

펩티드 독소 Tolaasin에 의한 세포독성의 pH 의존성

김성태 · 최태근 · 김영기*

충북대학교 농업생명환경대학 농화학과

pH-dependent Cytotoxicity of a Peptide Toxin, Tolaasin

Sung-Tae Kim, Tae-Keun Choi and Young-Kee Kim*

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

Received October 19, 2007; Accepted October 25, 2007

Tolaasin, a peptide toxin produced by *Pseudomonas tolaasii*, causes a serious disease on the cultivated mushrooms, known as brown blotch disease. Hemolysis using red blood cells was designed to measure the cytotoxicity of tolaasin molecules. Since tolaasin has two amine groups near the C-terminus, its membrane binding will be dependent on the ionic states of the amine groups. When the tolaasin peptide was titrated, its titration curve indicated the presence of titratable amine(s) at pH ranges from 7.0 to 9.6. When the pH-dependence of tolaasin-induced hemolysis was measured at various pHs, hemolysis was more efficient at alkaline pHs. In order to measure the membrane binding activity of tolaasin at different pHs, RBCs were incubated with tolaasin molecules for short time periods and washed out with fresh buffer. Because of the tolaasin binding during the preincubation period, fast hemolyses were observed at pH 8 or higher. These results imply that non-charged or less positively charged states of tolaasin molecules easily bind to membrane and show high hemolytic activity.

Key words: hemolysis, pore-forming toxin, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin

서 론

버섯은 다당류, 단백질, 비타민, 무기질, 섬유소 등의 영양소가 풍부할 뿐만 아니라 저열량식품으로 성인병의 예방이나 치료 효능이 알려지면서 수요가 급격히 증가하고 있다. 많은 농가들은 버섯의 유용성과 높은 수익성으로 버섯재배를 희망하나, 병해에 따른 심각한 피해가능성 때문에 적극적인 재배를 망설이고 있다. 버섯의 병발생을 유발할 수 있는 세균은 *Pseudomonas*속의 *P. tolaasii*와 *P. agarici* 및 *Erwinia*속 세균들이 있다. 이들 중 *P. agarici*는 심각한 문제가 되지 않는 반면 *P. tolaasii*는 세균성 갈반병을 일으키는 주된 원인균이다.¹⁾ 세균성 갈반병은 *P. tolaasii*가 분비하는 tolaasin이란 독소펩티드에 의해서 버섯의 자실체가 괴사함으로써 나타난다. 이 병원균은 양송이버섯, 느타리버섯, 팽이버섯 등에 갈반병을 일으키며, 재배 버섯의 수량 손실 원인들 중 가장 중요한 생물학적 요인으로 보고되었다.^{1,2)}

*P. tolaasii*에 의한 갈반병은 버섯조직 전체를 진한 갈색으로 변화시키고, 성장을 중지시키거나, 버섯의 갓조직에 갈색 반점

을 형성하여 상품성을 없애 버린다. 또한, 이 병은 심하면 버섯의 균사를 괴멸시키며, 결국 재배가 불가능한 치명적인 손실을 유발한다.³⁾ 병원균의 전파는 재배상에서 재배농가, 나아가 재배단지 전체로 번지는 특성을 갖고 있다. 갈반병의 예방은 철저한 지하수의 살균과 재배사의 훈증소독 등으로 이루어지고 있으며,^{4,5)} 생물학적 방제로서 bacteriophage 등이 실험적으로 사용되기도 하였다.^{6,7)} 갈반병은 항생제⁸⁾ 등의 사용으로 방제될 수 있으나, 버섯은 식품으로서 약제의 사용이 용인되지 않는다.

