

## 항균성 펩타이드인 magainin 2의 활성에 대한 고체 핵자기 공명 분광 연구

김 철★

한남대학교 화학과

(2011. 12. 5. 접수, 2011. 12. 8. 수정, 2011. 12. 8. 승인)

### A solid-state NMR study on the activity of an antimicrobial peptide, magainin 2

Chul Kim★

Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon, 305-811, Korea

(Received December 5, 2011; Revised December 8, 2011; Accepted December 8, 2011)

**요 약:** 얇은 유리판 위에 정렬된 지질 이중막에 작용하는 항균성 펩타이드 magainin 2의 작용활성을 고체 핵자기 공명 분광법을 이용하여 조사하였다. 수화에 따른 지질 이중막의 파괴정도를 파악하기 위해 두 가지 수화 상태에서 실험이 이루어졌다. 95%의 상대 습도에서 수화된 지질 이중막에서는 약 15% 정도의 지질 이중막이 파괴되었으며, 완전히 수화된 지질 이중막에서는 약 20% 정도의 지질 이중막이 파괴되었다. 두 가지 시료 제조방법에 따른 지질 이중막 파괴 정도의 비교를 통해, 항균성 펩타이드의 지질 이중막 결합과정이 지질 이중막 파괴에 중요한 변수임을 알 수 있었다.

**Abstract:** The activity of an antimicrobial peptide, magainin 2, on lipid membranes was investigated using solid-state NMR and a new sampling method that employed mechanically aligned bilayers between thin glass plates. The experiments were performed at two hydration levels. At 95% hydration about 15% of the lipid bilayers were disrupted and at full hydration 20% were disrupted. From the comparison of two equilibrium states established by two sampling methods the importance of peptide binding to the lipid bilayer for whole membrane disruption was demonstrated.

**Key words:** antimicrobial peptide, lipid bilayer, hydration, solid-state NMR

### 1. 서 론

생물체 내에서 면역 기능을 나타내는 항균성 펩타이드는 18개에서 50 개까지의 아미노산으로 이루어진

자그마한 고분자로써 균류, 나방, 양서류, 그리고 돼지 등의 다양한 생물 종에서 발견되고 있고<sup>1-3</sup> 이것들의 활성을 설명하는 반응 메커니즘에 대한 많은 연구들이 지금까지 진행되어오고 있다.<sup>4,7</sup> 이 펩타이드들은

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-629-8875 Fax : +82-(0)42-629-8811

E-mail : chulkim@hnu.kr

특정 수용 단백질의 도움 없이 생체 지질막에 직접 결합하여 세포막을 파괴시키는 작용을 하는 것이 그 특징인데<sup>8</sup> 이들의 반응성은 지질과의 화학적 상호작용에 영향을 주는 펩타이드의 2차원 구조( $\alpha$ -helix 또는  $\beta$ -sheet),<sup>9</sup> 펩타이드의 농도 및 표면 전하 밀도,<sup>9</sup> 지질막의 표면전하,<sup>10</sup> 지질의 종류<sup>11</sup> 등에 의해 좌우된다. 또한 지질막의 질서적인 정렬도에 의해서도 영향을 받는데, 일반적으로 질서 정연한(liquid-ordered) 지질막에서보다 무질서한(liquid-disordered) 지질막에서 항균성 펩타이드가 더 잘 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>12</sup> 이러한 다양한 변수들의 효과는 형광 분광법(Fluorescence),<sup>13,14</sup> 원편광 이색성 분광법(CD),<sup>14,15</sup> 그리고 핵자기 공명 분광법(NMR)<sup>16</sup> 등과 같은 여러 분광법에 의해 연구되어 오고 있다.

