

지질의 첨가를 통한 포도당 기반 무세포 단백질 합성 시스템의 단백질 발현 효율 향상

이소정 · 김호철 · 김동명[†]

충남대학교 응용화학공학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99
(2018년 10월 20일 접수, 2018년 11월 7일 수정본 접수, 2018년 11월 13일 채택)

Enhancement of Glucose-Fueled Cell-Free Protein Synthesis by the Addition of Lipids

So Jeong Lee, Ho-Cheol Kim and Dong-Myung Kim[†]

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University,
99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea

(Received 20 October 2018; Received in revised form 7 November 2018; accepted 13 November 2018)

요 약

무세포 단백질 합성 시스템은 세포를 파쇄한 후 파쇄액 내의 단백질 합성기구들을 이용하여 단백질을 발현하는 시스템으로 기존의 세포 기반 재조합 단백질 발현 기법들과 달리 세포의 성장조건에 영향을 받지 않으면서 발현 조절에 관한 다양한 인자들을 인위적으로 조절 할 수 있는 장점이 있다. 그러나, 단백질 합성 과정 중 소모되는 ATP의 연속적 재생을 위해 사용되는 에너지원의 높은 비용과 낮은 안정성은 재조합 단백질 대량생산에의 적용을 제약하는 요인으로 작용하여 왔다. 이러한 문제를 해결하기 위한 대안들 중의 하나로 포도당을 에너지원으로 사용하여 세포 파쇄액 내 대사과정을 통해 ATP를 재생하는 방법이 있다. 본 연구에서는 포도당을 에너지원으로 이용한 무세포 합성 시스템에서의 단백질 합성 효율 향상을 위하여 대장균 파쇄액으로부터 회수된 지질을 추가적으로 첨가함으로써 산화적 인산화 과정에서의 ATP재생을 증진시키고자 하였다. 그 결과, 지질이 추가된 무세포 단백질 합성 시스템은 지질이 추가되지 않은 대조군에 비하여 6배 이상 향상된 단백질 생산성을 나타내었다.

Abstract – Cell-free protein synthesis utilizes the translational machinery in a cell extract. Unlike the conventional cell-based expression methods, not being affected by the conditions for cell growth, cell-free protein synthesis enables flexible manipulation of individual factors affecting the efficiency protein biosynthesis. However, the high cost and low stability of the energy sources to regenerate ATP have limited the use of cell-free synthesis for large-scale production of recombinant proteins. One of the approaches to address this problem is to use glucose as an alternative energy source to regenerate ATP through the glucose-metabolizing pathways in a cell extract. In this study, in an attempt to improve the efficiency of ATP regeneration by reinforcing oxidative phosphorylation process, we supplemented with cellular lipids to a glucose-fueled reaction mixture for cell-free protein synthesis. As a result of the lipid supplementation, the productivity of chloramphenicol acetyltransferase in a cell-free synthesis system using glucose increased more than 6 fold compared to when the lipid was not supplemented.

Key words: Cell-free protein synthesis, ATP regeneration, Glucose, Energy source, Lipids

1. 서 론

무세포 단백질 합성 시스템은 당초 유전 정보로부터의 단백질 번역과정을 이해하기 위한 도구로서 개발 되었으나[1], 단백질 합성

효율을 결정하는 다양한 인자들에 대한 이해와 함께 그 생산성이 획기적으로 향상 됨에 따라 기존의 세포 기반 단백질 발현을 보완, 대체할 수 있는 방법으로 주목을 받고 있다[2-6]. 무세포 단백질 합성 시스템에 사용되는 리보솜 및 다른 전사 번역 인자들은 세포 밖으로 추출 했을 때 불안정하다는 일반적인 개념과는 달리, 단백질 합성에 요구되는 기질들의 공급과 저분자 부산물들의 제거가 지속적으로 이루어지는 연속 반응기 내에서 10 시간 이상 동안 단백질 합성 반응을 지속한다는 결과에서 볼 수 있듯이[5], 적절한 반응 환경이 유지될 경우 반응기 내에서도 장시간 동안 그 생물학적 기능

