈다. 용균반의 형태적 특징과 톨라시 용균력에 따라 고독성, 중독성, 저독성의 3가지로 분류하였다.



<그림 37> 파아지 종류에 따른 용균반 특성.

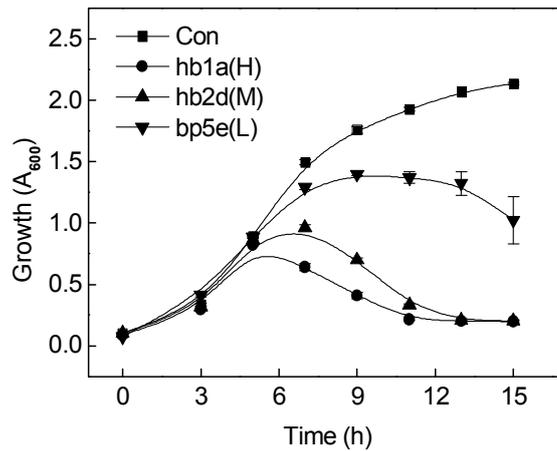
(A) 고독성 파아지, (B) 중독성 파아지, (C) 저독성 파아지.

<표 2> 분리한 파아지의 명명 및 독성분류

NO.	phage	toxicity	Titer(pfu/ml)	NO.	phage	toxicity	Titer(pfu/ml)
1	hb1a	H	1.12×10^9	5	bp5a	H	1.23×10^{11}
	hb1b	H	5.5×10^{10}		bp5b	M	3.57×10^{10}
2	hb2a	M	2.22×10^{10}	5	bp5c	L	3.56×10^9
	hb2b	M	4.33×10^{10}		bp5d	M	5.5×10^{10}
	hb2c	H	1.93×10^{10}		bp5e	L	7.93×10^9
	hb2d	M	1.35×10^9		bp5f	L	2.1×10^9
3	hb3a	L	3.7×10^9	6	bp5g	H	1.3×10^{11}
4	hb4a	H	8.63×10^{10}		bp6a	H	1.65×10^{11}
	hb4b	H	7.42×10^{10}	7	ms7a	L	7.45×10^8
8	ms8a	M	6.36×10^{10}		ms7b	M	2.46×10^{10}

(2) 파아지의 안정성 및 살균특성 분석

파아지를 이용한 갈반병 방제 방안을 버섯재배사에서 실제 적용하기 위하여 먼저 분리한 파아지의 종류, 접종 농도, 접종시간에 따른 톨라시 용균력의 차이를 측정하였다.

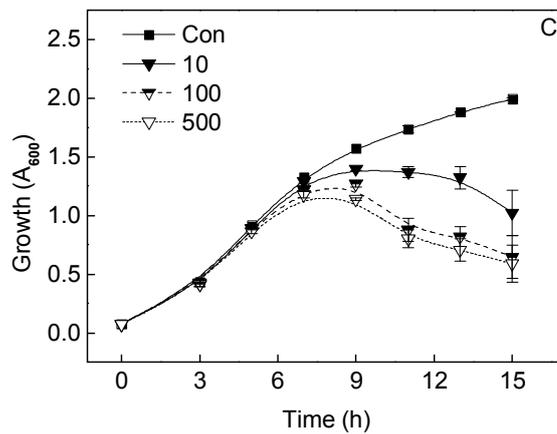
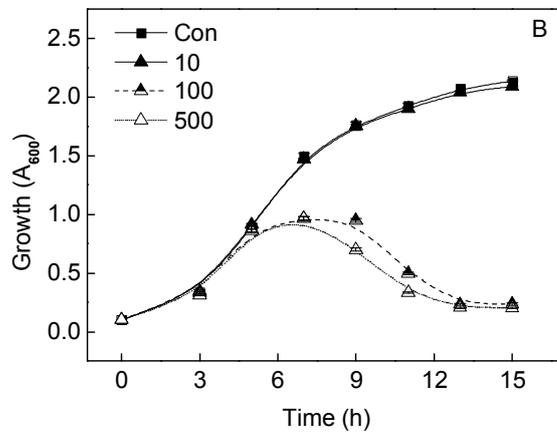
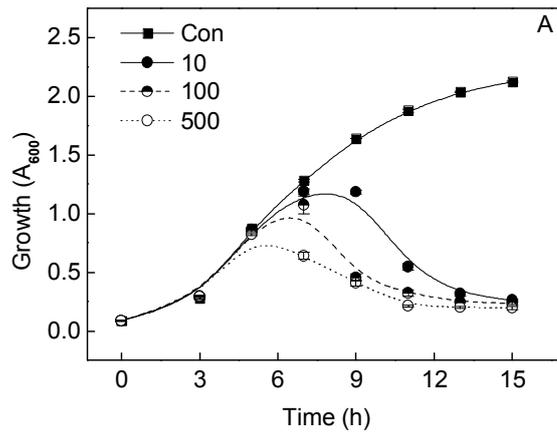


<그림 38> 독성이 다른 파아지에 의한 용균활성.

H, 고독성; M, 중독성; L, 저독성 파아지.

① 파아지의 종류에 따른 용균력의 차이

파아지는 용균반의 형태에 따라 톨라시 용균력의 차이를 보였는데, 각 종류의 대표적 파아지인 hb1a, hb2d, bp5e를 이용하여 시간경과에 따른 톨라시 용균력을 A₆₀₀에서 15시간에 걸쳐 흡광도 변화를 측정함으로써 확인하였다. 숙주균인 톨라시 6264 균주를 5%와 10⁻⁸배로 희석한 파아지 농축액 1%를 동시에 접종하여 파아지의 종류에 따른 각각의 톨라시 용균력을 살펴본 결과, 파아지의 수는 1.12x10⁹, 1.35x10⁹, 7.93x10⁹ ml⁻¹ 로서, 파아지 수에 큰 차이는 없었으나, <그림 38>과 같이 시간에 따른 용균력은 각각의 용균반 형태적 특성에 따라 차이를 나타냈다. 용균반의 모양이 크고 선명한 파아지의 경우 5시간의 잠복기 후에 숙주균이 차츰 용균되어 13시간 이후 100%용균이 관측되었고, 용균반의 모양이 작고 선명한 경우 크고 선명한 파아지와 비슷한 용균양상을 보였으나 7시간 정도의 잠복기를 나타냈다. 이와 비교하여 용균반이 크고 불투명한 특성을 나타내는 경우, 잠복기는 8시간으로 세 가지의 파아지 중에서 가장 길었으며, 용균력도 위의 2종의 파아지와 비교하여 약한 것으로 확인되었다.



<그림 39> 파아지 접종량에 따른 용균효과.

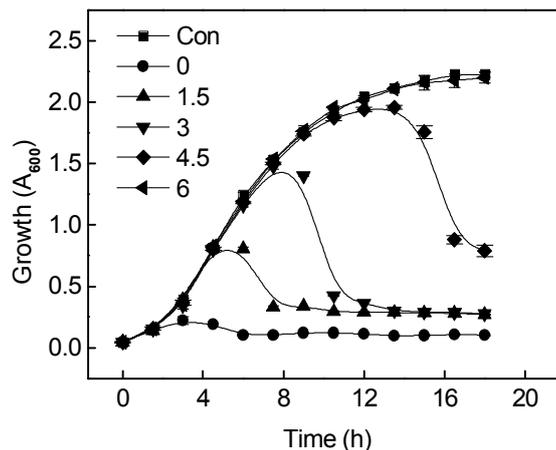
(A) 고독성 파아지 hb1a.

(B) 중독성 파아지 hb2d.

(C) 저독성 파아지 bp5e.

② 파아지 접종량에 따른 용균효과 측정

파아지의 독성에 따른 용균정도를 접종량을 달리하며 측정하였다. <그림 39A>는 숙주균과 고독성 파아지 hb1a (1×10^5 pfu·mL⁻¹)를 비율이 5000:1, 1000:1 그리고 100:1이 되도록 파아지액을 10, 100 그리고 500 μ L씩 접종하였을때, 각각 8, 6 그리고 5시간 이후부터 흡광도가 감소하기 시작하여 파아지에 의하여 숙주균이 파괴되는 용균이 일어남을 확인하였다. 배양 13시간이후에는 완벽하게 용균이 되었다. 한편, <그림 39B>에서 중간 독성을 갖는 파아지 hb2b (1×10^5 pfu·mL⁻¹)는 5000:1의 비율에서 숙주균 *P. tolaasii*를 완벽히 용균시키지 못했지만, 1000:1, 100:1의 비율에서는 완벽하게 용균을 시켜, 용균을 위해서는 최소 1000:1 비율의 파아지가 필요함을 확인하였다. 독성이 낮은 파아지인 bp5e (7×10^5 pfu·mL⁻¹)의 경우, 숙주균:파아지의 비율이 5000:7, 1000:7 그리고 100:7이었으며, 7-9시간 후부터 흡광도의 감소가 보였으나, 15시간 이후까지도 완벽한 용균현상은 관측할 수 없었다 <그림 39C>.

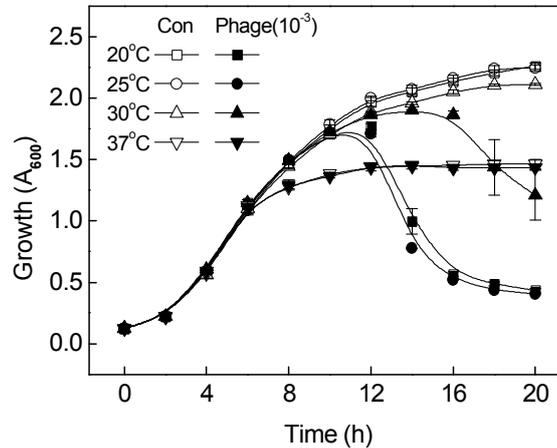


<그림 40> 접종시기에 따른 파아지의 용균곡선.

③ 파아지의 접종 시간에 따른 용균력

톨라시균의 사전 배양 시간에 따른 파아지의 톨라시균 용균력 차이를 알아보기 위해 0, 1.5, 3, 4.5, 6시간 사전 배양한 톨라시균에 각각 파아지 hb1a (10^5 pfu·mL⁻¹)를 접종하여 시간에 따른 톨라시균 용균 양상을 관찰하였다<그림 40>. 톨라시균의 배양과 동시에 파아지를 접종한 경우, 톨라시균은 거의 성장하지 못하고 용균되었으며, 1.5, 3시간 사전배양한 경우에는 각각 4시간과 5시간의 잠복기를 거쳐 존재하는 톨라시균의 약 80-90%를 용균하였다. 4.5시간 사전 배양한 경우에는 9시간의 긴 잠복기를 나타냈으며 약 60%의 용균이 이루어짐을 확인하였다. 반면에 6시간 사전배양 후 파아지를 접종한 경우 파아지에 의한 용균효과는 없는 것으로 나타났다. 즉, 숙주균의 개체수가 적을수록 파아지의 용균효과는 우수하며 톨라시의 개체균이

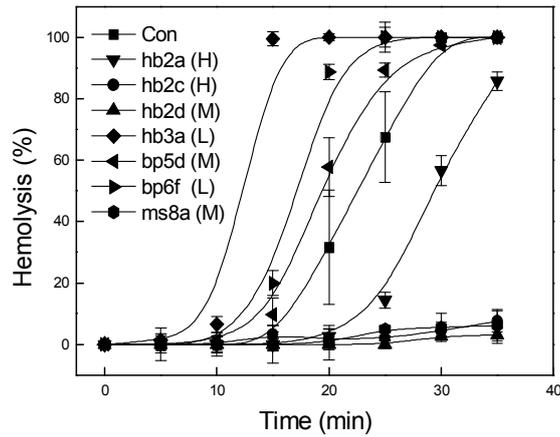
일등히 많아서 파아지의 증식이 많은 양의 톨라시를 용균하는데 역부족일 경우 파아지에 의한 살균이 어렵다. 따라서 파아지를 이용한 갈반병방제의 현장적용은 톨라시 감염 초기에 효과적일 것으로 예측되며, 감염이 심할수록 파아지의 접종량을 늘려야 할 것이다.



<그림 41> 파아지 용균활성의 온도 의존성.

④ 온도변화에 따른 파아지의 용균력

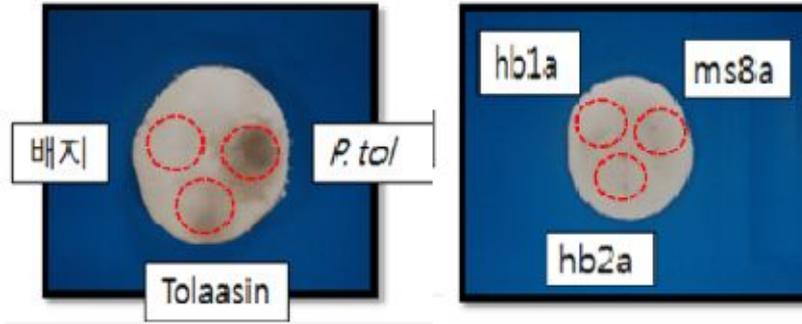
배양온도 변화에 따른 파아지의 용균특성을 확인하기 위하여 배지에 톨라시균을 2% 접종하고 4시간 사전배양 한 후, 10⁻³배로 희석된 파아지 용균액 1%를 접종하여 20°C, 25°C, 30°C, 37°C로 온도를 달리하여 배양하였다. 이에 대한 대조군으로서 파아지를 접종하지 않은 톨라시 배양액을 각각의 온도에서 동시 배양하여 시간에 따라 톨라시의 용균과 성장특성을 관찰하였다. 결과로, <그림 41>과 같이 37°C에서는 톨라시균의 최적 성장온도(25°C)에서 멀어져 톨라시균 자체의 성장이 억제됨으로 파아지의 성장 또한 확인할 수 없었다. 30°C에서도 톨라시균의 최적 온도인 20-25°C와는 달리 파아지의 잠복기가 약 10시간으로 최적조건인 6시간 보다 길어졌고, 용균력에서도 최적온도에서와 비교하여 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 즉, 배양온도에 따른 파아지의 용균력은 숙주균의 최적온도에서 최대로 나타남을 확인하였다.



<그림 42> 파아지 존재에 따른 숙주균의 톨라신 생산활성.
숙주균과 파아지를 함께 배양한 후, 배양액을
분리하여 용균활성을 측정하였다.

⑤ 파아지에 의한 숙주균의 톨라신 독소 생산증가

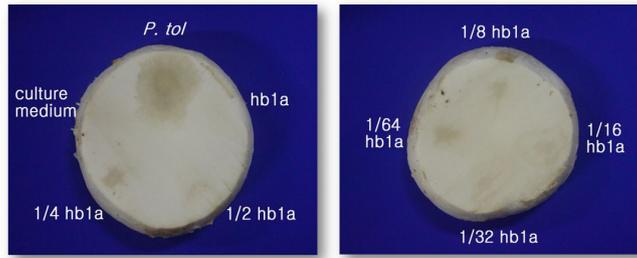
파아지 존재시 숙주균의 독성변화를 확인하기 위하여 숙주균과 파아지를 함께 배양한 후, 배양액의 용균활성을 측정하였다. 파아지와 톨라시 균주를 함께 배양하며 5분마다 배양액을 채취하여 원심분리한 후, 상정액을 적혈구에 처리하여 용균효과를 측정하였다<그림 42>. 톨라시 균과 함께 파아지 hb2c와 hb2d, ms8a 등을 배양하였을 때는 톨라시 균주의 활성이 낮아져 톨라신의 분비가 감소함으로 용혈활성이 낮았다. 그러나 독성이 낮은 파아지 hb3a, bp6f, bp5d 등을 첨가하여 동시배양한 경우, 톨라시 균주 배양액의 세포독성은 오히려 증가하여 대조균의 배양액보다 용균이 빠르게 일어났다. 이러한 결과는 톨라시 균주에 저독성 파아지를 함께 배양할 경우, 톨라시 균주에 의한 톨라신 독소 분비가 촉진되는 것을 의미한다. 특히 저독성 파아지인 hb3a의 경우 15분 배양으로 완전한 용균을 일으켜 파아지에 의한 숙주균 자극현상이 크게 일어남을 확인하였다. 이 결과는 저독성 파아지의 경우 숙주균인 톨라신 균의 세포독성을 오히려 증가시킬 수 있다는 가능성을 보이는 것이나 이후 실험에서 저독성 파아지도 버섯조직에서는 병원균을 충분히 용균시킬 수 있음을 확인하였다.



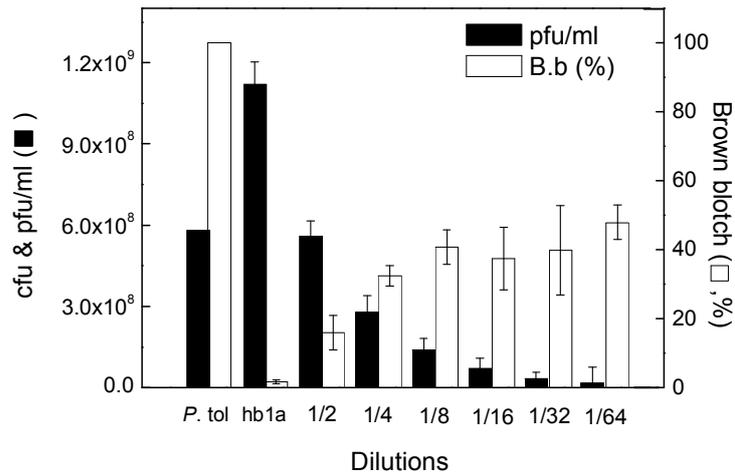
<그림 43> 버섯조직함몰검정법을 위한 갈반생성 확인실험.

⑥ 버섯조직함몰검정법에 의한 파아지 효과 검증

갈반병 원인균주인 톨라시균에 의한 갈반병 발생을 검정하고 파아지에 의한 갈반병 억제 효과의 여부를 확인하기 위하여 버섯조직함몰검정법을 수행하였다. 느타리버섯의 경우, 갓의 색이 어둡고 얇으며 버섯에 따라 형태의 변화가 심하므로 함몰검정법의 적용이 어렵다. 따라서, 색이 희고 표면이 단단한 양송이버섯을 사용하여 파아지의 효과를 측정하였다. 톨라시균에 의한 갈반병 발생 유무와 파아지 자체가 버섯 조직에 미치는 영향을 대조실험으로 수행하였다. 양송이버섯 자실체의 상부를 절단한 단면에 1% 계대배양한 톨라시균과 분리한 톨라신 독소, 3종의 파아지와 이에 대한 대조군으로서 배지를 각각 10 μ L 처리하여 12-15시간 상온배양 후, 갈반의 형성을 관측하였다<그림 43>. 톨라시균과 톨라신 독소 처리구에서는 각각 갈반이 형성되었고, 배지액이나 파아지를 처리한 경우 버섯세포에 독성을 나타내지 않아 갈반 등의 병증상은 나타나지 않았다. 그러나, 톨라시 균주와 함께 파아지 3종, hb1a, hb2a, ms8a를 각각 처리한 버섯표면에서는 톨라시 균주에 의한 갈반의 생성이 완전히 억제되었다. 이것은 고독성 파아지는 물론 저독성 파아지도 버섯조직에서 갈반병 원인균주 톨라시균을 완전히 용균함으로써 톨라신의 생성을 억제하고 갈반생성을 저해할 수 있음을 나타낸 결과이다. 이로부터 파아지를 이용한 톨라시균의 용균 효과는 pitting test를 통하여 실제 버섯에서 측정할 수 있음을 확인하였다.



<그림 44> 툴라시균에 의한 갈반 형성시 파아지의 효과.



<그림 45> 파아지의 농도감소에 따른 툴라시균의 갈반생성은 증가.

툴라시 균주와 파아지를 동시에 배양할 때, 파아지의 농도와 갈반의 생성량 사이에 상관관계를 조사하기 위하여 툴라시 균과 파아지의 양을 달리하며 pitting test를 하였다. 고독성 파아지, hb1a 배양액(1.12×10^9 pfu/mL)을 $1/2^0$ - $1/2^6$ 배로 희석하고, 툴라시균 (6.0×10^8 cfu/mL)과 50%씩 혼합한 툴라시-파아지 용액을 만들었다. 이 용액을 각각 10 μ L씩 버섯의 절단면에 처리하고 12-15시간 배양 후, 형성된 갈반을 관찰하였다. <그림 44>와 같이 툴라시 균에 의해 형성된 갈반에 비하여, 툴라시균과 파아지를 혼합 처리한 경우에는 파아지의 증가에 따라 갈반의 형성이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 툴라시균에 의해 형성된 갈반의 면적을 100으로 하여, 각 파아지 처리농도에 따른 갈반의 면적을 비교하여보면, 파아지의 수가 증가할수록 갈반의 면적이 감소하였다. 이러한 결과는 파아지의 동시 접종이 갈반병균의 갈반생성능을 현저하게 저해시킴을 보여주는 것으로 파아지의 사용으로 갈반병의 방제가 가능함을 보인다. <그림 45>는 파아지 농도와 갈반의 크기를 측정하여 정량적으로 보여준 것이다. 파아지 농도의 감소에 따라 갈반의 크기는 점차 증가하여 대조구의 갈반크기에 비하여 50% 전후까지 증가하였다. 따라서, 툴라시 균주의 버섯세포 독성은 파아지의 존재로 크게 약화되며 갈반의 생성은 낮은 농도라도 파아지의 존재에 따라 억제될 수 있음을 보여준다.

2. 재배실험을 통한 파아지 효과검증 및 적용조건 설정

(1) 파아지 효과 확인을 위한 갈반병 발병조건 확립

예비실험을 통하여 톨라신 독소에 의한 갈반병 발병이, 세포벽이 얇은 어린 버섯일수록 민감하며 갈반병의 피해가 크다는 것을 확인하였다. 또한 버섯이 어느 정도 성장하여 세포벽이 두꺼워진 경우에는 톨라신에 의한 피해가 작아지는 것도 관찰하였다. <그림 46>는 톨라시 병원균의 처리 농도에 따른 갈반병의 발병 조건을 알아보기 위한 실험으로, 발이한 어린버섯에 배양된 톨라시균 (6.0×10^8 cfu/mL)을 1-1000 배 희석하여 버섯 표면에 처리한 결과이다. 24시간 경과 후, 1-1000 배 희석한 톨라시균을 처리한 버섯에서는 확인한 갈반병이 나타나 버섯색의 변화를 보였으며, 색변화는 병원균의 처리농도에 비례하였다. 10^{-3} 배 희석한 톨라신을 처리한 경우에는 미비하게 갈색 흔적이 보였으나 버섯이 성장함에 따라 차츰 사라졌다.



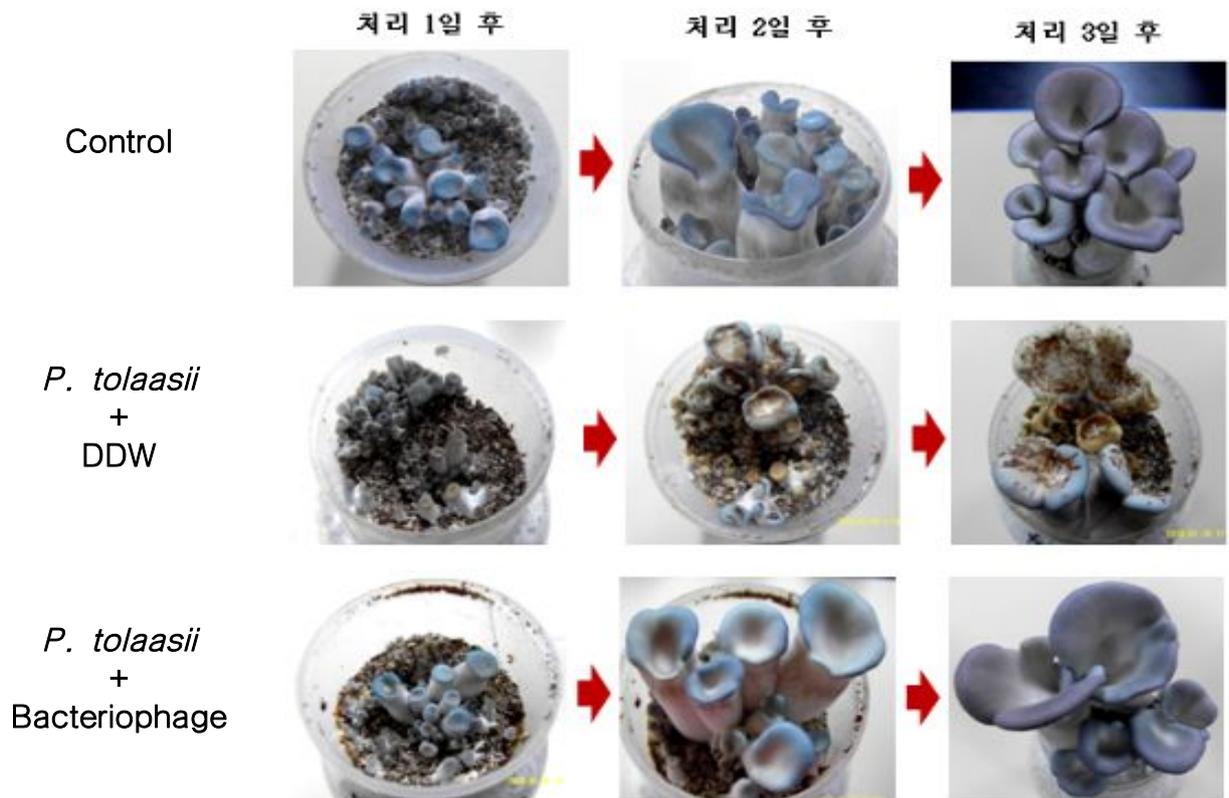
<그림 46> 갈반병균 처리 농도에 따른 갈반병 발병.

(2) 파아지의 갈반병 억제 효과

위의 실험을 바탕으로 하여, 병재배를 통해 파아지의 갈반병 억제 효과를 확인하였다. 버섯이 어릴수록 톨라시 균주에 대한 감수성이 컸으므로, 병원균의 처리는 2 cm 이내로 발이한 어린 버섯에 이루어졌다. 갈반병 발병을 위하여 병원균 *P. tolaasii* 6264 배양액과 증류수를 1:1로

혼합하여 분무하였고, 파아지에 의한 갈반병 방제효과를 확인하기 위하여 톨라시 균 배양액과 파아지 (hb1a) 배양액을 1:1로 혼합하여 분무하고 경과를 관측하였다.

<그림 47>은 시간경과에 따른 처리효과를 보여준다. 톨라시균과 증류수(*P. tolaasii* + DDW)를 혼합하여 처리한 경우 처리 1일 후부터 갈반의 증상이 나타나기 시작하여 시간이 경과할수록 조직의 수축과 반점, 건조 등의 갈반병 증상이 뚜렷하였고, 또한 대조구에 비하여 버섯의 성장이 제대로 이루어지지 않았다. 반면, 병원균과 함께 파아지를 함께 처리한 경우(*P. tolaasii* + bacteriophage)에 버섯은 처리 초기부터 대조구와 차이가 크게 나타나지 않았으며, <그림 48>에서 보여주듯, 처리 3일 후에는 대조구와 비교하였을 때 정상적인 성장이 이루어졌으며, 갈반병의 증상이 발견되지 않았다. 즉, 파아지에 의한 갈반병균 *P. tolaasii*의 멸균효과는 매우 우수하였으며, 이러한 결과는 파아지를 이용한 균상재배에서의 갈반병 억제실험 역시 매우 성공적으로 수행될 수 있음을 보여준다.



<그림 47> 파아지의 갈반병 억제 효과.

Con *P. tol* + Phage *P. tol* + DDW



<그림 48> 처리 3일 후 파아지의 갈반병 억제효과 비교.

(3) 느타리버섯 균상재배를 통한 파아지 및 TIF 효과 검증

① 느타리버섯 균상재배 시설

병재배에 비하여 균상재배를 통하여 생산된 느타리버섯은 품질이 매우 우수하여 가격면에서 약 3-5배 유리하며, 생산량에서도 약 3배의 이점이 있다. 따라서 균상재배 버섯은 병재배에 비하여 9-15배 가격경쟁력이 있으나, 버섯 재배과정중 재배상이 공기 중에 노출되어 갈반병에 매우 취약하다는 단점이 있다.

