

이소루신 생합성 과정에서 *Serratia marcescens* Threonine Dehydratase의 조절 역할

최병범 · 방선권* · 김승수**

신흥전문대학 식품영양과, 의정부시, 경기도, 480-701,

*호서대학교 자연과학대학 생명과학과, 아산군, 충청남도, 337-795,

**연세대학교 이과대학 생화학과, 생물산업신소재센터, 서울시, 120-749

The Regulatory Role of *Serratia marcescens* Threonine Dehydratase in a Isoleucine Biosynthesis

Byung-Bum Choi, Son-Kwon Bang* and Soung-Soo Kim**

Dept. of Food and Nutrition, Shinheung Junior College, Euijeongbu 480-741,

*Dept. of Life Science, College of Natural Science, Hoseo University, Asan 337-795,

**Dept. of Biochemistry, College of Science and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749

Abstract

The effects of branched chain amino acids and metabolites in growth media on the biosynthesis of *Serratia marcescens* threonine dehydratase activity were examined. The enzyme activity was decreased above 60% by leucine among the range from 1 to 20 mM, and the enzyme activity was decreased approximately 20% by a low concentration of valine (1 to 4 mM), but not affected at high concentration (20 mM). However, the enzyme activity was increased approximately 100 to 140% by a low concentration of isoleucine (1 to 4 mM), but decreased approximately 25 to 80% at high concentration (15 to 30 mM). The enzyme activity was decreased by 25 and 58% by the simultaneous addition of all three branched chain amino acids at 2 and 10 mM concentration, respectively, but increased by 75 and 50% by the combination addition of isoleucine plus valine and isoleucine plus leucine at 2 mM, respectively. cAMP was decreased the enzyme activity approximately 10 to 40% by a low concentration (1 to 2 mM), but increased by 80% at high concentration (10 mM). These data suggest that *S. marcescens* threonine dehydratase should be multivalently repressed by branched chain amino acids, but positively regulated by a low isoleucine concentration and may play a regulatory role in an isoleucine biosynthetic pathway unlike the *E. coli* K-12 enzyme.

Key words : threonine dehydratase, branched chain amino acid, *Serratia marcescens*

서 론

세균, 효모, 식물 등에서 광범위하게 발견되는 threonine dehydratase [L-threonine hydro-lyase (deaminating), EC 4.2.1.16, 트레오닌 탈수효소]는 threonine deaminase라고도 하며 결사슬을 가진 필수 아미노산인 이소루신의 생합성에 관여하는 효소로서 L-트레오닌을 텔아미노화하여 α -케토부티르산과 암모니아를 생성한다¹⁾. α -케토부티르산은 이소루신의 전구체에 해당되므로 threonine dehydratase는 이소루신 생합성 경로에 있어서 첫번째 반응을 촉매 한다²⁾. 한편, 피루브산은 발린과 루신의 전구체에 해당하며 acet-

ohydroxy acid synthase(acetolactate synthase EC 4.1.3.18)는 발린과 루신 생합성 경로에 있어서 첫 번째 반응을 촉매 한다²⁾.

Enterobacteria에서 threonine dehydratase 발현에 관한 연구는 주로 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에서 수행되었다. 이소루신과 발린의 생합성에서 *E. coli* K-12와 *S. typhimurium*의 *ilv* 오페론은 결사슬을 가진 세 아미노산에 의해 다각적 억제와 탈억제의 조절을 받는다고 보고되었다³⁾. Kisumi 등⁴⁾은 *E. coli*와 *S. typhimurium*처럼 *Serratia marcescens*도 모두 세 결사슬을 가진 아미노산에 의해 *ilv* 오페론이 다각적 조절을 받는다고 보고한 바 있다. *E. coli* B를 동위 원

