

# 대장균 Leucine-Responsive Regulatory Protein의 정제 및 형광분광학적 특성 분석

이찬용\* · 김성철 · 서초희  
충남대학교 생화학과

## Purification and Fluorometric Analysis of Leucine-Responsive Regulatory Protein from *Escherichia coli*

Chan Yong Lee\*, Sung-Chul Kim, and Cho-Hee Seo

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

(Received February 2, 2010/Accepted February 28, 2010)

We describe the construction of derivatives of wild type and mutant *lrp* genes that encode 6XHis-tag Lrps. These derivatives of wild type and mutant Lrp could be useful for *in vitro* studies including Lrp conformational changes. We show that 6XHis-tag Lrp wild type and 6XHis-tag Lrp R145W bind with similar patterns *in vitro* to 21 bp duplex DNA containing the consensus sequences of Lrp sites of upstream of the *ilvIH* operon. In addition, we report here the 6XHis-tag Lrp R145W is useful to investigate the conformational changes of Lrp in solution by using its own intrinsic fluorescence characteristics.

**Keywords:** global regulator, leucine, Leucine-responsive regulatory protein (Lrp)

미생물은 주위환경의 변화를 끊임없이 인지하고 이에 적응하며 살아간다. ‘글로벌 조절자(Global Regulator)’로 알려진 단백질이 여러 그룹의 유전자들을 조절한다는 사실이 일반화되고 있다(1, 11). 이러한 그룹들의 유전자들은 그들의 생리적, 환경적 역할에 의하여 동정되거나 발견된 바, 온도의 변화는  $\sigma^{32}$ 를 매개로한 heat-shock 유전자의 전사를 변화시키게 되고, cyclic AMP receptor protein (Crp)는 탄수화물 분해에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다(11, 19).

Leucine-responsive regulatory protein (Lrp)은 *Escherichia coli*에서 발견된 ‘글로벌 조절자’로서 이것은 35개 혹은 그 이상의 표적 오페론의 발현을 조절하게 된다(5, 10, 14). Lrp는 약 9.3의 pI값을 갖는 염기성 단백질이며, 단량체 분자(monomeric molecule)의 크기는 약 18.8 kDa이며 10  $\mu$ M 정도 이상의 용액에서는 이량체(dimer)로 존재한다(5, 15). *E. coli*에서 Lrp에 의하여 조절되는 대부분의 표적 오페론은 아미노산의 생합성(13) 및 분해(17, 18), 혹은 아미노산의 수송에 관여하는 유전자들이다(2, 12). 또한 one carbon 대사 과정에 관여하는 반응에 관여하는 효소들을 암호화하는 유전자들의 발현 역시 Lrp에 의하여 조절되는 것으로 알려졌다(5).

Lrp는 LysR과 같은 큰 패밀리의 박테리아 조절 단백질 혹

은 CRP나 FNR (Fumarate Nitrate Reduction Regulatory Protein)과 같이 잘 알려진 조절 단백질과는 상관관계가 없을 뿐만 아니라, host-factor를 integration 시키는 DNA 결합단백질 혹은 histone-like 조절 단백질과도 상관관계를 보이지 않는다(4, 5). Lrp는 다만 asparagine synthase를 암호화하는 *asnA*의 조절 유전자인 *asnC*가 코드하는 단백질과 약 25%의 아미노산 상동성을 보였으며(5), 이는 *lrp* 유전자가 아미노산 대사과정에서 관여하기 때문인 것으로 사료된다.

