

트립토판 중합효소 α 소단위체의 폴딩에 미치는 24번 잔기 치환효과

박후희 · 김종원 · 신혜자* · 임운기†

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

*동서대학교 환경공학과

Effect of Substituted Residue 24 on Folding of Tryptophan Synthase α Subunit

Hoo-Hwi Park, Jong-Won Kim, Hae-Ja Shin* and Woon-Ki Lim†

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Department of Environmental Engineering, Dongseo University, Pusan 616-010, Korea

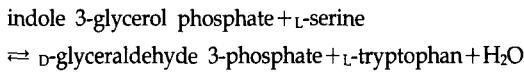
Abstract

In order to elucidate a role of residue 24 in the folding of tryptophan synthase α subunit, mutant proteins in which Thr 24 was replaced by Met, Ala, Ser, Leu or Lys were overexpressed in *E. coli*, and the extents of accumulated proteins as soluble or aggregated forms were examined. The mutant proteins with Met or Leu at residue 24 were predominantly accumulated as soluble forms as the native protein. On the other hand, mutant proteins with Ser, Ala or Lys at residue 24 were expressed as aggregated forms as well. This result suggests that residue 24 of tryptophan synthase α subunit may be implicated in the folding of this protein.

Key words – Tryptophan synthase α subunit, in vivo Folding, Mutant

서 론

트립토판 중합효소는 $\alpha_2\beta_2$ 복합체로 존재하며, 다음 반응(α β 반응)을 촉매하여 L -tryptophan를 합성한다.



α 소단위체(분자량=28,600Da)는 트립토판 생합성에서 indole 3-glycerol phosphate를 indole과 D-glyceraldehyde 3-phosphate로 분해(α 반응)하며, 조효소나 이황화결합을

가지고 있지 않아 폴딩 연구에 좋은 재료가 되고 있다 [12,21]. β 소단위체(분자량=43,500Da)는 이량체로 존재하고 각 단위체당 한 분자의 pyridoxal phosphate를 조효소로 가지고 있으며, indole과 L -serine으로부터 L -tryptophan을 합성(β 반응)한다. α 와 β 두 소단위체는 결합하여 $\alpha_2\beta_2$ 복합체를 이루게 되면 두 반응의 합인 α β 반응을 촉매하며, 이때 두 소단위체는 결합에 의한 구조적인 변화를 수반하고 각기의 반응을 증가시키게 된다 [13].

살모넬라(*S. typhimurium*) 동종효소의 X-선 결정구조에 의하면 3차 구조가 α/β 의 구조가 8번 반복하는 barrel

*Corresponding author

motif 기본 구조에 3개의 α 나선구조가 추가로 존재한다고 알려져 있다 [12]. 대장균 효소의 구조는 아직 밝혀져 있지 않지만, 살모넬라의 효소와는 아미노산 배열이 85% 가 같고, 여러 가지 효소 활성의 특성과 폴딩 성질이 거의 동일한 것으로 미루어 구조가 거의 동일한 것으로 보여 구조의 활용성이 가능하다.

트립토판 중합효소 α 소단위체는 잔기 1-188의 N-domain과 잔기 189-286의 C-domain으로 나누어진 두 개의 폴딩 domain($\alpha 1$ 과 $\alpha 2$)으로 구성되어 있다. 이를 밝혀진 barrel motif의 3차 구조와 비교하면 N-domain은 N-말단으로부터 helix 5개와 sheet 6개로 이루어져 있고, C-domain($\alpha 2$)은 3개의 helix와 2개의 sheet로 구성된다 [11, 20]. 최근에 α 소단위체의 잔기 139번과 258번 페닐알라닌을 트립토판으로 각기 치환하여 두 폴딩 domain을 개별적으로 조사하여 보고한 바에 따르면, 주요한 폴딩 중간체의 구조가 $\alpha 1$ domain은 중간적인 구조를 가지고 $\alpha 2$ domain은 완전히 폴딩된 상태로 또는 완전히 unfolding된 상태로 존재하는 두 종류가 혼합된 형태라고 제한된 바 있다 [6].

