

## Inclusion Body를 형성한 $\beta$ -Glucosidase의 Chaperonin에 의한 활성 향상

†김 종 덕 · <sup>1</sup>Sachiko Machida · <sup>1</sup>Kiyoshi Hayashi · <sup>2</sup>하 순 덕 · <sup>2</sup>공 재 열  
 여수대학교 생물공학과, <sup>1</sup>일본 농림수산성 식품종합연구소, <sup>2</sup>부경대학교 생물공학과  
 (접수 : 1999. 4. 30., 게재승인 : 1999. 7. 13.)

### Improvement of Insoluble $\beta$ -Glucosidase Activity by Molecular Chaperonin GroEL/ES

Jong-Deog Kim†, Sachiko Machida<sup>1</sup>, Kiyoshi Hayashi<sup>1</sup>, Soon-Duck Ha<sup>2</sup>, and Jai-Yul Kong<sup>2</sup>

Dept. of Biological Engineering, Yosu National University, San 96-1, Dunduck-Dong, Cheonnam 550-250, Korea

<sup>1</sup>National Food Research Institute, Kannondai, Tskuba, Ibaraki 305-0856, Japan

<sup>2</sup>Dept. of Biotech. & Bioeng., Pukyong National University, 599-1, Daeyeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea

(Received : 1999. 4. 30., Accepted : 1999. 7. 13.)

$\beta$ -Glucosidases from *Cellvibrio gilvus*(CG) was successfully overproduced in soluble form in *E. coli* with the coexpression of GroEL/ES. Without the GroEL/ES protein, the  $\beta$ -glucosidase overexpressed in *E. coli* constituted a huge amount(80%) of total cellular protein, but was localized in the insoluble fraction, and little activity was detected in the soluble fraction. Coexpression of the *E. coli* GroEL/ES had a drastic impact on the proper folding of the  $\beta$ -glucosidase; 20% of the overexpressed enzyme was recovered in the soluble fraction in active form. Similar effects of GroEL/ES were also observed on the overexpressed  $\beta$ -glucosidase from *Agrobacterium tumefaciens*(AT). And pET28(a)-RGRAR, partially deleted mutant lacking 5-amino acid residues at carboxy terminus also could be folded into an active form when expressed with the molecular chaperonin GroEL/ES, and its activity was higher than that of the without GroEL/ES system. In addition, the synergistic effect of GroEL/ES and the low induction temperature were important factors for solubilization of the inclusion body from overproduced  $\beta$ -glucosidases.

Key Words : GroEL/ES, chaperonin system, *Cellvibrio gilvus*, *Agrobacterium tumefaciens*,  $\beta$ -glucosidase, pET28(a) vector, coexpression

#### 서 론

단백질은 세포 내에서 합성되어 각각의 최적 장소로 이동하여 그 역할을 하기 위해서는 단백질의 입체구조 형성, 구조 변화 및 subunit 재배열이 필요하다. Chaperonin은 어떤 단백질이 정확한 장소에서 그 기능을 정확히 발현 가능하도록 그 단백질의 구조 변화를 도와주는 단백질 분자-세포 내에 있어서 단백질이 활성이 있는 구조로의 재생반응(refolding reaction)을 아주 능률적으로 도와주는 물질을 총칭하는 것으로 알려져 있다(1). 이 folding의 기전은 최근까지도 커다란 의문점으로 남아있었으나, 최근에 일본의 鳥取(Tottori)大學의 Kawata(2-6)등을 중심으로 생체 내에서 단백질의 folding 반응은 어떤 단백질에 의해서 도움을 받는 것으로 밝혀졌으며, 이 단백질은 folding 도중에 polypeptide 구조에 특이적으로 결합하여 정확한 folding 반응을 촉진시키는 절대적인 기능을 가지고 있는 것으로 보고되었다.