NMR 연구의 경우, 우선 액체 NMR을 이용한 연구에서는 용액 중에 지질들로 이루어진 미셀 (micelle) 또는 소포(vesicle) 등을 만들고, 여기에 항균성 펩타이드를 작용시키는 방법을 이용하는데 용액 중 지질 이중막의 변화에 대해 여러 핵종의 NMR 스펙트럼을 측정함으로써 그 반응 메커니즘을 파악하는 것이다. 또한 액체 NMR과 함께 고체 NMR을 이용하여서도 많은 연구가 진행되고 있는데 주로 항균성 펩타이드와 지질막의 상호작용 시 지질막에 대한 펩타이드의 배향 및 지질 분자들의 공간적 배향에 대한 연구가 이루어지고 있다.<sup>17-19</sup> 이러한 고체 NMR 연구의 경우, 대부분에서는 펩타이드와 지질을 유기용매에 균일하게 섞은 시료를 얇은 유리판에 떨어뜨리고 수화시킨 후, 지질 이중막의 정렬도를 다양한 핵종의 스펙트럼으로 확인해오고 있다.<sup>20,21</sup> 하지만, 이렇게 펩타이드와 지질 분자를 처음부터 균일하게 혼합한 시료에서는 항균성 펩타이드가 생체막에 접근하고 결합하는 중간 과정에 대한 정보를 얻을 수 없게 된다. 저자 등은 이러한 중간과정에 대한 정보를 얻고자 새로운 실험방법을 다른 논문에서 제시한 바 있다.<sup>22</sup> 즉, 새로운 시료 제조 방법에서는 하나의 유리판에 잘 정렬된 지질 이중막을 만들고 다른 유리판에는 항균성 펩타이드를 올려 놓은 다음, 두 유리판을 겹쳐서 항균성 펩타이드가 지질 이중막에 작용하게 한다. 그런 후 작용 시간에 따라 지질 이중막의 정렬도가 파괴되는 과정을 지질 분자의 <sup>31</sup>P 고체 NMR 스펙트럼을 측정함으로써 파악한다. 이런 과정을 통해 그 논문에서 저자 등은 펩타이드와 지질을 균일하게 섞어주는 기존방식의 시료와 지질 이중막을 먼저 만들고 거기에 펩타이드가 작용하도록 하는 새로운 방식의 시료에 있어서 최종

적으로 얻어지는 펩타이드-지질 상의 평형상태가 다르다는 것을 보여주었다.<sup>22</sup>

본 연구에서는 23개의 아미노산으로 이루어진 항균성 펩타이드 magainin 2 (GIGKFLHSAKKFGKAFVGV-EIMNS)의<sup>6</sup> 지질 이중막 파괴과정을 새로이 제시된 방법에 의하여 고찰하였다.  $\beta$ -hairpin 구조를 가지고 있는 protegrin-1과 달리 magainin 2는  $\alpha$ -helix 구조를 갖고 있어서 지질 이중막에 대한 반응성이 다를 것으로 예상된다. 펩타이드가 낮은 농도일 때는 magainin 2의  $\alpha$ -나선형 기둥이 지질막 표면에 평행하게 결합하면서 지질막을 얇게 만드는 작용을 하지만,<sup>23,24</sup> 임계농도 이상의 높은 농도에서는 magainin 2의  $\alpha$ -나선형 기둥이 지질막에 수직 방향으로 결합하면서 지질막을 통과하는 기공을 만드는 것으로 알려져 있다.<sup>8,24</sup>

## 2. 실험

### 2.1. 시약

지질 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC)는 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였으며, 항균성 펩타이드 magainin 2는 GL Biochem (Shanghai, China)으로부터 구입하여 추가 정제과정 없이 사용하였다. Trifluoroethanol (TFE), chloroform, 그리고 sodium phosphate dibasic 등은 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 고체 NMR 스펙트럼 측정을 위한 시료를 제조하기 위하여 가로와 세로의 길이가 각각 10 mm인 얇은 유리판을 Marienfeld Laboratory Glassware (Bad Mergentheim, Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 시료 제조

잘 정렬된 지질 이중막이 항균성 펩타이드에 의해서 파괴되는 과정을 고체 NMR로 측정하기 위해서, 얇은 유리판에 POPC 지질 이중막을 형성시켰다.<sup>25</sup> 이를 위해 먼저 4.8 mg POPC 지질을 TFE/chloroform (2:1, v/v) 용액에 녹인 후 이 용액을 얇은 유리판에 떨어뜨린 다음, 공기 중에서 수시간 건조시킨 후, 남아 있는 극미량의 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 진공 상태에서 밤새 건조시킨다. 잘 건조된 시료에 약 2  $\mu$ L의 물을 직접 첨가하여 수화시킨 다음, sodium phosphate dibasic으로 포화된 용액이 들어있는 건조기에서 약 2일 동안 방치해둔다.<sup>26,27</sup> 이 과정에 따라 유리판 표면에 있는 지질들이 약 95%의 상대습

도로 수화됨으로써, 잘 정렬된 2000개 이상의 이중막 층을 형성하게 된다.