트립토판 중합효소 α 소단위체의 *in vivo* 폴딩 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 하나의 아미노산 잔기를 치환하고 이를 대량발현(over-expression)시켰을 때 inclusion body 상태로 나타난다는 보고가 있었다 [16,18]. inclusion body의 형성과정은 폴딩과정에서의 중간체들이나 misfolding된 단백질들에 의해 일어난다.

inclusion body의 형성과 관련된 단백질의 응집과정은 미생물의 배양온도, 배지의 pH, 소단위체 간의 상호작용, 조효소 존재유무, chaperone의 작용, 이온 강도 등의 요인에 영향을 받는다. 또한 peptide prolyl cis-trans isomerase, protein disulfide isomerase, 리간드의 결합유무 등이 *in vivo* 폴딩 기작에 중요한 요인이 된다고 보고가 있었다 [2,7,8,10,19,22]. 본 연구에서는 아미노산 잔기의 치환이 *in vivo* 폴딩에 영향을 보고자 24번 잔기인 Thr이 다른 아미노산으로 치환된 트립토판 중합효소 α 소단위체의 3차구조 형성을 *in vivo*에서 조사하였다.

재료 및 방법

박테리아 균주 및 플라스미드

대장균 균주 RB797 (F' lac I^q proL8/arg Nal r Rif r recA

sup lac proXIII)는 돌연변이 단백질들을 발현하는데 사용하였다. *trpA* 유전자를 포함하고 있는 플라스미드 ptactrpAMK-M13은 단백질의 대량발현 과정에 사용하였다 [24]. *trpA* 유전자는 D-락토오스에 의해 대량발현이 유도되는 tac 전사조절인자를 가지고 있다 [24].

시약

모든 시약은 순도가 높은 것(ultrapure)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

클로닝 및 형질전환

139번 잔기가 트립토판으로 치환된 부위와 24번 잔기가 치환된 부위가 같이 있는 이중잔기치환체를 클로닝한 방법은 다음과 같다. 먼저 플라스미드 DNA는 alkaline lysis 방법을 사용하여 분리하고, 분리된 각 플라스미드 DNA를 제한효소인 Sal I과 BssH II를 사용하여 자른 다음 1% 아가로스 겔에서 분리하여 그림 1에서와 같이 클로닝하여 이중잔기치환된 플라스미드 DNA를 작성하였다 [23].

단백질의 대량생산을 위해 대장균 RB797에 형질전환시킨 방법은 CaCl₂ 방법을 사용하였다[23].

단백질의 대량생산 및 분리방법

자연형 및 돌연변이 단백질들은 대장균 RB797에서 대량생산하고 분리하였다 [17]. 단백질의 대량생산은 plasmid 를 가진 대장균을 20ml TYS(1% bactotrypton, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride)배지에서 약 16시간 배양한 후, 이를 새로운 1L TYS배지로 옮겨 600nm에서 흡광도가 약 0.4가 될 때 10% 젖당 100ml(최종농도 1%)로 발현을 시키고 22시간을 더 배양하였다. 이렇게 배양된 대장균은 원심분리(28,000×g에서 10분)하여 수확(harvest)한 후 100ml의 10mM KPO₄ (pH 7.8), 5mM EDTA, 0.2mM PMSF, 0.2mM DTT 완충용액에 대장균을 현탁하고 원심분리하여 용액을 제거하는 방법을 2회 반복하여 여분의 배지성분을 제거하였다. 수확된 대장균은 같은 용액 15ml 에 다시 현탁시켜 초음파 파쇄기를 사용하여 켠 후 원심분리(28,000×g에서 20분)로 침전물을 제거하고 단백질 추출액을 얻었다. 단백질 추출액은 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 35-50% 포화(100% 포화; 70g/100ml) 농도에서 침전된 분

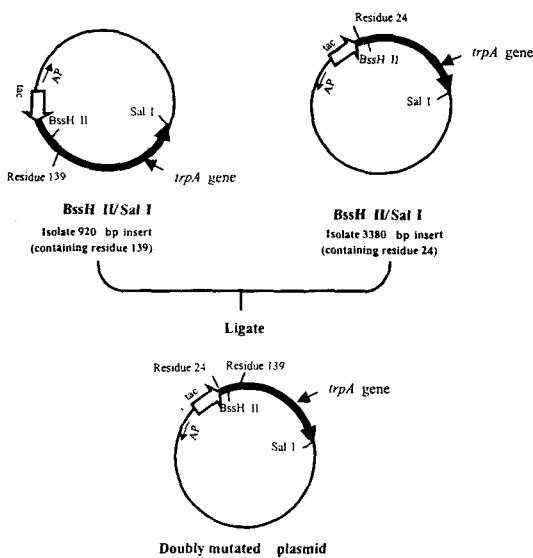


Fig. 1. Construction of plasmid containing doubly mutated *trpA*.

