Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 26, No. 1, 61-66, 2013
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2013.26.1.061

A ^{2}H solid-state NMR study on the lipid phase change in the presence of an antimicrobial peptide

Hyung Geun Choi and Chul Kim★

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

(Received January 16, 2013; Revised February 5, 2013; Accepted February 5, 2013)

항균성 펩타이드와 혼합된 인지질 분자의 상 변화에 대한 고체 중수소 핵자기 공명 연구

최형근 · 김 철★

한남대학교 화학과

(2013. 1. 16. 접수, 2013. 2. 5. 수정, 2013. 2. 5. 승인)

Abstract: The activity of an antimicrobial peptide, protegrin-1, on the well-aligned lipid bilayer deposited on a thin coverglass plate was investigated by ^{2}H solid-state NMR spectroscopy. Orientational distribution and molecular motion in the lipid bilayer were determined from ^{2}H solid-state NMR spectrum. Reorientational motion of lipid molecules in the vacuum-dried state was found to be small but their orientational distribution was not able to be determined. As storage times were longer, the order of the alignment of lipid molecules in the lipid bilayer and percentages involved in the toroidal pore structures increased. We found that much longer time is required to get the equilibrium state of the peptide-lipid mixture under our experimental condition for investigating the action of the antimicrobial peptide like protegrin-1 on the lipid bilayers deposited on the thin coverglass plates.

요 약: 얇은 유리판 위에 잘 정렬된 인지질 이중막에 작용하는 항균성 펩타이드 protegrin-1의 활성작용을 고체 ^{2}H 핵자기 공명 분광법을 이용하여 조사하였다. 수화 전후에 있어서 인지질 분자의 배향분포와 그 운동성을 고체 ^{2}H 핵자기 공명 스펙트럼을 통하여 확인하였다. 진공으로 건조된 상태에서는 인지질 분자의 운동성이 작다는 사실 외에는 인지질 분자들의 배향분포에 대한 정확한 상태를 알 수 없었다. 그러나 시료가 수화된 이후에는 시간이 지남에 따라 인지질 분자들이 잘 정렬되어 간다는 것과 원환체 기공이 형성되어 간다는 것을 확인할 수 있었다. Protegrin-1과 같은 항균성 펩타이드에 의한 인지질 이중막 변화를 본 연구논문에서 사용한 방법으로 확인하기 위해서는 상당히 긴 반응시간이 필요하다는 것을 확인하였다.

Key words: protegrin-1, antimicrobial peptide, lipid bilayer, solid-state NMR

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)42-629-8875 Fax : +82-(0)42-629-8811
E-mail : chulkim@hnu.kr

www.kci.go.kr

1. 서 론

생물체의 면역 기능에 관여하는 항균성 펩타이드는 18 개에서 50 개까지의 아미노산으로 이루어진 생체 고분자로서 균류, 나방, 양서류, 그리고 돼지 등 광범위한 생물종에서 발견되어지고 있으며,[1-3] 이것들의 다양한 활성을 설명하기 위한 반응 메커니즘 연구들이 지금까지 지속적으로 진행되어지고 있다.[4-7] 이 펩타이드들은 특정 수용 단백질의 도움 없이 생체 인지질막에 결합하여 세포막을 파괴시키는 작용을 하는 것이 그 특징인데, 이들의 결합정도는 인지질과의 화학적 상호작용에 영향을 주는 펩타이드의 2차원 구조(α-helix 또는 β-sheet), 펩타이드의 농도 및 표면 전하 밀도, 인지질막의 표면전하, 인지질의 종류 등에 의해 좌우된다.[8-11] 또한 인지질막에서 인지질 분자의 정렬도에 의해서도 영향을 받는데, 일반적으로 질서정연한(liquid-ordered) 인지질막에서보다 무질서한(liquid-disordered) 인지질막에서 항균성 펩타이드가 더 잘 작용하는 것으로 알려져 있다.[12] 이러한 변수들의 영향이 형광 분광법(Fluorescence), 원편광 이색성 분광법(CD), 그리고 핵자기 공명 분광법(NMR) 등과 같은 여러 분광법에 의해 연구되어 오고 있다.[13-16]