종합적인 관점에서 볼 때 *lrp*는 대장균에서 매우 중요한 조절 유전자이며 이 유전자의 생리적 혹은 적용에 관한 흥미로운 관심을 갖게 한다(4, 14). 수십 개의 오페론이 Lrp에 의하여 조절될 것으로 생각되며 이들 오페론을 Lrp-regulon이라 칭하며, 글로벌 조절 메커니즘으로 작용되는 Lrp-regulon이 어떻게 환경의 주요한 변화에 대응하며 조절하게 되는지를 규명하는 것은 매우 큰 의의가 있다. 특기할 만한 것은 Lrp-regulon이 leucine에 의하여 다른 형태의 조절 양상을 보인다는 점이다(5, 7). Leucine/Lrp regulon의 가장 큰 의문점 중의 하나는 이것의 대사 작용에서의 역할에 대한 일반적인 기술이 아직까지 이루어지지 않았다는 점이며, 세포 외부의 leucine이 대장균의 대사 과정을 조절하는 지에 대한 많은 다양한 이론(7, 10)이 제시됐지만 아직 합리적인 이론이 정립되지는 않은 상태이다.

본 연구에서는 어떻게 단일 조절 단백질이 조그만 리간드

\* For correspondence. E-mail: cylee@cnu.ac.kr; Tel: +82-42-821-5482; Fax: +82-42-822-7548

(leucine)과 상호작용하여 많은 상이한 오페론들의 발현을 조절시킬 수 있으며, 어떻게 leucine이 Lrp 효과를 상쇄하게 되거나, 증가시키거나, 또는 무관할 수 있는 지에 대한 주요한 의문점을 해명하여 줄 leucine과 Lrp와의 상호작용에 관한 메커니즘 규명을 위하여 6XHis-Lrp를 코드하는 유전자 DNA를 포함하는 재조합플라스미드를 제조하여 발현시켜 단백질들을 분리·정제하고 이 단백질의 형광분광학적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

제한효소, 리가아제, kinase 등의 효소는 Amersham Bioscience (USA) 제품을 사용하였으며,  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP는 Du Pont-New England Nuclear (USA), ampicillin, kanamycin, tetracyclin 등은 Sigma (USA) 제품을 사용하였다. Oligonucleotides는 Genotech (Korea)에서 구입하였다.

### 재조합 플라스미드 제조 및 균주

pBluescript II SK<sup>-</sup> 플라스미드의 유도체인 pQE 30은 QIAGEN (USA)에서 구입하였으며 *lrp* 유전자가 삽입된 pBluescript II SK<sup>-</sup> 플라스미드에 대한 특성은 전의 논문에 기술되어 있다(16). 이들 재조합플라스미드에서 *lrp* 유전자들은 pQE 30 벡터의 multi-cloning site의 BamHI/HindIII 절단부위와 *lrp* 유전자의 open reading frame 염기서열을 확인해 고안된 프라이머 ACAATAGGATCCGCTAGATAGCAAGAAG (밑줄은 BamHI 절단부위)와 TTTGCAAAGCTTCCGTGTTAGCGCGTC (밑줄은 HindIII 절단부위)를 이용한 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 통하여 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 제한효소 BamHI and HindIII로 절단한 후 PCR product purification kit (Solgent, Korea)로 정제한 후 같은 제한효소들로 이미 절단된 pQE 30에 ligation 시켰다. Ligation 산물은 형질전환 조건에 따라 *E. coli* CV1306 (16)으로 유전자 전이되었으며 형질전환체는 100 µg/ml ampicillin을 넣은 Luria-Bertani (LB) 배양접시에서 자라는 콜로니로써 선별되었으며 이들 재조합 플라스미드들은 DNA 염기서열을 결정함으로써 확인하였다.

### 세포 배양 및 6XHis-tag *lrp* 야생형 및 돌연변이 *lrp* 유전자의 발현

*E. coli* 배양액은 100 µg/ml Amp<sup>+</sup>, 25 µg/ml Kan<sup>+</sup>, 25 µg/ml Tet<sup>+</sup>이 포함된 20 ml의 LB 배양액에 접종하여 37°C에서 밤새 자라게 하였다. 배양한 LB 배지를 1:50으로 희석시켜 1 L에 접종하여 교반 시키며 OD<sub>600nm</sub> 값이 0.6내지 0.8까지 자라게 한 후 IPTG (100 µM)를 가하여 발현을 유도한 후 5-6시간을 더 자라게 하였다. 배양세포는 15,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 수집한 후 2배 부피의 A 완충용액(50 mM sodium phosphate; pH 8.0 and 300 mM NaCl을 함유)에 현탁시킨 후 초음파로 세포를 분쇄시켰다. 각각의 용액에는 RNase A (10 µg/ml)와 DNase 1 (5 µg/ml)을 가하였으며 lysozyme과 PMSF를 각각 1 mg/ml의 농도로 넣고 30분간 얼음에 넣어둔 후,

