

## 중간단계의 구조적 안정성을 통한 HubWA 단백질의 접힘(folding) 반응 탐색

박순호

강릉원주대학교 치과대학 치의학과 생화학 및 분자생물학 교실, 구강과학연구소  
(접수 2022. 11. 24; 게재확정 2023. 3. 17)

### Study of HubWA Protein Folding Reaction by Measuring the Stability of Folding Intermediate

Soon-Ho Park

Biochemistry and Molecular Biology Group, Department of Dentistry, College of Dentistry and Research Institute of Oral Sciences, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung-si, Gangwon-do 25457, Korea.

E-mail: spark9@gwnu.ac.kr

(Received November 24, 2022; Accepted March 17, 2023)

**요약.** HubWA 단백질을 모델로 삼아 소수성 아미노산이 folding 반응에 끼치는 영향을 탐색하기 위하여 HubWA에 있는 I와 L을 V로 치환한 변이 단백질의 folding kinetics를 측정하였다. 변이 단백질의 folding kinetics는 HubWA 단백질과 마찬가지로 three-state on-pathway mechanism( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ , U는 unfolded 상태, I는 중간단계, N은 native 상태를 의미한다)을 따르는 것으로 나타났다. Folding kinetics 분석을 통하여 three-state 반응의 elementary 반응과 전체 반응의 자유에너지인  $\Delta G^{\circ}_{UI}$ ,  $\Delta G^{\circ}_{IN}$ ,  $\Delta G^{\circ}_{UN}$ 을 얻었고, 변이 단백질의 자유에너지와 HubWA 단백질의 자유에너지의 차( $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI} = \Delta G^{\circ}_{UI}(\text{변이 단백질}) - \Delta G^{\circ}_{UI}(\text{HubWA})$ ,  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UN} = \Delta G^{\circ}_{UN}(\text{변이 단백질}) - \Delta G^{\circ}_{UN}(\text{HubWA})$ )의 비인  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$ 를 통하여 중간단계가 전체 folding 반응에 끼치는 영향을 각 소수성 잔기 별로 알아볼 수 있었다. HubWA의 입체구조에서  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet가 상호작용하는 소수성 코어에 위치하는 아미노산인 I3, I13, L15, I30, L43, I61, L67을 V로 치환한 변이 단백질의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이  $\sim 0.5$ 로 나타난 점은 이들 아미노산이 중간단계에서 native 상태보다는 느슨하지만 비교적 견고한 구조를 이루는 것으로 해석되었다. HubWA 입체구조에서  $\alpha$ -helix의 아미노말단에 위치하는 I23, 특정 이차구조가 없는 부위에 위치하는 I36,  $\beta$ -strand 5의 카복실말단에 위치하는 L69를 V로 치환한 변이 단백질의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.4 이하로 나타난 것은 이들 아미노산 잔기가 중간단계에서는 비교적 느슨한 구조를 이루다 중간단계에서 native 단계로 진행되는 folding 과정의 후반부에 HubWA의 입체구조에 견고하게 편입되는 것으로 해석되었다. HubWA의 입체구조에서 두 번째  $\beta$ -strand의 카복실말단에 위치한 V17, 짧은 네 번째  $\beta$ -strand의 카복실말단에 위치한 L50, 짧은  $3_{10}$ -helix의 아미노말단에 위치한 L56이 중간단계에서 서로 상호작용을 하는 점은 이들 아미노산을 V로 치환한 변이 단백질의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.8 이상으로 나타난 점을 통하여 알 수 있었다. L50과 L56은 짧은  $\beta$ -strand와  $3_{10}$ -helix를 제외하고 특별한 이차구조가 존재하지 않는 부위(46번째 아미노산 잔기부터 62번째 아미노산 잔기 까지)에 위치하는데, 이들 아미노산이 V17과 더불어 folding 반응의 초기에 견고하게 상호작용을 하는 것은 HubWA 단백질이 folding 과정의 초기에 응집체를 형성하는 것을 막아주는 역할을 하는 것으로 생각되었다.

**주제어:** 소수성 상호작용과 단백질 접힘, 단백질 접힘 중간단계

**ABSTRACT.** The contribution of hydrophobic residues to the protein folding reaction was studied by using HubWA variant proteins with I and L to V mutation. Folding kinetics of all V variant proteins was observed to be satisfied by a three-state on-pathway mechanism,  $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ , where U, I, and N represent unfolded, intermediate, and native state, respectively. Three-state folding reaction was quantitatively analyzed and the free energy of folding of each elementary reactions and overall folding reaction,  $\Delta G^{\circ}_{UI}$ ,  $\Delta G^{\circ}_{IN}$ , and  $\Delta G^{\circ}_{UN}$ , were obtained. From the ratio of free energy difference between the variant protein and HubWA,  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI} = \Delta G^{\circ}_{UI}(\text{variant protein}) - \Delta G^{\circ}_{UI}(\text{HubWA})$  and  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UN} = \Delta G^{\circ}_{UN}(\text{variant protein}) - \Delta G^{\circ}_{UN}(\text{HubWA})$ ), the contribution of hydrophobic residues to HubWA folding was analyzed. The residues which are located in the hydrophobic core between  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet, I3, I13, L15, I30, L43, I61 and L67, showed  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  value of  $\sim 0.5$  when each of these residues was mutated to V, indicating that these residues form relatively solid hydrophobic core in the intermediate state. Residues located at the end of secondary structures and loop, I23, L69 and I36 showed  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  value below 0.4 when each of these residues was mutated to V, indicating that the region containing these residues are loosely formed in the intermediate state. V17A, L50V and L56V showed fairly high  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  value of  $\sim 0.8$ . Since L50 and L56 are located in the region containing long loop (residue 46 to 62), it is suggested that the high  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  value of these residues prevents the formation of aggregate at the early stage of folding reaction.

