

## *Serratia marcescens* ATCC 25419가 생산하는 Acetolactate Synthase Isozyme의 특성

김종탁 · 김승수\*

연세대학교 이과대학 생화학과

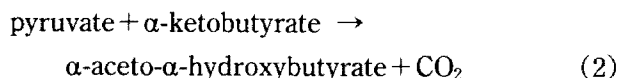
### The Properties of Acetolactate Synthase Isozyme Produced by *Serratia marcescens* ATCC 25419

Kim, Jong-Tak and Soung-Soo Kim

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**Abstract** — One acetolactate synthase isozyme which has Rf value of 0.83 on polyacrylamide gel electrophoresis was purified from *Serratia marcescens* ATCC 25419 by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel chromatography, Phenyl-Sepharose chromatography, Sephacryl S-400 gel filtration followed by native gel elution. The native molecular weight of the enzyme was determined to be 531,400 by gel filtration method, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis separated the native enzyme into two polypeptides having molecular sizes of 55,000 and 38,900 respectively. In kinetic parameters,  $K_m$  value for pyruvate was 2.54 mM, and  $V_{max}$  was 21.75 nmole/min/mg. The enzyme showed maximal activity around pH 8.0 and optimal temperature of the acetolactate formation was 37°C. Feedback inhibition studies indicate that the purified enzyme is rather resistant to branched chain amino acids when compared with acetolactate synthase isozymes of plants or other enterobacteria.

세균, 효모, 식물 등에서 광범위하게 발견되는 acetolactate synthase(ALS, E.C. 4.1.3.18)는 acetohydroxyacid synthase(AHAS)라고도 하며 isoleucine, leucine 그리고 valine과 같은 branched chain 아미노산의 생합성에 관여하는 효소로서 다음과 같은 반응을 촉매한다(1).



여기서  $\alpha$ -acetolactate는 leucine과 valine의 전구체가 되고  $\alpha$ -aceto- $\alpha$ -hydroxybutyrate는 isoleucine의 전구체에 해당되므로 ALS는 valine과 leucine 생합성

경로에 있어서 첫번째 반응을 촉매하고 isoleucine 생합성 경로에 있어서는 threonine deaminase에 이어 두번째 반응을 촉매한다(2).

이 효소가 요즈음 많은 연구가들의 관심을 끌고 있는 것은 구조적으로 서로 다른 herbicides인 sulfonyleurea 계통의 화합물과 imidazolinone 계통의 화합물에 대하여 표적효소로 작용하기 때문이다(3, 4). 이들 herbicide들은 고등식물 뿐만 아니라 세균, 효모 등에서 branched chain 아미노산의 생합성을 막아 성장을 저해하지만 포유동물에는 해를 주지 않는다.

현재 ALS의 연구가 가장 많이 진행된 enteric bacteria에서는 ALS I, II, III라 불리는 세 종류의 ALS isozyme들이 발견되었는데 이들은 모두 분자량이 다른 두 종류의 polypeptide로 구성된 multimer로 thiamine pyrophosphate(TPP), flavin adenine dinucleotide(FAD), 그리고  $\text{Mg}^{2+}$ 을 cofactor로 요구한다(5-7). Wild type *E. coli*는 이들 세 유전자를 모두 가지고

**Key words:** Acetolactate synthase isozyme, *Serratia marcescens*

\*Corresponding author

있는데 각기 *ilv* BN(ALS I), *ilv* GM(ALS II), *ilv* IH(ALS III) operon으로부터 발현된다(8-10). Enteric bacteria 이외에도 효모와 몇몇 식물에서 ALS isozyme들의 유전자 구조에 관하여 상당한 지식이 축적되었지만(7, 11, 12) ALS isozyme의 정제는 주로 *E. coli*(ALS I, ALS III)와 *S. typhimurium*(ALS II) 효소들이 성공적으로 수행되었다(13-15). 정제된 효소의 특성연구에 의하면 species에 따라 또는 한 species내의 isozyme type에 따라 cofactor 요구성, 효소 활성의 feedback 억제 양상, herbicides에 의한 억제 양상, 그리고 기질 친화도 등에 있어서 현격한 차이가 있음이 밝혀졌다. 따라서 ALS isozyme들의 생리적 역할을 좀더 자세히 파악하고, 새로운 herbicide 개발을 위해서는 enteric bacteria는 물론 기타 여러 species에서 ALS isozyme들의 확인, 정제 및 특성규명이 절실히 요구된다.

이와같은 관점에서 본 연구에서는 branched chain 아미노산들의 산업적 생산 측면에서 기초연구가 어느 정도 수행된 바 있는 *Serratia* sp. 중(16) *Serratia marcescens* ATCC 25419로부터 아직 정제 및 그 특성 규명이 되어 있지 않은 ALS isozyme 하나를 정제하고 그 효소학적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 배양

*Serratia marcescens* ATCC 25419는 Louisiana State University의 Braymer 교수로부터 분양받아 사용하였다. 사면배지로부터 single colony를 멸균된 BHI(Brain Heart Infusion) 배지 10 ml이 들어있는 cap tube에 접종한 후 12시간 동안 30°C에서 배양한 후 BHI 배지 2l가 들어있는 5l 플라스크에 옮긴 다음 24시간 동안 30°C에서 진탕배양하였다.

### 시약

Phenyl-Sepharose CL-4B, Sephacryl S-400과 high molecular weight electrophoresis marker는 Pharmacia사 제품을,  $\alpha$ -naphthol은 Hayashi 제품을 구입하여 사용하였으며, 그밖에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입한 일급 내지 특급제품을 사용하였다.

### Acetolactate synthase isozyme의 활성도 측정

ALS isozyme의 활성도는 반응생성물인 acetolactate가 decarboxylation되어 생성되는 acetoin의 양을 McEwen과 Silverman 방법에 따라 측정하였다(17). 즉, Eppendorf tube에 assay buffer(0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM pyruvic acid, 0.1 mM TPP, 0.1 mM FAD)와 효소 용액을 첨가하여 전체 반응액 부피를 1 ml이 되게 하여 37°C에서 1시간 preincubation하였다. 이 반응액에 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 10  $\mu$ l을 넣어 반응을 중지시킨 다음, 200  $\mu$ l의 0.5% creatine과 200  $\mu$ l의 2.5 N NaOH 용액에 녹아있는 5%의  $\alpha$ -naphthol 용액을 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시켜 발색시킨 후, 반응액을 12,000 $\times$ g에서 원심분리한 후 상층액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Acetolactate synthase isozyme의 1 unit는 37°C에서 1분간 1 nmole의 acetoin을 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의했고, specific activity는 unit/mg protein으로 표시했다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 이용하여 Lowry 방법(18)을 사용하였다.

### 활성 염색

Davis의 방법(19)에 따라 anionic disc polyacrylamide gel 전기영동을 수행한 후 이 gel을 standard buffer(20 mM potassium phosphate(pH 7.0), 0.1 mM TPP, 0.5 mM DTT, 1  $\mu$ M FAD, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glycerol)로 씻은 후 반응액 속에서 4시간 동안 preincubation하였다. 그런 후 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml을 첨가한 후 발색용액을 처리하였다.

### 세포추출물의 제조

배양물을 4°C에서 5,000 $\times$ g의 속도로 20분간 원심분리하여 세포를 수확한 후 수확한 세포를 2~3배 부피의 standard buffer에 하룻밤 동안 suspension시켰다. 이 용액을 초음파 파쇄기로 20초간 10회 반복 파쇄하였다. 그런 후 15,000 $\times$ g에서 40분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 실험의 효소원으로 사용하였다.

### 효소의 분리 및 정제

Step 1. 황산암모늄에 의한 분별침전: 수확한 상층액을 50~80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 fractionation한 후 15,000 $\times$ g에서 40분간 원심분리하여 침전물을 취하

였다. 이 침전물을 최소 부피의 standard buffer에 녹인 후 sample volume의 100배 정도의 동일한 완충용액에 4시간씩 네번에 걸쳐 투석하였다.

**Step 2. DEAE-Sephacel column chromatography :** 위의 과정에서 얻은 효소용액을 standard buffer로 미리 평형에 이르게 한 DEAE-Sephacel column (4.5×30 cm)에 loading한 후 같은 완충용액으로 단백질의 280 nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 씻어주고 다시 90 mM potassium phosphate standard buffer (pH 7.0)로 씻어 280 nm에서의 흡광도가 0이 되는지를 확인하였다. 그런 후 90~400 mM potassium phosphate standard buffer(pH 7.0)로 linear gradient elution을 하여 흡착된 단백질을 용출시켜 30 ml/hr의 속도와 15 ml의 분획으로 받았다. 효소활성을 가진 부분을 모아 Amicon membrane YM10으로 농축한 후 0.5 M ammonium sulfate가 함유된 standard buffer에 4시간씩 2회 투석하였다.

**Step 3. Phenyl Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography :** 앞의 과정에서 얻어 농축한 효소용액을 0.5 M ammonium sulfate가 함유된 standard buffer로 미리 평형에 이르게 한 Phenyl-Sepharose CL-4B column(2.5×20 cm)에 loading하여 같은 완충용액으로 단백질의 280 nm에서의 흡광도가 0이 될 때까지 씻어준 후, 0.5~0.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 역 linear gradient elution을 하여 흡착된 단백질을 용출시켰으며, 20 ml/hr의 속도와 8 ml의 분획으로 받았다.

