

## 항균성 펩타이드에 의한 지질 이중막의 상 변화에 대한 NMR 연구

김 철

한남대학교 생명·나노 과학대학 화학과  
(접수 2010. 1. 8; 수정 2010. 2. 10; 게재확정 2010. 2. 17)

### An NMR Study on the Phase Changes of Lipid Bilayers by Antimicrobial Peptides

Chul Kim

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

E-mail: chulkim@hnu.kr

(Received January 8, 2010; Revised February 10, 2010; Accepted February 17, 2010)

**요약.** 1-Palmitoyl- $d_{31}$ -2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC- $d_{31}$ )로 이루어진 지질 이중막에 항균성 펩타이드 magainin 2와 aurein 3.3이 작용했을 때 일어나는 상변화를 중수소 고체 핵자기 공명 스펙트럼을 관측하여 탐구하였다. 측정된 중수소 고체 핵자기 공명 스펙트럼의 선모양을 이론적 모델 구조를 통하여 모사함으로써, 펩타이드-지질 혼합 상태의 기하학적 구조상수 및 동력학적 표면 확산 계수 등을 구하였다. 펩타이드의 혼합 이후 5일 이내의 짧은 작용 시간에는 지질 이중막의 정렬이 파괴되는 현상이 나타났으나, 100일 이후에는 magainin 2에 의해서는 타원형 원환체 기공 (elliptic toroidal pore)이, aurein 3.3에 의해서는 6각형 단면 막대구조 상(hexagonal phase)이 관측되었다. 지질 이중막 표면의 전하밀도가 항균성 펩타이드의 작용에 미치는 효과를 보기 위해 산성 지질인 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG)를 함유한 POPC- $d_{31}$ /POPG 지질 이중막에 대해서도 동일한 실험을 수행하였다. 동일한  $\alpha$ -나 선형 구조를 가지는 두 펩타이드가 두 종류의 지질 이중막에 작용하는 과정의 차이를 확인할 수 있었다.

**주제어:** 항균성 펩타이드, 마가이닌 2, 오리인 3.3, 원환체 기공, 6각형 단면 막대구조 상

**ABSTRACT.** The phase changes of 1-palmitoyl- $d_{31}$ -2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC- $d_{31}$ ) bilayers distorted by an antimicrobial peptide, a magainin 2 or an aurein 3.3 were investigated by using  $^2\text{H}$  solid-state NMR (SSNMR) spectroscopy. From the theoretical simulation of the experimental  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectra the geometric structure constants and the lateral diffusion coefficients were obtained in the peptide-lipid mixture phases. Within five days of the peptide action on the lipid bilayers only the distorted alignment of the bilayers were measured but after 100 days an elliptic toroidal pore structure and an inverted hexagonal phase were formed in the presence of magainin 2 and aurein 3.3, respectively. In order to investigate the effect of an anionic lipid molecule on the actions of two peptides on the lipid bilayer, the same experiments were performed on the POPC- $d_{31}$ /1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG) bilayer and the significant differences in the actions of two peptides on two bilayers of POPC- $d_{31}$  and POPC- $d_{31}$ /POPG were measured.

**Keywords:** Antimicrobial peptide, Magainin 2, Aurein 3.3, Toroidal pore, Hexagonal phase

## 서론

항균성 펩타이드(antimicrobial peptide)는 18 내지 50 개까지의 아미노산으로 이루어진 면역 펩타이드로서 양서류, 균류, 벌의 독, 나방, 그리고 돼지의 내장 등 다양한 생물 중에서 발견되어지고 있다.<sup>1-6</sup> 이 펩타이드들은 특정 수용 단백질의 도움 없이 생체 지질막에 직접 결합하여 세포막을 파괴시키는 작용을 하는 것이 그 특징이다.<sup>7-8</sup> 항균성 펩타이드는 지질막에 결합하였을 때의 펩타이드의 2차원 구조,<sup>9</sup> 농도 및 전하 밀도와<sup>10</sup> 같은 펩타이드의 물리화학적

성질과 함께 생체 지질막의 표면전하,<sup>11</sup> 수화도,<sup>12</sup> 지질의 종류<sup>13</sup> 등 생체 지질막의 성질에 따라 다양한 메커니즘에 의해 생체막을 파괴하는 것으로 알려져 있다. 제안된 메커니즘 중에는 지질막의 미셀화(micellization), carpet model, membrane thinning model, toroidal pore model, barrel-stave model 등이 있다.<sup>14-16</sup> 균류의 일종인 *Trichoderma viride*로부터 얻는 alamethicin이나 아프리카 개구리의 하나인 *Xenopus laevis*로부터 발견되는 magainin 등은 특정 농도에서는 지질 이중막을 파괴시키지 않고 단지 지질 이중막을 얇게 만들기만 한다.<sup>17</sup> 다량의 양이온 아미노산을 가지고 있는

HIV-derived cell-penetrating 펩타이드인 TAT은 쯔비터 이온성(zwitterionic) 지질 분자인 dimyristoylphosphatidylcholine 지질막에서는 역전된 미셀을 유도하는 반면에, 음전하를 띤(negatively charged) 지질 분자인 dimyristoylphosphatidylglycerol 지질막에서는 역전된 미셀을 유도하지 못한다.<sup>18</sup> 그렇지만, 많은 항균성 펩타이드들은 임계 농도 이상에서 지질막에 기공(barrel-stave pore or toroidal pore)을 만든다는 것이 잘 알려져 있다.<sup>19-22</sup>

이러한 항균성 펩타이드의 생체막 표면 작용을 이해하기 위해 다양한 실험 방법이 사용되어 왔다. 생체막의 모방 이중막으로써는 미셀(micelle)<sup>23</sup> 또는 소포(vesicle)<sup>24</sup> 등이 사용되었으며, 최근에는 평편한 이중막을 갖고 있는 bicelle을<sup>25</sup> 이용한 생체막 펩타이드의 작용 연구가 진행되어지고 있다. 다양한 모델 생체막에 대한 분석은 원편광 이색성 분광 분석(circular dichroism),<sup>26</sup> 중성자 회절법(neutron diffraction),<sup>27</sup> X-ray 회절법(X-ray diffraction),<sup>28</sup> 핵자기 공명 분광법(nuclear magnetic resonance spectroscopy)<sup>29-30</sup> 등 다양한 분광학적 방법이 이용되고 있다. 이 중에서도 고체 핵자기 공명 분광법은 다양한 핵종에 대하여 스펙트럼을 측정함으로써 불용성 펩타이드의 구조연구에 널리 이용되어 오고 있다.<sup>31-32</sup> 본 연구에서는  $\alpha$ -나선형 구조를 가지는 것으로 알려진 두 개의 항균성 펩타이드가 지질 이중막에 작용할 때, 지질 분자들의 고체 핵자기 공명 스펙트럼을 측정함으로써, 지질 이중막이 시간에 따라 어떠한 상변화를 일으키는지 연구하였다.