Protegrin-1 (PG-1, MW=2154 Da)은 18 개의 아미노산을 갖고 있는 항균성 펩타이드로서 돼지의 백혈구에서 발견되고 있다.[17] PG-1은 다양한 세균과 곰팡이에 대한 항균 작용을 보여주며, HIV-1 에 대한 항바이러스 효과도 보여주고 있다. PG-1은 4개의 시스테인 아미노산 사이에서 두 개의 disulfide bonds 를 가지는 펩타이드로 용액 상에서 β-sheet 구조를 보인다.[18] PG-1은 인지질 분자와의 정전기적인 상호작용과 반데르바알스 상호작용 등에 의해 인지질막의 표면에 결합하는 것으로 알려져 있는데, 인지질막 표면에 결합된 상태의 분자 구조에 대한 많은 연구가 다양한 분광기법을 이용하여 이루어지고 있다.[7,19] 중성자 회절법, NMR 등의 연구에 의하면, PG-1은 생체막에 있는 인지질 분자의 종류, 펩타이드의 농도 등에 의해 기공구조를 만들 수도 있고, 때론 생체막을 얇게 만드는 효과만을 낼 수도 있는 것으로 알려져 있다.[20-25]

다양한 분광기법이 항균성 펩타이드의 활성작용 연구에 활용되고 있는 바, 이 중의 가장 효과적인 방법 중의 하나가 고체 NMR에 의한 연구이다. 고체 NMR의 경우, 항균성 펩타이드와 인지질막이 상호작용할 때, 인지질막에 대한 펩타이드의 배향 및 인지질 분자들의 공간적 배향에 대한 연구가 주를 이루고 있다.[21,26,27] 이러한 연구의 대부분에서는 얇은 유리판 위에 도포된 펩타이드와 인지질 혼합물의 고체 NMR 스펙트럼을 얻음으로써 인지질 이중막에 대한 펩타이드의 작용방식을 파악하게 된다.[28,29]

2. 실 험

2.1. 시약

Palmitoyl부분에 있는 수소 원자를 중수소로 치환한 1-palmitoyl_d_{31}-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphotidylcholine (POPC_d_{31})는 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였으며, 항균성 펩타이드protegrin-1은 GL Biochem (Shanghi, China)으로부터 구입하여 사용하였다. Trifluoroethanol (TFE), 클로로포름, 그리고 sodium phosphate dibasic 등은 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 핵자기 공명 분광학 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

항균성 펩타이드와 혼합된 인지질 분자들의 정렬도를 핵자기 공명 분광법으로 측정하기 위해서, 얇은 유리판에 POPC_d_{31} 인지질 이중막을 형성시켰다. 먼저, PG-1이 녹아있는 TFE 용액을 인지질이 녹아 있는 클로로포름 용액에 혼합한다. 용액 중의 펩타이드와 인지질의 비율은 PG-1/POPC_d_{31}=1/80이다. 균일하게 혼합된 펩타이드-인지질 용액을 얇은 유리판 표면에 0.01-0.04 mg/mm^2 농도로 떨어뜨려준다. 공기 중에서 수시간 건조시킨 후, 남아 있는 극미량의 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 진공 상태에서 밤새 건조시킨다. 이렇게 건조시킨 시료에 대해 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 측정하였다. 잘 건조된 시료는 약 2 μL의 물을 직접 첨가하여 수화시킨 다음, sodium phosphate dibasic으로 포화된 용액이 들어있는 제습기에서 약 2일 동안 방치해둔다.[28] 이 과정에 의해 유리막 표면에 있는 인지질 분자들이 약 95%의 상대습도로 수화되게 되고, 잘 정렬된 2000 개 이상의 인지질 이중막 층을 형성하게 된다. 강한 세기의 핵자기 공명 분광 신호를 얻기 위하여, 10 개 정도의 유리판 시료를 포개어 준다. 포개어진 유리판을 Parafilm으로 싸고, polyethylene으로 밀봉하여, 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 측정하는 동안 시료가 마르지 않도록 한다. 만들어진 시료가 평형 상

www.kci.go.kr

태에 이르도록 5 °C의 냉장고 안에서 수 시간에서 수일 동안 방치해 두면서 적절한 시간에 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 측정하였다. 이 모든 과정에 대한 좀 더 자세한 과정은 Hallock의 논문에 잘 나와있다.[30]