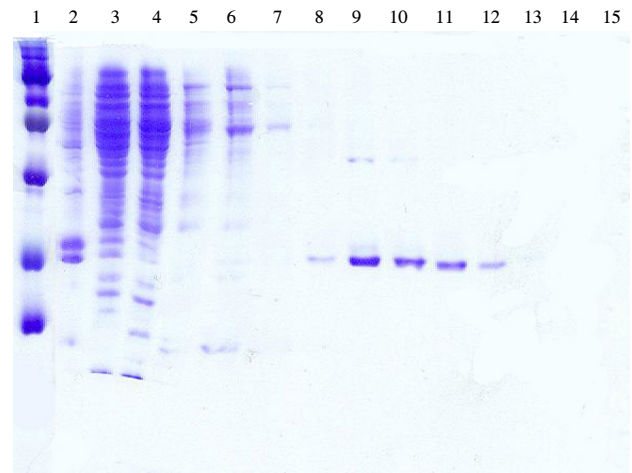
15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다.

### 6XHis-tag Lrp 야생형 및 Lrp R145W의 분리·정제

A 완충용액에 들어있는 50%의 Ni-NTA 현탁액(slurry)에 상등액을 혼합시켰다. 한 시간을 교반 시킨 후 수지(resin)를 칼럼에 넣어 준 후 280 nm의 OD값이 0.01이 될 때까지 0.5 ml/min의 속도로 세척시킨 후, B 완충용액(50 mM sodium phosphate; pH 6.0, 300 mM NaCl, and 10% glycerol)으로 280 nm의 OD값을 0.02까지 내려준 후, 0.1 M imidazole을 첨가한 B 완충용액으로 세척한 후, 0.25 M imidazole이 들어간 B 완충용액으로 용출시켰다. 각각의 분획(fraction)에 1-3 ml씩을 수집한 후, 13% acrylamide SDS-PAGE로 확인하였다 (Fig. 1). 6XHis-Lrp가 들어있는 적당한 분획을 모은 후, imidazole을 제거하기 위하여 50% glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 0.1 M NaCl이 포함된 pH 8.0 Tris-HCl에 넣어 투석시킨 후 -70°C에 보관하였다. 정제되어진 단백질의 정량은 Bradford protein assay (3) 방법에 따라 수행하였다.

### Lrp의 형광분광학적 분석

A 완충용액에 녹아있는 1 µM의 농도로 동일한 단백질을 준비하고, fluorescence spectrophotometer FS-2000 (Hitachi, Japan)을 사용하여 278 nm에서 excitation값을 고정시키고,



**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of 6XHis-Lrp wild type. The Lrp was analyzed by Coomassie blue-stained 13% acrylamide gel. Lanes: 1, protein standards (14, 21, 30, 46, 66, 97, and 220 kDa, respectively); 2, cell pellet after sonication; 3, wash with sonication buffer; 4, wash with wash buffer; 5, first elution with imidazole (0.1 M) in wash buffer 5 ml; 6, second elution with imidazole (0.1 M) in wash buffer 3 ml; 7, third elution with imidazole (0.1 M) in wash buffer 3 ml; 8, first elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 9, second elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 10, third elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 11, fourth elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 12, fifth elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 13, sixth elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 14, seventh elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml; 15, eighth elution with imidazole (0.25 M) in wash buffer 1 ml.

emission 344 nm에서의 형광값을 측정하였다.