동시에 POPC 지질의 1/20에 해당하는 magainin 2를 TFE/chloroform (2:1) 용액에 녹인 후 새로운 유리판에 떨어뜨린 다음, 지질막을 형성시키는 방법과 같은 과정을 통하여 시료를 제조한다. 이상의 과정을 거쳐 제조된 지질막으로 도포된 유리판과 펩타이드로 도포된 유리판을 겹쳐서 펩타이드가 지질 이중막에 작용하게 한 다음, 제조된 유리판 시료 10개 정도를 포개어 준다. 포개어진 유리판을 Parafilm으로 싸고, polyethylene으로 밀봉하여, NMR 스펙트럼을 측정하는 동안 시료가 마르지 않도록 한다.  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 측정을 계속하여 스펙트럼이 더 이상 변하지 않게 되었을 때, 시료를 꺼낸 후, 충분한 양의 물을 시료에 첨가하였다. 물이 첨가된 시료를 분광기에 넣고  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼을 다시 측정하였다.

### 2.3. 고체 핵자기 공명 분광법

$^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼은 Bruker MSI-300 분광기를 이용하여 측정하였다.  $^{31}\text{P}$  스펙트럼의 화학 이동값 (chemical shift)의 기준은 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  수용액으로부터 나오는 신호를 0 ppm으로 정하였다.  $^{31}\text{P}$ 의  $90^\circ$  펄스 길이는 5  $\mu\text{s}$ 이고, 수소핵과의 상호작용을 없애기 위해 사용한 수소핵의 rf 자기장의 세기는 45 kHz이었다. 스펙트럼의 폭은 17.86 kHz이었고, 2000번의 반복 측정을 통하여 스펙트럼을 얻었다. 고체 NMR 스펙트럼의 측정온도는 25  $^\circ\text{C}$ 이었다.

## 3. 이론적 고찰

고체 NMR 스펙트럼은 액체 NMR 스펙트럼과 달리 한 분자의 외부 자기장에 대한 핵스핀 신호가, 분자의 배향에 따라 주파수 차이를 보여준다. 그것은 분자의 배향에 따라 각 핵스핀이 경험하는 외부자기장의 세기가 달라지기 때문이며, 이는 핵스핀 주위의 전자분포가 구형대칭을 가지고 있지 않기 때문에 나타나는 현상이다. POPC 지질의 경우  $^{31}\text{P}$ 를 포함하고 있는데, 지질 분자가 외부자기장에 대하여 어떠한 배향적 분포를 나타내느냐에 따라 고체 NMR 스펙트럼의 모양이 달라지게 된다. 유리판에 한 방향으로 잘 정렬된 지질분자의 경우 30 ppm 근처에서 단 하나의 신호로 보이지만, 지질분자의 정렬이 깨져 다양한 배향을 가지게 되면 30 ppm에서 -15 ppm 사이에 넓은 신호가 검출된다. 따라서 항균성 펩타이드에 의해 생

긴 지질 이중막의 다양한 구조에 의해 여러 가지 모양의 고체 NMR 스펙트럼이 관찰될 수 있다.<sup>21</sup> 본 연구에서는 펩타이드에 의해 만들어진 지질 이중막 구조에 대한 정밀한 분석 없이, 지질 이중막의 파괴 정도만을 파악하는 것으로 항균성 펩타이드의 작용 활성에 대해 알아보려고 한다.

