

Kinetic Characterization of an Iron-sulfur Containing Enzyme, L-serine Dehydratase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Yu Jeong Han and Ki Seog Lee*

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

Received October 23, 2017 / Revised January 3, 2018 / Accepted January 3, 2018

L-Serine dehydratase (LSD) is an iron-sulfur containing enzyme that catalyzes the conversion of L-serine to pyruvate and ammonia. Among the bacterial amino acid dehydratases, it appears that only the L-serine specific enzymes utilize an iron-sulfur cluster at their catalytic site. Moreover, bacterial LSDs are classified into four types based on structural characteristics and domain arrangement. To date, only the LSD enzymes from a few bacterial strains have been studied, but more detailed investigations are required to understand the catalytic mechanism of various bacterial LSDs. In this study, LSD type II from *Mycobacterium tuberculosis* (MtLSD) H37Rv was expressed and purified to elucidate the biochemical and catalytic properties using the enzyme kinetic method. The L-serine saturation curve of MtLSD exhibited a typically sigmoid character, indicating an allosteric cooperativity. The values of K_m and k_{cat} were estimated to be 59.35 ± 1.23 mM and 18.12 ± 0.20 s⁻¹, respectively. Moreover, the plot of initial velocity versus D-serine concentration at fixed L-serine concentrations showed a non-linear hyperbola decay shape and exhibited a competitive inhibition for D-serine with an apparent K_i value of 30.46 ± 5.93 mM and with no change in the k_{cat} value. These results provide insightful biochemical information regarding the catalytic properties and the substrate specificity of MtLSD.

Key words : Allosteric cooperativity, iron-sulfur cluster, L-serine dehydratase (LSD), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, substrate specificity

서 론

아미노산의 한 종류인 L-serine은 여러 경로에 관여하는 대사물질로써 세포 내로 들어오게 되면 단백질 합성과 메틸화 반응 등 많은 활동의 중심이 되는 1-탄소 대사과정에서 전구체 역할을 한다[4, 19]. 또한, L-cysteine 및 L-glycine과 같은 아미노산의 합성에도 관여하여 질소 원료로서 작용하며[8, 9], 인지질의 막 구성요소에 주요한 성분인 포스파티딜세린 합성의 전구체로써도 작용하고 있다[2, 18]. 많은 세균에서, L-serine의 합성은 인산화 경로의 결합으로 인하여 영양 요구의 결과를 초래하지만 반면에, 높은 농도의 L-serine은 세포독성을 나타내기도 하며[16], 아울러 peptidoglycan (PG)층의 합성에 문제를 야기시켜 비정상적인 PG층 합성을 유발하게 된다[3, 23]. 따라서, 세포내의 L-serine 농도를 일정하게 유지할 수 있는 조절작용이 요구된다.

세포내 L-serine농도의 일정한 유지를 위하여, L-serine dehydratase (LSD) (EC 4.3.1.17)는 탈아미노화 작용을 통해 피루

브산과 암모니아로의 전환을 촉매하는 작용에 관여하고 있다 [6]. 진핵세포에서의 LSD는 prosthetic group으로 pyridoxal 5'-phosphate (PLP)를 포함하고 있으며, gluconeogenesis 및 citric acid cycle에 피루브산을 제공함으로써 대사작용에 관여하는 반면에, 최초로 세균에서 발견된 *Peptococcus asaccharolyticus* LSD는 PLP를 대신하여 활성부위에 iron-sulfur (Fe-S) cluster가 그 역할을 대신하고 있다[10, 12, 15]. 최근 연구에 따르면, LSD는 세포 내에서 isoleucine 및 방향족 아미노산(aromatic amino acid) 생합성의 억제로 인하여 초래되는 세균성 세린 독성(bacterial serine toxicity)으로부터 스스로를 보호하는 자가-방어(auto-defense) 기전에 관여한다는 것이 보고되었다[16]. 또한, *Escherichia coli* K-12에서 LSD의 결손을 유발하여 실험한 결과, 세포벽 합성의 저해, 세포 분열 및 성장에 영향을 준다는 것이 보고된 바 있다[22, 23]. 따라서, 이와 같은 세균성 LSD의 촉매기전에 대한 연구는 새로운 항생제 개발을 위한 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