갈반병은 1915년에 처음 보고되었으며,⁹⁾ 1991년에 tolaasin의 분자구조가 밝혀졌다. Tolaasin은 아미노산 18개로 구성된 분자량 1,985 Da의 lipodepsipeptide이며, N-말단은 β -hydroxyoctanoic acid와 acylation되어 결합하고 있고, C-말단의 lysine은 14번째 D-allo-threonine과 lactone을 형성하여 환상결합을 하고 있는 복잡한 구조의 2차 대사산물이다.¹⁰⁾ 이 독성 펩티드는 버섯의 세포막에 pore를 형성하여 이온 및 대사물질의 이동을 유발하고 결국, 세포내외의 삼투압 교란을 통해 버섯조직의 괴사를 유발한다.¹¹⁾

본 연구실에서는 전기생리 기술을 이용하여 tolaasin이 인공 지질막에서 두 가지 유형의 이온채널을 형성하는 것을 보였으며,¹²⁾ tolaasin에 의한 이온채널 형성의 자세한 분자기작을 밝혀야 노력하고 있다. Tolaasin 분자는 C-말단부위의 lactone 환에 두 개의 amine기를 갖고 있어 이들의 전하량에 따라 tolaasin의

*Corresponding author

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

E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

막결합 특성이 달라질 것이므로, 본 연구에서는 pH 변화에 따른 tolaasin의 막결합 및 용혈활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 보관. *P. tolaasii* 6264 균주는 갈반병에 감염된 느타리버섯에서 Cho 등의 방법¹³⁾에 따라 분리동정 하였다. 간략히 서술하면, 감염된 버섯의 갓조직을 멸균수에 넣고 분쇄한 후, 이 현탁액을 희석하여 약 200 μ l PAF(Bacto-peptone 10 g, Bacto-tryptone 10 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄ 1.5 g, glycerol 10 ml, agar 15 g per liter) 평판배지위에 도말하고, 25°C에서 1-2일간 배양하여 병원세균을 얻었다. 이렇게 얻은 세균 중에서 형광성의 균주를 선발하고, 흰색침강선 생성검정 및 버섯조직함물 검정을 통하여 병원성을 평가한 후,¹⁾ 세균학적 특성을 확인하였다.^{14,15)} 분리한 세균은 PAF 액체배지 80%와 glycerol 20%를 함유한 저장배지 1.5 ml에 현탁시켜 -80°C에서 보관하였다.

적혈구 분리. 마취한 쥐를 개복하여 대정맥으로부터 채혈한 후, 멸균한 glass bead가 담긴 삼각 플라스크에 옮기고, 약 1시간 동안 저속으로 교반하여 fibrin을 제거하였다. 얻어진 혈액은 4°C에서 보관하였으며, HBS 완충액(150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, pH 7.4)으로 10배 희석하여 사용하였다. 채취한 혈구는 약 3주간 실험에 사용하였으며, 필요시 HBS 완충액에서 원심분리하여 파괴된 적혈구 세포들을 세척하였다.

Tolaasin의 분리 및 정제. Tolaasin의 순수분리는 Cho 등의 방법¹⁶⁾으로 이루어졌다. 간략히 서술하면, *P. tolaasii* 균주를 PAF 액체배지에 접종하여 18시간 진탕배양한 후, 원심분리하여 세균을 제거하고 배양액을 얻었다. 배양액은 30% ammonium sulfate를 가하여 4°C에서 1시간 동안 정치한 후, SW 28 rotor (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 20,000 rpm(60,000×g)에서 1시간 동안 초고속 원심분리하였다. 침전으로 얻은 crude tolaasin은 HBS 완충액에서 4시간 투석하여 glass-Teflon homogenizer로 균질화한 후, Sephadex G-75로 충전한 column에서 순수분리 하였다. 얻어진 분획은 자외선 분광광도계(U-2000, Hitachi Ltd., Tokyo)를 이용하여 220 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 적혈구를 이용한 용혈활성을 관측하였으며, tolaasin 활성을 갖는 분획을 순수분리 하였다.

용혈활성 측정. Tolaasin의 용혈활성은 Rainey 등¹⁷⁾의 방법에 따라 쥐의 적혈구를 이용하여 측정하였다. 용혈활성 측정에 사용한 적혈구는 사용직전에 멸균한 HBS 완충액으로 10배 희석하였고, 이것을 최종 반응 용액에 10%가 되도록 첨가하였다. 용혈활성 측정시 1% 적혈구를 37°C에서 30분 이내에 모두 용혈시키는 tolaasin의 농도를 1 hemolytic unit(HU)으로 정하여 사용하였다. 용혈활성은 spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도 변화로 측정하였다. pH 효과는 pH별로 다르게 준비한 용액을 사용하였다. 먼저 pH 4와 5 완충액은 생리식염수(130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄)를 기본으로 하여 초산 완충액을 30 mM되게 만들었고, pH 6과 7은 30 mM HEPES 완충액으로, pH 8과 9는 30 mM Tris 완충액으로 제조

하였다. Tolaasin의 적정곡선은 순수분리한 tolaasin 펩티드 농도가 1.53 mg/ml인 용액 10 ml를 HCl로 pH 2까지 조정한 후, 0.5 N NaOH 용액을 가하며 pH 12까지 적정하였다.