## 4. 결과 및 고찰

### 4.1. 불균일하게 혼합된 시료에서 항균성 펩타이드에 의한 지질 이중막의 파괴

항균성 펩타이드와 지질분자를 처음부터 균일하게 혼합하는 기존의 시료 제조 방법과는 달리, 지질 이중막과 펩타이드를 따로 분리해서 각각의 유리판에 도포한 후, 두 유리판을 겹쳐서 화학 반응을 일으키는 시료 제조 방법의 파괴과정을 살펴보자. Fig. 1에서 보여주는 바와 같이, 얇은 유리판에 잘 정렬된 지질 이중막 층들은 시간이 지남에 따라 펩타이드에 의하여 파괴되기 시작한다. 첫번째 지질 이중막에 작용한 펩타이드에 의해 지질 이중막이 파괴되고, 펩타이드가 파괴된 지질 이중막을 통과하여 다음 지질 이중막 표면에 쌓이게 된다. 펩타이드의 농도가 지질 이중막을 파괴할 수 있는 생물학적 임계농도에 이르게 되면, 두번째 지질 이중막도 파괴될 것이다. 이러한 파괴에 의해 펩타이드-지질 혼합상이 점점 증가하게 되고, 이어지는 지질 이중막을 파괴하는데 참여할 수 있는 자유로운 펩타이드의 농도가 감소하게 된다. 지질 이중막 표면에 쌓이는 펩타이드의 농도가 생물학적 임계 농도를 넘지 못하면 지질 이중막의 파괴는 멈출 것이다. 최종적으로 도달한 평형 상태의 상으로부터 얻어지는  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼을 통해 파괴된 지질 이중막의 함량을 파악할 수 있다. 이 방법은 시간에 따라 지질 이중막 층들이 파괴되어져 가는 과정을 파악할 수 있다는 장점이 있다. 반면에, 기존의 균일 혼합 방식은 이러한 과정을 파악할 수 없고 최종적인 평형 상태만을 파악할 수 있다.

### 4.2. Magainin 2에 의한 POPC 이중막의 파괴

Fig. 2는 95% 상대 습도에서 수화된 지질 이중막에 대하여 magainin 2가 작용하는 경우, 지질 이중막의 파괴 과정을 나타내는  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼이다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 지질 이중막의 파괴는 10분 이하의 짧은 시간에 이루어지며 그 이후에는 큰 변화가 없었다. 파괴된 지질 이중막을 정량화하기 위해 시

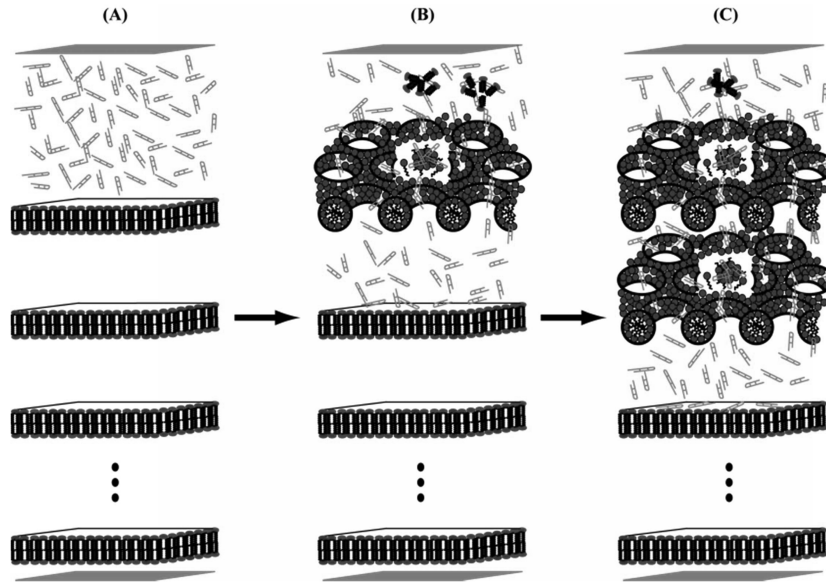


Fig. 1. The reaction procedure. (A) Initial, (B) intermediate, and (C) final stages after placing a peptide-containing glass plate on a lipid-containing glass plate. Black rods and gray hairpin-like objects represent the lipids and the antimicrobial peptides, respectively.

