

Rana Box를 포함한 Brevinin-1 및 Thanatin의 구조-항생활성 상관관계

신송엽 · 강주현 · 이동건 · 장소윤 · 서무열 · 함경수*
생명공학연구소, 펩타이드공학 RU

Structure-antibiotic Activity Relationships of Brevinin-1 and Thanatin Containing Rana Box. Shin, Song Yub, Joo Hyun Kang, Dong Gun Lee, So Youn Jang, Moo Yeol Seo, and Kyung-Soo Hahm*. *Peptide Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P. O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea* - In order to investigate structure-antibiotic activity relationships of brevinin-1 and thanatin containing Rana box composed of basic loop formed by disulfide bridge in their carboxy terminus, thanatin, brevinin 1 and their analogues (T-B1, T-B2 and B-T) in which their Rana box sequence exchanged was designed and synthesized by the solid phase method using Fmoc-chemistry. The basic sequence of Rana box of thanatin had more significant effect on both antibacterial and antifungal activity than that of brevinin 1. The tail sequence (QRM) of thanatin was found to be important in its antibacterial and antifungal activity. Rana box sequence of brevinin-1 did not have a significant effect on its antitumor and phospholipid vesicle-aggregating activities. Brevinin-1 showed stronger α -helical structure in the membrane-mimicking environment such as SDS micelle than thanatin. A remarkable increase in α -helicity of T-B1 and T-B2 caused a significant reduction on antibacterial and antifungal activities. In contrast, a little decrease in α -helicity of B-T caused 4-fold reduction on antibacterial activity. These results suggested that the α -helicity of brevinin-1 plays more important role in antibiotic activity than that of thanatin. Furthermore, antibacterial activity of thanatin against *E. coli* resulted from the disruptive effect against the outer cell membrane of *E. coli*.

Key word : Brevinin-1, Rana box, Thanatin

Brevinin-1은 *Rana brevipodapors*라는 개구리의 피층에서 분리된 항균 펩타이드(antimicrobial peptide)이다 [11]. Brevinin-1은 *Bombina* 또는 *Xenopus*로 분리된 개구리 피층(frog skin) 유래의 항균 펩타이드인 *bombinin* 또는 *magainin*과는 구조적 상동성(structural homology)을 전혀 가지고 있지 않다 [1, 2, 8, 11]. Brevinin-1은 그람 양성균 및 음성균에 대하여 강한 항균활성을 나타내지만 진균에 대하여서는 항진균활성을 나타내지 않는다. Brevinin-1은 *bombinin* 또는 *magainin*과는 달리 카르복실 말단에 2개의 시스테인 잔기에 의해 형성된 disulfide linkage에 의하여 loop가 형성되어 있고 loop의 안쪽에는 KITKK와 같은 다수의 염기성 아미노산을 포함하고 있다 (Table 1).

Thanatin은 hemipteran insect *Podisus maculiventris*로부터 분리된 항균 펩타이드로서 그람 양성균 및 그람 음성균에 대하여 항균활성을 나타낼 뿐만 아니라 진균에 대하여도 항진균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[4]. Thanatin은 21개의 아미노산으로 이루어져 있으며, brevinin-1과 마찬가지로 카르복실 말단에 2개의 시스테인 잔기의 disulfide linkage에 의한 loop를 형성하고 있다[4]. 또한

thanatin은 brevinin-1과 달리 basic loop의 뒤쪽에 QRM의 3개의 아미노산으로 이루어진 tail을 포함하고 있다 (Table 1). 또한 brevinin-1 및 thanatin의 카르복실말단의 2개의 시스테인 잔기로 이루어진 -CKITKKC 및 -CNRRTGKC의 basic loop 서열을 Rana box라고 불리고 있다[4, 11]. 또한 brevinin-1 및 thanatin 이외에도 Rana box을 포함한 항균 펩타이드로서는 한국산 개구리(*Rana rugosa*)의 피층으로부터 6종류의 gaegurins (gaegurin 1~6)와 유럽산 개구리(*Rana esculenta*)의 피층으로부터 분리된 brevinin-1E, brevinin-2E 및 esculentin 등을 들 수 있다 [12, 16]. 이들 항균 펩타이드들도 카르복실 말단의 2개의 시스테인 잔기로 이루어진 basic loop를 형성하고 있다 [12, 16].