The open bar arrow represents the *tac* promoter and the direction of transcription. The solid bar represents the *trpA* gene encoding Tsase α subunit. Each of two plasmids was cut with *BssH* II and *Sal* I. Fragment containing FW139 mutation and backbone fragment containing mutation at residue 24 were isolated and ligated.

획을 얻어 이를 이온크로마토그래피로 순수분리하였다. 이온크로마토그래피는 Protein-Pak™ DEAE 5PW(Waters사) 칼럼을 사용하여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography, Waters사)로 분리하였다 [24]. 이 때 사용된 완충용액은 5mM EDTA, 0.2mM PMSF, 0.2mM DTT가 포함된 KPO₄(pH 7.8)이며, 결합 단백질의 용출은 KPO₄(pH 7.8) 농도를 10mM에서 500mM로 직선 농도 구배로 용출시켰다. 정제된 단백질 분획의 순도는 SDS-전기 영동을 실시하여 Coomassie Brilliant Blue R250으로 염색하여 확인하였다.

단백질의 농도결정

단백질 추출액의 단백질 농도는 microbiuret 방법을 사용하여 결정하였다 [15]. 순수 정제된 자연형의 α 소단위체와 β_2 소단위체의 농도는 흡광계수를 사용하여 결정하였다. 이때 α 소단위체의 경우에는 $E^{1\%}_{278nm} = 4.4$ 를, β_2 소단위체의 경우에는 $E^{1\%}_{278nm} = 6.5$ 를 사용하였다 [1,9].

잔기가 치환된 돌연변이 단백질의 경우에는 자연형과 비교하여 microbiuret 방법을 사용하여 결정하였다.

효소 활성도 측정

트립토판 $\alpha_2\beta_2$ 중합효소의 β_2 소단위체 특이 반응(β 반응)은 α 소단위체를 몰비로 β 에 비해 5배 이상 첨가한 조건으로 Kirschner등의 방법으로 측정하였다 [14].

결 과

α 소단위체의 *in vivo* 폴딩에 있어서의 24번 잔기 치환의 영향

Inclusion body의 형성이 폴딩과정에서의 중간체들이나 misfolding된 단백질들에 의해 일어난다고 알려져 있어 이들의 형성 정도에 따라 *in vivo* 폴딩의 기작의 변화를 유추해 볼 수 있다 [16,18]. 또한 단백질의 3차 구조가 아미노산 순열 즉, 1차 구조에 의해 형성되므로 단일잔기 치환의 방법을 사용하여 24번 잔기의 역할을 알아보았다.

잔기 24번 트레오닌이 메티오닌으로 치환된 돌연변이체(TM24)의 경우 자연형과 거의 동일한 효소활성을 가지며, 특히 열에 대한 안정성이 크게 증가되었다는 보고된 바 있어 이 단백질의 *in vivo* 폴딩에 24번 잔기가 중요한 역할을 할 수도 있다고 제안된 바 있다 [17, 18]. FW139는 139번 자리의 페닐알라닌이 트립토판으로 치환된 돌연변이체로 트립토판 잔기의 형광성질을 표지로 활용하여 *in vitro* 폴딩의 연구에 유용하게 쓰이고 있다 [6]. FW139 돌연변이체는 자연형의 효소와 여러 가지 효소 활성의 특성과 폴딩 성질이 거의 동일한 것으로 이미 보고된 바 있다 [6]. 본 연구에서는 잔기 24번 치환체의 *in vitro* 폴딩 성질도 차후에 조사 비교할 수 있도록 여러 가지 잔기 24번 돌연변이체를 FW139 치환체와 합하여 *in vivo* 폴딩을 조사하였다.