세균성 LSD는 각 도메인의 구조적 특성 및 배열에 따라 4가지 형태로 구분 된다[21]. LSD-I은 가장 보편적으로 잘 알려진 효소로써 α -와 β -subunit이 각각 분리된 polypeptide chain을 형성하며, 두 subunit에 의해 형성된 heterodimer로 존재한다[21]. α -Subunit에 해당하는 도메인에는 prosthetic group으로써 Fe-S cluster를 포함하고 있으며, LSD의 촉매활성 기능을 유도하는 데 기여하고 있다. 반면, β -subunit에 해당하는 도메인은 N-말단에 알로스테릭 기질결합(allosteric substrate

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-0566, Fax : +82-51-510-0568

E-mail : kslee@cup.ac.kr

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.

binding, ASB) 도메인과 C-말단에 ACT 도메인으로 구성되어 있다[17]. ASB 도메인은 *Mycobacterium*의 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase의 ASB 도메인과 유사한 기능을 한다고 알려져 있다[5, 11]. LSD-II~IV는 α/β -도메인으로 구성된 단일 polypeptide chain으로 구성되어 있으며, homodimer형태로 존재한다[7, 21]. 그 중에서 LSD-II는 β -subunit에 ASB-ACT 배열을 갖지 않는 유일한 형태이며, 다른 형태의 LSD와 달리 LSD-II에서의 ACT 도메인의 결손이 효소 촉매작용에 영향을 미칠 것인가에 대한 연구에 초점을 맞추고 있다.

현재까지, *E. coli*와 *Legionella pneumophila*로부터 유래된 LSD-II에 대한 생화학적 연구 결과[14, 20]가 보고되었지만, LSD-II의 도메인 특성을 고려한 촉매기전을 규명하기 위하여 여러 균종 간의 비교를 통한 더 많은 추가적인 연구가 요구된다. 따라서, 본 연구에서는 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv로부터 유래된 LSD-II (MtLSD, SdaA) 단백질을 분리·정제하고, 효소활성 측정을 통한 효소동력학적 변수를 분석하여 생화학적 촉매 특성을 규명하고자 한다. 이는 향후 균종 간 또는 도메인 형태별 LSD의 촉매기전에 대한 비교 분석에 중요한 자료로 활용될 것이다.

재료 및 방법

유전자 클로닝 및 단백질의 발현

L-serine dehydratase (LSD)를 암호화 하고 있는 *sdaA* 유전자(Genebank accession No. NC_000962.3)는 Table 1에 나타난 primer를 사용하여 *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA로부터 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 유전자를 증폭하였다. 증폭을 위한 primer는 vector로의 삽입을 위하여 제한효소인 *Nde*I과 *Hind*III site를 첨가하여 디자인하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA 절편과 발현 vector인 pET-28a를 제한효소를 사용하여 절단하였다. 재조합 plasmid의 제작을 위해 절단된 각각의 DNA 절편과 pET-28a vector는 T4-DNA ligase를 이용하여 연결하였다. 완성된 재조합 plasmid는 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환 한 후, 50 μ g/ml의 kanamycin이 첨가된 Luria-Bertani 배지에 접종하여 37°C에서 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양하였다. 단백질의 대량 발현을 위하여 0.5 mM의 isopropyl D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 18°C에서 16시간 이상 배양한 후, 4°C 조건 하에 5,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상청액을 분리하였다.

단백질의 정제

세포 pellet은 lysis 완충액(20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 500 mM KCl, 5 mM β -mercaptoethanol (β ME), 5% glycerol, 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride)를 사용하여 부유한 후, 초음파분쇄기를 사용하여 4°C 조건하에서 분쇄하였다. Crude lysate는 25,000×g에서 20분 동안 4°C로 유지된 상태로 원심분리 하였다. 상청액은 완충액 A (20 mM potassium phosphate pH 7.5, 500 mM KCl, 5 mM β ME, 5% glycerol)로 pre-equilibration되어있는 Ni²⁺-chelated HiTrap chelating HP 컬럼(GE Healthcare, USA)에 흘려 보냈다. 컬럼에 결합된 단백질은 농도구배(gradient)를 위한 완충액 B (20 mM potassium phosphate pH 7.5, 500 mM KCl, and 5 mM BME, 5% glycerol, 500 mM imidazole)를 사용하여 용출하였다. 최종 정제된 단백질의 농도는 Bradford 분석을 사용하여 추정하였다.