본 연구에서는 brevinin-1 및 thanatin의 카르복실 말단의

Table 1. Amino acid sequences of thanatin, brevinin-1 and their analogues

Peptides	Sequences
thanatin	GSKKPVPIIYCNRRTGKCQRM
T-B1	GSKKPVPIIYC---KITKKCQRM
T-B2	GSKKPVPIIYC---KITKKC
brevinin-1	FLPVLAGIAAKVVPALFC---KITKKC
B-T	FLPVLAGIAAKVVPALFCNRRTGKC

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4160, Fax. 82-42-860-4593

E-mail: Hahmks@kribb4680.kribb.re.kr

*Rana box*의 아미노산 서열 및 thanatin의 카르복실 말단의 tail sequencce인 QRM이 항균, 항진균, 항암활성에 미치는 영향을 조사하였다. 따라서 brevinin-1의 *Rana box* 위치에 thanatin의 서열을 도입시킨 유사체 펩타이드 (T-B1 및 T-B2)와 역으로 thanatin의 *Rana box* 위치에 brevinin-1의 서열을 도입시킨 유사체 펩타이드(B-T)를 합성하여 구조와 항생활성과의 상관관계에 대하여 조사하였다. 또한 *Rana box*을 포함한 항균 펩타이드인 gaegurin 6의 카르복실말단의 2개의 시스테인 잔기에 의한 disulfide linkage는 항균활성에 영향을 미치지 않는다는 것이 알려져 있다[17]. 따라서 본 연구에서 사용한 펩타이드는 탈보호 및 수지로 펩타이드의 분리 및 정제하고 난후, disulfide linkage를 형성시키지 않는 상태의 펩타이드를 사용하였다.

재료 및 방법

펩타이드의 설계

Table 1에 나타낸 바와 같이 brevinin-1의 *Rana box* 위치에 thanatin의 서열인 KITKK를 도입시킨 유사체 펩타이드인 T-B1 및 T-B1에서 thanatin의 꼬리서열인 QRM을 제거한 T-B2를 설계하고, 또한 역으로 thanatin의 *Rana box* 위치에 brevinin-1의 서열인 NRRTGK를 도입시킨 B-T을 설계하였다.

펩타이드 합성

본 연구에서 사용한 합성 펩타이드들은 Fmoc-Chemistry를 이용한 고상법(solid phase method)로 합성하였다[10]. Thanatin 및 이들의 유도체 (T-B1 및 T-B2)의 합성을 위한 출발물질로는 Fmoc-Met-Wang-Resin (Nova Biochem. USA)을 사용하였으며, brevinin-1 및 유도체(B-T)의 합성을 위한 출발물질로는 Fmoc-Cys(Trt)-Wang-Resin (Nova Biochem. USA)을 사용하였다. 관능기를 가진 아미노산은 trifluoroacetic acid (TFA)로 제거가능한 보호기가 붙은 Fmoc-아미노산을 사용하였다 (tert-butyl: Ser, Thr, trityl: Asn, tert-butyloxycarbonyl: Lys, pmc: Arg). Fmoc-아미노산의 coupling은 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 및 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)을 이용하였다. 펩타이드 사슬의 연장을 종료한 후, 보호기의 제거 및 수지로 부터의 펩타이드의 분리를 위하여, 보호 펩타이드-수지는 탈보호용액 (조성: 88% trifluoroacetic acid, 2.5% phenol, 2.5% thioanisole, 2.5% H₂O, 2.5 % 1, 2-ethanedithiol, 2% triisopropylsilane, v/v)으로 처리하였다. 이렇게 얻어진 탈보호되고 수지로부터 분리된 crude peptide들은 정제형의 C₁₈ column을 사용한 HPLC로 정제하였다. 정제된 펩타이드들의 순도는 분석역상그래프(analytical RP-HPLC)로 분석하여 단일 피크임을 확인하였다. 또한 정제 펩타이드의 농도결정을 위하여 펩타이드를 일정량 6N-염산으로 110°C에서 22

시간 가수분해 한 후, 용액을 감압농축하여 제거하고 잔사를 0.02 N 염산 포함한 수용액에 녹인 후, 아미노산 분석기 (HITACHI 8500A, JAPAN)에 적용하여 정제 펩타이드의 아미노산 조성 및 양을 측정하였다.