**Step 4. Sephacryl S-400 gel filtration :** 앞의 과정에서 얻은 효소용액을 Amicon membrane YM10을 사용하여 농축한 후 효소용액을 standard buffer로 미리 평형에 이르게 한 gel filtration column(1.4×110 cm)에 loading하여 시간당 10 ml의 속도와 1.6 ml의 분획으로 용출시켰다.

**Step 5. Native gel elution :** Laemmli의 방법(20)을 수정하여 Mighty small II kit에 5% acrylamide running gel과 4% acrylamide stacking gel이 되도록 만든 vertical slab gel(7×8 cm)에 효소용액을 loading하여 stacking시에는 50 V, running시에는 80 V의 직류를 가하여 약 6시간 동안 전개시켰다. 이때 running gel(Tris-HCl buffer pH 8.8)과 stacking gel(Tris-HCl buffer pH 6.8) 그리고 running buffer(Tris-HCl buffer pH 8.3)에는 효소를 안정화시키기

위해 12% glycerol, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM TPP, 0.5 mM DTT 그리고 10 μM FAD를 첨가하였다(27). 전개가 끝난 후 활성염색을 하여 효소활성이 있는 부분을 알아낸 후 gel slice하여 Hoefer사의 gel eluter로 용출시켰다.

### 분자량 측정

Native gel에서 용출한 용액을 Centricon 10으로 농축하여 Andrew(21) 방법에 의한 Sephacryl S-400 gel filtration과 Laemmli(20)의 SDS gel 전기영동 방법을 이용하여 native 분자량과 subunit 분자량을 결정하였다.

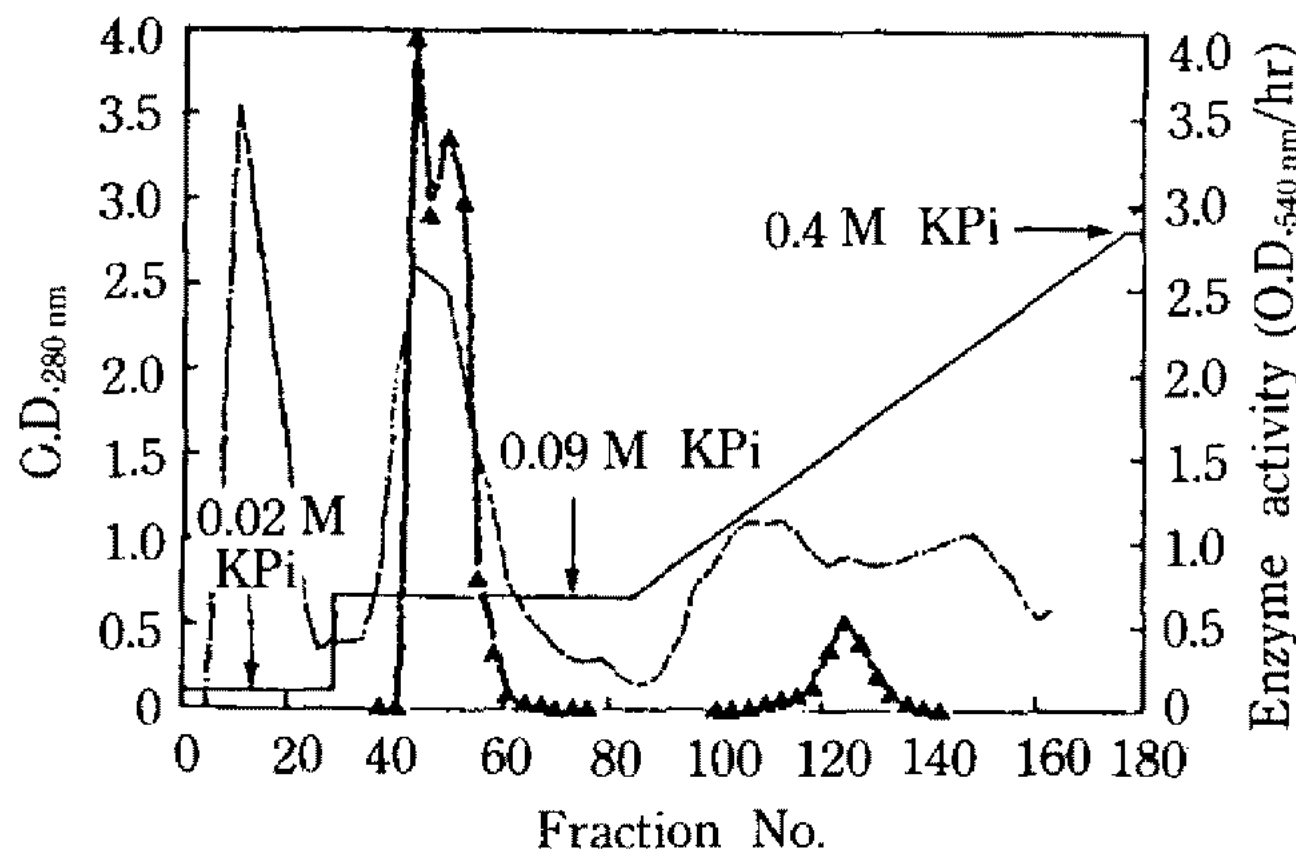
## 결과 및 고찰

### 효소의 분리 및 정제

*Serratia marcescens* ATCC 25419에 존재하는 ALS isozyme은 세포추출물을 anionic disc polyacrylamide gel 전기이동을 수행하여 활성염색을 하였을 때 Rf값(bromophenol blue에 대한 단백질의 이동도)이 0.24와 0.83인 두 종류의 isozyme으로 분리되며, 이 중 Rf 0.83인 isozyme을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분별침전, DEAE-Sephacel column chromatography, Phenyl-Sepharose column chromatography, Sephacryl S-400 gel filtration, native gel elution 방법으로 정제하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 50~80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fractionation 과정에서 33.7%의 활성이 상실되었고, DEAE-Sephacel chromatography 결과 90 mM potassium phosphate elution시 Rf 0.24 isozyme이 major peak으로 먼저 elution되고 Rf 0.83 isozyme은 90~400 mM gradient elution에서 분획되었다(Fig. 1). 분획된 Rf 0.24 isozyme의 활성 peak(fraction : 40~60)과 Rf 0.83 isozyme의 활성 peak(fraction : 117~127)을 chromatogram상에서 잘라 무게로 비교했을 때 Rf 0.83 isozyme의 활성은 Rf 0.24 isozyme의 약 1/10 정도인 것으로 밝혀졌다. 따라서 Table 1에서 DEAE-Sephacel 과정 이후에 볼 수 있는 낮은 회수율은 Rf 0.83 isozyme의 회수율만 표시했기 때문이며 정제도는 의미가 없어 생략하였다. Phenyl-Sepharose chromatography(Fig. 2)에서 Rf 0.83 isozyme은 DEAE-Sephacel 과정의 1.6배 가량 정제되었으며 Sephacryl S-400 filtration(Fig. 3)에 의해 161.8배 정제

된 효소를 얻었다(Table 1). 부분정제한 Rf 0.83 isozyme은 Hoefer사의 Gel elution kit을 이용하여 minor

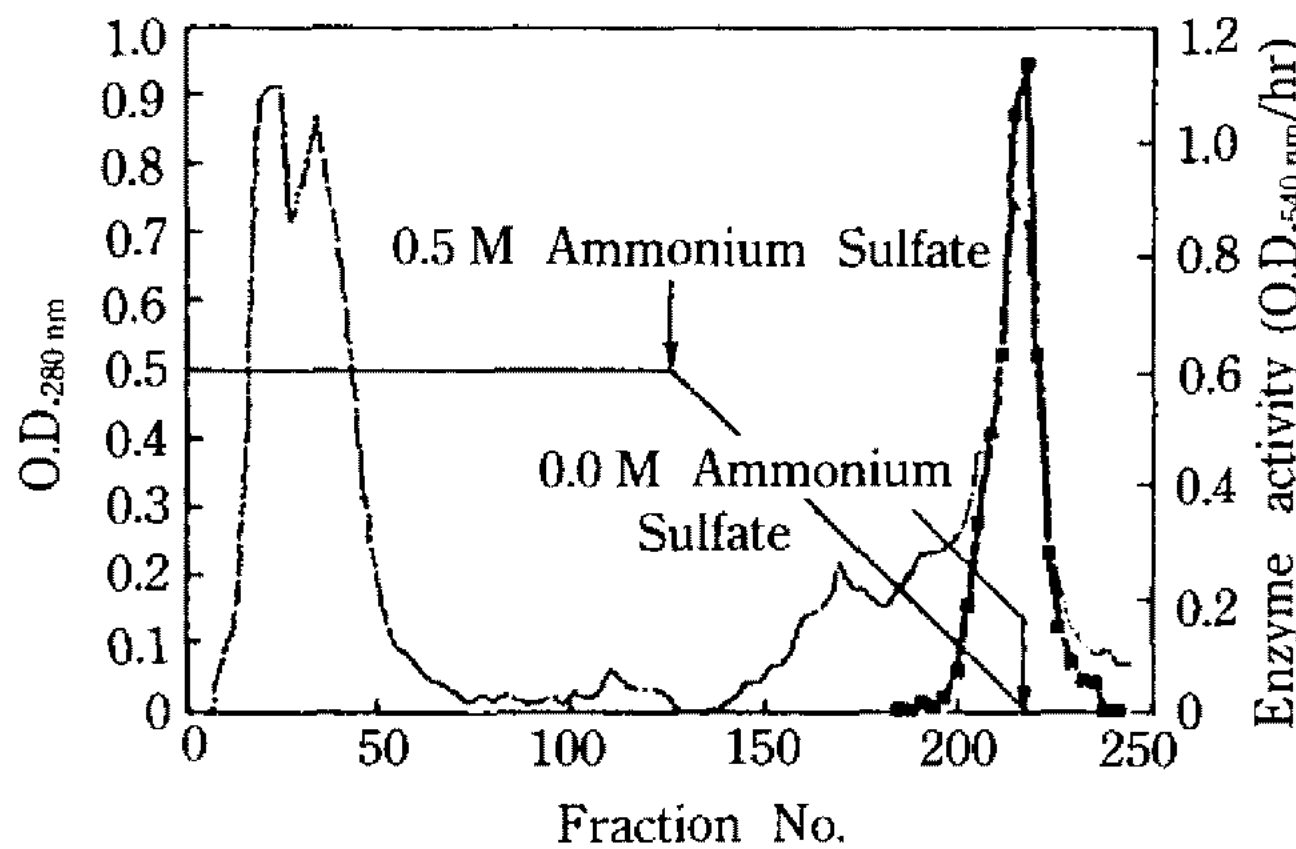
contaminants를 제거하고 순수정제된 단백질을 실험에 사용하였다.