**Key words:** Hydrophobic interactions and protein folding, Protein folding intermediate

## 서 론

단백질 접힘(folding) 반응은 아미노산이 펩티드 결합으로 연결된 사슬 형태의 단백질이 생물학적 기능을 수행하는 고유한 삼차원 입체구조를 이루는 과정이다. 단백질의 삼차원 입체구조는 단백질의 native 구조라 하며 비공유결합인 소수성 상호작용, 수소결합, 정전기적 상호작용, 반데르 발스 결합에 의하여 안정성을 유지한다. 단백질의 native 삼차원 입체구조에 존재하는 비공유결합은 native 결합으로 불린다. 따라서 단백질의 folding 과정은 삼차원 입체구조를 안정화하는 native 결합이 형성되는 과정을 연구하면 이해할 수 있을 것으로 여겨진다. 오늘날 단백질 folding에 관한 실험적 정보를 바탕으로 단백질의 삼차원 입체구조를 예측하는 알고리즘이 개발되고 있으며 최근에는 인공지능을 이용한 예측 방법이 단백질의 삼차원 입체구조를 실제로 가깝게 예측하는 것으로 알려졌다.<sup>1</sup> 단백질 입체구조 및 리간드의 결합에 따른 입체구조의 변화를 예측하여 단백질의 기능을 탐색하는 알고리즘의 개발을 위하여 folding 반응의 메커니즘을 탐구하는 실험은 필수적이라고 할 수 있으며, 따라서 단백질 folding 연구는 실험적 접근과 구조 예측 알고리즘의 개발이 병행되고 있다.

HubWA는 유비퀴틴 단백질의 26번째 위치에 존재하는 아미노산인 V를 A로 그리고 45번째 위치에 존재하는 아미노산인 F를 W로 치환한 변이 단백질로서 변성력은 guanidine hydrochloride보다 약하지만 비이온성인 요소를 folding 반응 연구의 변성제로 사용할 수 있으며, 단백질의 구조에 따른 W의 fluorescence emission의 변화를 이용하여 단백질 folding 반응을 연구할 수 있게 고안된 단백질이다.<sup>2,3</sup> 비이온성 변성제인 요소는 이온성 변성제인 guanidine hydrochloride와는 달리 정전기적 상호작용을 왜곡하지 않고, lyotropic 효과로 인하여 단백질의 구조적 안정성이 영향을 받지 않으므로 순수하게 단백질의 구조 변환만 연구할 수 있는 장점이 있다.<sup>4,5</sup> HubWA 단백질의 folding 반응은 경로상에 중간단계(intermediate state)가 관찰되는 three-state on-pathway mechanism ( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ , U는 unfolded 상태, I는 중간단계, N은 native 구조를 의미한다)을 따르는 것으로 관찰되었다.<sup>3</sup> 따라서 HubWA는 folding 중간단계의 구조적 특성을 통하여 반응의 진행 과정을 연구하는 데 적절한 모델 단백질이다.

단백질 folding 반응의 초기에 소수성 아미노산이 서로 뭉치는 현상인 hydrophobic collapse(소수성 붕괴) 현상이 일어난다. 소수성 상호작용은 수소결합이나 정전기적 상호작용과는 달리 명백한 수여자와 공여자가 없는 비공유결합이다. 소수성 상호작용이 단백질의 삼차원 입체구조를 안정시키는 비공유결합 중 하나이지만 단백질 folding

반응에 어떠한 기여를 하는지 잘 알려져 있지 않다. 소수성 붕괴 현상이 folding 반응에 끼치는 영향을 연구하기 위하여 HubWA에 있는 소수성 아미노산인 I, L, V를 소수성 상호작용이 더 약한 A로 치환한 변이 단백질의 폴딩을 연구하였다.<sup>6</sup> HubWA에 있는 소수성 아미노산을 A로 치환하였을 때, 네 개의 변이 단백질(V5A, I13A, V17A, I36A)만 얻을 수 있었다. 나머지 변이 단백질은 HubWA와 입체구조가 다르거나, 봉입체(inclusion body)를 형성하여 순수 정제가 불가능하여 연구하기에 적절하지 않았다. 네 개의 변이 단백질 중 V17A는 HubWA와 마찬가지로 three-state on-pathway mechanism을 따르는 것으로 관찰되었다. V17A의 폴딩 반응의 속도상수(rate constant)로부터  $U \rightleftharpoons I$ , 반응과  $I \rightleftharpoons N$  반응 및 전체 folding 반응의 자유에너지인  $\Delta G_{UI}^\circ$ ,  $\Delta G_{IN}^\circ$ ,  $\Delta G_{UN}^\circ$ 를 각각 구할 수 있었다. V17A의 native 구조는 HubWA의 native 구조보다 안정성이  $\sim 2.4$  kcal/mol 약해진 것으로 관찰되었고, 중간단계 또한 그 안정성이 HubWA의 그것보다  $\sim 2.1$  kcal/mol 정도 약해진 것으로 관찰되었다. 즉 V17을 A로 변이시켰을 때 주로 중간단계가 형성되는 과정인  $U \rightleftharpoons I$  반응이  $I \rightleftharpoons N$  반응보다 더 크게 영향을 받았다고 할 수 있으며, 이는 V17은 HubWA 폴딩 반응의 초반부에 기여하는 아미노산임을 의미한다. V5A, I13A, I36A 변이 단백질의 폴딩 반응은 two-state mechanism을 따르는 것으로 관찰되었다.<sup>6</sup> 이들 세 개의 변이 단백질의 native 구조의 안정성은 HubWA에 비하여  $\sim 4.3$  kcal/mol 정도 불안정해진 것으로 나타났는데, 이 에너지는 HubWA 중간단계가 보이는 구조적 안정성( $\Delta G_{UI}^\circ = -4.2$  kcal/mol)과 유사한 값이었다. 만약 변이가 중간단계의 구조적 안정성에 주로 영향을 끼쳤다면 이들 변이 단백질의 중간단계의 에너지 준위는 HubWA가 풀린(unfolded) 상태와 거의 같거나 더 높아서 unfolded된 상태와 구분되지 않을 것이므로 folding kinetics 실험에서 관찰되지 않았다고 할 수 있다. 즉 three-state on-pathway mechanism이 중간단계의 구조적 안정성이 약해지면서 two-state mechanism으로 보여지게 된 것이라고 해석되었다. 소수성 아미노산을 A로 변이한 변이 단백질의 folding 연구는 얻을 수 있는 변이 단백질도 매우 적었고 변이 단백질 대부분이 two-state folding 반응을 보여서 중간단계의 구조적 특징을 탐구하여 folding 과정을 탐색하는 데 적절하지 않았다. 따라서 본 연구에서는 소수성 아미노산을 A보다는 소수성이 약간 더 강한 V로 변이한 단백질을 제조하여 folding 중간단계의 특성을 탐색하였다.