2.3. 고체 핵자기 공명 분광법

고체^{2}H NMR 스펙트럼은 Bruker MSI-300 분광기를 이용하여 측정하였다. 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 얻기 위하여 사중극자 에코 시퀀스의 펄스가 사용되었고,[31] 5.0 μs의 90° 펄스와 30 μs의 에코시간 그리고 0.5초의 반복시간을 사용하였다. 스펙트럼의 폭은 100 kHz이다. 모든 실험은 POPC_d_{31} 인지질의 상전이 온도보다 높은 25 °C에서 행해졌다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 진공상태에서 건조한 시료의 고체상

지금까지, 저자의 여러 논문에서는 수화된 상태에서의 인지질 분자의 상변화를 확인해왔다.[29,32-34] 수화된 시료를 제조하기 위해서는 인지질이 녹아있는 유기용매를 제거하기 위한 진공 건조 과정을 거치게 된다. 진공 건조 상태에서 인지질 분자들은 어떠한 고체상태로 존재하며, 수화에 의해 어떠한 상태로 변화하는지 알아보고자 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 측정하였다. *Fig.* 1A는 수화된 상태에서 잘 정렬된 순수한 POPC_d_{31}의 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼이다. *Fig.* 1B는 시료가 도포된 유리판을 외부 자기장 (B_0)에 평행하게, *Fig.* 1C는 수직으로 위치하여 측정한 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼이다. 여기서, 평행이라 함은 유리판의 수직방향과 외부 자기장의 방향이 평행함을 의미한다.

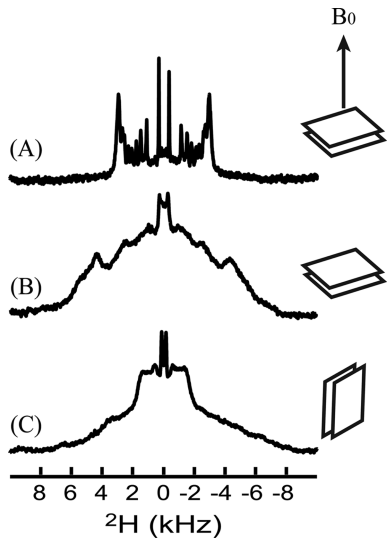

Fig. 1. Experimental ^{2}H solid-state NMR spectra of POPC_d_{31} molecules (A) in the fully-hydrated and well-aligned POPC_d_{31} bilayer, (B and C) in the vacuum-dried mixtures of POPC_d_{31} and PG-1 deposited on the thin coverglass plate. The orientations of thin coverglass plates are given on the right side.

Fig. 1B와 1C의 스펙트럼이 보여주듯이 진공건조 상태에서는 인지질 분자들이 이중막 형태로 잘 정렬되어 있지도 않고, 무질서하게 배향된 형태도 아니었다. 만약, 잘 정렬된 상태라면 *Fig.* 1A와 같은 모양의 스펙트럼을 보여주어야 한다. 반면에, 인지질 분자들이 무질서하게 배향된 고체상이었다면, 시료가 외부 자기장에 대해 평행하게 놓여진 상태에서 측정된 스펙트럼(*Fig.* 1B)과 직각으로 놓여진 상태에서 측정된 스펙트럼(*Fig.* 1C) 사이에 차이가 없어야 한다. 즉, *Fig.* 2B와 같은 모양이어야 한다. *Fig.* 2는 측정된 스펙트럼으로부터 인지질 분자들의 배향분포를 확인하기 위해 모사한 스펙트럼이다. *Fig.* 2A는 외부 자기장과 평행한 방향으로 잘 정렬된 POPC_d_{31} 분자들의 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 모사한 것이고, *Fig.* 2B는 무질서하게 배향된 POPC_d_{31} 분자들의 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 모사한 것이다. POPC_d_{31} 분자들의 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼의 모양을 모사하기 위한 이론적 기술은 저자의 다른 논문에서 자세히 나와 있어 여기서는 생략하기로 하겠다.[29] 진공으로 건조된 상태에서 측정된 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼은 *Fig.* 1B와 1C에서 보듯이 분명한 차이를 보여준다. 그렇다고, 잘 정렬된 상태에서 보여주는 스펙트럼(Fig. 2A)을 닮은 모양을 보여주지도 않는다. 일반적으로 외부 자기장에 평행하게 배열한 POPC_d_{31} 분자의 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼의