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: dmkim@cnu.ac.kr

‡이 논문은 충남대학교 이용택 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

을 유지한다는 사실이 보고되어 왔다[2]. 그러나 이 같은 연속식 무세포 단백질 합성 반응은 기질의 지속적인 공급과 부산물의 제거를 위해 다량의 기질과 별도의 반응장치가 요구된다는 문제점을 가지고 있다[7]. 이와 달리 회분식의 무세포 합성 시스템은 단백질 생산의 다중화 및 고숙화에 실용적으로 적용될 수 있다. 반면, 대부분의 회분식 무세포 단백질 합성 시스템은 주로 1 시간 이내에 단백질 합성이 종결되는 짧은 반응 시간으로 인해 그 생산성이 낮다는 단점을 가지는데, 이는 유전 정보를 단백질로 번역하는 과정에서 소모되는 많은 양의 ATP 재생에 한계를 가지고 있기 때문이다[8,9]. 따라서 ATP를 장시간 동안 안정적으로 공급할 수 있는 ATP 재생 시스템의 도입은 회분식 무세포 합성 시스템의 생산성 향상을 위한 필수적인 요소이다. 일반적으로 무세포 합성 시스템에서 ATP의 재생은 고 에너지 인산 결합을 갖는 화합물을 사용한 기질 수준의 인산화를 사용해왔다[10,11]. 그러나, 이들은 대부분 고가의 화합물이고 또한 세포 파쇄액에 존재하는 다양한 phosphatase에 의해 쉽게 분해되므로 ATP 재생에 사용되기 전에 빠르게 분해되어 효과적인 ATP 재생에 이용되지 못해 무세포 단백질 합성 수율을 낮추게 된다.

본 연구에서는, 세포 배양을 위한 탄소원으로 널리 사용되는 포도당을 무세포 단백질 생산을 위한 에너지원으로 이용하고자 하였다. 무세포 단백질 합성 반응에 요구되는 단백질 합성 기구들은 세포 파쇄액의 형태로 이용되므로 무세포 단백질 합성 시스템 내에는 세포 내에 존재하는 대부분의 효소들이 존재하게 되며, 이들 효소들에 의해 포도당의 에너지 대사가 진행되어 무세포 단백질 합성 반응 과정에 요구되는 ATP를 경제적이고 효율적으로 공급할 수 있었다. 포도당을 이용한 무세포 단백질 합성을 위해서는 산소의 공급이 추가적으로 요구되었으며 이로부터 무세포 시스템에 가해진 포도당은 해당 작용과 시트르산 회로 뿐만 아니라 전자전달계에 의한 산화적 인산화 반응에 이용되는 것을 확인 할 수 있었다. 무세포 단백질 합성 시스템에서의 산화적 인산화 반응은 세포 파쇄과정에서 형성된 반전된 막 소포(inverted microvesicle)에 의해 진행되는 것으로 예상 되었으며 산화적 인산화의 효율을 높임으로써 ATP 재생 및 단백질 생산 효율을 향상시키고자 반응액 내에 지질을 추가하였다. 그 결과, 같은 조건에서의 단백질 생산성을 지질의 추가를 통해 현저히 향상시킬 수 있었다. 이러한 결과들을 통하여 무세포 단백질 합성 시스템이 산업적으로 단백질 대량생산에 적용될 수 있음을 확인하였고, 에너지 대사 연구에 유용한 가치가 있음을 확인하였다.

2. 실험

2-1. 실험재료

본 연구에 사용된 ATP, GTP, UTP, CTP, creatine phosphate, creatine kinase는 Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA)로부터, L-[U-¹⁴C] leucine은 Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), 그 외 모든 시약은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 무세포 단백질 합성 반응에서 단백질 합성 기구로 사용된 세포 파쇄액 S12는 BL21 star (DE3) 대장균 균주를 사용하여 이전에 보고된 바와 같이 제조하였다[15].