## 실 험

### 재료

HubWA의 유전자가 들어있는 pET-HubWA 플라스미드를

위치 특정 돌연변이 생성(site-directed mutagenesis)의 주형으로 사용하였다.<sup>7</sup> 소수성 아미노산인 L과 I를 V로 치환한 돌연변이 단백질은 Stratagene (La Jolla, USA)의 QuikChange site-directed mutagenesis kit를 사용하여 제조하였다. 돌연변이 제조에 사용한 DNA oligomer는 Genotech(대전, 대한민국)에서 구입하였다. 변이 플라스미드의 염기 서열을 측정하여 돌연변이를 확인하였다. 대장균 BL21(DE3) 균주에 변이된 플라스미드를 접종하여 형질 전환 균주를 제조하였고, 형질 전환된 균주에 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 처리하여 변이 단백질을 발현시켰다. 변이 단백질은 이전 실험에서 사용한 방법인 DEAE-sephacel column chromatography를 실시한 후에 Sephacryl S-100 column chromatography를 사용하여 분리 정제하였다.<sup>7</sup> 정제된 단백질은 coomassie brilliant blue로 염색한 SDS-PAGE에서 하나의 밴드로 관찰되어서 folding 반응을 연구하기에 적절한 순도를 지닌 것으로 판단되었다. 변이 단백질의 이름은 변이 전 아미노산의 한 글자 약자, 아미노산 서열 숫자, 그리고 발린의 아미노산 한 글자 약자로 명명하였다. 변이 단백질의 folding 실험에 ICN Biochemical Inc.(Aurora, USA)에서 구입한 초고순도 요소를 사용하였으며, 그 외 시약은 시약등급(reagent grade) 또는 그보다 더 순도가 높은 것을 사용하였다.

### Folding/unfolding 반응의 kinetics 측정

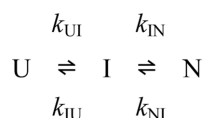
Folding/unfolding 반응의 kinetics는 fluorescence spectrometer 가 연결된 BioLogic SFM-4 stopped-flow 장치(Claix, France)를 사용하여 측정하였다. Folding/unfolding 반응의 진행 과정은 HubWA와 변이 단백질에 있는 트립토판(W45)을 295 nm로 여기 시킨 후 324 nm 이상에서 관찰되는 fluorescence emission 의 시간에 따른 변화로 측정하였다. Folding 반응의 kinetics는 고농도(~6 M)의 요소 용액에서 삼차원 입체 구조가 완전히 풀린 단백질을 native 구조를 띌 수 있는 용액 조건이 되도록 완충용액과 저농도의 요소 용액을 stopped-flow 장치를 사용하여 매우 빠르게 섞은 후 시간에 따른 fluorescence emission의 변화로 측정하였다. Unfolding 반응의 kinetics는 완충용액에 들어있어서 native 구조를 띠는 단백질을 unfolding 반응이 일어나는 용액 조건이 되도록 완충용액과 고농도의 요소 용액을 stopped-flow 장치를 사용하여 빠르게 섞은 후 시간에 따른 fluorescence emission의 변화로 측정하였다. 완충용액과 요소 용액의 비율을 변화시켜 다양한 최종 요소 농도에서 일어나는 folding/unfolding 반응의 kinetics를 측정하였다.

변이 단백질의 folding kinetics는 세 개의 지수 함수로 관찰되었고 nonlinear least squares 방법으로 분석하여 반응의 속도상수(rate constant)와 진폭(amplitude)을 얻었다.

HubWA 변이 단백질의 unfolding kinetics는 하나의 지수 함수로 나타났고, nonlinear least squares 방법으로 분석하여 속도상수와 진폭을 얻었다. Folding/unfolding kinetics 측정 결과는 rate profile (요소 농도에 따른 log (속도상수)의 변화)과 amplitude profile (요소 농도에 따른 표준화한 진폭의 변화)로 나타났다. 단백질이 완전히 풀어진 상태의 fluorescence emission을 1로, native 상태의 fluorescence emission을 0으로 하여 진폭을 표준화 하였다.

### Folding/unfolding kinetics 분석

본 연구에 사용한 변이 단백질의 folding 반응은 three-state on-pathway mechanism으로 분석하였다(Scheme 1).



Scheme 1.

Scheme 1에서 U, I, N은 각각 unfolded 상태, intermediate 상태, native 상태를 나타내며,  $k_{UI}$ ,  $k_{IN}$ ,  $k_{IU}$ ,  $k_{NI}$ 는 각각  $U \rightleftharpoons I$  와  $I \rightleftharpoons N$  elementary반응의 microscopic 속도상수이다. Microscopic 속도상수에 자연로그를 취한 값의 요소 농도에 따른 변화는 수식 (1)과 같이 직선으로 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>8-10</sup>

$$\ln k_{ij} = \ln k_{ij}^{\circ} + (m_{ij}^{\ddagger}/RT)C \tag{1}$$

수식 (1)에서  $k_{ij}^{\circ}$ 는 0 M 요소농도에서의 microscopic 속도상수이며,  $C$ 는 요소농도,  $m_{ij}^{\ddagger}/RT$ 는 기울기이고,  $T$ 와  $R$ 은 절대온도와 기체상수를 각각 나타낸다. 수식 (1)을 사용하여 각 요소 농도에서 microscopic 속도상수를 구할 수 있다. Three-state on-pathway mechanism에 따르는 folding 반응에서 관찰되는 속도상수(apparent rate constant), 표준화된 진폭, 평형상태에서의 folding transition은 rate matrix로부터 구할 수 있다.<sup>11</sup> Rate matrix로부터 얻은 이론치를 folding/unfolding kinetics 실험으로 얻은 관찰치에 적용(fitting)하여 요소가 없는 용액에서의 microscopic 속도상수( $k_{ij}^{\circ}$ )를 구하였다.  $U \rightleftharpoons I$ 와  $I \rightleftharpoons N$  반응의 자유에너지를  $k_{ij}^{\circ}$ 를 사용하여 계산하였고(수식 2, 3), 전체 폴딩 반응의 자유에너지( $\Delta G^{\circ}_{UN}$ )는  $\Delta G^{\circ}_{UI}$ 와  $\Delta G^{\circ}_{IN}$ 을 더하여서 얻었다.