Corresponding author : Byung-Bum Choi

소로 표지된 글루코오스가 들어 있는 최소 배지에 배양 시킨 후 이소루신을 첨가하면 글루코오스의 탄소가 이소루신으로 전환되는 것을 억제한다고 보고되었다⁵⁾. *Streptococcus bovis*의 threonine dehydratase의 활성이 감소되면 이소루신의 전구체인 α -케토부티르산의 생성 속도가 감소되어 이소루신 양은 감소되고 발린 양은 증가된다고 보고되었다⁶⁾. *E. coli* K-12에서 transaminase B (*ilvE* gene 산물), dihydroxy acid dehydratase (*ilvD* gene 산물)과 threonine dehydratase (*ilvA* gene 산물)는 겉사슬을 가진 세 아미노산에 의해 조절되지만, acetohydroxy acid synthase, *ilvBN*과 *ilvIH* gene 산물)는 주로 발린과 루신에 의해 조절되고 isomeroeductase (acetohydroxy acid isomeroeductase (EC 1. 1. 1. 86), *ilvC* gene 산물)는 발린이 조절한다고 보고되었다⁷⁾. *S. marcescens*에서 이소루신의 생합성은 주로 threonine dehydratase와 acetohydroxy acid synthase의 억제와 되돌림저해에 의해 조절된다고 보고되었다^{4, 8, 9)}. *E. coli*에서 *ilvA* gene의 발현은 성장 배지에 겉사슬을 가진 아미노산의 공급을 제한하면 가장 높고, *ilv* 오페론의 발현은 이소루신을 제한할 경우 가장 높으며, 루신을 제한할 경우 가장 낮아진다고 보고되었다¹⁰⁾. *S. typhimurium*에서도 성장 배지에 이소루신의 공급을 제한하면 acetohydroxy acid synthase가 탈억제되어 아세토락트산의 형성과 isomeroeductase의 유도가 동시에 증가되어, *ilv* 오페론의 발현이 높아진다고 보고되었다⁷⁾.

본 연구에서는 *S. marcescens* ATCC 25419에서 겉사슬을 가진 아미노산 생합성 과정의 조절에 관한 정보를 얻기 위하여 최소 배지에 첨가한 겉사슬을 가진 아미노산과 대사산물이 *S. marcescens* threonine dehydratase의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 군 주

Serratia marcescens ATCC 25419는 미국 Louisiana 주립 대학교의 Braymer 교수로부터 분양받아 BHI (brain heart infusion) 사면 배지에 옮긴 다음 배양하였다.

2. 시 약

Potassium phosphate, dithiothreitol (DTT), ethylenediamine tetraacetate (EDTA), pyridoxal-5-phosphate (PLP), threonine, serine, isoleucine, valine, leucine, histidine, methionine, argi-

nine, isoleucine hydroxamate, α -ketobutyrate, pyruvate, imidazole, homoserine, α -ketoglutarate, γ -aminobutyrate, glyoxylate, AMP, indole acetate (IAA), bovine serum albumin (BSA), isopropylthiogalactoside (IPTG), trichloroacetate (TCA), cAMP 등은 Sigma사 제품을 사용하였고 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 등은 Hayashi사 제품을 사용하였다. BHI는 Difco사, 기타 시약은 일급 내지 특급 제품을 사용하였다.

3. *Serratia marcescens* ATCC 25419의 배양

사면 배지에 보존된 군주의 종균은 BHI 배지 10ml에 접종한 다음 하루밤 동안 배양하여 최소 배지 30ml가 들어 있는 100ml 삼각 플라스크에 1ml씩 넣어 37°C에서 18시간 진탕 배양하였다. 최소 배지는 다음과 같이 변형한 Davis-Mingioli 최소 배지를 사용하였다¹¹⁾. 배지의 구성은 0.5% glucose, 51mM K₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 8mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM MgSO₄ · 7H₂O이었다.

4. 세포 추출물의 제조

배양물을 10,000×g로 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 수확한 세포를 2 내지 3배의 파쇄 완충 용액 (50mM potassium phosphate, pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM DTT)에 혼탁시켜 초음파 파쇄기로 40mA에서 1분 30초 동안 (파쇄 30초마다 2분 휴식) 세포를 파쇄한 다음 12,000×g로 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취하여 효소 활성 측정에 사용하였다.