효소활성 측정

MtLSD의 효소활성 측정은 탈아미노기 반응으로 생성된 2-ketoacid와 2,4-dinitro-phenylhydrazine (2,4-DNPH)가 결합하여 발색되는 높은 알칼리 조건보다 낮은 산성의 조건하에서 반응시켜 hydrazone을 얻은 후에, 최종 알칼리 조건하에서 퀴노이드형의 hydrazine (적갈색)으로 변환시켜 발색된 정색 반응을 피루브산 표준액의 정색과 대비하여 촉매 활성도를 측정하였다[13]. 효소활성 반응은 최종 반응 혼합액의 양이 1 ml가 되도록, 반응 완충액(20 mM potassium phosphate pH 7.5, 5 mM dithiothreitol)에 기질인 L-serine을 다양한 농도(10~200 mM)로 첨가한 후, 30°C에서 5분간 전처리과정을 진행하였다. 이후, 반응혼합액에 MtLSD를 최종 농도가 1 μ g/ml (2.65×10⁻⁵ mM)이 되도록 넣어 반응을 개시하였다. 30°C에서 15분간 반응한 후, 효소반응을 종료를 위해 1.26 mM 2,4-DNPH를 1 ml 첨가하여 30°C에서 15분간 반응을 시켰다. 이후 1.5 M NaOH를 1 ml 첨가하여 실온에서 5분 방치하였다. 피루브산과 반응하여 생성된 퀴노이드형 hydrazine은 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 모든 실험은 3번 이상 반복 측정하였다.

온도 및 pH 변화에 따른 MtLSD의 효소 활성 변화를 알아 보기 위하여, 20~35°C의 온도 범위와 pH 6.5~8.0 범위에서 각각 효소 활성을 측정하였다. 이전의 연구[6]에서 보고된 바와 같이, LSD의 촉매 활성에 억제 현상을 일으키는 tris, tricine, glycine, barbital, borate, MES 등과 같은 완충액을 배제하기 위하여 potassium phosphate 완충액을 사용하였다. 또한, po-

Table 1. Primers used for the amplification of target gene

	Primers sequence	Restriction site
MtLSD_forward	5'-ATA <u>CAT ATG</u> ACC ATC AGC GTC TTC GAC CTG-3'	<i>Nde</i> I
MtLSD_reverse	5'-ATA <u>AAG CTT</u> TCA ACA CTC GAC GAT GTT GAC-3'	<i>Hind</i> III

tassium phosphate 완충액의 허용 pH 범위 내에서 측정하기 위하여 상기와 같은 pH 범위를 설정하였다. 반응 완충액에 80 mM L-serine을 기질로 사용하였으며, 각 온도 및 pH 조건의 변화 외에는 앞서 기술한 효소 활성 측정방법과 동일한 조건하에서 실시하였다.

D-Serine에 의한 억제반응 측정

MtLSD의 기질 L-serine에 대한 K_m 값을 고려하여, L-serine의 농도를 각각 40, 60, 80, 120 mM로 고정된 조건하에서 D-serine의 농도 범위를 20~200 mM로 변화하여 효소 활성을 측정하였다. 반응 완충액에 고정된 농도의 L-serine과 다양한 농도 범위의 D-serine을 혼합하여 30°C에서 5분간 pre-incubation한 후, 효소의 최종 농도가 1 ug/ml이 되도록 혼합액에 첨가하여 효소 반응을 개시하였으며, 30°C에서 15분간 반응하였다. 각 조건에 따른 효소 반응은 1.26 mM 2,4-DNPH를 첨가하면서 종료되었으며, 30°C에서 15분간 반응을 시킨 후, 1.5 M NaOH를 1 ml 첨가하여 실온에서 5분 방치하였다. 피루브산과 반응하여 생성된 퀴노이드형 hydrazine은 515 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 모든 실험은 3번 이상 반복 측정하였다. 효소 동력학적 변수는 SigmaPlot v10.0과 Prism 7 프로그램을 이용하여 계산하였다.

효소동력학적 분석

L-Serine 농도에 대비한 MtLSD의 효소 활성 그래프는 반응의 협동성(cooperativity)을 접목한 Michaelis-Menten 식으로 보정하기 위하여 다음과 같은 식을 이용하였다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{K_m^h + [S]^h} \tag{1}$$

여기에서, V 는 주어진 기질농도에서의 속도를 나타내며, $[S]$ 는 기질농도, V_{max} 는 최대속도, K_m 은 Michaelis 상수, h 는 Hill coefficient를 나타낸다. 속도상수인 k_{cat} 값은 최대속도 (V_{max})를 초기의 효소농도(E_T)로 나누어 계산하였다.