† Corresponding Author : Dept. of Biological Engineering, Yosu National University, San 96-1, Dunduck-Dong, Cheonnam 550-250, Korea

Tel & Fax. : +82-662-659-3305

e-mail : pasteur@soback.kornet21.net, pasteur@yosu.yosu.ac.kr

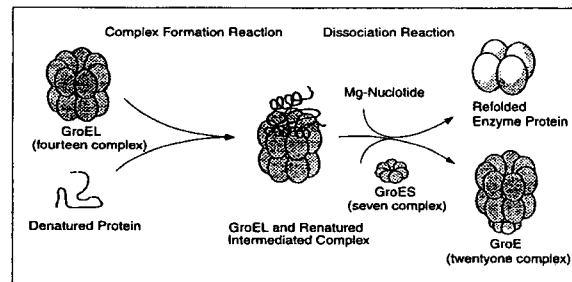


Figure 1. The functional expression mechanism of the molecular chaperonin GroEL/ES.

Kawata (7)는 이들 chaperonin 중 대장균 유래의 GroE는 subunit 분자량 약 57,000의 GroEL과 subunit 분자량 약 10,000의 GroES의 2종류의 단백질로 이루어져 있음을 밝혔다 (Figure 1 참조). GroEL은 보통 7개의 subunit가 링 형태의 구조를 하고 있으며, 14량체로 이중의 도너츠 모양의 4차 구조를 하고 있다. GroES도 7량체의 링 형태를 하고 있으며 변성된 단백질은 GroEL의 내강에서 folding되어져 ATP 의존성의 GroES의 해리에 의하여 GroEL로부터 유리됨으로써 활성형 단백질 형태로 되돌아 갈 수 있다고 알려져 있다(8, 9).

현재 유전공학의 발달과 더불어 생산물이 과잉 생산 되어짐에 따라 균체 내에서 단백질이 folding되지 못하거나 inclusion body를 형성하게 됨으로써, 생산되어진 단백질을 목적에 맞게 사용할 수가 없다. Ashiuchi등(10)은 glutamate racemase가 과잉 생산되어 inclusion body를 형성하여 활성이 아주 낮을 때 GroEL/ES의 유전자와 *murI* 유전자를 coexpression시켜 효소를 활성화시킨바 있으며, Mizobata등(11)은 tryptophanase를 GroEL/ES 시스템을 사용하여 ATP 존재 하에서 refolding시켜 효소를 활성화시켰다. 또, Kubo등(12)도 yeast의 enolase를 GroEL/ES로써 refolding할 때의 ATP, CTP 및 UTP의 효과에 대하여 연구해 왔다. Kawata등(4)도 ADP의 존재하에서 GroEL/ES이 여러가지의 단백질이 refolding을 촉진시키며, 또한, 비가역적인 열 변성을 방지한다는 보고를 하고 있다.

본 실험에서는  $\beta$ -glucosidase의 유전자를 pET28(a) vector로 이전시킨 후 과잉 생산된 inclusion body의 비수용성 부분인  $\beta$ -glucosidase의 많은 부분을 가용 화하기 위하여 분자 chaperonin(GroELs)과  $\beta$ -glucosidase를 생산하는 두 가지의 세균의 *Cellvibrio gilvus*와 *Agrobacterium tumefaciens*의 유전자들을 cotransformation시켜 얻은 transformant를 37°C 및 25°C에서 배양하여 가용성을 증가시켰으며, 또한 deleted mutant도 같은 방법으로 실험하여  $\beta$ -glucosidase의 활성을 향상시킨 바를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Bacterial strain and vectors

*E. coli* NM522 *hsd* $\Delta$ 5  $\Delta$ (*lac-pro*)[F' *pro* *lacIqZ* $\Delta$ M15]는 *Cellvibrio gilvus*(이하 CG로 약칭함)의, 그리고 *E. coli* DH5a F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* ( $\gamma_k m_k$ ) *supE44 relA1 deoR*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169는 *Agrobacterium tumefaciens*(이하 AT로 약칭함)의  $\beta$ -glucosidase 유전자의 숙주로 사용하였으며, 이들로부터  $\beta$ -glucosidase의 유전자를 pET28a(Novagen) vector에 subcloning하여, 각각 pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT로 명명하고, 이 vector의 전용 발현 competent cell인 *E. coli* BL21 (DE3)에 transformation시켜 실험에 사용하였다. 그리고 CG 및 AT의  $\beta$ -glucosidase는 서로 상당한 수준의 상동성을 가지고 있으나 그 특성은 서로 달라(13, 14) CG의 C-terminal의 특성을 검토하기 위하여 CG의 아미노산 배열 중의 C-말단으로부터 5개의 잔기(RGRAR)를 제거하여 제조한 deleted mutant(pET28(a)-RGRAR)도 같은 목적으로 사용하였다. 그리고 산물이 과잉 생산되어 inclusion body나 unfolding 되었을 때 이들을 refolding시키기 위하여 GroEL/ES을 생산하는 pKY206 plasmid(10, 15)를 pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT, 그리고 pET28(a)-RGRAR과 cotransformation 하여 사용하였다.