그림 2는 트립토판 중합효소 α 소단위체의 잔기 24번이 각기 다른 아미노산으로 치환된 돌연변이체를 과량발현하여 수용성 상태와 inclusion body 상태로 분리하여 SDS-PAGE로 전개한 것이다. FW139는 자연형과 마찬가지로 과량발현시 대부분 수용성(S)으로 발현되었으며, inclusion body(P)로는 거의 나타나지 않았다. 이와는 달리 잔기 24번 트레오닌이 치환된 이중잔기치환 α 소단위체는

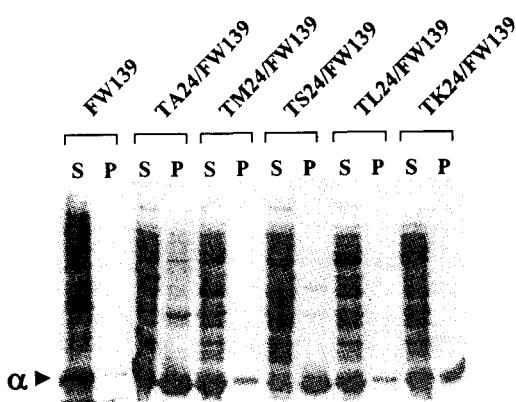


Fig. 2. Amounts of mutant α subunits in the soluble or aggregated forms after lactose induction.

E. coli cells carrying various *trpA* genes were harvested after 22hr induction with lactose. The cells were resuspended in 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 10mM β -mercaptoethanol, 5mM EDTA, 0.2mM PMSF, and sonicated, and centrifuged at 28,000 \times g for 15 min. The pellet (P) was resuspended in the same buffer. 50 μ g of each supernatant (S) was loaded, and the amount of loaded pellets are equivalent to that of supernatant in term of volume.

체의 경우는 종류에 따라 inclusion body로 나타나는 α 소단위체의 양이 다르게 나타남을 볼 수 있다. 이들의 inclusion body의 형성정도를 비교해 보면, 메티오닌이나 류신으로 치환된 돌연변이체들(TM24/FW139와 TL24/FW139)은 FW139와 마찬가지로 수용성이 대부분을 차지하는 반면, 세린이나 알라닌 또는 리신으로 치환된 돌연변이체들(TS24/FW139, TA24/FW139 및 TK24/FW139)은 FW139에 비해 많은 양이 inclusion body로 대량발현되었으며, 그 양에 있어서도 차이를 보이고 있다. 각 단백질의 과량 발현시 사용된 균주와 배양, 발현유도, 단백질 추출 등의 조건이 모두 동일하므로 이러한 inclusion body 형성의 차이는 α 소단위체의 24번 자리의 잔기 치환에 따른 영향으로 생각할 수 있다.

잔기치환 단백질의 효소활성도

트립토판 중합효소의 각 소단위체의 효소반응(α 반응과 β 반응)은 두 소단위체가 결합하였을 때 야기되는 구조적인 변화로 인하여 각각의 활성도가 훨씬 증가된다 [13].

표 2는 잔기가 치환된 α 소단위체들을 정제한 후 β_2 소단위체와 결합시켜 β 반응을 측정한 것이다. 수용성으로 나타나는 FW139와 TM24/FW139 및 TL24/FW139는 β 반응의 활성도가 자연형과 거의 같고, 자연형에 비해 inclusion body의 양이 상대적으로 많은 TS24/FW139와 TA24/FW139 및 TK24/FW139는 낮게 나타났다. 이는 α 소단위체가 결합에 의한 구조적인 변화를 유발하여 β 소단위체의 활성을 증가시키는데 있어서도 24번 자리의 치환된 아미노산 잔기의 크기가 관여하고 있음을 제시하고 있다. 또한 β 반응의 활성도가 세린과 알라닌에 비해 리신으로의 치환이 상대적으로 낮게 나타나는 것은 리신의 (+)전하에 의해 α 와 β 소단위체간의 상호작용에 큰 영향을 준 것으로 사료된다.