$$\Delta G^{\circ}_{UI} = -RT \ln(k^{\circ}_{UI}/k^{\circ}_{IU}) \tag{2}$$

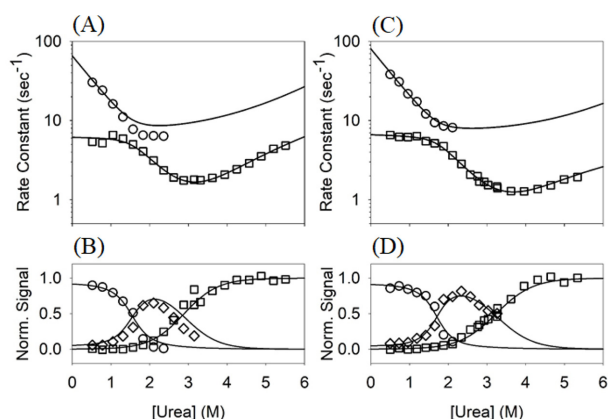
$$\Delta G^{\circ}_{IN} = -RT \ln(k^{\circ}_{IN}/k^{\circ}_{NI}) \tag{3}$$

HubWA 단백질과 변이 단백질의  $\Delta G^{\circ}_{UI}$ ,  $\Delta G^{\circ}_{IN}$ ,  $\Delta G^{\circ}_{UN}$ 의 차이를 각각 비교하면 변이를 도입한 각 아미노산 잔기가 폴딩 과정에 끼친 영향을 알 수 있다. 변이가 native 상태의

안정성에 끼친 영향은  $\Delta G_{UN}^{\circ}$ (변이 단백질)에서  $\Delta G_{UN}^{\circ}$ (HubWA)를 뺀 값인  $\Delta\Delta G_{UN}^{\circ}$ 를 통해서 알 수 있고, 변이가 중간단계의 안정성에 끼친 영향은  $\Delta G_{UI}^{\circ}$ (변이 단백질)에서  $\Delta G_{UI}^{\circ}$ (HubWA)를 뺀 값인  $\Delta\Delta G_{UI}^{\circ}$ 를 통해서 알 수 있으며, 변이가 folding 반응의 나중 단계인  $I \rightleftharpoons N$  반응 과정에 끼친 영향은  $\Delta G_{IN}^{\circ}$ (변이 단백질)에서  $\Delta G_{IN}^{\circ}$ (HubWA)를 뺀 값인  $\Delta\Delta G_{IN}^{\circ}$ 을 통해서 알 수 있다. 변이를 도입한 아미노산 잔기가 folding 반응에 끼치는 상대적인 영향은  $\Delta\Delta G_{UI}^{\circ}/\Delta\Delta G_{UN}^{\circ}$ 로 나타나는  $\Delta\Delta G_{UI}^{\circ}/\Delta\Delta G_{UN}^{\circ}$  값으로 알 수 있다. 즉  $\Delta\Delta G_{UI}^{\circ}/\Delta\Delta G_{UN}^{\circ}$  값이 1에 가까운 아미노산 잔기는 folding 반응의 중간단계가 형성되는 folding 반응의 초기 과정인  $U \rightleftharpoons I$  반응에 크게 영향을 끼치는 것으로 해석할 수 있는 반면, 0에 가까우면 중간단계가 형성되는 과정에는 거의 영향을 끼치지 않고 중간단계에서 native 상태로 되는 과정인  $I \rightleftharpoons N$  반응에 주로 영향을 끼치는 것으로 해석할 수 있다.

## 결과 및 고찰

HubWA의 소수성 아미노산을 A로 치환한 변이 단백질의 폴딩 연구에서 얻은 변이 단백질(V5A, I13A, V17A, I36A) 중 V17A를 제외한 나머지 변이 단백질은 two-state folding mechanism을 보여서 중간 단계의 안정성을 통한 folding 과정을 연구하기에 적합하지 않았다.<sup>6</sup> 본 연구에서는 A 대신 V로 치환한 변이 단백질을 사용하여 folding 중간단계를 연구할 수 있는지 탐색하였다. 먼저 A로 치환하여도 folding 반응을 연구할 수 있었던 I13과 I36을 V로 치환한 I13V와 I36V를 제조하였다. I13V와 I36V의 far-UV Circular Dichroic (CD) spectrum은 HubWA의 그것과 같은 것으로 관찰되었다(Fig. S1). 따라서 이들 변이 단백질의 펩티드 골격구조가 HubWA와 같으므로 연구에 적절한 것으로 판단되었다. I13V와 I36V의 folding kinetics는 HubWA 단백질의 folding kinetics 측정에서 관찰된 것과 같이 세 개의 지수 함수로 나타났다. 세 개의 지수함수로 나타난 과정 중 두 개의 빠른 과정은 요소 농도에 따라 속도상수와 진폭이 변하는 것으로 관찰되었고 가장 느린 과정은 요소의 농도에 상관없이 속도상수(I13V는  $\sim 0.05 \text{ sec}^{-1}$ , I36V는  $\sim 0.1 \text{ sec}^{-1}$ )와 진폭(I13V는 전체 진폭의  $\sim 2\%$ , I36V는 전체 진폭의  $\sim 5\%$ )이 일정한 것으로 관찰되었다(Fig. S2). 이 세 개의 folding 과정 중 속도상수와 진폭이 일정하게 나타난 가장 느린 과정은 folding 반응과 평행하게 일어나는 Xaa-Pro 펩티드 결합의 *cis/trans* isomerization을 반영하는 것으로 해석하여 folding 반응의 분석에서는 제외하였고, 처음 두 개의 빠른 과정만 분석에 사용하였다.<sup>3</sup> 두 개의 folding 과정이 관찰되는 것은 I13V와 I36V의 folding 반응에 하나의 중간단계가 관여하고 있음을 의미한다. I13V와 I36V의