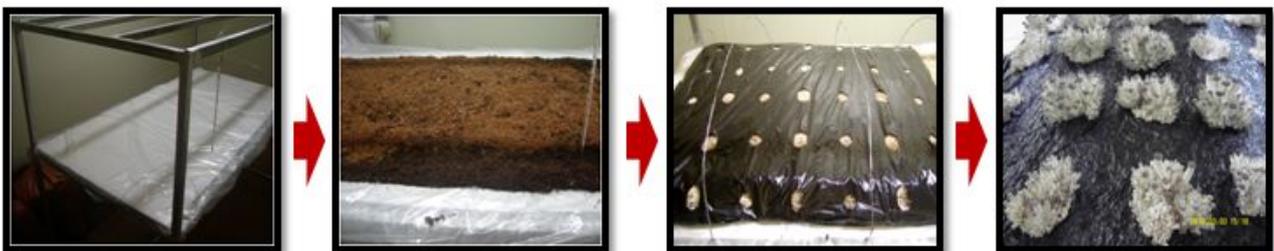


<그림 49> 느타리 버섯 균상재배를 위한 버섯재배사.

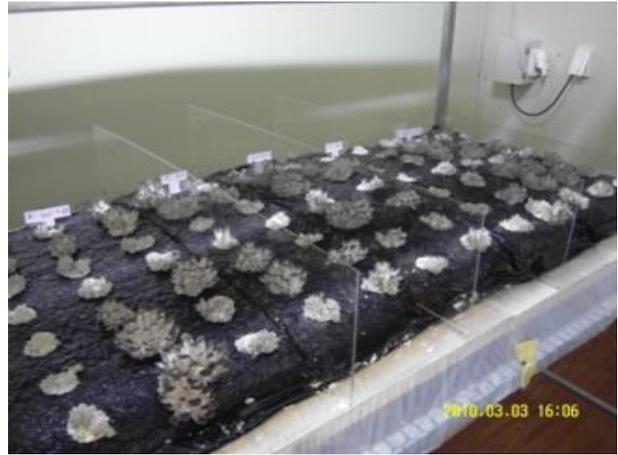
느타리버섯 갈반병은 노출이 많아 톨라시 균에 감염되기 쉬운 균상재배에서 주로 발생하므로 본격적인 갈반병 억제 방안을 시험하기 위해서는 버섯재배사 시설을 이용한 균상재배가 필수적이다. 버섯재배사를 위한 공간은 충북대학교 농장 내 기존의 25평 컨테이너를 보수하여 마련하였으며, 3평 버섯재배실 4실과 12평의 준비실을 설치하였다. 특히, 버섯재배실로 사용할 3실은 단열을 위하여 추가로 보온판넬을 시설하였으며, 냉·난방장치와 환기조절장치를 시설하였고, 가습장치를 설치하여 완벽한 재배조건을 갖추었다 <그림 49>.

② 느타리버섯 균상재배

상품성은 우수하나 갈반병에 특히 민감하여 농가에서는 재배를 꺼리는 수한품종을 집중하여 균상재배를 실시하였다<그림 50>. 여러 종류의 버섯배지 중에서 발효된 톱밥혼합 배지를 선택하였다. 균상의 접종에 앞서, 재배사 전체를 소독하여 병원균의 감염을 예방하였다. 발효한 톱밥배지에 3.3 m²당 10-15병 정도의 종균을 접종하고 적당한 크기와 모양으로 균상을 제작하여 균사배양을 하였다. 습도 85%이상, 온도는 약 28°C를 유지하며 3주 간 균사를 배양 한 후, 균사가 균상의 밑바닥까지 완전히 자랐을 때, 16-18°C로 하온하여 저온자극을 줌으로써 자실체 형성을 유도하였다<그림 51>. 이때 90%의 가습을 실시하여 충분한 수분이 공급되도록 하고 버섯이 발이되면 18°C를 유지하고 80-90%의 습도를 유지하도록 하였다. 또한 약한 빛을 쬐여 자실체의 색이 나오도록 하고, 환풍시설을 가동하여 재배사 내 이산화탄소 농도를 일정수준 이하로 유지시켰다. 재배실험은 주로 이른 가을에 시작하여 늦은 봄까지 계속되었으며, growth chamber를 이용한 병재배도 이루어졌다. 배지에 종균을 접종하여 균상을 제작하고 약 25일 후 하온하여 버섯을 발생시켜 실험하였으며, 균상에서 약 3주기 수확하며 실험을 수행하였다.



<그림 50> 느타리 버섯의 균상재배 과정.



<그림 51>느타리버섯 방제기술 최적화 실험을 위한 버섯균상재배.

③ TIF와 파아지 처리를 통한 갈반병 억제 효과 확인실험

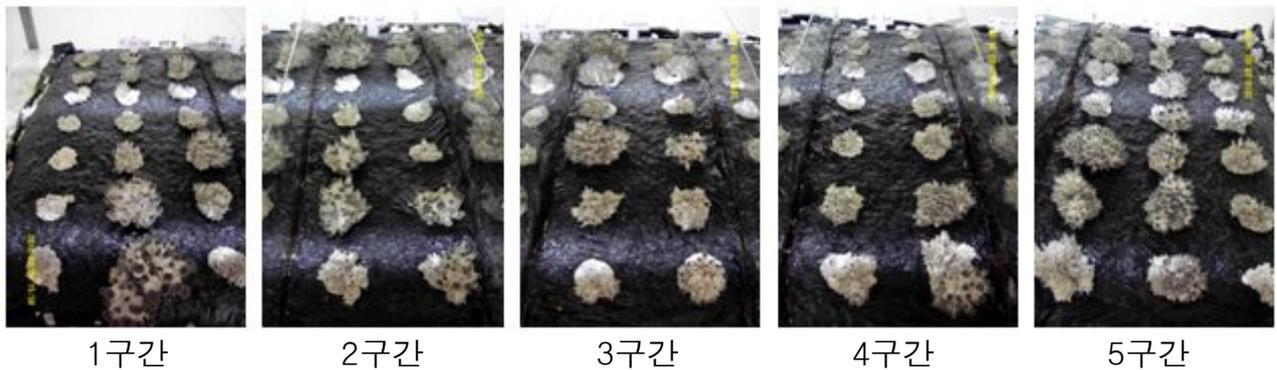
갈반병 피해는 세포벽이 발달하지 않아 톨라시 병원균과 톨라신 독소펩티드에 민감한 발이 초기 어린버섯에 가장 심하게 발생하므로, 갈반병 발병과 방제실험은 버섯이 3 cm 미만으로 비교적 균일하게 발이 되었을 때 시행하였다.



<그림 52> 효과적인 실험을 위한 버섯균상 분할.

파아지의 갈반병 방제효과를 실험하기 위한 대조구, 톨라시균(갈반병균), 톨라시+파아지의 한 조의 실험과 TIF의 갈반병 방제 효과를 실험하기 위한 또 다른 한 조의 대조구, 톨라시균(갈반병균), TIF+톨라시균을 동시에 실험하기 위하여 <그림 52>와 같이 대조구를 중심으로 대칭적으로 균상을 5구획으로 나누었다 (파아지효과확인, 갈반병 유발, 대조구, 갈반병 유발, TIF효과확인). 파아지 또는 TIF를 분무하였을 때 옆 실험군 또는 대조군에 미치는 피해를 최소화하기 위하여 높이 20 cm의 투명 아크릴판을 설치하여 실험군과 실험군 또는 실험군과 대조군

사이를 분리하였다 <그림 53>.



<그림 53> 파아지와 TIF 처리를 위한 균상의 구획.

1구간: *P. tolaasii* + Phage(파아지 효과 확인).

2구간: *P. tolaasii* (갈반병 유발).

3구간: Control (대조구).

4구간: *P. tolaasii* (갈반병 유발).

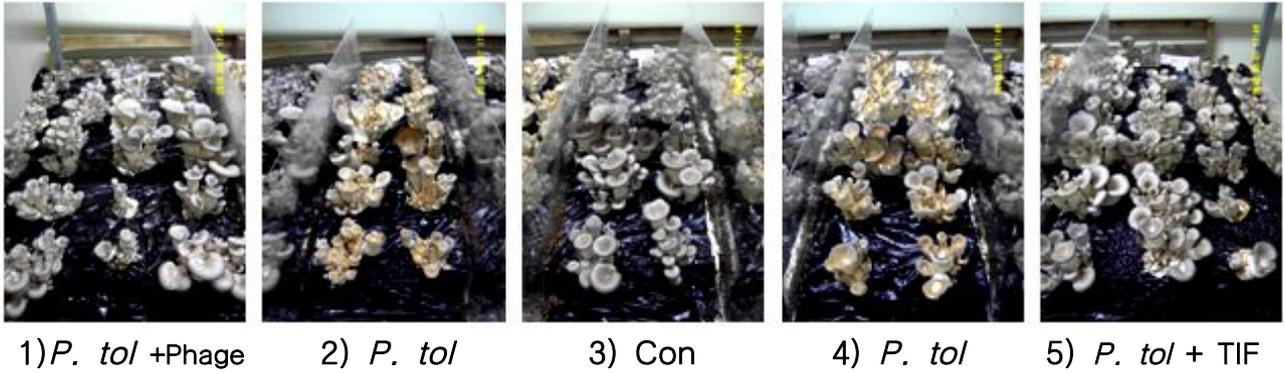
5구간: *P. tolaasii* + TIF (TIF 효과 확인).

대량배양한 병원균 *P. tolaasii* 6264를 1/10으로 희석하여 대조구(3번째 구획)를 제외한 구획 1, 2, 4, 5에 충분히 분무 후 대량 배양한 파아지(hb1a) 배양액을 1구획에, TIF-11을 5구획에 각각 분무하였다. 이와 동시에 2, 3, 4 구간에 DDW를 각각 분무하였다. 1시간 후 동일하게 반복처리하고 경과를 관측하였다.

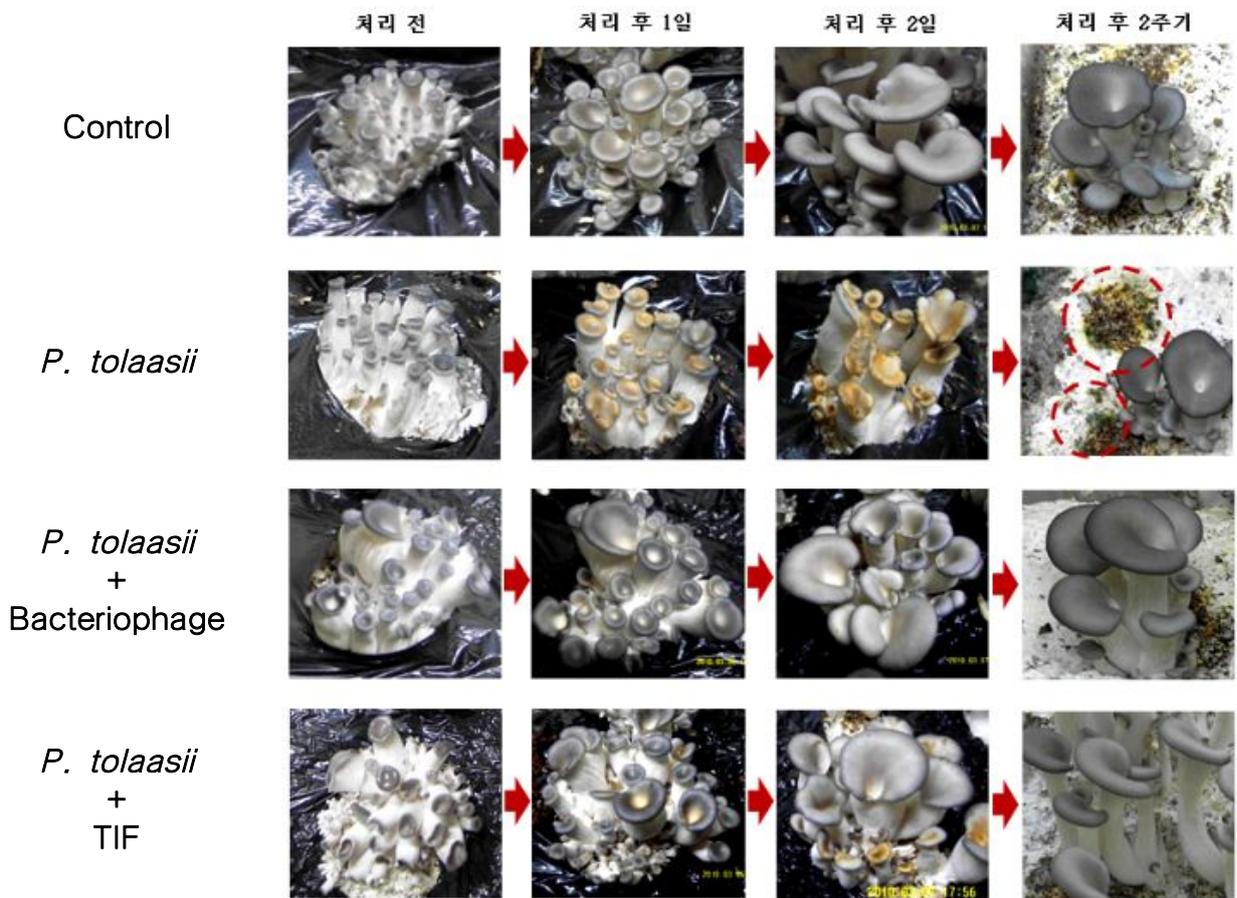
<그림 54>는 처리 후 약 40시간 경과한 것으로, 대조구(3구획)에 비하여 *P. tolaasii* 병원균을 처리한 2와 4구획 버섯의 경우 생육이 완전히 저해되고 자실체에 갈반이 만연하여 조직이 건조되고 수축되는 병징이 뚜렷하였다. 그러나, 병원균과 함께 파아지와 TIF를 각각 처리한 1구획과 5구획에는 갈반병 발병이 현저하게 감소하였고, 대조구와 같이 자실체의 계속성장이 이루어졌다. 특히 파아지를 처리한 1구획의 경우, 병원균의 제어에 의한 갈반병 저해효과가 현저하였다. 물론 갈반증상이 일부 나타나서 버섯의 상품성은 없었다.

1주기에 처리된 버섯을 모두 수확하고, 2주기에 두 번째 발이한 버섯의 상태를 구획에 따라 관찰하였다. 2주기의 버섯이 발이하였을 때 <그림 55>, 발이한 버섯의 상태는 구획에 따라 차이가 확인하였다. TIF와 파아지를 처리한 1, 5번 처리구획의 버섯배지는 비교적 건강한 상태를 유지하였으나, *P. tolaasii*를 처리한 2, 4번 구획에서는 배지에 푸른곰팡이가 만연하여 균상에 퍼지고 있었다. 즉, 파아지와 TIF를 처리한 실험구에서는 *P. tolaasii*의 개체수가 감소하거나 툴라신의 작용이 저해되어 이후 발이하는 버섯의 군사가 정상적으로 유지되었으나, *P. tolaasii*

처리구에서는 병원균이 지속적으로 유지, 증식하여 균사의 활력을 떨어뜨려 푸른곰팡이가 발생한 것이다.



<그림 54> 처리 40시간 경과 후 버섯생육.



<그림 55> 처리 구획별 1주기와 2주기(두 번째 수확) 생육비교.

붉은 점선의 원은 푸른곰팡이의 증가를 보임.

(4) Phage therapy를 위한 병원균 특성분석

앞의 포장실험에서 갈반병 억제를 위한 TIF의 효과를 <그림 55>에서 보였듯이 감염된 당대에서는 갈반병의 억제로 버섯의 생육은 회복되었으나, 처리 2일 후의 생육에서 부분적 갈반병의 발생으로 상품성은 훼손되었다. TIF의 효과는 2주기 수확에서 뚜렷이 나타나 갈반병이 완전히 억제되었으나 생육은 원래 병이 발생하지 않은 대조구에 비하여 상품성이 감소하였다. 이러한 현상은 병원균을 사멸하는 기능이 없는 TIF의 작용기작에 원인이 있다. TIF는 살균효과가 없으나 병원균에 의해 분비된 톨라신 독소의 저해로 발병을 억제함으로써 버섯조직을 보호하고, 이것은 결국 병원균의 영양공급을 차단하여 병원균의 세력을 급격히 감소시키며, 따라서 버섯의 균사나 조직이 강해져 갈반병이 억제된다. 살균력이 없는 TIF의 단점에도 불구하고 TIF의 포장실험은 성공적으로 나타났다.

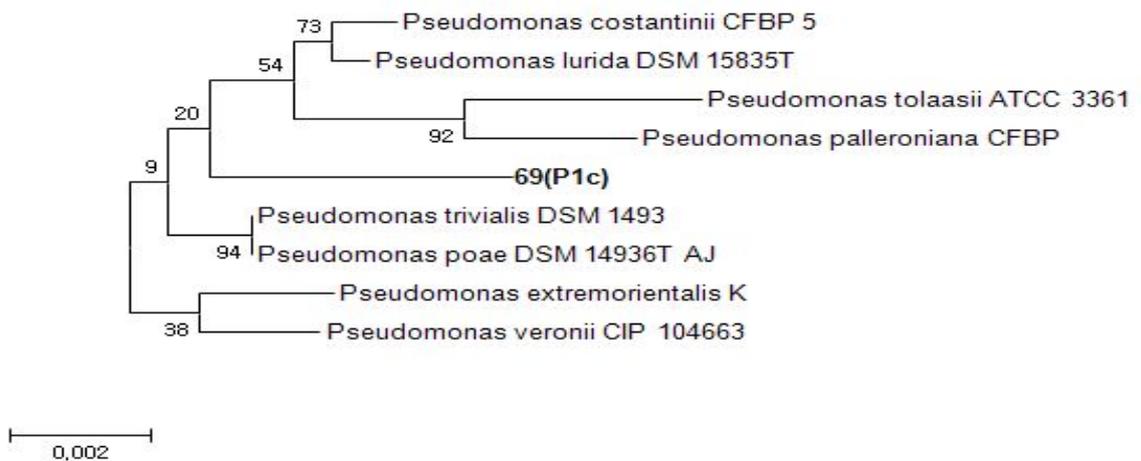
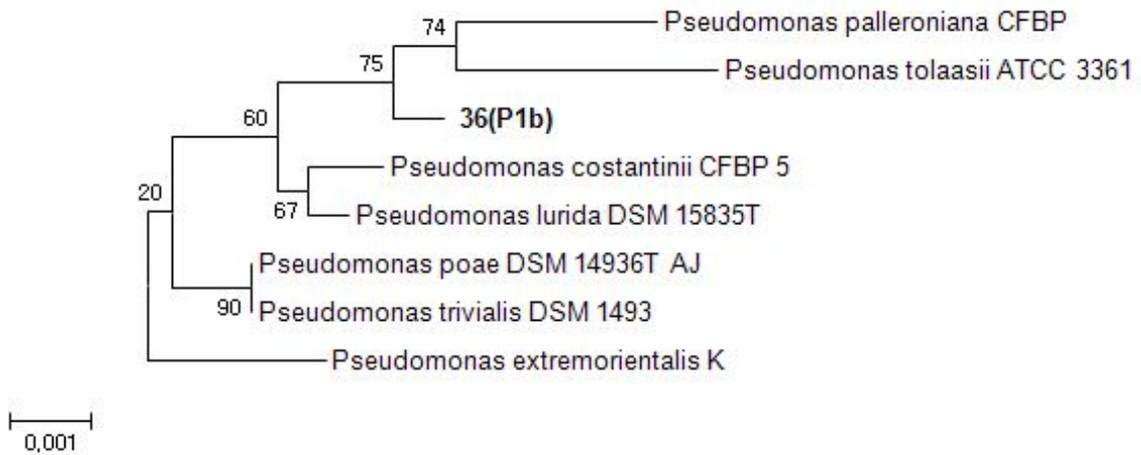
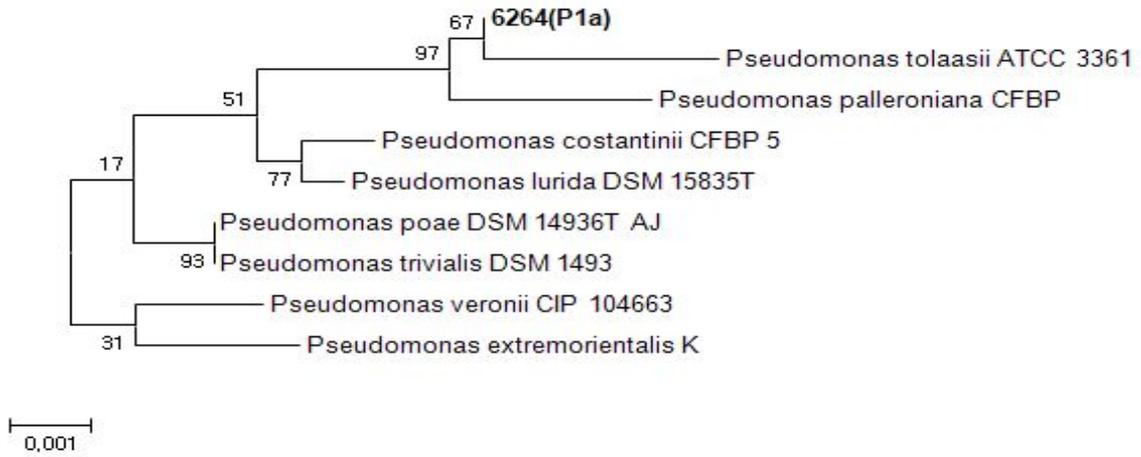
버섯재배사에서 수행한 파아지의 포장실험은 TIF 효과에 비교하여 매우 강력한 효과를 보였다. 병원균을 충분한 농도로 감염시켰음에도 불구하고 파아지의 처리는 갈반병 억제에 탁월한 효과를 발휘하여 당대에서 상품성이 높은 버섯의 수확이 가능하였다. 물론 2주기 재배에서도 우수한 품질을 보여 파아지의 발병 억제효과를 입증하였다. 이러한 결과는 갈반병 예방이나 병원균의 감염시 억제에도 파아지의 효과가 있음을 보여준다. 그럼에도 파아지 사용의 문제점은 병원균에 대한 파아지의 특이성이 매우 높아 병원균의 종류가 바뀌거나 변이가 일어난다면 파아지의 효과를 기대할 수 없다는 것이다.

따라서, 그동안 국내에서 갈반병을 유발하였던 균주들을 특성에 따라 분류하고 각 분류에 따라 특이적인 파아지를 분리하였다. 만약 갈반병을 유발하였던 모든 병원균의 종류를 사멸할 수 있는 각각의 파아지를 분리한다면 이들의 혼합액을 이용하여 병원균의 종류에 관계없이 방제가 가능할 것이다.

① 갈반병 원인 균주의 분석 및 분류

지난 20년간 충북지역을 중심으로 갈반병이 발생한 버섯재배 농가에서 분리한 균주 약 120종을 충북대학교 식물외과에서 분양받아 이들 중 용혈활성으로 측정된 독성이 큰 47종을 분리하였다. 이들에 대한 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 수행하고, 유전자 서열을 GenBank의 자료를 이용하여 균주 동정에 이용하였다. 총 47 균주중 23종이 병원균으로 알려진 *Pseudomonas tolaasii*에 속하며, <그림 56>과 <그림 57>에서는 *Pseudomonas tolaasii*에 속하는 23종의 병원균에 대한 유전자 서열에 근거한 계통수와 16S rRNA 유전자의 염기서열을 보였다. 이들 중 P1a 그룹에 속하는 균주들은 본 연구실에서 표준 병원균으로 사용하는 6264 균주와 동일한 분류에 속하며, 가장 많은 사고발생 기록을 갖고 있는 P1b 균주들과 매우 가까운 근원관계를 갖고있다. P1c 분류에는 한 균주가 속하며 6264 균주와 계통수에서도 떨어

져 있는 것으로 나타나나 *Pseudomonas tolaasii*로 분류되었다.



<그림 56> 농가에서 분리한 병원성 균주의 유전자 계통수.

위) *Pseudomonas tolaasii* P1a.

중간) *Pseudomonas tolaasii* P1b.

아래) *Pseudomonas tolaasii* P1c.

Pseudomonas tolaasii 6264 (P1a 그룹)

G TTCAGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGA
G CCGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
G CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAACGGACGCTA
A TACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC
T ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC
C AAGGCGACGATCCGTAAC TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA
C TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
C AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTT
C GGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTGCCTAATACGT
A AACTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAG
C AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
A AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA
A CCTGGGAACTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGG
T GGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA
G TGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCG
T GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
T CAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGCGCAGCTAACGCATT
A AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATT
G ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACG
C GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGAT
T GGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTC
G TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCT
T AGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAA
A ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTG
G GCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAG
G TGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC
T CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGG
G TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAG
T GGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCAC
G GTGTGATTTCATGACTGGGGTGAGTCAGNGGGGAAGGCGGAACAAAAAAA
A

Pseudomonas tolaasii 36 (P1b 그룹)

GTAAGATTTTTTTTTTTCAGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAAC
ACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCG
GAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT
TCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTG
TGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAG
TTGCCTAATACGTAACCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCT
AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAAGTACTGACTGACTAGAGTA
TGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
GGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTG
AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCG
CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCG
CAACCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTT
GCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAA
TCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGGAGTGGGTGACCAGAAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGA
GGACGTTACCACGGTGTGATTGACTGGGGTGAGTCTAAGGGGAAGG
AGCCACAAAAA

Pseudomonas tolaasii 69 (P1c 그룹)

TTTTTTTTTGGCGGCTCCTTCCTCTAGCTCCACCCAGTCATGATCCACACG
GTGTACCCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCCA
CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACC
GCGACATTTTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAG
TTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTATGGGATTAGCTCCACCT
CGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
GGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT
GTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAG
GACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAAT
CTATCTCTAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCG
TTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
TTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTCAACTTAA
TGCGTTAGCTGCGCCACTAAAAGCTCAAGGCTTCCAACGGCTAGTTGACA
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACG
CTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTG
GTGTTCCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACC
ACCCTCTACCATACTCTAGTCAGTCAGTTTTGAATGCAGTTCCCAGGTTG
AGCCCGGGGATTTACATCCA ACTTAACA AACCCACCTACGCGCGCTTTAC
GCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAACGTCAAAAACACTAAC
GTATTAGGTTAATGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAA
GACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATGTGC
CAATATTC C C C A C T G C T G C C T C C C G T A G G A G T C T G G A C C G T G T C T C A G T T
CCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGT
GAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGC
GCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTA
GCGTTCGTTTCCGAACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCAT
TACTCACCCGTCGCGCGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTCTACCGCTC
GACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCTGTACAA
AAAACCTACAT

- <그림 57> 병원성 균주인 *P. tolaasii*에 속하는 그룹의 16S rRNA 유전자 염기서열.
위) *Pseudomonas tolaasii* 6264 (P1a 그룹).
중간) *Pseudomonas tolaasii* 36 (P1b 그룹).
아래) *Pseudomonas tolaasii* 69 (P1c 그룹).

② 갈반병 원인균 분류에 따른 파아지의 분리 및 분류

<표 3>은 사고유발 균주중 *P. tolaasii*에 속하는 균주를 P1a, P1b, P1c로 배열한 것이고, 이들 균주중 6264, 36, 69를 숙주균으로하여 추가로 분리한 파아지를 나열하였다. 새로 분리한 파아지 13종중 11종이 *P. tolaasii* P1a 숙주균의 파아지로 확인되었고, 2종이 *P. tolaasii* P1c를 숙주균으로 하는 파아지로 확인되었다. *P. tolaasii* P1b 균주를 숙주로 하는 파아지는 발견되지 않아서 추가적인 파아지 분리가 수행될 예정이다. 아래 표에서의 그간에 사고를 유발하였던 병원균중 가장 많은 수가 P1b 그룹에 속하여 갈반병 발병 빈도가 가장 높은 것으로 나타났다. 파아지 분리에서 이 그룹을 숙주로 하는 파아지가 발견되지 않은 것으로 P1b 그룹에 속하는 균주가 생활하수 중에는 많지 않을 가능성을 보여주는 결과이다.

<표 3> 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii*의 분류 및 파아지

Type	Strain	Phage
P1a	6264, 32, 87, 101, 125, 152	32A1, 32A2, 32A3, 32B1, 32B2, 32B3, 87A1, 87A2, 101A1, 101A2, 101A3
P1b	36, 37, 46, 47, 48, 54, 67, 70, 71, 74, 93, 100, 119, 133, 135, 554	NI*
P1c	69	69A1, 69B1

*NI; not isolated.