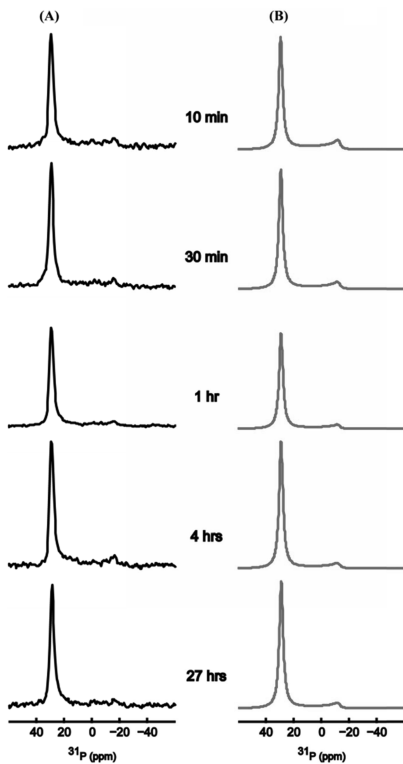


Fig. 2. (A) Experimental and (B) simulated  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectra of POPC multi-bilayers distorted by magainin 2. The samples were hydrated at 95% relative humidity.

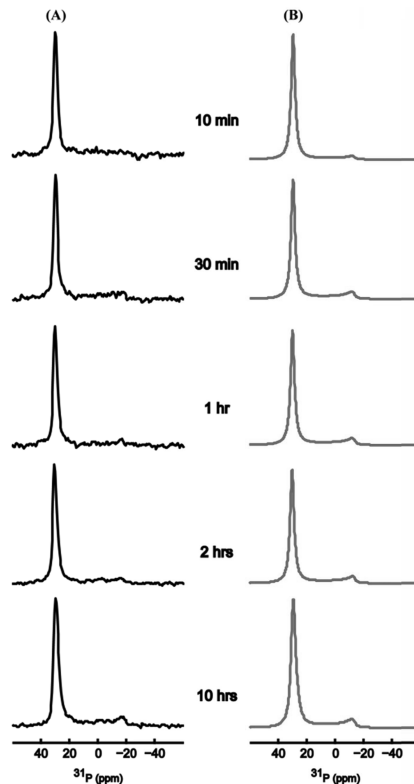


Fig. 3. (A) Experimental and (B) simulated  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectra of POPC multi-bilayers distorted by magainin 2. The samples were fully hydrated.

Table 1. Percentages of POPC phases distorted by a magainin 2

Hydration	Phases	10 min	30 min	1 hour	4 hours	27 hours
95% humidity	Bilayer	75	80	85	85	85
	Distorted	25	20	15	15	15
Hydration	Phases	10 minutes	30 minutes	1 hour	2 hours	10 hours
Full hydration	Bilayer	90	80	80	80	80
	Distorted	10	20	20	20	20

료 중의 물질 상을 정렬된 이중막 상과 파괴되어 등방성 분포를 가지는 펩타이드-지질 혼합상으로 가정하여  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼을 모사하였다. 얻어진 두 종류의 상에 존재하는 지질분자의 백분율이 Table 1에 나와 있다. 펩타이드와의 결합으로 인해 전체 지질 분자 중의 15% 만이 최종적으로 파괴된 것을 이용하여 지질 이중막 파괴를 위한 펩타이드/지질 비율은 약 1/3 임을 계산하였다. 이 값은 처음 사용된 펩타이드/지질 비율이 1/20임과 시료 상의 거의 모든 펩타이드가 파괴된 지질분자와의 결합에 참여하였다고 하는 가정으로부터 얻어진 것이다.

Fig. 3은 얇은 유리판 위에 잘 정렬된 지질 이중막에 물을 첨가하여 지질 이중막을 완전히 수화한 후 얻어진  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼이다. 95% 상대습도에서 수화된 지질 이중막의 파괴정도와 큰 차이는 없으나 좀 더 많은 지질 이중막이 파괴된 것임을 모사된 스펙트럼을 통해 알 수 있었다(Table 1). Fig. 2에서 보이는 스펙트럼과 Fig. 3의 스펙트럼을 비교해 보면, Fig. 3의 마지막 스펙트럼은 20 ppm과 -15 ppm 사이의 영역에서 좀 더 큰 신호의 세기를 보여주고 있음을 알 수 있다. 스펙트럼의 모사를 통해 얻어진 결과는 충분히 수화된 지질 이중막의 경우 파괴된 펩타이드-지질 혼합상의 펩타이드/지질 비율이 1/4임을 말해준다. 이는 지질 이중막이 물에 충분히 수화됨으로써 지질 이중막을 파괴하는데 적은 농도의 펩타이드가 필요함을 의미한다.