2-2. 무세포 단백질 합성 시스템

무세포 단백질 합성 시스템의 단백질 생산 효율을 확인하기 위하

여 목적 단백질은 Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)을 이용하였고 해당 유전자를 T7 promoter와 T7 terminator가 포함된 pK7 플라스미드에 클로닝 하여 (pK7CAT) 사용하였다. Creatine phosphate (CP)를 에너지원으로 이용한 무세포 단백질 합성 시스템의 반응액 조성은 다음과 같다. 67 mM CP, 57 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1.2 mM ATP, 각 0.85 mM의 CTP, GTP 및 UTP, 2 mM DTT, 90 mM potassium glutamate, 80 mM ammonium acetate, 8 mM magnesium acetate, 34 µg/mL folinic acid, 각 2.0 mM의 20종 아미노산, 5.6 µg/mL creatine kinase, 2% (w/v) polyethylene glycol 8000, 6.7 µg/mL pK7CAT 플라스미드, 26.7% (v/v) S12 세포 파쇄액. Glucose system; 80 mM glucose, 20 mM phosphate, 240 mM HEPES-KOH (pH 8.2), 1.2 mM ATP, 각 0.85 mM의 CTP, GTP 및 UTP, 2 mM DTT, 90 mM potassium glutamate, 80 mM ammonium acetate, 8 mM magnesium acetate, 2.7 mM sodium oxalate, 34 µg/mL folinic acid, 각 3.17 mM의 20 종 아미노산, 0.01 µM L-[U-¹⁴C] leucine (11.3 GBq/mmol), 2% (w/v) polyethylene glycol 8000, 6.7 µg/mL pK7CAT 플라스미드, 26.7% (v/v) S12 세포 파쇄액. 반응액은 30 °C 항온 수조에서 주어진 시간 동안 유지하였다.

산소의 추가 공급 유무에 따라 단백질 발현량의 변화를 확인하기 위하여 산소가 추가로 공급되지 않은 조건은 micro-centrifugal tube에 15 µL의 무세포 단백질 합성 용액을 넣고 뚜껑을 닫은 채로 반응하였으며, 산소가 추가되는 조건은 산소의 공급을 위하여 96 deep-well plate를 사용하여 450 µL을 반응하였다. 반응 동안에 지속적인 산소 공급을 위하여 밀폐 가능한 플라스틱 백 내에 순수 산소를 주입한 후 무세포 단백질 합성 용액이 담긴 96 deep-well plate를 넣고 밀봉하였으며, 교반기를 사용하여 반응액 내에 산소가 균등하게 공급되도록 하였다.

2-3. 지질이 추가된 무세포 단백질 합성 반응액의 제조

S12 세포 파쇄액 과정에서 대장균 세포를 French Press로 파쇄한 후 원심 분리하였을 때 가장 세포 파쇄액 위에 형성되는 지질층을 파이펫을 이용하여 조심스럽게 분리하였다. 분리된 지질층은 별도의 정제 과정 없이 무세포 단백질 합성 반응액에 다양한 비율로 첨가하여 단백질 합성에 미치는 효과를 조사하였다. 반전 막 소포의 효과적인 생성을 위해 무세포 단백질 합성 반응액에 지질을 추가한 후 강하게 교반하였다.

2-4. 발현 단백질의 분석

발현된 단백질의 확인을 위하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 통하여 12% acrylamide gel에서 단백질을 분리하였으며, gel에서 분리된 단백질은 Coomassie Brilliant Blue G-250 dye로 상온에서 10분간 염색한 후, 탈색 용액 (methanol 10% (v/v), acetic acid 10% (v/v))을 이용하여 6시간의 탈색과정 후 확인하였다. 발현된 단백질의 정량은 합성 과정에 도입된 ¹⁴C-leucine로부터 방출되는 방사선의 양의 측정을 통해 이전에 보고된 방법에 따라 이루어졌다[16].