**Gel retardation assay**

Lrp와의 결합 시험에는 *ilvIH* 프로모터에 존재하는 Lrp가 결합하는 15개의 공통 염기서열 양쪽 끝에 3개씩의 bp (base pair)를 추가시킨 21 bp (Scheme 1)의 이중가닥 DNA가 쓰였다.



**Scheme 1.** Oligonucleotide sequences for gel retardation assay. The underlined region corresponds to the 15 bp consensus sequence that was defined by comparison of the 63 sequences (9).

이중나선 가닥 DNA를 만들기 위하여 동일한 mole의 상보적 단일가닥 DNA를 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA에 넣은 후, 95°C에서 5분간 가열한 후 실온에서 천천히 냉각시켰다. Gel retardation assay를 위한 폴리아크릴아마이드 젤(5-10%; 40:1 acrylamide:bis-acrylamide; 15 cm×8 cm)은 0.25 M TBE (Tris-Borate EDTA) 완충용액에서 작동시켰다.

**결과 및 고찰**

*E. coli*의 *lrp* 유전자는 PCR에 의하여 증폭되었으며, 발현 플라스미드인 pQE 30 벡터에 *lrp* 유전자가 삽입된 pCV 294 (6XHis-Lrp 코드 유전자 삽입)와 pCV 305 (6XHis-Lrp R145W 코드 유전자 삽입)가 제조되었다. 6XHis-LRP Wt의 N-말단 아미노산 서열을 아래 Scheme 2에 나타냈다.

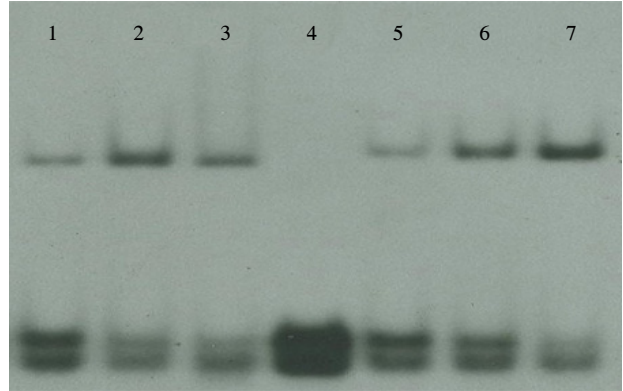
MetValAspSerLysLys-----Lrp Wt

MetArgGlySerHisHisHisHisHisHisGlySerValAspSerLysLys  
 -----6XHis Lrp Wt

**Scheme 2.** The amino terminal amino acid sequences of the wild type and 6XHis-LRP.

재조합 플라스미드 pCV294를 포함하는 CV1494 균주는 IPTG 유도에 의하여 총 단백질의 약 10% 정도의 Lrp를 생산했다. 그러나 Lrp의 대부분은 세포 파쇄후의 원심분리에 의하여 소실되는 것으로 보아 봉입 과립체(inclusion body)를 형성하는 것으로 보인다. 상당량의 Lrp는 침전물을 분쇄기(homogenizer)로 추출함으로써 회수가 가능한데, Ni-NTA affinity 크로마토그래피 후의 수분이 포함된 배양 세포 1 g당 수용성 6XHis-Lrp의 수득량은 약 10 mg 정도였다.

Lrp에는 tryptophan이 존재하지 않아 삼차원적 구조변이 연구에 쓰이는 예민한 내부의 고유 형광(intrinsic fluorescence) 측정이 야생형 Lrp에서는 불가능하다. 따라서 본 연구에서는