D-Serine 의한 MtLSD의 효소 활성 억제 반응은 각각의 K_m 값에 해당하는 L-serine의 기질 농도를 고정하여 측정하였으며, 다음의 식에 나타난 바와 같이 hyperbolic decay 식을 이용하였다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot K_i}{K_i + [S]} \tag{2}$$

여기에서, K_i 는 효소 반응에 대한 억제 상수를 나타낸다. 상기의 모든 그래프는 SigmaPlot v10.0을 이용하여 작성되었으며, 각 상수의 값은 Prism 7을 이용하여 재확인하였다.

결과 및 고찰

온도 및 pH의 변화에 따른 MtLSD의 효소활성

MtLSD 효소 활성의 최적 조건을 알아보기 위하여 다양한

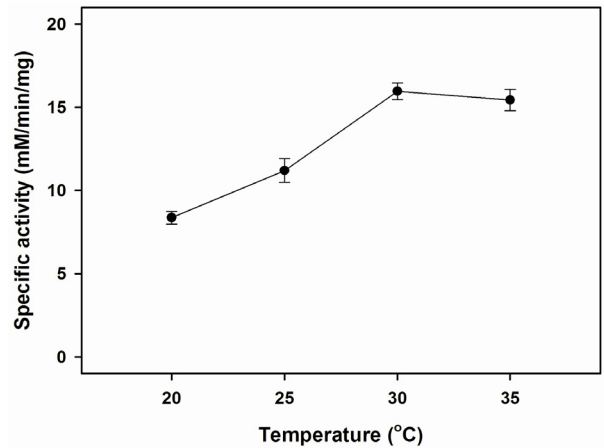


Fig. 1. Effect of temperature on the catalytic activity of MtLSD. The activity of enzyme was measured on various temperature conditions (20~35°C). The reaction was performed by adding 1 ug/ml MtLSD and 80 mM L-serine as a substrate in the reaction mixture containing 20 mM photassium phosphate buffer, pH 7.5, 5 mM DTT.

온도 및 pH 변화에 따른 특이 활성도(specific activity)를 측정 한 결과, Fig. 1에서 보인 바와 같이, 최적 온도로써 30°C에서 가장 높은 활성을 보였다. 낮은 온도 범위의 20°C와 25°C에서는 두드러진 활성도 차이를 보였으나, 35°C의 조건에서는 최적 온도에서와 유사한 촉매활성을 나타내었다. 또한, 효소 활성에 억제 반응을 보이지 않는 potassium phosphate 완충액을 선택하여 pH 6.5~8.0까지의 범위에서 촉매 활성도를 비교하였을 때, MtLSD는 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 그 외의 pH 조건에서는 최적 pH에서의 활성과 큰 차이를 보여 주었다(Fig. 2). 이는 다른 LSD-II 효소에서 나타난 효소

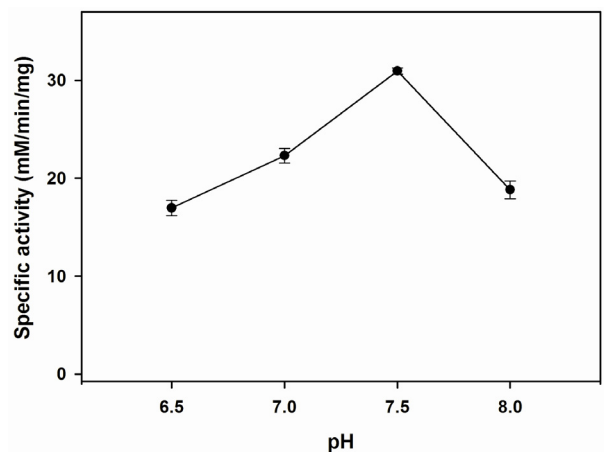


Fig. 2. Effect of pH on the catalytic activity of MtLSD. The activity of enzyme was measured on various pH conditions (pH 6.5~8.0). The reaction was performed by adding 1 ug/ml MtLSD and 80 mM L-serine as a substrate in the reaction mixture containing 20 mM photassium phosphate buffer, pH 6.5-8.0, 5 mM DTT.