항균활성 측정

본 연구에서 합성 펩타이드 항균활성측정에 사용한 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, *Bacillus subtilis* KCTC 1918, *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621는 생명공학연구소 Korean Collection for Type Culture로부터 분양받았다. 박테리아는 LB에서 mid-log phase까지 배양하였다. 펩타이드는 1% Bacto-peptone에 희석하여 0.22 μm 필터로 멸균하여 사용하였다. 96웰 microtiter plate (Nunc)에 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 100 μl씩 넣고, 여기에 *E. coli*가 포함된 배지를 100 μl씩 가한 후, 37°C에서 하루밤 방치하여 하였다 (웰당 박테리아수: 2 × 10⁶ CFU/ml). 620 nm에서 흡광도를 측정하고, 흡광도가 나타나지 않는 농도를 최저성장억제농도(MIC: minimal inhibitory concentration)로 결정하였다.

항진균활성 측정

펩타이드의 항진균 활성측정에 사용된 균주로는 병원성 진균인 *Aspergillus flavus* KCTC 1375, *Aspergillus fumigatus* KCTC 6145 및 *Aspergillus niger* KCTC 2025를 사용하였다. 진균수는 96웰 microtiter plate에 각 웰당 2 × 10³ cell가 되도록 진균을 포함한 YM배지 100 μl 분주한 후, 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 10 μl씩 넣고, 30°C 배양기에서 24시간 방치하였다. 그리고 난 후, 10 μl의 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 용액[5 mg of MTT/ml of PBS (pH 7.4)]을 각각의 웰에 넣고 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. MTT에 의하여 생성된 Formazan crystal들을 용해하기 위해 0.02N HCl이 포함된 20% SDS를 30 μl를 넣은 후, 37°C에서 16시간 방치한다. 각 웰의 흡광도를 ELISA reader (Molecular Devices E_{max}, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

인지질막 응축활성(phospholipid-aggregating activity) 측정

펩타이드의 인지질막 응축활성을 측정하기 위하여 HEPES 완충용액 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4)에 현탁된 최종농도가 50 mM의 phosphatidylcholine (PC)/phosphatidylserine(PS) (4:1, w/w)의 인지질막을 sonication process로 제조하였다[6, 9]. 일정량의 인지질막 현탁액에 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 혼합하고, 일정시간 경

Table 2. Antibacterial activities of thanatin, brevinin-1, and their analogues

Peptides	Bacterial cells: MIC (μM)					
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>
thanatin	12.5	0.78	0.78	25	25	25
T-B1	12.5	6.25-12.5	6.25	12.5-6.25	12.5	25.0
T-B2	50	50	50	50	50	> 50
brevinin-1	3.125	3.125	1.56-3.125	1.56-3.125	1.56	1.56
B-T	6.25	12.5	6.25-12.5	6.25-12.5	6.25	6.25-12.5

Table 3. Antifungal activities of thanatin, brevinin-1, and their analogues

Peptides	Pathogenic fungi: MIC (μM)		
	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>
thanatin	6.25	3.125	6.25
T-B1	12.5	12.5	12.5
T-B2	50	50	50
brevinin-1	12.5	25	12.5
B-T	12.5	25	25.0

과된 후, 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 펩타이드의 항암 활성은 사람의 소세포 폐종양세포 (human small cell lung cancer cells)에 대한 50% 성장억제농도 (50% growth inhibition concentration)로 나타내었다.