본 연구에서 사용한 magainin 2는 23 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드(GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS)로서 광범위한 항균작용을 보인다.<sup>33</sup> 낮은 농도에서는 magainin 2의  $\alpha$ -나선형 기둥이 지질막 표면에 평행하게 결합하면서 지질막을 얇게 만드는 작용을 하지만,<sup>15,34-35</sup> 임계농도 이상의 높은 농도에서는 magainin 2의  $\alpha$ -나선형 기둥이 지질막에 수직 방향으로 결합하면서 지질막을 통과하는 기공을 만드는 것으로 알려져 있다.<sup>13,27,36-37</sup> Aurein은 Green and Golden Bell Frog인 *Litoria aurea* 또는 Southern Bell Frog인 *L. raniformis* 등에 있는 입상의 분비기관에서 분비된 항균성 펩타이드이다.<sup>38</sup> 17 개의 아미노산(GLFDIVKKIAG-HIVSSI)으로 이루어진 aurein 3.3 는 지질막 표면에 결합되었을 때, 아마도  $\alpha$ -나선형 구조가 될 것으로 생각된다.<sup>39</sup> 이 펩타이드는 항세균성 뿐만 아니라 항암효과까지 보이는 물질로서 magainin과 비슷한 구조 및 성질을 보이지만,<sup>38</sup> 구체적인 성질에 대해서는 아직도 많은 연구가 필요한 펩타이드이다.

세균 등이 갖고 있는 원핵세포의 세포막과 고등생물이 갖고 있는 진핵세포의 세포막은 서로 다른 특징을 가지고 있다. 진핵세포의 세포막은 콜레스테롤을 다량 포함하고 있는 반면에, 원핵세포의 세포막에는 콜레스테롤의 함량이

일반적으로 적다. 이와 함께, 진핵세포의 세포막은 POPC와 같은 쯔비터 이온성 지질로 이루어져 있어 표면 전하가 중성인 반면에, 원핵세포의 바깥 세포막은 음전하를 띤 지질을 포함하고 있어 전기적으로 음성을 띠고 있다. 이러한 차이는 전기적으로 양전하를 띤 대부분의 항균성 펩타이드가 두 종류의 지질막에 반응하는 메커니즘에 영향을 주게 된다. 본 연구에서는 두 종류의 지질막에 대한 항균성 펩타이드의 반응성을 확인하기 위하여, 쯔비터 이온성 지질인 POPC로만 이루어진 지질막과 음성지질인 POPG를 포함한 POPC/POPG 지질막을 사용하여 연구를 진행하였다.

## 실험

### 사용된 물질

두 종류의 지질 1-palmitoyl-*d*<sub>31</sub>-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC-*d*<sub>31</sub>)과 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG)은 Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였다. 펩타이드 magainin 2와 aurein 3.3은 GL Biochem (Shanghai, China)으로부터 구입하여 추가 정제과정 없이 사용하였다. Trichloroethanol, chloroform, cholesterol, 그리고 sodium phosphate dibasic 등은 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 핵자기 공명 분광학 측정을 위한 시료를 제조하기 위하여 가로 세로 약 10 mm의 얇은 유리막을 Marienfeld Laboratory Glassware (Bad Mergentheim, Germany)로부터 구입하였다.

### 핵자기 공명 분광학 측정을 위한 시료 제조

잘 정렬된 지질 이중막이 항균성 펩타이드에 의해서 파괴된 정렬도를 핵자기 공명 분광법으로 측정하기 위해서, 얇은 유리판에 POPC-*d*<sub>31</sub> 지질 이중막을 형성시켰다. Magainin 2 또는 aurein 3.3를 Trichloroethanol에 녹인 용액을, chloroform에 녹아있는 지질용액에 혼합한다. 용액 중의 펩타이드와 지질의 비율에 따라 각각 1/80, 1/50, 1/20의 세 종류 용액을 제조하였다. 지질 이중막의 종류에 있어서도 쯔비터 이온성 지질로만 만들어지는 POPC 지질용액과 정전기적으로 음성인 지질 POPG를 포함하는 POPC/POPG (비율은 3/1) 지질용액을 제조하였다. 균일하게 혼합된 펩타이드-지질 용액을 얇은 유리판 표면에 0.01 ~ 0.04 mg/mm<sup>2</sup> 농도로 떨어뜨려 준다. 공기 중에서 수시간 건조시킨 후, 남아 있는 극미량의 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 진공 상태에서 밤새 건조시킨다. 잘 건조된 시료는 약 2  $\mu$ L의 물을 직접 첨가하여 수화시킨 다음, sodium phosphate dibasic으로 포화된 용액이 들어있는 제습기에서 약 2일 동안 방치해둔다.<sup>32</sup> 이 과정에 의해 유리막 표면에 있는 지질들이 약 95%의 상대습도로 수화됨으로써, 잘 정렬된 2000

개 이상의 이중막 층을 형성하게 된다. 강한 세기의 핵자기 공명 분광 신호를 얻기 위하여, 제조된 유리판 시료를 10개 내지 15개를 포개어 준다. 포개어진 유리판을 Parafilm으로 싸고, polyethylene으로 밀봉하여, 핵자기 공명 분광 스펙트럼을 측정하는 동안 시료가 마르지 않도록 한다. 만들어진 시료가 평형 상태에 이르도록 5 °C의 냉장고 안에서 수일 동안 방치해 둔다. 이후 핵자기 공명 분광기로 중수소 스펙트럼을 측정한다. 첫 번째 측정 후 시료는 다음 번 측정을 위해 냉장고에서 보관되어진다. 이 모든 과정에 대한 좀 더 자세한 과정은 Hallock 등에 의해서 제안된 방법에 잘 나와있다.<sup>30</sup>

### 핵자기 공명 분광학적 측정

고체 핵자기 분광 스펙트럼은 46.07 MHz의 중수소 공명 주파수를 가지는 Bruker Avance II 300 MHz 분광기를 이용하여 얻어졌다. 포개어진 얇은 유리판 위의 지질에 대한 핵자기 공명 분광 스펙트럼을 얻기 위하여, 분광기의 코일은  $18 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$  크기의 직육면체 모양이 사용되었다. 중수소 고체 핵자기 분광 스펙트럼을 얻기 위하여 사중극자 에코 시퀀스의 펄스가 사용되었고,<sup>40</sup> 5.0  $\mu\text{s}$ 의 90도 펄스와 30  $\mu\text{s}$ 의 에코시간 그리고 0.5 초의 반복시간을 사용하였다. 스펙트럼의 폭은 100 kHz이다. 모든 실험은 POPC 지질의 상전이 온도보다 높은 20 °C에서 행해졌다.