### 배 지

배지는 LB 고체배지에 0.2 mM, 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -glucoside(Sigma) 및 0.1 M IPTG를 넣어 만든 MUG 배지에 목적에 맞게 항생제를 넣어 사용하였으며, pKY206 plasmid의 배양균체를 위한 배지는 MUG배지에 tetracycline 12.5 ug/ml를 넣어 제조한 MUG-Tet를 사용하였고, pET28a vector의 배양

균체를 위한 배지는 MUG배지에 kanamycin을 30 ug/ml되게 넣어 제조한 MUG-Km 배지를, 그리고 pKY206 및 pET28(a) vector의 cotransformant를 위한 배지는 kanamycin/tetracycline을 각각 넣은 MUG-KmTe 배지를 사용하였다.

### GroEL/ES system

pKY206 plasmid는 GroELs를 생산하는 plasmid로서, 산물이 과잉 생산됨에 따라 형성된 inclusion body를 가용화 하며(14), 또한 unfolding된 단백질의 3차 구조로 환원(15)시키는 역할을 도와주는 system으로, pET28(a) vector와 cotransformation하여 사용하였다.

### 균체의 배양

Kanamycin/tetracycline의 항생제가 든 LB broth에 cotransformant를 배양하고, O.D.<sub>600</sub>가 0.2에 도달되었을 때 IPTG를 최종농도가 1 mM이 되게 첨가하고 이 후 8시간 동안 배양하였다. pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT의 transformant의 배양온도는 25°C 및 37°C에서 배양하였으며, deleted mutant인 pET28(a)-RGRAR는 25°C에서 배양하였다.

### SDS-PAGE

배양액 1.5 ml를 eppendorf tube에 넣고 8,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전을 얻어 0.1 mM PMSF, 10% glycerol, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP를 함유하는 25 mM MOPS buffer 500 ul에 재현탁시켜 sonication 하였다. 그리고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 수용성 효소용액으로 하고, 남은 침전에 8 M urea 용액으로 다시 현탁시켜 실온에서 30분간 반응시키고 동일 조건으로 원심분리한 상등액을 불용성 효소용액으로 조제하여 Biorad사의 전기영동 장치로 SDS-PAGE를 실행하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 성장

Inclusion body를 녹이기 위하여 GroEL/ES와  $\beta$ -glucosidase 유전자를 coexpression하여 사용하였다. 즉, pET28(a)-CG, pET28(a)-AT의 transformant를 단독으로 배양하거나, pET28(a)-CG의 vector와 pKY206 plasmid, 그리고 pET28(a)-AT의 vector와 pKY206 plasmid를 동시에 지닌 transformant를 37°C 및 25°C에서 배양하였다.

Figure 2에서 보는 것처럼 pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT의 균체 배양에서 세균들의 성장률은 37°C에서의 성장이 25°C 좋은 것으로 나타났으며, 두 가지의 transformant 모두 chaperonin을 공유하고 있는 균체가 chaperonin을 가지고 있지 않은 균체보다 성장이 느린 것으로 나타났다. 이 결과는 한 균체 내에 두 종류의 vector를 보유함으로써 단독의 균체에 비교하여 plasmid 복제에 시간이 소요되는 것으로 사료된다.