Circular Dichroism (CD) 측정

펩타이드의 CD 스펙트럼은 J 720 spectropolarimeter (Jasco, Japan)를 사용하여 측정하였다. 모든 펩타이드 샘플은 분석하는 동안 25°C를 유지 시켰다. 1 mm의 path-length cell을 사용하였으며, 샘플당 0.1 mg/ml로 190~250 nm에서 연속적으로 4번 측정하였다. 세포막을 모방하는 조건에서 2차구조를 측정하기 위하여 10 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)을 포함한 30 mM SDS에서 측정하였다. CD 스펙트럼의 측정을 위한 펩타이드의 농도는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였다. Mean residue ellipticity (θ)는 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 로 나타내며, $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} (\text{MRW}/10lc)$ 로 나타낸다. $[\theta]_{\text{obs}}$ 는 millidegree로 측정되는 ellipticity를 의미하며, MRW는 펩타이드의 mean residue molecular weight를 의미한다. c 는 샘플의 농도(mg/ml)를 나타내고, l 은 cell의 optical pathlength(cm)를 나타낸다[3, 13-15].

Brevinin-1 및 thanatin에 의한 *E. coli*의 세포벽 파괴능 측정

Brevinin-1 및 thanatin의 *E. coli*에 대한 항균활성이 *E. coli*의 세포벽의 파괴에 의한 것인지를 조사하기 위하여 펩타이드의 투여에 의하여 방출되는 β -lactamase의 활성을 측정하였다[5, 7]. *E. coli*를 ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 포함한 LB에 log phase로 배양한 후, 세포를 집균하고

phosphate-buffered saline (PBS; 35 mM phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.0)으로 씻는다. 최종 세포농도가 600 nm에서 흡광도 1.0이 되도록 PBS로 resuspension시킨 후, 펩타이드를 가하고 37°C에 incubation시킨 후, 투여 펩타이드의 농도별 또는 투여시간별에 따른 cell-free supernatant에 존재하는 β -lactamase활성을 ampicillin의 decomposition에 의하여 결정하였다.

결과 및 고찰

항균 항진균활성

Table 2 및 Table 3에 합성 펩타이드의 항균 및 항진균 활성은 최소성장억제농도로 나타내었다. Thanatin의 Rana box 위치에 B의 서열인 KITKK을 도입시킨 T-B1 유사체는 5종의 세균 및 3종의 병원성 진균에 대하여 항균 및 항진균 활성 저하를 보였다. 특히, 그람 음성균인 *S. typhimurium* 및 *P. aeruginosa*에 있어서는 8~16배의 항균활성의 저하를 나타내었다. Brevinin-1의 Rana box 위치에 thanatin의 서열인 NRRTGK을 도입시킨 B-T 유사체는 thanatin보다 2~4배의 항균 및 항진균활성의 저하를 나타내었다. 따라서 균주마다 약간의 차이는 있지만 대체적으로 항균 및 항진균활성에 있어서는 brevinin-1보다 thanatin의 Rana box에 해당하는 염기서열이 활성에 더 중요한 영향을 준다는 사실을 알았다.

T-B1 유사체에 꼬리서열인 QRM을 제거한 T-B2 유사체는 T-B1 유사체보다 모든 세균 및 진균에 대하여 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 thanatin의 꼬리 서열인 QRM은 항균 및 항진균 활성에 있어서 중요한 역할을 담당한다는 사실을 알았다.

항암활성

Table 4에 사람의 소세포 폐암세포주에 대한 항암활성을 IC_{50} 값으로 나타내었다. Thanatin의 항암활성은 펩타이드 100 μM 에서도 전혀 항암활성을 나타내지 않았으며, T-B1은 100 μM 에서 IC_{50} 값을 나타내는 약간의 활성의 증가를 보였다. 또한 brevinin-1은 IC_{50} 값이 1.0~3.0 μM 으로 높은 항암활성을 나타내었으며, brevinin-1의 Rana box 서열을 도입시키더라도 항암활성에는 변화를 주지 않았다. 따라서

Table 4. Antitumor activity of thanatin, brevinin-1 and their analogues against human small cell lung cancer cells

Peptides	Human SCLC cells : IC ₅₀ (μM)		
	NCI-H69	NCI-H128	NCI-H146
thanatin	> 100	> 100	> 100
T-B1	100	100	100
T-B2	> 100	> 100	> 100
brevinin-1	1.5	2.0	3.0
B-T	2.0	2.0	3.0

brevinin-1의 항암활성에는 *Rana box* 서열보다는 소수성 잔기가 많이 포함된 긴 아미노말단의 서열이 중요하다는 사실을 알았다.

