

사슬이합체의 헬릭스-코일 구조에 미치는 온도와 변성시약의 영향

金永九 · 朴炳錫[†]

한국과학기술연구원 응용과학연구부

[†] 서울대학교 자연과학대학 화학과

(1996. 2. 7 접수)

The Effects of Temperature and Denaturant on the Helix-Coil Transition of Chain-Dimer

Younggu Kim and Hyungsuk Pak[†]

Division of Applied Science, Korea Institute of Science and Technology,

P.O. Box 131 Cheongyang, Seoul, Korea

[†] Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received February 7, 1996)

요 약. 결합성 사슬이합체를 형성할 수 있는 올리고펩티드-(HPPHPPP)_n- (H: 소수성 아미노산, P: 친수성 아미노산)는 온도, 수소이온 농도, 이온세기, 변성시약 등에 의해 구조적인 변화가 가능하다. 본 연구에서는 변성시약과 온도에 의한 올리고펩티드의 전이 현상을 이론적으로 고찰하였다. 사슬이합체로는 올리고펩티드 20R, 변성시약으로는 구아니듐-염산을 사용하였다(20R에는 사슬 내의 정전기적 반발력이 10개가 존재하고, 사슬사이의 정전기적 반발력이 10개가 존재한다). 변성 시약에 의한 올리고펩티드의 나선에서 코일로의 전이는 급격한 것으로 보아, 변성이 일어나는 전이상태에서 올리고펩티드들은 완전한 나선구조와 무질서한 코일구조로만 되어있다. 반면에 온도에 의한 전이는 변성시약에 의한 전이보다 완만하게 일어난다. 낮은 온도에서 긴 나선 구조를 가지는 올리고펩티드가 짧은 나선 구조를 가지는 것보다 다량으로 존재한다. 온도가 증가할수록 부분적으로 변성된 분자들의 몰분율이 증가하여, 전이가 일어나는 온도에서 부분적으로 변성된 올리고펩티드가 널리 분포되어 있다.

ABSTRACT. The conformational transitions of oligopeptide -(HPPHPPP)_n- (H: hydrophobic amino acid, P: polar amino acid) which becomes cross linked-dimer are detected at various temperatures, pHs, ionic strengths, and the concentrations of denaturant. In this study, the transitions of oligopeptide due to denaturant, and those due to temperature are theoretically studied. Oligopeptide 20R as chain-dimer and guanidium-HCl as denaturant are used(20R, which contains 10 interchain and /or 10 intrachain electrostatic repulsions. Alpha helix-coil transitions by denaturant are very steep. This shows that the denaturations have transition states of, presumably all helical forms and random coils. The transitions by temperature are smoother than those by the concentration of denaturant. At low temperature the oligopeptides which contain long helices exist more than those which contain short helices. As temperature rises, the mole fractions of the partially denatured oligopeptides increase. So the partially denatured oligopeptides are widely distributed at the transition temperature.

서 론

생체에서 생명현상의 가장 중요한 역할 중에 하

나를 담당하고 있는 단백질은 역동적인 구조를 가지고 있음이 알려졌다. 역동적인 구조에 관한 연구는

NMR과 컴퓨터를 이용하는 모의 실험 등으로 활발히 진행되고 있다. 이러한 단백질의 구조는 온도,¹² 이온세기,³ 수소이온의 농도,⁴ 용매의 종류,⁵ 변성시약⁷⁻¹⁰ 등의 물리적인 조건에 따라 그 활성이 변화한다. 온도 등에 의하여는 단백질의 삼차원적인 구조의 변화가 서서히 일어나지만 변성시약에 의하여는 구조 전체가 전이농도에서 급격히 변화한다는 실험적인 현상들이 알려져 있다.⁹ 삼차구조의 성질을 가장 간단하게 나타낼 수 있는 모형으로는 나선 구조로 된 사슬이 여러 개 꼬여 있는 꼬인-코일의 사슬다합체이다. 사슬이합체 또는 사슬다합체는 여러 물리적인 조건하에서 변성이 가능하다.