**Figure 1.** Folding kinetics analysis of I13V and I36V. Panels A and B represent the folding kinetics of I13V and panels C and D represent the folding kinetics of I36V. Circles and squares in panels A and C denote the rate constant of the first and second folding phases, respectively. Circles and squares of panels B and D denote the normalized amplitudes of first and second phases, respectively. Diamonds in panels B and D denote the normalized signal at long time, which is equivalent to the equilibrium folding transition. Solid lines represent the fitted line for the I13V and I36V folding reaction based on a three-state on-pathway folding mechanism.

unfolding kinetics는 HubWA의 unfolding kinetics와 마찬가지로 하나의 지수함수로 관찰되었고 요소 농도에 따라 속도상수와 진폭이 변하였으므로 이들 변이 단백질의 folding 반응을 분석하는데 사용하였다. Fig. 1은 I13V와 I36V의 folding kinetics를 three-state on-pathway mechanism으로 분석한 결과를 보여준다. 실선으로 보여진 분석 결과가 실제 데이터를 만족하는 것이 Fig. 1에 잘 나타나 있다. 이러한 결과는 이전에 HubWA를 분석한 결과와 상통하는 것으로, I13V와 I36V의 folding kinetics는 HubWA의 그것과 마찬가지로 three-state on-pathway mechanism을 만족하는 점을 나타낸다.<sup>3</sup> I13V와 I36V의 folding/unfolding kinetics 실험을 통하여 소수성 아미노산을 V로 치환한 변이 단백질을 사용하면 folding 중간단계를 관찰할 수 있으며 따라서 중간단계의 안정성 변화를 통하여 HubWA 단백질의 folding 반응을 탐색할 수 있는 점을 확인하였으므로, 소수성 아미노산을 V로 치환한 일련의 변이 단백질을 사용하면 HubWA 단백질의 폴딩 반응이 일어나는 과정을 세세하게 이해할 수 있을 것으로 생각되었다. 본 연구에서 V로 치환한 아미노산과 이들 아미노산과 소수성 상호작용을 하는 아미노산 잔기를 Table 1에 정리하였다.

HubWA의 소수성 코어에 위치하는 I와 L을 V로 치환한 모든 변이 단백질은 순수한 상태로 정제가 가능하였고, far-UV CD spectrum으로 확인한 결과 삼차원 펩티드 골격구조가 HubWA와 같아서 folding 반응을 연구하기에 적합

**Table 1.** Interaction of hydrophobic residues of HubWA

Residue	Interacting hydrophobic residues
I3 ( $\beta$ 1)	L15 ( $\beta$ 2), V17 ( $\beta$ 2), I61 (t6), L67 ( $\beta$ 5)
I13 ( $\beta$ 2)	L15 ( $\beta$ 2), I30 ( $\alpha$ )
L15 ( $\beta$ 2)	I3 ( $\beta$ 1), V5 ( $\beta$ 1), I13 ( $\beta$ 2), V17 ( $\beta$ 2), I30 ( $\alpha$ )
V17 ( $\beta$ 2)	I3 ( $\beta$ 1), L15 ( $\beta$ 2), L56 ( $3_{10}$ )
I23 ( $\alpha$ )	L43 ( $\beta$ 3), L50 ( $\beta$ 4), L56 ( $3_{10}$ )
I30 ( $\alpha$ )	V5 ( $\beta$ 1), I13 ( $\beta$ 2), L15 ( $\beta$ 2), I36 (us), L43 ( $\beta$ 3), L69 ( $\beta$ 5)
I36 (us)	I30 ( $\alpha$ ), L69 ( $\beta$ 5), L71 ( $\beta$ 5)
L43 ( $\beta$ 3)	V5 ( $\beta$ 1), I23 ( $\alpha$ ), I30 ( $\alpha$ ), L50 ( $\beta$ 4), L67 ( $\beta$ 5), L69 ( $\beta$ 5)
L50 ( $\beta$ 4)	I23 ( $\alpha$ ), L43 ( $\beta$ 3), I61 (t6), L67 ( $\beta$ 5)
L56 ( $3_{10}$ )	V17 ( $\beta$ 2), I23 ( $\alpha$ ), I61 (t6)
I61 (t6)	I3 ( $\beta$ 1), L56 ( $3_{10}$ ), L67 ( $\beta$ 5)
L67 ( $\beta$ 5)	I3 ( $\beta$ 1), L43 ( $\beta$ 3), I61 (t6)
L69 ( $\beta$ 5)	V5 ( $\beta$ 1), I30 ( $\alpha$ ), I36 (us), L43 ( $\beta$ 3), L71 ( $\beta$ 5)

The secondary structure where each amino acid is located is shown in parenthesis.  $\alpha$ ,  $\beta$ , t, us, and  $3_{10}$  denote  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -strand, turn, region without distinct secondary structure, and  $3_{10}$ -helix, respectively. Number after  $\beta$  and t represents the sequence of  $\beta$ -strand and turn from the N-terminus.

한 것으로 판단되었다(Fig. S3). 변이 단백질 I3V, L15V, I23V, I30V, L43V, L50V, L56V, I61V, L67V, L69V의 folding kinetics를 stopped-flow 장치로 측정된 결과 이들 변이 단백질의 folding 반응도 I13V와 I36V와 마찬가지로 Xaa-Pro 펩티드 결합의 cis/trans isomerization을 반영하는 하나의 느린 과정과 더불어 두 개의 빠른 지수함수 과정이 관찰되었고, unfolding 반응은 하나의 지수함수 과정으로 관찰되었다. 이러한 결과는 이들 변이 단백질의 folding 반응이 하나의 중간단계를 거쳐서 일어나는 것을 보여준다. 따라서 모든 변이 단백질의 folding kinetics 결과를 three-state

on-pathway mechanism으로 분석하였고 모든 변이 단백질의 folding kinetics는 I13V, I36V와 마찬가지로 three-state on-pathway mechanism을 만족하는 것으로 나타났다. 변이 단백질의 folding kinetics 분석으로 얻은 0 M 요소 농도에서의 microscopic 속도 상수( $k_{ij}^o$ )와 three-state 반응을 이루는 elementary 반응인  $U \rightleftharpoons I$  반응과  $I \rightleftharpoons N$  반응의 자유에너지인  $\Delta G_{UI}^o$ 와  $\Delta G_{IN}^o$  그리고 전체 folding 반응의 자유에너지인  $\Delta G_{UN}^o$ 을 Table 2에 정리하였다.