### *E. coli* 내에서의 $\beta$ -glucosidase의 과잉 생산

pET vector는 강력한 발현 시스템 중의 하나로 알려져 있으며 Figure 3에서 CG 및 AT  $\beta$ -glucosidase의 과잉생산을 볼 수 있다. 과잉 생산된  $\beta$ -glucosidase의 분자량은 CG  $\beta$ -

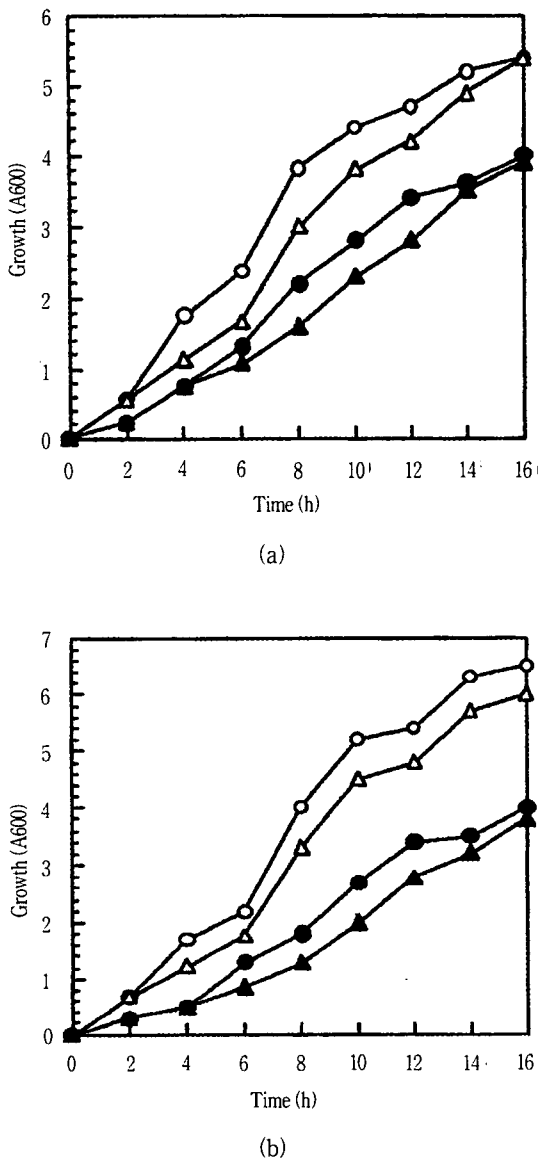


Figure 2. Effect of coproduction of GroEL/ES and induction temperature on the growth of transformants of  $\beta$ -glucosidase. Growth of the transformants carrying pET28(a)-CG, pET28(a)-AT, pET28(a)-CG and pKY206, or pET28(a)-AT and pKY206 was determined by measuring turbidity at 600 nm. Panel A: Transformant cells overproducing CG  $\beta$ -glucosidase. Panel B: Transformant cells overproducing AT  $\beta$ -glucosidase. ○, overproduction without GroEL/ES at 37°C ; ●, co-overproduction with GroEL/ES at 37°C; △, overproduction without GroEL/ES at 25°C; ▲, co-overproduction with GroEL/ES at 25°C.

glucosidase가 약 82,000 dalton이며 AT  $\beta$ -glucosidase가 약 88,000 dalton이다. Figure 3의 densitometer에 의한 분석은 CG의  $\beta$ -glucosidase는 전체 단백질의 약 80%를 나타내었다. 그러나 대부분의 효소는 비수용성 부분에 응집되어 있어 Figure 4A에서 인지 할 수 있듯이 활성은 거의 무시 할 정도이다. 그

리고 AT의  $\beta$ -glucosidase도 CG와 마찬가지로 약 80%의  $\beta$ -glucosidase가 비수용성의 부분에 응집되어 있음을 볼 수 있으며, 활성 역시 낮음을 Figure 4B로부터 알 수 있다. 이 결과로서 overproduction system에 의한  $\beta$ -glucosidase의 과잉 생산은 대부분 inclusion body를 형성하여 활성이 낮음을 볼 수 있다.