Skolnick 등은 사슬이합체에 관한 나선-코일로의 전이에 관한 이론을 세운 바 있으며,¹¹⁻¹⁶ 본 연구진은 올리고펩티드의 구조에서 중요한 역할을 하는 dangling H-bond를 고려하여 여러 종류의 사슬다합체가 공존하는 계에 대한 이론을 얻어 전이현상을 설명한 바 있다.¹⁷⁻¹⁹ 그러나 사슬이합체를 형성할 수 있는 올리고펩티드의 역동적인 구조에 관한 연구는 많이 이루어지지 않은 상태이다. 역동적인 구조를 연구하는 방법은 삼차구조를 연구하는 것과 동일하게 NMR, MD 모의실험^{21,22} 등이 있다. 올리고펩티드의 역동적인 구조를 연구하는 이론적인 방법 중의 하나는, 주어진 조건에서 단일 사슬, 사슬이합체 사슬다합체로 존재하는 올리고펩티드의 물 분율과 각각의 나선수소결합수가 어떻게 분포하는가를 정량적으로 고찰하는 것이다. 본 연구에서는 결합성 사슬이합체의 온도에 의한 완만한 전이와 변성시약에 의한 급격한 전이를 다루었다. 올리고펩티드의 물 분율과 나선도의 식을 유도한 후, 온도와 변성시약에 관한 결합성 사슬이합체의 전이현상의 진행과정을 비교하고자 하였다.

이 론

변성시약에 의한 결합성 사슬이합체의 전이 이론.
 일차구조-(HPPHPPP)_n-으로 조성된 올리고펩티드는 소수성상호인력에 의하여 사슬이합체의 구조를 가질 수 있다. 두 올리고펩티드에 Cysteine이 존재하면 S-S 결합이 가능하다. 이러한 S-S 결합에 의하여 생성된 결합성사슬이합체는 사슬이합체의 농도의 변화에 무관하게, 변성시약이 없으면 낮은 온

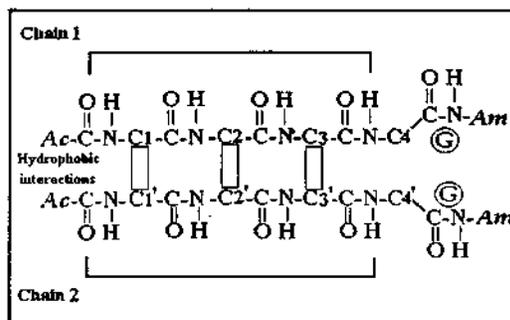


Fig. 1. The linear structure of cross-linked dimer: two α -carbon of oligopeptides have random coil conformations.

도에서는 항상 나선을 구조를 가진다. 순수한 사슬이합체A2 분자로만 된 것의 통계가중치는 다음과 같다.¹⁷⁻¹⁹

$$Z_0 = \sigma^2 \xi^{2N-4} w^N \quad (1)$$

여기서 σ 는 나선개시상수, ξ 는 나선안정화상수, w 는 소수성상호인력배개변수이다. 올리고펩티드의 사슬 길이 $N=3$ 이면 통계가중치 $Z_0 = \sigma^2 \xi^2 w^3$ 이 된다. 결합성사슬이합체 수용액에서 사슬 1과 사슬 2 사이의 C4와 C4' 위치에 변성시약 분자가 결합하면 Fig. 1에 보여주는 바와 같이 소수성상호인력이 배제되어, 올리고펩티드에 있는 아미노산의 C4와 C4'는 무질서한 코일구조를 가진다. Fig. 1에서 변성시약인 G 분자가 C4와 C4'에 각각 상호작용을 하면 올리고펩티드 사슬이합체의 통계가중치는 다음과 같이 계산된다. 각 올리고펩티드 마다 $\sigma \xi$ 이 존재하며, 소수성상호인력은 3개가 있으므로 w^3 이 되며, 변성시약과 각 올리고펩티드 사이의 상호인력은 S_1^2 으로 표현된다. 사슬이합체의 통계가중치는 $\sigma^2 \xi^2 w^3 S_1^2$ 이 된다. 두 사슬 사이의 σ 탄소 사이에 존재하는 소수성 상호작용 및 나선내 수소결합이 제거되고 펩티드결합이 존재하는 위치와 변성시약 사이에 수소결합 등과 같은 친수성상호작용이 존재하게 될 때 에너지 변화가 있게 되는데, 이 에너지를 나타내는 통계가중치가 S_1 이다. 이러한 S_1 을 다음과 같은 식으로 표현할 수 있다.