인지질막 응축활성

Fig. 1에 phosphatidylcholine (PC) 및 phosphatidylserine (PS)이 4:1(w/w)로 구성된 음이온성 인지질막에 대한 펩타이드에 유도되는 인지질막 응축활성을 나타내었다. 항암활성에서와 마찬가지로 brevinin-1 및 B-T 유사체는 거의 같은 정도의 높은 응축활성을 나타낸 반면에 thanatin, T-B1 및 T-B2는 거의 응축활성을 나타내지 않았다. 이 결과는 항암활성의 결과와 공통점을 가지고 있다. brevinin-1은 thanatin과는 달리 아미노말단 쪽에 소수성 아미노산을 많이 함유하고 있으므로 hydrophobicity가 높으며, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 SDS 용액에서 brevinin-1이 thanatin보다는 전형적인 α-helical structure를 갖는 펩타이드인 것을 알 수 있었다. 이와같이 brevinin-1은 지질막에서 α-helix 구조를 취하며, 또한 지질막과의 파괴활성에 중요한 역할을 담당하는 소수성 아미노산이 brevinin-1은 thanatin보다

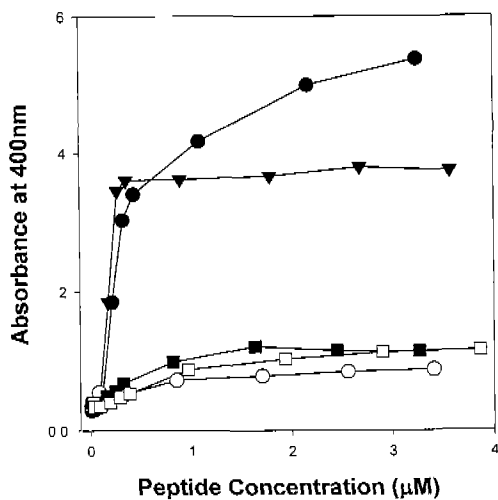


Fig. 1. Monitoring the phospholipid vesicle (PC/PS, 4:1) aggregation induced by thanatin (○), T-B1(■), T-B2 (□), brevinin-1 (○), and B-T (△).

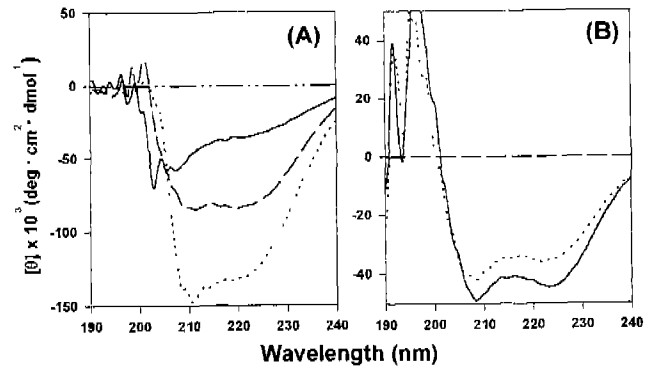


Fig. 2. CD spectra of thanatin, brevinin-1 and its analogues in 30 mM SDS containing 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.2. (A): thanatin (—), T-B1(---), T-B2 (.....), (B): brevinin-1 (—), B-T (.....).

아미노말단쪽에 많이 존재하는 구조적인 특징이 인공모델 막 및 종양세포의 사멸에 높은활성을 나타내는 것으로 생각된다.