5. Threonine dehydratase의 활성 측정

Threonine dehydratase의 활성은 threonine이 탈아미노화되어 생성된 α -케토부티르산의 양을 Friedemann과 Haugen의 방법¹²⁾을 변형시킨 Datta의 방법¹³⁾에 따라 측정하였다. 반응 용액 (100mM potassium phosphate, pH 8.0, 0.02mM PLP, 20mM L-threonine)에 효소 용액을 첨가하여 전체 반응액 부피를 1ml이 되게 하여 37°C에서 15분 동안 미리 반응시켰다. 이 반응액에 0.1ml의 30% (W/V) TCA 용액을 넣어 반응을 중지시킨 다음, 0.1ml의 2 N HCl 용액에 녹아 있는 0.02% (W/V) DNPH를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켜 발색시킨 후, 이 반응액에 1ml의 2.5 N NaOH 용액을 가하고 다시 37°C에서 5분간 방치시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Threonine dehydratase의 1 unit는 37°C에서 1분간 1 mole의 α -케토부티르산을 생성하는 데 필요한 효소의

양으로 정의했고, 활성 측정 조건 하에서 α -케토부티르산의 흡광계수는 $4,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 이었다. 비활성은 unit /mg protein으로 표시했다.

6. 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 방법으로 정량 했다¹⁴⁾.

7. 여러 아미노산이 효소 활성에 미치는 영향

최소 배지에 각각 다른 농도의 이소루신, 발린 및 루신을 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕 배양시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 한편 겉사슬을 가진 아미노산들과 다른 아미노산들의 영향을 비교하기 위해서 최소 배지에 각각 10mM의 겉사슬을 가진 아미노산과 트레오닌, 세린, 히스티딘, 아르기닌 및 메티오닌을 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕 배양시킨 후 효소 활성을 측정하였다. Isoleucine hydroxamate의 영향도 동일한 방법으로 실험하였다.

8. 이소루신, 발린, 루신의 동시 첨가가 효소 활성에 미치는 영향

이소루신과 발린, 발린과 루신, 이소루신과 루신, 그리고 세 아미노산을 함께 2, 10mM의 농도로 최소 배지에 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕 배양시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

9. 여러 대사 산물이 효소 활성에 미치는 영향

최소 배지에 각각 1mM의 이미다졸, 호모세린, α -케토글루타르산, α -케토부티르산, 피루브산 또는 2mM의 α -아미노부티르산, 글리옥실산, AMP, cAMP, IPTG를 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕 배양시킨 후 효소 활성을 측정하였다. cAMP와 IAA의 영향은 최소 배지에 여러 농도의 cAMP와 IAA를 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕 배양시킨 후 효소 활성을 측정하여 분석하였다.

결 과

1. 여러 아미노산이 효소 활성에 미치는 영향

Serratia marcescens threonine dehydratase 생합성에 대한 아미노산의 영향을 알아보고자 겉사슬을 가진 아미노산들 (이소루신, 발린 및 루신)과 트레오닌, 세린, 히스티딘, 메티오닌 및 아르기닌 등을 사용하였다. 최소 배지에 10mM의 여러 아미노산을 첨가시킨 후 세포 추출물의 threonine dehydratase의 비활성을 조사

한 결과는 Table 1과 같이 10mM의 루신, 트레오닌, 히스티딘 그리고 메티오닌은 대조군보다 효소의 비활성을 40~70% 정도, 10mM의 이소루신, 세린 그리고 아르기닌은 모두 20% 감소시켰다. 그러나 10mM의 발린은 효소의 비활성을 10% 감소시키는 등 거의 영향을 주지 못했다.