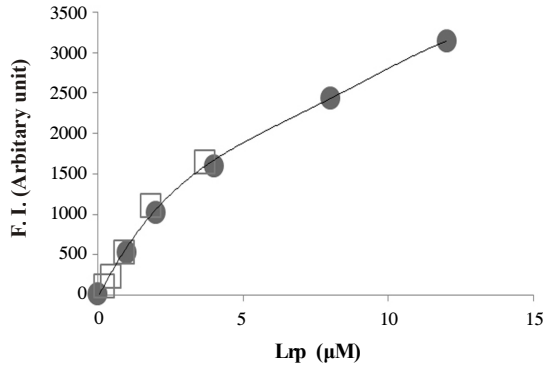
**Fig. 2.** Gel retardation assay using 21 bp DNA duplex synthesized based on consensus sequences from *ilvIH* DNA. Upper band, Lrp-DNA complex; lower band, free DNA. Lanes: 1, Lrp Wt 0.014 μM; 2, Lrp Wt 0.028 μM; 3, Lrp Wt 0.056 μM; 4, Without Lrp; 5, Lrp R145W 0.04 μM; 6, Lrp R145W 0.08 μM; 7, Lrp R145W 0.16 μM. DNA samples were labelled with [<sup>32</sup>P]ATP (3,000 Ci/mmol) and 10 U T4 polynucleotide kinase, incubated with Lrp, and fractionated by electrophoresis as previously described (18).

기존(8, 16)에 제조된 돌연변이 Lrp 중에서 leucine 결합부위에 관여하는 영역에 존재하는 arginine 145가 형광성을 지닌 tryptophan으로 바뀐 돌연변이 단백질(Lrp R145W)을 코딩하는 *lrp* 유전자를 위의 6XHis-Lrp Wt의 제조 방법과 같은 방식으로 재조합 플라스미드를 제조하여 발현시킨 후 이 단백질(6XHis-Lrp R145W)을 정제하였다.

정제된 6XHis-Lrp Wt과 6XHis-Lrp R145W와 *ilvIH* DNA와의 결합 양상을 *E. coli ilvIH* 오페론의 프로모터 상류에 존재하는 consensus 염기서열(8, 9) 15 bp를 포함하는 21 bp와 이중가닥 DNA를 이용하여 시험하였다. N-말단에 11개의 아미노산을 부착시킨 6XHis-Lrp Wt과 arginine 145가 tryptophan으로 바뀐 돌연변이 6XHis-Lrp R145W 단백질은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 거의 비슷한 정도로 DNA 결합하여 DNA-Lrp 복합체를 이루는 성질을 보였다. 이는 arginine 145가 tryptophan으로 바뀐 돌연변이 단백질도 Lrp 고유의 DNA 결합 능력을 유지하고 있음을 나타낸다.

이들 단백질의 구조변이를 탐구하기 위하여 단백질의 농도 증가에 따른 형광 변화 및 leucine의 농도를 증가시켜 형광 감소에 대한 민감도 정도를 측정하였다. 이전의 보고(6, 7)에 의하면 Lrp가 leucine에 의하여 Lrp의 자체적인 복합체 형성을 유도하며 DNA와의 결합에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어, Lrp의 고유 형광의 예민한 변화는 이 단백질의 leucine에 의하여 유도되는 구조변이 및 상호작용에 따르게 될 것이다.

형광성 아미노산인 tryptophan이 존재하지 않는 6XHis-Lrp Wt에서는 형광이 전혀 관찰되지 않았으나, Fig. 3에서 보는 바와 같이, Lrp R145W은 단백질의 농도 증가에 따라 tryptophan에 기인하는 고유 형광 광도가 증가하는 양상을 보여 주고 있다. 좀 더 세밀히 Fig. 3을 관찰해 보면 Lrp의 농도 5 μM 정도까지는 형광광도가 일직선으로 증가하는 양상을 보이다가, 그 농도 이상에서는 형광광도 세기의 증가율이 감소하는 양상

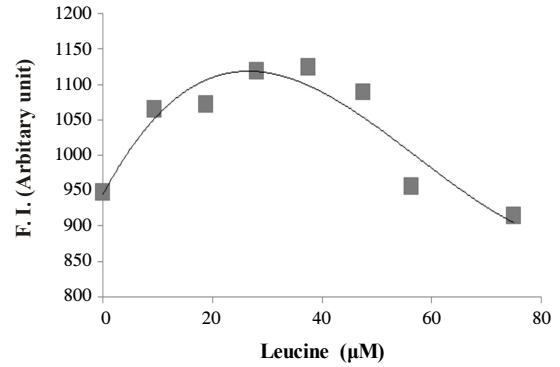


**Fig. 3.** Fluorescence intensity according to the protein concentration of Lrp R145W. Excitation, 277 nm; Emission 344 nm. The data shown in closed circles and open squares were obtained from separated experimental works performed, respectively.