3. 결과 및 고찰

3-1. 무세포 단백질 합성에 미치는 산소의 영향

무세포 단백질 합성 반응에 요구되는 ATP의 지속적인 재생을 위

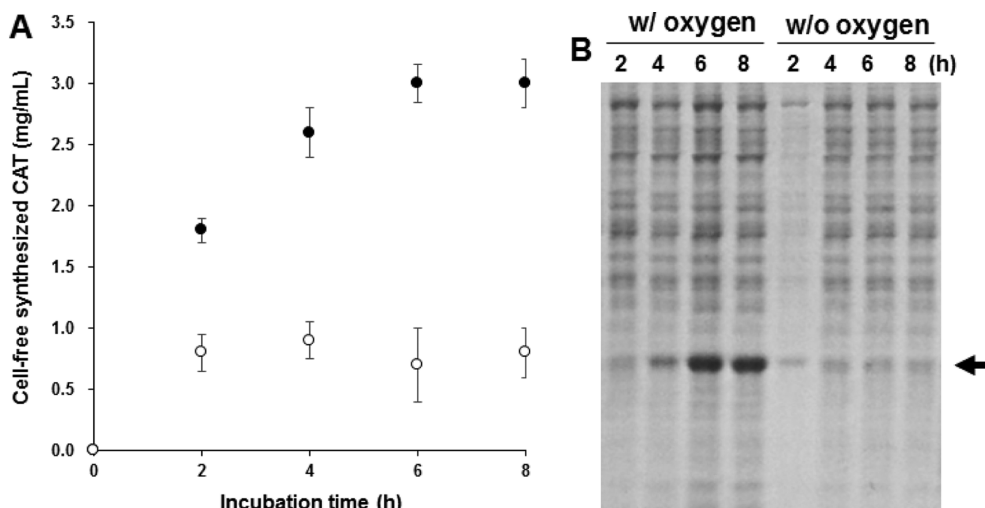


Fig. 1. Effects of oxygen supply on the productivity of cell-free protein synthesis using glucose as an energy source. (A) Amounts of synthesized CAT were determined at the indicated time points during the incubation of a reaction mixture for cell-free protein synthesis programmed with the plasmid pK7CAT. The time-courses of CAT synthesis with (filled circles) or without (open circles) oxygen supply were compared. Error bars represent standard deviations of three independent experiments. (B) The reaction samples withdrawn for the quantification of protein were also analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. Arrow indicates the expected molecular weight of CAT (25.7 kDa).

해 일반적으로 사용되는 에너지원인 CP등에 비해 포도당은 매우 낮은 비용의 에너지원으로 이용될 수 있으며 기존의 에너지원들이 한 분자의 ATP만을 재생할 수 있는 것에 비하여 세포 파쇄액 내에 존재하는 포도당 대사관련 효소들의 작용에 의해 다단계로 산화되며 다량의 ATP분자를 재생할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 산화적인산화 반응을 통한 포도당의 완전한 산화에서 전자수용체는 산소가 되므로 산소 공급의 유무에 따른 무세포 단백질 합성 반응액에서의 단백질 생산량 변화를 조사하였다. Fig. 1에서 보는 것과 같이 포도당을 에너지원으로 이용한 무세포 단백질 합성 반응에서의 단백질 생산량은 산소의 공급 여부에 따라 크게 변화하는 것을 알 수 있었다. 산소의 공급이 없는 경우 단백질 합성은 2시간 이후 더 이상 일어나지 않는 반면 산소가 공급된 반응에서는 무세포 합성된

단백질의 양이 6시간 이상 지속되어 최종적으로 반응액 내에 축적된 단백질의 양은 3배 이상 증가하였으며 약 3 mg/mL이상의 생산성을 나타내었다. 이러한 결과는 포도당을 이용한 ATP재생과정에서 산화적 인산화 단계가 중요한 역할을 하는 것을 의미한다.

