

*Escherichia coli*내의 ATP-dependent Clp 효소의 ATPase 활성 연구

김승호* · Michael R. Maurizi¹

한국과학기술연구원 유전공학연구소 단백질화학연구실, ¹미국 국립보건원 암연구소

Properties of ATPase Activity of ATP-dependent Clp Protease in *Escherichia coli*

Kim, Seung-Ho* and Michael R. Maurizi¹

Protein Chemistry Lab., Genetic Engineering Research Institute,
KIST, P. O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606, Korea
¹National Cancer Institute, National Institutes of Health, U.S.A.

Abstract — Clp is a relatively abundant ATP-dependent protease found in *E. coli*. Its specific activity was proportional to the concentration of the limiting amount of Clp A and an excess amount of Clp P, and *vice versa*. Clp A has an intrinsic ATPase activity that is stimulated by casein, and contains a second site for binding ATP, in addition to the ATPase site. The modification of sulfhydryl groups in Clp A with reagents which have bulky groups such as N-phenylmaleimide led to nullifying both ATPase and protease activity. The same sites were modified by sulfhydryl reagents. It seems that the sulfhydryl groups of Clp A are not directly involved in catalysis. Since non-hydrolyzable analogs of ATP do not activate Clp, ATP hydrolysis may be essential for the proteolytic activity of Clp protease. Clp A and Clp P did not associate in the absence of nucleotide. The results suggest that the activity of the proteolytic component, Clp P, is regulated by the ATP-dependent cycling of Clp A between the activator form and the non-activator form.

세포에 존재하는 단백질들은 대개 안정하게 존재하지만 비정상적인 단백질의 경우는 반감기가 20~40 분으로 쉽게 분해되어진다. 모든 단백질이 이와같이 쉽게 분해되는 것은 아니지만 세포내에서 비정상적이든가 변이되어진 단백질을 분해하는데 관여하고 있는 효소 체제로서 *E. coli*의 경우 glucose가 부족한 상황에서 cyanide를 첨가하였을 때에는 에너지 대사의 억제제로서 단백질이 분해되는 속도가 감소되는 것과 같은 서로 다른 생리학적 조건하에서 일어난다(2). 단백질의 분해로서 에너지 의존에 대한 대부분의 연구는 세포가 성장하는 동안 비정상 단백질의 turnover를 측정하거나(12) 에너지 결핍에 의한 정상 단백질의 분해(9)에 대한 것으로 이와같이 측정된 결과에서 약 90%가 에너지에 의존하는 단백질 분해이

다. 단백질이 분해되는데 대사 에너지가 필요하며, *in vivo*와 *in vitro*에서 단백질 분해 활성을 나타내기 위하여서는 에너지원으로서 ATP가 요구되어지고 이러한 ATP는 단백질의 binding site에 존재하여 ATP의 분해 혹은 결합에 의해서 이루어질 것으로 Oiden과 Goldberg 등 여러 연구자들에 의해서 보고되어졌다(3, 4, 6, 12).

*E. coli*에는 이와같은 에너지 의존성 단백질 분해 효소로서 Lon효소(3, 4)와 Clp효소(6)가 알려져 있다. La효소로도 불리어지는 Lon효소는 *lon* 유전자로부터 발현되고 783개의 아미노산으로 분자량이 87,000 daltons이며, Lon효소의 자연형태는 4배체로 형성된다고 알려져 있다(11, 13). Lon효소는 serine 계열 trypsin family로서 활성 위치에 serine이 존재하며 serine이 없으면 *in vivo*에서 활성이 사라진다고 알려졌다(1). Lon효소가 존재하지 않는 세포에서 에너지 의존성 단백질 분해 활성이 유지되는 현상에서 분리 정제된