Table 2. Kinetic parameters of MtLSD

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	K_i (mM)	R^2
L-serine (SigmaPlot 10.0)	59.35 ± 1.23	18.12 ± 0.20	$3.05 \pm 0.02 \times 10^2$		0.999
L-serine (Prism 7)	59.15 ± 1.28	18.09 ± 0.24	$3.06 \pm 0.02 \times 10^2$		0.999
D-serine* (Prism 7)		18.88 ± 3.61		30.46 ± 5.93	0.988

* The value of K_i was calculated with based on the value of $1K_m$ for L-serine.

활성 최적 조건인 pH 7.0~8.0의 약알칼리 범위와 30~35°C의 온도 범위와 유사함을 알 수 있었다.

MtLSD의 효소 동력학적 변수 분석

MtLSD의 L-serine 농도 의존성에 대한 기질 포화곡선은 "S"자 모양의 sigmoid 형태를 보여주었으며, 식(1)에 잘 맞추어졌다(Fig. 3). 이때의 효소 동력학적 변수(kinetic parameters)는 각각 K_m 값이 59.35 ± 1.23 mM과 k_{cat} 값이 18.12 ± 0.20 s^{-1} 로 계산되었으며, 전체 효소반응에 대한 촉매효율(catalytic coefficient) 상수인 k_{cat}/K_m 은 $3.05 \pm 0.02 \times 10^2$ $M^{-1}s^{-1}$ 을 나타내었다(Table 2). 기질농도에 대한 sigmoid 형태의 포화곡선을 직선형태의 이중역비례선(double reciprocal plot)을 이용하여 도식하였을 때, 그래프는 직선에 일치하지 않는 포물선(parabola)의 형태를 보여주었다(Fig. 4A). 하지만, 높은 기질농도(80~200 mM) 범위로부터 얻어진 데이터를 이용하여 Lineweaver-Burk plot에 의해 도식하였을 때는 직선형의 그래프를 얻을 수 있었다(Fig. 4B). 이때, L-serine에 대한 동력학적 변수인 K_m 과 k_{cat} 값은 각각 66.10 ± 29.03 mM과 24.11 ± 3.59 s^{-1} 로 계산되었으며, 식(1)에 의한 sigmoid형 포화곡선으로부터 계산되어진 변수의 값들과 유사한 경향성을 나타내었다.

LSD-II는 다른 세균성 LSD와 달리, β -subunit에 ACT 도메

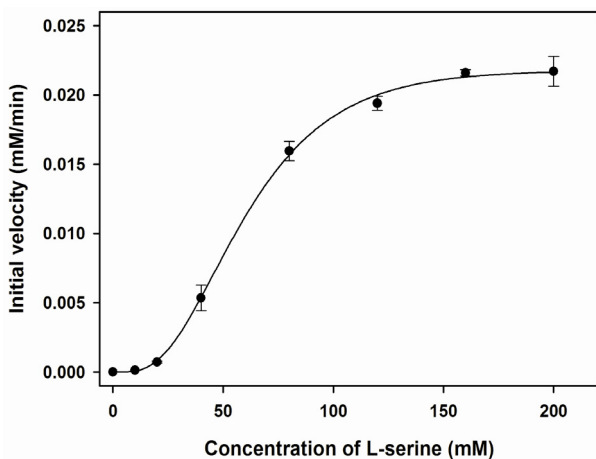


Fig. 3. Saturation curve for L-serine. The initial velocities of MtLSD were plotted as a function of L-serine concentration (10-200 mM). The sigmoidal substrate-velocity curve was fitted using the data with Eq. (1). The activity assays were carried out as previously described on Material & method.

인이 없이 ASB 도메인만으로 구성된 독특한 형태의 dimer 구조를 보여주고 있다. 또한, 도메인명에서 나타낸 바와 같이, 알로스테릭 기질결합(allosteric substrate binding) 도메인으로서 기능적 역할을 담당하고 있다[21]. MtLSD에 대한 기질 L-serine의 포화곡선은 일반적인 Michaelis-Menten식을 따르지 않고, sigmoid 형태의 알로스테릭 협동성(allosteric cooperativity)을 보여주었으며, 이는 다른 세균성 LSD-I과 II 모두에서 보인 특성과 유사하였다[1].