고찰

자연형의 α 소단위체에서 단 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 치환하여 이를 대장균에서 대량발현시켰을 때 inclusion body로 형성되는 단백질들은 *in vivo*에서 특정 아미노산 잔기 폴딩에 있어서 갖는 역할을 연구하기에 좋은 대상이 된다 [18]. 최근의 보고에 의하면 돌연변이에 기인한 단백질의 불완전한 3차 구조나 폴딩 과정에서의 중간체들은 세포 내에서 단백질의 mislocation을 유발하기도 하며, 또한 이들의 응집으로 정상적으로는 수용성으로 나타나야하는 단백질이 소수성 덩어리를 형성함에 따라 세포나 조직에 구조적, 기능적인 이상(amyloidosis)을 초래하는 심각한 질병들(Alzheimer's disease, Huntington's related disease, prion-transmissible spongy form encephalopathies 등)에도 관계한다는 보고들이 있어 단백질의 돌연변이에 의한 폴딩 기작의 변화에 대한 연구가 매우 중요함을 알 수 있다 [4].

표 1은 24번 잔기가 치환된 아미노산의 반데르발스 부피, 소수성 및 친수성의 강도를 나타낸 것이다. 반데르밸스 부피로 보면 리신>메티오닌>류신>트레오닌(자연형)>세린>알라닌의 순으로, 소수성의 강도는 류신>메티오닌>알라닌>트레오닌(자연형)>세린>리신 순으로 감소한다. 수용성에 의해 inclusion body로 나타나는 양이 증가된 세린(TS24/FW139)과 알라닌(TA24/FW139)으로 각기 치환된 돌연변이체의 경우 다른 돌연변이체에 비해 잔기의 크기

Table 1. Some properties of altered residues at residue 24 as free amino acid

	Van der Waals volume(Å ³) ^a	Hydrophilicity (kcal/mol) ^b	Hydrophobicity(kcal/mol)			
			Side Chain analogue ^b	Amino Acid ^c	N-Acetyl amide ^d	Calculated ^e
Met	124	-3.87	-1.41	-1.3	-1.23	-0.96
Leu	124	-0.11	-3.98	-1.8	-1.70	-1.82
Thr(WT)	93	-7.27	3.51	-0.4	-0.26	1.00
Ala	67	-0.45	-0.87	-0.5	-0.31	-0.39
Ser	73	-7.45	4.34	0.3	0.04	1.24
Lys	135	-11.19	6.49	3.0	1.01	3.95

^aCreighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular properties*, p141 2nd Ed. Freeman(1993)^bRadzicka, A. and Wolfenden, R.: Comparing the polarities of the amino acid: side-chain Distribution Coefficients between the vapor phase, Cyclohexane, 1-Octanol, and Neutral Aqueous Solution, *Biochemistry*, 27, 1664(1988)^cNozaki, Y. and Tanford, C.: The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale, *J. Biol. Chem.*, 246, 2211(1971)^dFauchere, J. and Pliska, V.: Hydrophobic parameters Π of amino-acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides, *Eur. J. Med. Chem.*, 18, 369(1983)^eRoseman, M. A.: Hydrophilicity of polar amino acid side-chains is markedly reduced by flanking peptide bonds, *J. Mol. Biol.*, 200, 513(1988)

가 작은 것으로 바뀌었음을 알 수 있다. 특히 세린으로 치환된 경우(TS24/FW139) 대부분이 inclusion body로 나타나는 것은 세린이 다른 아미노산에 비해 크기가 작고 소수성이 강도가 약해서 두 효과가 동시에 영향을 주었을 가능성도 있다. 알라닌(TA24/FW139)과 리신(TK24/FW139)으로 치환된 경우 수용성 α 소단위체가 세린에 비해 많은 양으로 나타나는 것은 세린에 비해 알라닌은 소수성이 상대적으로 강하며, 리신은 크기가 상대적으로 크기 때문인 것으로 추정된다. 즉, 트립토판 중합효소의 α 소단위체에서 24번 잔기 위치에는 부피가 작거나 친수성이 강한 아미노산은 적합하지 않은 것 같다. 만일 24번 잔기에 이러한 적합하지 못한 잔기가 돌연변이에 의해 치환되었을 경우 돌연변이체는 *in vivo* 폴딩 기작의 변화로 폴딩에 있어서의 중간체나 misfolding된 단백질이 세포 내에 축적하게 되어 궁극적으로 inclusion body로 나타나는 것으로 판단된다.