Key words: ATP-dependent protease, *E. coli*

*Corresponding author

Clp효소는 Ti로도 불리어지는데 casein이나 다른 단백질 분해하는데 ATP가 요구된다. Clp효소는 Clp A효소와 Clp P효소로 이루어져 있으며 각각 다른 유전자에 의해서 발현되는 Clp A효소와 Clp P효소는 기능적으로도 다른 활성을 나타내고 있다(6). Clp P는 분자량이 21,500 daltons인 subunit로 되어 있으며 Clp효소의 단백질 분해에 관여하고 있다고 알려지고 있으며(5, 10, 14), Clp P는 Triton X-100에 의해서 안정도를 높였다는 보고가 있으며(8), diisopropylfluorophosphate에 의해 활성이 억제되고 Ser111과 His 135가 활성 부위에 관여되는 것을 확인하였다(10). 금속이온과 nucleotides가 존재하지 않는 조건에서 분리된 Clp A의 분자량은 110,000에서 140,000 정도로 추정하며, Mg^{2+} 과 ATP가 존재할 경우 Clp A는 변환되어 분자량이 약 500,000으로 된다고 알려졌으며(5, 6), Clp A는 ATP가 결합하여 육배체로서 활성을 나타낼 것으로 추정하고 있다(8). 따라서 Clp효소가 단백질 분해 능력을 나타내기 위해서는 Clp P는 Clp A와 결합되어야 하고, Clp A는 ATP에 따라 활성을 나타낼 수 있는 구조를 유지하므로써 활성이 조절되는 것을 알아보기 위하여 본 연구에서는 Clp효소가 활성을 나타내기 위한 ATP의 의존성과 Clp A의 ATPase 활성을 저해함으로써 나타나는 단백질 분해 활성에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

재료

Tris-HCl은 Bethesda Research Laboratories에서 공급받았으며, Mono Q, Mono S, DEAE Sephacel은 Pharmacia 회사 제품을 사용하였고, TSK DEAE-5PW 컬럼은 Bio Rad 회사 제품을 사용하였다. 그 밖의 다른 시약들은 특급품을 구입하여 사용하였다.

Clp A의 분리 정제

활성을 갖는 Clp A는 Katayama 방법(6)에 따라 정제하였다. Clp A가 발현되는 *E. coli* SG1110을 Luria broth에서 배양시킨 다음 사용할 때까지 -70°C 에서 보관하였다. 냉동된 세포 배양액(100 g)을 350 ml의 완충 B 용액(50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, pH 7.5(24°C), with 10%(v/v) glycerol)에 현탁시킨 다음 French press로 2번 세포를 파괴시켜 얻어진 용액을 $30,000\times g$ 에서 1시간 동안 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상등액에 0.13

%가 되도록 polyethylene imine을 넣어준 후 얼음에서 20분간 방치하였다. 방치 후 $30,000\times g$ 으로 원심분리하여 침전된 nucleic acid와 불필요한 단백질을 제거한 상등액을 미리 평형화시켜둔 phosphocellulose column(Whatman P11, 5×10 cm)에 통과시켰다. 시료를 통과시킨 후 B 용액으로 충분히 컬럼을 씻어준 다음 0.2 M에서 0.4 M까지 KCl로 linear gradient를 행하여 Clp A를 용출시켰다. Clp A를 포함하고 있는 용출액을 40%부터 60%의 ammonium sulfate로 Clp A를 침전시킨 다음 B 용액으로 투석하고 다시 phosphocellulose column(1.5×14 cm)에 의해서 분리하여 확인한 후 TSK-250 겔여과 및 TSK DEAE-5PW column을 이용한 고속액체 크로마토그래피를 행하였다. 정제된 Clp A는 SDS 전기영동으로 확인하였으며, 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

Clp P의 분리 정제

Clp P의 분리 정제는 Clp A의 정제와 유사한 방법으로 Maurizi 방법(10)에 따라 분리하고, SDS 전기영동에 의한 확인과 단백질 분해 활성 능력을 확인한 후 사용하였으며, Clp P의 안정도를 높이기 위하여 Triton X-100를 0.1%되도록 첨가한 후 -70°C 에 보관하였다(8).