3-2. 계면활성제에 의한 지질 첨가 효과의 상세

위의 결과로부터 무세포 단백질 합성 과정에서 포도당이 에너지원으로 사용되는 과정은 기질 수준의 인산화 반응보다는 산소를 소모하는 전자 전달계의 구동이 중요한 역할을 하는 것으로 예상되었다. 이 같은 가정을 간접적으로 증명하기 위하여, 지질이중막 구조를 와해시킬 수 있는 계면활성제(Brij-58)를 첨가하여 그 효과를 관찰하였다. Fig. 2에서와 같이 Brij-58의 농도를 달리하여 반응액에

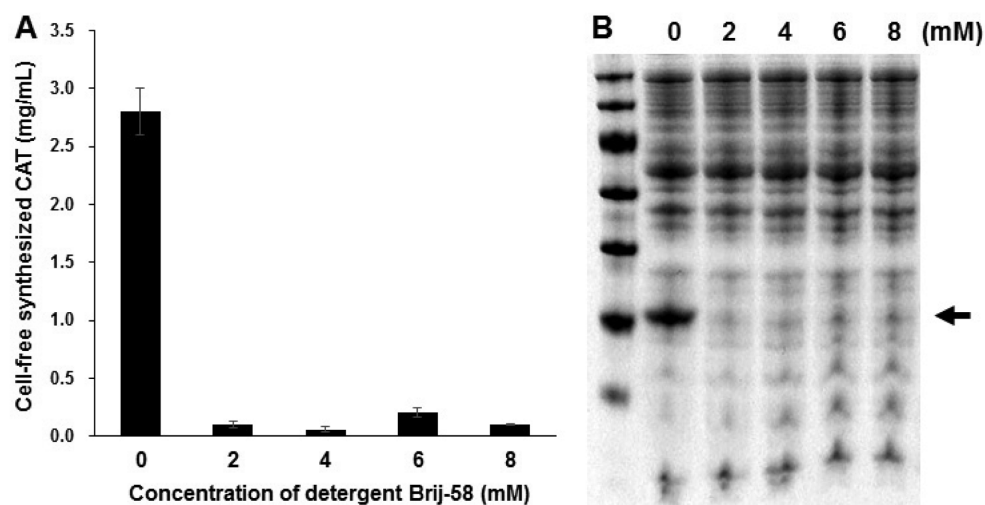


Fig. 2. Suppression of cell-free protein synthesis by the addition of a detergent. (A) Varying amounts of Brij-58 were added to the reaction mixtures for cell-free synthesis of CAT using glucose as an energy source. Final amounts of cell-free synthesized CAT were determined after 6 h incubation of the reaction mixtures. Error bars represent standard deviations of three independent experiments. (B) The reaction samples withdrawn for the quantification of cell-free synthesized CAT were also analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. Arrow indicates the expected molecular weight of CAT (25.7 kDa). CMC of Brij-58; 0.08 mM.

첨가하였을 때, 조사된 최소의 농도에서도 Brij-58의 첨가는 포도당을 에너지원으로 사용하는 무세포 단백질 합성을 크게 저해함이 관찰되었다. 조사된 모든 농도의 Brij-58가 가해진 반응액에서의 단백질 생산량은 SDS-PAGE gel에서 거의 보이지 않을 정도로 낮은 수준을 나타내었다.