**단백질의 과잉생산 및 chaperonin에 의한 가용화**

Figure 3에서 pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT 균체의 SDS-PAGE를 보면 GroEL/ES을 가지고 있지 않은 균체에서 단백질이 과잉생산 된 것을 볼 수 있으며, 수용성의 단백질 부분보다 비수용성의 단백질 부분이 많은 것으로 나타났다. 이것은 균체의 성장이 일어나는 과정에서 단백질이 과잉 생산되어 불용성의 inclusion body를 형성한 것에 기인되는 것으로 사료된다. CG 및 AT의 유전자와 chaperonin과 동시 발현을 한 부분을 보면 수용성의 부분에 밴드가 보이나, chaperonin의 도움이 없이 단독 발현된 CG 및 AT의 37°C 부분은 수용성의 밴드가 보이지 않는다. 그리고 37°C 부분의 pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT의  $\beta$ -glucosidase를 25°C의 것과 비교해 보면, 37°C에서의 비수용성  $\beta$ -glucosidase부분이 수용성의  $\beta$ -glucosidase 부분보다 많이 생산된 것을 볼 수 있는데, 이것은 37°C에서의 성장이 25°C의 성장보다 빨리 일어나 과잉 생산되어 축적되면서 inclusion body가 많이 형성되었음을 의미한다. 따라서 대량의  $\beta$ -glucosidase를 가용화하려면 낮은 온도에서 배양하는 것이 중요한 것을 알 수 있으며, 또한 chaperonin의 도움으로 수용성의  $\beta$ -glucosidase가 증가된 것으로 판단된다.

**Chaperonin에 의한  $\beta$ -glucosidase의 총 활성의 향상**

Figure 2에서 chaperonin과 coexpression된 CG 및 AT 균주의 성장률은 chaperonin을 보유하지 않은 단독의 CG 및 AT의 균주보다 상대적으로 낮았으나, chaperonin과 coexpression된 CG 및 AT의  $\beta$ -glucosidase의 가용성은 현저히 증가되었다. Figure 3에서 CG  $\beta$ -glucosidase는 37°C에서 단독으로 발현시킨 부분보다 chaperonin에 의한 가용성부분의 증가는 약 20%이며, 이에 따른 총 활성은 Figure 4A로부터 3배정도 증가한 것을 볼 수 있다. 그리고 AT  $\beta$ -glucosidase의 37°C에서 coexpression에 의한 수용성의 증가는 약 60%이며 이에 따른 총 활성의 증가는 Figure 4B로부터 3배정도 증가한 것을 볼 수 있다. 이 결과로부터  $\beta$ -glucosidase와 GroEL/ES system의 coexpression은  $\beta$ -glucosidase의 가용성 향상 및 총 활성의 증가에 아주 좋은 효과가 있는 것으로 사료된다.

**저온 배양에 따른  $\beta$ -glucosidase의 가용성 향상**

단기 낮은 온도에서 배양함으로써 CG 및 AT의  $\beta$ -glucosidase의 inclusion body 형성을 감소시킬 수 있었다. Figure 3으로부터 chaperonin의 도움없이 pET28(a)-CG 단독으로 37°C에서 발현된  $\beta$ -glucosidase의 가용성 부분의 band는 거의 볼 수 없으나, 25°C에서의 가용성 부분의 band는 5% 정도 증가한 것을 볼 수 있으며, 이 결과에 따른 총 활성은 Figure 4A로부터 약 9배정도 증가됨을 볼 수 있다. AT  $\beta$ -glucosidase의 경우에도 같은 조건으로 보면 9% 정도가 가용성이 증가되었으며, 이에 따라 총 활성은 2배정도 증가 된 것을 Figure 4B로부터 볼 수 있다. 이처럼 낮은 온도(25°C)에서의 배