Folding 반응의 각 단계가 전체 folding 반응에 끼친 상대적인 영향을 반영하는 값인  $\Delta\Delta G_{UI}^o/\Delta\Delta G_{UN}^o$ 과  $\Delta\Delta G_{IN}^o/$

**Table 2.** Kinetic parameters of HubWA and variant proteins with hydrophobic residue to A or V

Proteins	$k_{UI}^o$	$m_{UI}^{\ddagger}$	$k_{IU}^o$	$m_{IU}^{\ddagger}$	$k_{IN}^o$	$m_{IN}^{\ddagger}$	$k_{NI}^o$	$m_{NI}^{\ddagger}$	$\Delta G_{UI}^o$	$\Delta G_{UI}^o$	$\Delta G_{UI}^o$
HubWA <sup>a</sup>	95.0	-0.72	0.08	0.39	11.0	-0.35	0.25	0.20	-4.19	-2.24	-6.43
I3V	60.0	-0.78	0.33	0.36	7.50	-0.15	1.00	0.17	-3.08	-1.19	-4.27
I13V	65.1	-0.82	0.45	0.38	5.15	-0.05	1.03	0.19	-2.95	-0.95	-3.90
L15V	90.0	-0.75	1.00	0.32	5.20	-0.10	0.90	0.25	-2.66	-1.04	-3.70
V17A <sup>a</sup>	25.5	-0.72	0.69	0.40	10.2	-0.19	0.44	0.23	-2.14	-1.86	-4.00
I23V	80.0	-0.78	0.15	0.43	5.10	-0.11	0.45	0.11	-3.72	-1.44	-5.16
I30V	45.0	-0.82	0.40	0.35	4.50	-0.05	1.35	0.10	-2.80	-0.71	-3.51
I36V	80.0	-0.82	0.36	0.35	5.20	-0.05	1.45	0.09	-3.20	-0.76	-3.96
L43V	65.0	-0.75	1.50	0.40	8.00	-0.04	3.70	0.10	-2.23	-0.46	-2.69
L50V	65.0	-0.55	3.10	0.60	17.0	-0.01	1.00	0.19	-1.80	-1.68	-3.48
L56V	55.0	-0.65	1.60	0.50	11.0	-0.01	0.57	0.19	-2.10	-1.75	-3.85
I61V	90.0	-0.77	0.68	0.50	10.7	-0.09	1.18	0.15	-2.89	-1.31	-4.20
I67V	80.0	-0.75	0.45	0.40	6.50	-0.01	1.40	0.10	-3.07	-0.91	-3.98
I69V	65.0	-0.71	0.40	0.50	4.10	-0.01	2.05	0.10	-3.01	-0.41	-3.42

Rate constants,  $k_{UI}^o$ ,  $k_{IU}^o$ ,  $k_{IN}^o$ , and  $k_{NI}^o$ , are the fitted rate constant at 0 M urea concentration. The m-values,  $m_{UI}^{\ddagger}$ ,  $m_{IU}^{\ddagger}$ ,  $m_{IN}^{\ddagger}$ , and  $m_{NI}^{\ddagger}$ , are the urea dependence of rate constants. Free energies of folding are calculated as  $\Delta G_{UI}^o = -RT \ln(k_{UI}^o/k_{IU}^o)$ ,  $\Delta G_{IN}^o = -RT \ln(k_{IN}^o/k_{NI}^o)$ , and  $\Delta G_{UN}^o = \Delta G_{UI}^o + \Delta G_{IN}^o$ . The units for rate constant and free energy are  $\text{sec}^{-1}$  and kcal/mol, respectively.

<sup>a</sup>Taken from previously published result by Park.<sup>3</sup>

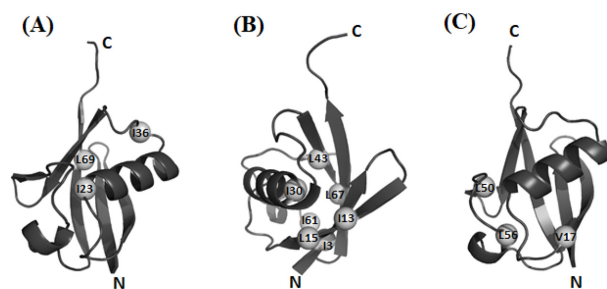
**Table 3.** Free energy difference between HubWA and variant proteins

Proteins	$\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$	$\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}$	$\Delta\Delta G^{\circ}_{IN}$	$\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$	$\Delta\Delta G^{\circ}_{IN}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$
I3V	2.16	1.11	1.05	0.51	0.49
I13V	2.53	1.25	1.28	0.49	0.51
L15V	2.73	1.53	1.20	0.56	0.44
V17A <sup>a</sup>	2.43	2.05	0.38	0.84	0.16
I23V	1.28	0.47	0.80	0.37	0.63
I30V	2.92	1.40	1.52	0.48	0.52
I36V	2.48	0.99	1.48	0.40	0.60
L43V	3.74	1.96	1.78	0.52	0.48
L50V	2.95	2.39	0.56	0.81	0.19
L56V	2.59	2.10	0.49	0.81	0.19
I61V	2.23	1.30	0.94	0.58	0.42
L67V	2.46	1.12	1.33	0.46	0.54
L69V	3.01	1.18	1.83	0.39	0.61

$\Delta\Delta G^{\circ}_{UN} = \Delta G^{\circ}_{UN}(\text{variant protein}) - \Delta G^{\circ}_{UN}(\text{HubWA})$ ,  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI} = \Delta G^{\circ}_{UI}(\text{variant protein}) - \Delta G^{\circ}_{UI}(\text{HubWA})$ , and  $\Delta\Delta G^{\circ}_{IN} = \Delta G^{\circ}_{IN}(\text{variant protein}) - \Delta G^{\circ}_{IN}(\text{HubWA})$ . The unit for free energy difference is kcal/mol.