### 이론적 고찰

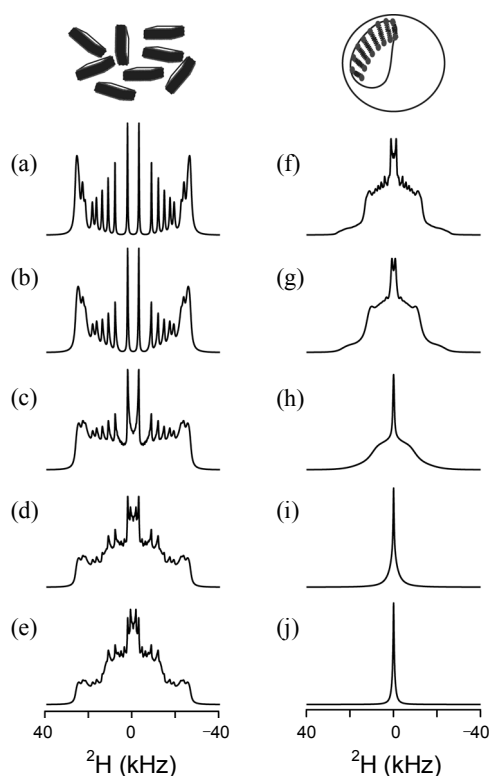
중수소 고체 핵자기 분광 스펙트럼은 특정 지질 이중막 구조에 있어서 지질 분자들이 가지는 공간적 분포에 대한 정보를 주는 훌륭한 수단 중의 하나이다. 중수소의 핵은 전기적 사중극자 모멘트를 가지고 있어 핵 주위에 형성된 전기적 경사(electric gradient)에 의해 3개의 에너지 상태가 서로 다르게 변하게 된다. 이 에너지 상태는 중수소 핵의 사중극자 모멘트의 크기와 함께 핵을 포함하고 있는 분자의 방향이 외부 자기장과 이루는 배향각( $\theta$ )에 의해서 달라지게 되고, 핵자기 공명 스펙트럼의 공명주파수를 다르게 한다. 시료 중에 있는 지질 분자의 방향이 일정하면 하나의 주파수를 가지는 뾰족한 신호선을 보이지만, 그 방향이 많은 경우 각 방향에 존재하는 지질 분자의 분포에 의존하는 선모양을 나타내게 된다. 이러한 의존성에 입각하여 실험적으로 얻은 스펙트럼의 선모양을 분석함으로써 시료 속의 지질분자들의 배향적 분포를 파악할 수 있다.

다양한 지질 이중막 구조가 만들어 내는 중수소 고체 핵자기 분광 스펙트럼을 모사하기 위해서는, 특정 지질 이중막 구조를 이루는 지질 분자 중에서 외부 자기장에 대해 일정한 배향각을 가지는 지질 분자들의 상대적 분포량을 나타내는 함수를 알아야만 한다. 예를 들어 잘 정렬된 이중

막 구조의 경우에는 모든 지질 분자들이 하나의 배향각만 가지므로 그 배향각에 대해서만 함수값이 1이 되게 되고 나머지 배향각 전부에는 함수값이 0이 된다. 6각형 단면 막대구조 상에 있어서는 모든 배향각  $\theta$ 에 대해서 함수값이 모두 1이 된다. 반면에 vesicle과 같은 구형의 분포를 갖는 지질 이중막 구조에서는 특정 배향각  $\theta$ 에 대해서 함수값이  $\sin\theta$ 가 된다. 위와 같이 단순한 구조에 대해서는 그 함수값이 쉽게 결정될 수 있으나, 항균성 펩타이드에 의해 타원형 원환체 구조가 만들어지는 경우나, 지질의 이중막이 얇아진 구조 등에 있어서는 그 함수값을 얻기가 단순하지 않다. 그러나 본 연구의 토대가 된 논문에서 저자 등은 원환체 구조 및 얇아진 막구조에 대한 함수값을 이미 구하였다.<sup>41</sup> 다양한 지질 이중막 구조에 대한 중수소 핵자기 공명 스펙트럼을 이론적으로 구현하기 위해서는 위에서 구한 함수값과 함께 중수소 핵의 전기적 사중극자의 크기를 나타내는 사중극자 결합상수(Quadrupolar Coupling Constants, QCC)를 알아야만 한다. 본 실험에서 사용된 POPC<sub>d31</sub> 지질분자는 15 종류의 중수소를 가지고 있다. 따라서 15 종류 각각에 대한 사중극자 결합상수가 필요한데, 이 값은 지금까지의 실험결과들에 의해 얻어진 값을 이용하였다.<sup>11,41</sup>

여기서 한 가지 더 중요한 요인이 중수소 핵자기 공명 스펙트럼의 모양에 작용하고 있음을 언급해야만 한다. 그것은 지질 분자들이 특정한 기하학적 모양을 이루는 구조상의 표면에서 확산 운동을 함으로써, 분자들의 방향이 시간에 따라 달라진다는 점이다. 이러한 표면 확산 운동은 그 크기에 의해 중수소 핵자기 공명 스펙트럼의 모양을 변화시키게 된다. 이러한 변화에 대해서도 앞에서 언급한 논문들에 자세히 언급되어 있다.<sup>11,41</sup> 다음에 보이는 모든 이론적 스펙트럼은 저자가 발표한 이전 논문에서 근거하여 모사되었다.<sup>41</sup>

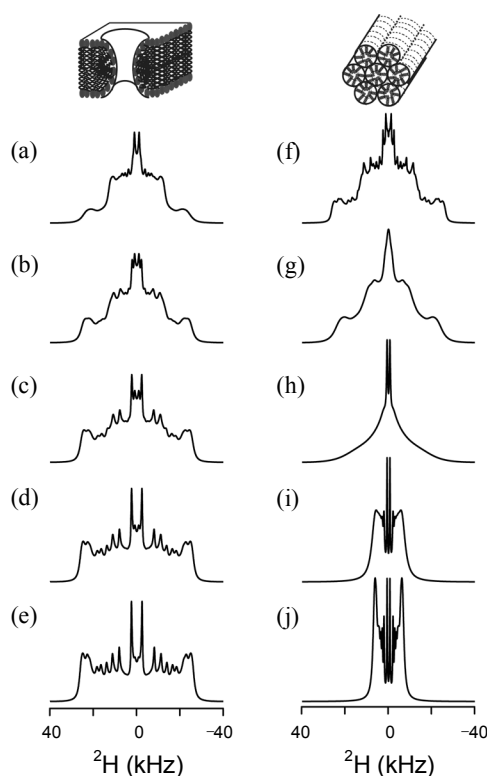
본 연구에서는 얇은 유리판 위에 지질분자와 항균성 펩타이드가 혼합되어 있을 때 생기는 지질 이중막 구조가 펩타이드의 종류와 지질의 종류에 따라 어떻게 달라지는지 확인하고자 한다. 따라서 앞에서 언급한 지질막 구조를 포함하여 일반적으로 나타나는 여러 지질막 구조들의 중수소 핵자기 공명 분광학 스펙트럼에 대한 이론적 모양을 Fig. 1에 구현하여 보았다. 유리판 위에 지질만 놓여있을 경우에는 지질 분자가 유리판 표면에 수직 방향으로 잘 정렬되게 되어 Fig. 1(a)에 보이는 바와 같은 중수소 핵자기 공명 분광학 스펙트럼이 나타난다. 그러나 잘 정렬된 지질 이중막 구조에 항균성 펩타이드가 가해지게 되면, 지질 이중막의 정렬도가 파괴되어 이중막 층이 다양한 방향으로 배향하게 된다. 이러한 배향분포를 가우스(Gauss) 함수로 표현했을 때, 지질 이중막 정렬도의 파괴정도를 의미하는 가우스 함수 표준편차( $\sigma$ )에 따른 중수소 핵자기 공명 분광학 스펙트럼을 Fig. 1(a-e)에 나타내었다. 다양한