결 과

용혈활성의 pH 의존성. Tolaasin 분자는 C-말단 부위에 두 개의 amine기를 갖고 있어 용액의 pH에 따라 분자의 전하량이 달라진다. 또한, tolaasin의 생체막 결합은 펩티드의 전하량과 전하의 종류에 따라 좌우될 수 있으므로, tolaasin 활성의 pH의 의존성을 조사하기 위하여 용액의 pH를 변화시키면서 tolaasin 분자의 적정곡선을 측정하였다(Fig. 1). 순수분리한 tolaasin 용액의 농도는 0.77 mM이며, 이 용액의 pH를 1 N HCl로 낮춘 후, 0.5 N NaOH로 적정하였다. Tolaasin용액은 pH 7.0-9.6 사이에서 pH가 크게 변화하지 않는 완충구간을 보여, 이 구간에서 amine기의 중화가 일어남으로 tolaasin의 양전하 전하량이 변화됨을 알 수 있었다.

Tolaasin의 세포독성 평가는 적혈구를 이용한 용혈활성 측정으로 하였다.^{17,18)} 용혈활성은 tolaasin에 의한 적혈구 파괴와 이에 따른 600 nm에서 흡광도 감소를 시간에 따라 측정함으로써 이루어졌다. Tolaasin의 활성에 미치는 pH의 영향을 측정하기 위하여 반응완충액의 pH를 4에서 9까지 변화시켰으며, 시간에 따른 tolaasin의 용혈활성은 중성 pH에서 보다 산성과 알칼리성 조건에서 더 크게 나타났다(Fig. 2A). 이 결과를 50% 용혈활성이 일어나는 시간인 T₅₀ 값으로 pH에 따라 도시하면, 중성의 pH에서 용혈은 가장 늦었고, pH 4-5와 pH 8-9에서 T₅₀이 작아져 용혈이 빨라짐을 알 수 있었다(Fig. 2B).

산성과 염기성 조건에서 용혈활성의 증가 현상은 tolaasin의 독성증가에 의해서 설명되어질 수 있으나, 사용된 적혈구의 안정성 변화에 의해서도 나타날 수 있으므로 각 pH에서 tolaasin을 첨가하지 않은 상태로 적혈구의 용혈여부를 측정함으로써 적혈구 자체의 안정성을 측정하였다. 생리적 완충액을 pH 4로 낮추었을 때, 적혈구의 용혈은 약 70%정도 일어났고, pH 5에서도 약 10% 전후로 일어나는 것을 관측하였다(Fig. 3). 즉, 산성조건에서는 적혈구가 불안정하여 tolaasin의 유무와 관계없이

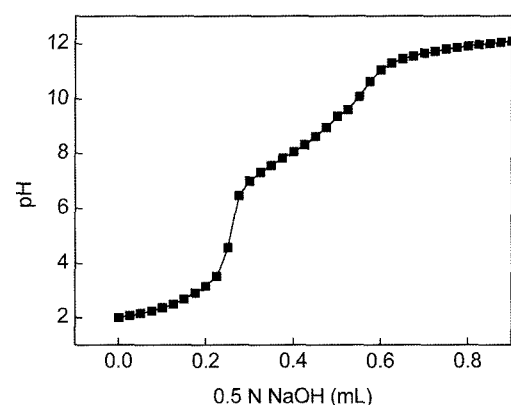


Fig. 1. Titration of tolaasin peptide. Solution containing purified tolaasin molecules was adjusted to pH 2 and titrated with 0.5 N NaOH.