**Fig. 1. DEAE-Sephacel chromatography of *Serratia* acetolactate synthase isozymes.**

Column size: 4.5×30 cm, loading protein: 3279 mg/200 ml, flow rate: 30 ml/hr, fraction volume: 15 ml/fraction, left activity peak: ALS isozyme Rf 0.24, right activity peak: Rf 0.83

----- protein profile, ---▲--- activity profile



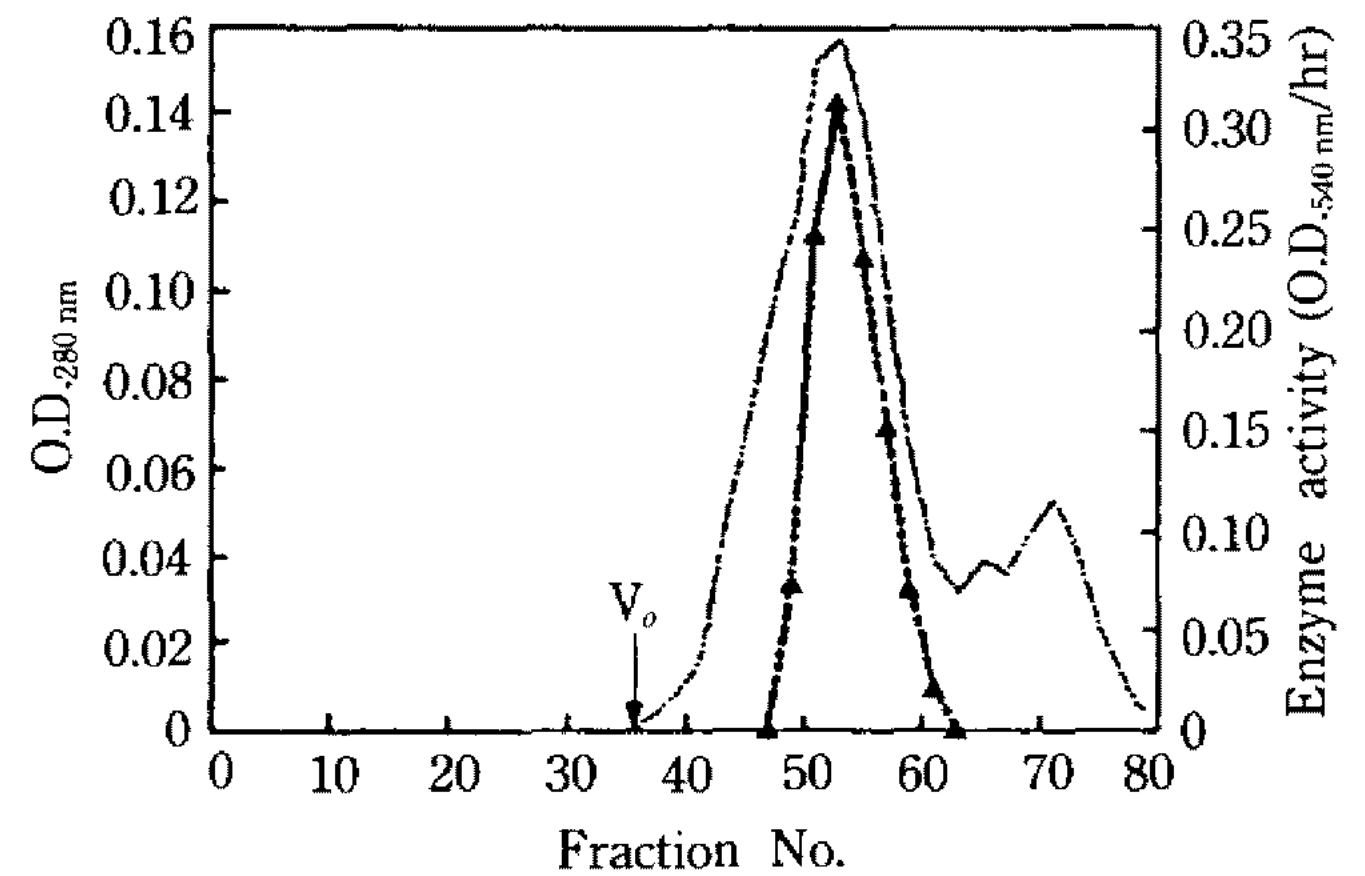
**Fig. 2. Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography of ALS isozyme Rf 0.83.** Arrows in the figure represent ammonium sulfate gradient (0.5 M~0.0 M).

Column size: 2.5×20 cm, loading protein: 93.6 mg/40 ml, flow rate: 20 ml/hr, fraction volume: 8 ml/fraction

----- protein profile, ---▲--- activity profile

**정제효소의 특성**

**분자량 :** Native 형태의 Rf 0.83 isozyme을 Sephacryl S-400 gel filtration 방법으로 측정된 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 531,000 정도로 추정되었으며, SDS-poly crylamide gel 전기영동에 의해 측정된 결과는 분자량이 55,000인 large subunit과 분자량이 38,900인 small subunit으로 이루어진 multimeric 효소로 나타났다(Fig. 5). 다른 enterobacteria에서 정제된 ALS isozymes의 경우 *E. coli* ALS I과 *S. typhimurium* ALS II의 large subunit의 분자량이 모두 60,000 정도이고 small subunit의 분자량은 각각 9,500 정도로 알려져 있으며(13, 14) *E. coli* ALS III의 large subunit과 small subunit의 분자량이 각각 60,000과 18,000 정도임을 감안할 때(8), 본 실험에서 밝혀진 *Serratia* ALS Rf 0.83 isozyme의 small subunit 분



**Fig. 3. Sephacryl S-400 gel filtration of ALS isozyme Rf 0.83.**

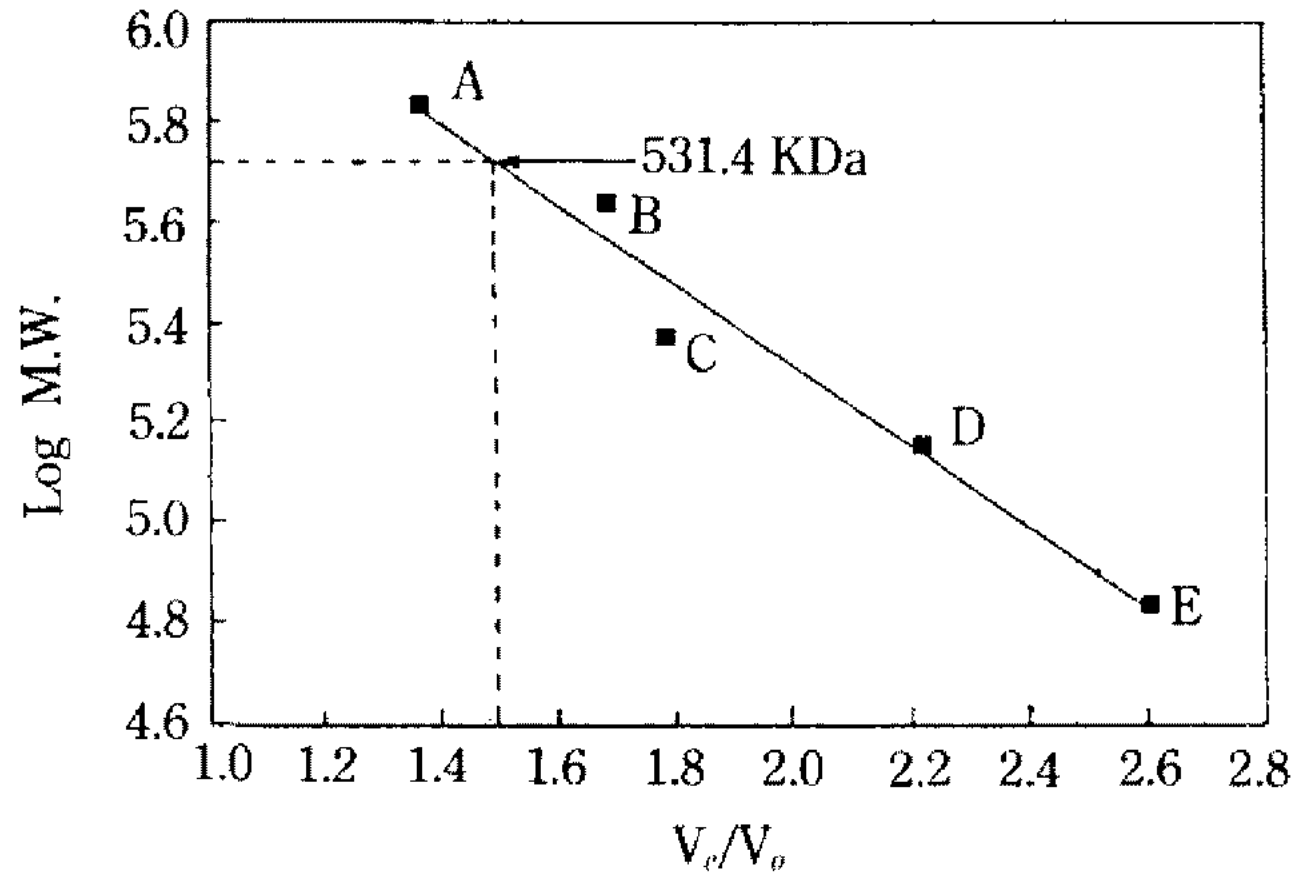
Column size: 1.4×110 cm, loading protein: 4.04 mg/1.2 ml, flow rate: 10 ml/hr, fraction volume: 1.6 ml/fraction,  $V_o$ : Void volume