Protegrin-1의 활성을 보고한 이전 논문에서는 수화 정도가 미치는 protegrin-1의 활성 정도의 차이는 매우 크다는 것을 보여주었다.<sup>22</sup> 하지만, magainin 2의 경우에 있어서는 그 차이가 크지 않았다. 이는 펩타이드의 구조 및 화학적 특성의 차이에 따라 지질 이중막 파괴에 수화가 미치는 영향의 크기가 달라짐을 의미한다.

#### 4.3. 두 종류의 시료에 있어서 magainin 2의 활성 비교

항균성 펩타이드인 protegrin-1에서 살펴보았듯이 항

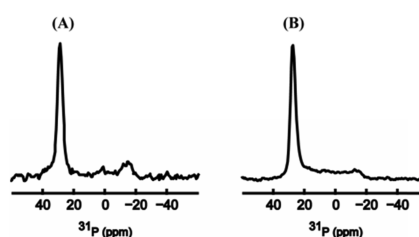


Fig. 4. Comparison of  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectra of POPC multi-bilayers distorted by magainin 2. (A) The heterogeneously mixed sample and (B) the homogeneously mixed sample.

균성 펩타이드의 활성 및 그 반응 메커니즘을 탐구하는데 있어서, 시료의 제조 방법은 큰 차이를 준다. Magainin 2에 있어서도 그 차이를 확인하였다. Fig. 4는 불균일하게 혼합된 시료 (A)와 균일하게 혼합된 시료 (B)가 각각 평형상태에 이르렀을 때, 시료 중의 지질 분자가 보여주는  $^{31}\text{P}$  고체 NMR 스펙트럼이다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 균일하게 혼합된 시료의 경우 20 ppm에서 -15 ppm 사이의 신호 세기가 불균일하게 혼합된 시료의 경우보다 강하다. 이들 신호는 유리판에 수직방향으로 정렬되지 못한 지질 분자로부터 나온 것들이다. 불균일하게 혼합된 시료에서는 약 20%의 지질 이중막이 파괴된 반면, 균일하게 혼합된 시료에서는 약 30% 가량의 지질 이중막이 파괴되었음을 확인하였다. 앞에서 언급하였듯이 magainin 2는 지질 이중막을 얇아지게 하거나, 지질막에 작은 구멍을 만들어낸다. 20 ppm에서 -15 ppm 사이의 신호는 작은 구멍을 이루는 지질로부터 얻어지는 것들이다.

저자 등에 의해서 규명되었듯이 지질 이중막을 얇게 만들어서 생기는 구조로부터 얻어지는 스펙트럼은 그 신호의 폭이 줄어들게 된다.<sup>21</sup> 스펙트럼의 폭이 줄어든 효과는 27 ppm 근처에서 얻어지는 강한 신호의 화학 이동값이 작아지는 것으로 확인될 수 있다. 얇아진 지질 이중막의 두께가 작아질수록 화학 이동값은 더욱 작아지게 된다. 두 종류의 시료에 대한 화학 이동값을 비교한 결과 (A) 시료의 경우 27.5 ppm이었고,

(B) 시료의 경우 26.2 ppm이었다. 이는 펩타이드와 지질을 균일하게 혼합하여 제조한 시료의 경우 magainin 2가 POPC 이중막을 좀 더 얇게 만든다는 것을 알 수 있었다.

Protegrin-1의 경우에 살펴보았듯이, 이러한 차이는 항균성 펩타이드가 지질막의 표면에 접촉하여 결합하는 과정이 중요하다는 것을 의미한다. 균일하게 혼합된 시료의 경우에는 잘 정렬된 지질 이중막에 대한 결합과정이 생략된 반면, 불균일하게 혼합된 경우에는 지질 이중막의 파괴가 펩타이드와 지질 분자의 결합과정을 통해서 이루어지기 때문이다.