또한, 이들 LSD 효소에서 공통적으로 제기되는 의문점 중에 하나인 L-serine에 대한 높은 K_m 값은 세포 내에 적정 농도

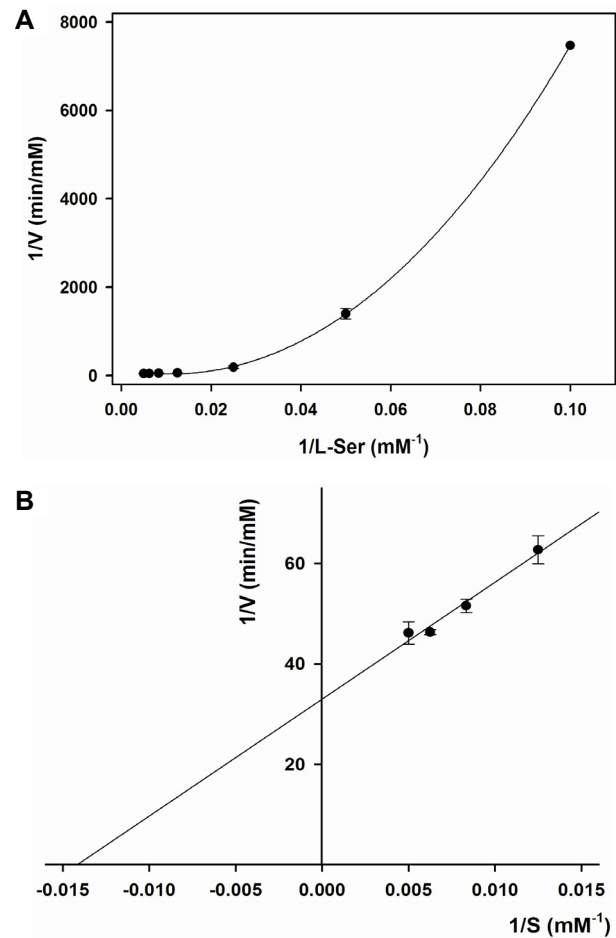


Fig. 4. A double-reciprocal plots. (A) A double reciprocal plot of the data from the sigmoidal substrate-velocity plot. (B) A double reciprocal plot of the data obtained at high substrate concentrations (80-200 mM of L-serine).

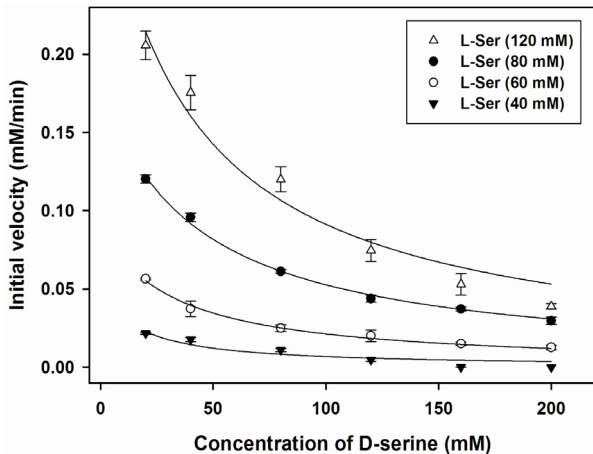


Fig. 5. Inhibition kinetics of MtLSD with D-serine. The initial velocities of MtLSD were plotted as a function of inhibitor concentration at fixed substrate concentrations. Non-linear hyperbolic decay curve was fitted using the data with Eq. (2). The activity assays were carried out as previously described on Material & method.

의 L-serine을 유지함으로써, L-serine의 부족으로 인한 대사 작용의 부재를 방지하고, 아울러 세포성 독소로서의 작용이나 세포벽 합성을 방해하지 않을 정도로만 유지하기 위함일 것으로 이해되고 있다[7]. 본 실험에서 얻어진 MtLSD의 L-serine에 대한 높은 K_m 값은 다른 LSD-II 효소들과 비교하였을 때, 대략 10~30배 정도의 높은 값을 나타내었다. 이는 앞서 기술한 바와 같이 동일한 측면에서 이해될 수 있으나, 다른 한편으로는 일반 세균과 *Mycobacterium* 균종간의 대사과정 및 세포벽 합성과 같은 생리적 기전의 차이에서 보여질 수 있는 L-serine의 항상성 조절의 차이에서 초래되었음을 암시한다.