을 보였다. 이는 이 단백질이 낮은 농도에서는 단량체(monomer)로 존재하고 대략 10 μM 이상에서는 이량체(dimer) 상태로 존재한다는 기존의 결과(5)와 연관지어 볼 때, 단백질의 농도가 증가함에 따라 이 단백질의 4차 구조가 변화됨에 기인하여 형광성을 띤 아미노산인 tryptophan의 형광세기가 감소하게 되는 위치 혹은 미세 환경으로 전이되었을 것으로 추정된다.

Leucine의 농도 증가에 따른 Lrp R145W의 형광의 변화 양상 조사하여 Fig. 4에 나타냈다. 기존의 연구 결과(16, 20)에 의하면 아미노산 leucine에 의하여 Lrp의 구조변이가 유도되어 DNA 결합 단백질인 Lrp의 regulatory 영역의 DNA에 결합하는 양상이 달라진다고 보고 되었는데, Fig. 4에서 보는 바와 같이 leucine의 농도가 20 μM까지는 Lrp의 형광 광도가 증가하다가 그 이상의 leucine 농도에서는 형광광도가 감소하는 결과를 얻었다. Lrp의 기능적 영역에 대한 lrp 유전자의 돌연변이에 대한 연구 결과(16)에 따르면, 아미노 말단은 DNA에 결합하는 역할을 하며, 중앙부분은 전사활성에 관련되는 영역, 카복시 말단은 leucine에 감응하는 영역으로 알려져 있다. 따라서 leucine의 Lrp R145W 단백질과의 결합에 따른 구조변이에 기인하여 카복시 말단 영역에 있는 아미노산 tryptophan의 형광성이 변화됨으로써 나타난 결과로 추리된다.

위의 실험 결과들은 이 단백질의 리간드인 아미노산 leucine 혹은 DNA와 결합함으로써 나타나는 단백질의 구조변이 가능성을 Lrp R145W 돌연변이 단백질의 tryptophan 아미노산이 갖는 내부 고유 형광광도로써 유추할 수 있는 유용성이 있음을 나타내 주며, DNA 존재할 때와 부재시 등의 Lrp R145W의 형광 광도 분석에 대한 심도 있는 연구 실험이 후속되어야 할 것이다. 요약하면 본 연구에서 6XHis-tag 시스템을 활용하여 Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) 단백질 Wt과 tryptophan이 포함되어 있는 돌연변이 단백질 Lrp R145W를 affinity chromatography로 분리·정제하였다. 이들을 형광분광광도계를 이용하여 이 돌연변이 단백질의 농도 증가에 따른 형광의 특성과 아미노산 leucine을 첨가하였을 때의 형광세기의 변화를 조사하였으며, 이들 실험 결과들은 Lrp 단백질의 구조 분석 해명에 유용하게 활용될 가능성을 보였다.



**Fig. 4.** Effect of leucine on intrinsic fluorescence intensity (F.I.) of Lrp R145W. Protein concentration, 1 μM. Excitation, 278 nm; Emission at 344 nm. The fluorescence intensities were the average values from separated two measurements.