----- protein profile, ---▲--- activity profile

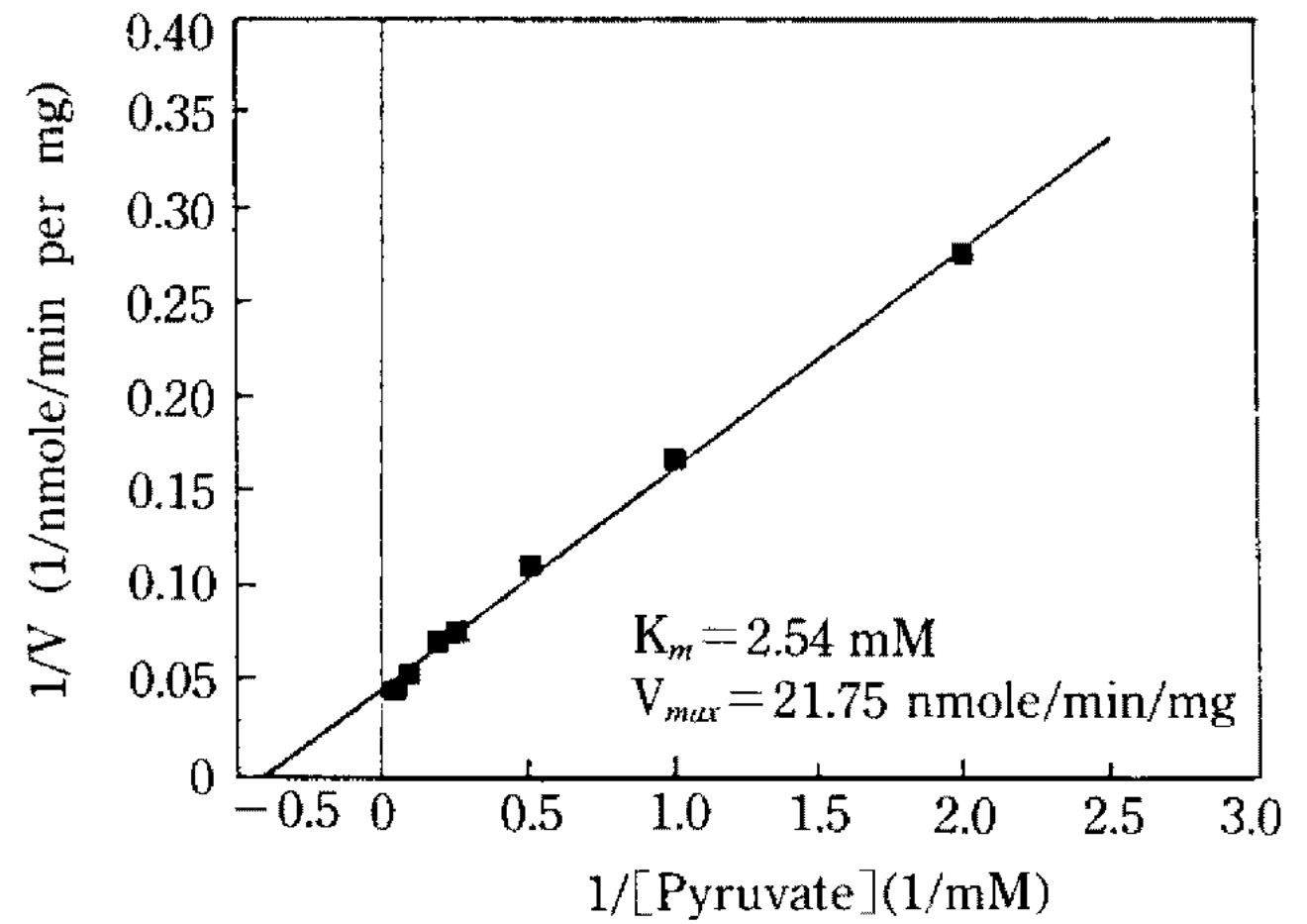
**Table 1. Purification of ALS Rf 0.83 isozyme from *Serratia marcescens* ATCC 25419**

Step	Total volume (ml)	Total unit (nmol/min)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Culture extract	370	76823	4210	18.3	100
50~80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	59415	3279	18.1	77.3
DEAE-Sephacel	40	1344	93.6	14.4	1.8
Phenyl-Sepharose	12	930.2	40.4	20.0	1.2
Sephacryl-400 filtration	1.2	210.4	1.3	161.8	0.27