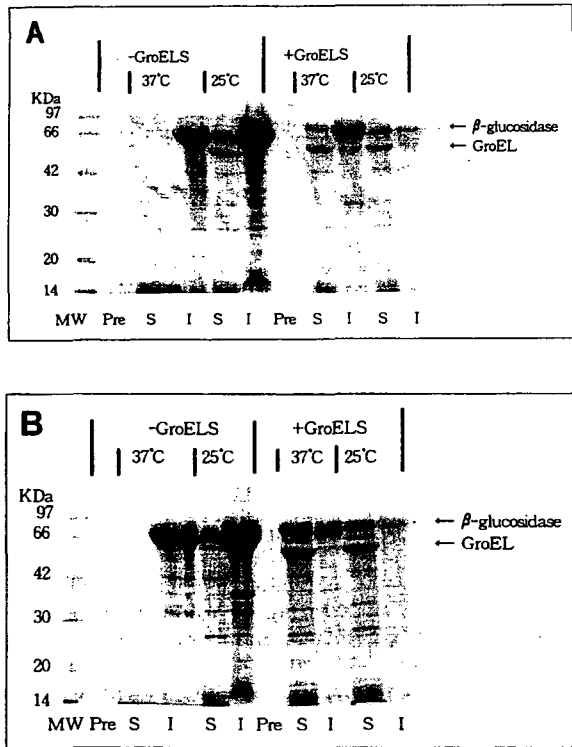


Figure 3. SDS-PAGE analysis of expression and solubility of recombinant  $\beta$ -glucosidase induced at 37°C and 25°C. Expression of  $\beta$ -glucosidase was induced by addition of IPTG, and cells were harvested at 3.0 OD<sub>600</sub>. Soluble(S) and insoluble(I) fractions were prepared by treatment of 8M urea. Panel A : Expression of CG  $\beta$ -glucosidase. Panel B: Expression of AT  $\beta$ -glucosidase. Pre, whole cell lysate of transformants before induction by IPTG; -GroEL/ES, expression without GroEL/ES; +GroEL/ES, expression with over-produced GroEL/ES.

양은 높은 온도(37°C)에서의 배양할 때보다  $\beta$ -glucosidase를 천천히 생산함으로써 inclusion body가 적게 형성되는 것으로 판단된다.

**Coexpression과 저온 배양의 synergic effect**

CG  $\beta$ -glucosidase의 37°C에서의 활성을 Figure 4A로부터 검토해 보면 chaperonin의 도움이 없는 단독의 CG  $\beta$ -glucosidase의 활성은 아주 미미하며 무시 가능할 정도이다. 그러나 25°C에서 chaperonin과 coexpression된  $\beta$ -glucosidase의 총 활성은 130,000 unit로서 활성이 20배정도 향상된 것을 볼 수 있다. 이러한 온도와 chaperonin의 상승효과는 AT  $\beta$ -glucosidase에서도 명확하게 나타나며 37°C에서의 pET28(a)-AT vector 단독의 활성과 25°C에서 chaperonin과 coexpression된  $\beta$ -glucosidase의 총 활성은 Figure 4B로부터 12배정도 향상된 사실을 볼 수 있다. 이 결과로부터  $\beta$ -glucosidase와 GroEL/ES와의 coexpression과 더불어 25°C에서의 균주의 배양은 CG 및 AT 두 가지의  $\beta$ -glucosidase를 활성형으로 전환시키는 중요한 상승효과로 작용함을 볼 수 있었다.