<제 2 세부과제>

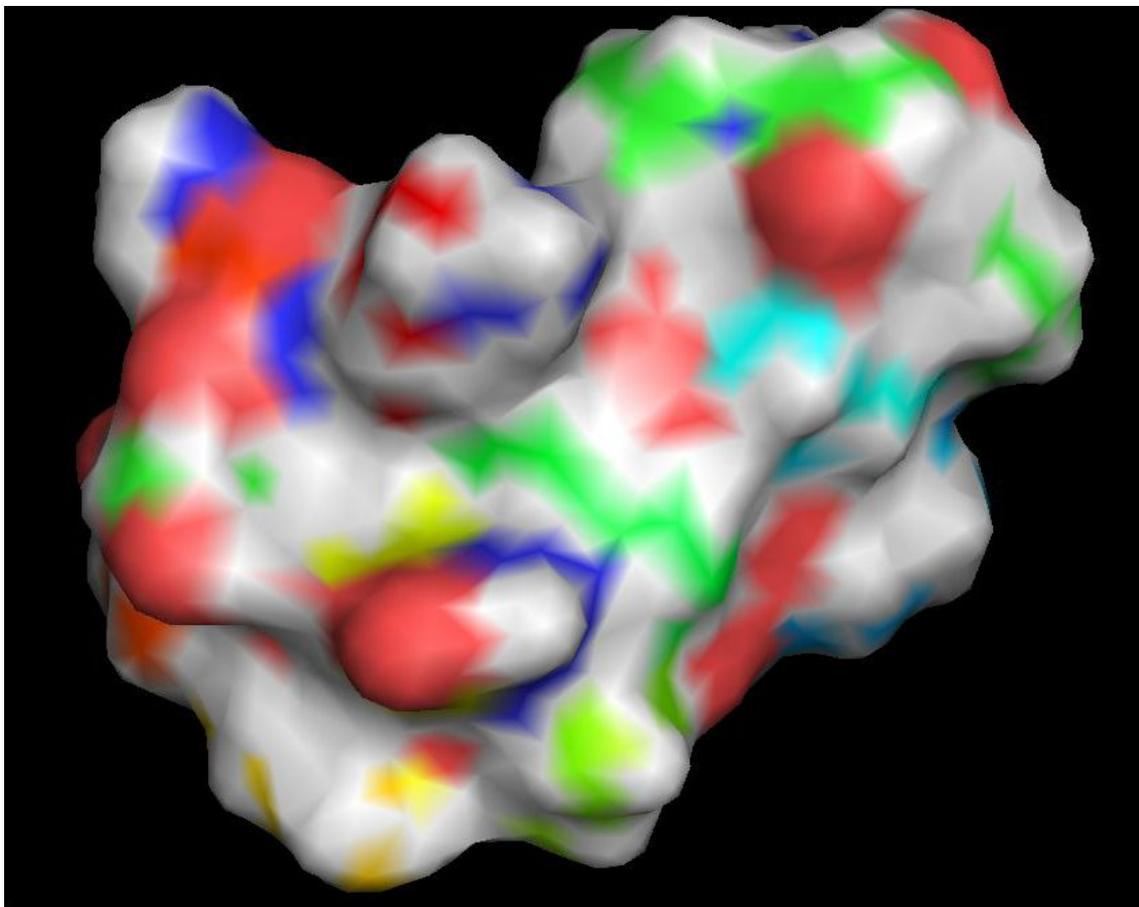
제 3 절 In silico 방법을 이용한 TIF 탐색 및 톨라신 채널 구조결정

1. In silico docking을 이용한 tolaasin 저해제의 도출

버섯에서 갈반병을 일으키는 tolaasin은 *Pseudomonas tolaasii*에 의해 생성되는 extracellular toxin의 일종으로 lipodepsipeptide이다. 미생물로부터 발견되는 다른 펩타이드와 마찬가지로 D-amino acids를 포함하고 있다. 현재까지 수 종의 isomer가 있는데 공통의 구조적 성질을 갖는다. 즉, β -hydroxyoctanoic acid moiety를 가지며, N-terminal 부위에 7개 D-amino acids가 연속적으로 배열되어 있고, C-terminal과 D-Thr의 hydroxyl group 사이에 lactone ring이 형성되어 있다. 이들 isomer 중에 tolaasin I이 버섯에서 virulent infection을 야기시키는 주된 인자로 알려져 있다. tolaasin은 transmembrane pores를 형성해서 cell membrane을 파괴함으로써 tissue alteration으로 나타난다. Tolaasin I은 β -hydroxyoctanoyl-DBut¹-D-Pro-D-Ser-D-Leu-D-Val-D-Ser-D-Leu-D-Val-L-Val-D-Gln-L-Leu-D-Val-DBut-D-alloThr-L-Ile-L-Hse-D-Dab-L-Lys¹⁸의 구조를 가지는데 여기서 DBut, D-Hse, D-Dab는 각각 Z-dehydroaminobutyric acid, D-homoserine, D-2,4-diaminobutyric acid를 나타낸다. Tolaasin I을 저해하는 물질은 버섯의 virulent infection을 막아줄 수 있는 억제제로 활용할 수 있다. 따라서 효과적인 tolaasin I 저해제(TIF)를 찾기 위하여 *in silico* docking을 사용하였고, 그 결과로 도출된 TIF에 대해서는 nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy를 이용하여 결합여부를 판단하였으며, *in vitro* hemolysis assay를 병행하여 수행하였다.

Tolaasin I에 대해 저해효과를 보이기 위해서는 먼저 tolaasin I과 결합을 해야 한다. 이와 같이 tolaasin I에 결합을 잘하는 물질을 찾기 위하여, 일반적으로 단백질-리간드 사이의 결합 여부를 판단하는 docking 실험을 수행하고자 하였다. 이를 위해서는 먼저 tolaasin I의 3차 구조가 확보되어야 한다. NMR을 이용하여 tolaasin I의 3차구조를 규명했다고 한 논문이 Jourdan 등(2003)에 의해서 발표되었으나, 이 펩타이드의 3차구조가 protein data bank에 등록되어 있지 않았기 때문에 본 연구자들은 발표된 논문의 data를 가지고 tolaasin I의 3차구조를 재현하고자 하였다. D-Pro²과 D-alloThr¹⁴ 사이에서는 left-handed α -helix가 형성되어 있고 D-alloThr¹⁴과 L-Lys¹⁸ 사이에는 lactone ring이 형성되어 있다. 전체 모양은 boat모양을 이루고 있는데 그 바닥은 D-Ser³과 D-Ser⁶이 차지하고 있는데 이들은 lactone ring에 면하면서

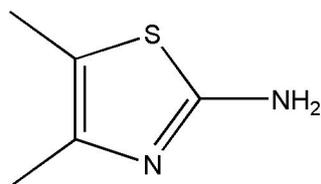
hydrophobic 성질을 갖는다. Jourdan 등(2003)은 sequential map을 논문에서 제시하고 있기 때문에 이 자료를 활용하였다. Tolaasin I의 initial structure는 Sybyl program (Tripos, St. Louis, MO)을 사용하여 구성하였다. constraints와 phi dihedral angles은 논문에서 제공한 sequential map에서 추출하여 구성하였다. 그러나 논문에서는 lipid 부분에 대한 정보는 제시하지 않기 때문에 Linux workstation PC에 설치된 Sybyl 7.3 프로그램을 이용하여 구조를 얻었다. Energy minimization은 AmberFF02 force field와 Gasteiger-Huckel charge를 사용하여 수행하였다. Energy minimization후 simulated annealing을 수행하였는데 1000 fs 동안 300 K에서 1000 K로 온도를 올렸다가 5000 fs 동안 1000 K에서 300 K로 온도를 낮추었다. 가장 낮은 에너지를 갖는 conformer를 선택하였다. 이와 같이 얻은 3차구조는 아래 <그림 58>과 같다.



<그림 58> Tolaasin I의 3차구조.

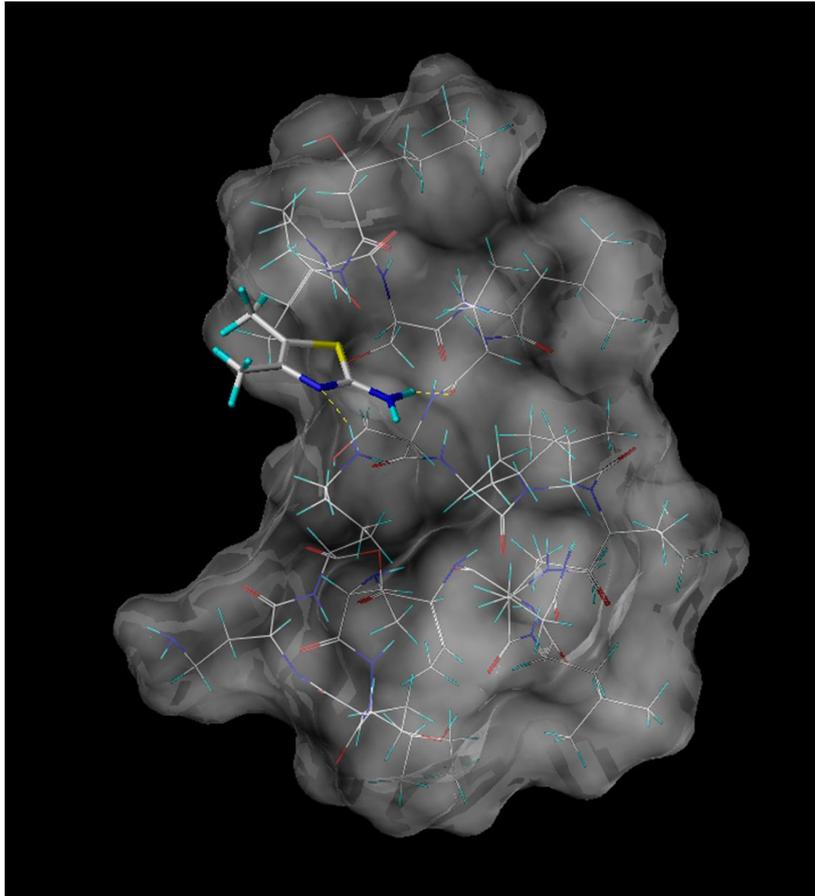
Tolaasin I에 결합하는 화합물을 도출하기 위해서 *in silico* docking 실험을 수행하였다. LeadQuest 3D compound library Vol. 3: gold type database (Tripos, St. Louis, MO)에서 제공하는 32,000 개 이상의 화합물을 대상으로 docking 실험을 수행하였다. Docking 실험은 Linux OS (CentOs 5.0 WS)를 가진 Intel Core 2 Quad Q6600 (2.4 GHz) PC에 설치된 FlexX

프로그램(Tripes)을 사용하여 수행하였다. Ligand 당 pose의 최대 수는 5로 하였고, binding site는 tolaasin I의 표면 전체를 선택하였다. Docking을 위한 selection radius는 6.5Å를 설정하였다. 각 ligand 마다 30번씩 docking을 반복하였다. Docking 결과로 얻은 docking scores는 -29와 +8.9 사이의 값이었다. 음의 값을 보이는 화합물은 대부분이 thiazole moiety를 가진 화합물들이었고 hydrophilic과 hydrophobic groups을 동시에 가지는 sugar와 carboxylic acid의 ester 결합으로 구성된 화합물은 0 근처의 docking score를 보였다. 비록 docking score값이 좋다고 해도 tolaasin I 펩타이드에 화합물이 ligand로서 잘 결합된 image를 보이는 것이 아니었기 때문에 별도로 docking score가 좋은 화합물 중 제대로 된 pose를 가진 화합물들을 선별하였다. 이와 같은 기준을 만족시킨 화합물 중 하나가 2-amino-4,5-dimethylthiazole (ADT)로서 아래 <그림 59>와 같은 구조를 가진다.

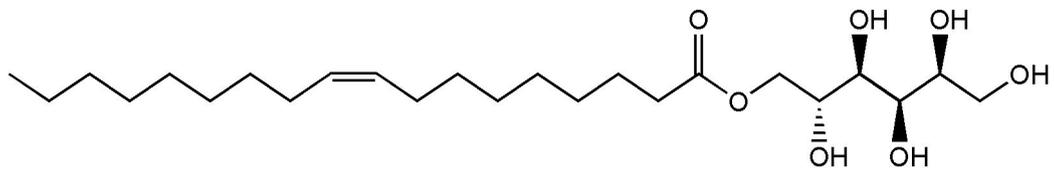


<그림 59> 2-amino-4,5-dimethylthiazole (ADT)의 구조.

이 화합물의 docking score는 -7.9로서 상당히 좋은 score를 보였다. ADT의 3차구조가 tolaasin I의 3차구조에 결합된 모양은 아래 <그림 60>과 같다. ADT이 tolaasin I의 DBut¹과 Lys¹⁸의 side chain으로 구성된 pocket에 결합한 구조를 보였는데 구체적으로는 ADT의 amine group이 Ser⁶의 carbonyl group의 oxygen과 Lys¹⁸의 amine group의 proton과 각각 hydrogen bond를 이루고 있었다.



<그림 60> Tolaasin I과 ADT의 결합된 상태.

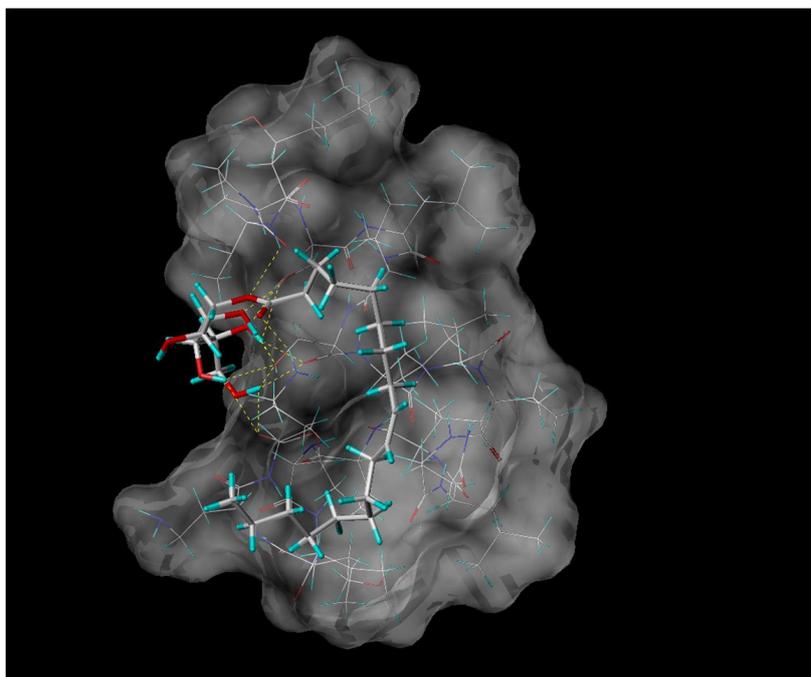


<그림 61> Sorbitololeic acid의 구조.

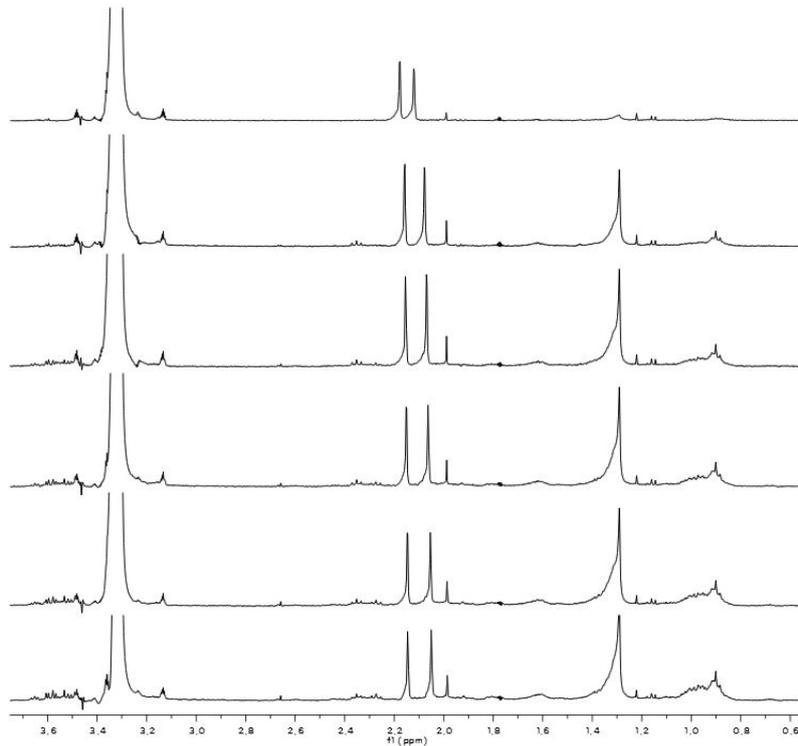
마찬가지로 sugar와 carboxylic acid 사이에 ester 결합으로 이루어진 sorbitololeic acid가 선택되었는데, 이 화합물은 docking score가 +8.5로 앞서 언급한 ADT보다는 안 좋은 결과였으나 image로 볼 때 tolaasin I에 잘 결합하는 구조였기 때문에 선택하였다 <그림 61>.

Sorbitololeic acid와 tolaasin I의 complex은 아래 <그림 62>와 같은데, sorbitol의 1-Hydroxyl group과 Ser⁶의 carbonyl group의 hydroxyl group과 oxygen과 H-bond를 형성하고, Lys¹⁸의 carbonyl group의 oxygen과도 H-bond를 형성하고 있다. 또한 sorbitol의 2-hydroxyl group과 Ser³의 hydroxyl groups, Ser⁶의 oxygen, 그리고 Ser⁶의 carbonyl group과 H-bond를 형성한다. Sorbitol의 3-hydroxyl group은 Ser⁶의 hydroxyl group, Lys¹⁸의 carbonyl

group의 oxygen과 H-bond를 형성한다. Sorbitol의 4-hydroxyl group은 Ser³과 Ser⁶의 hydroxyl group들과 H-bond를 형성한다. 그리고 ester bond의 oxygen은 DBut¹의 amine group과 interaction을 하며, ester bond의 carbonyl group은 Lys¹⁸의 amine group과 interaction을 보였다. 따라서 비록 ADT보다 낮은 docking score를 보이기는 했으나 여러 부분에서 tolaasin I과 결합을 보였기 때문에 tolaasin I의 저해효과가 클 것으로 예측되었다.



<그림 62> Sorbitoleic acid와 tolaasin I의 결합된 구조.

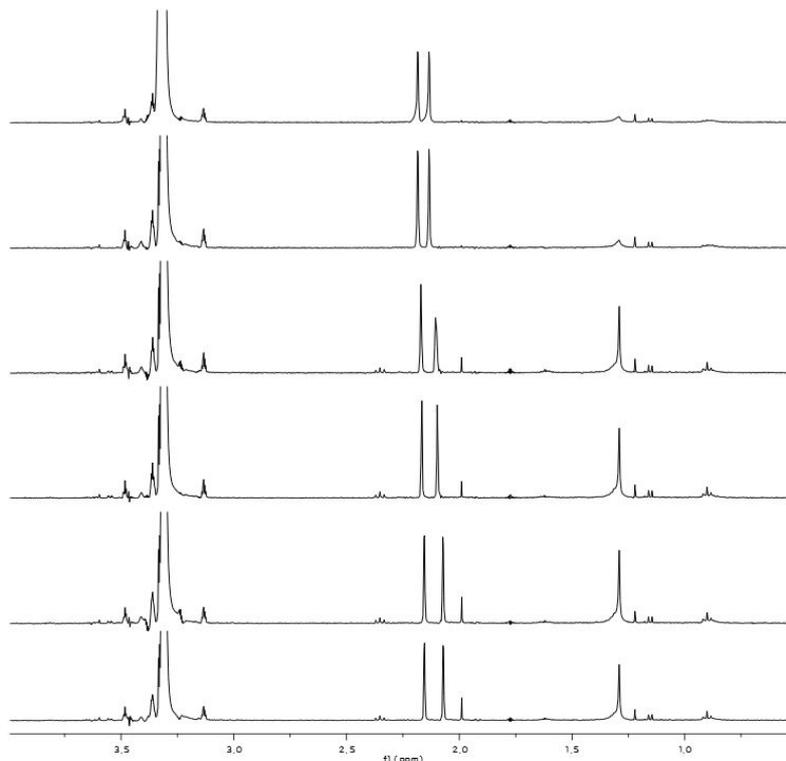


<그림 63> 2-amino-4,5-dimethyl thiazole (ADT)에 tolaasin I 용액을 첨가하면서 얻은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum.

2. NMR을 이용한 톨라신과 TIF 결합연구

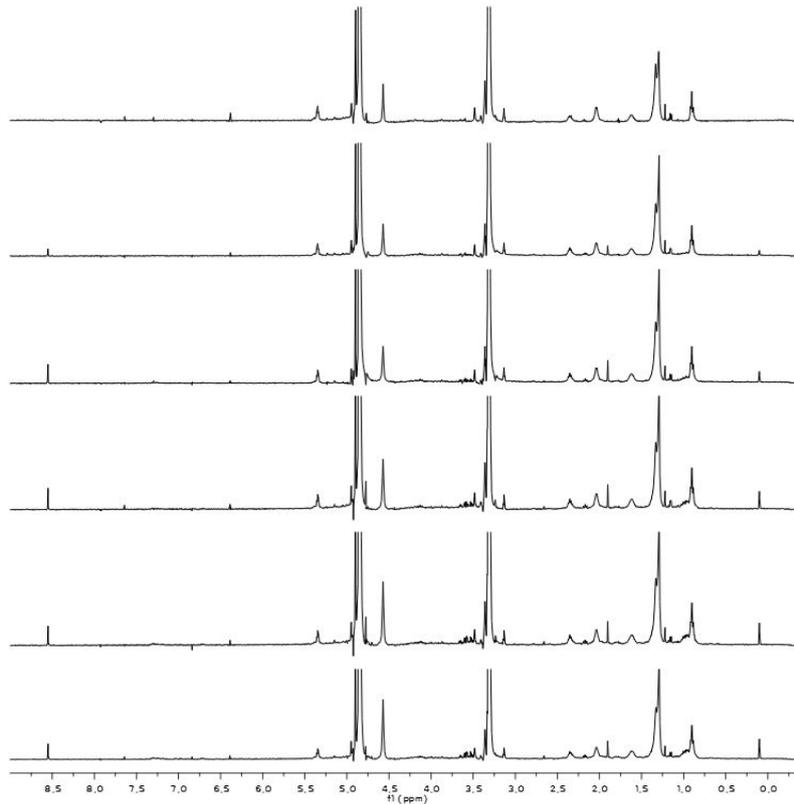
이상과 같이 *in silico* docking으로부터 얻은 tolaasin I의 저해제 2종이 과연 tolaasin I에 결합하는지 여부를 확인하기 위하여 핵자기공명분광법 (nuclear magnetic resonance spectroscopy)을 사용하였다. 저분자가 큰분자와 결합할 때 perturb 현상이 관찰되기 때문에 이를 이용하여서 tolaasin I의 저해제 후보 화합물들의 NMR signal을 관찰 대상으로 하고 여기에 tolaasin I을 첨가하면서 저해제 화합물의 NMR signal 변화를 관찰하여 결합여부를 확인하고자 하였다. 이와 같은 실험의 이론적 배경으로는 큰 분자는 저분자보다 faster relaxation과 slower diffusion을 나타내기 때문에 broad peak을 보인다. 따라서 저해제인 저분자 화합물은 sharp peak을 보이거나 고분자인 tolaasin I과 결합하게 되면 broad peak으로 변하게 될 것이다. 이 실험에 사용한 NMR은 Bruker Avance 400 (Karlsruhe, Germany)이었고, tolaasin I을 6 mg 취하여 methanol-d4 (MeOH-d4)에 녹여서 최종 농도가 1.5 mM이 되도록 하였다. 2-amino-4,5-dimethyl thiazole (ADT)은 hydrochloric acid가 결합된 화합물을 사용하였는데, 이 화합물과 sorbitansesquioleate은 펩타이드와 마찬가지로 MeOH-d4에 녹여서 1 mM의 농도가 되도록 하였다. 먼저 저해제 화합물을 5 mm NMR tube에 옮겨서 $^1\text{H-NMR}$ 실험을 수행하

였다. 여기에 tolaasin I 용액을 20 μL 부터 100 μL 까지 점차 더해갔다. 매 20 μL 를 첨가할 때마다 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 확보하였다. 2-amino-4,5-dimethyl thiazole (ADT)의 경우에 얻은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum들을 stacked plot으로 나타낸 결과는 <그림 63>과 같다.



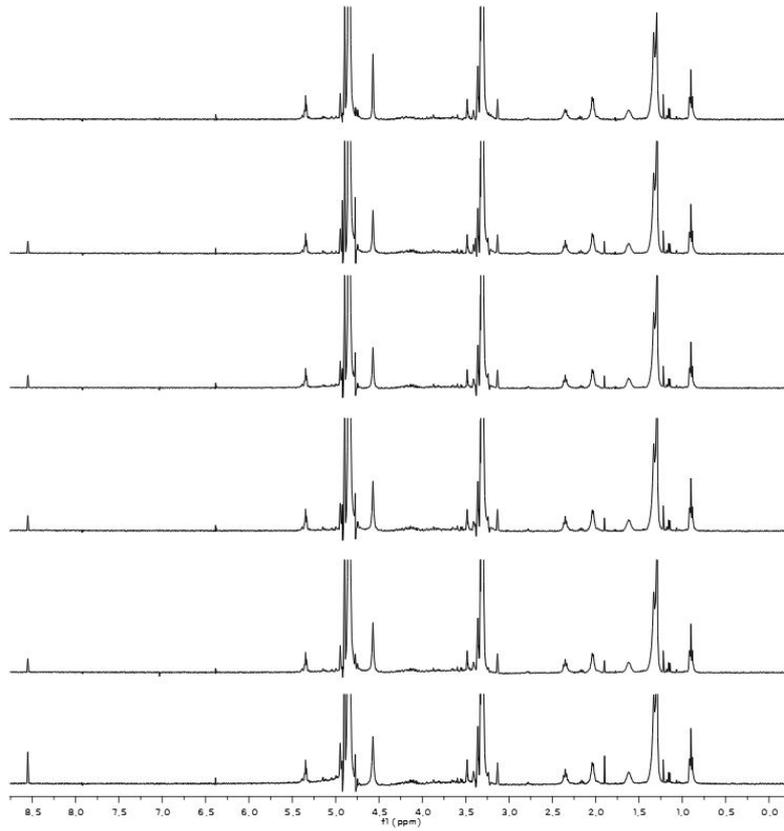
<그림 64> 2-amino-4,5-dimethyl thiazole (ADT)에 MeOH-d4 용매만을 첨가하면서 얻은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum.

여기서 2.12 ppm에 관찰된 peak은 ADT의 4-methyl proton이고 2.18 ppm peak은 5-methyl proton을 나타낸다. 이 두 peak은 tolaasin I 용액을 첨가하면서 변한 결과를 얻었다. 즉, 전자는 2.05ppm으로, 후자는 2.15ppm으로 변하였다. 그러나 이와 같은 변화가 ADT가 HCl이 결합된 상태이기 때문에 용매로 사용한 MeOH-d4만을 더해도 발생할 수 있기 때문에 이를 확인하기 위해서 tolaasin I이 없는 MeOH-d4만을 첨가하면서 동일한 실험을 수행하였다. 아래 <그림 64>에서 보듯이 동일한 spectrum을 얻었기 때문에 여기서 언급한 두 peak의 변화는 tolaasin I과 ADT의 결합으로 인해서 생긴 변화가 아닌 것으로 결정되었다. 결과적으로 ADT는 tolaasin I에 결합하지 않는 것으로 판단하였다.