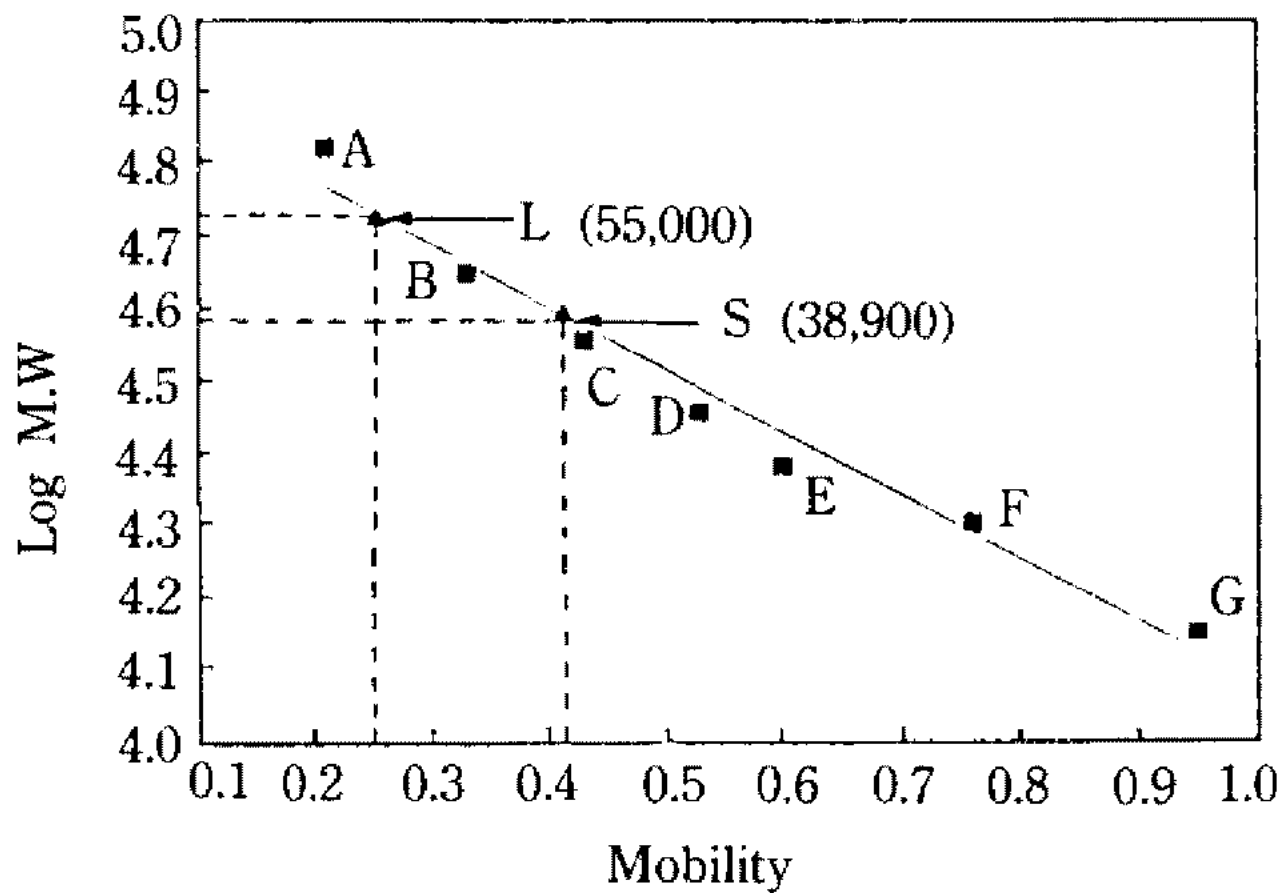




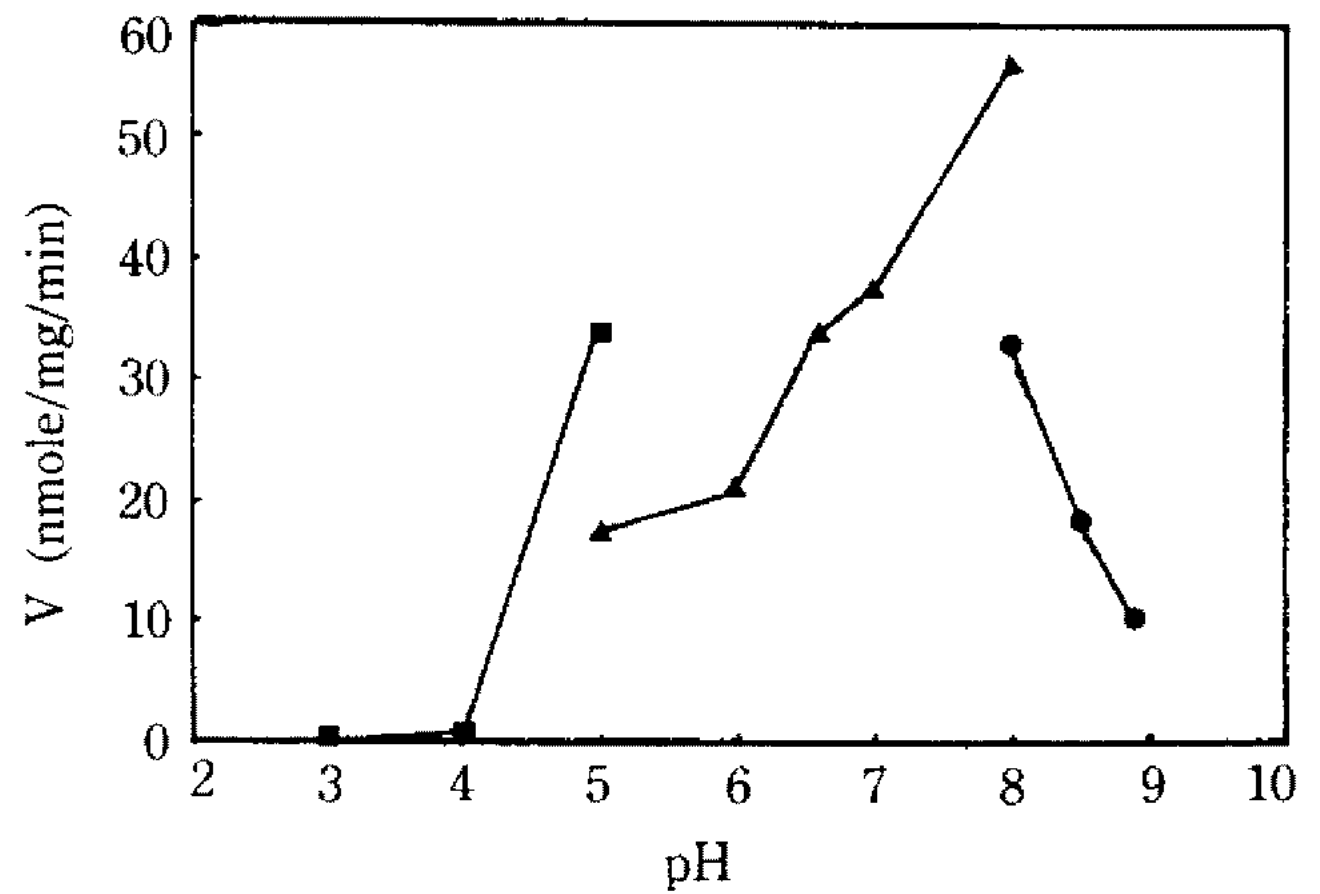
**Fig. 4. Native molecular weight determination of ALS isozyme Rf 0.83 by Sephacryl S-400 gel filtration.** Standards used were: A. thyroglobulin (669,000), B. ferritin (440,000), C. catalase (232,000), D. lactate dehydrogenase (140,000), E. albumin (67,000)



**Fig. 6. Double reciprocal plot of activity vs pyruvic acid concentrations for ALS isozyme Rf 0.83.**



**Fig. 5. Determination of subunit molecular weight of ALS isozyme Rf 0.83 by SDS PAGE.** Standards used were: A. bovine serum albumin (66,000), B. ovalbumin (45,000), C. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000), D. carbonic anhydrase (29,000), E. trypsinogen (24,000), F. trypsin inhibitor (21,400), G.  $\alpha$ -lactalbumin (14,200)



**Fig. 7. Effect of pH on the activity of ALS isozyme Rf 0.83.** Buffers used were:  $\blacksquare$ : 0.1 M Sodium acetate buffer,  $\blacktriangle$ : 0.1 M Potassium phosphate buffer,  $\bullet$ : 0.1 M Tris-HCl buffer

자량은 다른 enterobacter ALS isozymes의 small subunit보다 크다는 점이 특이하다.

**ALS Rf 0.83 isozyme의  $K_m$  및  $V_{max}$  값 :** 효소반응의 기질인 pyruvate의 농도를 0.5 mM에서 50 mM까지 변화시킨 반응액에서 효소활성도를 측정하여 전형적인 Michaelis-Menten type 포화곡선을 나타냈으며 Fig. 6에서 보는 바와 같이 Lineweaver-Burk plot(22)에 의한  $K_m$  값은 2.54 mM이었으며  $V_{max}$  값은 21.75 nmole/min/mg이었다. *Serratia* ALS Rf 0.83 isozyme의 pyruvate에 대한  $K_m$  값은 *E. coli* ALS I의  $K_m$  값(1.5 mM)과 유사하지만 *E. coli* ALS III의  $K_m$  값

(10.5 mM)과 *S. typhimurium* ALS II의  $K_m$  값(6 mM)과는 아주 다르게 나타났다(23).

**최적 반응 pH 및 반응온도 :** 기질의 pH를 pH 3~5인 0.1 M sodium acetate 완충용액, pH 5~8인 0.1 M potassium phosphate 완충용액, pH 8~9인 0.1 M Tris-HCl 완충용액으로 조절한 후 효소활성을 측정하여 결과는 Fig. 7과 같았으며, pH 8.0 부근의 0.1 M potassium phosphate 완충용액에서 최적 활성을 나타내었다. 문헌상에서 *E. coli*의 ALS I과 ALS III isozyme의 최적 pH는 각각 7.5와 9.0으로 보고된 바 있는데(24), 본 연구에서 밝혀진 Rf 0.83 isozyme의 최적 pH는 ALS III보다는 ALS I type과 비슷하다고 생각된다. 한편, 효소와 반응액을 반응시키는 preincubation 과정에서 4~60°C의 각 온도에서 30분간