SDS micelle상에서의 펩타이드 구조

세포막을 모방하는 조건인 sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액에서 각 펩타이드의 CD 스펙트럼을 Fig. 2에 나타내었다. Thanatin은 약한 α-helix구조를 취하며 Thanatin의 *Rana box*에 brevinin 1의 서열인 KITKK를 도입한 B-T1은 α-helicity가 증가하였다. B-T1 유사체에서 thanatin의 꼬리서열을 제거한 B-T2는 더욱더 α-helicity가 증가하였다. Brevinin-1은 CD스펙트럼에서 222 nm 및 208 nm에서 최소값을 갖는 전형적인 α-helical structure를 나타내었다. 또한 brevinin-1의 *Rana box*에 thanatin의 서열인 NRRTGK를 도입한 B-T 유사체는 약간의 α-helicity가 감소함을 보였다. 따라서 B-T1 및 B-T2에서의 α-helicity의 증가는 항균, 항진균 및 항암활성에 영향을 미치지 않았으나, B-T에서의 α-helicity의 감소는 항균활성의 감소에 영향을 주었다. 따라서 이 결과는 brevinin-1에 있어서의 α-helicity가 항생활성에 중요한 역할을 한다는 사실을 의미한다.

Brevinin-1 및 thanatin에 의한 E. coli의 세포벽 파괴능 효과

Brevinin-1과 thanatin의 E. coli에 대한 항균활성의 작용기작을 조사하기 위하여 brevinin-1과 thanatin에 대한 E. coli의 세포벽 파괴능을 측정하였다. β-lactamase는 E. coli의 periplasmic space에 존재하는 효소로서 E. coli의 세포벽의 파괴활성의 실험에서 indicator로 주로 사용된다. 따라서 펩타이드를 농도별 투여한 후 일정시간 또는 일정량의 펩타이드를 투여한 후 시간경과에 따라 방출되는

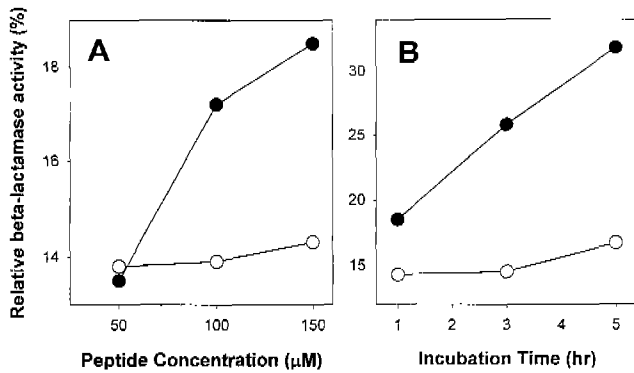


Fig. 3. Effect of thanatin (●) and brevinin-1(○) in the disruption of outer membrane of *E. coli*. (A) β -lactamase activity depending on peptide concentration. (B) β -lactamase activity depending on incubation time at 150 μ M of the peptide.

β -lactamase 효소활성을 측정하였다 (Fig. 3). 그 결과, brevinin-1에 비하여 thanatin이 *E. coli*의 세포벽 파괴효과가 높음을 알수 있었다. 그리고 방출된 β -lactamase 효소활성은 처리하는 반응시간 및 펩타이드 농도와도 상관관계가 존재하였다. 따라서 brevinin-1과 달리 thanatin의 *E. coli*에 대한 항균활성은 세포벽에 대한 파괴효과에 의한것으로 여겨진다.