본 연구의 결과에 따르면 α 소단위체의 잔기 24번 자리에는 크기가 크고 소수성이 강한 아미노산 잔기들(트레오닌, 메티오닌, 류신)이 대장균에서의 단백질 과량발현시 대다수가 수용성으로 나타나고 *in vivo* 폴딩에 유리하게 작용됨을 알 수 있다. 그러나 β 반응의 활성도는 폴딩과는 큰 상관관계가 없는것 같다. 24번 잔기가 리신으로 치환(TK24/FW139)된 경우, *in vivo* 폴딩에서도 문제점을 보

이고 있지만 효소의 활성은 현저하게 저하(16%)시키는 결과를 보여 주었다(표 2). Lim등의 보고에 따르면 대량발현 시 68%가 inclusion body로 나타나는 돌연변이 α 소단위체 PL28을 KSCN으로 녹여내었을 때, α 반응에서 98%와 β 반응에서 90%의 효소 활성도를 보여 inclusion body 형성과 효소의 활성은 크게 상관관계가 없음을 이미 보여주었다 [18].

α 소단위체의 폴딩에 있어서 최근에 발표된 보고에 의하면 잔기 139번과 258번 페닐알라닌을 트립토판으로 각기 치환하여 두 폴딩 domain을 개별적으로 조사하여 보고된 바, 주요한 폴딩 중간체의 구조가 α 1 domain은 중간적인 구조를 가지고 α 2 domain은 완전히 폴딩된 상태로 또는 완전히 unfolding된 상태로 존재하는 두 종류가 혼합된 형태라고 제안된 바 있었다 [6]. 따라서 이 효소의 폴딩 기작에 있어서 두 domain을 따로 분리하여 생각해 보면, α 1 domain은 하나의 중간적인 구조를 가지며, α 2 domain은 중간적인 구조를 가지지 않는다는 것을 말해 준다. 만약 두 폴딩 domain간의 상호작용을 배제한다면 inclusion body의 형성과 관련이 있는 응집과정은 α 1 domain이 중요하게 작용할 것으로 사료된다. 즉, 자연형 비해 크기가 작거나 친수성이 강한 아미노산의 치환이 α 1 domain의 폴딩 속도가 느려지게 하거나 소수성 아미노산들이 보다 불안정한 폴딩의 중간구조로 인해 많은 응집이

Table 2. Relative activities of wild type and mutant tryptophan synthase α subunits

TSase	Relative Specific Activities(%)
Wild Type	100
FW139	87±2
TA24/FW139	60±17
TM24/FW139	108±20
TS24/FW139	57±8
TL24/FW139	104±4
TK24/FW139	16±5

Enzymatic activities were measured in stimulating catalytic activities of β subunit in β reaction (indole + serine \rightarrow tryptophan + H₂O)

유도되었을 것으로 사료된다.

대장균이 아닌 다른 종의 미생물과 동일 효소의 아미노산 서열을 비교하여 보면(data not shown) 24번 잔기의 위치에 다수(*S. typhimurium*, *V. parahomolyticus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* 등)의 경우 대장균의 효소와 마찬가지로 트레오닌을 가지고 있지만 메티오닌(*C. crescentus*)이나 발린(*L. casei*)인 경우도 나타났다. 본 연구에 사용되진 않았지만, 발린은 반데르발스 부피가 105 Å³으로 트레오닌(자연형), 메티오닌, 류신과 유사하며, 소수성의 강도는 -1.5 kcal/mol로 트레오닌이나 메티오닌 보다 오히려 큰 아미노산임으로 풀딩에 있어서 잔기 24번의 크기와 소수성 성질에 관여한다는 본 연구결과를 뒷받침해 준다고 볼 수 있다.

요 약

본 연구에서는 대장균 트립토판 중합효소(triptophan synthase) α 소단위체의 풀딩에 있어 24번 잔기의 역할을 보고자 하였다. 24번 잔기인 트레오닌이 메티오닌, 알라닌, 세린, 류신 또는 리신으로 치환된 단백질을 대장균내에서 과량 발현시켜 수용성 구조의 양과 비수용성인 inclusion body양을 조사하였다. 그 결과 메티오닌이나 류신으로 치환된 α 소단위체는 트레오닌이 있는 소단위체와 마찬가지로 수용성 구조가 대부분을 차지하였다. 반면, 세린이나 알라닌 또는 리신으로 치환된 단백질들은 많은 양의 inclusion body로 발현되었다. 이 결과는 트립토판 중합효