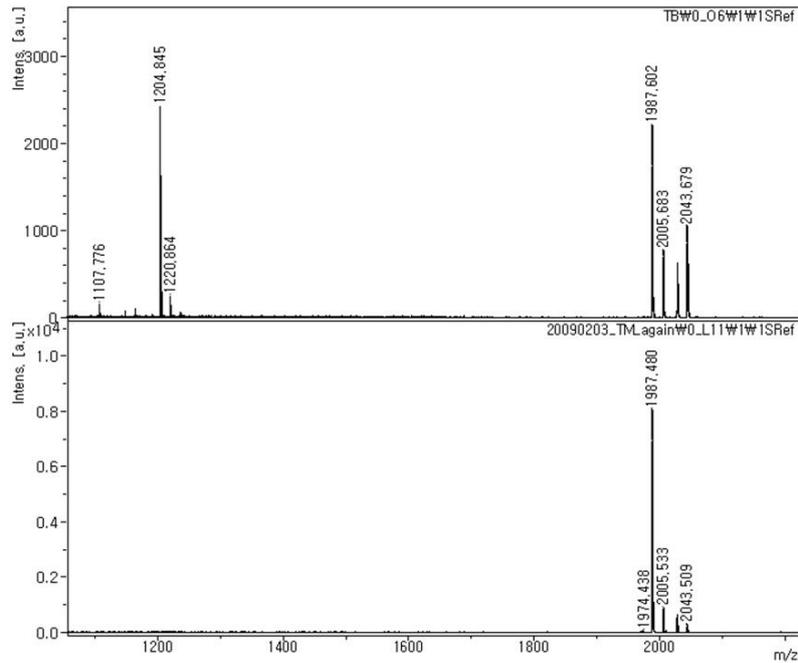
<그림 65> Sorbitansesquioleate에 tolaasin I 용액을 첨가하면서 얻은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum.

동일한 실험을 sorbitansesquioleate에 수행한 결과는 위의 <그림 65>와 같다. 여기서 보듯이 chemical shift의 변화가 관찰된 peak은 없는 반면 4.57 ppm의 peak과 0.9 ppm peak의 area를 서로 비교하면 tolaasin I 용액을 첨가해 가면서 이 비율이 증가한 것을 알 수 있는데 약 38%까지 증가하였다. 마찬가지로 현상이 1.31 ppm의 peak과 0.9 ppm peak을 비교한 비율은 32%까지 감소한 결과를 보였다. 즉, 어느 한 방향으로만 peak의 intensity가 변한 것이 아니고 서로 반대 방향으로의 경향을 보였다는 것을 알 수 있다. 0.9 ppm, 1.31 ppm, 4.57 ppm은 각각 oleic acid의 methyl group과 methylene groups 그리고 hydroxyl groups을 나타낸다.



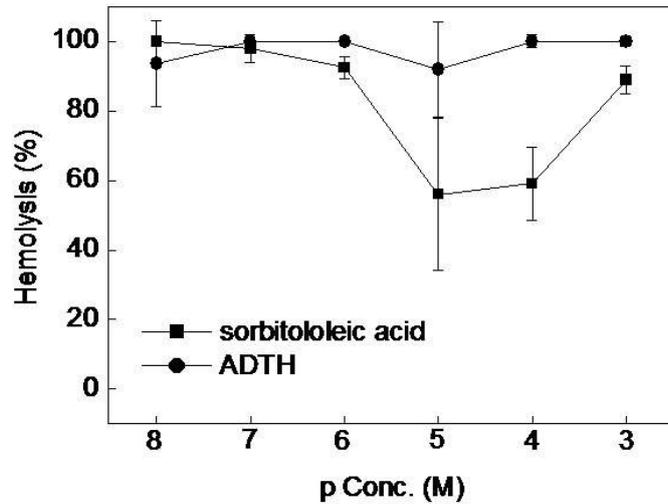
<그림 66> Sorbitansesquioleate에 MeOH-d4 용매만을 첨가하면서 얻은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum.

앞서 언급한 바와 같이 이 같은 변화가 단순히 MeOH-d4의 첨가만으로도 발생하는지를 확인하기 위하여 ADT에서와 동일한 실험을 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었는데 처음부터 마지막까지 동일한 spectrum을 얻었기 때문에 위에서 얻은 실험결과는 MeOH-d4에 의한 것이 아니고 tolaasin I의 결합에 의한 것으로 결론지을 수 있었다<그림 66>.



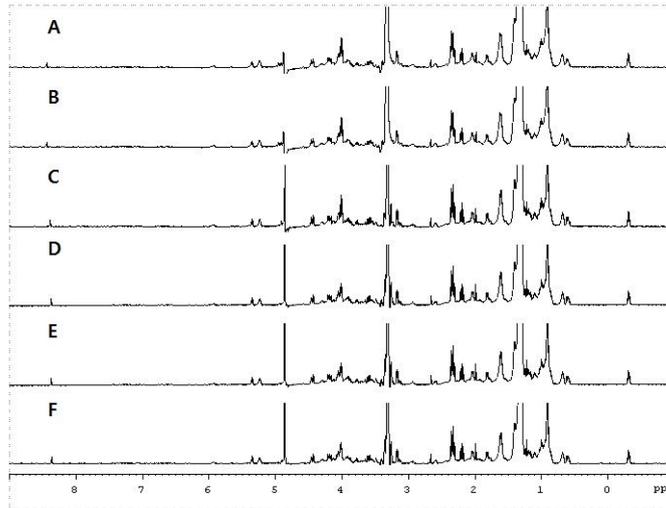
<그림 67> Tolaasin I의 배양액과 membrane 분획에 대한 질량분석 시험.

이상의 실험을 위해서는 tolaasin I의 확보가 필요한데, *Pseudomonas tolaasii*을 Pseudomonas Agar F (PAF, 1L, Difco, Detroit, MI)에서 25°C로 3일간 배양하였다. 배양액을 n-butanol (1L)로 추출한 후 추출액을 동결건조하였다. 건조물을 420 mg 얻어서 50% aqueous ethylacetate 용액에 녹였다. Ethylacetate 분획과 membrane으로 나누어 membrane 분획을 질량분석기 (Mass Spectrometry)로 측정된 결과 여기에 tolaasin I이 포함된 것을 확인하였다 <그림 67>. 최종적으로 6 mg의 tolaasin I을 확보하였다.



<그림 68> Tolaasin I에 의한 hemolysis에 대한 sorbitol과 ADT의 효과.

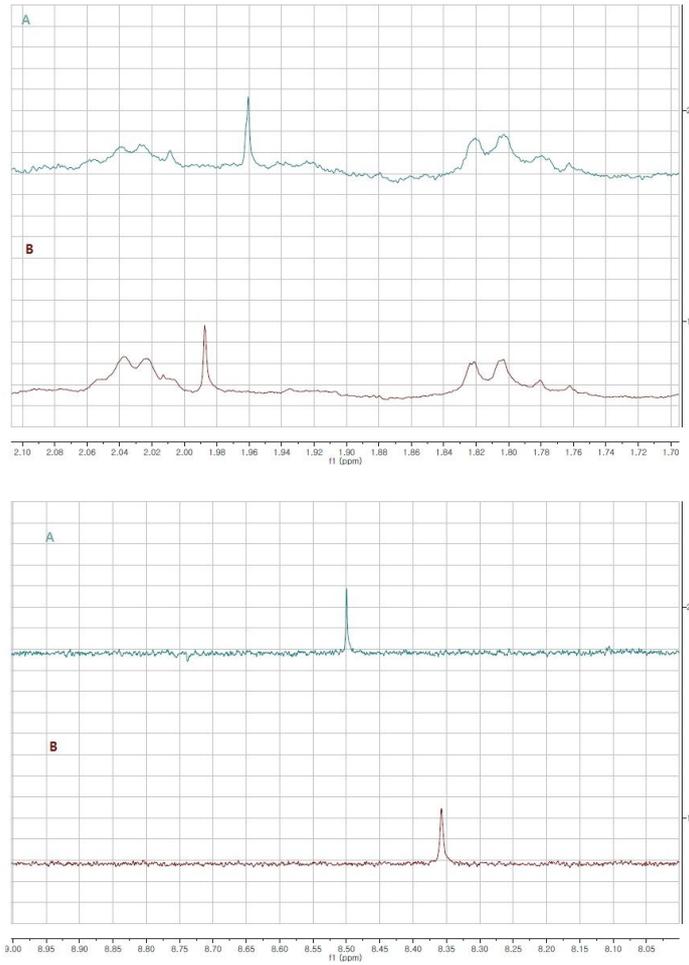
여기까지 실험한 결과는 단지 sorbitol이 tolaasin I에 결합했다는 증거는 되지만 과연 저해작용을 하는지에 대한 근거는 되지 못하기 때문에 추가로 hemolysis 현상을 측정하였다. Tolaasin의 hemolytic activity는 rat erythrocytes로 측정하였다. Defibrinated rat erythrocytes를 HBS (HEPES-buffered saline; 5 mM HEPES and 150 mM NaCl, pH 7.4)로 3회 세척한 후 HBS buffer에 희석하여 10% 용액을 얻었다. 이를 37°C에서 30분간 incubation 하였다. Hemolysis는 spectrophotometer (U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. 이 결과는 <그림 68>과 같은데 sorbitol은 5 pM에서 60%까지 tolaasin I의 hemolysis를 저해한 반면, ADT는 전혀 변화를 주지 못했음이 관찰되었다. 따라서 sorbitol은 tolaasin I의 저해제로서 작용하는 것이 밝혀졌다.



<그림 69> Zinc 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR spectrum의 변화.

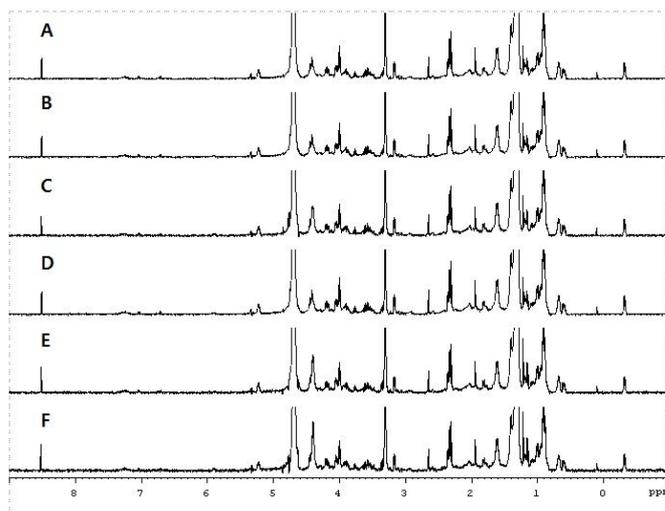
3. 핵자기공명분광법을 이용한 톨라신과 양이온 사이의 결합에 대한 연구

Zinc, sodium, calcium의 세 가지 양이온이 tolaasin에 결합하는지 여부를 핵자기공명분광법으로 확인하고자 하였는데 초기에는 각각의 양이온을 $ZnCl_2$, NaOH, $CaCl_2$ 로부터 확보하였으나 NaOH의 경우에는 pH에 의한 영향을 배제하기 어려워서 NaCl로 source를 바꾸어서 추가 실험을 하였다. 또한 세가지 양이온의 첨가에 의한 NMR data에서 chemical shift의 변화 및 intensity의 변화에 대한 해석이 미비하였는데 현재는 완전한 assignments를 통하여 이들 세가지 양이온이 tolaasin에 결합한다는 사실에 대한 확증을 얻게 되었다. zinc 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR data에서의 변화를 관찰하기 위하여 위와 같은 stacked plot를 구성하였다<그림 69>.



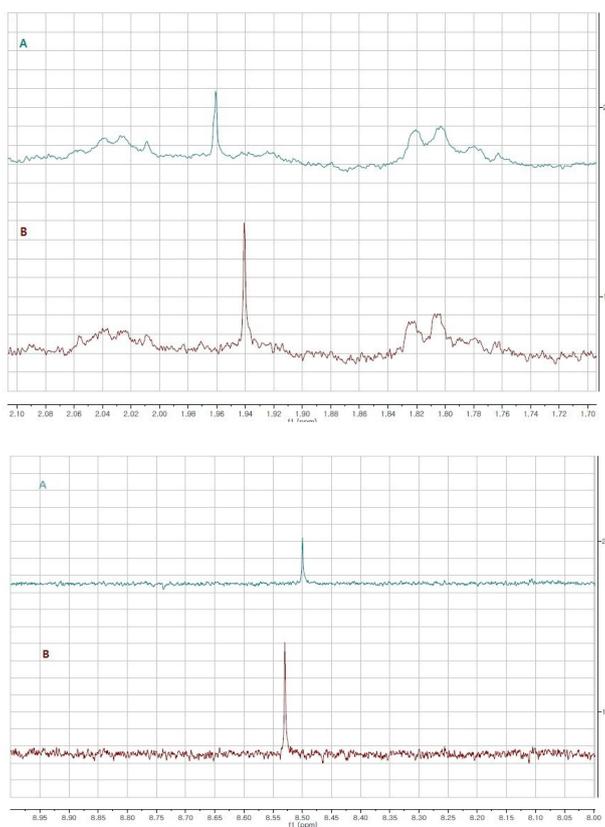
<그림 70> Zinc 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR spectrum의 확대한 부분.

변화된 부분을 관찰하기 위하여 위와 같이 확대하여 보면 두 군데 차이나는 부분을 관찰할 수 있었는데 이 부분은 1.96 ppm \rightarrow 1.99 ppm (β proton of Dab¹⁷) 와 8.50ppm \rightarrow 8.35ppm (NH of Dab¹⁷) 이었다. 즉, zinc 이온은 tolaasin의 Dab¹⁷에 결합한다고 판단되었다<그림 70>.



<그림 71> Sodium 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR spectrum

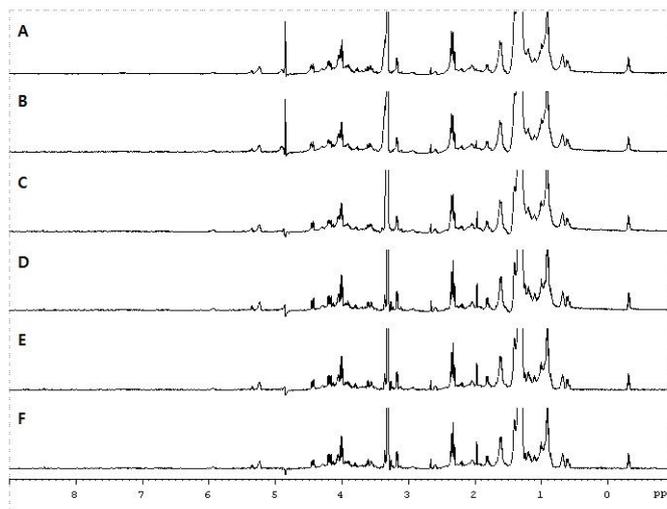
Sodium 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR data에서의 변화를 관찰하기 위하여 위와 같은 stacked plot를 구성하였다<그림 71>. 이 실험은 NaOH로부터 sodium ion source를 사용한 것과는 달리 NaOH에 의한 pH 영향을 배제하기 위하여 NaCl로 재실험 한 결과이다.



<그림 72> Sodium 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR spectrum의 확대한 부분.

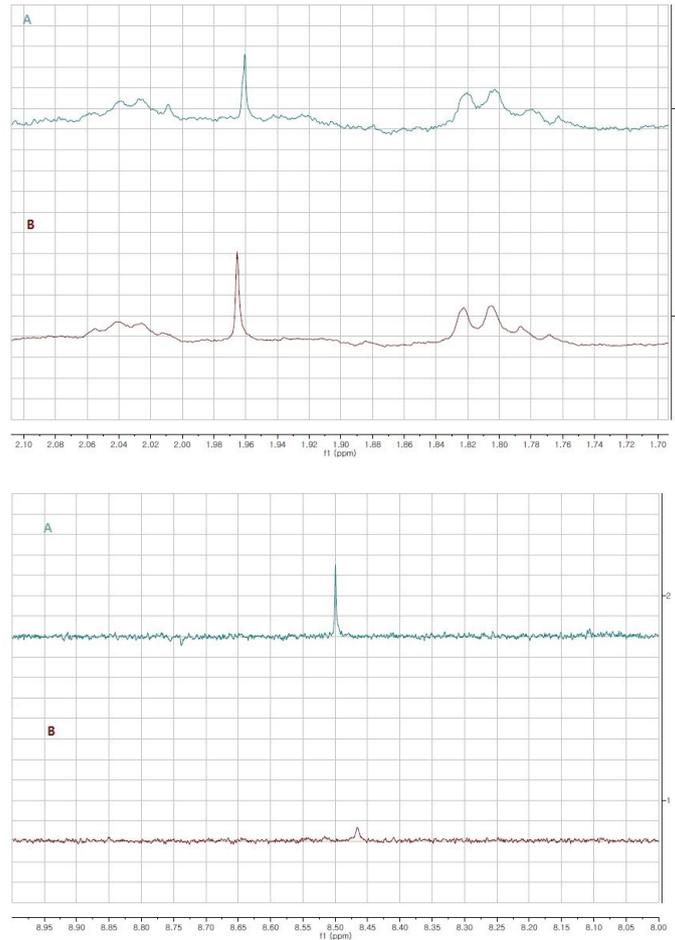
위의 확대한 두 개의 spectrum에서 보듯이 1.96pp->1.94ppm 과 8.50ppm->8.53ppm의 두 변

화로부터 sodium 이온 역시 zinc 이온과 마찬가지로 Dab¹⁷에 결합한다는 결과를 얻었다<그림 72>.



<그림 73> Calcium 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR spectrum.

앞서 언급한 zinc 및 sodium과 마찬가지로 calcium 이온에 대한 tolaasin 결합 여부를 관찰하고자 위와 같은 stacked plot를 구성하였다<그림 73>.



<그림 74> Calcium 이온의 첨가로 인한 tolaasin의 NMR spectrum의 확대한 부분.

위의 확대한 두 개의 spectrum에서 보듯이 1.96pp->1.97ppm 과 8.50ppm->8.47ppm의 두 변화로부터 calcium 이온 역시 zinc, sodium 이온과 마찬가지로 Dab¹⁷에 결합한다는 결과를 얻었다<그림 74>.

결론적으로 zinc, sodium, calcium 양이온들은 tolaasin I의 lactone ring을 구성하는 아미노산 중 하나인 Dab¹⁷에 결합하는 결론을 얻었다.

4. 톨라신에 의해 형성된 이온채널의 3차구조 결정

Tolaasin I monomer의 3차구조는 2003년에 Jordan 등에 의해서 NMR을 사용하여 결정되었다. Tolaasin I은 모두 18개의 아미노산으로 구성되어 있다.

D-But¹-D-Pro-D-Ser-D-Leu-D-Val-D-Ser-D-Leu-D-Val-L-Val-D-Gln-L-Leu-D-Val-D-But-D-alloThr-L-Ile-L-Hse-D-Dab-L-Lys¹⁸

그리고 1번 위치의 *Z*-dehydroaminobutyric acid에 β -hydroxyoctanoyl acid가 결합되어 있다. 또한 14번인 D-alloThr와 18번인 L-Lys 사이에 lactone ring이 형성되어 있다. 또한 2번인 D-Pro부터 14번 아미노산 사이는 left handed α -helix가 형성되어 있다. 1번에 붙어 있는 β -hydroxyoctanoyl acid는 α -helix와 나란한 구조를 이룬다.

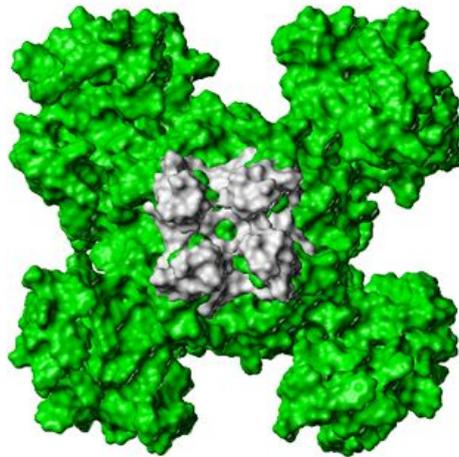
Tolaasin I로부터 형성된 이온 채널은 zinc이온에 의해서 활성이 저해된다는 사실은 이미 본 과제 1세부책임자에 의해서 결정되어 보고된 바 있다. 이와 같은 결과는 zinc 이온이 톨라신 I이 가지고 있는 lactone ring을 통과해서 일어날 수도 있기 때문에 먼저 이에 대한 연구를 수행하였다. Lactone ring의 크기는 5Å x 7Å 이므로 이보다 작은 크기인 zinc 이온이 통과할 수 있으나 tolaasin I의 3차구조를 바탕으로 볼 때 lactone ring은 van der Waals 구름 때문에 구멍이 드러나 있지 않아서 이와 같은 가능성은 배제하게 되었다. 따라서 tolaasin I이 trimer 또는 tetramer를 형성함으로써 이온 채널을 형성하여 zinc 이온을 투과시킴으로써 세포에 영향을 주는 것으로 판단하였다.

단백질이나 펩타이드의 3차구조를 결정하는 방법으로는 X-ray crystallography, NMR spectroscopy, Molecular modelling 방법이 널리 사용되는데 본 연구에서는 molecular modelling 방법을 사용하여 이온 채널의 3차구조를 결정하였다. 그 이유는 tolaasin I은 18개에 불과한 작은 펩타이드이기 때문에 결정을 얻기가 쉽지 않을 뿐만 아니라 1번 아미노산에 연결되어 있는 β -hydroxyoctanoyl acid가 rigid structure를 갖지 못하고 flexible하므로 더더욱 결정을 얻는게 어려워서 X-ray crystallography 방법은 배제하였다. 또한 tolaasin I이 trimer 또는 tetramer를 형성한 상태를 얻기가 용이하지 않아서 NMR을 이용한 실험도 배제하였다.

톨라신 I의 3차구조는 이미 NMR을 이용하여 결정한 구조를 이용하였는데 실험을 위해서 사용한 프로그램은 Intel Core 2 Quad Q6600 (2.4 GHz) computer에 설치된 Sybyl (Tripos, St. Louis, MO) 이었다. 단순한 docking 방법으로 trimer 또는 tetramer의 tolaasin I의 3차구조를 얻고자 이미 여러 가지 방법을 시도한 바 있었으나 만족할 만한 결과를 얻지 못하여서 새로운 방법을 시도하였다. 우선 이온 채널을 구성하기 위한 template를 결정하고자 하였다. Tolaasin

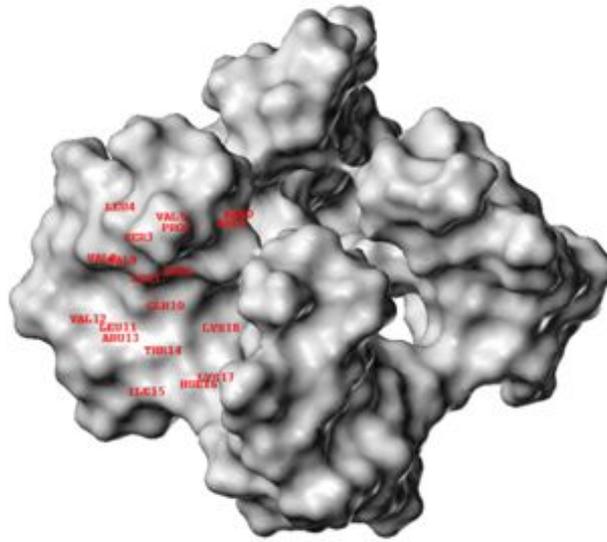
I이 이온 채널을 형성하기 위해서는 적어도 trimer 이상의 multimer의 형성이 필요하고, 또한 tolaasin I의 길이가 23Å에 이르기 때문에 이를 바탕으로 이온 채널 구조를 찾고자 하였다. 세포막의 평균 두께는 30Å으로 알려져 있기 때문에 tolaasin I이 trimer 또는 tetramer를 형성한다고 해도 이온이 통과하기 위해서는 double layer의 형성이 필요하다고 판단하였다. Trimer로 구성된 대부분의 이온 채널은 Protein Data Bank에 등록된 3차구조를 보면 tolaasin I보다 훨씬 긴 구조를 가지고 있음이 밝혀졌다. 따라서 PDB에 등록된 이온 채널의 trimer들은 template로 사용이 어려워 tetramer를 대상으로 하였다. 왜냐하면 PDB에 등록된 trimer로 구성된 이온 채널들은 그 길이가 세포막의 두께 보다 길어서 double layer의 형성이 불필요하기 때문이다. PDB에 등록된 non-redundant tetramer인 이온 채널로는 3IFX, 3E83, 3CO2, 2H95, 2OVC, 1P7B, 1BHP가 발견되었는데, 이들은 모두가 tolaasin I과 alignment 시킨 결과 일치하지 않음이 밝혀져서 제외하고 유일하게 KCNQ1만이 tolaasin I과 align되어서 이것을 template로 사용하였다. KCNQ1은 human voltage-gated potassium channel로서 cardiac action potential의 repolarization phase에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. KCNQ1은 다른 potassium channel인 KCNE1, KCNE3과 heteromultimer를 구성하는 것이 보고되어 있다. 그러나 이들의 3차구조는 PDB에 등록되어 있지 않고 논문의 supplementary material로서 제공되었기 때문에 이를 이용하였다. KCNQ1의 X-ray 결정 구조는 tetramer의 구조를 가지고 있었는데 각각의 monomer는 Cys¹²²와 Gln³⁵⁹ 사이의 238개의 아미노산으로 구성되어 있다. 특히 B chain의 3번째 alpha-helix에 해당하는 Leu⁴⁵, Leu⁷¹ 사이의 잔기들은 transmembrane domain으로 알려져 있고 이 부분을 tolaasin I의 이온 채널 구조를 만들기 위한 template로 사용하였다. 이 α -helix 부분은 34Å의 길이를 갖고 있다. 논문으로 발표된 구조는 open ion channel mode와 closed mode 두 가지 모두를 제공하는데 본 연구에서는 전자를 선택하였는데, 그 이유는 tolaasin I이 이온 채널을 구성하여 zinc 이온과 같은 이온을 통과시키기 위한 구조에 적합하다고 판단하였기 때문이다.

Template는 238개의 아미노산으로 구성된 구조를 갖고 있고 target 펩타이드는 18개의 아미노산으로 구성된 구조를 가지므로 이 둘 사이에서 서로 유사한 부분을 찾은 결과 template의 Val³⁵⁵ 주변의 구조가 target 펩타이드와 가장 유사하였기 때문에 template의 Val³⁵⁵와 target의 Val¹²를 align하였다. 앞서 언급한 Sybyl 프로그램을 이용하여 이와 같은 실험을 4번 반복함으로써 tetramer로 구성된 tolaasin I의 구조를 확보하게 되었는데 그 결과는 아래 <그림 75>와 같다. 이 그림에서 보듯이 tolaasin I은 template 단백질의 tetramer에 꽂잎같이 얹혀진 모양을 가진다.



<그림 75> Tetramer KCNQ1에 겹쳐진 tolaasin I 네분자.

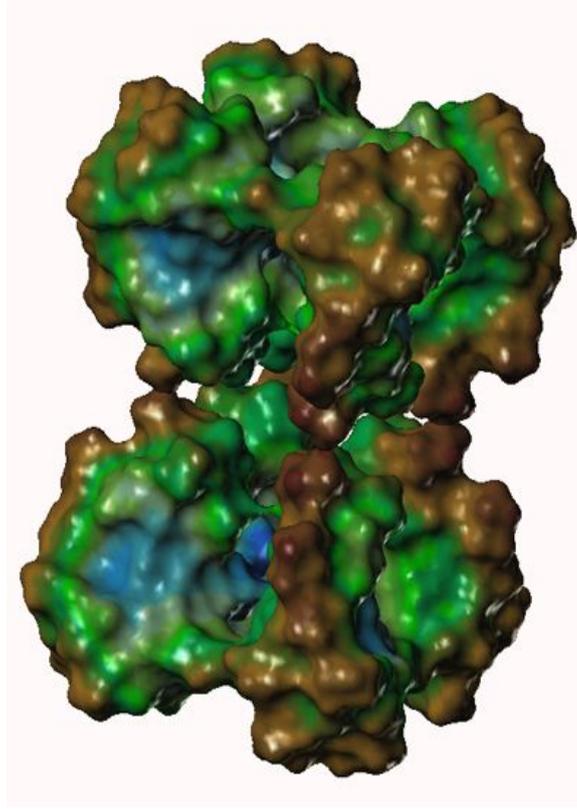
Tolaasin I이 zinc, sodium, calcium 등과 같은 양이온과 결합한다는 결과와 결합 조건이 밝혀졌기 때문에 이를 근거로 tolaasin I이 구성한 이온 채널의 3차구조가 가져야할 몇가지 조건이 도출되었고, 여기서 얻은 tolaasin I 이온 채널의 3차구조의 최종 결정에 추가하였다. 즉, $^1\text{H-NMR}$ 실험으로부터 양이온을 tolaasin I 용액에 더하면 L-Hse¹⁶ 및 D-Dab¹⁷ 두 잔기의 chemical shift와 intensity가 변하는 결과를 얻었기 때문에 tolaasin I 이온 채널의 안 쪽 표면에 이 두 잔기가 위치해야 한다. 아래 <그림 76>에서 보면 이와 같은 조건을 잘 충족시킨 구조임이 밝혀져서 본 실험으로부터 얻은 tolaasin I 이온 채널의 3차구조의 정확성에 대한 근거가 확보되었다.