단백질 분해 활성 측정

Clp 효소활성 측정은 Katayama 방법(6)에 따라 casein 분해능력으로 측정하였다. 활성을 측정할 때 사용한 용액은 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM $MgCl_2$ 의 용액에 24 μg (약 60,000 cpm에 해당)의 [methyl- ^3H]methyl casein과 4 mM ATP를 넣은 용액이며, 이 용액에 Clp P(0.17 μg 이상)를 넣어준 즉시 Clp A(0.37 μg 이상)를 넣어주고 완충 용액으로 최종 부피가 0.5 ml이 되게 한 다음 37°C 에서 30분간 방치시켰다. 반응이 완료된 후 반응액에 50% trichloroacetic acid (TCA)를 60 μl 첨가하여 반응을 종료시키고 carrier로서 1%(w/v) bovine serum albumin을 40 μl 넣어준 다음 원심분리하여 얻어진 상등액 중 0.5 ml를 취하여 Aquasol 10 ml에 넣어 scintillation counter(Beckman model LS 3801)로 측정하였다.

ATPase 활성 측정

Katayama 방법(7)에 따라 ATPase 활성을 측정하였다. Casein 분해 측정시 사용한 용액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM $MgCl_2$)에 0.2 mM [γ - ^{32}P]ATP(1

$\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$)를 넣고 Clp P 및 Clp A를 첨가한 후 37°C에서 10분, 혹은 30분간 방치하였다. 미리 냉각시켜둔 용액(2 M 황산으로 제조한 5% ammonium molybdate 용액 0.16 ml와 1 mM 황산으로 제조한 5 mM silicotungstic acid 용액 0.8 ml의 혼합액)에 효소 반응액의 45 μl 를 넣은 후 얻어지는 phosphomolybdate는 isobutanol과 toluene이 1:1의 비율로 만들어진 용액으로 추출한 후 scintillation counter로 측정하였다.

ADP 및 AMPPNP의 Clp효소 활성에 대한 K_i 값 측정

효소기질의 원액과 희석액들을 사용하여 각각 Clp A와 Clp P효소의 활성도를 측정한 후 이들 성적으로부터 $1/v$ 치를 그리고 기질 농도로부터 $1/[S]$ 치를 계산하여 이중역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 K_m 치와 V_{max} 를 산출하고, 반응액에서의 Clp효소의 농도를 고정하고 ADP 또는 AMPPNP의 농도를 변동시키면서 Clp효소의 단백질 분해 활성과 ATPase 활성을 측정하고 Dixon plot법으로 각각의 K_i 값을 측정하였다.

결과 및 고찰

Clp 효소의 활성도

Clp P 및 Clp A효소의 활성도는 각 효소의 limiting amount에 대한 casein 분해 능력을 측정하여 얻었다(Fig. 1). Clp효소의 단백질 분해 활성은 Clp A 및 Clp P의 중합체 형성에 의해서 이루어진다는 사실은 이미 알려져 있으므로(7), Clp A 및 Clp P의 각각에 대한 free subunit의 농도에 따른 단백질 활성의 의존도를 분석한 결과 Clp A의 limiting amount가 0.37 μg 이었으며 Clp P는 0.17 μg 에 해당되었다. 각 효소의 limiting amount에 해당되는 양에 과량의 다른 효소를 넣어준 후, 시간이 지남에 따라 반응액에서 일정량을 취하여 casein에 대한 단백질 분해 활성을 분석하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 10분 동안의 분석 시간 내에서는 limiting amount의 농도에서 시간이 지남에 따라 일정하게 활성이 증가하고 있음을 보여주었다. $v=k[E]$ 에 따라 Clp 효소 활성은 Clp효소의 농도에 의존하고 있음을 나타내주고 있으며, Clp P의 limiting amount에서 분해된 casein의 양은 Clp A의 경우보다 3배가량 적게 나타나는 것으로부터 casein에 대한 단백질 분해 활성은 Clp P에 의존하고 있다는 것을