### 5. 결 론

항균성 펩타이드의 작용활성을 파악하는데 있어서, 두 종류의 시료 제조 방법이 뚜렷한 차이가 있음을 <sup>31</sup>P 고체 NMR 스펙트럼을 통하여 조사하였다. 불균일하게 혼합된 시료의 경우 magainin 2에 의한 지질 이중막의 파괴가 균일하게 혼합된 시료에 비해 적어짐을 확인하였다. 이러한 사실은 magainin 2가 지질 이중막을 파괴할 때, 지질 이중막과 결합하는 중간과정이 중요하다는 것을 의미한다고 생각된다. 또한 시료 제조의 차이와 함께 수분의 함량에 따른 작용 활성도 측정하였고, 그 결과 지질 이중막의 수분 함량이 많아짐에 따라 magainin 2에 의한 지질 이중막 파괴 정도가 크게 됨을 확인하였다. 이러한 다양한 지질 이중막과 다양한 항균성 펩타이드에 대한 실험을 통하여 항균성 펩타이드에 의한 지질 이중막 파괴의 영향 인자들을 정량화하는 연구는 앞으로도 계속 될 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 2011년도 한남대학교 교비 학술 연구 조성비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. R. Latorre and O. Alvarez, *Physiol. Rev.*, **61**, 77-150 (1981).
2. H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, H. G. Boman, *Nature*, **292**, 246-248 (1981).
3. J. Y. Lee, A. Boman, C. X. Sun, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt and H. G. Boman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 9159-9162 (1989).

4. K. J. Hallock, D. K. Lee and A. Ramamoorthy, *Biophys. J.*, **84**, 3052-3060 (2003).
5. P. M Hwang and H. J. Vogel, *Biochem. Cell Biol.*, **76**, 235-246 (1998).
6. M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5449-5453 (1987).
7. J. J. Buffy, A. J. Waring and M. Hong, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4477-4483 (2005).
8. M. R. Yeaman and N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.*, **55**, 27-55 (2003).
9. R. Mani, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1716**, 11-18 (2005).
10. Y. Bai, S. Liu, P. Jiang, L. Zhou, J. Li, C. Tang, C. Verma, Y. Mu, R. W. Beuerman and K. Pervushin, *Biochemistry*, **48**, 7229-7239 (2009).
11. O. Toke, *Biopolymers*, **80**, 717-735 (2005).
12. A. Pokorny and P. F. F. Almeida, *Biochemistry*, **44**, 9538-9544 (2005).
13. K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii and K. Miyajima, *Biochemistry*, **34**, 6521-6526 (1995).
14. K. Matsuzaki, K.-I. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima and R. M. Eppard, *Biochemistry* **37**, 11856-11863 (1998).
15. Y. Herasimenka, M. Benincasa, M. Mattiuzzo, P. Cescutti, R. Gennaro and R. Rizzo, *Peptides*, **26**, 1127-1132 (2005).
16. J.-A. Richard, I. Kelly, D. Marion, M. Pezolet and M. Auger, *Biophys. J.*, **83**, 2074-2083 (2002).
17. S. Yamaguchi, T. Hong, A. Waring, R. I. Lehrer, M. Hong, *Biochemistry*, **41**, 9852-9862 (2002).
18. B. Bechinger, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1712**, 101-108 (2005).
19. R. Mani, M. Tang, X. Wu, J. J. Buffy, A. J. Waring, M. A. Sherman and M. Hong, *Biochemistry*, **45**, 8341-8349 (2006).
20. J. J. Buffy, M. J. McCormick, S. Wi, A. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry*, **43**, 9800-9812 (2004).
21. S. Wi and C. Kim, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 11402-11414 (2008).
22. C. Kim and S. Wi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, in press, (2012).
23. K. Matsuzaki, O. Murase and K. Miyajima, *Biochemistry*, **34**, 12553-12559 (1995).

24. S. J. Ludtke, K. He, Y. Wu and H. W. Huang, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1190**, 181-184 (1994).
25. R. Mani, J. J. Buffy, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry*, **43**, 13839-13848 (2004).
26. K. J. Hallock, D.-K. Lee, J. Omnaas, H. I. Mosberg and A. Ramamoorthy, *Biophys. J.*, **83**, 1004-1013 (2002).
27. E. W. Washburn, C. J. West and C. Hull, *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry, and Technology*; McGraw-Hill: New York, 1926.