$$S_1 = \exp(-\Delta G/RT) \exp(-\Delta H/RT + \Delta S/R) \quad (2)$$

자유에너지 변화량 ΔG 는 다음과 같다. 변성시약

분자 2개가 각 올리고펩티드의 α 탄소와 결합할 때의 에너지(G_j)와, 변성시약이 없는 수용액에서 소수성 상호인력이 각 올리고펩티드의 α 탄소 사이에 존재하는 에너지(G_0)와의 차이이다. 변성시약이 없는 경우에는 $G_j = G_0$ 이 되므로 $S_j = 1.00$ 이 된다. 나선안정화상수는 다음의 식으로 정의된다.

$$\xi = \exp(-\Delta G'/RT) = \exp(-\Delta H'/RT + \Delta S'/R) \quad (3)$$

$\Delta G'$ 은 올리고펩티드에 있는 α 탄소가 무질서한 코일구조에서 α 나선구조로 전이할 때의 자유에너지 변화량이다. 무질서한 코일구조의 엔트로피가 나선구조의 엔트로피보다 크기 때문에 엔트로피 변화량 $\Delta S < 0$ 이지만 온도가 낮아지면 $\Delta G' < 0$ 이 되므로 나선안정화상수 ξ 는 1보다 큰 값을 가진다. 소수성 상호인력상수 w 는 다음의 식으로 정의된다.

$$RT \ln w = B \ln T + A_0 + A_1 T \quad (4)$$

(4)식의 B , A_0 , A_1 은 실험적으로 측정되어 결정되는 양이다.¹¹⁻¹⁶ 소수성상호인력매개변수는 온도의 증가에 따라 감소하다가 서서히 증가하는 물리량이다. 물분자와 변성시약은 올리고펩티드의 펩티드(-CONH-)와 수소결합 등의 친수성 상호인력이 작용한다. 사슬이합체에서 낮은 온도($\xi \gg 1$), 큰 소수성 상호인력상수($w \gg 1$)이면 올리고펩티드는 나선으로 존재하는 구조가 무질서한 구조로 존재하는 것보다 열역학적으로 안정하다. 그리하여 (1)식에 있는 통계가중치를 가지는 사슬이합체의 구조로만 존재하여 나선도가 1.00에 가깝게 된다. 반면에 큰 변성능력($S_j \gg 1$)을 가지는 변성시약이 올리고펩티드 용액에 존재하면 다음과 같은 화학적 평형이 가능하다.



단계별로 이루어지는 화학반응식에 관한 화학평형상수는 K_j' 로 표현하였다. A_2G_{2j} (2개의 변성분자가 사슬이합체에 결합한 분자)로 있는 올리고펩티드의 물분율을 g_j 라 하면 다음 식이 성립된다.

$$\sum_{j=0}^N g_j = 1 \quad (6)$$

Table 1. Partition function of chain dimer where denaturant coexists

	Dimer conformations	Statistical weight
Z_0	hhhhhh...hhhhh hhhhhh...hhhhh	$\sigma^2 \xi^{2(N-4)} w^N$
Z_1	chhhhh...hhhhh chhhhh...hhhhh	$\sigma^2 \xi^{2(N-6)} w^{(N-1)} S_1^2$
Z_j	hhhhhh...hhhhc hhhhhh...hhhhc cc...cchh...hhhhh cc...cchh...hhhhh cc...chhh...hhhhc cc...chhh...hhhhc	$\sigma^2 \xi^{2(N-6)} w^{(N-1)} S_1^2$ $\sigma^2 \xi^{2(N-2j-4)} w^{(N-j)} S_1^{2j}$ $\sigma^2 \xi^{2(N-2j-4)} w^{(N-j)} S_1^{2j}$

	chhhh...hhcc...cc chhhh...hhcc...cc hhhhh...hccc...cc hhhhh...hccc...cc	$\sigma^2 \xi^{2(N-2j-4)} w^{(N-j)} S_1^{2j}$ $\sigma^2 \xi^{2(N-2j-4)} w^{(N-j)} S_1^{2j}$
Z_N	cccccc...cccccccc cccccc...cccccccc	S_1^{2N}

h: helical conformation, c: coil conformation which interacts with denaturant molecule G, respectively.