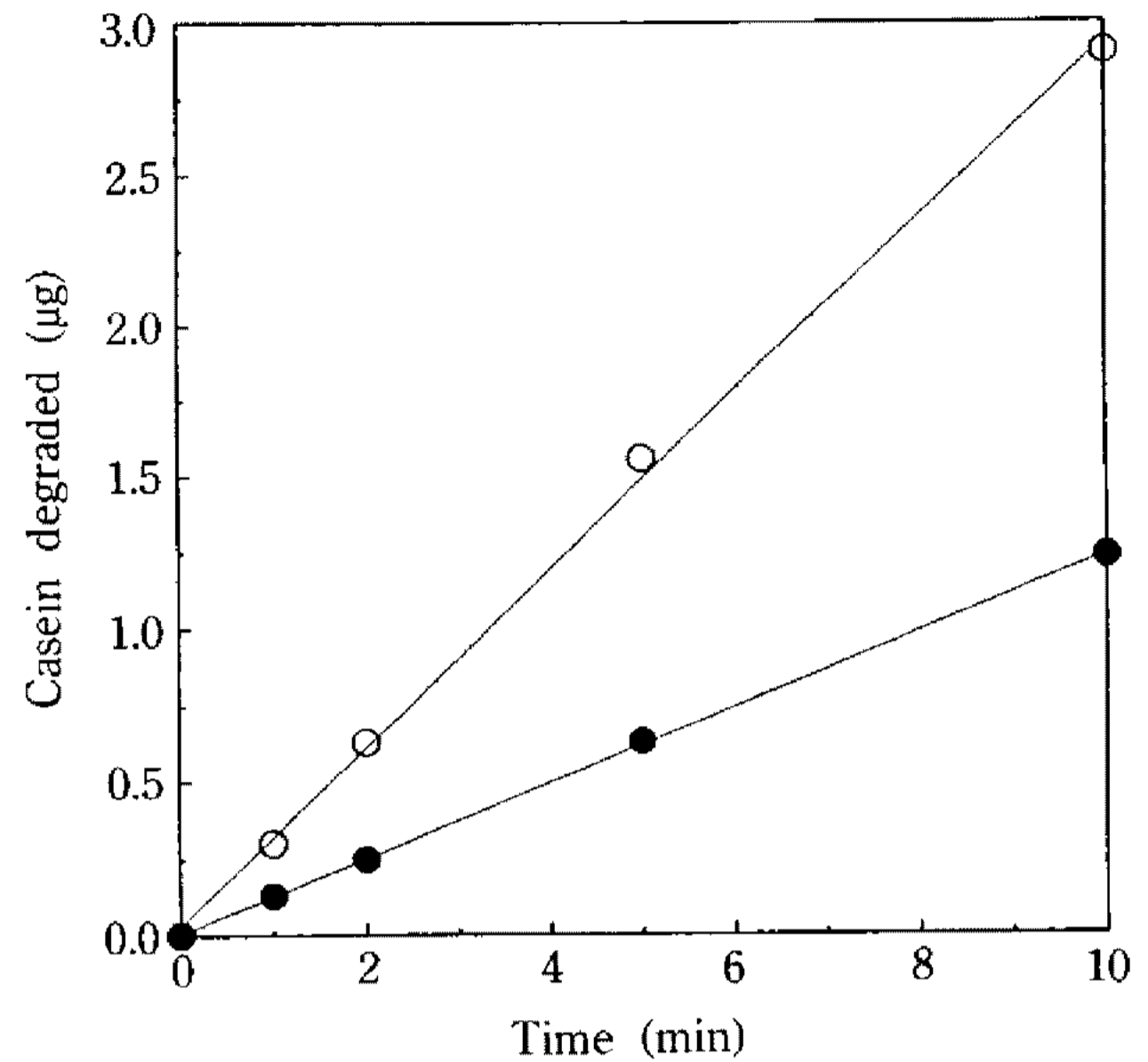


Fig. 1. Specific activities of Clp A and Clp P.