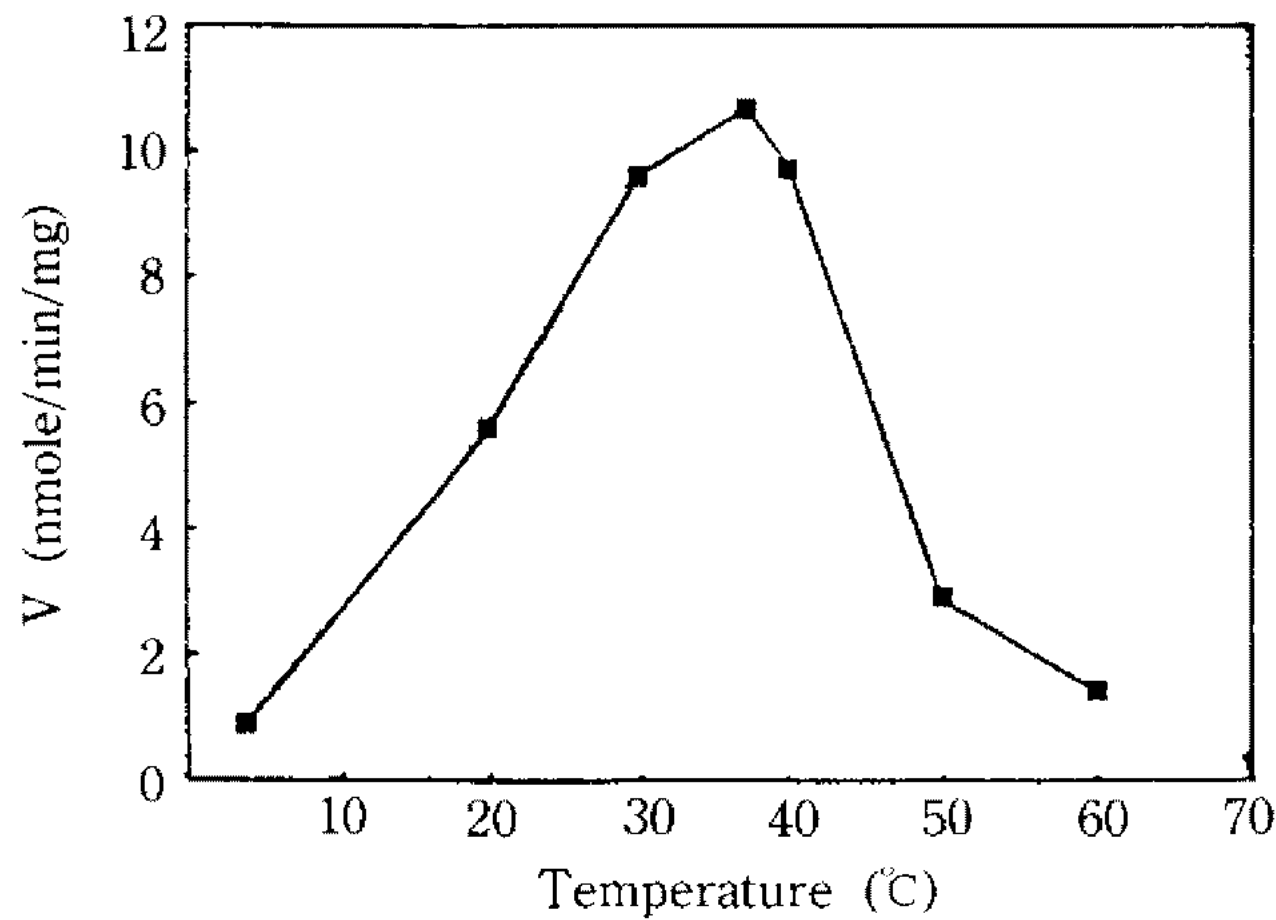


Fig. 8. Determination of optimum temperature of ALS isozyme Rf 0.83.

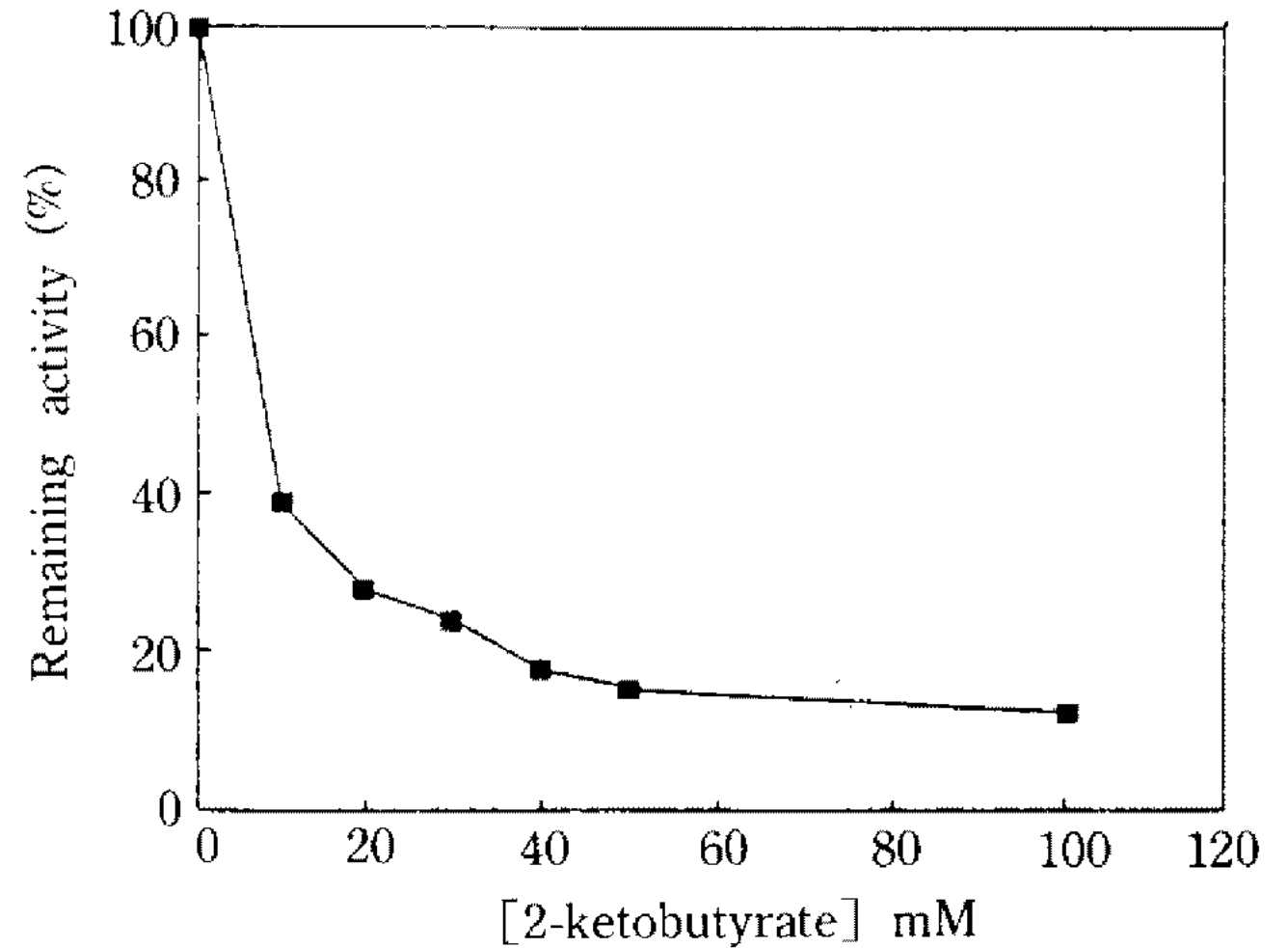


Fig. 10. Effect of  $\alpha$ -ketobutyrate on ALS isozyme Rf 0.83 at 20 mM pyruvate.

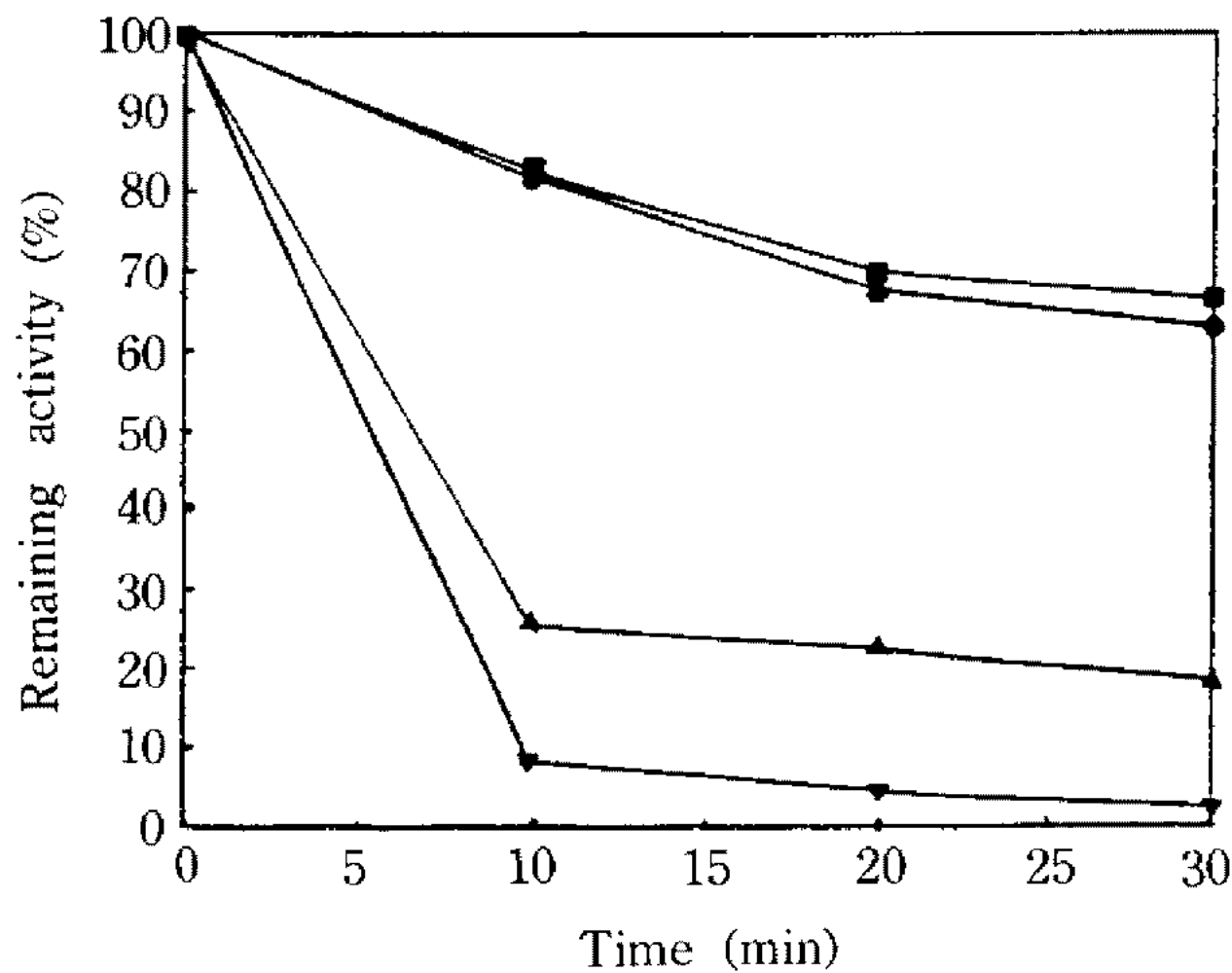


Fig. 9. Heat stability of ALS isozyme Rf 0.83. The enzyme solution was preincubated at 30°C, 37°C, 50°C and 60°C for 10, 20, and 30 min, and then the residual enzyme activity was measured. (■): 30°C, (●): 37°C, (▲): 50°C, (▼): 60°C

반응시킨 후 발색시약을 넣고 37°C에서 30분간 발색시킨 다음 효소활성을 측정한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 최적 반응온도는 37°C이었다.