g_0 를 A_2 로만 존재하는 것의 물분율, Z_k 를 사슬이합체에 2k개의 변성 시약 분자가 붙어서 부분적으로 변성된 것의 통계가중치라 하면, 올리고펩티드의 상태함은 Table 1과 같은 방법으로 구할 수 있다. Table 1에서 코일 구조 c는 올리고펩티드의 α 탄소에 변성 분자 G가 결합한 상태를 의미한다. A_2G_{2j} 분자의 상태함은 다음과 같이 된다.

$$Z_N = (j+1) \sigma^2 \xi^{2(N-2j)} w^{(N-j)} S_1^{2j} \quad (7)$$

j 는 0에서 $N-1$ 까지 가능하며, 변성시약에 의하여 완전히 무질서한 코일로 전이된 올리고펩티드의 상태함(Z_N)은 S_1^{2N} 이 된다. 위의 (5-1)식에서 (5-N)식까지의 모든 분자들은 화학평형이 가능하므로 A_2G_{2j} 분자가 생성되는 단계의 화학 평형상수는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$K_j' = \frac{[A_2G_{2j}]}{[A_2G_{2(j-1)}][G]^2} = \frac{g_j}{g_{j-1}[C_1 - C_0(1-g_0)]^2} \quad (8)$$

C_0 는 변성시약에 의하여 사슬이합체가 완전히 단일 사슬로 해리되었을 때의 올리고펩티드 전체농도이며, C_1 는 변성 시약의 농도이다. 위의 (8)식에 있는

g_j 값을 구하기 위하여는 화학평형상수를 알아야 한다. 이를 위해 통계역학 이론을 사용하는 다음의 식으로 화학평형상수가 표현되므로, 각 단계마다의 화학평형상수 값을 구할 수 있다.²³

$$K_j' = \frac{u^2 Z_j}{Z_{j-1}} \quad (9)$$

u 는 n 개의 블록(α 나선인 경우에 n 은 heptad이므로 7이 된다.)으로 이루어진 올리고펩티드가 차지하는 부피이다. $u = nd^2 h$ 인데 d 는 α 나선에서 한 바퀴 회전시 생기는 나선의 지름이며 h 는 그 나선의 높이이다. u 값은 나선의 경우에 359 Å이다.²⁴ 위의 두 식 (8), (9)으로부터 다음의 식이 얻어진다.

$$g_j = g_0 (c_1 - c_0 (1 - g_0))^2 u^2 \frac{Z_j}{Z_{j-1}} \quad (10)$$

g_j 는 다음과 같이 다시 쓸 수 있다.

$$g_j = g_0 (c_1 - c_0 (1 - g_0))^2 u^{2j} \frac{Z_j}{Z_0} \quad (11)$$

(11)식을 (6)식에 대입하여 정리하면 다음의 식이 얻어진다.

$$g_0 + 2g_0 \sum_{j=1}^N (c_1 - c_0 (1 - g_0))^2 u^{2j} \frac{Z_j}{Z_0} = 1 \quad (12)$$

Z_j 는 나선개시상수, 나선안정화상수, 소수성상호인력 매개변수, 변성시약의 변성능력 등의 함수이다. 나선개시상수는 온도나 용매의 조건에 무관한 물리량으로 실험적으로 구한다.²⁵ Z_0 와 Z_j 는 상태합을 사용하여 통계열역학적으로 알 수 있으므로, 수치계산법으로 g_0 값을 얻을 수 있다. 그리하여 온도, 올리고펩티드의 농도, 변성시약의 농도에 따라 $A_2 G_{2j}$ 로 존재하는 분자의 몰분율을 (11)식을 통해 얻을 수 있고 올리고펩티드 용액의 평균나선도를 구할 수 있다. g_0 는 0에서 1 사이의 값이므로 각각의 나선도 $h_j = \frac{\partial \ln Z_j}{\partial \ln \xi} \frac{1}{(2N-4)}$ 이 되어²⁶ 전체 나선도 $h = \sum_{j=0}^N h_j g_j$ 가 된다.