**Fig. 1.** Simulated  $^2\text{H}$  SSNMR spectra of POPC- $d_{31}$  (a-e) in the angular mosaic distributions of bilayers and (f-j) in the isotropic phases. For the mosaic distributions, the standard deviations ( $\sigma$ ) of Gaussian distribution functions for the orientational angle of the bilayer normal are (a)  $0^\circ$ , (b)  $10^\circ$ , (c)  $30^\circ$ , (d)  $50^\circ$ , and (e)  $70^\circ$ . The rotational diffusion coefficients,  $D_{\text{iso}}$ , of the lipid micelle with a diameter of 40 Å are (f) 0, (g)  $1.0 \times 10^{-14}$ , (h)  $1.0 \times 10^{-13}$ , (i)  $1.0 \times 10^{-12}$ , and (j)  $1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ .

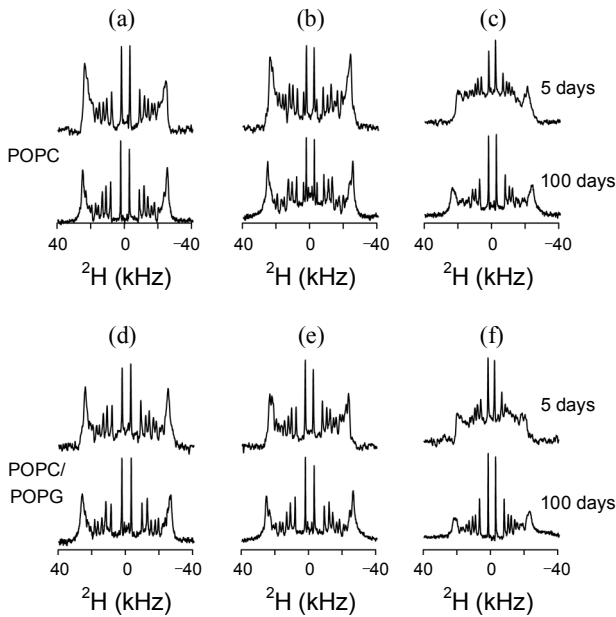
항균성 펩타이드의 경우에서 볼 수 있는바와 같이 일정한 농도 이상의 펩타이드가 존재하게 되면 지질 이중막은 파괴되어 미셀 혹은 소포와 같은 구형의 펩타이드-지질 복합체를 형성하게 된다. 이러한 경우에 있어서 중수소 핵자기 공명 분광학 스펙트럼은 Fig. 1(f)처럼 보이게 된다. 이러한 경우에도 구형의 복합체 표면에서 지질 분자들이 굉장히 빠른 표면 확산 운동을 하게 되면, 중수소 핵자기 공명 분광학 스펙트럼은 시간적으로 평균화된 모양으로 변하게 된다[Fig. 1(g-j)].

Magainin 2는 원환체 형태의 기공을 지질 이중막에 만들어내는 것으로 알려져 있다. 그런데 저자의 앞선 연구에서 살펴 보았듯이 원환체의 단면이 항상 반원이라고는 단정할 수 없고 타원형인 경우도 있을 수 있다. 이러한 경우에 있어서는 Wi 등이 발표한 논문의 수식 (7)을 이용하여 구한 이론적 중수소의 핵자기 공명 스펙트럼을 Fig. 2(a-e)에 나타내었다.<sup>41</sup> 측정된 중수소 핵자기 공명 스펙트럼과



**Fig. 2.** Simulated  $^2\text{H}$  SSNMR spectra of POPC- $d_{31}$  (a-e) in the elliptic toroidal pores and (f-j) in the hexagonal phases. The ratios,  $d/b$ , between the thickness of a lipid monolayer,  $b$ , and the length of the horizontal major axis,  $d$ , in the elliptic toroidal pore shown in the previous paper<sup>41</sup> are (a) 0.6, (b) 0.8, (c) 1.0, (d) 1.2, and (e) 1.4. The lateral diffusion coefficients,  $D_{\text{ld}}$ , on the cylindrical surface of the hexagonal phases with a diameter of 40 Å are (f) 0, (g)  $1.0 \times 10^{-14}$ , (h)  $1.0 \times 10^{-13}$ , (i)  $1.0 \times 10^{-12}$ , and (j)  $1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ .

이론적으로 구현한 타원형 원환체 기공 스펙트럼으로부터 항균성 펩타이드가 만든 타원형 원환체의 기하학적 구조 상수들을 구할 수 있을 것이다. 즉 타원형 원환체의 가장 좁은 지점에서의 수평 방향축의 길이 ( $d$ )를 지질 이중막 두께 ( $b$ )로부터 얻게 된다. 여기서 수평방향축의 길이 ( $d$ )와 지질 이중막의 두께 ( $b$ )에 대한 정의는 앞선 논문에서 잘 나와있다.<sup>41</sup> 원환체 기공 구조와 함께 자주 보이는 6각형 단면 막대구조 상도 특징적인 선모양을 보여주기 때문에 중수소 핵자기 공명 스펙트럼의 해석을 통하여 그 지질상을 결정할 수 있다. Fig. 2(f-j)는 6각형 단면 막대구조 상의 표면에서 지질분자들이 활발한 확산운동을 보일 때 나타나는 스펙트럼의 변화를 그 표면 확산계수와 함께 보여준다. 매우 빠른 표면 확산운동의 경우 Fig. 2(j)와 같은 특징적인 스펙트럼을 보여주는데 이것으로부터 항균성 펩타이드에 의해 생성된 6각형 단면 막대구조 상을 정확히 예측할 수 있다.



**Fig. 3.** Experimental  $^2\text{H}$  SSNMR spectra of (a-c) the POPC $_{d31}$  membrane and (d-f) the POPC $_{d31}$ /POPG membrane distorted by a magainin 2 with the P/L ratios of (a, d) 1/80, (b, e) 1/50, and (c, f) 1/20. The spectra in the first and the third rows were measured within 5 days after sampling and those in the second and the fourth rows were measured 100 days later after sampling.