**열안정성 :** 효소용액을 30~60°C에서 각각 10분, 20분, 30분 동안 preincubation시킨 후 반응액을 넣고 37°C에서 30분 반응시켜 잔존하는 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 9과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 Rf 0.83 isozyme을 30°C와 37°C에서 30분간 preincubation시켰을 때 효소역가가 40% 정도 감소하는 반면 50°C와 60°C에서는 preincubation 10분만에 효소역가가 80~90% 감소하는 것으로 나타났다.

**$\alpha$ -Ketobutyrate가 효소활성에 미치는 영향**

ALS에 의한 아미노산 생합성 과정에 있어서  $\alpha$ -ketobutyrate는 pyruvate 외에 ALS의 또다른 기질로서 pyruvate와 condensation 반응으로  $\alpha$ -aceto- $\alpha$ -hydroxybutyrate를 형성하여 isoleucine을 생성한다. Pyruvate 농도를 20 mM로 고정시키고 10~100 mM의  $\alpha$ -ketobutyrate를 반응액에 첨가하여 그 영향을 관찰한 결과 10 mM  $\alpha$ -ketobutyrate에서 60% 정도  $\alpha$ -acetolactate 생성이 억제되었으며 20 mM  $\alpha$ -ketobutyrate에서 73% 정도 억제되었다(Fig. 10).

**Branched chain 아미노산에 의한 효소활성 억제**

Branched chain 아미노산 생합성의 최종 생성물인 valine, leucine 및 isoleucine이 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 기질인 pyruvate 농도를 20 mM로 하고 여러 농도의 valine, leucine 그리고 isoleucine을 반응액에 각각 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 결과는 Fig. 11(—●—: valine, —■—: leucine, —▲—: isoleucine)에서 보는 바와 같다. ALS Rf 0.83 isozyme의 경우 5 mM valine과 15 mM isoleucine에서 50% 잔류활성을 나타내었으며(Fig. 11A, 11C) 20 mM leucine에서 60% 잔류활성을(Fig. 11B) 유지하는 것으로 보아, valine이 isoleucine 또는 leucine보다 세배 내지 네배 가량 효소활성을 억제함을 알 수 있다. 그러나 *E. coli* ALS I과 ALS III isozyme이 각각 0.2 mM과 0.02 mM의 valine에 의하여 50%의 잔류활성을 보이고 isoleucine에 의하여는 두 효소 모두 3 mM에서 50% 잔류활성을 나타내는 것으로 보아(23), *Serratia* ALS Rf 0.83 isozyme은 fee-

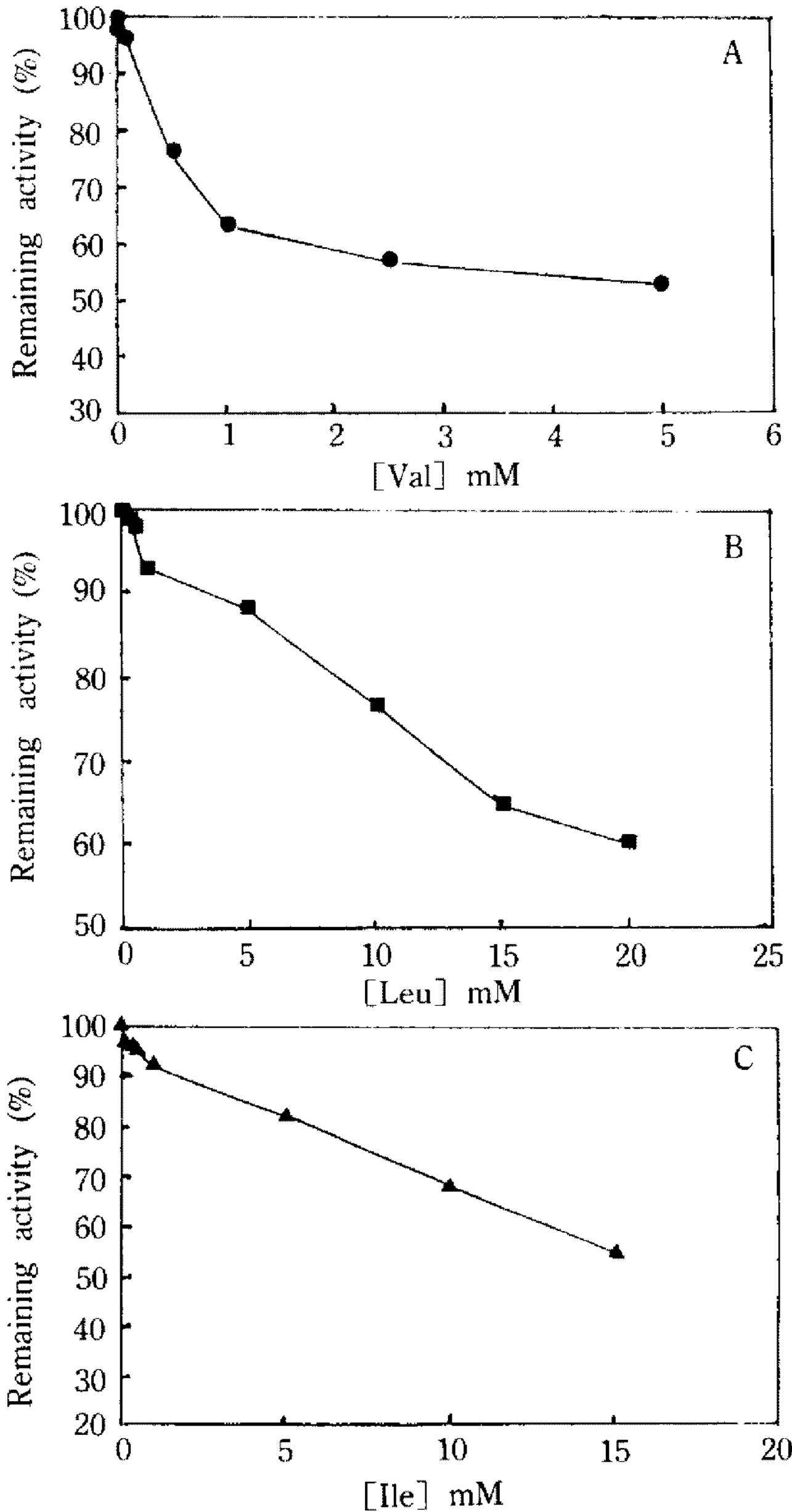


Fig. 11. Feedback inhibition pattern of branched chain amino acids on ALS isozyme 0.83 at 20 mM pyruvate.

feedback 억제현상이 *E. coli* isozymes과 다르며 오히려 branched chain 아미노산에 insensitive한 *S. typhimurium* ALS II(22)와 이점에서 상응한다고 볼 수 있다.

Herbicides에 의한 효소활성 억제

20 mM pyruvate가 들어있는 효소반응 용액에 sulfometuron methyl(SM)과 Imazaquin을 각각 0.5~2.5 mM되게 첨가하여 효소활성을 측정된 결과 Fig. 12 (—▲—: imazaquin, —■—: sulfometuron methyl)에서 보는 바와 같이 두 종류의 herbicide 모두 1.5 mM 근처에서 효소활성을 50% 감소시켰다. Black