2. 여러 농도의 이소루신, 발린, 루신이 효소 활성에 미치는 영향

이소루신, 발린, 루신 등의 겉사슬을 가진 아미노산들이 threonine dehydratase의 생성에 미치는 영향을 여러 농도에서 조사한 결과 이소루신은 1~4mM에서 효소의 비활성을 100~140% 정도 증가시킨 반면 15~30mM에서 25~80% 정도 감소시켰다. 특히 2mM에서 효소의 비활성을 140% 증가시키는 효과를 보여 주었다 (Fig. 1). 한편, 이소루신의 경쟁적 저해제로 알려진 isoleucine hydroxamate¹⁵⁾를 여러 농도로 세분해서 첨가했을 경우 이소루신과는 다르게 1~10mM에서 효소의 비활성을 60% 이상 감소시켰고, 20mM에서는 효소의 활성이 완전히 사라졌다 (Fig. 2). 발린은 효소의 비활성을 1~4mM에서 20% 정도, 8~10mM에서 10% 정도 감소시켰으나 20mM 이상에서 효소의 비활성을 원래대로 회복시켰다 (Fig. 3). 한편, 루신은 효소의 비활성을 1~20mM의 조사한 농도에서 60% 이상 감소시켰다 (Fig. 4).

Table 1. The effects of various amino acids in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase (TD)

Addition to minimal medium (10 mM)	Specific activity of TD (units /mg)	Relative activity (%)
None	0.050 ± 0.004	100
Isoleucine	0.040 ± 0.002	80
Valine	0.045 ± 0.004	90
Leucine	0.015 ± 0.001	30
Threonine	0.020 ± 0.002	40
Serine	0.040 ± 0.003	80
Histidine	0.030 ± 0.002	60
Methionine	0.030 ± 0.002	60
Arginine	0.040 ± 0.003	80

a: The concentration of each amino acid added to the medium was 10mM, b: Values are mean range of variation for three experiments, c: Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with each of amino acids.

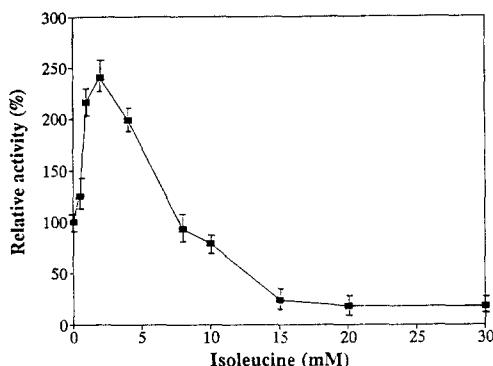


Fig. 1. Effect of varying concentrations of isoleucine in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase. a: Cells were grown aerobically for 9h at 37°C in modified Davis-Mingoli medium. Crude extracts for enzyme assay were prepared by sonication of the harvested cells as described in Materials and Methods, b: Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of isoleucine, c: Values are mean range of variation for three experiments.

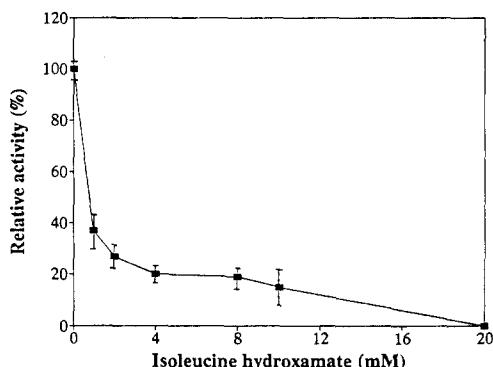


Fig. 2. Effect of varying concentrations of isoleucine hydroxamate in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase. a: Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of isoleucine hydroxamate, b: Values are mean range of variation for three experiments.