## 결과 및 고찰

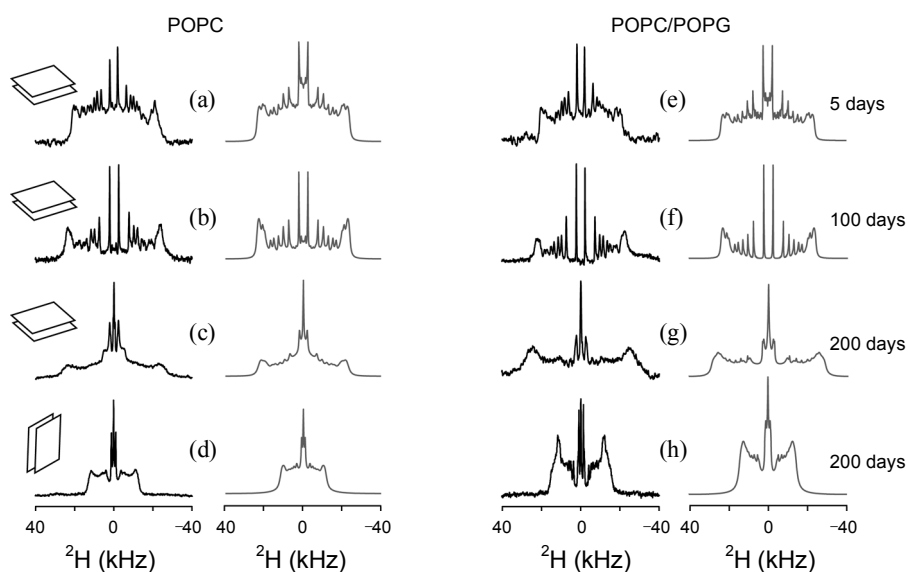
### Magainin 2에 의한 지질 상의 변화

Fig. 3은 항균성 펩타이드 magainin 2에 의해서 파괴된 POPC 지질 이중막 또는 POPC/POPG 지질 이중막에서 얻은 중수소 핵자기 공명 스펙트럼을 보여주고 있다. Fig. 3(a-c)는 POPC 지질 이중막에서 얻은 스펙트럼으로 위쪽 스펙트럼은 시료를 만든 후 5일 이내에 측정된 것이며, 아래쪽 스펙트럼은 100일이 지난 후 측정된 것이다. Fig. 3(d-f)는 POPC/POPG 지질 이중막에서 얻은 스펙트럼으로 각각의 경우에 있어서 위 아래 두 개의 스펙트럼은 POPC의 경우와 같다. Fig. 3의 (a)와 (d)는 펩타이드와 지질의 비율이 1/80이며, (b)와 (e)는 1/50, 그리고 (c)와 (f)는 1/20인 경우이다. 3(a-c)와 3(d-f)를 비교해 보면, 펩타이드-지질 각각의 비율에서 POPC 지질 이중막과 POPC/POPG 지질 이중막에 대한 펩타이드의 반응이 비슷하게 일어나는 것을 알 수 있다. 펩타이드-지질 비율이 1/50 이하인 경우에 있어서는 지질 이중막의 변형정도가 작용시간에 관계없이 비슷하였다. 100일이 지난 후의 스펙트럼은 잘 정렬된 지질 이중막으로부터 얻을 수 있는 Fig. 1(a)의 스펙트럼과 일치하는 선모양을 보여주고 있다. 반면에 5일 이내에 측정된 스펙트럼은 Fig. 1(b)에서 보이는 것과 유사한 선모양을 보여주고 있다. 이는 지질 이중막 중에 펩타이드가 존재함으로써 이

중막의 정렬도가 많이 파괴되어 이중막의 방향이 가우시 함수에 따라 폭넓게 분포한다는 것을 말해준다. 이 결과는 얇은 유리판에 형성된 지질과 펩타이드의 혼합 시료는 5일이라는 짧은 기간 내에 평형 상태의 준고체상을 이루지 못하는 것을 의미한다. 이는 임계 농도 이하에서 그리고 평형 상태에 이르지 못한 상태에서는 magainin 2의 작용이 POPG의 존재 여부에 상관없다는 것을 말해준다.

Fig. 3의 (c)와 (f)는 펩타이드-지질의 비율이 1/20로 크게 됨으로써 지질 이중막의 정렬도가 더 크게 파괴됨을 보여주고 있다. Fig. 3(c, f)의 위쪽 스펙트럼은  $30^\circ$ 의 표준편차를 가지는 Fig. 1(c)와 유사한 선모양을 보여준다. 이러한 큰 변화는 임계 농도 이상일 것이라는 예상으로부터, 시료의 변화를 좀 더 관측하기 위하여 시료 제조 후 200일이 후에 한 번 더 스펙트럼을 측정하였다. Fig. 4의 첫 번째 열(POPC 지질 이중막)과 세 번째 열(POPC/POPG 지질 이중막)의 스펙트럼은 각각 시료 제조 후 5일 이내 (a, e), 100일 후 (b, f), 그리고 200일 후 (c, d, g, h)에 측정된 실험 결과이다. Fig. 4의 (d)와 (h)는 200일 이후의 지질 분자의 분포를 정확히 결정하고자, 얇은 유리판의 수직 방향을 핵자기 공명 분광기의 외부 자기장과 수직으로 배치한 후 한 번 더 측정된 스펙트럼이다. 이 외의 모든 스펙트럼은 얇은 유리판의 수직 방향이 핵자기 공명 분광기의 외부 자기장과 수평으로 배치한 후 측정된 것들이다.

Fig. 4의 두 번째와 네 번째 열의 스펙트럼은 실험에서 얻은 첫 번째와 두 번째 선모양을 위에서 언급한 모델 구조로부터 이론적으로 가장 잘 묘사한 것들이다. 각 스펙트럼을 얻기 위한 모델 구조에 대한 상수는 Table 1에 잘 나와 있다. Table 1에서 볼 수 있듯이 펩타이드의 작용 시간이 지남에 따라 이중막 구조의 분율이 감소하고, 원환체 기공 구조의 분율이 증가하게 된다. 이중막 구조의 경우, 시간이 지남에 따라 이중막의 정렬도가 증가함을 가우시 함수의 표준편차 감소로부터 확인할 수 있었다. 이로 보건대 펩타이드-지질 혼합물은 초기에 불균일하게 섞여 있다가 점차 균일한 혼합상으로 변화하면서 지질 이중막이 정렬되어지고 정렬된 이중막 구조 중에 원환체 기공이 형성되는 것으로 생각된다. 100일 이후에도 펩타이드-지질 혼합물의 상변화가 지속되었고, 200일 후에는 더 많은 원환체 기공이 형성되는 것이 보인다. POPC/POPG 지질 이중막에서 magainin 2는 더 많은 원환체 기공구조를 형성시키는 현상을 기공 구조의 백분율[POPC (60%), POPC/POPG (80%)]로부터 알 수 있었다. 원환체 기공면 또한 POPC/POPG 지질 이중막에서 좀 더 가파른 모양을 만든다는 것이 타원형 원환체 기공의 수직 단면의 수평 평형축 길이,  $d$ 와 이중막 두께,  $b$  사이의 비율 ( $d/b$ )이 POPC의 경우 1.5에서 POPC/POPG의 경우 1.3으로 감소하는 것으로부터 알 수 있었다. 이 현상은 항균성 펩타이드 magainin 2가 POPC/



**Fig. 4.** Experimental and simulated  $^2\text{H}$  SSNMR spectra of (a-d) POPC- $d_{31}$  membrane and (e-h) the POPC- $d_{31}$ /POPG membrane distorted by a magainin 2 with the P/L ratio of 1/20. The spectra in (a) and (e) were measured within 5 days after sampling, those in (b) and (f) were measured 100 days later after sampling, and those in (c, d) and (g, h) were measured 200 days later after sampling. The spectra in (a-c) and (e-g) were measured with the glass plate normal parallel to the external magnetic field and those in (d) and (h) were measured with the glass plate normal perpendicular to the external magnetic field. The first and the third columns are the experimental spectra and the second and the fourth columns are the simulated spectra. The simulation parameters for each spectrum are given in the Table 1.