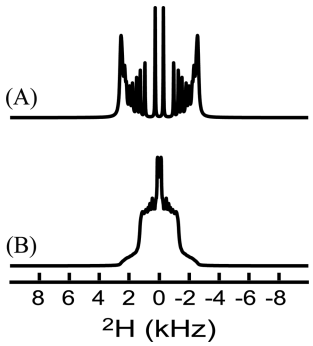

Fig. 2. Simulated ^{2}H solid-state NMR spectra of POPC_d_{31} molecules (A) in the well-aligned bilayer and (B) in the isotropic phase.

www.kci.go.kr

폭이 외부 자기장에 수직으로 배열한 POPC_d_{31} 분자의 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼의 폭보다 2배 크다. 보통의 경우, 수화된 인지질 분자들은 유리판 표면에 수직으로 배열하기 때문에 유리판이 외부 자기장에 평행할 때, 인지질 분자들도 외부 자기장에 평행하게 된다. *Fig.* 1C와 1B를 비교했을 때, *Fig.* 1B의 가장자리 신호세기가 상대적으로 크다는 것은 많은 인지질 분자가 유리판 위에서 수직방향으로 정렬되어 있다는 것을 말해준다고 하겠다. 결국, 얇은 유리막 표면에 놓여있는 POPC_d_{31} 인지질 분자는 진공 상태에서 건조되었을 때, 대부분의 분자가 유리판 표면에 수직 방향으로 정렬되어지고, 일부는 무질서한 상태의 분자 배향을 보인다고 생각되어진다.

또한 진공건조에 의해 만들어진 고체상에서 각 인지질 분자들은 어떠한 운동 상태를 보이는지 고체 스펙트럼을 통해서 알 수 있었다. 뒤에서 자세한 수식으로 설명하겠지만, ^{2}H를 포함하는 메틸렌 그룹의 운동성이 증가하면 그 메틸렌 그룹의 ^{2}H로부터 얻어지는 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼의 폭은 줄어들게 된다. 수화된 POPC_d_{31} 이중막의 ^{2}H 스펙트럼(*Fig.* 1A)에서 보여주듯이 스펙트럼의 폭은 38.3 kHz이나, 진공으로 건조된 상태(*Fig.* 1B)에서는 약 80 kHz이다. 이는 진공 건조 과정이 인지질 분자들 사이에 존재하는 물 분자를 제거해줌으로 인해 인지질 분자들의 전체적인 운동과 국부적인 운동이 2 배 이상 크게 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

3.2. 수화 상태에서 시료의 상 변화

Fig. 3은 진공 건조된 시료에 물을 첨가한 후, 시간이 지남에 따라 변하는 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 측정한 것이다. 시간에 따라 인지질 고체상의 변화를 파악하기 위하여 여러 가지 고체상의 혼합으로 모사하였다. 측정된 스펙트럼을 가장 근사적으로 모사한 결과가 *Fig.* 3B에 함께 나와있다. *Table* 1에는 모사한 스펙트럼으로부터 얻은 인지질 상들의 백분율을 보였다. *Table* 1에서 볼 수 있듯이 대부분의 인지질 분자는 protegrin-1에 의하여 원환체 기공(toroidal pore)을 형성하는데 참여하고 있음을 알 수 있다.[29] 약 20% 미만의 인지질 분자들은 정렬된 이중막 구조와 등방적인 고체상을 형성하는 데 참여하고 있음을 알 수 있었다. 35시간 미만의 경우에서는 큰 변화가 없었으나 360 시간(15일) 이상의 보존 기간을 거치면 등방적인 고체상과 정렬된 이중막 상이 줄어들면서 원환체 기공 구조가 좀 더 생성되는 것을 알 수 있었다. 이러한