3. 이소루신, 발린, 루신의 동시 첨가가 효소 활성에 미치는 영향
최소 배지에 2mM과 10mM 농도의 이소루신, 발린 또는 루신을 조합하여 동시 첨가한 실험에서 이소루신과 발린 또는 이소루신과 루신을 각각 2mM씩 동시 첨가했을 경우 효소의 비활성을 75, 50%씩 증가시킨 반

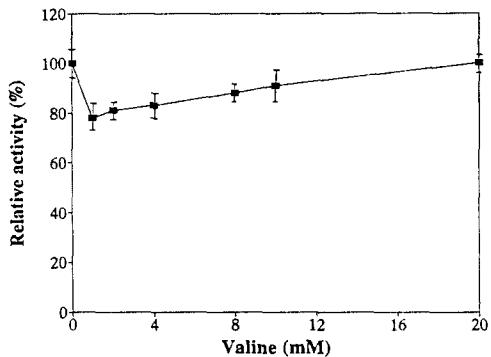


Fig. 3. Effect of varying concentrations of valine in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase. a: Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of valine, b: Values are mean range of variation for three experiments.

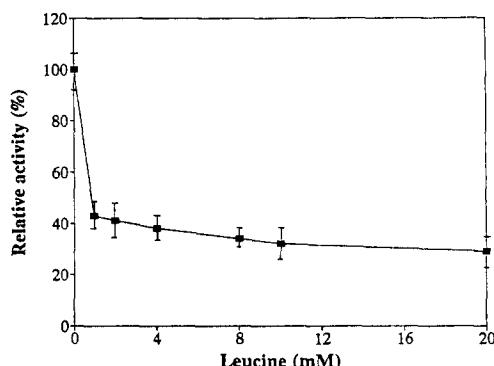


Fig. 4. Effect of varying concentrations of leucine in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase. a: Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of leucine, b: Values are mean range of variation for three experiments.

면 발린과 루신, 세 아미노산을 각각 2mM씩 동시 첨가했을 경우 37, 25%씩 감소시켰다 (Table 2). 한편 이소루신과 발린, 발린과 루신, 이소루신과 루신 그리고 세 아미노산을 각각 10mM씩 동시 첨가했을 경우는 효소의 비활성도를 각각 21, 29, 31, 58%씩 감소시켰다 (Table 2).

4. 여러 대사 산물이 효소 활성에 미치는 영향

Table 3에서 나타난 것처럼 조사한 대사 산물중에서

Table 2. The effects of isoleucine, valine and leucine on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase when added together in growth media

Addition to minimal medium (mM)	Specific activity of TD (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.040±0.004	100
Ile(2)+Val(2)	0.070±0.006	175
Val(2)+Leu(2)	0.025±0.002	63
Ile(2)+Leu(2)	0.060±0.003	150
Ile(2)+Val(2)+Leu(2)	0.030±0.002	75
None	0.048±0.003	100
Ile(10)+Val(10)	0.038±0.002	79
Val(10)+Leu(10)	0.034±0.002	71
Ile(10)+Leu(10)	0.033±0.002	69
Ile(10)+Val(10)+Leu(10)	0.020±0.001	42

a: The concentrations of each amino acid added to the medium were 2 and 10 mM, b: Values are mean±range of variation for three experiments, c: Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with combination of branched chain amino acids.

글리옥실산은 대조군보다 효소의 비활성을 75% 감소시켰다. 히스티딘의 전구체인 이미다졸, 세린의 대사 분해 물질이며 발린 생합성의 전구체인 피루브산, α -케토부티르산 유사체인 α -아미노부티르산 그리고 AMP를 첨가했을 경우 효소의 비활성을 모두 50%씩 감소시켰다. 메티오닌의 전구체인 호모세린, 히스티딘과 아르기-

Table 3. The effects of several metabolites in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase

Addition to minimal medium (mM)	Specific activity of TD (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.040±0.004	100
Imidazole (1)	0.020±0.002	50
Homoserine (1)	0.030±0.001	75
α -Ketoglutarate (1)	0.030±0.002	75
α -Ketobutyrate (1)	0.030±0.003	75
α -Aminobutyrate (2)	0.020±0.002	50
Pyruvate (1)	0.020±0.001	50
Glyoxylate (2)	0.010±0.001	25
AMP (2)	0.020±0.001	50
cAMP (2)	0.036±0.002	90
IPTG (2)	0.030±0.002	75

a: The concentrations of each amino acid added to the medium was 1 or 2 mM, b: Values are mean±range of variation for three experiments, c: Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with each of metabolites.