온도에 의한 결합성 사슬이합체의 전이이론. 몰분자도 일종의 변성시약으로 작용할 수 있다. 몰분자와 같은 G 분자가 올리고펩티드의 골격에 상호

작용을 하면 사슬이합체의 α 탄소에 소수성 상호인력이 배제되므로 그 곳의 올리고펩티드의 α 탄소는 항상 무질서한 코일구조를 가지는 것으로 간주할 수 있다(Fig. 1 참조). 변성시약이 물분자인 경우에는 S_1 값이 1.00이므로 통계가중치는 $\sigma^2 \xi^2 w^3$ 이 된다. 본 연구진이 zipper 모형으로 사슬이합체 혹은 사슬다합체가 공존하는 계에서 얻은 상태합을 사용하면 사슬길이 N 을 가지는 올리고펩티드의 온도에 따른 상태합은 다음과 같다.

$$Z(N) = 1 + \sum_{j=0}^{N-3} (j+1) \sigma^2 \xi^{2(N-j-2)} \omega^{(N-j)} \quad (13)$$

나선도는 정의에 의하여 다음과 같다.

$$h = \frac{\partial \ln Z(N)}{\partial \ln \xi} \frac{1}{(2N-4)} = \frac{\sum_{j=0}^{N-3} (j+1) \sigma^2 (N-j-2) \xi^{2(N-j-2)} \omega^{(N-j)}}{Z(N)(N-2)} \quad (14)$$

각 사슬에 j 개의 물분자가 아미노산의 α 탄소에 상호작용을 하고 있을 때의 몰분율은 다음과 같다.

$$g_j = \frac{(j+1) \sigma^2 \xi^{2(N-j-2)} \omega^{(N-j)}}{Z(N)} \quad (15)$$

(15)식을 (11)식과 (12)식에 넣어 수치계산법으로 g_j 값들을 모두 구할 수 있다.

결과 및 논의

소수성 상호인력 매개변수의 결정. Skolnick 등에 의하여 실험적으로 얻어진 다음 식을 기초로 하여 소수성 상호인력 매개변수를 결정할 수 있었다.¹¹⁻¹⁶

$$RT \ln w = B \ln T + A_0 + A_1 T \quad (4)$$

20R(20R은 사슬이합체에 20개의 반발작용이 존재하고 있는 단백질을 의미하며, $T_m = 54^\circ \text{C}$ 이다. Fig. 2 참조)의 경우에 관하여 다음과 같은 결과를 얻었다. $\xi = \exp(-\Delta H'/RT + \Delta S'/R)$ 에 의하여 $\Delta S'$ 값은 아미노산의 종류와 상관없이 $-17.5 \text{ J/molK}^{27-30}$ 이 되어 ΔH 는 5.23 kJ/mol 이었다. $A_0 = 16191$, $A_1 = -351.912$, $B = 52.584$ (단위는 cal/mol 이다). 평균장

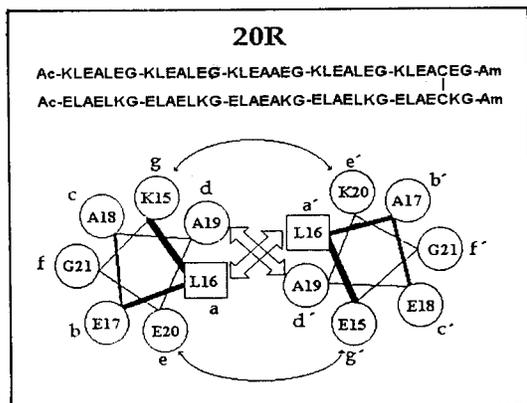


Fig. 2. The amino acid sequence and cross-sectional representation of the coiled-coil analog. Each strand contains 5 repeats and each residue in a heptad is designated by a-b-c-d-e-f-g, as shown in the 20R. Each chain is acetylated in the amino terminal ends and amidated in the carboxyl-terminal ends in order to minimize electronic interactions at the terminal ends. 20R contains 10 interchain and/ or intrachain electronic repulsions.