$\Delta\Delta G^{\circ}_{UN} (1 - \Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN})$ 을 Table 3에 정리하였다. Table 3에서 보듯이 변이 단백질의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.37에서 0.84에 이르는 다양한 값으로 나타났다. 이러한 결과는 본 연구에서 탐색한 소수성 아미노산 잔기가 HubWA folding 중간단계를 형성하는데 적어도 ~40% 이상 기여하고 있음을 의미한다. 모든 변이 단백질이 three-state on-pathway mechanism을 따르고 소수성 아미노산 잔기의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 ~0.4 이상이라는 점은 HubWA 단백질의 folding 반응 초기에 일어나는 소수성 붕괴 현상으로 형성된 중간단계가 native 상태의 구조적 특성을 상당히 지닌 상태라는 것을 나타낸다. 또한  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 모든 변이 단백질에서 서로 다르게 나타나는 점은 각 소수성 아미노산이 folding 반응의 초기에 중간상태를 형성하는데 기여하는 정도가 서로 다르다는 점을 반영한다. Table 3에 보여진  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값에 따라 V 변이 단백질을 크게 세 개의 무리, 즉  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.4 이하인 I23V, I36V, L69V와 ~0.5(0.4~0.6) 정도의 값을 보이는 I3V, I13V, L15V, L30V, L43V, I61V, L67V와 0.8 이상의 값을 보이는 V17A, L50V, L56V로 무리 지을 수 있었다. Fig. 2는 펩티드 골격을 리본 형태로 표현한 HubWA의 삼차원 입체구조를 보여주며,  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.4 이하인 아미노산 잔기는 Fig. 2A에, ~0.5인 아미노산 잔기는 Fig. 2B에, 0.8 이상인 아미노산 잔기는 Fig. 2C에 나타내었다.

Fig. 2A는 V로 치환했을 때  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.4 이하인 아미노산 잔기를 보여준다. 이들 아미노산 잔기는 특정 이차구조의 가장자리에 위치하거나(I23, L69), 특정 이차구조가 존재하지 않는 부위에 위치하고(I36) 있다. I23은  $\alpha$ -helix의 아미노말단에 위치하며, L69는 다섯 번째  $\beta$ -strand ( $\beta 5$ )의 카복실말단 근처에 위치하고 있어서 소수



**Figure 2.** Three-dimensional structure of HubWA shown by ribbon diagram. Each panel shows the hydrophobic residue with  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  is smaller than 0.4 (A), ~0.5 (B), and bigger than ~0.8 (C), respectively. The  $\alpha$ -carbons of designated hydrophobic residues are illustrated as a sphere. N and C denote amino-terminus and carboxy-terminus, respectively. X-ray coordinates has been taken from Vijay-Kumar *et al.*<sup>15</sup>

성 붕괴와 더불어 이차구조의 일부가 형성되는 중간단계에는 입체구조가 견고하게 형성되지 않았기 때문에 0.4 이하의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값을 갖는 것으로 보인다. 독립적인 펩티드의 구조에 관한 연구에서  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -hairpin의 양 말단 부위는 중앙부위보다 수소결합이 비교적 약하게 형성되는 점이 알려져 있다.<sup>12</sup> HubWA 단백질 folding 반응의 초기에 온전한 3차원 입체구조가 형성되기 전인 중간단계에서 이들 I23과 L69가 속해있는  $\alpha$ -helix와  $\beta 5$ 도 말단 부위가 견고하게 형성되지 않은 느슨한 구조를 이루기 때문에 I23과 L69의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.4 이하로 나타난 것으로 생각된다. 같은 무리에 속한 I36은 특정 이차구조가 존재하지 않는 부위(G35부터 D39까지)에 위치하고 있으며 상호작용하는 소수성 아미노산이 대부분 이차구조의 말단에 위치하고(I69, L71)있기 때문에 I36을 V로 치환한 변이 단백질이 0.4 이하의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값을 보이는 것

으로 생각된다. I23V, I36V, L69V 변이 단백질의 folding 실험의 결과는 HubWA 단백질의 삼차원 입체구조를 구성하는 이차구조의 말단이나 특정 이차구조가 존재하지 않는 부위는 folding 반응 초기 중간단계가 형성되는 과정에서 native 구조와 유사하나 상대적으로 느슨한 입체구조를 이루며 folding 반응의 후반부에 안정한 native 구조를 이룬다는 것을 시사한다.

Fig. 2B는 V로 치환했을 때  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 ~0.5인 아미노산을 보여준다. 이들 아미노산 잔기는 HubWA의 삼차원 입체구조에서 네 개의  $\beta$ -strand로 이루어진  $\beta$ -sheet와  $\alpha$ -helix가 접촉하는 부위인 HubWA의 소수성 코어(hydrophobic core) 부위에 존재하고 있으며, Table 1에서 보듯이 대부분 같은 무리에 속한 아미노산 잔기와 상호작용하고 있다. 이들 아미노산을 V로 치환했을 때  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 ~0.5인 것은 이들 아미노산 잔기가 속해있는 부위가 folding 중간단계에서 native 구조보다는 느슨하지만 비교적 견고한 소수성 코어를 형성한다는 점을 시사한다.