3-3. 세포 지질의 첨가를 통한 무세포 단백질 생산 효율의 향상

세포 파쇄액은 살아있는 세포를 포함하고 있지 않으므로, 파쇄액에 가해진 포도당이 산화적 인산화 반응을 통해 ATP를 재생하는 것은 French Press 등 고압 파쇄장치를 통한 세포막의 파쇄과정에서 형성된 반전 막 소포에 의해 이루어지는 것으로 추정되었다. 따라서, 무

세포 단백질 합성 반응액 내에 이러한 반전 막 소포의 양을 증가시킬 경우 ATP 재생 효율의 향상을 통해 단백질 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 예상하였다. 세포 파쇄액 제조과정에서 세포 용해물을 고속원심분리하면 가장 아래층에 침전물이 쌓이고 중간층에 세포 내 용해물이, 가장 위 층에 얇은 지질 층이 형성된다. 일반적인 세포 파쇄액 제조과정에서는 침전물과 지질층을 제외한 중간층 용해물을 사용하는데, 지질층만을 별도로 회수하여 기존의 세포 파쇄액을 이용한 무세포 단백질 합성 반응액에 추가하여 강한 교반을 통해 반전 막 소포의 생성을 유도한 후 단백질 합성에 미치는 효과를 조사하였다. 무세포 단백질 파쇄액에 지질층 추가 한 후 강한 교반을 가할 경우 교반하지 않았을 때 보다 단백질 합성 수율을 약

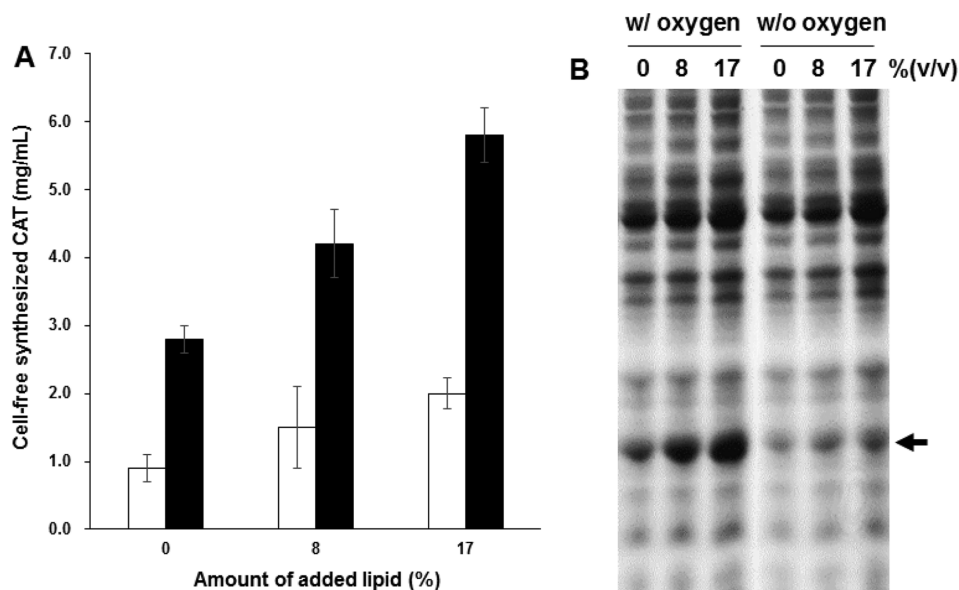


Fig. 3. Effects of additional lipids on the productivity of cell-free protein synthesis using glucose for ATP regeneration. (A) Varying amounts of lipid recovered from *E. coli* lysate were added to the reaction mixtures for cell-free synthesis of CAT using glucose as an energy source. Total (filled bars) and soluble (blank bars) amounts of cell-free synthesized CAT were determined after 6 h incubation of the reaction mixtures. (B) The reaction samples withdrawn to determine the total amounts of cell-free synthesized CAT were also analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. Arrow indicates the expected molecular weight of CAT (25.7 kDa).