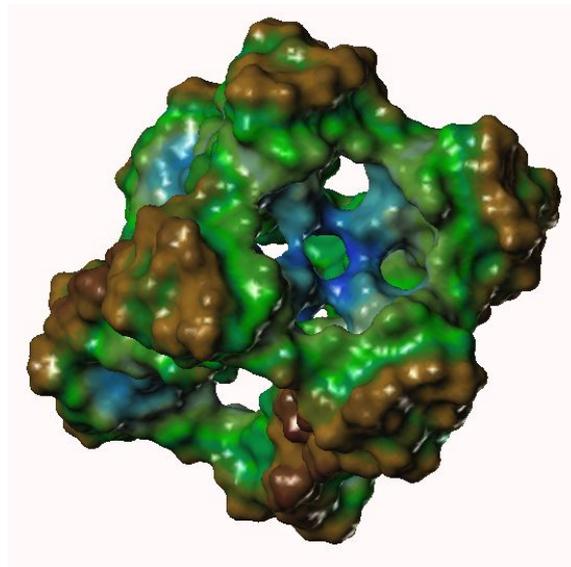
<그림 76> Tolaasin I에 의해 형성된 ion channel.

일반적으로 이온 채널은 세포막 내에 위치하기 때문에 이온 채널의 외부 표면은 세포막의 내부와 유사한 hydrophobicity를 지니게 된다. 그런데 본 실험에서 얻은 tolaasin I 이온 채널은 외부 표면에 Ser, Gln, Thr, Lys들이 위치하고 있어서 이와 같은 조건도 충족시킨다. 또한 tetramer로 구성된 tolaasin 이온 채널의 내부 홀의 크기는 3Å의 직경을 갖고 있기 때문에 이온의 통과가 가능한 것으로 판단되었다.

앞서 언급한 바와 같이 tolaasin I monomer의 길이는 23Å에 불과하므로 세포막 내 위치할 경우 아래 위가 가리게 되어 1가 양이온이 통과하기 어려울 것으로 판단되어 double layer 구조를 예상하였다. 따라서 double layered tetramer 구조를 확보하기 위해서 tolaasin 펩타이드의 N-terminal 부분에 가상적인 평면을 놓고 거울상 이성질체인 tetramer를 배치하였다. 그 결과로 아래 <그림 77>에서 보듯이 아래 위가 동일한 tetramer로 구성된 tolaasin I octamer의 구조를 얻게 되었다.

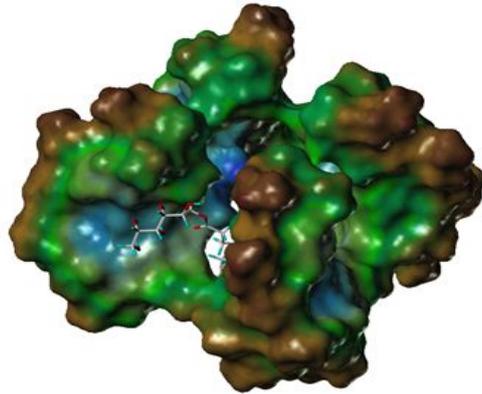


<그림 77> Octamer tolaasin I로 구성된 ion channel (옆에서 관찰한 모습).

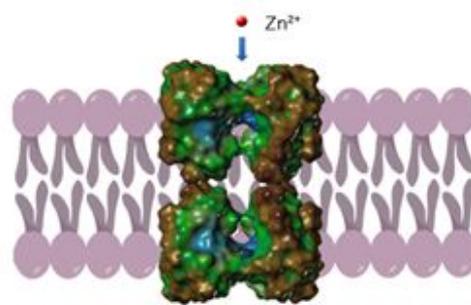


<그림 78> Octamer tolaasin I로 구성된 ion channel (위에서 관찰한 모습).

위의 구조는 tolaasin I octamer 구조를 옆에서 관찰한 구조이고 아래의 <그림 78>은 위에서 관찰한 그림이다.



<그림 79> Tolaasin I inhibitor, sorbitololeic acid가 octamer tolaasin I로 형성된 ion channel에 결합한 모양.



<그림 80> Octamer tolaasin I이 형성한 ion channel이 membrane에 포함된 모양과 zinc ion.

이 구조 역시 tolaasin 이온 채널이 가져할 조건들, 즉, 내부 표면은 이온이 통과해야 하므로 hydrophilic 해야하고 외부 표면은 세포막 내에 위치하기 위한 hydrophobic해야 하는 조건을 잘 충족시키고 있다. 위의 그림에서 갈색으로 구성된 부분은 D-Pro²,D-Ser³,D-Leu⁴, D-Val⁵,D-Val⁸,L-Val⁹,L-Leu¹¹, D-Val¹²,D-But¹³,andL-Ile¹⁵ 로 구성되어 hydrophobic surface를 나타내고, 파란색은 D-But¹,D-Ser⁶,D-Leu⁷,D-Gln¹⁰,D-*allo*Thr¹⁴,L-Hse¹⁶,D-Dab¹⁷, L-Lys¹⁸ 로 구성되어 hydrophilic surface를 나타낸다.

선행 연구결과로부터 glucosylated carboxylic acids가 tolaasin I을 저해함이 이미 밝혀졌다. 이들을 tolaasin inhibition factors(TIF)라고 앞서 명명하였는데 TIF의 일종인 sorbitololeic acid를 본 실험에서 얻은 tolaasin I octamer 구조에 docking하였다. docking 실험은 FlexX (Tripos) 프로그램을 사용하여 수행하였다. Tolaasin I octamer를 구성하고 있는 모든 잔기들을 potential docking site로 간주하였고, docking을 위한 selection radius 는 6.5Å으로 하였다. Sorbitololeic acid를 리간드로 사용하였고, 모두 30회 반복하였다. 아래 <그림 79>에서 보듯이

sorbitololeic acid는 tolaasin I octamer 구조의 입구 부분에 docking됨으로써 이 입구를 막고 있는 현상을 나타냈다. 이는 sorbitololeic acid가 in vitro 실험에서 tolaasin의 활성을 저해한 결과와 잘 일치됨을 보여준다.

이상과 같이 tolaasin I이 형성하는 이온 채널이 세포막에 위치한 모양을 모식도로 나타내면 아래 <그림 80>과 같다.

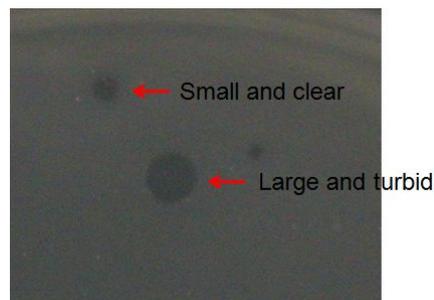
결론적으로 tolaasin I은 tetramer로 이루어진 구조가 아래 위에 서로 동일한 구조로 붙어 있는 모양의 octamer를 구성함으로써 이온 채널을 이루고 이와 같은 이온 채널의 입구를 TIF가 막음으로써 tolaasin의 활성을 저해하는 것으로 판단되었다.

<제 3 세부과제>

제 4 절 갈반병 병원균의 파아지 돌연변이 연구

1. 환경시료로부터의 파아지 분리

각각의 환경시료를 한외여과 방법으로 농축하여 여과액을 파아지 농축시료로 사용하였다. 각각의 시료에 대해 *Pseudomonas* agar F media (PAF) plate에 톨라시균과 함께 top agar에 섞어 깔았을 때 용균반 (plaque)의 형태와 크기를 관찰하였다. 톨라시균을 OD₆₀₀=0.5가 되도록 배양한 후, 10⁷ cfu · mL⁻¹의 균체를 적절히 희석한 환경시료 농축액과 섞어 도말한 뒤 25°C에서 18 시간 배양하였으며, 한 plate에 용균반이 약 50여개 가량 각각 구분되어 관찰되는 조건으로 최적화한 뒤 용균반의 크기와 모양을 관찰한 것은 아래 <그림 81>과 같다.



<그림 81> 발굴한 파아지의 용균반 형태.

용균반의 모양에 따라, 작고 맑은 (small and clear) 용균반을 만드는 파아지는 MT, 크면서 흐린 (large and turbid) 용균반을 만드는 파아지는 MTK로 명명하였다, 시료를 얻은 지역별, 시기별로 각각의 고유 번호를 부여하였다. 이와 같은 구분을 통해 총 35종의 파아지를 우선 선별하였다.

2. 톨라시균 파아지의 순수 분리 및 정제

발굴된 35종의 파아지는 하나의 용균반을 순수분리한 뒤, 대량배양을 통해 분리 정제하였

다. Solid 대량배양을 위하여 PAF media plate에 톨라시균을 top agar에 섞어 깔고 희석된 파아지를 빈 곳이 없게 spotting하여 25°C에서 자라게 하였다. 다음 날 파아지 버퍼를 넣어 파아지를 최대한 용출하고 원심분리하여 균체나 배지에서 유래한 불순물을 제거하였다. 정제 목적의 순수분리를 위해 PEG 침전에 이은 초고속원심분리를 수행하였고, 침전된 파아지를 용출 후 CsCl gradient (1.45, 1.50, 1.70 g/ml)를 통해 핵산과 같은 불순물을 완전히 제거하였다. 순수 분리된 파아지는 2회의 투석을 통해 최종 정제하였다.

3. 발굴한 파아지의 살상능력 분석

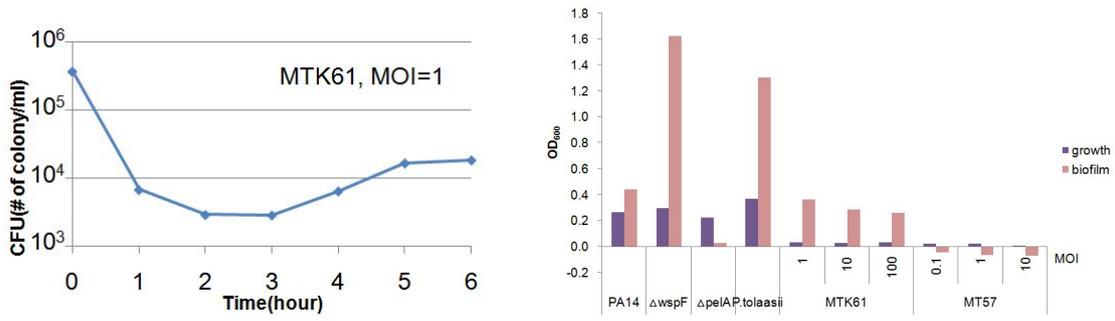
순수분리 정제한 총 35종의 파아지의 in vitro 살상능력과 in vivo 살상능력 (therapeutic efficacy)를 확인하였다. In vitro 살상능력을 확인하기 위하여 톨라시균에 파아지를 MOI별로 처리하여 유영배양 및 생물막 배양에서의 파아지의 살상능력을 확인하였는데, 유영배양 조건에서의 살상능력은 약 10^6 cfu · mL⁻¹의 톨라시균을 계대하고 톨라시균 수에 맞추어 일정 MOI를 충족하는 파아지를 함께 배양하여 톨라시균을 얼마나 죽일 수 있는지를 보았다. 배양 시간별로 톨라시균을 희석하여 PAF media plate에 도말하고 cfu를 측정함으로써, 살상능력을 확인하였다 <표 4>

생물막 배양에서의 파아지 살상능력은 역시 10^6 cfu · mL⁻¹의 톨라시균을 계대하고 톨라시균 수에 맞추어 일정 MOI를 충족하는 파아지를 배양하게 되는데 이 경우는 정체배양으로 생물막을 얼마나 형성할 수 있는지를 확인할 수 있다. 96-well plate에 150 μ l의 media에 톨라시균과 파아지를 넣고 30°C incubator에서 8시간 배양한 후, 균이 포함되어 있는 media를 버리고 crystal violet을 처리하여 well에 부착하여 성장한 균체를 염색하였다. 균체에 염색된 crystal violet을 100% ethanol에 용출한 뒤 OD₆₀₀을 측정하여 생물막 형성 정도를 측정하였다. 생물막을 매우 잘 형성하기로 잘 알려져 있는 녹농균의 야생형균주와 생물막을 많이 형성하는 균주 ($\Delta wspF$), 형성하지 못하는 균주 ($\Delta pelA$) 들을 대조군으로 사용하였고 이와 비교하여 톨라시균이 생물막형성을 얼마나 할 수 있을지를 측정하였다. 톨라시균은 자체적으로 생물막을 매우 잘 형성하는 것으로 보이고 파아지를 처리했을 때는 톨라시균이 대부분의 파아지에 의해 생물막 형성이 저해되어 보인다. 이것은 생물막 형태의 성장 또한 파아지에 의해 효율적으로 저해될 수 있음을 보여준다.

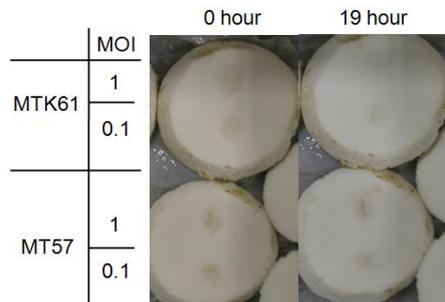
<표 4> 발굴한 파아지 35종의 *in vitro* 살상능력 및 *in vivo* therapeutic efficacy

Phage	Lytic ability <i>in vitro</i>		Therapeutic efficacy <i>in vivo</i>		
	Planktonic	Biofilm	1st	2nd	3rd
MT11(hb1a)	I	H	H	L	H
MT12(hb1b)	I	H	H	I	H
MT21(hb2a)	L	I	I	L	L
MT22(hb2b)	I	I	L	I	I
MT23(hb2c)	L	I	L	L	I
MT24(hb2d)	L	I	I	I	I
MT31(hb3a)	L	I	L	I	I
MT41(hb4a)	L	I	I	I	L
MT42(hb4b)	I	H	I	H	H
MT51(bp5a)	I	I	L	I	I
MT52(bp5b)	L	I	L	I	I
MT53(bp5c)	L	I	L	I	L
MT54(bp5d)	I	I	I	I	L
MT55(bp5e)	L	I	L	I	I
MT56(bp5f)	L	I	I	L	L
MT57(bp5g)	I	H	I	H	H
MT61(bp6a)	L	I	I	L	L
MT71(ms7a)	L	I	I	I	L
MT72(ms7b)	L	I	I	I	I
MT82(ms8a)	I	I	L	I	L
MTK12(hb1b)	I	H	I	H	H
MTK21(hb2a)	H	H	H	I	H
MTK23(hb2c)	L	I	L	I	I
MTK42(hb4b)	H	H	I	H	H
MTK51(bp5a)	L	I	L	L	I
MTK52(bp5b)	I	I	I	L	I
MTK53(bp5c)	I	I	I	I	L
MTK54(bp5d)	I	I	L	I	I
MTK55(bp5e)	I	I	L	I	I
MTK56(bp5f)	I	I	I	I	I
MTK57(bp5g)	L	I	L	L	I
MTK61(bp6a)	H	H	H	H	H
MTK71(ms7a)	L	I	I	L	I

Pitting test를 통한 *in vivo* 살상효과 측정은 톨라시균이 감염하는 양송이버섯에 직접 감염시켜 실험하였다. 상태가 양호한 양송이버섯을 골라 버섯의 갓 부분을 약 0.5 mm의 두께로 자른 후, 버섯이 건조해지는 것을 막기 위하여 용기의 바닥에 증류수를 머금은 휴지를 깔고 랩으로 씌워 그 위에 자른 버섯을 놓았다. 톨라시균은 10^6 cfu · mL⁻¹로 감염하였고, 파아지는 살상능력 확인 실험에서와 같이 MOI별로 함께 버섯의 절단면에 처리하였다. 균과 파아지를 처리 후 25°C에서 19시간을 두고 살상효과를 확인하였다. 살상효과 확인은 균체의 성장을 측정하거나, 갈반의 저해 정도를 육안으로 측정하여 비교하였다.

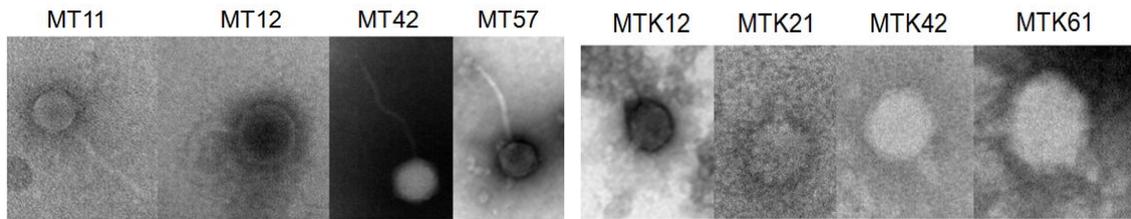


<그림 82> 유영배양 (좌)과 생물막배양 (우)조건에서 MPK61 파아지의 살상능력 측정.



<그림 83> 양송이 감염 pitting test에서 MPK61 파아지의 살상능력 확인.

세 가지 성장 조건 (유영배양, 생물막배양, 양송이감염)에서의 살상효과 측정실험에서, 살상능력이 높은 것을 H (high), 중간 것을 I (intermediate), 낮은 것을 L (low)의 세 단계로 구분하였고, 특히 in vivo 살상효과를 중심으로 살상효과가 뛰어난 8종의 파아지(MT11, MT12, MT42, MT57, MTK12, MTK21, MTK42, MTK61)를 선별하였다. 특이한 점은, MTK (large and turbid plaque) 파아지들이 MT (small and clear plaque) 파아지들에 비해 살상효과가 높은 편이었다. 이중 가장 살상효과가 뛰어난 MTK61의 실험결과는 아래 <그림 82 & 83>과 같다.



<그림 84> 고독성 파아지 8종의 TEM 사진 (좌, B1 그룹; 우, C1 그룹).

4. 발굴한 8종 파아지의 형태분석

순수 분리 정제된 8종의 파아지는 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 형태를 분석하였다. 2% uranyl acetate (pH 4.0)으로 염색하고 air dry한 뒤 120,000-150,000배로 확대하여 관찰하였다 (JEM 1010 EM). 8종의 파아지는 *Siphoviridae*와 *Podoviridae*의 두 가지 형태를 가지고 있었다. *Siphoviridae* (morphotype B)는 flexible noncontractile tail을 가지고 있는데, MT11, MT12, MT42, MT57의 4가지였다. *Podoviridae* (morphotype C)는 매우 짧은 (stubby) tail을 가지고 있는 형태로서, MTK12, MTK21, MTK42, MTK61의 4가지였다. 8종류 모두 icosahedral head를 가지고 있었으므로 각각 B1, C1의 morphotype을 가지는 것으로 분류하였다<그림 84>.

특이한 점은, MT로 명명한 파아지는 모두 *Siphoviridae*에 속하였고, MTK로 명명한 파아지는 모두 *Podoviridae*에 속하였다는 점으로, 용균반의 모양과 파아지의 계통이 연관성이 있음을 확인하였다. 다만, 같은 계통의 파아지라도 분리된 환경이 다르고 활성이 상이했기 때문에 동일한 파아지 클론은 아니더라도, 유사한 파아지로서 유사성이 높은지 등의 여부를 확인하기 위해서는 유전자 수준에서의 서열유사성 분석이 필요하다.

두 가지 계통에서 각각 MT57과 MTK61의 유전자를 분리하여, 2차년도 연구로 계획하고 있는 전장 유전체 분석에 착수하였다. 현재까지 얻은 부분적인 유전체 서열 정보로부터 MT57의 nucleocapsid protein homologous gene (480 bp)과 MTK61에서만 나타나는 major head protein homologous gene (951 bp)을 amplicon으로 사용하여, 나머지 6종의 파아지에 대해서도 유사성 분석을 목적으로 PCR을 수행하였다. DMSO가 5% 존재하는 조건에서, 일반적인 조건 (95°C 1분, 42°C 1분, 72°C 30초) PCR을 수행하였다. MT파아지의 경우는 모두 MT57과 같은 패턴으로 PCR이 되었으며, MTK 파아지의 경우는 모두 MTK61의 amplicon으로 PCR한 패턴으로 관찰되었다<그림 85 & 86>.

MT57 amplicon (nucleocapsid protein; 491 bp)

```
cTTGAACAATCACGGCGTGGCTAGCATTTCGATACCGCGTCATAGCCTGCATTCTTCAAAAAGCTTTAC
TGCGATCTCTGGCTTGTTTCATCTCGTATTGCTCCGTTGTTTCGTTTCGATGGGTTTCATTCTACAGGGTT
TAGAAAATGGGTCAACAAGTATTTTCAATTATTTATCGAGAGTAGTTCTCATTACCAGAAAGTTATGC
ACCCTCCCCGTTTGTCCCGTGCCAGACACCACCCATGACCACCATTCTACAGACAACAAAAAGCC
CCGTCAACCATTACGATGACAGGGCTTTGGGGAGTTTACCGTGGATAACTGCCACGAATGGCGTTA
ATCTTCTGTGTAAGCTCTACAGCGCTTTGTTTGCCGCCGTGCTTATCAGGGTGTACCAGTTGCAGAA
GGCTACGCAATTTCGCTGTCATCGAACTGGTGTACAGTGCGACTACCCATAGTAGCCGTCTGCAAAA
ACTCTTCACCACCtaacgcattg
```

MT61 amplicon (major head protein; 966 bp)

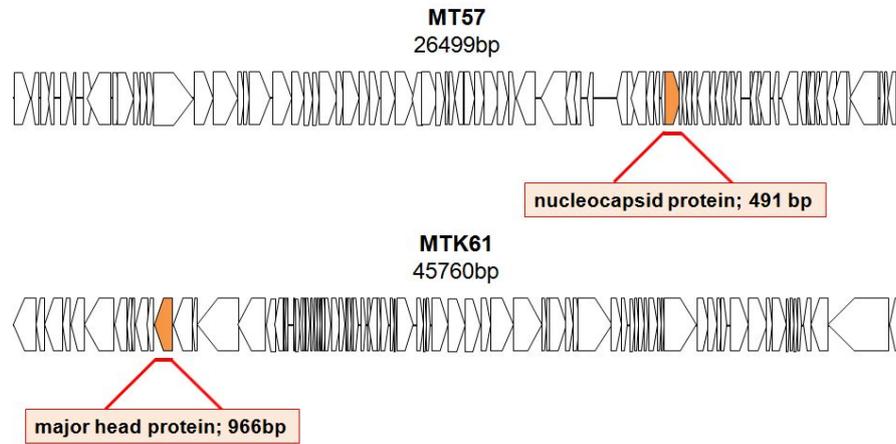
```
gcATGGCTACTCCTGCTAATGCCGTTTCGACCGTACAGATGAAAGGTCAGCGTGAAGACCTGATCGA
CGTGATCTACAACATCGACCCGTACGACACTCCGTTTCATGACTGCTGTAGGTAAGGGCACAGCTAC
TGCCCTAACCCACGAATGGCAGACTGACGAACCTTCGTGATCCGAAGAAAAACGTTTCGTATCGAAGG
TGAGGATGCCACCATTAAGGCTGGCTCGTTCACCACTGTAAGCAACTACTGCCAGATCTCTGAT
GAGACCCCTGCAGGTTACCGGTACTGCCAACGCGATTAAGACCGCTGGCCGTGCTAAAGAGTTGGC
TTACCAGCTGAGCAAGAAGTCCAAAGAGATCAAACCTGGACATCGAGTACGCTCTGGTTGGTGCACC
ACAAGCCAAGGTTTCAGCGTAACTCCACCACTCCGGGCCAGATGGGTAACATCTTCGCCTACTACAA
GACCAACGGTTCTGTAGGTGTTGGTGGTACTCAACCAGTTGGTGACGGTACTGACACCGGTACTGA
CGGCACCCTGCGACTCCTGACTGAAAACATGCTGTTGGATGCTTCTGAGAAGATCTGGCGTGCAGG
TGGTCAGGCTAACTCGATCATGACTTCCAGCTCGATCAAGAAAGCGATCTCGAAGAACATGAAGGG
CCGTGCAACTGAGGTGACTCTGAACGCATCGGATAACACCATCGCTGTTGCTGTAGACGTGTACGA
AACTGATTTTCGTAAGTACACCATCTCGGCCAACCGCTGGTTCGATGCCAACACTCTGTTTCATCTAC
GATCCTAAGATGCACTCCCTGTGCTACCTGCGTCCGTTCTTCCAACAAGAGCTGGCGAAGACTGGT
GACAGCGAGAAGCATCAGCTGCTGACCGAGTACACCTCCCGTGTAAACAACGAGAAGTCCGGGTGCT
CTGATCCGTAACATCGTAGCTGAATTGtaagaccacggg
```

<그림 85> 발굴한 파아지의 amplicon (대문자 ; ORF, 밑줄 ; amplicon primer).



<그림 86> 발굴한 파아지의 패턴 분석.

이와 같은 결과는 용균반의 모양에 따른 두 가지 분류가 파아지의 형태뿐 아니라 유전적인 유사성까지도 확인되는 연구결과로서 추가적으로 확보되는 파아지에 대해서 PCR과 amplicon 서열분석을 통해 유사성 분석을 고속으로 진행할 수 있을 것으로 기대한다.

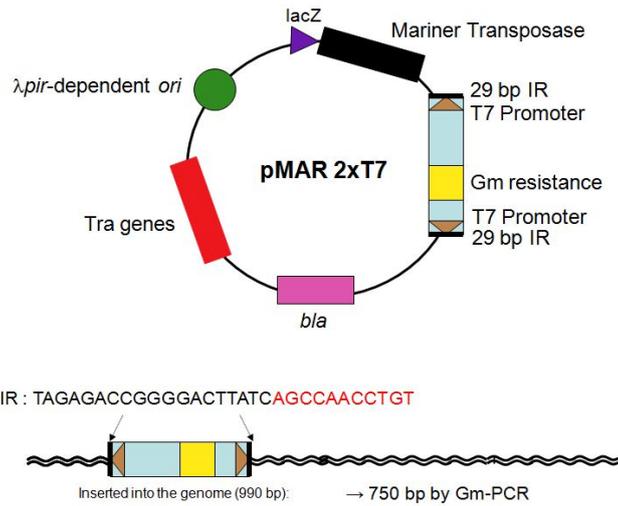


<그림 87> 현재까지 분석한 내용으로 완성한 고독성 파아지의 유전체 정보: MT57과 MTK61.

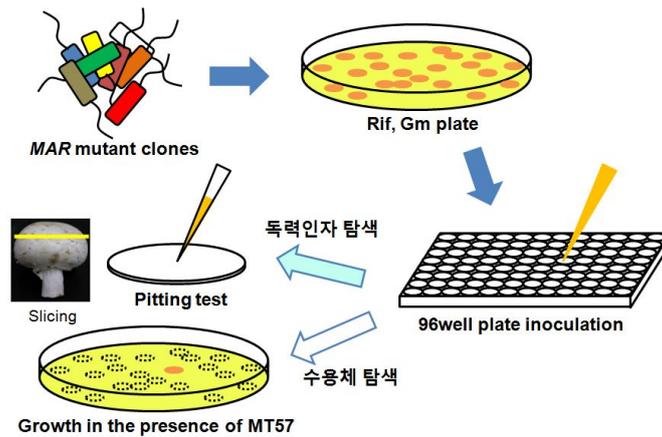
(1) 고독성 파아지의 유전체 분석 (454 GS FLX 서열 결정 및 annotation)

(주)마크로젠에 의뢰하여, 최종적으로 두 종류의 고독성 파아지 (MT57과 MTK61)의 서열 분석을 완료하였다. (주)마크로젠의 초고속 대용량 서열분석기기인 454의 GS FLX를 이용하였으며, 24× coverage로 각각 한 개의 contig을 완성하였다. *Siphoviridae*인 MT57은 약 27 kb (26,499 bp), *Podoviridae*인 MTK61은 약 46 kb (45,760 bp)의 contig로 확인되었으며, 양 끝부분의 DNA가 결여되어있는지의 여부는 아직 확인되지 않았다. 현재까지 얻어진 contig에 대해 tRNAscan-SE, GeneMark, FRAME OMIGA 2.0, Countcodon 및 BLAST 등의 Web 기반 혹은 PC 기반 프로그램들을 이용하여, 유전체 정보를 분석하였다. 두 파아지 모두 tRNA는 존재하지 않았으며, 30개 이상의 ORF가 존재하는 것으로 보인다. 추후, 명확한 서열분석 및 프로티옴 검증을 통해 전체 유전체 정보를 완성할 수 있을 것으로 기대한다.