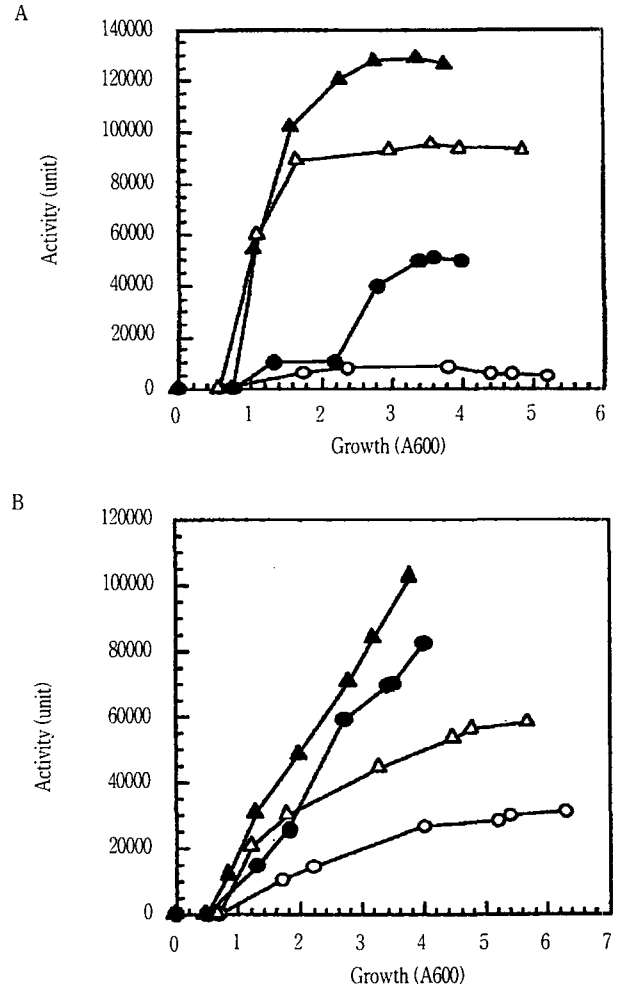


Figure 4.  $\beta$ -glucosidase activity of transformants. The activity in the soluble fraction of transformants carrying pET28-CG, pET28-AT, pET28-CG, and pKY206, or pET28-AT and pKY206 was examined at the appropriate growth stages. Panel A: Transformants overproducing CG  $\beta$ -glucosidase. Panel B : Transformants overproducing AT  $\beta$ -glucosidase. O, overproduction without GroEL/ES at 37°C; ●, co-overproduction with GroEL/ES at 37°C; Δ, overproduction without GroEL/ES at 25°C; ▲, co-overproduction with GroEL/ES at 25°C.

**Deleted mutant의 chaperonin에 의한 총 활성의 향상**

Deleted mutant로 제조된 pET28(a)-RGRAR vector로부터  $\beta$ -glucosidase의 총 활성을 검토하기 위하여 pET28(a)-RGRAR vector의 단독으로, 그리고 pET28(a)-RGRAR vector와 pKY206 plasmid를 coexpression 시켜 25°C에서 배양하였다. 균주의 성장은 CG나 AT의 transformant와 마찬가지로 Figure 5에서 chaperonin과 cotransformation된 pET28(a)-RGRAR의 transformant가 단독의 pET28(a)-RGRAR의 transformant 보다 성장률은 50% 정도로 낮은 것을 볼 수 있다. 그러나  $\beta$ -glucosidase의 총 활성은 chaperonin과 coexpression된  $\beta$ -glucosidase가 단독으로 발현된 pET28(a)-AT의  $\beta$ -gluco-

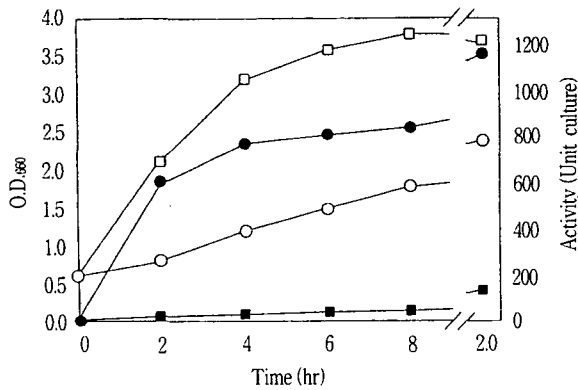


Figure 5. Effect of molecular chaperonin GroEL/ES on enzyme activity and growth of the transformant. Higher enzyme activity in soluble fraction was obtained from cells harboring the pET28(a)-RGRAR and pKY206 plasmid (●) compared to that from cells with the pET28(a)-RGRAR plasmid only (■). The growth of the transformant harboring the pET28(a)-RGRAR and pKY206 plasmid (○) was inhibited compared with that with the pET28(a)-RGRAR plasmid only (□).

sidase 활성보다 16배 이상 높은 것으로 나타났다. 따라서 Deleted mutant로 제조된 pET28(a)-RGRAR의 경우에서도 chaperonin은  $\beta$ -glucosidase의 총 활성의 향상에 아주 큰 효과가 있는 것으로 판단된다.