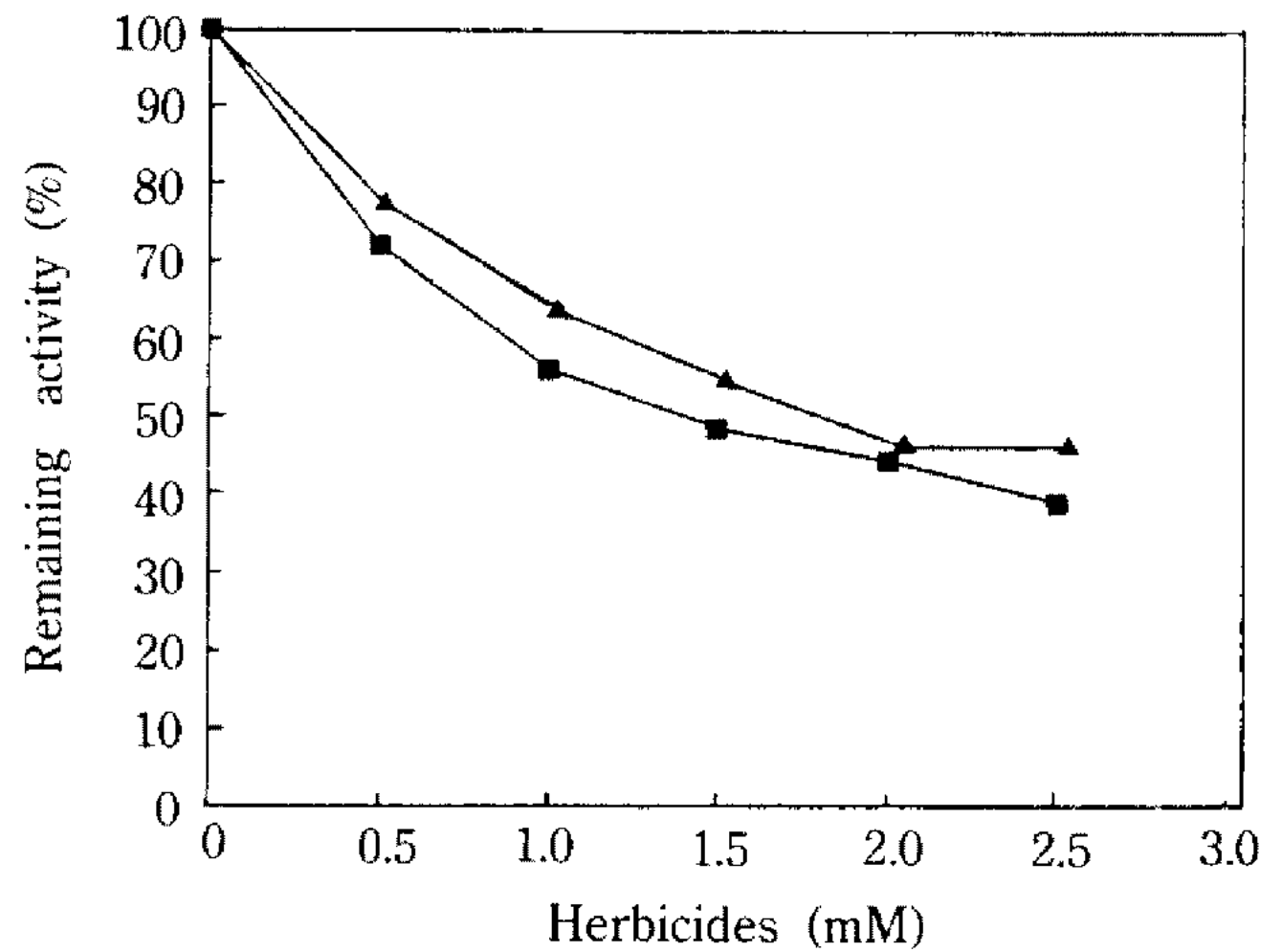


Fig. 12. Effect of sulfometuron methyl and imazaquin on ALS isozyme Rf 0.83.

Mexican Sweet(BMS) corn suspension culture의 경우 효소활성을 50% 억제하는 imazapyr 또는 sulfometuron methyl의 농도( $I_{50}$ )는 AHAS I에서 각각 2  $\mu$ M과 10 nM로 알려져 있으며 AHAS II에서는 1.5  $\mu$ M과 10 nM로 보고된 바 있다(24). 따라서 *Serratia* ALS Rf 0.83 isozyme은  $I_{50}$ 가 대개  $\mu$ M 범위인 식물 효소들(24)에 비해 이들 herbicides에 훨씬 저항성이 강하다고 볼 수 있으며 앞으로 효소 활성자리에 관하여 더 자세한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

*Serratia marcescens* ATCC 25419를 질소원이 풍부한 BHI 배지에서 배양하여 황산 암모늄 분별 침전을 시킨 후 DEAE-Sephacel chromatography, Phenyl-Sepharose hydrophobic chromatography, Sephacryl S-400 gel filtration, native gel elution을 거쳐 ALS isozyme Rf 0.83을 분리하였다. 분리한 ALS isozyme Rf 0.83의 native 형태는 gel filtration을 이용하여 분자량을 측정된 결과, 531,400이었고, SDS-PAGE를 수행한 결과 55,000의 large subunit와 38,900의 small subunit로 구성된 multimer임을 알 수 있었다. 이 효소의 pyruvate에 대한  $K_m$ 값은 2.54 mM이었으며,  $V_{max}$ 값은 21.75 nmole/min/mg이었다. 효소의 활성과 온도와의 관계를 보았을 때 효소반응의 적정온도는 37°C였으며 열에 대한 안정성은 50°C 이상에서 80~90%의 효소활성이 상실함을 보였다. 또한

이 효소의 최적 pH는 8.0 근처였다. ALS isozyme Rf 0.83은  $\alpha$ -ketobutyrate 10 mM에 대해 효소활성이 60% 정도 감소하였고 branched chain 아미노산인 isoleucine, leucine 및 valine에 대하여 식물 또는 다른 enterobacteria의 isozyme들보다 활성억제 현상이 미약했으며 구조적으로 서로 다른 sulfometuron methyl과 imidazolinone herbicides에 의해 효소활성이 억제됨을 관찰하였다.

### 감사의 말

본 연구는 89년도 과학재단 목적 기초 연구비지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 533-606.
2. Ramakrishnan, T. and E.A. Adelberg. 1955. Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. II. Identification of two operator genes. *J. Bacteriol.* **89**: 654-660.
3. Chaleff, R.S. and J. Mauvais. 1984. Acetolactate synthase is the site of action of the herbicides chlorosulfuron and sulfometuron methyl in higher plants. *Science*. **224**: 1443-1445.
4. Mazur, B.J., C. Chui and J.K. Smith. 1987. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase. The target enzyme for two classes of herbicides. *Plant physiol.* **85**: 1110-1117.
5. Grimminger, H. and H.E. Umbarger. 1979. Acetohydroxyacid synthase I of *Escherichia coli*: Purification and properties. *J. Bacteriol.* **137**: 846-853.
6. Squires, C.H., M. De Felice, C. Lago and J.M. Calvo. 1983. *ilv* HI locus of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **154**: 1054-1063.
7. De Felice, M., t. Newman and M. Levinthal. 1978. Regulation of synthesis of acetohydroxyacid synthase I isozymes in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Acta.* **541**: 1-8.
8. Friden, P., J. Donegan, J. Muller, P. Tsui, M. Freundlich, L. Eoyang, R. Weber and P.M. Silverman. 1985. The *ilv* B locus of *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding both subunits of acetohydroxyacid synthase I. *Nucleic Acid Research.* **13**: 3979-3993.
9. Wek, R.C., C.A. Hauser and G.W. Hatfield. 1985. The nucleotide sequence of the *ilv*BN operon of *Escherichia coli*: Sequence homologies of the acetohydroxyacid synthase isozymes. *Nucleic Acid Research.* **13**: 3995-4010.
10. Squires, C.H., M. De Felice, J. Derereux and J.M. Calvo. 1983. Molecular structure of *ilv* HI and its evolutionary relationship to *ilv* G in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acid Research.* **11**: 5299-5313.
11. Polania, J. 1984. Cloning of the *ILV* 2, *ILV* 3 and *ILV* 5 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 577-584.
12. Falco, S.C., K.S. Dumas and K.J. Livak. 1985. Nucleotide sequence of the yeast *ILV* 2 gene which encodes acetolactate synthase. *Nucleic Acid Research.* **13**: 4011-4027.
13. Eoyang, L. and P.M. Silverman. 1984. Purification and subunit composition of acetohydroxyacid synthase I from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **157**: 184-189.
14. Schloss, J.V., D.E. Van Dyk, J.F. Vasta and R.M. Kutny. 1985. Purification and properties of *Salmonella typhimurium* acetolactate synthase isozyme II from *Escherichia coli* HB 101/pDU9. *Biochemistry.* **24**: 4952-4959.
15. Gollop, N., B. Damri, Z. Barak and D.M. Chipman. 1989. Kinetics and mechanism of acetohydroxyacid synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **28**: 6310-6317.
16. Komatsubara, S., M. Kisumi and I. Chibuta. 1980. Transductional construction of an isoleucine producing strain of *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 51-61.
17. McEwen, J. and P.M. Silverman. 1980. Mutations in genes *cpxA* and *cpxB* of *Escherichia coli* K-12 cause a defect in isoleucine and valine synthetase. *J. Bacteriol.* **144**: 68-73.
18. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, N.E. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
19. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
20. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). **227**: 680-685.
21. Andrews, P. 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606.
22. Barak, Z., N. Kogan, N. Gollop and N.M. Chipman. 1990. Importance of AHAS isozymes in branched chain amino acid biosynthesis, pp. 91-107. In Barak Z., D.M. Chipman, and J.V. Schloss



- (ed.), *Biosynthesis of Branched Chain Amino Acid*. VCH, Weinheim.
23. De Felice, M., C.H. Squires and M. Levinthal. 1978. A comparative study of the acetohydroxyacid synthase isozymes of *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta.* **541**: 9-17.
24. Singh, B.K., E. Newhouse, M.a. Stidham and D.L. Shaner. 1990. Imidazolinones and acetohydroxyacid synthase from plants, Pp. 357-371. In Barak Z., D.M. Chipman, and J.V. Schloss (ed.), *Biosynthesis of Branched Chain Amino Acid*. VCH, Weinheim.

(Received October 22, 1991)