이론에 의한 나선개시상수(σ)는 8.52×10^{-4} 이다. 여기서 $\Delta H'$ 와 $\Delta S'$ 는 올리고펩티드에 있는 한 개의 아미노산 1몰이 무질서한 코일구조에서 α 나선으로 바뀔 때 각각 엔탈피 및 엔트로피 변화량이다.

변성 시약에 의한 전이. 적은 농도의 변성시약으로는 사슬이합체의 해리가 거의 일어나지 않다가 변성시약이 전이 농도에 도달하게 되면 급격한 전이가 일어난다. $\xi=1.04$, $w=2.40$ 이 되는 20 °C, $S_1=1.45$, $\sigma=0.000852$, $C_0=1.00 \times 10^{-4}$ M인 경우에 변성시약의 농도가 3.54 M 이상이 되어야 풀림이 일어난다는 사실은 실험적인 사실과 잘 일치한다(Fig. 3). 변성시약에 의하여 급격한 전이 현상이 존재한다는 것은, 변성시약의 영향이 전혀없는 구조와 변성시약에 의해 모두 무질서한 코일로 된 두 상태(two state)로 전이가 일어난다는 사실을 나타내 준다.³¹ 20R 올리고펩티드계물 예를 들어 고찰한 바에 따르면, 전이가 일어나는 점에서의 각 부분 변성된 것들의 몰 분율은 다음과 같다. $N=35$, $S_1=1.45$, $\xi=1.04$, $w=1.40$, $C_1=3.54$ M일 때 $g_0=0.501$, $g_N=0.498$, 그리고 부분 변성된 것들의 몰분율의 합은 0.0010에 불과하다(Fig. 4). g_0 , g_N 가 다른 g_i 보다 커서 변성시약이 전혀 끼어 있지 않은 구조와 변성시약에

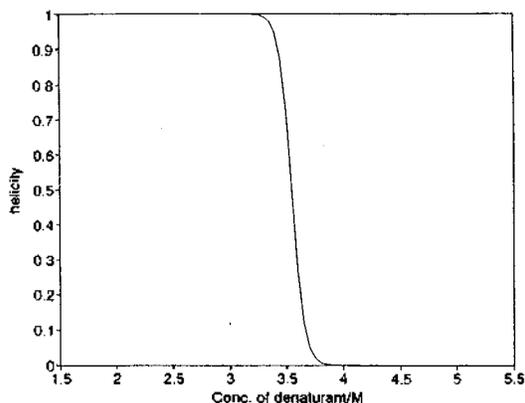


Fig. 3. Helicity of 20R vs. concentration of denaturant: $N=35$ at 20 °C.

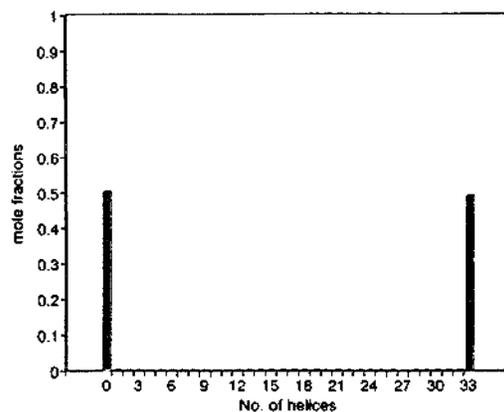


Fig. 4. The distributions of helical length of 20R in denaturing solution: $C_1=3.54$ M, $N=35$ at 20 °C.