## 결론

단백질 공학에 있어 vector의 발전은 cloning된 유전자로부터의 과잉발현이 가능하지만 과잉 생산된 단백질은 inclusion body를 형성하여 활성을 갖지 못하는 경우가 많다. 본 실험에서도 재 조합된  $\beta$ -glucosidase의 유전자를 pET vector로 이전하여  $\beta$ -glucosidase를 과잉으로 생산할 수 있었으나,  $\beta$ -glucosidase의 대부분이 과잉 생산되면서 빠른 속도로 축적되어 inclusion body를 형성함으로써 대량의 활성형  $\beta$ -glucosidase를 얻지 못하였다. 따라서 inclusion body를 가용화할 목적으로 chaperonin의 refolding 효과와 37°C에서의 배양보다도 25°C에서의 배양이 효소를 천천히 생산함으로써 불용성의 응집 형성을 방지할 수 있을 것으로 판단되어, pET28(a)-CG, pET28(a)-AT, 그리고 deleted mutant인 pET28(a)-RGRAR 등의 3가지의 vector와 GroEL/ES의 유전자를 가진 plasmid를 coexpression하였다. pET28(a)-CG 및 pET28(a)-AT는 chaperonin이 없는 단독의 균체 배양에서는 비수용성의  $\beta$ -glucosidase가 과잉 생산되어 활성이 낮았으나, chaperonin과 동시 발현된  $\beta$ -glucosidase는 수용성이 증가되고 활성이 현저히 향상되는 것을 볼 수 있었다. 그리고, deleted mutant인 pET28(a)-RGRAR도 chaperonin과의 동시 발현에 의하여 생산된  $\beta$ -glucosidase가 단독의 pET28(a)-RGRAR의 균주보다 활성이 16배 이상 증가된 것으로 나타났다. 이와 같이 chaperonin은  $\beta$ -glucosidase의 3차 구조를 도와 refolding 되게하며 이에 따라  $\beta$ -glucosidase 원래의 활성으로 되돌아갈 수 있게하는 기능을 가지고 있다.  $\beta$ -glucosidase의 과잉생산에 의한 inclusion

body의 가용화는  $\beta$ -glucosidase와 GroEL/ES와의 coexpression과 더불어 저온(25°C)에서의 균주의 배양은 서로 상호 효과로 작용하여  $\beta$ -glucosidase를 활성형으로 전환함에 중요한 요소가 됨을 알 수 있었다.

## 참고 문헌

1. Kawata, Y. and J. Nagai (1993), 분자샤페론 단백질, *화학*, 48(3), 194-198.
2. Kawata, Y. (1993), 단백질 분자의 구조 형성とその 안정성, *단백질 핵산 효소*, 38(1), 11-25.
3. Kimura, Y. and I. Yahara (1996), 스트레스 단백질 Hsp90 분자 샤페론 기능, *단백질 핵산 효소*, 41(7), 883-887.
4. Kawata, Y., K. Nosaka, K. Hongo, T. Mizobata and J. Nagai (1994), Chaperonin GroE and ADP facilitate the folding of various proteins and protect against heat inactivation, *FEBS Letter*, 345, 229-232.
5. Kuwajima, K. (1996), GroELによる標的蛋白質認識의 분자 구조, *단백질 핵산 효소*, 41(7), 860-867.
6. Taguchi, H. and M. Yoshida (1996), 샤페론의 구조와 작용 기구, *단백질 핵산 효소*, 41(7), 849-859.
7. Kawata, Y. (1993), 분자 샤페론 GroE의 작용 기구, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 70(5), 576-579.
8. Fenton, W. A., Y. Kashi, K. Furtak, A. L. Horwich (1994), Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release, *Nature*, 371(6498), 614-619.
9. Mark, S., H. L. George and S. W. Englander (1999), Chaperonin Function: Folding by Forced Unfolding, *Science*, 284(5415), 822-825.
10. Ashiuchi, M., T. Yoshimura, T. Kitamura, Y. Kawata, J. Nagai, S. Goratov, N. Esaki, and K. Soda (1995), In Vivo Effect of GroESL on the Folding of Glutamate Racemase of *Escherichia coli*, *J. Biochem.*, 117, 495-498.
11. Mizobata, T., Y. Akiyama, K. Ito, N. Yumoto and Y. Kwata (1992), Effects of the Chaperonin GroE on the refolding of Trptophanase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 267(25), 17773-17779.
12. Kubo, T., T. Mizobata and Y. Kawata (1993), Refolding of Yeast Enolase in the presence of the Chaperonin GroE, *J. Biol. Chem.*, 268(26), 19346-19351.
13. Singh, A. and K. Hayshi (1995), Construction of chimeric  $\beta$ -glucosidase with improved enzymatic properties, *J. Biol. Chem.*, 270, 21928-21933.
14. Singh, A., K. Hayashi and T. T. Hoa (1995), Construction and characterization of a chimeric  $\beta$ -glucosidase, *Biochem. J.*, 305, 715-719.
15. Okazaki, A., K. Katsumata and K. Kuwajima (1997), Hydrogen-Exchange Kinetics of Reduced & alpha;-Lactalbumin Bound to the Chaperonin GroEL, *J. Biochem.* 121, 534-541.