소 α 소단위체의 풀딩에 있어서 24번 잔기가 관여하고 있음을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기성회재원 학술연구조성비에 의해 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- Adachi, O., Kohn, L. D., and Miles, E. W. 1974. A rapid method for preparing crystalline β_2 subunit of tryptophan synthase of *Escherichia coli* in high yield, *J. Biol. Chem.* **249**, 7756.
- Albert, T. 1989. Mutational effects of protein stability, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 765.
- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, **181**, 223.
- Betts, S., Haase-Pettingell, C. and King, J. 1997. Mutational effects on inclusion body formation, *Adv. Protein. Chem.*, **50**, 243.
- Bychkova, V. E. and Ptitsyn, O. B. 1995. Folding intermediates are involved in genetic disease?, *FEBS Letters*, **359**, 6.
- Choi, S. G. and Hardman, J. K. 1995. Unfolding properties of tryptophan-containing alpha-subunits of the *Escherichia coli* tryptophan synthase, *J. Biol. Chem.* **270**, 28177.
- Creighton, T. E. 1993. *Proteins : Structures and Molecular Properties*, pp.383-84 2nd Ed. Freeman.
- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. 1990. Molecular C. B. pp.659-62, 2nd Ed. Scientific American Books.
- Faeder, E. J., and Hammes, G. G. 1970. Kinetic studies of tryptophan synthase. Interaction of substrates with β subunit, *Biochemistry* **9**, 4043.
- Gething, M. J. and Sambrook, J. 1992. Protein folding in the cell, *Nature*, **355**, 33.
- Higgins, W., Fairwell, T. and Miles, E. W. 1979 An active proteolytic derivative of the alpha subunit of tryptophan synthase. Identification of the site of cleavage and characterization of the fragment, *Biochemistry*, **22**, 4827.
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W. and Davies, D. R. 1988. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.*

- 267, 17857.
13. Kayastha, A. M., Sawa, U., Nagata, S. and Miles, E. W. 1990. Site-directed mutagenesis of the β subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 7618.
 14. Kirschner, K., Wiskocil, R. L., Foehn, M. and Rezeau, L. 1975. The tryptophan synthase from *Escherichia coli*. An improved purification procedure for the alpha-subunit and binding studies with substrate analogues, *Eur. J. Biochem.* **60**, 513.
 15. Leggett-Bailey, J. 1962. *Techniques in Protein Chemistry* p249, Elsevier Scientific Publishing Co. Inc., New York.
 16. Lim, W. K., Brouillette, C. and Hardman, J. K. 1992. Thermal stabilities of mutant *Escherichia coli* of tryptophan synthase alpha subunits, *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 34.
 17. Lim, W. K., Shin, H. J., Milton, D. L., and Hardman, J. K. 1991. Relative activities and stabilities of mutant *Escherichia coli* tryptophan synthase alpha subunits, *J. Bactiol.*, **173**, 1886.
 18. Lim, W. K., Smith-Somerville, H. E. and Hardman, J. K. 1989. Solubilization and renaturation of over-expressed aggregates of mutant tryptophan synthase alpha subunits, *Appl. Environ. Micro.*, **55**, 1106.
 19. Martin, J., Horwich, A. L. and Hartl, F. U. 1992. Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaeronin Hsp60, *Science*, **258**, 995.
 20. Miles, E. W., Yutani, K. and Ogasahara, K. 1982. Guanidine hydrochloride induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase and of the two alpha proteolytic fragments : evidence for stepwise unfolding of the two alpha domains, *Biochemistry* **21**, 2586.
 21. Milton, D. L., Napier, M. L., Muers, R. W. and Hardman, J. K. 1986. *In vitro* mutagenesis and over-expression of the *Escherichia coli* trpA gene and the partial characterization of the resultant tryptophan synthase mutant alpha subunits, *J. Biol. Chem.* **261**, 16604.
 22. Mitraki, A. and King, J. 1989. *Bio/Technology* **7**, 690.
 23. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning* 1.82-1.84, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd. Ed. USA.
 24. Sarker, K. D., and Hardman, J. K. 1995. Affinities of phosphorylated substrates for the *E. coli* tryptophan synthase alpha-subunit: roles of Ser-235 and helix-8' dipole, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **21**, 130.
 25. Selkoe, K. J. 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.*, **271**, 18295.