The limiting amount of Clp A (0.37 μg) or Clp P (0.17 μg), standard assay solution (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 25 mM MgCl_2 , 4 mM ATP) containing 24 μg of casein and an excess of the other Clp protein (Clp A or Clp P) were incubated at 37°C for different time and assayed for casein degradation. ○, limiting amount of Clp A; ●, limiting amount of Clp P.

알 수 있다.

Clp 효소의 반응성

Clp A의 ATPase 활성을 나타내는데 관여하는 ATP의 결합과 분해 능력을 분석하기 위하여 casein, ATP, ADP와 AMPPNP를 이용하여 Clp효소의 단백질 분해 활성과 ATPase 활성에 대한 $S_{0.5}$ 와 K_i 값을 구하였다(Table 1). Casein에 대한 $S_{0.5}$ 는 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, ATPase 활성에 대해서는 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 계산되었다. ATP에 대한 $S_{0.5}$ 는 Clp효소의 단백질 분해활성과 ATPase 활성면에서 비슷하게 나타났다. 이러한 결과는 Clp A와 Clp P의 상호 결합은 ATPase 활성에는 크게 관여하고 있지 않다는 것을 나타내고 있다. 저농도의 ATP에서 Clp효소에 대한 ATP의 sigmoidal character한 n 값이 1.3으로 계산되었으며, fluorescence와 light scattering에 의한 ATP와 Clp A와의 결합 정도를 측정한 결과로부터(결과 제출치 없음), Clp A에 2분자의 ATP가 결합되어지며 Clp A에 1분자의 ATP가 결합함과 동시에 2번째의 ATP 결합 위치에서의 ATP 결합 능력이 높다는 것을 시사하고 있다. 이러한 결과에서도 casein과 Clp P는 ATP의 결합에 있어서 영향을 미치지 않고 있다는 사실을 뒷받침하고

Table 1. Kinetic properties of Clp protease

Properties	Proteolysis	ATPase
Casein ($S_{0.5}$)	40 $\mu\text{g/ml}$	35 $\mu\text{g/ml}$
ATP ($S_{0.5}$)	0.18 \pm 0.05 mM	0.15 \pm 0.05 mM
ADP (K_i)	0.20 \pm 0.10 mM	—
AMPPNP (K_i)	0.8 \pm 0.20 mM	1.0 \pm 0.30 mM

있다. ADP와의 반응에서 나타난 K_i 값의 결과는 단백질 분해 능력에는 ATP가 영향을 미치지않으나 ATPase 활성화에는 ATP가 관여되고 있음을 시사하고 있다. AMPPNP와의 반응에서 나타난 결과로부터 Clp A의 동일 위치에서 AMPPNP가 결합되는 반응속도는 ATP와 경쟁적 임을 나타내주고 있으며, AMPPNP는 Clp A 자체의 상호결합이나 Clp A와 Clp P의 결합을 약하게 촉진시키지만 단백질 분해능력은 촉진하지 않는 것으로 생각된다. 결과적으로 ATP는 Clp 효소 활성을 위하여 Clp P와 Clp A가 결합되어지기 위하여 요구되고 있음을 시사하고 있다.

Sulfhydryl group의 Clp효소 활성 영향

Clp효소의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Clp A에 존재하는 sulfhydryl group에 대한 변성을 시도 하였다. Iodoacetic acid(IAM), N-methylmaleimide(NMM)와 N-phenylmaleimide(NPM) 등을 각각 10 mM되도록 Clp A효소 반응액에 첨가하고 반응 시간이 지남에 따라 반응액으로부터 sulfhydryl group이 변성된 Clp A를 일정량씩 취하여 ATPase의 활성화와 casein에 대한 단백질 분해 활성을 측정하였으며, 시약을 첨가하지 않은 Clp A효소의 활성화와 비교하였다(Fig. 2). IAM으로 변성된 Clp A효소는 Clp 효소에 존재하는 ATPase 활성화와 단백질 분해 활성에 영향을 미치지 않았다. NMM에 의한 변성의 경우 ATPase 활성화에는 영향을 미치지 않았으나 단백질 분해 활성에는 반응시킨 후 급격히 소멸되는 현상을 보여주었다. 이러한 현상은 N-ethylmaleimide의 경우에서도 비슷한 경향을 나타내었다. NPM과 neohydrin(mercurial)의 경우에는 ATPase 활성화와 단백질 분해 활성을 모두 억제하는 것으로 나타났다(Table 2). Clp A에 존재하는 sulfhydryl group의 변성에 있어서 분자가 큰 물질에 의한 변성은 ATPase 활성화와 casein 분해 활성을 모두 억제되도록 하고 있지만 분자가 작은 물질에 의해서는 ATPase 활성을 큰 분자보다는 쉽게 억제시키지 못하며 저해 물질에 따라