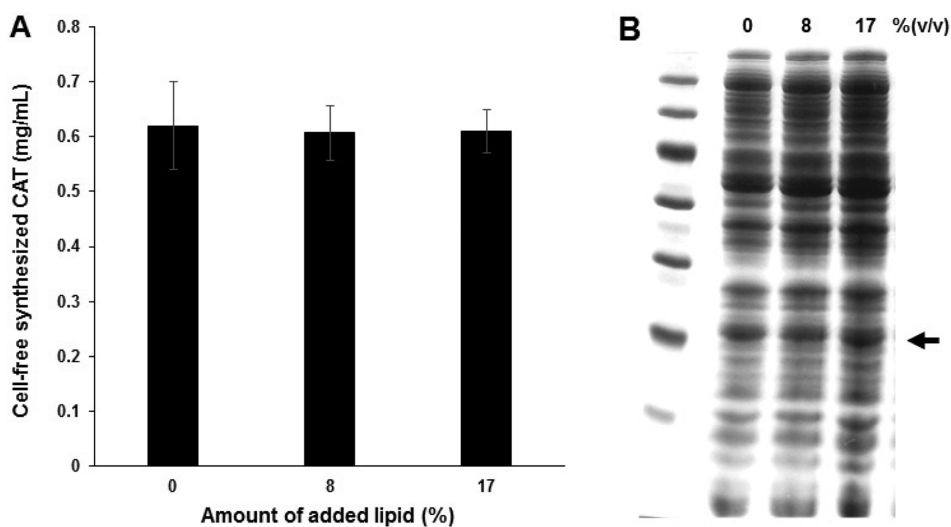


Fig. 4. Effects of additional lipids on the productivity of cell-free protein synthesis using CP for ATP regeneration. (A) Varying amounts of lipid recovered from *E. coli* lysate were added to the reaction mixtures for cell-free synthesis of CAT using CP as an energy source. Total amounts of cell-free synthesized CAT were determined after 6 h incubation of the reaction mixtures. (B) The reaction samples withdrawn to determine the total amounts of cell-free synthesized CAT were also analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. Arrow indicates the expected molecular weight of CAT (25.7 kDa).

30% 높이는 효과가 있었다(Data not shown). Fig. 3에서 확인 할 수 있듯이, 인지질 층의 첨가는 무세포 합성 시스템에서의 단백질 생산을 현저히 증가시킴을 알 수 있었다. 산소를 공급한 반응과 공급하지 않은 반응 모두에서 지질의 첨가는 단백질 생산량을 증가시켰으나, 산소가 공급된 경우의 증가량이 현저히 높게 나타났으며 17% (v/v)의 지질이 추가되고 산소가 공급된 반응의 경우 무세포 생산된 단백질의 양은 5.8 mg/mL에 달하는 결과를 얻을 수 있었다. 한편, Fig. 4의 결과와 같이, 포도당 대신 CP를 에너지원으로 사용한 무세포 단백질 합성 반응에서는 지질의 첨가에 의한 효과가 거의 나타나지 않음을 확인하였다. 이 같은 결과 또한 포도당을 에너지원으로 이용 시 관찰되는 지질첨가의 효과는 세포 파쇄액 내에 존재하는 포도당 대사 관련 효소들에 결과임을 나타낸다.

4. 결 론

무세포 단백질 합성 시스템의 생산성과 경제성을 향상시키기 위한 방안으로, 포도당을 에너지원으로 사용하는 반응액에 대장균 파쇄액으로부터 추출된 지질을 첨가하는 시도를 행하였으며 그 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 첫째, 포도당을 에너지원으로 사용하는 무세포 단백질 합성 시스템에서의 단백질 생산성은 산소의 공급여부에 의해 크게 영향을 받는다. 둘째, 산소공급에 의한 단백질 생산성 증가는 세포 파쇄액에 존재하는 반전 막 소포에 의한 ATP재생에 의한 것으로 보이며, 이 같은 가설에 근거하여 무세포 단백질 합성 반응액에 추가적으로 지질을 추가하였을 경우 산소공급 조건 하에서 단백질 생산성을 더욱 향상시킬 수 있었다. 이와 같이 개선된 무세포 단백질 합성 시스템에서 생산된 단백질 양은 최고 5.8 mg/mL으로 기존의 포도당 만을 사용한 무세포 단백질 합성 시스템에서 보다 6.4배 증가하였다.