닌의 대사 분해 물질인 α -케토부티르산, 트레오닌의 대사 분해 물질이며 이소루신 생합성의 전구체인 α -케토부티르산 및 IPTG를 첨가했을 경우에는 효소의 비활성을 모두 25%씩 감소시켰다. IAA는 acetohydroxy acid synthase의 비활성을 1mM에서 6배 정도 증가시킨다고 보고하였다¹⁶⁾. IAA에 대한 threonine dehydratase의 영향을 살펴보기 위하여 IAA를 여러 농도로 세분해서 첨가했을 경우 0.5mM에서 효소의 비활성을 80% 증가시켰으나, 1~8mM에서 40~60% 정도 감소시켰고 10mM에서 효소의 활성이 거의 사라졌다 (Fig. 5). cAMP 농도를 세분해서 최소 배지에 첨가했을 경우 1~2 mM에서 효소의 비활성을 10~40% 정도 감소시킨 반면 10mM에서 80% 증가시켰다 (Fig. 6).

고 칠

본 실험에서 *Serratia marcescens* threonine dehydratase가 세 결사슬을 가진 아미노산이 동시에 배지에 존재할 때 비활성도가 감소되는 것으로 보아 *S. marcescens* ATCC 25419의 *ilvA* gene도 *ilvB* gene 산물인 acetolactate synthase¹⁷⁾처럼 세 결사슬을 가진 아미노산에 의해 다각적 억제를 받는 것으로 나타났다. *E. coli* K-12의 경우 이소루신의 낮은 농도 (0.1mM)에서 threonine dehydratase의 비활성이 감소한다 (40%) 고 보고되었다¹⁸⁾. 그러나 *S. marcescens* ATCC 25419의 경우 이소루신의 낮은 농도에서 효소의 비활성이 증가한 반면 높은 농도에서는 감소하는 것으로 보아 이소

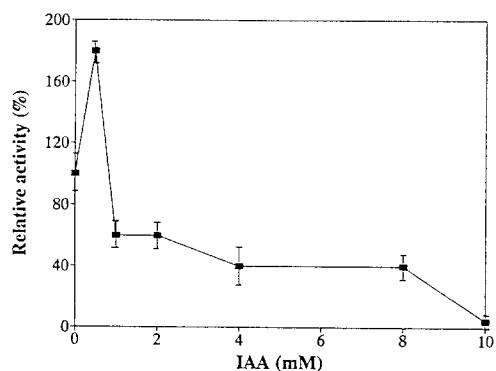


Fig. 5. Effect of varying concentrations of IAA in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase. a: Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of IAA. b: Values are mean range of variation for three experiments.

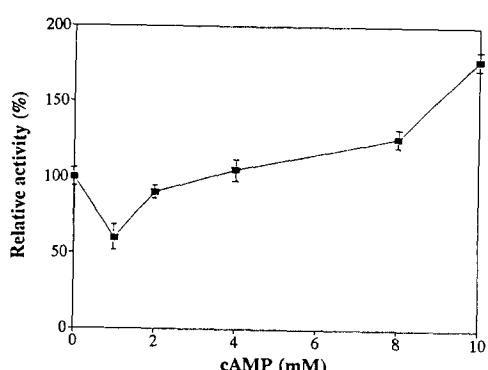


Fig. 6. Effect of varying concentrations of cAMP in growth media on the specific activity of *S. marcescens* threonine dehydratase. a: Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of cAMP. b: Values are mean range of variation for three experiments.