의해 모두 무질서한 코일로 된 두 상태(two state)로도 사슬 이합체의 풀림을 잘 설명할 수 있다. 긴 사슬로 이루어진 사슬다합체라도 변성시약에 의한 전이는 변성시약의 용해도가 충분히 크다면 강하게 일어날 수 있다. 이 사실은 온도에 의한 전이는 사슬이 길어지면 전이가 불가능한 경우와는 다른 결과이다. 물분자보다 큰 변성능력을 가진 변성시약이라면 높은 농도에서 사슬이합체의 전이가 가능하다.¹⁹

온도에 의한 전이. $T_m=54$ °C를 기초로 Zimm-Bragg 변수와 소수성 상호인력 매개변수를 얻은 것을 기초로 온도에 따른 20R의 전이현상을 고찰하였다. 변성시약에 의한 전이와 다르게 좀더 완만한 전이를 가졌다.⁹ 높은 온도에서도 나선구조는 완전히

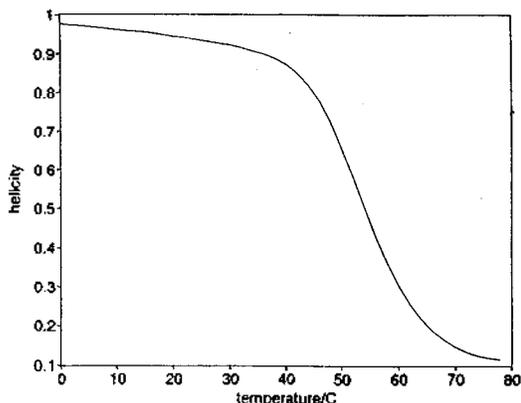


Fig. 5. Helicity vs. temperature for cross-linked dimer of 20R. The concentration of 20R is 1.00×10^{-4} M.

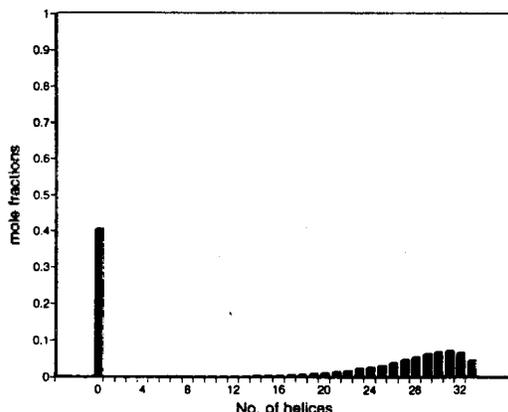


Fig. 7. The distributions of helical length of 20R at 54°C.

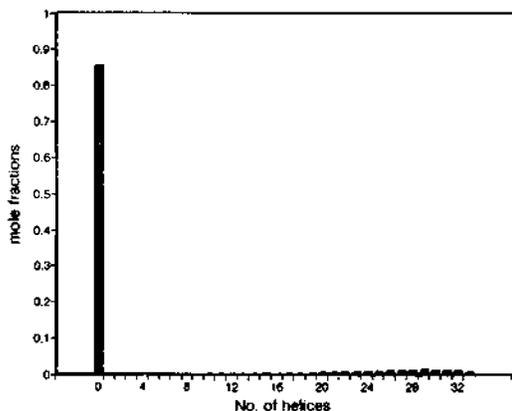


Fig. 6. The distributions of helical length of 20R at 0°C.

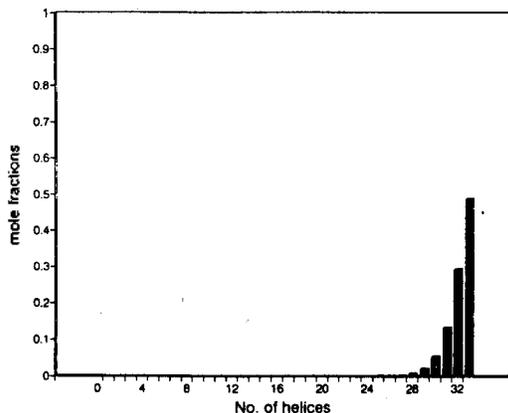


Fig. 8. The distributions of helical length of 20R at 78°C.