현재는, 유전체 정보를 토대로 각 계통의 파아지에 보존되어 있을 것으로 보이는, 한 개의 유전자 마커를 발굴하였다. MT57의 nucleocapsid 단백질의 약 491 bp amplicon과 MTK61의 major head 단백질 약 966 bp amplicon을 확보하여 <그림 87>, 추후 발굴되는 파아지의 유전체 기반 계통학적 특성에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.



<그림 88> 삽입돌연변이 제조에 사용한 pMAR2×T7.
29 bp의 inverted repeat (IR)로 flanking된
990 bp의 MAR2×T7이 톨라시균 유전체로 삽입됨.

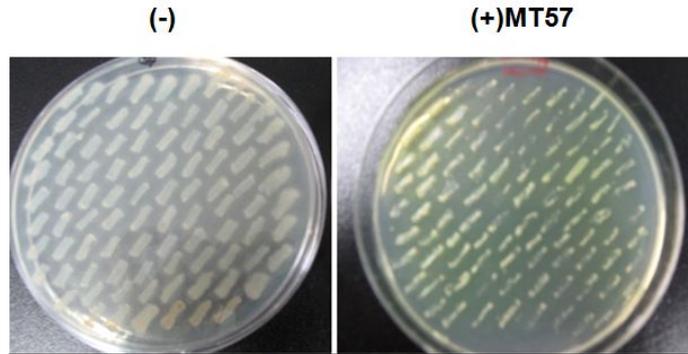


<그림 89> 삽입돌연변이의 구축 및 스크리닝 outline.

(2) 톨라시균 돌연변이 라이브러리 제조

Hot spot이 상대적으로 적어, 유전체 전체에 골고루 삽입되는 특성이 있는 것으로 알려진, *MARINER* 유래 transposon인 MAR2×T7을 이용하였다. 대장균으로부터의 counter selection을 용이하게 하기 위해 먼저 원래 톨라시균 6264로부터 rifampin 저항성 톨라시균을 유도하였고 (톨라시균 6264R), 이 유도균이 갈반생성능력 및 세포독성에서 야생형과 차이점이 없음을 확인하였다. 6264R 균을 pMAR2×T7 (pMFLGM.GB-2×T7. 아래 그림)을 가지고 있는 대장균 HB101과 접합을 가능하게 하는 플라스미드인 pRK2013을 가지고 있는 대장균 HB101을 섞어 삼자접합 (triparental mating)을 수행하였다. 접합은 12시간 이상 진행하고, 접합한 균체를

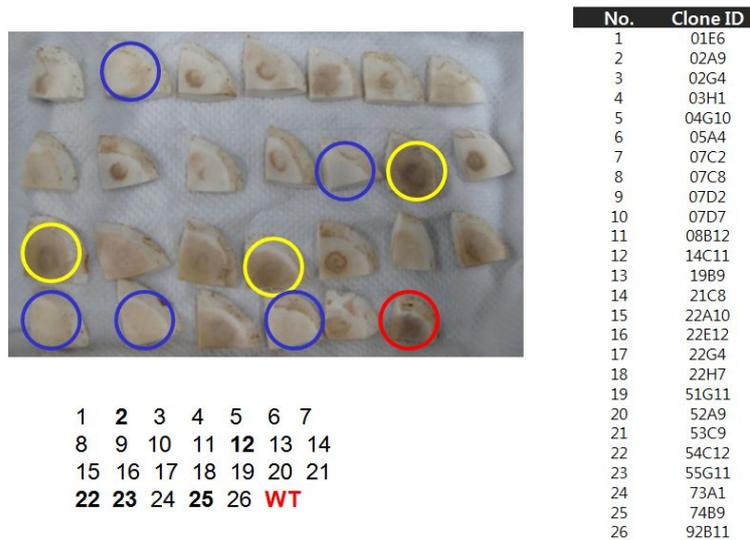
gentamicin (Gm)이 함유된 cetrimide agar배지에 배양하여 transposon이 삽입된 6264R 클론을 확보하였다. 일부 클론들을 임의로 추출하여 Gm을 특이적으로 증폭해내는 PCR을 수행하여 (Gm cassette 내부의 750 bp 증폭), *MARINER*가 삽입된 것을 확인하였다. 이와 같은 방식으로 총 10,000여개의 클론을 확보하고 두 가지 스크리닝에 활용하였다 <그림 88>.



<그림 90> MT57 파아지를 첨가한 배지에서 라이브러리 클론의 성장 확인.

(3) 돌연변이 라이브러리로부터 파아지 내성 변이균 스크리닝

파아지를 첨가한 배지에서의 성장여부를 이용하여 파아지내성균을 스크리닝하였다<그림 89>. 살상능이 가장 높은 MT57 파아지를 20 ml 기준의 배지 1개당 10^9 pfu씩 첨가하였고, 배지당 100여개의 클론을 streak함으로써, MT57 파아지에 대한 내성균을 스크리닝하였다 <그림 90>. 스크리닝은 파아지 첨가배지와 미첨가배지에서 성장하는 정도의 차이를 가지고 판단하였고, 파아지가 있는 조건에서도 성장하는 것으로 판단되는 클론을 선별하여 동일한 실험을 반복하였다. 두 번의 반복실험을 통해 반복적으로 성장여부가 확인된 클론에 대해서는 액체배지로 바꾸어 성장여부를 측정하고자 하였는데, 중복되지 않는 총 10,000개의 라이브러리 클론을 사용한 스크리닝에서 단 하나의 내성 변이균을 확보하지 못했다. 이는, 수용체등 파아지의 민감성에 필요한 인자들을 합성하는데 관여하는 유전자가 essential할 가능성이 있음을 시사한다. 물론, *톨라시균*의 추정 유전자수인 6,000개 (이중 약 1,000개 정도가 일반적인 성장조건에서 essential할 것으로 예상)와 비교했을 때, 10,000개가 충분히 큰 숫자는 아니지만, 관련유전자가 단 하나 존재하지는 않을 것으로 생각됨에도 불구하고 하나의 클론도 얻지 못했기 때문에, essential할 수 있음을 시사한다 (가령 세포 표면의 essential한 porin이나 outer membrane protein 등).

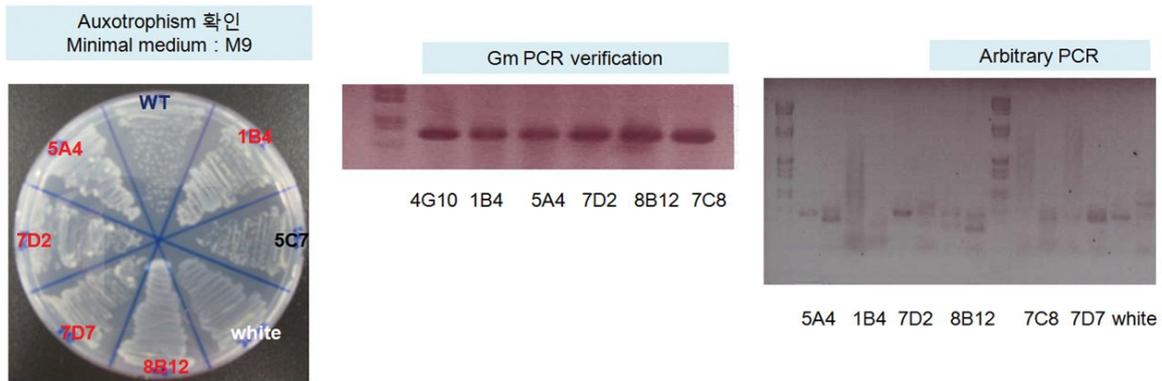


<그림 91> 독력 감소 변이균 26종의 갈반생성능력 및 독력 확인.

(4) 돌연변이 라이브러리로부터 독력 감소 변이균 스크리닝

최적화된 *Agaricus*의 pitting 실험을 통해 돌연변이균들의 세포독성을 측정하였다. 10,000개 클론을 모두 24 시간 동안 PAF에 소량 배양 (96-well 플레이트에 100 μ L 배양)한 뒤, 버섯의 갓으로부터 오려낸 작은 슬라이스 위에 20 μ L씩 접종하였다. 접종 후 20 시간 정도 추가로 배양하여, 갈반생성능력을 정성적인 방법으로 측정하였고, 필요한 경우, 48 h까지 갈반형성을 관찰하였다. 이후 가능성이 높은 클론 33개를 1차 선별한 뒤, 33개의 클론을 OD₆₀₀이 3.0이 될 때까지 배양하여, pitting 실험을 수행하였으며, 최종적으로 26개의 클론을 확보하였다 <그림 91>. 2차 선별까지 확인된 26개의 클론에 대해 독력감소 확인실험을 진행하였고, 이중 아래 그림에서 노란색으로 표시한 3개의 클론 (19B9, 22A10, 22H7)은 어느 정도 갈반이 생기지만, 야생형에 비해서는 뚜렷한 감소가 있음을 여러 번 진행하여 확인하였다. 무엇보다 푸른색으로 표시한 5개의 클론은 갈반이 전혀 생성되지 않았다 (2A9, 14C11, 54C12, 55G11, 74B9).

갈반생성이 전혀 되지 않는 이들 클론은, 유전적 특성과 관련유전자에 대한 이해를 통해 파아지 요법에 사용하는 파아지의 생산, 분리, 및 정제에 활용될 수 있는 자원으로 기대한다.



<그림 92> 분리한 변이균의 유전적 특성 확인 예시.

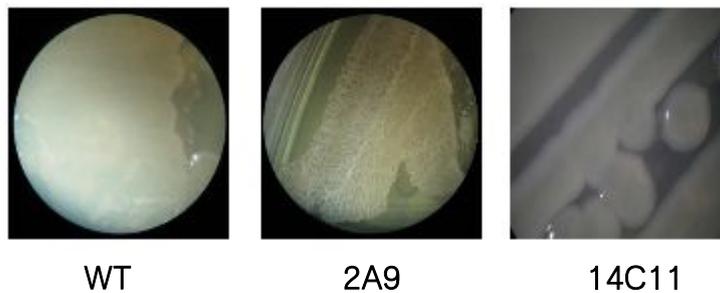
(5) 독력 감소 변이균의 관련 유전자 확인

총 26종 (갈반이 전혀 생성되지 않는 5종 포함)의 독력 감소 변이균에 대해 최소배지에서의 성장여부와 Gm cassette 존재 여부 (즉, transposon의 삽입 여부)를 확인한 뒤, arbitrary PCR을 이용하여, transposon의 삽입위치를 증폭하였다 <그림 92>.

이를 통해, 총 26개의 클론에 대한 transposon의 삽입위치를 결정하였으며, 해당 유전자를 BLASTX를 통해 알려진 DB상에 유사성을 보이는 유전자를 확인하였다. 특히, 지금까지 유전체 정보가 알려진 모든 세균 중에서 가장 높은 synteny를 보이는 *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (6,722,539 bp)를 기준으로 유사성이 높은 유전자를 확인하였다. 아래 <표 5>는 지금까지 확인한 유전자들이며, 많은 경우, non-ribosomal peptide synthase (NPRS)에 해당하였다.

<표 5> 분리한 26종 삽입 변이균의 변이 유전자 및 특성 확인

Clone ID	Sequence	Atten.	Gene ID	Gene	Description (BLAST NR)	Characteristics
01E6	AACCCCTACGGAATA	High	PFLU1146	-	putative RHS repeat-like protein	
02A9	AAGCGCGGCTGTTA	High	PFLU2553	-	tolaasin biosynthesis gene	Rugose
02G4	ACCTGCGTCTTTTC	Moderate	PFLU0414	gltB	glutamate synthase large chain	
03H1	CGCCGGTGGCGAC	Moderate	PFLU5558	trpC	indole-3-glycerol phosphate synthase	
04G10	ACTGGCCGACATGC	Moderate	PFLU1146	argF	ornithine carbamoyltransferase	
05A4	AAAGTGCCTCCTGT	High	PFLU0122	-	GntR family transcription factor	
07C2	AAGCGTGGTGCA	High	PFLU2544	-	syringopeptin synthetase C	Rugose
07C8	ATATGCTCGGCGCA	High	PFLU2553	-	syringopeptin synthetase, amino acid	Rugose
07D2	AATCGATATCGGTC	Moderate	PFLU0415	gltD	glutamate synthase small chain	
07D7	AGTTGCGGTACGGT	High	PFLU2553	-	syringopeptin synthetase, amino acid	Rugose
08B12	ATGTGNATGATNCC	High	PFLU5912	-	putative polyphosphate kinase (ppk)	
14C11	ACTCGGTTGCGGTA	High	PFLU5819	ptsP	PEP-protein phosphotransferase	
19B9	ATGCCCGCTCGAA	Weak	PFLU4403	-	putative sensor kinase	
21C8	ATATCCCGGGGCG	Moderate	-	-	None	
22A10	ACGTCGCGGGCCG	Weak	-	-	QNR family protein	
22E12	ACCACTATGCGCTC	High	PFLU2553	-	arthrofactin synthase B (Pvd? synthase)	Rugose
22G4	AAATGAAAAGCAA	Moderate	-	-	hypothetical protein (human)	
22H7	AAAGCTATTGCGAG	Weak	-	-	NLR family protein (human)	
51G11	ACTCAGTGGCTCTC	Moderate	PFLU0611	purD	phosphoribosylamine glycine ligase	
52A9	GCGCGACTTGAAC	High	PFLU0027	-	putative choline sulfatase	Rugose
53C9	ATGCCTACCAGGTG	Moderate	-	-	queosine biosynthesis protein	
54C12	ATGCCCTGGCGCCC	High	PFLU2552	-	syringopeptin synthetase	Rugose
55G11	AACTTTGCACACG	High	PFLU5603	-	hypothetical protein	Rugose
73A1	AAACATCCCGCTT	Moderate	PFLU3652	-	GntR family transcription factor	
74B9	ATTCAGCCACCGGC	High	PFLU2552	-	putative NRPS	Rugose
92B11	ACGCGATCCTCGGC	High	PFLU1629	-	putative peptidase (proline iminopeptidase)	



<그림 93> 갈반생성능력이 결여된 2A9과 14C11의 콜로니 모양.

특히, NPRS는 redundant한 경우가 많기 때문에, 이들 NPRS 구성요소들이 전혀 다른 기능을 하는 NPRS에서 유래한 것인지, 아니면 같은 기능을 하는 cluster에 포함되어 있는 요소들인지 확인할 필요가 있다. 무엇보다 톨라신 펩티드 생성에 관여하는 NPRS의 유전자 클러스터로 알려진 부위에 transposon이 삽입된 변이균 (2A9)도 확인되어 톨라신 생합성이 저해된 변이균도 확보한 것으로 확인되었다. 또한, 갈반을 전혀 생성하지 않는 5개의 변이균 중 3개가 NPRS에 해당되었으며 (2A9/톨라신 NPRS, 54C12, 74B9), 14C11은 PstP (PEP-protein phosphotransferase)와, 55G11은 기능을 알 수 없는 단백질들과 유사성이 있었다. 흥미로운 점은 발견된 많은 삽입변이 균들이 쭈글쭈글한 (rugose) 콜로니형을 보였는데 <그림 93>, 이는 톨라신을 포함한 antibiotic 활성을 가지는 분비 펩티드들의 결여와 갈반생성 혹은 톨라시균의 독력이 연관성이 있음을 시사한다. Rugose 콜로니형을 보이던 세포는 액체배양시 세포끼리 뭉치는 성향이 있어 (clumping), 생산균주로서 파악할 대량 배양에 활용하는데 어려움이 있을 것

으로 생각되므로, 갈반생성이 전혀 되지 않는 14C11이 파아지 대량 생산을 최적화하는데 좀 더 용이하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

1-1. Read

TotalNumberOfReads	TotalNumberOfBases	Assembled	Partial	Singleton	Repeat
564424	248680783	553919	6973	997	61

1-2. Large Contig (Length >= 500bp)

Contigs	Bases	AvgContigSize	N50ContigSize	LargestContigSize	Q40PlusBases	%Q40
67	6289485	93872	193105	459575	6288577	99.99%

<그림 94> GS FLX를 이용한 진장 유전체 서열 결정 요약 내용.

(6) 454 GS FLX를 이용한 유전체 염기서열 결정

톨라시균 transpon 삽입변이균들, 특히, 갈반생산, NPRS 뿐 아니라, rugose 콜로니형과 관련된 배양기법을 최적화하기 위해서는 변이균들의 유전적 특성을 명확히 규명하는 것이 필요하다. 이를 위해 약 6-7M 정도의 톨라시균 유전체 전체에 대해 454 GS FLX Titanium 머신을 이용하여 진장유전체 분석을 1회 시도하였다. 이를 통해 67개 이상의 contig를 가지는 draft를 얻었다. 이는 평균적으로 40×의 coverage를 보이는 것이나, 많은 수의 gap이 있어, 추가적인 서열결정 실험이 필요할 것으로 판단된다<그림 94>.

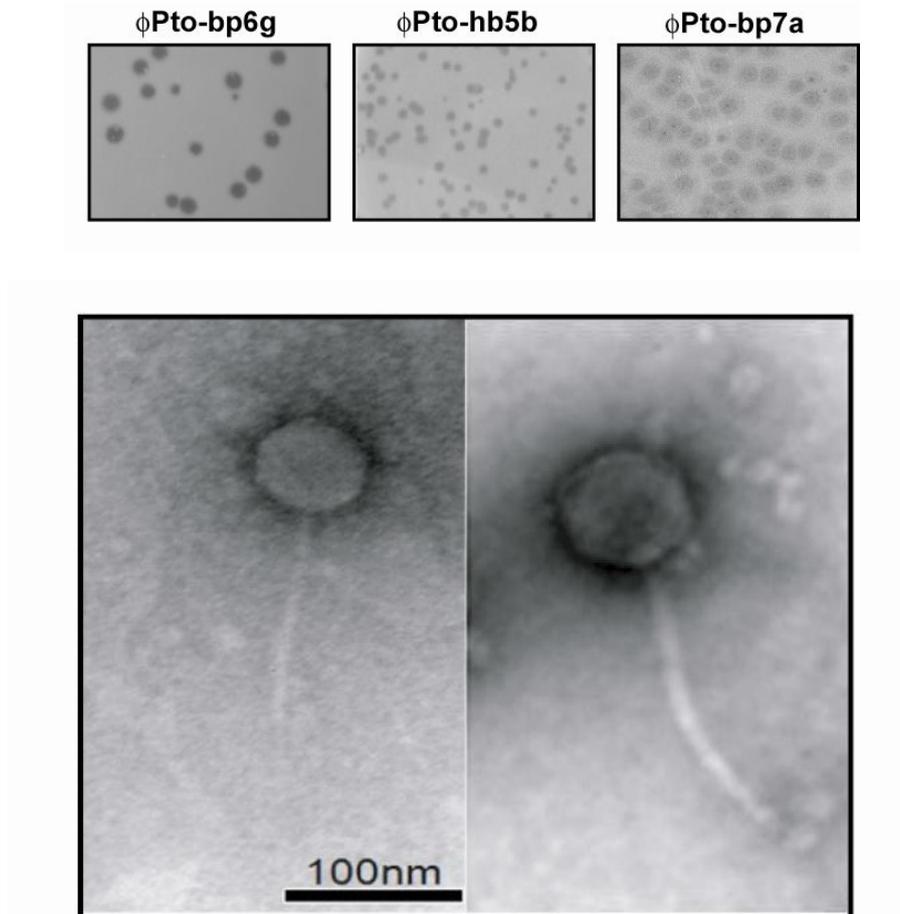
<표 6> 톨라시균의 유전체 서열 분석 내용

1	Query				Subject			
	Name	Length	Start	End	DB	AC	Gene	Ref.
2	contig00019	459575	153780	178525	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
3	contig00075	386415	35385	43096	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
4	contig00036	344294	54616	74206	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
5	contig00048	321588	86970	94478	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
6	contig00044	307140	277480	292490	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
7	contig00004	295271	55307	65801	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
8	contig00007	268357	132126	140406	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
9	contig00052	224249	30079	38590	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
10	contig00027	221203	8070	14970	emb	AJ007827.1	Pseudomonas tolaasii eprA, eprI, eprD, eprE and	http://www
11	contig00039	217482	145776	151835	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
12	contig00010	193105	19919	31257	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
13	contig00086	176255	23297	31472	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
14	contig00022	175570	1335	33281	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
15	contig00085	170653	123050	129856	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
16	contig00042	160352	51239	57708	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
17	contig00028	155472	76770	92003	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
18	contig00030	150842	100900	116312	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
19	contig00034	145895	136118	141997	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
20	contig00021	135033	59933	98218	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
21	contig00049	131745	49820	66714	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
22	contig00020	112127	10645	18071	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
23	contig00089	107286	43693	51782	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
24	contig00040	95297	56783	65919	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
25	contig00043	83373	63600	71121	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
26	contig00006	81215	24399	39427	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
27	contig00005	77544	44985	52754	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
28	contig00033	72626	25590	36296	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
29	contig00031	65399	60543	65167	emb	AM181176.4	Pseudomonas fluorescens SBW25 complete gen	http://www
30								

가장 길이가 긴 contig가 4.5 Mb 정도이며, 대부분의 contig들이 BLASTN으로 분석한 결과, SBW25와 유사성이 높은 것으로 확인되었다. 특히, contig 27번 (2.2 Mb)은 기존에 알려진 톨라신생합성 유전자 클러스터를 포함하고 있어, 톨라신생합성 관련 유전자에 대한 포괄적 분석이 가능하게 되었다<표 6>.

<협동과제>

제 5 절 파아지의 유전체 연구



<그림 96> (상) 파아지에 의한 톨라시균 배양 억제 용균반 형성, (하) Φ Pto-bp6g의 형태분석을 보여주는 전자현미경 사진.

1. 고독성 파아지의 용균반 형성과 전자현미경 형태분석

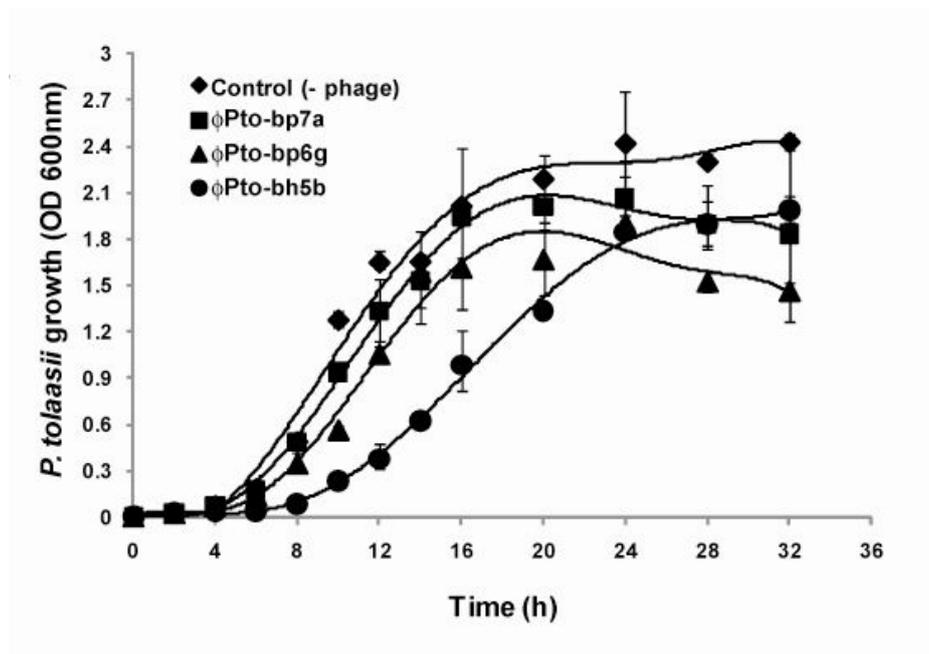
2차년도 연구에서 순수 분리 정제한 파아지들 중 세 가지 파아지(Φ Pto-hb5b, Φ Pto-bp6g, Φ Pto-bp7a)를 선별하여 Pseudomonas agar F (PAF) plate에 톨라시균과 함께 top agar에 섞어 깔았을 때 나타나는 용균반의 형태와 크기를 관찰하였다.

파아지에 따른 용균반의 모양과 크기는 독성에 따라서 맑고 큰 용균반 (Φ Pto-bp6g; 지름, 약 2mm) 이며, 맑고 작은 용균반 (Φ Pto-hb5b; 지름, 약 1mm) 그리고 흐리고 큰 용균반 (Φ Pto-bp7a; 지름, 약 2mm)의 형태로 관찰되었다 <그림 96, 상>. 파아지의 톨라시균에 대한 용

균 독성은 용균반의 탁도(turbidity)에 직접 상관관계가 있었다.

이 중 맑고 큰 크기의 용균반을 형성하는 Φ Pto-bp6g를 투과전자현미경 (TEM, 모델; JEM 1010 EM)을 이용하여 형태를 분석하였다. 파아지를 grid에서 2 % uranyl acetate (pH 4.0)으로 염색하고 air dry 한 뒤 120,000 - 500,000배로 확대하여 관찰하였다. <그림 96, 하>에서 보인 대로, Φ Pto-bp6g는 icosahedral head (약 60nm)와 긴 tail (약 140 nm)을 가지고 있는 형태로서, *Siphoviridae*의 특징적 형태를 가지고 있었다.

2. 파아지의 톨라시균 용균 살상능력 분석

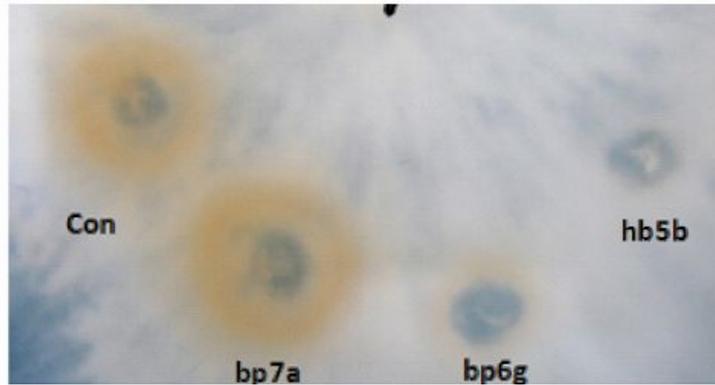


<그림 97> 파아지가 섞여있는 톨라시균 성장곡선 그래프.

각기 다른 용균반의 형태를 보인 세 가지 종류의 파아지 (Φ Pto-hb5b, Φ Pto-bp6g, Φ Pto-bp7a)에 갈반병 원인균 슈도모나스 톨라시균 (*Pseudomonas tolaasii* 6264)에 대한 용균 살상능력을 비교분석하였다. 톨라시균과 파아지를 함께 PAF 배양액에서 배양한 후, 시간대에 따라 600 nm의 흡광도를 측정하여 톨라시균의 성장곡선을 모니터링하기 위하여, 배양한 톨라시균에 파아지를 10,000 cfu : 1 pfu의 비율로 함께 배지에 배양하여 파아지가 톨라시균을 시간에 따라 얼마나 살상능력을 가지고 있는지 확인하였다.

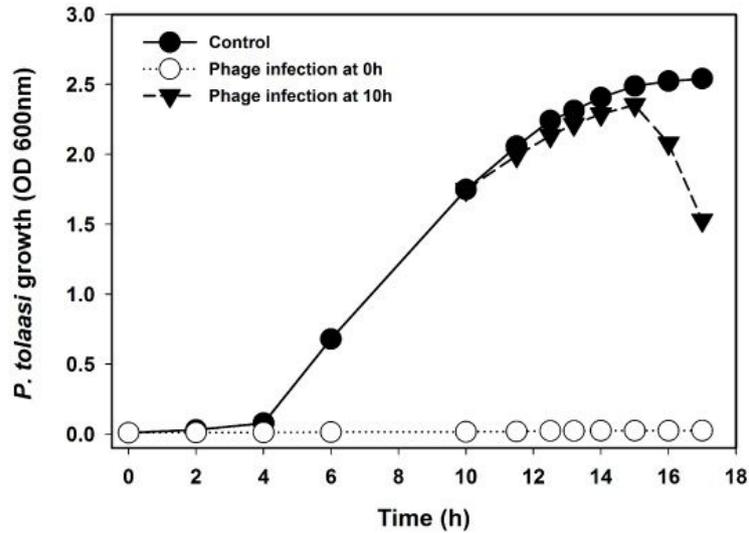
파아지를 제외한 톨라시균만을 배양하여 측정한 조건을 대조군(control)과 비교하여, 파아지 Φ Pto-hb5b를 섞은 조건에서는 초기에 톨라시균 성장을 효과적으로 저해시키는 것을 확인 할 수 있었으며, 24시간 이후에는 파아지 Φ Pto-bp6g가 가장 살상능력이 뛰어남을 알 수 있었다 <그림 97>.