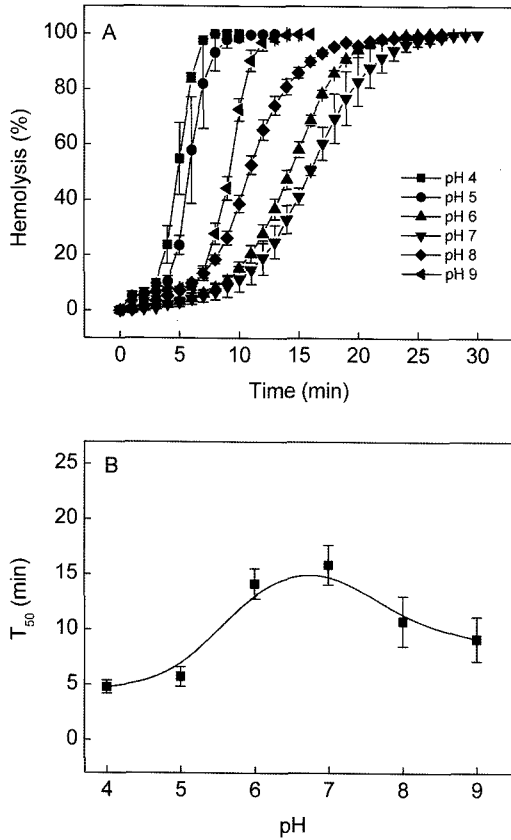


Fig. 2. pH-dependence of hemolysis. (A) Time courses of hemolysis were obtained at various pHs in the presence of 1 HU tolaasin. (B) T₅₀ vs. pH. T₅₀, time for 50% hemolysis, was measured from the data shown in A.

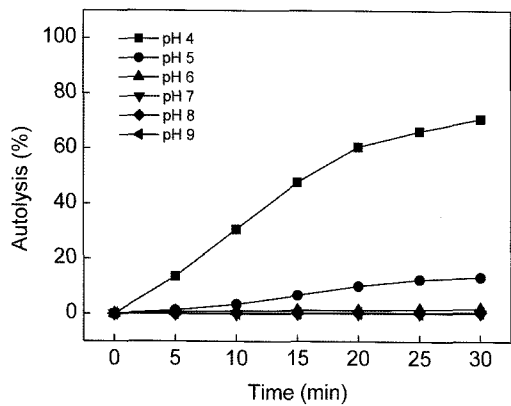


Fig. 3. Effect of pH on the stability of erythrocytes. To measure the stability of erythrocytes, cells were incubated at various pHs and hemolysis was measured without tolaasin.

용혈현상이 나타나는 것이 확인되었다. 이와 반대로 알칼리성 조건에서는 적혈구의 안정성이 높게 나타났다. 따라서, 적혈구가 불안정한 조건인 pH 4와 5의 결과를 제외하면, Fig. 2B에서 tolaasin의 용혈활성은 pH 7에서 보다 반응원충액의 pH가 높아질수록 증가하는 것으로 확인되었다. 알칼리 조건에서 tolaasin의 용혈활성이 증가하는 것은 tolaasin의 양전하 감소와 이에 따른 펩티드 분자의 극성감소로 세포막과 결합이 촉진되어 나타나는 것으로 판단된다.

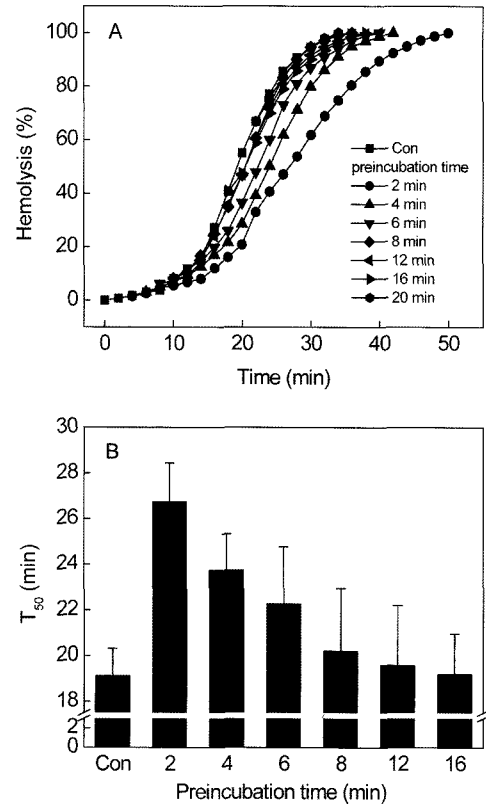


Fig. 4. Time-dependence of tolaasin binding. (A) Erythrocytes were incubated with tolaasin at pH 7 and 37°C, and cells were harvested by centrifugation at the indicated time. Cells were resuspended with fresh buffer and hemolyses were measured. (B) T₅₀ vs. preincubation time. T₅₀ was measured from the data shown in A.