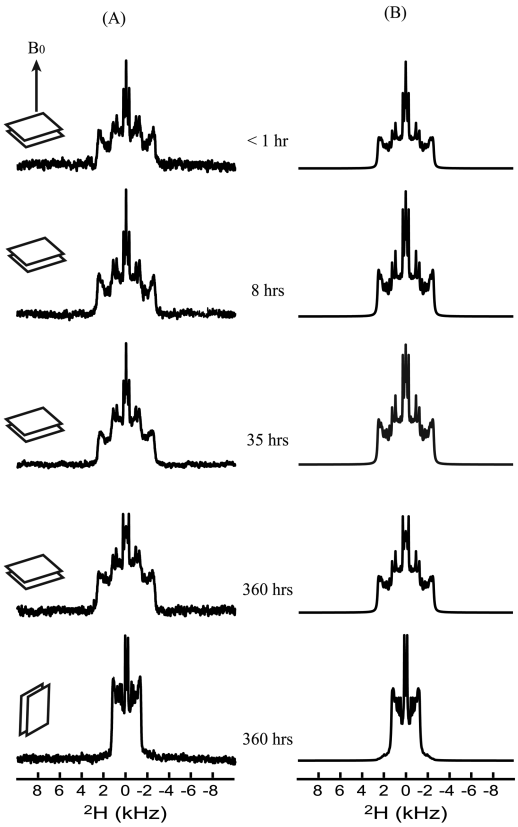

Fig. 3. (A) Experimental and (B) simulated ^{2}H solid-state NMR spectra of POPC_d_{31} molecules in the presence of PG-1. The storage times are given in the middle column. The orientations of thin coverglass plates are given on the left side.

Table 1. The percentages of POPC_d_{31} structures in the presence of PG-1

Structures	Storage time (hours)			
	< 1	8	35	360
Pore	80	80	85	90
Bilayer	15 (10°)[a]	16 (5°)	12 (4°)	8 (1°)
Isotropic	5 (10^{-11})[b]	4 (10^{-11})	3 (10^{-11})	2 (10^{-12})

[a]The standard deviation of a Gaussian function for the angular distribution of POPC_d_{31} bilayers.
[b]The rotational diffusion coefficient of an isotropic structure with a diameter of 40 Å.

사실은 본 연구에서 적용한 시료 제조 방법으로 항균성 펩타이드의 작용 기작을 이해하기 위해서는 오랜 시간이 필요함을 의미한다고 하겠다.[32] 즉, 수일 이상의 시간이 지나야 항균성 펩타이드와 혼합된 인지질

www.kci.go.kr

Table 2. The apparent ^{2}H quadrupolar coupling constants (QCC) in kHz of methylene groups in the fully-hydrated samples

Sample	Carbon Number														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
POPC	38.3	38.3	38.2	38.1	37.9	36.6	34.7	34.0	32.0	28.6	26.3	22.3	18.7	14.2	4.2
POPC+PG-1	34.8	34.5	34.4	33.9	33.6	32.9	31.3	30.8	29.4	26.5	23.9	20.2	17.0	12.9	3.7

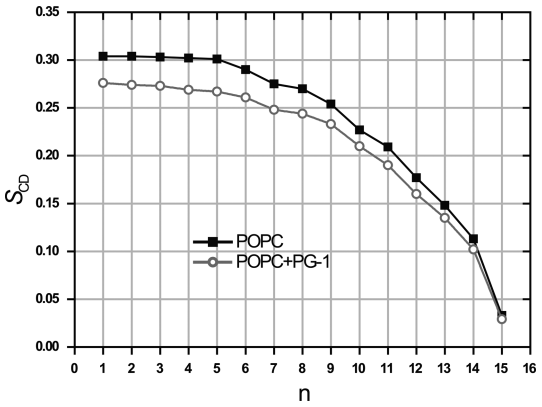

Fig. 4. Order parameters (S_{CD}) for the sn-2 chain of POPC_d_{31} in the presence of PG-1 at 25 °C as a function of the carbon atom index.

분자의 고체상이 평형에 이르게 된다는 것이다.