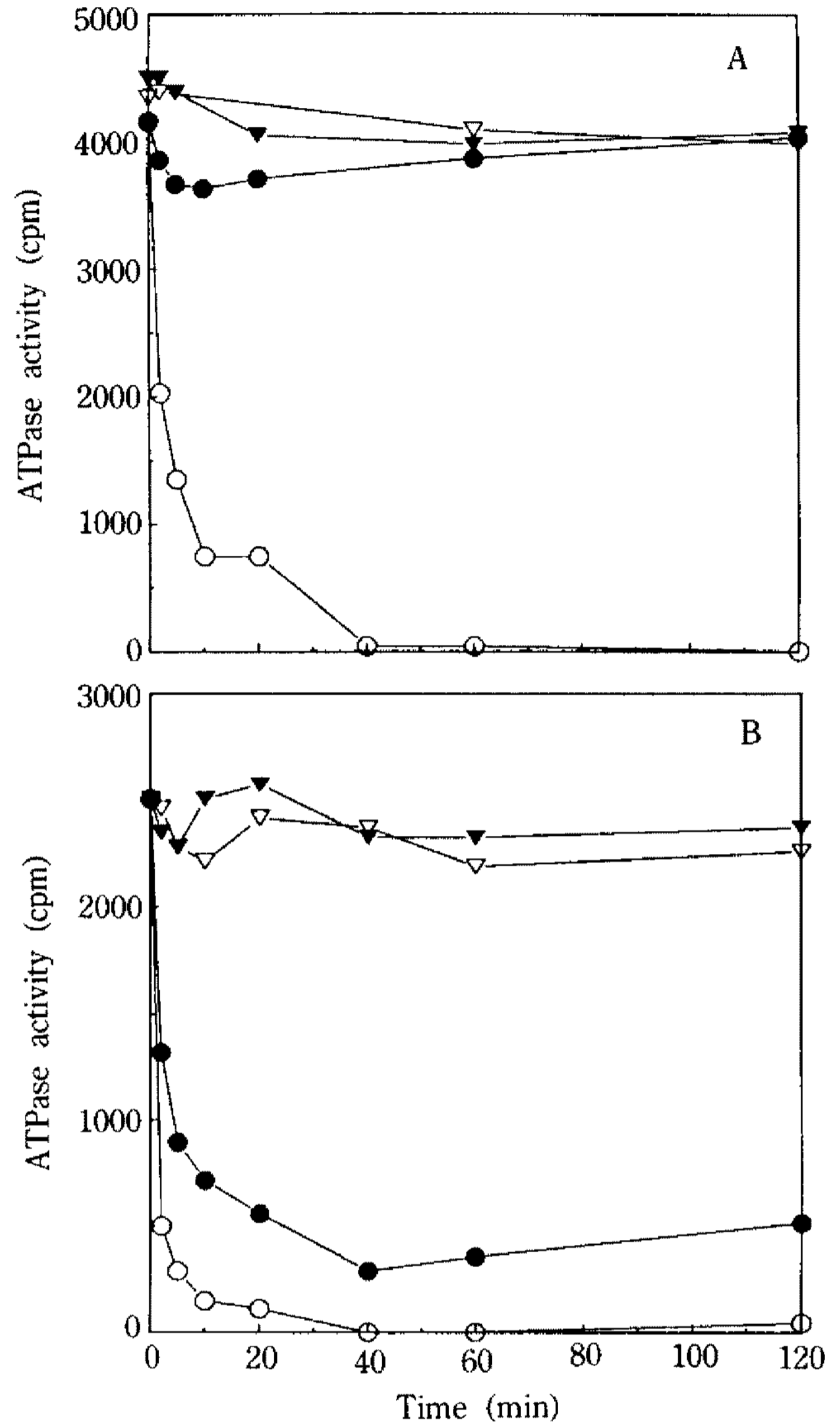


Fig. 2. Inhibition of Clp ATPase and Protease activity by sulfhydryl reagents.

Standard assay solution (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 25 mM MgCl_2 , 4 mM ATP) containing 24 μg of casein, Clp P and modified Clp A which was incubated with each 10 mM sulfhydryl reagent for different time were incubated for 10 min or 30 min at 37°C and assayed for ATPase activity (A) and casein degradation (B). ○, NPM; ●, NMM; ▼, IAM; ▽, no addition of modified Clp A.

서는 ATPase 활성을 약간 활성화시키는 현상을 나타내었다. Clp A효소를 먼저 NMM으로 일정시간 동안 반응시킨 후에 변성되어 나타나는 활성이 일정하게 유지되어 있는 것을 확인한 후 다시 저해 능력이 큰 NPM을 첨가하여 NPM에 의한 변성을 시도하여 보았으나 Clp A효소는 NMM에 의하여 변성된 후 나타나는 저해된 활성으로서만 유지되었으며 NPM에 의한 더 이상의 저해 현상은 보여주지 않았다(결과

Table 2. Effects of ATPase and protease activities on Clp A modified by sulfhydryl reagents

Addition	ATPase Activity (%)	Protease Activity (%)
None	100	100
Iodoacetic acid	104	100
Iodoacetamide	100	100
Neohydrin (mercurial)	10~30	<5
N-Methylmaleimide	100	5~20
N-Ethylmaleimide	100~150	<5
N-Phenylmaleimide	5~40	<5

Table 3. Effects of casein and Clp P on ATPase activity by inhibitor treatment