Tolaasin의 막결합 특성. pH 변화에 따른 tolaasin의 막결합 특성을 조사하기 위하여 먼저, pH 7에서 tolaasin의 시간에 따른 막결합 및 이에 따른 용혈활성을 측정하였다(Fig. 4). 적혈구 세포막에 tolaasin의 막결합을 유도하기 위하여 적혈구를 tolaasin과 함께 일정시간 사전배양한 후 원심분리하여 적혈구를 회수하였다. 회수한 적혈구는 tolaasin이 없는 새로운 완충액에 재현탁하여 용혈시간을 관측하였다. 이때, 용혈활성은 사전배양 동안에 결합한 tolaasin의 양에 좌우되며, 사전배양 시간이 길수록 더 많은 tolaasin이 결합하여 T₅₀은 짧아졌다. 이것은 tolaasin이 적혈구 막에 한꺼번에 결합하기 보다는, 시간에 따라 결합량이 누적되고 일정량 이상의 tolaasin이 이온통로를 형성하면 삼투압 변화로 세포가 파괴되는 용혈이 유발함을 보여준다. Fig. 4의 결과에서 나타낸 것처럼, T₅₀은 사전 배양시간이 16분 이상이면 거의 대조실험과 가까워져, 이 시간동안 용혈에 충분한 양의 tolaasin이 결합함을 알 수 있었다. 그리고, 사전배양 시간을 2분으로 단축하면 소량의 tolaasin만이 결합하여 적혈구를 용혈시키는 시간은 길어짐을 확인하였다.

동일한 실험을 pH 8과 9에서 수행하여 pH에 따른 T₅₀을 측정하였다. Fig. 5의 결과에서와 같이 적혈구의 용혈은 pH가 높아질수록 빨라져서 T₅₀은 감소하였다. 사전배양 시간이 8분일 때, pH 7과 8, 9에서 T₅₀은 각각 20.2±2.7분과 13.6±0.6분, 9.9±0.7분으로 측정되었다. 반응용액의 pH가 높아질수록 T₅₀이

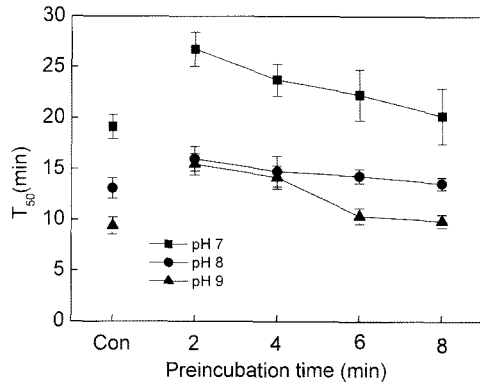


Fig. 5. Effects of preincubation on T_{50} at various pHs. T_{50} s were measured at pHs 7, 8 and 9 after preincubations of the indicated periods.

빨라지는 것은 사전배양 시간 동안에 높은 pH에서 더 많은 tolaasin 분자가 적혈구 세포막에 결합하였기 때문이다. 이것은 알칼리성 조건에서 tolaasin 분자내 amine기의 양전하 하전량이 감소함에 따라 tolaasin의 막결합이 증가함을 보여준다.

고 찰

*P. tolaasii*에 의해 생성된 tolaasin 분자는 N-말단에 지방산 결합과 C-말단 근처에 양전하를 띠는 두 개의 amine기를 가지고 있어, 분자내에 극성과 비극성 부분을 동시에 갖는 양친매성 펩티드이다. 따라서, 용액의 pH 변화에 의해 tolaasin 분자의 전하 상태가 달라질 수 있으며, 전하량에 따라 펩티드의 막결합 특성이 달라질 수 있다. 실제 측정된 tolaasin의 용혈활성은 중성에서보다 염기성에서 증가함을 보여, tolaasin의 작용이 pH 의존적임을 확인하였다(Fig. 2). 이것은 tolaasin이 pH 변화에 따라 분자내 양전하량이 달라질 가능성을 보여주는 것으로, 실제 tolaasin 펩티드의 적정실험에서도 pH 7-9 범위에서 적정이 일어남을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 tolaasin이 중성에서 보다 염기성에서 amine기의 양전하 감소와 이에 따른 세포막 결합력 증가로 용혈활성이 커짐을 의미한다.