3.3. 수화 상태에서 인지질분자의 운동상태

수화된 상태에서 얻어진 고체 ^{2}H NMR 스펙트럼을 모사함으로써 얻어진 ^{2}H의 사중극자 결합상수(quadrupolar coupling constant, QCC)로부터 인지질 분자의 부분별 운동 상태를 이해할 수 있게 되었다. 그것은 인지질 분자의 운동상태를 말해주는 질서인자(order parameter)가 인지질 분자의 메틸렌 그룹에 속해있는 ^{2}H의 고체 NMR 스펙트럼의 신호 폭과 관련되어 있다는 사실로부터 얻어진다. 즉, 고체 상태에 있는 시료의 ^{2}H로부터 얻어지는 두 개의 신호 사이의 폭은 다음과 같이 주어진다.[33]

$$\Delta V_Q = \frac{3}{2} A_Q S_{CD} \quad (1)$$

여기서, A_Q는 사중극자 결합상수로서 인지질분자에 있는 C-D결합의 경우에는 168 kHz이다. S_{CD} 는 질서인자로서 외부 자기장에 대한 C-D 벡터의 운동에 대한 평균값에 해당한다. C-D 벡터의 운동에 대한 평균값은 인지질 분자의 전체 운동과 인지질 분자 속의 각각의 C-D 벡터의 국부적인 운동이 복합적으로 작용하여 평균되어진 것이다. 수식으로 표현하면 다음과 같다.[33]

$$S_{CD} = \langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \rangle \quad (2)$$

여기서, θ는 C-D 벡터와 기준이 되는 축 사이의 각도이다. 각괄호는 시간에 대한 평균을 의미한다. C-D 벡터의 운동이 전혀 없는 경우에는 S_{CD} 값이 1이며, 모든 각도로의 자유로운 운동이 있는 경우에는 0이 된다. 즉, 운동성이 클수록 그 값이 1로부터 0의 값으로 작아지게 된다.

사중극자 결합상수로부터 계산된 질서인자를 각각의 메틸렌 그룹에 대해 *Fig.* 4에 그려보았다. 각 탄소번호는 palmitoyl 부분 중, -COO- 부분에 결합된 -CH_2-를 1번으로 시작하여 끝부분에 있는 -CH_3를 15번으로 정한 것이다. 다른 실험 결과와 마찬 가지로 친수성 그룹에 가까이 있는 메틸렌 그룹일수록 그 움직임이 적다는 것을 알 수 있다. POPC_d_{31} 인지질 내의 친수성 그룹 사이의 상호작용은 강한 반면, 소수성기의 끝부분으로 갈수록 그 상호작용이 약할 뿐만 아니라 인지질 분자들 사이의 간격이 넓어서 그 운동성이 커지기 때문인 것으로 생각된다.

4. 결 론

얇은 유리판 위에 인지질 분자와 항균성 펩타이드가 혼합되어 도포되었을 때, 인지질 분자들의 배향분포에 영향을 미치는 진공 건조 효과와 수화 효과를 관측하였다. 항균성 펩타이드와 인지질 분자들이 혼합된 액체를 얇은 유리판에 도포하고 진공으로 건조했을 때, 인지질 분자들은 무질서한 배향과 질서 정연한 이중막 구조의 혼합 상태인 것으로 확인되었다. 또한, 인지질 분자들 사이의 강한 상호작용으로 인해 인지질 분자의 운동성이 상당히 작았다. 반면에 수화된 상태에서는 인지질 분자 사이 그리고 인지질 이중막 사이에 존재하는 물 분자들로 인해 인지질 분자의 운동성이 크게 향상되었다. 이러한 변화는 항균성 펩타이드가 효과적으로 작용될 수 있는 조건을 만들게 되고, 인지질 분자들은 등방적 고체상과 원환체 기공구조를 가지는 이중막 고체상으로 배향하게 되었다. 수화상태가 지속되어짐에 따라 인지질 분자들의 배향구조에 있어서 등방적인 고체상 구조와 잘 정렬된 이중막 구