**Table 1.** Phase percentages of POPC or POPC/POPG bilayers distorted by a magainin 2

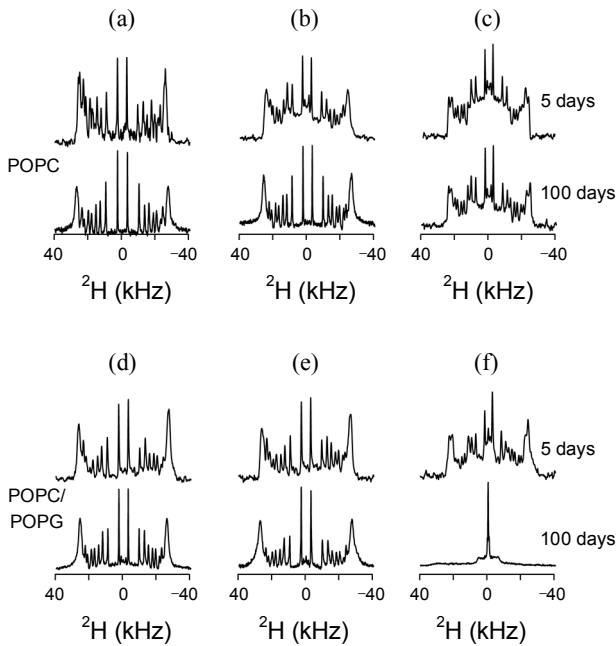
Membranes	Phases	Storage times		
		< 5 days	~ 100 days	~ 200 days
POPC	Isotropic	~ 0%	30% ( $< 1.0 \times 10^{-14}$ ) <sup>a</sup>	40% ( $\sim 2.0 \times 10^{-13}$ )
	Bilayer	100% (40°) <sup>b</sup>	70% (10°)	~ 0%
	Pore	~ 0%	~ 0%	60% (1.5) <sup>c</sup>
POPC/POPG	Isotropic	~ 0%	~ 0%	10% ( $\sim 2.0 \times 10^{-13}$ )
	Bilayer	100% (40°)	100% ( $\sim 0^\circ$ )	10% ( $\sim 0^\circ$ )
	Pore	~ 0%	~ 0%	80% (1.3)

<sup>a</sup>The lateral diffusion coefficient,  $D_{\text{ld}}$  ( $\text{m}^2/\text{s}$ ), of an isotropic phase with a diameter of 40 Å. <sup>b</sup>The standard deviation of a Gaussian function for the angular distribution of lipid bilayers. <sup>c</sup>The ratio,  $d/b$ , between the elliptic semimajor axis,  $d$ , and the monolayer thickness of lipid bilayer,  $b$ , in an elliptic toroidal pore.

POPG 지질 이중막에 수직 방향으로 좀 더 깊숙이 침투하기 때문에 나타나는 것으로 해석될 수 있을 것이며, 이는 음의 전하를 띤 지질 이중막 표면에 좀 더 효과적으로 작용한다는 기존의 결과와 부합할뿐더러 그 작용에 대한 좀 더 구체적인 값을 얻었다고 할 수 있겠다. 저자 등이 고안한 지질 이중막 모델에는 지질분자의 분포를 나타내는 기하학적 구조와 함께 표면확산운동을 포함하고 있다.<sup>41</sup> 실험 스펙트럼의 모사로부터 저자는 지질 분자의 분포를 나타내는 타원형 원환체 기공 구조와 함께 표면 확산 계수를 구할 수 있었다. 각 상태에서의 표면확산 계수는 Table 1과 2의 괄호 안에 나타내었다.

### Aurein 3.3에 의한 지질 상의 변화

Fig. 5는 항균성 펩타이드 aurein 3.3에 의해 상변화가 일어난 두 종류의 지질 이중막으로부터 얻은 중수소 핵자기 공명 스펙트럼이다. Fig. 3의 스펙트럼과 비교해 볼 때, magainin 2의 경우와 비슷한 양상으로 지질 이중막의 상변화가 일어남을 알 수 있었다. 처음에는 지질 이중막의 정렬도가 상당히 깨져 있었지만 시간이 지남에 따라 잘 정렬되어가는 방향으로 진행된 것이다. 하지만, 1/20의 펩타이드-지질 비율에서는 magainin 2의 경우와는 다른 결과를 보여주었다. Aurein 3.3의 경우에는 POPC 지질 이중막과 POPC/POPG 지질 이중막에 대한 작용도 다르다는 것을

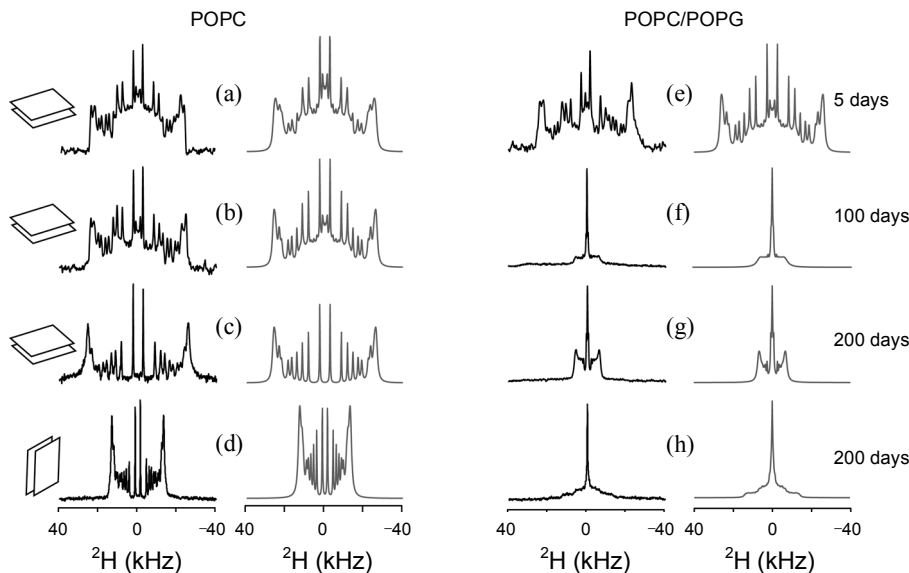


**Fig. 5.** Experimental  $^2\text{H}$  SSNMR spectra of (a-c) the POPC $_{d_{31}}$  membrane and (d-f) the POPC $_{d_{31}}$ /POPG membrane distorted by an aurein 3.3 with the P/L ratios of (a, d) 1/80, (b, e) 1/50, and (c, f) 1/20. The spectra in the first and the third rows were measured within 5 days after sampling and those in the second and the fourth rows were measured 100 days later after sampling.