루신의 농도에 따라 *S. marcescens* threonine dehydratase의 생합성이 조절되는 것으로 나타났다. *S. typhymurium*에서 이소루신은 발린에 의해 억제되는 acetohydroxy acid synthase의 촉진 인자로 작용한다고 보고되었다¹⁹⁾. 또한 *S. marcescens* acetolactate synthase도 이소루신의 낮은 농도에서 비활성이 증가한 반면 높은 농도에서는 감소한다고 보고되었으므로¹⁹⁾, *ilv* gene의 생합성은 이소루신의 농도에 따라 조절된다고 추정된다. 한편, 이소루신의 경쟁적 저해제인 isoleucine hydroxamate는 낮은 농도에서 이소루신과는 다르게 *S. marcescens* threonine dehydratase의 비활성을 절반 정도 감소시켰다. 루신의 경우에는 효소의 비활성이 조사한 모든 루신의 농도에서 절반 이상 억제되었고 발린의 경우는 20mM의 높은 농도에서 효소 활성에 별 영향이 없었다. 각각 2mM씩 이소루신과 발린 또는 이소루신과 루신을 동시에 첨가했을 경우 각각 75, 50%씩 증가시킨 반면, 세 아미노산을 각각 2과 10mM씩 동시에 첨가했을 경우에는 각각 25, 58%씩 감소시켰다. 조사한 여러 대사 산물중에서 cAMP가 10mM 농도에서 *S. marcescens* threonine dehydratase의 비활성을 80% 증가시키고, *S. marcescens* acetolactate synthase도 2mM 농도에서 100% 정도 증가시킨다고 보고된 것으로 보아¹⁷⁾ *S. marcescens*의 경우에도 *E. coli*와 *S. typhymurium*에서처럼^{20, 21)} cAMP가 *ilv* gene에서 촉진 인자로 작용한다고 생각된다. 또한, IAA는 낮은 농도에서 *E. coli* K-12 acetohydroxy acid synthase¹⁶⁾와 *S. marcescens* threonine de-

hydratase의 비활성을 증가시킨 것으로 보아 cAMP처럼 *ilv* gene에서 촉진 인자로 작용한다고 생각된다. 이상과 같은 결과들을 종합해 보면 *S. marcescens* threonine dehydratase는 *E. coli*와 *S. typhymurium*²¹⁾에서처럼 이소루신, 발린 그리고 루신에 의해 다각적인 조절과 cAMP에 의한 촉진적인 조절을 받지만, 비교적 낮은 농도의 이소루신 (1~4mM)에 의해서는 *S. marcescens* threonine dehydratase의 생합성이 증가되고 높은 농도의 이소루신 (10~30mM)에 의해서는 감소되는 등 이소루신 생합성 과정에서 조절 역할을 하는 것으로 생각된다.

요약

최소 배지에 여러 아미노산을 첨가하여 배양시킨 *Serratia marcescens* ATCC 25419 세포 추출물에서 threonine dehydratase의 비활성을 조사한 결과 이소루신은 1~4mM에서 효소의 비활성을 100~140% 정도 증가시킨 반면 15~30mM에서 25~80% 정도 감소시켰다. 루신은 효소의 비활성을 1~20mM에서 60% 이상 감소시켰다. 한편, 발린은 효소의 비활성을 1~4mM에서 20% 정도, 8~10mM에서 10% 정도 감소시켰으나 20mM에서 효소의 비활성을 원래대로 회복시켰다. 각 2mM 농도의 이소루신과 발린 그리고 이소루신과 루신은 효소의 비활성을 각각 75, 50%씩 증가시킨 반면 세 아미노산을 각각 2과 10mM씩 동시에 첨가했을 경우에는 각각 25, 58%씩 감소시켰다. 글리옥실산은 효소의 비활성을 75%, 이마디졸, 피루보산, α -아미노부티르산 그리고 AMP는 모두 50%씩, 호모세린, α -케토글루타르산, α -케토부티르산 및 IPTG를 첨가했을 경우는 모두 25%씩 감소시켰다. cAMP는 효소의 비활성을 1~2mM에서 10~40% 정도 감소시킨 반면 10mM에서 80% 증가시켰다. 이러한 결과들로부터 *S. marcescens* threonine dehydratase는 *E. coli* K-12 효소와는 다르게 낮은 농도의 이소루신에 의해 효소의 비활성이 증가되고, 높은 농도의 이소루신 (10~30mM)에 의해서는 감소되는 등 이소루신 생합성 과정에서 조절 역할을 하는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Umberger, H. E. : Amino acid biosynthesis and its regulation, *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 533~606(1978).
- Ramakrishman, T. and Adelberg, E. A. : Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. II. Identification of two operator genes,