한편, 산성조건에서도 적혈구의 용혈은 월등히 증가하였으나, 이 조건에서는 적혈구 자체가 매우 불안정하여, 자발적으로 용혈이 일어남을 확인하였다. 따라서 용액의 pH 4-5 범위에서의 용혈활성 촉진효과는 tolaasin의 세포독성보다 적혈구의 불안정성에 기인하는 것으로 판단하였으며, 이 조건에서 tolaasin의 독성 증가여부는 측정할 수 없었다(Fig. 3). 적혈구 세포의 생리적 특성은 세포 내부 및 외부의 pH와 Cl^- 의 농도 등에 의하여 변화한다고 알려져 있다.¹⁸⁻²⁰⁾ 적혈구는 외부의 pH가 낮아지면 세포 내부로 H^+ 과 Cl^- , 물 분자가 유입되어 삼투압 증가로 세포가 팽창함이 알려져 있다.²¹⁾ 따라서, 본 연구에서 확인한 것과 마찬가지로 산성에서 적혈구가 불안정한 것은 pH가 낮아짐에 따라 세포 안쪽으로 H^+ 과 Cl^- , 물이 유입되고 세포가 팽창하여 불안정해지기 때문일 것이다. 이러한 조건에서 tolaasin의 용혈활성은 대단히 크게 나타날 수 있을 것이다.

세포막에 결합하는 tolaasin의 양은 시간에 따라 누적된다(Fig.

4). 특히, 염기성 조건에서는 tolaasin의 양전하 감소로 막 결합량이 증가하여 용혈활성이 커짐을 알 수 있었다. Shai 등²²⁾은 펩티드 독소인 pardaxin의 pH 의존성에서 펩티드의 극성이 pH 변화에 따라 달라진다는 결과를 보고하였다. Pardaxin은 C-말단에 두 개의 carboxyl기를 갖고, N-말단에 3개의 amine기를 갖고 있다. Pardaxin과 그 이성체들은 pH 7에서 amine기의 일부가 전하를 갖지 않은 상태가 되기 때문에 N-말단 부위의 소수성이 증가하는 동시에, C-말단의 carboxyl기는 음전하를 띠게 되어 C-말단 부위의 친수성은 더욱 증가하였다. 한편, 산성 조건에서는 amine기의 양전하가 증가하고 carboxyl기의 음전하가 감소하여 분자내 친수성과 소수성 부위가 반대로 되었다. 이와 같이 tolaasin 분자도 C-말단에 두 개의 amine기를 갖고 있기 때문에, 산성에서는 tolaasin의 양전하 증가로 세포막 결합이 억제되고, 염기성에서는 양전하의 감소로 막 결합이 촉진됨을 확인하였다.

초 록

*Pseudomonas tolaasii*에 의해서 분비되는 펩티드 독소인 tolaasin은 재배버섯에 세균성 갈반병을 유발한다. Tolaasin의 독성은 적혈구를 파괴하는 용혈활성으로 평가된다. Tolaasin 펩티드는 C-말단부위에 두 개의 amine기를 갖고있어, 이 펩티드의 세포막 결합은 amine기의 전하상태에 따라 다를 수 있다. 이것을 확인하기 위하여 tolaasin을 적정하였을 때, 적정곡선은 pH 7.0에서 9.6 사이에서 적정이 되는 amine기가 있음을 보였다. Tolaasin에 의한 용혈활성의 pH 의존성을 조사하였을 때, 용혈활성은 알칼리 조건에서 증가함을 확인하였다. 따라서, pH 변화에 따른 tolaasin의 막결합 특성을 조사하기 위하여 적혈구를 tolaasin과 사전배양한 후, tolaasin을 포함하지 않은 완충액으로 씻어내고, 사전배양중 적혈구에 결합한 tolaasin의 용혈활성을 측정하였을 때, 활성은 pH 8 이상에서 크게 증가하였다. 이러한 결과는 tolaasin이 전하가 없거나 양전하량이 적은 상태에서 세포막에 잘 결합하여 세포독성이 커진다는 것을 의미한다.