D-Serine에 의한 촉매 억제반응

일반적인 LSD의 효소활성에서 요구되는 기질의 형태가 아미노산이기 때문에, MtLSD의 기질인 L-serine과 구조적 입체 이성질체인 D-serine을 대상으로 기질 또는 억제제로써 작용되어질 것인가를 알아보기 위해 효소 활성을 측정하였다. 앞선 실험에서 얻어진, MtLSD의 기질인 L-serine에 대한 K_m 값을 고려하여, L-serine의 농도를 각각 40, 60, 80, 120 mM로 고정시킨 후, D-serine의 농도 변화에 따른 촉매활성 변화를 측정하였다.

Fig. 5에서 보인 바와 같이, 다양한 L-serine 농도로 고정된 조건하에서 D-serine에 대한 포화곡선은 식(2)에 맞는 hyperbolic decay 형태를 보여 주었다. 이때의 D-serine에 의한 효소 반응 억제상수인 K_i 값은 L-serine에 대한 $1K_m$ 을 기준으로 하였을 때, 30.46 ± 5.93 mM를 나타내었고, 속도상수인 k_{cat} 값은 18.88 ± 3.61 s^{-1} 로 계산되었다(Table 2). 기질 L-serine에 대한 MtLSD의 효소 동력학적 변수와 D-serine에 의한 억제 반응으로부터 얻어진 변수 값을 비교하였을 때, 속도 상수인 k_{cat} 값의

변화는 없었으며, 단지 K_i 값에 의한 K_m 값의 변화를 초래하게 됨으로써 D-serine은 MtLSD의 촉매반응에서 경쟁적 억제제로써 작용한다는 것을 암시한다. 또한, D-serine에 대한 MtLSD의 효소활성 억제상수인 K_i 값은 *L. pneumophila* [20]로부터 유래된 LSD-II에서 보인 D-serine에 대한 K_i 값보다 대략 4배 정도의 높은 값을 나타내었다. 하지만, 이는 기질로써 L-serine에 대한 MtLSD의 K_m 값에서 큰 차이를 보인 것과는 달리, 억제제로써 D-serine에 대한 경쟁적 억제반응은 이들 두 균주 간에 유사한 경향성을 보여준다는 것을 인지할 수 있었다.

본 연구는 *M. tuberculosis* H37Rv로부터 유래된 LSD-II를 대상으로 효소 동력학적 변수의 분석을 통해 생화학적 촉매 특성을 비교 분석하였다. 향후, 분자수준에서의 촉매기전을 명확히 규명하기 위해, MtLSD의 3차원 입체구조 결정 및 활성부위 잔기의 돌연변이를 통한 좀 더 자세한 연구가 남아있지만, 본 연구를 통해 얻어진 결과들은 세균성 LSD의 촉매 기전을 활용한 새로운 접근방법의 항생제 개발에 중요한 기초 자료로 활용되어질 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구의 재조합 LSD단백질 제작에 필요한 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv의 genomic DNA를 제공해 주신, 부산가톨릭대학교 진현우 교수님과 김성현 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

References

- Alföldi, L., Raskó, I. and Kerekes, E. 1968. L-serine deaminase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **96**, 1512-1518.
- Bae-Lee, M. S. and Carman, G. M. 1984. Phosphatidylserine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of membrane-associated phosphatidylserine synthase. *J. Biol. Chem.* **259**, 10857-10862.
- Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S. and Blanot, D. 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 168-207.
- Blakley, R. L. 1969. *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Burton, R. L., Chen, S., Xu, X. L. and Grant, G. A. 2009. Role of the anion-binding site in catalysis and regulation of *Mycobacterium tuberculosis* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemistry* **48**, 4808-4815.
- Carter, J. E. and Sagers, R. D. 1972. Ferrous ion-dependent L-serine dehydratase from *Clostridium acidurici*. *J. Bacteriol.* **109**, 757-763.
- Chen, S., Xu, X. L. and Grant, G. A. 2012. Allosteric activation and contrasting properties of L-serine dehydratase types 1 and 2. *Biochemistry* **51**, 5320-5328.