Inhibitor	ATPase activity (cpm)		
	No addition	+ Casein	+ Casein, + Clp P
None	4783	5921	8849
N-Phenylmaleimide	2969	3029	3084
N-Methylmaleimide	6571	6529	5469

제출치 않음). 따라서 이러한 물질에 의하여 변성되는 Clp A의 위치는 동일할 것으로 추정되고 Clp A의 sulfhydryl group은 직접적으로 catalysis에는 관여하고 있지는 않을 것으로 추정된다. Clp A의 ATPase 활성에 Clp P효소의 영향을 분석하기 위하여 NMM과 NPM으로 변성된 Clp A효소에 casein과 Clp P효소를 첨가한 후 ATPase 활성 능력을 검토하였다(Table 3). ATPase 저해제를 첨가하지 않았을 경우 Clp A의 ATPase 활성과 비교하여 casein과 Clp P를 첨가한 후의 ATPase 활성은 2배정도 증가한 결과는 ATPase 활성에 Clp P가 관여하고 있음을 시사하고 있다. 한편 Clp A에 NMM과 NPM의 저해제를 첨가하게 되면 ATPase 활성이 억제되었으며, Clp A를 변성시킨 다음 Clp P를 첨가하더라도 ATPase 활성이 증가하지 않는 것으로부터 Clp P는 ATPase 활성에는 관여하고 있지 않다는 것을 나타내주고 있다. Clp P만으로는 Clp A의 ATPase 활성에 영향을 미치지 않지만, casein이 함께 존재할 경우에는 Clp A에 의한 ATP hydrolysis가 잘 일어나는 것으로부터 casein이 Clp A의 ATPase 활성을 증가시키고 있음을 시사하고 있다. casein이 존재하지 않을 경우에도 Clp A에 Clp P가 결합할 수 있다면 casein이 존재할 경우에는 Clp P의 단백질 활성에 의하여 ATP hydrolysis를 촉진시켜 주거나

또는 casein이 Clp A에 Clp P가 잘 결합될 수 있도록 하여 줌으로서 ATPase 활성이 촉진되도록 유도하는 것으로 생각할 수 있다. 이러한 결과로부터 Clp P의 단백질 분해 활성은 ATP에 의하여 조절되는 Clp A의 활성과 비활성 형태의 순환에 따라서 조절되고 있다는 것을 시사하고 있다.