- J. Bacteriol.*, **89**, 654~660(1965).
3. Dwyer, S. B. and Umbarger, H. E. : Isoleucine and valine metabolism of *Escherichia coli*. X IV. Pattern of multivalent repression in strain K-12, *J. Bacteriol.*, **95**, 1680~1684(1968).
 4. Kisumi, M., Komatsubara, S., Sugiura, M. and Chibata, I. : Multivalent repression and genetic derepression of isoleucine-valine biosynthetic enzyme in *Serratia marcescens*, *J. Bacteriol.*, **107**, 824~827 (1971).
 5. Umbarger, H. E. : Evidence for a negative feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine, *Science*, **123**, 848(1956).
 6. Basso, A. L., Ricca, E., Caruso, C., Ferrara, L. and Felice, M. D. : Acetohydroxy acid synthase and threonine deaminase activities, and the biosynthesis of isoleucine-leucine-valine in *Streptococcus bovis*, *Res. Microbiol.*, **144**, 539~545(1993).
 7. Freundlich, M., Burns, R. O. and Umbarger, H. E. : Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. I. Multi-valent repression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 1804~1808(1962).
 8. Kisumi, M., Kato, J., Komatsubara, S. and Chibata, I. : Increase in isoleucine accumulation by α -amino-nobutyric acid-resistant mutants of *Serratia marcescens*, *App. Microbiol.*, **107**, 824~827(1970).
 9. Kisumi, M., Komatsubara, S. and Chibata, I. : Enhancement of isoleucine hydroxamate-mediated growth inhibition and improvement of isoleucine-producing strains of *Serratia marcescens*, *App. Environ. Microbiol.*, **34**, 647~653(1977).
 10. Smith, J. M., Smolin, D. E. and Umbarger, H. E. : Polarity and the regulation of the *ilv* gene cluster in *Escherichia coli* strain K-12, *Mol. Gen. Genet.*, **148**, 111~124(1976).
 11. Davis, B. D. and Mingoli, E. S. : Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamine B₁₂, *J. Bacteriol.*, **60**, 17~28(1950).
 12. Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. Pyruvic acid. II. The determination of keto acids in blood and urine, *J. Biol. Chem.*, **147**, 415~422(1943).
 13. Datta, P. : Purification and feedback control of threonine deaminase activity of *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 5836~5844(1966).
 14. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275(1951).
 15. Kisumi, M., Komatsubara, S., Sugiura, M. and Chibata, I. : Isoleucine hydroxamate, an isoleucine antagonist, *J. Bacteriol.*, **107**, 741~745(1971).
 16. Williams, A. L. : Regulation of acetohydroxy acid synthase activities in *Escherichia coli* K-12 by small metabolites, *Biochim. Biophys. Acta*, **866**, 15~18 (1986).
 17. Choi, B. B. and Kim, S. S. : The effects of branched chain amino acids and small metabolites on the biosynthesis of acetolactate synthase in *Serratia marcescens* ATCC 25419, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 119~121(1992).
 18. Ramakrishnan, T. and Adelberg, E. A. : Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. I. Genetic derepression of enzyme formation, *J. Bacteriol.*, **87**, 566~573(1964).
 19. Davidson, J. D. and Wilson, D. A. : Evidence for isoleucine as a positive effector of the *ilvBN* operon in *Salmonella typhimurium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 934~939(1991).
 20. Frider, P., Voelkel, K., Sternblitz, R. and Freundlich, M. : Reduced expression of the isoleucine and valine enzymes in integration host factor mutants of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **172**, 573~579 (1984).
 21. Calvo, J. M., Freundlich, M. and Umbarger, H. E. : Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: Isolation of regulatory mutants, *J. Bacteriol.*, **97**, 1272~1282(1969).

(1996년 10월 10일 접수)