8. Cherest, H. and Surdin-Kerjan, Y. 1992. Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics* **130**, 51-58.
9. Cherest, H., Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. 1993. Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through the transsulfuration pathway which has been built up by enzyme recruitment. *J. Bacteriol.* **175**, 5366-5374.
10. Cicchillo, R. M., Baker, M. A., Schnitzer, E. J., Newman, E. B., Krebs, C. and Booker, S. J. 2004. *Escherichia coli* L-serine deaminase requires a [4Fe-4S] cluster in catalysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 32418-32425.
12. Dey, S., Grant, G. A. and Sacchettini, J. C. 2005. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase: extreme asymmetry in a tetramer of identical subunits. *J. Biol. Chem.* **280**, 14892-14899.
12. Flint, D. H. and Allen, R. M. 1996. Iron-sulfur proteins with non-redox functions. *Chem. Rev.* **96**, 2315-2334.
13. Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. 1943. Pyruvic acid II. The determination of keto acids in blood and urine. *J. Biol. Chem.* **147**, 415-442.
14. Grabowski, R. and Buckel, W. 1991. Purification and properties of an iron-sulfur-containing and pyridoxal-phosphate independent L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *Eur. J. Biochem.* **199**, 89-94.
15. Grabowski, R., Hofmeister, A. E. and Buckel, W. 1993. Bacterial L-serine dehydratases: A new family of enzymes containing iron-sulfur clusters. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 297-300.
16. Hama, H., Katahira, T., Tsuda, M. and Tsuchiya, T. 1991. Inhibition of homoserine dehydrogenase I by L-serine in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **109**, 604-608.
17. Hofmeister, A. E., Albracht, S. P. and Buckel, W. 1994. Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. *FEBS Lett.* **351**, 416-418.
18. Kanfer, J. and Kennedy, E. P. 1964. Metabolism and function of bacterial lipids. II. biosynthesis of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**, 1720-1726.
19. Ramos, F. and Wiame, J. M. 1982. Occurrence of a catabolic L-serine (L-threonine) deaminase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **123**, 571-576.
20. Thoden, J. B., Holden, H. M. and Grant, G. A. 2014. Structure of L-serine dehydratase from *Legionella pneumophila*: Novel use of the C-terminal cysteine as an intrinsic competitive inhibitor. *Biochemistry* **53**, 7615-7624.
21. Xu, X. L. and Grant, G. A. 2013. Identification and characterization of two new types of bacterial L-serine dehydratases and assessment of the function of the ACT domain. *Arch. Biochem. Biophys.* **540**, 62-69.
22. Zhang, X. and Newman, E. 2008. Deficiency in L-serine deaminase results in abnormal growth and cell division of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **69**, 870-881.
23. Zhang, X., El-Hajj, Z. W. and Newman, E. 2010. Deficiency in L-serine deaminase interferes with one-carbon metabolism and cell wall synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **192**, 5515-5525.

초록 : *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv로부터 유래된 철-황 함유 효소인 L-세린 탈수화효소의 동력학적 특성

한유정 · 이기석*

(부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과)

L-세린 탈수화효소(LSD)는 L-serine을 피루브산과 암모니아로 전환하는 반응을 촉매하는 iron-sulfur 함유 효소이다. 세균성 아미노산 탈수화 효소 중에서, L-serine에 대한 이들 특정 효소만이 촉매 부위에서 iron-sulfur cluster를 이용하는 것으로 보고되고 있다. 또한, 세균성 LSD는 구조적 특성과 도메인의 배열에 따라 네 가지 유형으로 분류된다. 현재까지, 이 효소들은 소수의 균주로부터 얻어진 LSD 효소에 대해서만 연구되었지만, 다양한 세균성 LSD의 촉매 메커니즘을 이해하기 위해서는 더 많은 자세한 조사가 요구된다. 본 연구에서, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv로부터 유래된 유형 II LSD (MtLSD) 단백질을 효소 동력학적 방법을 이용하여 생화학적 및 촉매적 특성을 규명하기 위해 발현 및 정제되었다. MtLSD에 대한 L-serine의 포화 곡선은 알로스테릭 협동성(allosteric cooperativity)을 나타내는 전형적인 S자형(sigmoid)의 특성을 보였다. 이때의 K_m 과 k_{cat} 값은 각각 59.35 ± 1.23 mM과 18.12 ± 0.20 s⁻¹로 계산되었다. 또한, 고정된 L-serine 농도 하에서 D-serine의 농도 대비 초속도에 대한 그래프는 비선형 쌍곡선 감소 형태를 보였고, k_{cat} 값의 변화 없이 30.46 ± 5.93 mM의 겉보기 K_i 값으로 D-serine에 대한 경쟁적 억제(competitive inhibition)를 나타내었다. 이들 연구는 MtLSD의 촉매 특성 및 기질 특이성에 관한 통찰력 있는 생화학적 정보를 제공한다.