www.kci.go.kr

조가 감소하였고, 원환체 기공 구조는 상대적으로 증가하였다. 잘 정렬된 이중막 구조의 분율은 줄었으나 그 정렬도는 증가하였음을 아울러 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 한남대학교 교비 학술 연구 조성비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich and H. G. Boman, *Nature,* **292**(5820), 246-248 (1981).
2. 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**(23), 9159-9162 (1989).
3. R. Latorre and O. Alvarez, *Physiol. Rev.,* **61**(1), 77-150 (1981).
4. M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **84**(15), 5449-5453 (1987).
5. P. M. Hwang and H. J. Vogel, *Biochem. Cell Biol.,* **76**(2/3), 235-246 (1998).
6. K. J. Hallock, D. K. Lee and A. Ramamoorthy, *Biophys. J.,* **84**(5), 3052-3060 (2003).
7. J. J. Buffy, A. J. Waring and M. Hong, *J. Am. Chem. Soc.,* **127**(12), 4477-4483 (2005).
8. M. R. Yeaman and N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.,* **55**(1), 27-55 (2003).
9. R. Mani, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.,* **1716**(1), 11-18 (2005).
10. O. Toke, *Biopolymers,* **80**(6), 717-735 (2005).
11. Y. Bai, S. Liu, P. Jiang, L. Zhou, J. Li, C. Tang, C. Verma, Y. Mu, R. W. Beuerman and K. Pervushin, *Biochemistry,* **48**(30), 7229-7239 (2009).
12. A. Pokorny and P. F. F. Almeida, *Biochemistry,* **44**(27), 9538-9544 (2005).
13. K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii and K. Miyajima, *Biochemistry,* **34**(19), 6521-6526 (1995).
14. K. Matsuzaki, K. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima and R. M. Epand, *Biochemistry,* **37**(34), 11856-11863 (1998).
15. J.-A. Richard, I. Kelly, D. Marion, M. Pezolet and M. Auger, *Biophys. J.,* **83**(4), 2074-2083 (2002).
16. Y. Herasimenka, M. Benincasa, M. Mattiuzzo, P. Cescutti, R. Gennaro and R. Rizzo, *Peptides,* **26**(7), 1127-1132 (2005).
17. V. N. Kokryakov, S. S. Harwig, E. A. Panyutich, A. A. Shevchenko, G. M. Aleshina, O. V. Shamova, H. A. Korneva and R. I. Lehrer, *FEBS Lett.,* **327**(2), 231-236 (1993).
18. R. L. Fahrner, T. Dieckmann, S. S. L. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg and J. Feigon, *Chem. Biol.,* **3**(7), 543-550 (1996).
19. H. Jang, B. Ma and R. Nussinov, *BMC Struct Biol,* **7**, 21 (2007).
20. L. Yang, T. M. Weiss, R. I. Lehrer and H. W. Huang, *Biophys. J.,* **79**(4), 2002-2009 (2000).
21. S. Yamaguchi, T. Hong, A. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry,* **41**(31), 9852-9862 (2002).
22. J. J. Buffy, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry,* **42**(46), 13725-13734 (2003).
23. J. J. Buffy, T. Hong, S. Yamaguchi, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biophys. J.,* **85**(4), 2363-2373 (2003).
24. R. Mani, J. J. Buffy, A. J. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry,* **43**(43), 13839-13848 (2004).
25. C. Kim, J. Spano, E. K. Park and S. Wi, *Biochim. Biophys. Acta,* **1788**(7), 1482-1496 (2009).
26. B. Bechinger, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.,* **1712**(1), 101-108 (2005).
27. R. Mani, M. Tang, X. Wu, J. J. Buffy, A. J. Waring, M. A. Sherman and M. Hong, *Biochemistry,* **45**(27), 8341-8349 (2006).
28. J. J. Buffy, M. J. McCormick, S. Wi, A. Waring, R. I. Lehrer and M. Hong, *Biochemistry,* **43**(30), 9800-9812 (2004).
29. S. Wi and C. Kim, *J. Phys. Chem. B,* **112**(36), 11402-11414 (2008).
30. K. J. L. Hallock, D.-K. and Ramamoorthy, A., *Biophys. J.,* **84**, 3052-3060 (2003).
31. J. Butterworth, *Proceedings of the Physical Soc.,* **86**, 297-304 (1965).
32. C. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.,* **31**(2), 372-378 (2010).
33. C. Kim, *J. Korean Chem. Soc.,* **54**(2), 183-191 (2010).
34. C. Kim, *Anal. Sci. Technol.,* **24**(6), 460-466 (2011).
35. L. S. Vermeer, B. L. de Groot, V. Reat, A. Milon and J. Czaplicki, *Eur. Biophys. J.,* **36**(8), 919-931 (2007).

www.kci.go.kr