요 약

*E. coli*에서 발견된 ATP-dependent 효소인 Clp효소 중에서 Clp A의 ATPase의 활성에 대한 영향을 검토하였다. Clp효소의 limiting amount으로 나타난 specific 활성은 일정하게 증가하는 효소의존성을 보였다. ATPase 활성을 나타내고 있는 Clp A는 casein에 의하여 활성화되어지며 2분자의 ATP가 결합하고 ATPase 활성을 나타내기 위한 ATP의 분해는 Clp효소의 단백질 분해 활성에 필요하다. Clp A효소의 sulfhydryl group의 저해로 인한 활성은 저해제의 분자 크기에 따라 Clp효소의 활성에 영향을 미쳤으며 Clp효소의 활성을 위한 Clp A와 Clp P의 결합은 ATP에 의존하는 Clp A의 활성 구조에 따라서 조절될 것으로 보인다.

감사의 말

본 연구는 미국 국립보건원의 암연구소에서 수행된 것임.

참고문헌

1. Amerik, A.Y., V.K. Antonov, A.E. Gorbalenya, S. A. Kotova, T.V. Rotanova and E.V. Shimbarevich. 1991. Site-directed mutagenesis of La protease. *FEBS Lett.* **287**: 211-214.
2. Canceill, D., E. Dervyn and O. Huisman. 1990. Proteolysis and modulation of the activity of the cell division inhibitor Sul A in *Escherichia coli lon mutants*. *J. Bacteriol.* **172**: 7297-7300.
3. Charette, M., G.W. Henderson and A. Markovitz. 1981. ATP hydrolysis-dependent activity of the *lon(cap R)* protein of *E. coli* K12. *Proc. Natl Acad. Sci.* **78**: 4728-4732.
4. Chung, C.H. and A.L. Goldberg. 1981. The product of the *lon(capR)* gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 4931-4935.
5. Hwang, B.J., K.M. Woo, A.L. Goldberg and C.H.

- Chung. 1988. Protease Ti, a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli* contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits. *J. Biol. Chem.* **263**: 8727-8734.
6. Katayama, Y., S. Gottesman and M.R. Maurizi. 1987. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 4477-4485.
7. Katayama, Y., S. Gottesman, J. Pumphrey, S. Rudikoff, W.P. Clark and M.R. Maurizi. 1988. The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 15226-15236.
8. Kim, S.H. and M.R. Maurizi. 1992. Stability and characterization of the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiology.* **30**: 528-532.
9. Maurizi, M.R., P. Trisler and S.J. Gottesman. 1985. Insertional mutagenesis of the *lon* gene in *Escherichia coli*: *lon* is dispensable. *J. Bact.* **164**: 1124-1135.
10. Maurizi, M.R., W.P. Clark, S.H. Kim and S.J. Gottesman. 1990. Clp P represents a unique family of serine proteases. *J. Biol. Chem.* **265**: 12546-12552.
11. Menon, A.S. and A.L. Goldberg. 1987. Binding of nucleotides to the ATP-dependent protease La from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 14921-14928.
12. Olden, K. and A.L. Goldberg. 1978. Studies on the energy requirement for intracellular protein degradation in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 385-398.
13. Waxman, L. and A.L. Goldberg. 1982. Protease La from *Escherichia coli* hydrolyzes ATP and proteins in a linked fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 4883-4887.
14. Woo, K.M., W.J. Chung, D.B. Ha, A.L. Goldberg and C.H. Chung. 1989. Protease Ti from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J. Biol. Chem.* **264**: 2088-2091.

(Received December 17, 1992)