양송이버섯의 균사체(mycelia)를 PGA배지(potato extract 4.0g, glucose 20g, agar 15g/l)가 포함된 agar plate에 자라게 하여 톨라시균을 직접 감염시킨 후 갈색반점이 형성되게 한다. 형성된 반점 가운데 해당 파아지를 떨어뜨려서 시간에 따라 배양하여 파아지에 의해서 톨라시균이 살상되는 정도를 확인하였다. 톨라시균만 감염시킨 부분을 대조군으로 사용하여 파아지로 인해 톨라시균이 얼마나 저해될 수 있는지를 비교하였다.



<그림 98> 양송이 버섯의 균사체 감염을 이용한 파아지의 톨라시균 살상 능력 확인.

Φ Pto-bp7a의 경우, 갈색반점이 대조군과 비슷한 형태(지름, 약 2cm)로 보아 효과적으로 톨라시균에 의한 버섯의 균사체 감염을 저해하지 못하며, 그 외 두 종류의 파아지인 Φ fPto-hb5b와 Φ Pto-bp6g의 경우, 갈색반점이 약 0.5cm 미만의 작은 형태로 대조군과 비교하여 톨라시균을 용해시켜 파아지에 의해 효율적으로 갈반병 원인균을 버섯 균사체에서 저해할 수 있음을 관찰하였다<그림 98>.

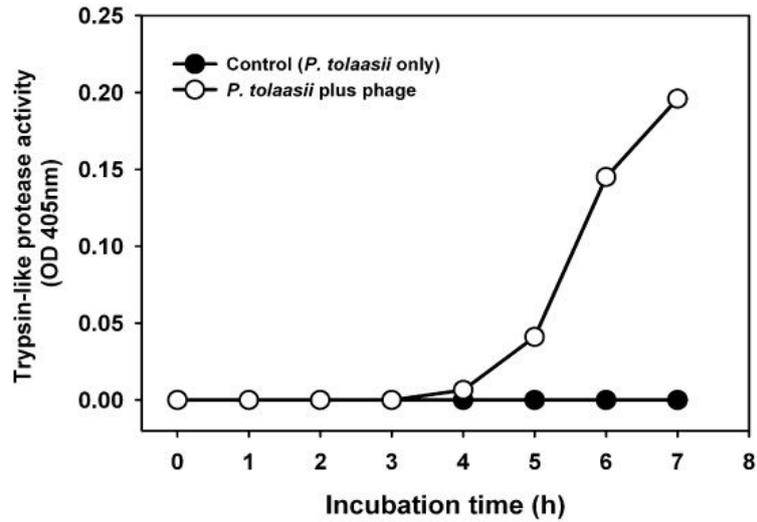


<그림 99> 파아지 Φ Pto-bp6g접종에 의한 톨라시균 살상활성 시간대 별 정량.

3. 선별한 파아지의 톨라시균 세포 용해 활성 분석

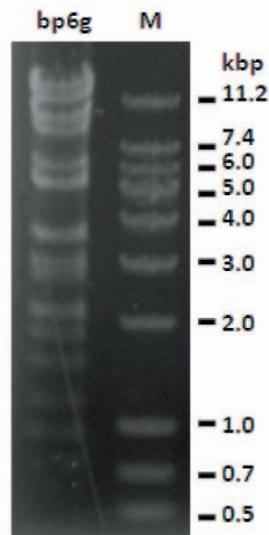
앞의 두 가지의 실험을 통하여 세 종류의 파아지 (Φ Pto-hb5b, Φ Pto-bp6g, Φ Pto-bp7a)의 살상능력을 분석한 결과, 톨라시균의 살상효과가 높은 Φ Pto-bp6g, Φ Pto-hb5b 중 Φ Pto-bp6g를 선별하여 숙주균의 세포벽 용해 활성을 분석하였다. 살상효과 뛰어난 파아지 Φ Pto-bp6g를 PAF 액체배지에 톨라시균을 배양시킨 후 파아지를 10^6 pfu \cdot mL $^{-1}$ 로 0시간과 10시간 후에 각각 섞은 다음 25 $^{\circ}$ C 에서 배양시킨다. 배양한 톨라시균에 10시간 이후 파아지를 넣은 조건에서 톨라시균의 밀도가 접종 후 5시간이 지나고 나서 감소함을 살펴볼 수 있었다<그림 99>.

또 다른 방법으로 Φ Pto-bp6g의 세포 용해 활성정도를 알아보았다. 톨라시 균이 함유하고 있는 Trypsin-like protease는 버섯의 갈색반점의 원인으로, 톨라시균이 파아지에 의해서 용해될 경우 세포 내부의 Trypsin-like protease이 유출되어 배양액에서의 활성이 증가된다. 이로써 파아지의 톨라시균 용해에 의한 세포 용해 활성을 살펴볼 수가 있다. 대조군으로 톨라시균만 배양시킨 것과 파아지 Φ Pto-bp6g와 섞을 것을 배양하는 시간에 따라 흡광도 405 nm에서 Trypsin-like protease 활성을 측정하였다.



<그림 100> 파아지 Φ Pto-bp6g의 톨라시균 세포 용해 활성 kinetics 그래프.

톨라시균과 파아지를 섞은 후, 5시간이 지난 후에 대조군과 비교해서 파아지로 인하여 흡광도가 증가함에 따라 Trypsin-like protease 활성이 증가, 즉 파아지의 세균성 세포 용해 활성을 볼 수 있었다. 이는 상기의 5시간 정도 소요되는 파아지의 톨라시균 살상 kinetics와 일치하는 결과이다 <그림 100>.



<그림 101> Φ Pto-bp6g의 genomic DNA의 제한효소 EcoRI 절단을 이용한 패턴분석.

4. 파아지 Φ Pto-bp6g의 유전체 분석

톨라시균 살상효과가 높은 고독성 파아지 Φ Pto-bp6g 유전체를 (주)마크로젠에 염기서열 분석

을 의뢰하여 서열분석을 완료하였다. 파아지 Φ Pto-bp6g의 전체 genomic DNA를 분리 하였고 이를 제한효소 EcoRI를 통하여 10개의 제한효소 자리로 나눠짐을 볼 수 있었다<그림 101>. 분리한 DNA를 454 pyrosequencing (GS FLX Titanium) 으로 분석하였다. 파아지 Φ Pto-bp6g의 DNA크기는 총 26,499 bp의 선형 DNA로서, 전체서열을 tRNA-scan SE, GeneMark, FRAME OMIGA 2.0, Glimmer 3 software 프로그램으로 ORF를 분석하였다.

파아지 유전체를 분석한 결과 GC가 42.7% 포함되어있으며, Glimmer 3 software ORF finder로부터 얻은 결과, 50bp 보다 큰 156개 ORF (open reading frames)가 존재함을 알 수 있었다. 전체서열의 85.8% 정도 포함되는 80개 ORF를 53 bp부터 1,205 bp까지의 길이의 단백질 코딩 서열로 정리를 하였다. 0 - 517 bp 길이의 간격으로 ORFs가 서로 분리되어 있거나, 겹치는 부분이 있다. 58개의 gene의 개시코돈은 ATG, 10개의 gene은 GTG로 시작하며 그 외 gene은 GGT, GGA, TGT, TTG, AAC, GTT, CAT, ATA, CCC, CAA로 시작한다.

단백질 서열과 생물정보 분석을 토대로 25개의 ORF (32.05%)은 특정 구조를 지니며, 15 개의 ORF(19.23%)는 알 수 없는 구조의 단백질을 인코딩하는 데이터베이스로 이루어졌다. 38개의 ORFs (48.72%)에서는 단백질 데이터베이스의 homologs와 특이한 단백질을 코딩하기 위한 파지 서열로 이루어져있다 <Table 1>.

파아지 Φ Pto-bp6g 유전자는 구조에 따라 (i) host interaction, (ii) phage DNA replication과 nucleotide metabolism, (iii) phage particle formation과 host lysis, 세 부분으로 나누어진다<그림 102>. <Table 1>에 보인 여러 ORF들에 의하면 파아지가 톨라시 균과 상호작용하기 위한 단백질과 파아지 유전자를 숙주에 삽입하기 위한 여러 ORF가 주목된다. 파아지의 ORF7은 *Pseudomonas* phage D3와 유사한 베타-1,4-glycosidic 밴드와 N-acetylmuramic acid 사이를 가수분해하는 엔도라이신을 암호화 한다. 이는 파아지 ORF7이 박테리아 막의 펩티도글라이칸을 분해하여 박테리아에 DNA 주입을 돕는 역할을 한다고 예상된다.

ORF2와 73은 각각 cI repressor 와 Cro repressor 단백질로 인코딩이 되는데, *Pseudomonas* phage D3에 33.3%, *Pseudomonas* phage F10에 32.1% 일치함을 볼 수 있다. 이 유전자는 호스트를 감염시키는 동안 lysogenic/lytic 스위치에 대한 역할을 한다. ORF13, 18, 43은 nucleotide metabolism에 관여하는 기능을 가지는 ORF들이며, ORF8, 17, 46, 48, 50, 66, 75는 DNA 복제 (replication)에 관여함을 볼 수 있다. 특히 ORF13은 시티딘과 디옥시시티딘의 deaminase zinc-binding 부분과 유사한 단백질을 암호화한다. ORF44는 디히드로엽산환원효소를 인코딩함으로써 nucleotide metabolism에 있어서 테트라하이드로엽산이 필요한 퓨린과 피리미딘을 제공한다.

DNA 복제와 수선(repair)은 DnaB 헬리케이스 (gp48), DNA 헬리케이스 II (gp75), DNA 중합효소 I (gp66), DNA ligase (gp17) 그리고 엑소뉴클리아제 (gp46)와 같은 몇몇의 유전자에

의해 일어난다. 중요한 것은 ORF8과 50은 DNA 엔도뉴클리아제 타입 7을 인코딩 하는데, 이것은 파아지 DNA의 Holiday junction을 절단하며 파아지 헤드구조를 이루는 DNA합성에 필요하다.

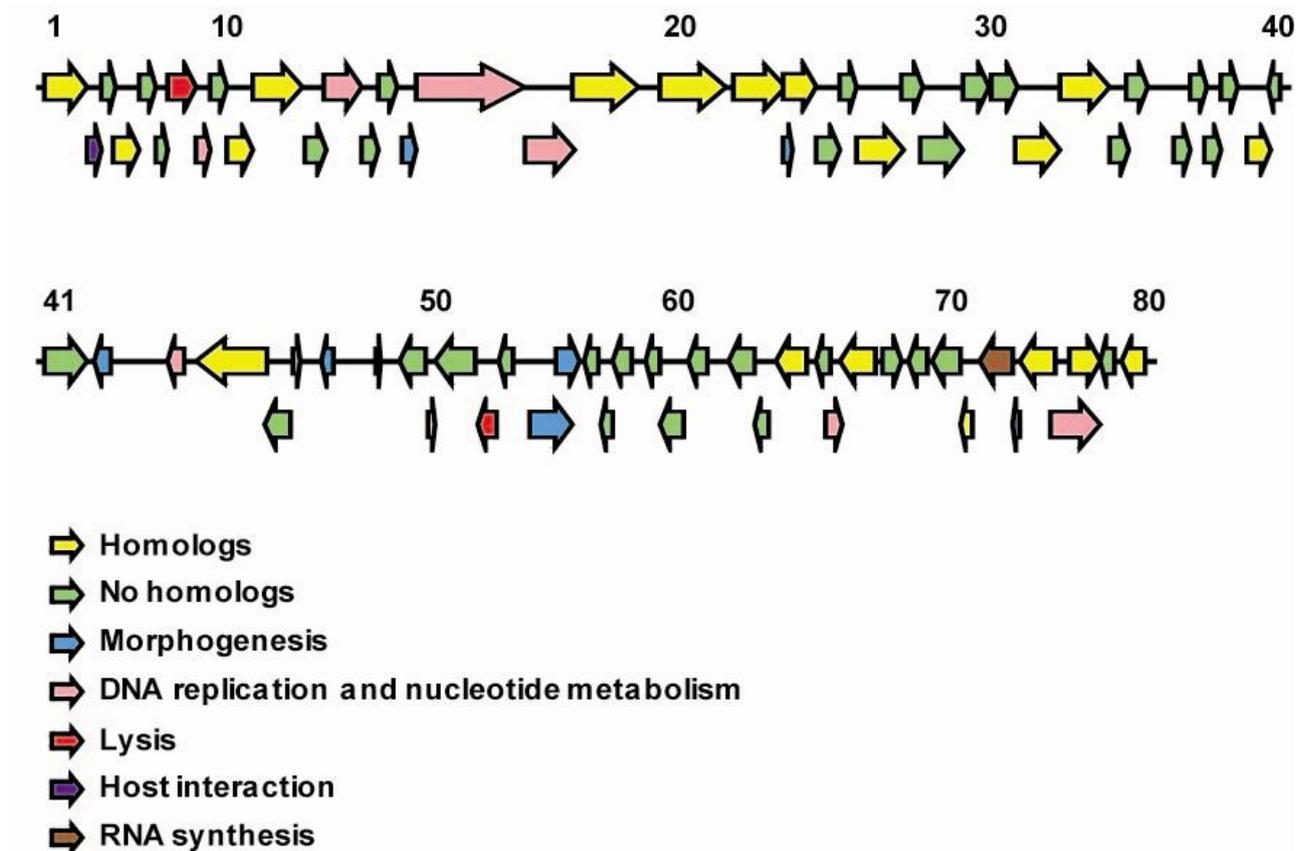
ORF72는 호스트 박테리아 내에서 파아지를 위한 최적의 조건을 만들기 위한 전사제어인자와 유사한 단백질을 인코딩한다. 파아지의 구조단백질에 관한 서열은 gp16, gp22, gp 42, gp47, gp54, gp 55, gp57로 portal 단백질, capsid 단백질, virion 구조 단백질로 인코딩됨을 분석하였다.

Table 1. General features of putative ORFs of phage ϕ Pto-bp6g and homology to phage proteins in databases.

ORF (gp)	Coordinates (bp)	Length (bp)	Best phage homolog	Gene product	E-value	Identity (%)
1	82-567	485	<i>Pseudomonas</i> phage PAK_P1	hypothetical protein ORF_0028	3.E-24	38.85
2	564-731	167	<i>Pseudomonas</i> phage D3	cI repressor protein	2.E-01	33.33
3	718-876	158		no homologs		
4	873-1142	269	<i>Vibrio</i> phage KVP40	hypothetical protein KVP40.0188	8.E-08	37.86
5	1139-1336	197		no homologs		
6	1329-1463	134		no homologs		
7	1463-1786	323	<i>Pseudomonas</i> phage D3	endolysin	1.E-01	34.78
8	1783-1950	167	<i>Pseudomonas</i> phage LUZ19	endonuclease type 7	7.E-02	28.95
9	1947-2138	191		no homologs		
10	2140-2421	281	<i>Pseudomonas</i> phage KPP10	hypothetical protein	2.E-16	51.16
11	2418-2978	560	<i>Pseudomonas</i> phage KPP10	hypothetical protein	2.E-01	28.26
12	3010-3228	218		no homologs		
13	3215-3637	422	<i>Prevotella timonensis</i> CRIS 5C-B1	cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region	2.E-25	40.00
14	3634-3831	197		no homologs		
15	3828-4025	197		no homologs		
16	4081-4236	155	<i>Pseudomonas</i> phage LUZ24	portal protein	3.E-01	24.14
17	4238-5443	1205	<i>Pseudomonas</i> phage PAK_P1	DNA ligase	3.E-67	38.86
18	5453-6010	557	<i>Xanthomonas</i> phage OP1	HNH endonuclease family protein	2.E-18	33.73
19	6003-6740	737	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58	Putative metallophosphoesterase	3.E-26	35.91
20	6979-7713	734	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato TI	hypothetical protein PSPTOT1_3768	6.E-08	30.46
21	7797-8357	560	<i>Escherichia coli</i> MS 115-1	conserved domain protein	2.E-16	37.33
22	8335-8433	98	<i>Pseudomonas</i> phage B3	capsid protein	2.E+00	53.33
23	8347-8730	383	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	hypothetical protein DDB_G0286989	9.E-17	28.39
24	8727-8987	260		no homologs		
25	8971-9162	191		no homologs		
26	9159-9686	527	<i>Enterobacteria</i> phage BF23	hypothetical protein	3.E-17	37.95
27	9676-9894	218		no homologs		
28	9888-10349	461		no homologs		
29	10350-10643	293		no homologs		
30	10666-10953	287		no homologs		
31	10950-11435	485	<i>Escherichia coli</i> MS 146-1	conserved hypothetical protein	1.E-48	60.87
32	11428-12000	572	<i>Listonella</i> phage phiHSC	hypothetical protein LPPVgp01	2.E-22	35.63
33	11987-12196	209		no homologs		
34	12193-12435	242		no homologs		
35	12714-12908	194		no homologs		
36	12905-13060	155		no homologs		
37	13057-13224	167		no homologs		
38	13227-13430	203		no homologs		
39	13524-13808	284	<i>Photobacterium profundum</i> SS9	hypothetical protein PBPRA1818	1.E-07	40.51
40	13888-13775	113		no homologs		
41	14080-14556	476		no homologs		
42	14832-14647	185	<i>Pseudomonas</i> phage 201phi2-1	virion structural protein	8.E-02	24.19
43	15662-15480	182	<i>Pseudomonas</i> phage 201phi2-1	dihydrofolate reductase	9.E-01	23.81
44	16572-15781	791	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Na(+)/H(+) antiporter	2.E-02	32.57
45	16823-16536	287		no homologs		
46	16879-16935	56	<i>Pseudomonas</i> phage PaP3	exonuclease	3.E+00	42.11
47	17307-17188	119	<i>Pseudomonas</i> phage 201phi2-1	major virion structural protein	3.E-01	57.89
48	17794-17856	62	<i>Pseudomonas</i> phage 201phi2-1	DnaB helicase	9.E-01	42.89
49	18338-18045	293		no homologs		
50	18383-18460	77	<i>Pseudomonas</i> phage phi-2	predicted phage DNA Endonuclease VII	5.E-01	30.77
51	18922-18470	452		no homologs		
52	19155-18934	221	<i>Pseudomonas</i> phage phiCTX	predicted lysis	1.E+00	37.50
53	19314-19159	155		no homologs		
54	19509-19976	467	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>	nucleocapsid protein	7.E-02	28.83
55	19806-20063	257	<i>Pseudomonas</i> phage MP22	virion morphogenesis protein	4.E-02	26.97
56	20282-20118	164		no homologs		
57	20451-20299	152		no homologs		
58	20639-20451	188		no homologs		

59	20985-20824	161		no homologs		
60	21236-20982	254		no homologs		
61	21497-21297	200		no homologs		
62	22035-21754	281		no homologs		
63	22199-22035	164		no homologs		
64	22607-22269	338	Pseudomonas phage KPP10	hypothetical protein	2.E-12	41.94
65	22875-22720	155		no homologs		
66	22830-23000	170	Pseudomonas phage PaP2	DNA polymerase I	1.E+00	31.58
67	23388-22972	416	Pseudomonas phage KPP10	hypothetical protein PsPhKPP10_gp145	2.E-06	21.25
68	23680-23474	206		no homologs		
69	23944-23738	206		no homologs		
70	24317-24021	296		no homologs		
71	24447-24328	119	Pseudomonas phage PAK_P1	hypothetical protein ORF_0137	4.E-10	62.50
72	24911-24525	386	Enterobacteria phage RB43	Srd postulated decoy of host sigma70 or sigmaS	1.E-10	40.22
73	25004-24921	83	Pseudomonas phage F10	Cro repressor	1.E+00	32.14
74	25375-24998	377	Shewanella sp. MR-7	YD repeat protein	1.E+00	42.86
75	25337-25894	557	Coxiella burnetii Dugway 5J108-111	DNA helicase II	3.E+00	50.00
76	25550-25895	345	Pseudomonas phage PAJU2	putative acetyl transferase	2.E-01	26.92
77	26035-25886	149		no homologs		
78	26397-26128	269	Pseudomonas phage KPP10	hypothetical protein	3.E-16	50.00

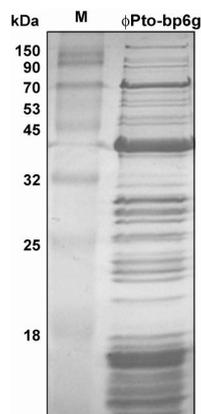
<Table 1> 파아지 Φ Pto-bp6g의 유전자의 ORF 분석 및 특성 확인



<그림 102> 파아지 Φ Pto-bp6g DNA서열의 유전자 구조(gene map).

ORF 52의 경우 구조 유전자 영역에 위치하여 lysis 단백질을 인코딩한다. 이는 파아지의 lysozymes 또는 holins와 유사한 것으로 LysB와 같은 세포막 용해 단백질로 예측하였다. 따라서 ORF52와 ORF7은 호스트 용해와 감염된 박테리아가 분해되어 자손 파아지가 방출되는 용균에 상당한 역할을 수행하는 endolysin을 encoding 한다고 예측된다.

5. 파아지 Φ Pto-bp6g의 단백질 분석



<그림 103> 파아지 단백질의 전기영동 분석.

분리한 파아지 Φ Pto-bp6g의 단백질을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동 후 <그림 103>, 파아지 Φ Pto-bp6g의 유전자의 ORF 분석 및 특성 확인, 밴드가 나뉘짐을 확인하고 정확한 단백질 분석을 위해 LC-ESI-MS/MS를 이용한 Mass spectrometer 분석을 수행하였다. SDS-PAGE에 밴드를 5그룹으로 나누어 단백질 밴드 샘플을 질량분석을 하였다. 파아지 단백질체(proteome)의 LC-MS/MS 분석 결과는 <Table 2>에 정리하였다.

분석 결과에 따르면 파아지 단백질 중 파아지 tail 또는 tail과 비슷한 단백질로 추정되는 높은 유사성을 보이는 단백질 fragment들의 분자량이 18.2, 41.8, 169 kDa에서 확인되었다. ORF8과 ORF51의 DNA 엔도뉴클레아제로 추정되는 부분은 25.1, 27.3, 64.0, 18.1 kDa의 분자량을 보이는 단백질 절편과 일치하였다.

흥미로운 것은 유전자 분석 데이터 중 ORF75에 해당되는 Cro-like 단백질이 8.5 kDa의 분자량 단백질 절편으로서 *Streptococcus* 파아지와 유사성을 발견하였다. 이 파아지는 DNA 복제 단백질처럼 몇 개의 DNA integration 단백질을 포함하고 있다. Φ Pto-bp6g 파아지는 DNA 헬리케이스와 loader 단백질 기능이 추정되는 절편으로서 88.8과 25.0kDa으로 각각 분석되었다. Φ Pto-bp6g의 proteome 분석 결과 여러 파아지 종들과 유사성을 보였는데, 8개의 ORF가 *Siphoviridae*에, 13개의 ORF가 *Myoviridae*에, 6개의 ORF가 *Podoviridae*에 유사성을 보였다.

상기의 유전체 및 단백질체 분석에서 얻어진 정보를 토대로 각각의 ORF가 encoding하는 단백질들의 기능을 이해한다면 더 효과적인 갈반병 유발 톨라시 균 억제 파아지의 활용이 가능하리라 예상된다.

Table 2. Proteome analysis of phage ϕ Pto-bp6g proteins identified by LC-MS/MS

Name	Mw (kDa)	Best phage homolog /NCBI accession No.	Score	Peptides	Predicted Function	Amino acid
phage tail tape measure protein	226578.2	Clostridium acetobutylicum ATCC 824 /15894405	10.24	2	-	KTADISMAKTADFA QVTDKA
predicted phage tail protein	196445.8	Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 6 str. Femo /307252079	10.18	4	-	KLPSNYDPETRK
phage minor structural protein	192847.0	Streptococcus suis 89/1591 /223933553	10.18	1	-	KTQSVESLANQAK ADAANAIARA
phage tail tape measure protein, TP901 family	168837.7	Xylanimonas cellulositytica DSM 15894 /269955330	10.18	1	-	RMNEAGEDVFTTL SDLGQSDVRV
Phage minor structural protein	152778.7	Bacillus cereus Rock4-18 /229076648	10.17	1	-	KTISDVQQTANDLK K
phage minor structural protein, N-terminal domain protein	123164.7	Lactobacillus iners LEAF 2052A-d /312873788	10.16	1	-	R.QIEAHHIAGELIK. N
phage integrase	108768.0	Acinetobacter johnsonii SH046 /262369481	10.16	1	hydrolase activity	RGGGKTESQLCRFV RL
phage infection protein	104656.9	Staphylococcus caprae C87 /314934754	10.15	2	nucleic acid binding	KALLTEANKV
putative RNA polymerase	98447.8	Enterobacteria phage K1-5 /108862033	10.15	1	Nucleotide metabolism	KIVMDMLNTDVTL QAIAMNVADRI
hypothetical protein phiCTXp28	95729.9	Pseudomonas phage phiCTX /17313245	10.18	1	-	RLGQGLVSAGRQAV AGLDGEFARGSRP
gp71	94518.0	Mycobacterium phage CrimD /304360923	10.18	1	-	RLACTIVADGLGAKI
bacteriophage replication gene A	88783.3	Shewanella sp. MR-7 /114046219	10.15	1	helicase activity	RALNLGRSANIWLK KR
hypothetical protein PPEV_gp081	88259.8	Pseudomonas phage EL /82701014	10.18	1	-	RLPSSRNHLSVTDI VEDFDELDKI
putative primase	88177.5	Lactobacillus phage A2 /22296557	10.15	1	primase	KQKFGAEMKQ
Phage infection protein	79420.1	Geobacillus thermodenitrificans NG80-2 /138895184	10.18	1	ligase activity	RENGNTARAMYIG RL
phage terminase GpA	73282.1	Burkholderia vietnamiensis G4 /134297331	10.15	2	DNA metabolic process	KAAWLVEHRILMG DTART
peptidase U35 phage prohead HK97	71314.0	Aminobacterium colombiense DSM 12261 /294102110	10.18	2	-	RAETFEQYQVAKFG KL
gp46 recombination endonuclease subunit	63986.2	Enterobacteria phage CC31 /311993043	10.15	1	DNA metabolic process	KTLNEELNKIVDTK S
Phage integrase family protein	63616.7	Methylobacterium extorquens AM1 /240136933	10.15	1	-	RMAWGAALAMLS ACAARS
phage terminase, large subunit, putative	61968.7	Labrenzia alexandrii DFL-11 /254503218	10.15	1	DNA metabolic process	KKSGFILVDELWLF GKK
putative phage tail fiber repeat-containing domain protein	61370.2	Enterococcus faecalis S613 /293389433	10.18	1	-	KVTSAQVGSYSKTE TDNLFINKS
Golgi protein-73	60054.1	Phage phiJL001 /62327185	10.16	1	-	KDDTATGNPQAGGN HSMRI
phage protein	54622.9	Lactobacillus crispatus JV-V01 /227877449	10.16	1	-	MIKLTAAEKNGIAL AAKE
phage uncharacterized protein, putative	53446.7	Campylobacter upsaliensis RM3195 /57506201	10.18	1	-	RQNKPLINNIEVYP ANRKI
phage sheath protein	52937.2	Pseudomonas entomophila L48 /104783121	10.22	1	-	RVFALLNQFRL
phage integrase family protein	52734.1	Pelobacter propionicus DSM 2379 /118579795	10.15	1	DNA integration,	KAFWGGIDRCMISE DVRR
site-specific recombinase phage integrase family protein	52704.9	Photobacterium damsela subsp. damsela CIP 102761 /269103790	10.15	13	DNA metabolic process -	KAQHDYLFVSLKT
phage integrase	50475.2	Enterobacteriaceae bacterium 9_2_54FAA /317493680	10.18	1	DNA integration	KEPQEQLEQQR.L
putative abortive phage resistance protein	49789.8	Mobiluncus mulieris 28-1 /269977401	10.17	1	membrane	RRQLIFTTHEVQLM RS
virion structural protein	48850.7	Pseudomonas phage 201phi2-1 /189490370	10.17	2	-	KTLPFDAQLPNEKL RL
site-specific recombinase, phage integrase family	47328.8	Coxiella burnetii RSA 334 /165919163	10.16	1	DNA metabolic process	RFIKDGVRIPNPKW
site-specific recombinase, phage integrase family	45954.0	Enterococcus faecalis S613 /293388986	10.19	1	host interaction	KNLINENPMKFKV M
phage integrase family protein	43121.2	Mycobacterium gilvum PYR-GCK /145223514	10.15	1	DNA integration,	RTAIASVIAERM
putative phage tail-like protein	41780.7	Pseudomonas fluorescens SBW25 /229588716	20.18	4	-	KFISYVGLEDAISRK
HK97 family phage portal protein	40580.6	Actinomyces coleocanis DSM 15436 /227494269	10.15	1	-	KLIGLEKRNAAPRV
transposase	37959.2	Sodalis phage phiSG1 /89886005	10.18	1	-	KTPRYREDAMTIAE QLRQ