깨어지지 않아 나선도가 0.1이 된다(Fig. 5 참조). 나선도가 가장 높은 0°C에서도 α 나선수소결합수가 최대 값인 올리고펩티드의 몰분율(g_0)이 0.485, $g_1 = 0.295$, $g_2 = 0.13$, $g_3 = 0.054$, $g_4 = 0.021$ 이고 g_5 에서 g_N 까지의 합이 0.005가 된다. 전이가 일어나는 54°C에서는 나선수소결합수가 31인 구조가 0.0712로서 가장 높은 몰분율을 가진다. 이것은 변성시약에 의한 몰분율 분포는 두 가지 상태로만 되어 있는 것과는 다른 결과이다. 완전히 무질서한 코일구조를 가지는 것을 제외하고는, 온도가 증가할수록 가장 큰 몰분율을 가지는 올리고펩티드는 적은 나선수쪽으로 이동한다(Fig. 6~8).

이상의 내용을 요약하면 다음과 같다. 변성 시약에

의한 전이는 두 가지 상태의 구조로만 존재하며 일어나, 온도에 의한 전이는 여러가지 상태의 구조를 지나면서 일어난다. 급격한 전이현상을 가지는 올리고펩티드는 두 가지 구조만 존재하는 전이가 될 것이다.

이 연구는 1995년 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-95-3414)의 지원에 의한 것임.

인 용 문 헌

1. Goto, Y.; Fink, A. L. *J. Mol. Biol.* 1990, 214, 803.
2. Ptitsyn, O. B. *J. Protein Chemistry* 1987, 6, 273.
3. Biltonen, R. L.; Lumry, R.; Madison, V.; Parker,

- H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1412.
4. Aune, K. C.; Sadahuddin, A.; Zarleng, M. H.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 4486.
 5. Thomas, P. D.; Dill, K. A. *Protein Science* **1993**, *2*, 2050.
 6. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem. Biol.* **1968**, *23*, 121.
 7. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem. Biol.* **1968**, *24*, 1.
 8. Zhu, B.; Zhou, N. E.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. *Protein Science* **1993**, *2*, 483.
 9. Monera, O. D.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. *Protein Science* **1994**, *3*, 184.
 10. Kohn, W. D.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. *Protein Science* **1995**, *4*, 237.
 11. Holtzer, M. E.; Holtzer, A.; Skolnick, J. *Macromolecules* **1983**, *16*, 173.
 12. Skolnick, J. *Macromolecules* **1984**, *17*, 2153.
 13. Skolnick, J. *Macromolecules* **1984**, *17*, 2158.
 14. Skolnick, J. *Macromolecules* **1985**, *18*, 1535.
 15. Skolnick, J.; Holtzer, A. *Macromolecules* **1985**, *18*, 1549.
 16. Skolnick, J. *Macromolecules* **1986**, *19*, 1153.
 17. Kim, Y.; Pak, H. *J. Korean Chem. Soci.* **1994**, *38* (10), 710.
 18. Kim, Y.; Pak, H. *J. Korean Chem. Soci.* **1995**, *39* (10), 776.
 19. Kim, Y.; Pak, H. *Bull. Korean Chem. Soci.* **1996**, *40*(2) It will be published.
 20. Sloan, D. L.; Young, J. M.; Mildvan, A. S. *Biochemistry* **1975**, *14*, 1988.
 21. Ebelling, M.; Nadler, W. *Journal of the Chemical Physics* **1993**, *99*(9) 6865.
 22. Dagett, V.; Kollman, P. A.; Kuntz, I. P. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1115.
 23. Mayer, J.; Mayer, M. *Statistical Mechanics*; Wiley: New York, 1940; p 215.
 24. Skolnick, J. *Macromolecules* **1982**, *15*, 303.
 25. Qian, H.; Schellman, J. A. *Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 3994.
 26. *Cantor and Schimmel Biophysical Chemistry Part 3; The behavior of biological Macromolecules*; W. H. Freeman and Company San Francisco, 1980; p 1056.
 27. Schellman, J. A. *C. R. Trav. Lab. Carsberg Ser. Chim.* **1955**, *29*, 223.
 28. Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8069.
 29. Privalov, P. L. *Adv. Protein Chem.* **1979**, *33*, 167.
 30. Murphy, K. P.; Privalov, P. L.; Gill, S. J. *Science* **1990**, *247*, 559.
 31. Matthews, B. W.; Nicholson, H.; Becktel, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 663.