Fig. 2C는 V로 치환하였을 때  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 0.8 이상인 V17, L50, L56을 보여준다. V17은 두 번째  $\beta$ -strand ( $\beta_2$ )의 카복실말단, L50은 네 번째 짧은  $\beta$ -strand ( $\beta_4$ )의 카복실말단, 그리고 L56은 짧은  $3_{10}$ -helix의 아미노말단에 위치한다. 같은 무리에 속하는 V17과 L56를 V로 치환한 변이 단백질이 큰 값의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$ 를 보이는 것은 이들 두 아미노산 잔기가 비록 특정 이차구조의 말단에 위치함에도 불구하고 native 상태뿐만 아니라 중간단계에서도 서로 상대적으로 견고하게 상호작용 한다는 것을 의미한다. L50은 native 상태에서는 V17과 L56과 상호작용을 하지 않고  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 ~0.5인 소수성 코어 부위에 위치하는 아미노산 잔기들과 상호작용한다. 그런데 L50V의  $\Delta\Delta G^{\circ}_{UI}/\Delta\Delta G^{\circ}_{UN}$  값이 V17과 L56과 비슷한 값을 보인다는 점은 L50이 native 상태에서는 V17과 L56과 소수성 상호작용을 하지 않지만 folding 중간단계에서는 V17, L56과 지엽적인 nonnative 소수성 상호작용을 하기 때문으로 생각할 수 있다. 즉 HubWA folding 반응의 중간단계는  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet로 이루어진 주된 소수성 코어 부분은 native 상태와 유사하지만 약간 느슨한 구조를 이루지만, L50과 L56이 위치한 부위는 V17과 더불어 지엽적으로 native 구조와는 약간 다르지만 상대적으로 견고한 구조를 이루는 것으로 생각할 수 있다. 이전 연구에서 L50을 A로 변이한 L50A 변이 단백질이 HubWA의 native 구조와는 다른 펩티드 골격 구조를 이루는 것으로 관찰되었고, L56을 A로 변이한 L56A 변이 단백질은 대장균 내에서 봉입체(inclusion body)를 형성하는 것이 관찰되었다.<sup>6</sup> 이러한 이전 실험 결과로 유추할 때, HubWA의 folding 반응의 중간단계에서 V17, L50, L56이 상대적으로 견고한 구조를 갖는 것은, HubWA

단백질의 native 상태로 가는 경로를 벗어나 응집체(aggregate)를 이루는 것을 방지해주는 역할을 하는 것으로 생각된다. 즉 L50은 HubWA folding 반응의 초기 중간단계가 형성되는 단계에는 V17과 L56과 더불어 지엽적인 nonnative 소수성 상호작용을 하여 소수성 부위가 노출됨에 따라서 발생할 수 있는 응집체가 생성되는 것을 막다가 중간단계에서 native 상태로 진행되는 후반기에 지엽적인 소수성 상호작용이 풀리면서 native 구조에서 소수성 코어에 위치하는 아미노산들과 상호작용을 하여 HubWA 단백질이 native 삼차원 입체구조를 이루게 하는 것으로 여겨진다.

## 결론

소수성 아미노산이 단백질 folding 반응에 끼치는 영향을 연구하기 위하여 모델 단백질인 HubWA의 I와 L을 V로 치환한 변이 단백질의 folding kinetics를 측정하였다. 변이 단백질들은 HubWA와 마찬가지로 모두 다 three-state on-pathway folding mechanism을 따르는 것으로 관찰되었다. Three-state 반응의 각 단계에서 변이 단백질과 HubWA 단백질의 자유에너지 차의 비를 통하여 소수성 아미노산이 중간단계에 끼치는 영향을 추론할 수 있었다. HubWA 단백질의 소수성 아미노산은 대부분 중간단계의 구조가 native 구조와 유사한 구조를 이루는 데 기여하지만, 기여하는 정도는 각각 다른 것으로 나타났다. HubWA 입체구조에서  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet가 이루는 소수성 코어에 위치하는 I3, I13, L15, L30, L43, I61, L67는 중간단계에서 native 구조와 유사하지만 약간 느슨한 상호작용을 하고 있는 것으로 나타났다. 반면에 HubWA 입체구조의 외곽에 위치한 I23, I36, L69은 중간단계에서 상당히 느슨한 구조를 보이다 중간단계에서 native 상태가 되는 후반부에 삼차원 입체구조에 견고하게 편입되는 것으로 나타났다. HubWA 단백질의 삼차원 입체구조에서 긴 루프 부위에 위치하는 L50과 L56은 V17과 더불어 중간단계에서 지엽적으로 native 구조에는 없는 소수성 상호작용을 이루는 것으로 보여졌다. 이 부위가 중간단계에서 이루는 소수성 상호작용은 HubWA folding 반응의 초기에 응집체가 형성되는 것을 방지하는 역할을 하는 것으로 생각되었다.

**Acknowledgments.** 이 논문은 2022년도 강릉원주대학교 연구년 연구지원으로 수행되었다.

**Supporting Information.** 추가적인 보완 정보를 이 논문의 온라인 판에 첨부하였다.

## REFERENCES

1. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. *Nature* **2021**, *596*, 583.
  2. Khorasanizadeh, S.; Peters, I. D.; Roder, H. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 193.
  3. Park, S.-H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 2877.
  4. Maxwell, K. L.; Wildes, D.; Zarrine-Afsar, A.; De Los Rios, M. A.; Brown, A. G.; Friel, C. T.; Hedberg, L.; Horng, J.-C.; Bona, D.; Miller, E. J.; Vallee-Belisle, A.; Main, E. R. G.; Bemporad, F.; Qiu, L.; Teilum, K.; Vu, N.-D.; Edwards, A. M.; Ruczinski, I.; Poulsen, F. M.; Kragelund, B. B.; Michnick, S. W.; Chiti, F.; Bai, Y.; Hagen, S. J.; Serrano, L.; Oliveberg, M.; Raleigh, D. P.; Wittung-Stafshede, P.; Radford, S. E.; Jackson, S. E.; Sosnick, T. R.; Marqusee, S.; Davidson, A.; Plaxco, K. W. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 602.
  5. Park, S.-H. *J. Korean Chem. Soc.* **2016**, *60*, 82.
  6. Park, S.-H. *J. Korean Chem. Soc.* **2019**, *63*, 427.
  7. Park, S.-H. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 676.
  8. Tanford, C. *Adv. Protein Chem.* **1970**, *24*, 1.
  9. Matthews, C. R. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 498.
  10. Chen, B.; Baase, W. A.; Schellman, J. A. *Biochemistry* **1989**, *28*, 691.
  11. Bachmann, A.; Kiefhaber, T. In *Protein Folding Handbook. Part I*; Buchner, J. and Kiefhaber, T., Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, Germany, 2005; p379.
  12. Park, S.-H.; Shalongo, W.; Stellwagen, E. *Proteins* **1998**, *33*, 167.
  13. Vijay-Kumar, S.; Bugg, C. E.; Cook, W. J. *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531.
-