## 적요

Leucine-responsive regulatory protein (Lrp)는 대장균 (*Escherichia coli*)에서 발견된 ‘글로벌 조절자(global regulator)’로서 Lrp-regulon이 leucine에 의하여 상이한 형태의 조절 양상을 나타낸다. 6XHis-tag 시스템으로 제조한 야생형 Lrp (Lrp Wt)와 돌연변이 Lrp (Lrp R145W) 단백질을 정제하여 그들의 생화학적 성질을 조사하였다. 이들은 gel retardation assay를 통하여 *ilv* 오페론의 프로모터 영역 consensus 염기서열인 21 bp의 이중가닥 DNA와 결합하여 복합체를 형성하는 것을 확인하였다. 형광성 아미노산인 tryptophan을 지닌 Lrp R145W는 단백질의 농도가 증가함에 따라 형광이 커졌으며, 아미노산 leucine에 의하여 형광성의 변화가 관찰되었다. 즉 1 μM의 Lrp R145W 단백질에 leucine을 첨가하여 결합시키면 약 20 μM까지는 형광이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 감소하는 양상을 얻었다. 이들 실험 결과는 leucine과 Lrp의 결합 양상 및 구조변이에 관한 심층연구에 있어서 Lrp의 고유 형광성이 요긴하게 쓰일 수 있음을 시사한다.

## 감사의 말

본 연구는 2007년도 충남대학교 연구력 강화사업의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ahdy, S. and S. Garges. 1990. Positive control. *J. Biol. Chem.* 265, 10797-10800.
- Austin, E.A., J.C. Andrews, and S.A. Short. 1989. *Mol. Genet. Bacteriophage, Abst* p. 153. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry* 72, 248-254.
- Brinkman, A.B., T.J.G. Ettema, W.M. de Vos, and J. Van der Oost. 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol.*

- Microbiol.* 48, 287-294.
5. Calvo, J.M. and R.G. Matthews. 1994. The leucine-responsive regulatory protein (Lrp), a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58, 466-490.
  6. Chen, S., Z. Hao, E. Bieniek, and J.M. Calvo. 2001. Modulation of Lrp activation in *Escherichia coli* by leucine. Effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *J. Mol. Biol.* 314, 1067-1075.
  7. Chen, S., M.H. Rosner, and J.M. Calvo. 2001. Leucine-regulated self association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 312, 625-635.
  8. Cui, Y., M.A. Midkiff, Q. Wang, and J.M. Calvo. 1996. The leucine responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. Stoichiometry and minimal requirements for binding to DNA. *J. Biol. Chem.* 271, 6611-6617.
  9. Cui, Y., Q. Wang, G.D. Stormo, and J.M. Calvo. 1995. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.* 177, 4872-4880.
  10. D'Ari, R., R.T. Lin, and E.B. Newman. 1993. The leucine responsive regulatory protein (Lrp): more than a regulator? *Trends Biochem. Sci.* 18, 260-263.
  11. Hengge-Aronis, R. 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 148-152.
  12. Hung, S.P., P. Baldi, and G.W. Hatfield. 2002. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effect of leucine-responsive regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 277, 40309-40323.
  13. Lin, R.T., R. D'Ari, and E.B. Newman. 1990. The leucine regulon of *E. coli* K-12: a mutation in *rblA* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* 172, 4529-4535.
  14. Newman, E.B., R. D'Ari, and R. Lin. 1992. The leucine-Lrp regulon in *Escherichia coli*: A global response in search of a raison d'être. *Cell* 68, 617-619.
  15. Newman, E.B. and R. Lin. 1995. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulatory gene expression in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 747-775.
  16. Platko, J.V. and J.M. Calvo. 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J. Bacteriol.* 175, 1110-1117.
  17. Platko, J.V., D.A. Willins, and J.M. Calvo. 1990. The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *J. Bacteriol.* 172, 4563-4570.
  18. Rica, E., D.A. Aker, and J.M. Calvo. 1989. A protein that binds to the regulatory region of the *ilvIH* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 1658-1664.
  19. Tani, T.H., A. Khodursky, R.M. Blumenthal, P.O. Brown, and R.G. Matthews. 2002. Adaption to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13471-13476.
  20. Willins, D.A., C.W. Ryan, J.V. Platko, and J.M. Calvo. 1991. Characterization of Lrp, and *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J. Biol. Chem.* 266, 10768-10774.