Fig. 5(c) 와 (f)로부터 알 수 있다.

이러한 변화를 면밀히 파악하고자 펩타이드-지질 비율이 1/20인 경우에 있어서 200일 후까지 실험적으로 얻은 스펙트럼을 가장 적절한 모델 지질 구조로 모사하였다. Fig. 6과 Table 2는 그 결과를 보여주고 있다. 5일 이내에 측정된 스펙트럼의 모사로부터 aurein 3.3의 경우에는 magainin 2보다 많은 양의 등방성이 존재함을 존재함을 알 수 있었다. 이는 magainin 2와 같은  $\alpha$ -나선형 구조일 것으로 예상되는 aurein 3.3이지만 아미노산의 배열 차이 그리고 부분적 구조의 차이 등이 서로 다른 반응과정을 보여주는 것으로 생각된다. 이러한 차이는 100일 후, 그리고 200일 후 측정된 스펙트럼에서 더욱 분명하게 나타났다. POPC 지질 이중막의 경우에는 시간이 지남에 따라 지질 이중막의 정렬도가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 아마도 반응 초기에 부분적으로 뭉쳐져 있던 aurein 3.3이 carpet 모델에서처럼 지질 이중막의 표면에 끌고루 분포하여, 지질 이중막의 두께를 약간 얇게 하는 정도의 작용을 하는 것으로 여겨진다. 반면에 POPC/POPG 지질 이중막의 경우에는 급격한 변화를 일으켜 일부의 등방상과 함께 6각형 단면 막대구조 상을 유발시켰다.

이러한 현상은 벌의 독에 있는 항균성 펩타이드 melittin의 작용에서도 일어난다. Melittin은 쓰비터 이온성 지질 이중막을 미셀화시키지만, 산성의 지질 이중막(지질 이



**Fig. 6.** Experimental and simulated  $^2\text{H}$  SSNMR spectra of (a-d) POPC $_{d_{31}}$  membrane and (e-h) the POPC $_{d_{31}}$ /POPG membrane distorted by an aurein 3.3 with the P/L ratio of 1/20. The spectra in (a) and (e) were measured within 5 days after sampling, those in (b) and (f) were measured 100 days later after sampling, and those in (c, d) and (g, h) were measured 200 days later after sampling. The spectra in (a-c) and (e-g) were measured with the glass plate normal parallel to the external magnetic field and those in (d) and (h) were measured with the glass plate normal perpendicular to the external magnetic field. The first and the third columns are the experimental spectra and the second and the fourth columns are the simulated spectra. The simulation parameters for each spectrum are given in the Table 2.

**Table 2.** Phase percentages of POPC or POPC/POPG bilayers distorted by an aurein 3.3

Membranes	Phases	Storage times		
		< 5 days	~ 100 days	~ 200 days
POPC	Isotropic	55% ( $< 1.0 \times 10^{-14}$ ) <sup>a</sup>	50% ( $< 1.0 \times 10^{-14}$ )	~ 0%
	Bilayer	45% ( $10^0$ ) <sup>b</sup>	50% ( $\sim 0^0$ )	100% ( $\sim 0^0$ )
	Hexagonal	~ 0%	~ 0%	~ 0%
POPC/POPG	Isotropic	45% ( $< 1.0 \times 10^{-14}$ )	40% ( $\sim 1.0 \times 10^{-10}$ )	30% ( $\sim 1.0 \times 10^{-10}$ )
	Bilayer	55% ( $\sim 0^0$ )	~ 0%	~ 0%
	Hexagonal	~ 0%	60% ( $\sim 1.0 \times 10^{-12}$ ) <sup>c</sup>	70% ( $\sim 1.0 \times 10^{-9}$ )

<sup>a</sup>The lateral diffusion coefficient,  $D_{ld}$  ( $m^2/s$ ), of an isotropic phase with a diameter of 40 Å. <sup>b</sup>The standard deviation ( $\sigma$ ) of a Gaussian function for the angular distribution of lipid bilayers. <sup>c</sup>The lateral diffusion coefficient,  $D_{ld}$  ( $m^2/s$ ), of a hexagonal phase with a diameter of 40 Å.

중막의 표면이 전기적으로 음성인 지질 이중막)의 경우에는 역전된 6각형 단면 막대구조 상을 유도시키게 된다.<sup>13,42</sup>  $\alpha$ -나선형 구조를 갖는 melittin은 지질 이중막의 표면에 양의 곡률을 유도하기 때문에 쓰비터 이온성 지질 이중막을 미셀화시키게 된다. 하지만, 산성의 지질 이중막에서는 전기적으로 음성인 지질분자와 강한 정전기적 상호작용으로 인해 지질 이중막에 더 깊이 침투하여 결합하게 되고, 지질 이중막의 표면에 음의 곡률을 유도하게 된다.<sup>43</sup> 이로 인해 음의 표면 곡률을 갖는 역전된 6각형 단면 막대 구조 상이 형성되게 된다.

Aurein 3.3의 경우에도 melittin과 유사한 작용으로 인해 역전된 6각형 단면 막대구조 상을 유도하는 것으로 생각된다. 하지만 magainin 2의 경우에는 타원형 원형체 기공 구조를 유도하였다. Melittin의 경우에서 보는 바와 같이 양전하를 갖는 펩타이드와 음전하를 갖는 지질 분자 사이의 정전기적 상호작용이 역전된 6각형 단면 막대구조 상을 유도한다면, 충전하량이 +4인 magainin 2가 충전하량이 +2인 aurein보다 정전기적 상호작용이 더 커서 아마도 역전된 6각형 단면 막대구조 상을 더 잘 유도할 것으로 예상된다. 그러나 실험의 결과는 이 예상과 달랐다. Magainin 2는 아마도 음의 곡률을 유도하는 경향이 aurein보다 더 작아서, magainin 2는 역전된 6각형 단면 막대구조 상을 만들기 보다는 음의 곡률과 양의 곡률이 공존하는 원형체 기공이 지질 이중막의 종류(POPC 또는 POPC/POPG)에 관계없이 형성되는 것으로 생각된다. 물론, 강한 정전기적 상호작용을 일으킬 수 있는 phosphatidic acid, phosphatidylserine 등으로만 이루어진 지질 이중막에서는 역전된 6각형 단면 막대구조 상이 형성되기도 한다.<sup>13</sup> 이러한 결과는 지질 막 표면의 곡률에는 단순히 정전기적 상호작용만이 아니라 소수성의 상호작용 그리고 펩타이드의 각 아미노산이 지질과 작용하는 힘 등이 함께 고려되어야 한다는 것을 보여주는 것으로 생각된다.