site-specific recombinase, phage integrase family	37006.0	Bacteroides ovatus SD CMC 3f /293369766	10.16	1	hydrolase activity	KFCGTLNMSFRQV TKE
phage encoded recombination associated protein	34426.0	Salmonella enterica subsp /207857406	10.16	1	DNA metabolic process	RDFNIDIDSLDK.K
antirepressor	31907.3	Lactobacillus phage Sal3 /90962619	10.16	1	nucleic acid binding	KPTTQSLTKVRK
gp24, lysin	30037.2	Corynebacterium phage BFK20 /160693215	10.15	1	lysis	RGVTTLV TPLQSIIN PKK
phage protein	27971.8	Subdoligranulum variabile DSM 15176 /261367719	10.16	2	-	RIVELAKPQTYKI
putative endonuclease	27255.8	Lactobacillus phage phiAT3 /48697295	10.16	3	DNA metabolic process	KINDLTSQLEAVKQ
phosphoribosylaminoimidazole synthetase	25695.2	Prochlorococcus phage P-SSM2 /61806047	10.19	1	DNA metabolic process	KSHNLIELDNGQFA LYPNNRM
putative site-specific intron-like DNA endonuclease	25471.4	Enterobacteria phage RB32 /116326368	10.17	1	DNA metabolic process	MNYEKIYNLSLIDRA
phage shock protein A, PspA	25289.6	Thermus aquaticus Y51MC23 /218297048	10.16	1	DNA packaging	KEAALWKEKAKE
loader of DNA helicase	25065.9	Aeromonas phage phiAS5 /310722573	10.15	1	DNA replication	RMLTRINKEQAKA
prophage repressor	24062.0	Yersinia phage PY54 /33770547	10.16	3	Lysis-lysogeny switch	KRDNQVLESADR KQ
putative repressor protein from phage origin	22582.7	Escherichia coli TA271 /307235732	10.17	1	DNA packaging	RYP SIMLEDLSCILG VCFKI
N-terminus of phage SPO1 DNA polymerase	22556.9	Aquifex aeolicus VF5 /15606784	10.15	1	DNA replication	RKPTPIEMRACFPY LKK
hypothetical protein CST111	21614.6	Clostridium phage c-st /80159797	10.21	2	-	KIEKTENILQKF
putative phage-related protein	20525.8	Vibrio phage VP882 /126010915	10.17	1	-	RELGQQLGIKQEPL KK
gp172	18798.9	Streptococcus phage Sfi11 /9635010	10.17	1	-	LSNEGCGCIGLNQR Q
putative phage tail-like protein	18221.5	Pseudomonas fluorescens SBW25 /229588717	20.20	2	-	RLGDDILLNVRE
gp49 EndoVII packaging and recombination endonuclease	18062.1	Acinetobacter phage Acj9 /311993392	10.15	1	DNA packaging	MLLIGKAFAAEKQR L
OrfE	14123.3	Serpulina phage VSH-1 /225620757	10.19	1	-	RSTLGNKFKSDDVI SINRP
hypothetical protein CDBPCV119_gp55	11239.8	Clostridium phage phi CD119 /90592691	10.17	2	-	KNIGGLRVKYECEK V
gp0.45	8955.3	Enterobacteria phage 13a /194100360	10.18	1	hydrolase activity	MPFMIFTNDVIGAN MSKL
putative Cro-like protein, phage associated	8535.5	Streptococcus phage 370.1 /15674726	10.15	1	Lysis-lysogeny switch	KITLIFGLPIEKIAIFF DKD
hypothetical protein LSL_1195	8455.2	Lactobacillus phage Sal4 /90962170	10.16	1	-	MRKTDIYDIADKL
hypothetical protein EFP_gp042	7772.1	Enterococcus phage phiEF24C /158079338	10.17	4	-	K.AIKDELSKELADI KQ

<Table 2> LC-MS/MS를 이용한 파아지 Φ Pto-bp6g의 단백질체 분석.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 제1세부과제

구분	연구개발의 목표	연구개발의 연구범위	달성도(%)
1차년도 (2008. 6. -2009. 6.)	- 톨라신 저해제 (TIF) 탐구 및 저해효과 검증	▪ 다양한 식품첨가물의 톨라신 독성 저해효과 평가	100
		▪ 적혈구를 이용한 세포독성 저해효과 측정	100
		▪ Pitting test를 이용한 버섯조직의 톨라신 감수성 평가 및 TIF 효과를 평가함	100
2차년도 (2009. 6. -2010. 6.)	- TIF 효과물질의 최적화 및 제제화	▪ 저장기간, pH, 온도 등 요인에 따른 저해효과 지속성을 평가함	100
		▪ TIF 종류에 따른 톨라신 저해효과	100
3차년도 (2010. 6 -2011. 6.)	- TIF와 파아지 시작품의 안정성 및 효과 극대화	▪ 재배사와 균상에서의 실용적 처리방법을 확립	100
		▪ TIF 종류별 최적의 처리조건 확립, 시작품 제작 및 효과검증	100

2. 제2세부과제

구분	연구개발의 목표	연구개발의 연구범위	달성도(%)
1차년도 (2008. 6. -2009. 6.)	- 톨라신 저해제 (TIF) 후보 도출	<ul style="list-style-type: none"> 톨라신 저해제와 톨라신과의 in silico 결합 연구: 적어도 10,000종 이상의 화합물에 대한 연구 	100
		<ul style="list-style-type: none"> 구조-활성 관계에 근거한 톨라신 저해제 후보 도출 	100
2차년도 (2009. 6. -2010. 6.)	- 톨라신 저해제의 작용기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> 톨라신 저해제와 톨라신과의 in vitro 결합 연구: 적어도 10종 이상 화합물 수행 	100
		<ul style="list-style-type: none"> 다양한 금속이온과 lactone 고리구조와의 결합특성 	100
3차년도 (2010. 6. -2011. 6.)	- 톨라신 활성 저해 극대화에 대한 방안 도출	<ul style="list-style-type: none"> 톨라신 이온채널 형성시의 분자수, 결합방법 등 	100
		<ul style="list-style-type: none"> 톨라신 활성 저해 극대화에 대한 방안제시로 시작품의 개발 및 품질개선 	100
		<ul style="list-style-type: none"> TIF 종류별 분자결합 특성을 밝혀 효과 증진 	100

3. 제3세부과제

구분	연구개발의 목표	연구개발의 연구범위	달성도
1차년도 (2008. 6. -2009. 6.)	- 파아지의 분리 및 살상효과 분석	▪ 환경시료로부터 파아지의 분리	100
		▪ 파아지의 대량분리 및 정제	100
		▪ in vitro 안정성 및 살상특성 분석	100
2차년도 (2009. 6. -2010. 6.)	- 파아지의 특성분석	▪ 파아지의 형태분류	100
		▪ 유전체서열 결정 및 annotation	100
		▪ LPS나 porin, pili 등의 세포표면 구조물을 대상으로 수용체 확인	80
		▪ 다양한 갈반병병원균에 대해 숙주특이성 조사	100
		▪ <i>araBAD</i> 프로모터에 결합한 lytic cassette 구성 유전자발현을 통한 살상특성 검증	100

4. 제1협동과제

구분	연구개발의 목표	연구개발의 연구범위	달성도(%)
3차년도 (2010. 6 -2011. 6.)	- 파아지 재설계 및 방제방식 최적화	▪ 파아지 재설계를 위한 파아지 유전체 및 단백질체 분석	100
		▪ 톨라시 균 용균 숙주특이성, 살상능력 관련 유전자의 동정	100
		▪ 파아지의 특성 및 톨라신 균 살상 메커니즘 규명	100

5. 협동기업(한국원균)

구분	세부연구개발 목표		달성도
1차년도 (2008. 6. -2009. 6.)	- 갈반병 검증을 위한 발병조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> 온도, 습도, 균상재료 등에 따른 갈반병 발병조건을 확립함 	100%
2차년도 (2009. 6. -2010 6.)	- TIF 적용실험 파아지의 적용실험	<ul style="list-style-type: none"> TIF와 파아지 효과를 극대화하는 최적조건을 확립함 	100%
3차년도 (2010. 6 -2011. 6.)	- 시작품의 제작 및 실용화	<ul style="list-style-type: none"> TIF와 파아의 안정성을 높인 제제화, 유통방법 등 	100%

제 2 절 관련 분야의 기술발전의 기여도

1. 활용계획

- ① 개발한 TIF는 2009년 특허를 출원하여 현재 등록 직전의 상태이다. 특허가 등록된다면 TIF의 안전성 실험에서 얻은 결과대로 제제화하여 버섯재배농가에 무상 공급하여 최종 포장실험을 거친 후 상품화할 예정이다.
- ② TIF를 이용하는 기술은 펩티드 독소를 분비하여 병을 유발하는 식물 및 사람과 동물의 병원균에 응용이 가능하다. TIF 관련 기술을 체계적으로 정리하여 식물과 인축에 발병하는 병원균의 병발생 억제에 응용성을 검토할 것이다.
- ③ 생물학적 방제를 위하여 분리 및 동정된 파아지는 안정성 실험을 거쳐 갈반병 억제를 위한 제제로 개발하여 농가실험을 수행할 예정이다. 다만, 갈반병 원인균이 예상보다 다양하여 갈반병 원인균을 분류한 후, 그에 맞는 파아지 종을 개발하고 이들을 혼합하여 버섯재배사에 사용할 계획이다. 이 부분에 대하여는 추가 연구를 필요로 한다.
- ④ 본 연구에서 분리한 파아지를 이용한 병원균 사멸방법은 항생제 내성을 갖은 병원균 등에 다양하게 적용이 가능하다. 병원균의 종류가 잘 연구된 작물이나 인축의 병에 동일한 논리로 연구가 가능하다.

2. 기술적 측면

본 연구를 통하여 갈반병 관련 연구에 다음과 같은 기술발전이 있었다.

- ① 갈반병의 원인독소의 작용기작을 3단계로 해석하여 밝혔다. 이것은 앞으로 갈반병독소 톨라신의 작용억제 연구에 크게 기여할 것이다.
- ② 톨라신의 세포독성 검증을 위하여 쥐의 적혈구를 이용한 용혈활성검정법을 확립하였다. 그간의 독성검사가 버섯함몰검정법으로 이루어졌는데, 이 방법은 24시간이 소요되는 방법이었으나 용혈활성검정법은 1시간 이내에 평가가 가능한 방법으로 장점이 있다.
- ③ 다양한 종류의 톨라신 독소 저해제를 개발하였고, 실제 버섯재배사에서 균상배양을 통하여 효과를 확인하였다. 개발된 TIF들은 특허출원되어 기술을 인정받는 단계에 있다.
- ④ 개발한 TIF는 현재 시제품으로 제작되어 농가실험을 앞두고 있다. 이미 균상재배를 통하여 효과를 입증하였지만 최종 단계인 농가실험을 통하여 제제기술을 확립하면 제품생산이 가능하여 기술을 최종 확립할 수 있을 것이다.
- ⑤ 새로운 TIF의 추가개발을 위하여 *in silico* docking을 수행하여 후보를 도출하였고, 후보 화합물은 핵자기공명분광 실험을 통하여 작용기작을 밝히는 데 기여하였다. 또한 분자모델링 기법을 이용하여 톨라신의 이온채널 형상을 밝혀 앞으로 펩티드 독소의 연구에 기반을 확립하였다.
- ⑥ 병원균의 생물학적 방제를 위한 파아지를 분리하였고, 특성을 밝혔으며, 파아지를 이용한 균상재배에서 갈반병 억제기술을 확립하였다. 다만, 병원균의 변이종이 여럿 존재함이 밝혀졌고, 따라서 각 균종마다 특이적인 파아지의 분리 및 특성구명이 이루어지고 있다.
- ⑦ 병원균을 효율적으로 사멸시키는 독성 파아지의 특성분석으로 파아지 유전자 전체의 염기서열을 결정하였고, 유전체 분석을 통하여 단백질 유전자를 동정하여 용균과 관련한 유전자를 확인하였다.

3. 경제, 산업적 측면

- ① 갈반병 억제제 TIF를 이용한 시제품 개발로 갈반병의 방제를 위한 방법을 제시하였다. 느타리버섯 갈반병은 방제방법이 없는 병해로서 발생시 피해가 막대하였고, 농가에는 심리적인 재배기피의 원인이었다. 본 방법의 개발로 갈반병의 방제가 가능해짐으로써 성공적으로 제품이 개발된다면 농가소득에 크게 기여할 것이다.
- ② 갈반병 유발독소 톨라신의 세포독성 검증을 위한 용혈활성검정법의 개발로 독성물질의 검정에 시간을 단축하여 갈반병 의심 현상 발생시 빠른 결론과 대응을 가능하게 하였다.
- ③ TIF를 이용한 갈반병 방제제 개발에 특허를 획득하면 TIF 관련기술을 유사한 동식물

세균병에 응용이 가능할 것이다.

- ④ 갈반병 세균을 박멸할 수 있는 박테리오파아지의 개발은 항생제나 살균제 등을 사용하지 않는 친환경 방제법의 개발을 가능하게 할 것이다.
- ⑤ 톨라시균 용균 파아지의 유전체를 독점적으로 분석함으로써 파아지 및 파아지 관련 유전자의 특허 도출에 있어서 우선적 지위를 확보하였다.

제 3 절 산업화를 위한 검토 및 개선점

본 연구의 결과물은 현재 농가에 큰 피해를 주고 있는 갈반병을 방제하기 위한 것으로, 크게 다음의 2가지 결과물이 성공적으로 얻어졌고 이들 각각에 대하여 산업화가 가능하다.

① 갈반병 원인 독소 톨라신의 억제제 TIF의 산업화

본 연구를 통하여 다양한 종류의 TIF가 개발되었고, 느타리버섯의 균상재배에서 TIF의 효과가 검증되었다. 더욱이 TIF의 시작용 제작을 위하여 보관 및 유통 중 안정성을 높일 수 있는 방안이 확립되었으며, 현재 본 기술을 출원한 특허가 등록단계에 있어 산업화를 위한 기술적 연구는 성공적으로 평가된다. 협동기업인 한국원균영농조합(주)에서 산업화에 대한 의지를 갖고 있어 산업화를 위한 구체적인 기술검토가 이루어질 것이다.

② 갈반병 원인 균주의 사멸을 위한 박테리오파아지의 산업화 문제점

갈반병 원인균주 톨라시 균을 완전히 사멸시킬 수 있는 박테리오파아지를 다수 분리하는데 성공하였고, 파아지를 갈반병균을 접종한 버섯에 처리하였을 때 완벽하게 갈반병을 억제하는 것을 확인하였다. 그러나 파아지를 산업화하는데는 아직 몇가지 기술이 확립되어야 한다. 먼저, 갈반병을 유발하는 톨라시 균의 변이균을 포함한 모든 병원균을 분리하고 각각에 대한 특성을 파악하여, 각 병원균 종류마다 독성이 높은 파아지를 분리하여야 한다. 이렇게 분리한 파아지들을 혼합하여 생물재제를 만들어 사용한다면 어떤 종류의 갈반병균에 의한 발병도 방제가 가능할 것이다. 현재 병원균의 분류작업을 수행하고 있으나 본 과제의 산업화를 위해서는 추가적인 연구수행이 불가피하다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구를 통하여 개발한 갈반병 원인독소 톨라신의 억제물질 TIF는 협동기업과 긴밀히 협의하여 산업화를 시도할 예정이다. 실험실 단계의 기술개발은 마무리 단계에 있으나 산업화를 위해서는 출원중인 특허의 등록, TIF 원료의 공급, 생산시설 및 공정의 개발, 유통 및 사용기술지도 등 실용화를 위한 다양한 기술이 확립되어야 할 것이다.

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

본 연구의 결과가 산업화된다면 ‘월간 버섯’, ‘농민신문’ 등에 홍보될 것이고, TIF 제재의 사용방법에 대한 버섯재배농가의 교육도 이루어질 것이다.

제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

1. 특허등록(또는 출원)

(1) 특허 출원

출원일자: 2009년 7월31일

출원인 : 충북대학교 산학협력단

출원번호: 10-2009-0070908

특허명: 지방산 또는 글리세롤을 포함하는 식품용 계면활성제를 이용한 갈반병 독소의 무독화 및 이에 따른 재배용 버섯의 세균성 갈반병 예방 또는 조성물

출원일자: 2009년 9월28일

출원인 : 임응호, 이영규, 우윤경

출원번호: 10-2009-0091615

특허명: 버섯 갈반병을 유발하는 톨라신 저해제

(2) 상품화

(없음)

(3). 논문발표 및 준비중 논문

1) 논문발표

Kwang-hyun Cho, Hee-sung Wang, Young-kee Kim (2010) Temperature-dependent hemolytic activity of membrane pore-forming peptide toxin, tolaasin. J. Peptide Sci. 16, 85-90. (SCI)

Min-Hee Kim, Seong-Wan Park, Young-Kee Kim (2011) Bacteriophage of *Pseudomonas tolaasii* for the biological control of brown blotch disease. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54, 99-104. (SCIE)

Younggiu Lee, Yoonkyung Woo, Soohyun Lee, Kyungrai Kang, Yeonjoong Yong, Jae Kyung Kim, Kwang Pyo Kim, Min-Hee Kim, Young-Kee Kim, Yoongho Lim (2009) Identification of compounds exhibiting inhibitory activity toward the *Pseudomonas tolaasii* toxin tolaasin I using in silico docking calculations, NMR binding assays, and in vitro hemolytic activity assays. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 4321-4324. (SCI)

GeunHyeong Jo, Doseokh Wang, Sunhee Lee, Yoonkyung Woo, Jiye Hyun, Yeonjoong Yong, Kyungrai Kang, Dong-Woon Kim, and Yoongho Lim. (2011) In silico study of the ion channel formed by tolaasin I produced by *Pseudomonas tolaasii*. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 1097-1100.(SCIE)

Sunhee Lee, Geunhyeong Jo, Doseok Hwang, Yoonkyung Woo, Yeonjoong Yong, Kyungrai Kang, Jiye Hyun, Young-Kee Kim, Dong-Woon Kim, Yoongho Lim (2011) A peptide produced by *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin binds to metal ions. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 54, 633-636.(SCIE)

2) 준비중 또는 투고된 논문

Soojin Yoon, Hanh Thi Dieu Nguyen, Min-Hee Kim, Young-Kee Kim, Gurn-Yong Kang, Hyung Soon Park, Jae Young Kim, Sang Heum Shin, You-Hee Sho, Dong-Eun Kim (2011) Characterization of genomic sequence and proteome of bacteriophage Φ Pto-bp6g, a novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms. Appl. Microbiol. Biotechnol. (submitted)

Seong-Wan Park, Min-Hee Kim, Young-Kee Kim. Suppression of brown blotch disease by tolaasin inhibitory factors. (in preparation)

Seong-Wan Park, Yoongho Lim, Young-Kee Kim. Decrease in the biological activity of TIF by molecular aggregation during storage. (in preparation)

제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

1. 파아지를 이용한 추가연구 계획

본 연구에서는 갈반병 원인균을 선택적으로 사멸할 수 있는 박테리오파아지를 분리하는 데 성공하였고, 파아지를 이용하여 균상재배에서 병원균을 집중한 느타리버섯에서 갈반병을 완벽하게 방제할 수 있었다. 이 결과로 파아지를 사용하는 것은 갈반병 발생을 근원적으로 방지할 수 있는 친환경적인 방법이 될 수 있다는 결과를 얻었다. 그럼에도 불구하고 파아지를 갈반병의 방제에 실용화하기 위해서는 첫째, 파아지 숙주역에 따른 병원균 종류의 실태를 파악하고, 둘째, 병원균의 돌연변이 발생과 변이균의 파아지 민감성을 조사하며, 셋째, 모든 분류 형태의 병원균에 대한 독성파아지를 분리하며, 넷째, 모든 종류의 병원균을 사멸시켜 완벽하게 갈반병을 방제할 수 있는 박테리오파아지 혼합제품을 개발하여야 실용화가 가능할 것이다.

현재, 1995년 이후 버섯재배 농가에서 갈반병 사고를 일으킨 약 150 여종의 병원균주를 분양받아 확보하였고, 이들 중 세포독성이 강한 균주를 16S rRNA 유전자를 분석하여 병원균들의 분류를 수행하고 있다. 이제 각 종류별 갈반병 원인균들을 숙주로 하는 독성 파아지를 분리하고, 이 파아지들의 혼합액을 만들어 포장실험을 통하여 효과를 확인한다면 갈반병에 대하여 항생제나 살균제를 사용하지 않는 친환경 개념의 방제방법을 개발하

는 것이 가능할 것이다. 이를 위하여 2-3년간의 추가 연구가 필요하여 계획중에 있다.

2. 파아지의 용균활성 재조합 단백질을 이용한 추가연구 계획

파아지 유전체 분석 결과, 파아지의 ORF7은 *Pseudomonas* phage D3와 유사한 베타-1,4-glycosidic 결합과 N-acetylmuramic acid 사이를 가수분해하는 엔도라이신(endolysin)을 암호화한다. 이는 파아지 ORF7가 박테리아 막의 펩티도글라이칸을 분해하여 박테리아에 DNA 주입을 돕는 역할을 한다고 예상된다. 파아지 유전체 분석 결과, 구조 유전자 영역에 위치하여 톨라시 균 용균 단백질을 인코딩하는 ORF52가 발견되었는데, 파아지의 lysozymes 또는 holins와 유사한 것으로 LysB와 같은 세포막 용해 단백질로 예측되었다. 따라서, ORF52와 ORF7은 호스트 용해와 감염된 박테리아가 분해되어 자손 파아지가 방출되는 용균에 상당한 역할을 수행하는 endolysin을 encoding 한다고 예측되므로 이들 유전자들을 클로닝하여 해당 단백질을 발현/정제 하여 동정함으로써 용균활성 관련 재조합 단백질만 선택적으로 활용하는 한단계 발전한 톨라시 균 방제연구를 추가로 수행하여 갈반병 방제방법을 개발할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

(해당사항 없음)

제 7 장 참고문헌

Bassarello 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.

Bessette AE, Kerrigan RW, and Jordan DC. (1985) Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1535-1537.

Birkenkamp-Demtroder K, Golz S, and Kemper B. (1997) Inhibition of holiday structure resolving endonuclease VII of bacteriophage T4 by recombination enzymes UvsX and

UvsY. *J Mol Biol* **267**, 150–162.

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–Microb Interact* **4**, 407.

Brown TA. (2010) *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 6th ed.* Wiley–Blackwell, Hoboken, NJ.

Ceyssens PJ, Mesyanzhinov V, Sykilinda N, Briers Y, Roucourt B, Lavigne R, Robben J, Domashin A, Miroshnikov K, Volckaert G, and Hertveldt K. (2008) The genome and structural proteome of YuA, a new *Pseudomonas aeruginosa* phage resembling M6. *J Bacteriol* **190**, 1429–1435.

Chibani–Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, and Brussow H. (2004) In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2558–2569.

Cho KH, Kim ST, and Kim YK. (2007) Purification of a pore–forming peptide toxin, tolaasin, produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *J Biochem Mol Biol* **40**, 113–118.

Cho KH, Wang HS, and Kim YK. (2010) Temperature–dependent hemolytic activity of membrane pore–forming peptide toxin, tolaasin. *J Pept Sci* **16**, 85–90.

Cho KH, and Kim YK. (2003) Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 221–226.

Chun Zhou C, Swaney SM, Shinabarger DL, Stockman BJ. (2002) ¹H Nuclear magnetic resonance study of oxazolidinone binding to bacterial ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 625–629.

- Coraiola M, Lo Cantore P, Lazzaroni S, Evidente A, Iacobellis NS, and Dalla Serra M (2006) WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1713–1722.
- Downes FP, and Ito K. (2001) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D.C.
- Geels F. (1995) *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Appl Bacteriol* **79**, 34–42.
- Gilakjan ZA and Kropinski AM. (1999) Cloning and analysis of the capsid morphogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: another example of protein chain mail? *J Bacteriol* **181**, 7221–7227.
- Grewa SI, Han B, and Johnstone K. (1995) Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J Bacteriol* **177**, 4658–4668.
- Jourdan F, Lazzaroni S, Méndez BL, Cantore PL, Julio M, Amodeo P, Iacobellis NS, Evidente A, and Motta A. (2003) A left-handed α -helix containing both L- and D-amino acids: The solution structure of the antimicrobial lipodepsipeptide tolaasin. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **52**, 534–543.
- Kang C, Tian C, Sönnichsen FD, Smith JA, Meiler J, George AL, Jr. Vanoye CG, Kim HJ, and Sanders CR. (2008) Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry* **47**, 7999–8006.
- Kim MH, Park SW, and Kim YK. (2011) Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the Biological Control of Brown Blotch Disease. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **54**, 99–104.
- Kim ST, Choi TK, and Kim YK. (2007) pH-dependent cytotoxicity of a peptide toxin,

- tolaasin. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **50**, 257–261.
- Kropinski AM. (2000) Sequence of the genome of the temperate, serotype-converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *J Bacteriol* **182**, 6066–6074.
- Largeteau ML and Savoie JM. (2010) Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 63–73.
- Lee Y, Kim K, Suh JW, Rhee S, Lim Y. (2007) Binding study of AfsK, a Ser/Thr kinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and S-adenosyl-L-methionine. *FEMS Microbiol Lett* **266**, 236–240.
- Lee Y, Woo Y, Lee S, Kang K, Yong Y, Kim JK, Kim KP, Kim MH, Kim YK, and Lim Y. (2009) Identification of compounds exhibiting inhibitory activity toward the *Pseudomonas tolaasii* toxin tolaasin I using in silico docking calculations, NMR binding assays, and in vitro hemolytic activity assays. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 4321–4324.
- Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Camp MJ. (2004) Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J Food Prot* **67**, 1682–1686
- Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, and Imai S. (2005) Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* **11**, 211–219.
- Munsch P, Oliver JM, and Houdeau G. (1991) *Experimental control of bacterial blotch by bacteriophages*. Balkema Pub., Rotterdam.
- Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey 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

- Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vaneechoutte M, Zizi M, Laire G, Lavigne R, Huys I, Van den Mooter G, Buckling A, Debarbieux L, Pouillot F, Azeredo J, Kutter E, Dublanchet A, Gorski A, and Adamia R. (2011) The phage therapy paradigm: Pret-a-porter or sur-mesure? *Pharm Res* **28**, 934-937.
- Rainey PB, Brodey CL, 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.
- Sajben E, Manczinger L, Nagy A, Kredics L, and Vagvolgyi C. (2010) Characterization of pseudomonads isolated from decaying sporocarps of oyster mushroom. *Microbiol Res* doi : 10.1016/j.micres.2010.05.002.
- 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.
- Tolass AG. (1915) A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* **5**, 51-54
- Tsukamoto T, Murata H. and Shirata A. (2002) Identification of non-pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild agaricales fungi that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Biosci Biotechnol* **66**, 2201-2208
- Wong WC and Preece TF. (1985) *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops effect of sodium hydrochloride on the bacterium and on blotch disease severity. *J Appl Bacteriol* **58**, 259-267.