감 사

이 논문은 2016년도 충남대학교 자체연구과제 지원사업에 의해 연구되었습니다.

References

1. Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H., "The Dependence of Cell-free Protein Synthesis in *E. coli* Upon Naturally Occurring or Synthetic Polynucleotides," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **47**, 1588-1602(1961).
2. Kim, H. C. and Kim, D. M., "Methods for Energizing Cell-free Protein Synthesis," *J. Biosci. Bioeng.*, **108**(1), 1-4(2009).
3. Kawarasaki, Y., Kawai, T., Nakano, H. and Yamane, T., "A Long-lived Batch Reaction System of Cell-free Protein Synthesis," *Anal. Biochem.*, **226**(2), 320-324(1995).
4. Kawarasaki, Y., Nakano, H. and Yamane, T., "Prolonged Cell-free Protein Synthesis in a Batch System Using Wheat Germ Extract," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**(10), 1911-1913(1994).
5. Kim, D. M. and Choi, C. Y., "A Semicontinuous Prokaryotic Coupled Transcription/translation System Using a Dialysis Membrane," *Biotechnol. Prog.*, **12**(5), 645-649(1996).
6. Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y. and Alakhov, Y. B., "A Continuous Cell-free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yield," *Science*, **242**(4882), 1162-1164(1988).
7. Swartz, J. R., "Advances in Escherichia Coli Production of Therapeutic Proteins," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**(2), 195-201(2001).
8. Kim, D. M. and Swartz, J. R., "Prolonging Cell-free Protein Synthesis with a Novel ATP Regeneration System," *Biotechnol. Bioeng.*, **66**(3), 180-188(1999).
9. Kim, D.-M. and Swartz, J. R., "Prolonging Cell-free Protein Synthesis by Selective Reagent Additions," *Biotechnol. Prog.*, **16**(3), 385-390(2000).
10. Itoh, H., Kawazoe, Y. and Shiba, T., "Enhancement of Protein Synthesis by an Inorganic Polyphosphate in an *E. coli* Cell-free System," *J. Microbiol. Methods.*, **64**(2), 241-249(2006).
11. Ryabova, L. A., Vinokurov, L. M., Shekhovtsova, E. A., Alakhov, Y. B. and Spirin, A. S., "Acetyl Phosphate as an Energy Source for Bacterial Cell-free Translation Systems," *Anal. Biochem.*, **226**(1), 184-186(1995).
12. Kim, D. M. and Swartz, J. R., "Regeneration of Adenosine Triphosphate from Glycolytic Intermediates for Cell-free Protein Synthesis," *Biotechnol. Bioeng.*, **74**(4), 309-316(2001).
13. Kim, T.W., Keum, J. W., Oh, I. S., Choi, C. Y., Kim, H. C. and Kim, D. M., "An Economical and Highly Productive Cell-free Protein Synthesis System Utilizing Fructose-1,6-bisphosphate as an Energy Source," *J. Biotechnol.*, **130**(4), 389-393(2007).
14. Calhoun, K. A. and Swartz, J. R., "Energizing Cell-free Protein Synthesis with Glucose Metabolism," *Biotechnol. Bioeng.*, **90**(5), 606-613(2005).
15. Kim, T. W., Keum, J. W., Oh, I. S., Choi, C. Y., Park, C. G. and Kim, D. M., "Simple Procedures for the Construction of a Robust and Cost-effective Cell-free Protein Synthesis System," *J. Biotechnol.*, **126**(4), 554-561(2006).
16. Kim, D. M., Kigawa, T., Choi, C. Y. and Yokoyama, S., "A Highly Efficient Cell-free Protein Synthesis System from *Escherichia coli*," *Eur. J. Biochem.*, **239**(3), 881-886(1996).