요 약

Brevinin-1 및 thanatin의 카르복실말단의 *Rana* box의 아미노산 서열 및 thanatin의 꼬리부분의 아미노산 서열이 항생활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, thanatin 및 brevinin-1의 *Rana* box위치에 아미노산 서열변화를 유도한 펩타이드를 고상법에 의하여 합성하고 이들의 항균, 항진균, 항암활성 및 음이온성 인지질막 응축활성을 측정하였다. Brevinin-1보다 thanatin의 *Rana* box의 염기성서열이 항균 및 항진균활성에 더 중요한 영향을 주었으며, thanatin의 꼬리 서열인 QRM은 항균 및 항진균 활성에 모두 중요한 역할을 담당한다는 사실을 알았다. Brevinin-1의 항암활성 및 인지질 응축활성에는 *Rana* box서열의 서열보다는 소수성 잔기가 많이 포함된 긴 아미노말단의 서열이 중요하다는 사실을 알았다. 세포막을 모방하는 조건인 30 mM SDS용액에서 thanatin의 *Rana* box에 brevinin-1의 서열을 도입(T-B1)하고 T-B1유사체에서 thanatin의 꼬리서열을 제거함(T-B2)으로서 α -helicity가 증가함을 보였다. Brevinin-1은 같은 조건에서 전형적인 α -helical structure를 나타내었으며 brevinin-1의 *Rana* box에 thanatin의 서열을 도입(B-T 유사체)함으로서 α -helicity가 감소함을 보였다. 즉 B-T1 및 B-T2에서의 α -helicity의 증가는 항균, 항진균 및 항암활성에 영향을 미치지 않았으나, B-T에서의 α -helicity의 감소는 항균활성의 감소에 영향을 미치는 것으로 보아

brevinin-1의 α -helicity는 항생활성에 중요한 역할을 한다는 사실을 알았다. 또한 thanatin이 brevinin-1에 비하여 높은 β -lactamase 방출효과를 나타내는 것으로 보아 thanatin의 *E. coli*에 대한 항균활성은 세포벽에 대한 파괴효과에 의한 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 과학기술부 특정연구개발사업 (NB 0810) 및 농림수산부 농림기술개발사업(AG 620M)의 연구비에 의하여 수행한 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bevins, C. L. and M. Zasloff. 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 395-414.
2. Boman, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 61-92.
3. Chen, Y. -H., J. T. Yang, and K. H. Chau 1974. Helix and β -form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**: 3350-3359.
4. Fehlbaum, P., P. Bulct, S. Chernysh, J. -P. Briand, J. -P. Rousset, L. Letellier, C. Hetru, and J. A. Hoffmann. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1221-1225.
5. Kang, J. H., M. K. Lee, K. -L. Kim, and K. -S. Hahm. 1996. Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *Int. J. Peptide Protein Res.* **48**: 357-363.
6. Kang, J. H., S. Y. Shin, S. Y. Jang, M. K. Lee, and K. -S. Hahm. 1998. Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8)-magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues. *J. Peptide Res.* **52**: 45-50.
7. Liu, J. and C. T. Walsh. 1990. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Escherichia coli*: A periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4028-4032.
8. Maloy, W. L. and U. P. Kari. 1995. Structure-activity studies on magainin 2 and other host defense peptides. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **37**: 105-112.
9. McLean, L. R., K. A. Hagaman, T. J. Owen, and J. L. Krstenansky. 1991. Minimal peptide length for interaction of amphipathic α -helical peptides with phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry* **30**: 31-37.
10. Merrifield, R. B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341-347.
11. Morikawa, N., K. -I. Hagiwara, and T. Nakajima. 1992. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana Brevipoda Porsa*. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.* **189**: 184–190.
12. Park, J. M., J. -E. Jung, and B. J. Lee. 1994. Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 948–954.
 13. Shin, S. Y., M. K. Lee, K. L. Kim, and K. -S. Hahm. 1997. Structure-antitumor and hemolytic activity cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J. Peptide Res.* **50**: 279–285.
 14. Shin, S. Y., J. H. Kang, M. K. Lee, S. Y. Kim, Y. Kim, and K. -S. Hahm. 1998. Cecropin A-magainin 2 hybrid peptides having potent antimicrobial activity with low hemolytic effect. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**: 1119–1126.
 15. Shin, S. Y., J. H. Kang, and K. -S. Hahm. 1999. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J. Peptide Res.* **53**: 82–90.
 16. Simmaco, M., G. Mignogna, D. Barra, and F. Bossa. 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. *J. Biol. Chem.* **269**: 11956–11961.
 17. Suh, J. -Y., K. -H. Lee, S. -W. Chi, S. -Y. Hong, B. -W. Choi, H.-M. Moon, and B. -S. Choi. 1996. Unusually stable helical kink in the antimicrobial peptide - A derivative of gae-gurin. *FEBS Lett.* **392**: 309–312.

(Received October 17, 1999)