## 결론

Magainin 2와 aurein 3.3에 의한 POPC 지질 이중막과 POPC/POPG 지질 이중막의 상변화를 중수소 핵자기공명 스펙트럼의 측정을 통하여 관찰하였다. 측정된 스펙트럼을 일반적으로 제시된 모델 지질 이중막 구조를 이용하여 모사함으로써 펩타이드-지질 혼합물의 상태에 대한 구체적인 정보를 얻을 수 있었다. 저자 등이 고안한 시뮬레이션 프로그램에 의해 정적 구조뿐만 아니라 동력학적 표면 확산 계수를 구할 수 있었다. 유사한  $\alpha$ -나선형 구조를 갖는 두 항균성 펩타이드는 펩타이드-지질의 비율이 낮은 경우에는 지질 이중막 표면의 전기적 성질에 관계없이 비슷한 양상을 보여주었다. 5일 이내의 작용시간에서는 지질 이중막의 정렬도가 파괴되어지지만, 시간이 지남에 따라 지질 이중막의 정렬도가 증가하는 것을 관측하였다. 하지만 펩타이드-지질의 비율이 1/20인 경우에 있어서는 두 개의 펩타이드와 두 종류의 지질 이중막에 대해서 상당한 차이를 보였다. 200일 이상의 긴 작용 시간 후에 magainin 2는 타원형 원형체 기공을 유도하는 반면에, aurein 3.3은 POPC/POPG 지질 이중막의 경우에만 다량의 6각형 단면 막대구조 상을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구로부터 저자는 유리판에 제조된 지질 이중막이 항균성 펩타이드의 작용에 의해서 일어나는 상변화의 시간적 추이를 중수소 고체 핵자기 공명 분광 스펙트럼과 지질 분포에 대한 이론적 모델, 그리고 그에 따른 이론적 모사로 훌륭히 기술할 수 있음을 보여 주었다.

**감사의 글.** 이 논문은 2010년도 한남대학교 교비 학술 연구조성비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Latorre, R.; Alvarez, O. *Physiol. Rev.* **1981**, *61*, 77.



2. Steiner, H.; Hultmark, D.; Engstrom, A.; Bennich, H.; Boman, H. G. *Nature* **1981**, 292, 246.
3. Habermann, E. *Science* **1972**, 177, 314.
4. Ludtke, S. J.; He, K.; Huang, H. W. *Biochemistry* **1995**, 34, 16764.
5. Lee, J. Y.; Boman, A.; Sun, C. X.; Andersson, M.; Jornvall, H.; Mutt, V.; Boman, H. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, 86, 9159.
6. Gibson, B. W.; Tang, D. Z.; Mandrell, R.; Kelly, M.; Spindel, E. R. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 23103.
7. Bessalle, R.; Kapitkovsky, A.; Gorea, A.; Shalit, I.; Fridkin, M. *FEBS Lett.* **1990**, 274, 151.
8. Toke, O. *Biopolymers* **2005**, 80, 717.
9. Mani, R.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Hong, M. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2005**, 1716, 11.
10. Bai, Y.; Liu, S.; Jiang, P.; Zhou, L.; Li, J.; Tang, C.; Verma, C.; Mu, Y.; Beuerman, R. W.; Pervushin, K. *Biochemistry* **2009**, 48, 7229.
11. Kim, C.; Spano, J.; Park, E. K.; Wi, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1788, 1482.
12. He, K.; Ludtke, S. J.; Worcester, D. L.; Huang, H. W. *Biophys. J.* **1996**, 70, 2659.
13. Matsuzaki, K.; Sugishita, K.-i.; Ishibe, N.; Ueha, M.; Nakata, S.; Miyajima, K.; Epand, R. M. *Biochemistry* **1998**, 37, 11856.
14. Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. *Pharmacol. Rev.* **2003**, 55, 27.
15. Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. *Biochemistry* **1996**, 35, 13723.
16. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1996**, 35, 11361.
17. Weiss, T. M.; Yang, L.; Ding, L.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W. *Biochemistry* **2002**, 41, 10070.
18. Afonin, S.; Frey, A.; Bayerl, S.; Fischer, D.; Wadhwani, P.; Weinkauff, S.; Ulrich, A. S. *ChemPhysChem* **2006**, 7, 2134.
19. Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 238.
20. Shai, Y. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1999**, 1462, 55.
21. Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. *Biophys. J.* **2001**, 81, 1475.
22. Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. *Biochemistry* **2004**, 43, 3590.
23. Gesell, J. Z., M.; Opella, S. J. *J. Biomol. NMR* **1997**, 9, 127.
24. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, 34, 12553.
25. Marcotte, I.; Wegener Kate, L.; Lam, Y.-H.; Chia Brian, C. S.; de Planque Maurits, R. R.; Bowie John, H.; Auger, M.; Separovic, F. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, 122, 107.
26. Ludtke, S. J.; He, K.; Wu, Y.; Huang, H. W. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1994**, 1190, 181.
27. Yang, L.; Weiss, T. M.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W. *Biophys. J.* **2000**, 79, 2002.
28. Munster, C.; Spaar, A.; Bechinger, B.; Salditt, T. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2002**, 1562, 37.
29. Glaser, R. W. S., C.; Durr, U. H. N.; Wadhwani, P.; Afonin, S.; Strandberg, E.; Ulrich, A. S. *Biophys. J.* **2005**, 88, 3392.
30. Hallock, K. J. L., D.-K.; Ramamoorthy, A. *Biophys. J.* **2003**, 84, 3052.
31. Yamaguchi, S.; Hong, T.; Waring, A.; Lehrer, R. I.; Hong, M. *Biochemistry* **2002**, 41, 9852.
32. Buffy, J. J.; McCormick, M. J.; Wi, S.; Waring, A.; Lehrer, R. I.; Hong, M. *Biochemistry* **2004**, 43, 9800.
33. Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84, 5449.
34. Bechinger, B.; Zasloff, M.; Opella, S. J. *Protein Sci.* **1993**, 2, 2077.
35. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Tokuda, H.; Funakoshi, S.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1994**, 33, 3342.
36. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, 34, 6521.
37. Nguyen, K. T.; Le Clair, S. V.; Ye, S.; Chen, Z. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 12358.
38. Rozek, T.; Wegener, K. L.; Bowie, J. H.; Olver, I. N.; Carver, J. A.; Wallace, J. C.; Tyler, M. J. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5330.
39. Pan, Y. L.; Cheng, J. T.; Hale, J.; Pan, J.; Hancock, R. E.; Straus, S. K. *Biophys. J.* **2007**, 92, 2854.
40. Butterworth, J. *Proc. Phys. Soc.* **1965**, 86, 297.
41. Wi, S.; Kim, C. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 11402.
42. Batenburg, A. M.; van Esch, J. H.; Leunissen-Bijvelt, J.; Verkleij, A. J.; de Kruijff, B. *FEBS Lett.* **1987**, 223, 148.
43. Batenburg, A. M.; Hibbeln, J. C.; de Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 903, 155.