Key words: hemolysis, pore-forming toxin, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin

감사의 글

이 논문은 2006년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Kim, J. W., Kim, K. H. and Kang, H. J. (1994) Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea: I. On the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**, 197-210.
- Jin, K. S., Kim, J. J., Jeon, C. S. and Lee, E. J. (1994) Characteristical differentiation on isolation and identification of

- mushroom bacterial brown blotch pathogens *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas agarici*. *RDA. J. Agri. Sci.* **36**, 343-348.
3. Kim, J. W., Kwon, S. I. and Kang, H. J. (1995) Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial diseases of cultivated mushrooms in Korea: 2. Bacteriological characteristics of *P. tolaasii* causing mushroom brown blotch and white line reacting organism. *Kor. J. Plant Pathol.* **11**, 353-360.
 4. Wong, W. C. and Preece, T. F. (1985) *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops effect of sodium hypochloride on the bacterium and on blotch disease severity. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 259-267.
 5. Geels, F. P., van Griensven, L. D. and Rutjens, A. J. (1991) Chlorine dioxide and the control of bacterial blotch on mushrooms, caused by *Pseudomonas tolaasii*. In *Science and Cultivation of Edible Fungi* (Maher, ed.) Vol. 1, p. 437-442, Balkema Pub., Rotterdam, Netherlands.
 6. Guillaumes, J., Houdeau, G., Germain, R. and Oliver, J. M. (1998) Amelioration de la lutte biologique contre *Pseudomonas tolaasii* utilisation de bacteriophages. *Bull. OEPP/EPPO* **18**, 77-82.
 7. Munsch, P., Oliver, J. M. and Houdeau, G. (1991) Experimental control of bacterial blotch by bacteriophages. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*, (Maher ed.,) Vol. 1., p. 389-396, Balkema Pub., Rotterdam, Netherlands.
 8. Geels, F. P. (1995) *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 38-42.
 9. Tolaas, A. G. (1915) A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathol.* **5**, 51-54.
 10. Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone, K. and Williams, D. H. (1991) Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2621-2627.
 11. Brodey, C. L., Rainey, P. B., Tester, M. and Johnstone, K. (1991) Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 407-411.
 12. Cho, K. H. and Kim, Y. K. (2003) Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**, 221-226.
 13. Cho, K. H., Park, K. S. and Kim, Y. K. (2000) Hemolytic properties of tolaasin causing the brown blotch disease on oyster mushroom. *J. Kor. Soc. Agricul. Chem. Biotechnol.* **43**, 190-195.
 14. Lee, H. I., Lee, S. D., Park, K. S., Kim, Y. K. and Cha, J. S. (1997) Pathogenicity of bacterial isolates from brown blotch-diseased oyster mushrooms in Chungcheungbuk-do. *J. Agr. Sci., Chungbuk Nat'l Univ.* **14**, 121-132.
 15. Tsuneda, A., Suyama, K., Murakami, S. and Ohira, I. (1995) Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. *Mycosci.* **36**, 283-288.
 16. Cho, K. H., Kim, S. T. and Kim, Y. K. (2007) Purification of a pore-forming toxin, tolaasin, produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 113-118.
 17. Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. (1991) Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 57-70.
 18. Bernheimer, A. W. and Rudy, B. (1986) Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 123-141.
 19. Jacobs, M. H. and Stewart, D. R. (1947) Osmotic properties of the erythrocyte. XII. ionic and osmotic equilibria with a complex external solution. *J. Cell. Comp. Physiol.* **30**, 79-103.
 20. Freedman, J. C. and Hoffman, J. F. (1979) Ionic and osmotic equilibria of human red blood cells treated with nystatin. *J. Gen. Physiol.* **74**, 157-185.
 21. Glaser, R. and Donath, J. (1984) Stationary ionic states in human red blood cells. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **13**, 71-83.
 22. Shai, Y., Hadari, Y. R. and Finkels, A. (1991) pH-dependent pore formation properties of pardaxin analogues. *J. Biol. Chem.* **266**, 22346-22354.