

## Branched Chain 아미노산과 대사산물들이 *Serratia marcescens* ATCC 25419 Acetolactate Synthase의 생합성에 미치는 영향

최병범 · 김승수\*

연세대학교 이과대학 생화학과

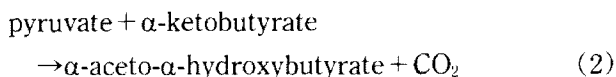
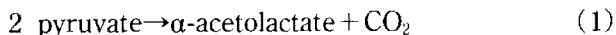
### The Effects of Branched Chain Amino Acids and Small Metabolites on the Biosynthesis of Acetolactate Synthase in *Serratia marcescens* ATCC 25419

Choi, Byung-Bum and Soung-Soo Kim\*

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

**Abstract** — The effects of branched chain amino acids and small metabolites in growth media on the biosynthesis of *Serratia marcescens* ATCC 25419 acetolactate synthase (ALS) were examined. ALS activity was gradually decreased by isoleucine or leucine among the range from 1 mM to 20 mM, while the activity was increased 40% by isoleucine under low concentration (0.5 mM). ALS activity was also increased about 40% by valine among 2 to 4 mM ranges, but the activity was decreased only 10% at 20 mM. ALS activity was decreased 25% and 70% by the simultaneous addition of all three branched chain amino acids at 2 mM and 10 mM, respectively. Among several small metabolites tested, ALS activity was increased about 2-fold by cAMP at 2 mM. These data suggest that *Serratia marcescens* ALS is multivalently repressed by branched chain amino acids, but not repressed by valine alone.

세균, 효모, 식물 등에서 광범위하게 발견되는 acetolactate synthase(ALS : ES 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). Enterobacteria에서는 ALS I, II, III라 불리는 세 종류의 ALS isozyme들이 발견되었으며 이들 ALS isozyme들의 발현에 관한 연구는 주로 *Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에서 수행되었다. 즉, ALS I(*ilv* BN) 유전자의 발현은 valine과 leucine에 의한 bivalent repression에 의해 조절되며 이러한 repression은 attenuation에 기인하는 것으로 밝혀졌다(3-6). 또한 다른 isozyme과는 달리 cAMP에 의해 transcription이 촉진된다(7, 8). ALS II(*ilv* GM)의 발현은 isoleucine, leucine

**Key words:** Acetolactate synthase, branched chain amino acid, *Serratia marcescens*

\*Corresponding author

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; TPP, thiamine pyrophosphate; FAD, flavin adenine dinucleotide; AMP, adenosine 5'-monophosphate; cAMP, adenosine 3':5'-cyclic monophosphate; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside

그리고 valine 등의 아미노산이 모두 존재해야만 억제되며, ALS III(*ilv IH*)의 발현은 leucine에 의해서만 억제된다(9, 10). 따라서 isoleucine과 valine의 생합성에서 *E. coli* K-12와 *S. typhimurium*의 *ilv* gene은 세 branched chain 아미노산에 의해 multivalent repression과 derepression의 조절을 받는다(11). Kishimi 등은 *E. coli*와 *S. typhimurium*에서와 마찬가지로 *S. marcescens*에서도 모두 세 branched chain 아미노산에 의해 *ilv* operon이 multivalent control을 받는다고 보고한 바 있다(16).

*E. coli*와 *S. typhimurium*에서는 적어도 2가지의 ALS isozyme들이 발현되는데 *E. coli* K-12의 경우 ALS I, III는 합성하지만 ALS II는 만들지 못하며 *S. typhimurium* LT-2의 경우 ALS I, II만을 합성한다고 보고되었다(12). ALS I과 III는 valine에 대해 sensitive하지만 ALS II는 valine에 대해 insensitive하다고 보고되었다(1). 한편, *Serratia marcescens* ATCC 25419의 경우에도 최근에 두 isozyme(ALS I과 II)이 분리되었는데 ALS I은 valine에 대해 sensitive하고  $\alpha$ -ketobutyrate에 대해 insensitive한 반면 ALS II는 valine에 대해 insensitive하고  $\alpha$ -ketobutyrate에 대해 sensitive한 것으로 나타났다(13, 14). 따라서 이들 두 형태의 ALS는 기능이 다른 isozyme으로 ALS I은 valine 생합성 경로에 참여하고 ALS II는 isoleucine 생합성 경로에 참여할 것으로 추측된다.

본 연구에서는 *Serratia marcescens* ALS의 유전자 발현에 관한 기초정보를 얻기 위하여 최소배지에 첨가한 branched chain 아미노산과 대사산물들이 *Serratia marcescens* ALS의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 배양

*Serratia marcescens* ATCC 25419는 Louisiana State University의 Braymer 교수로부터 분양받아 사용하였다. 사면 배지에 보존된 균주의 종균은 121°C에서 15분 동안 멸균한 Brain heart infusion(BHI) 배지 10 ml에 소량 접종한 다음 하룻밤 동안 배양하였다. 이 종균 모액을 최소 배지 30 ml가 들어있는 100 ml 삼각 플라스크에 1 ml씩 넣어 37°C에서 18시간 동안 진탕배양하였다. 최소 배지는 citrate를 빼고 0.5

%(w/v) glucose를 가해서 변형된 Davis-Mingioli 최소 배지를 사용하였다(15, 16). 배지의 구성성분은 0.5% glucose, 51 mM  $K_2HPO_4$ , 22 mM  $KH_2PO_4$ (pH 7.0), 8 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.4 mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 이었다.

### 시약

Potassium phosphate, TPP, FAD, pyruvic acid, creatine, DTT, valine, leucine, isoleucine,  $\alpha$ -ketobutyrate 등은 Sigma사 제품을 사용하였고  $\alpha$ -naphthol은 Hayashi사 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 밖에 사용한 시약은 일급 내지 특급제품을 사용하였다.

### 세포 추출물의 제조

배양물을 10,000×g로 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 세포를 수확한 후 수확한 세포를 2~3배(w/v)의 sonication buffer(50 mM potassium phosphate(pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT)에 하룻밤 동안 현탁시켰다. 이 용액을 초음파 파쇄기를 이용하여 약 1분 동안 세포를 파쇄한 다음 다시 10,000×g로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하여 효소 활성도 측정에 사용하였다.

### Acetolactate synthase의 활성도 측정

ALS의 활성도는 반응생성물인 acetolactate가 decarboxylation되어 생성되는 acetoin의 양을 McEwen과 Silverman 방법에 따라 측정하였다(17). Eppendorf tube에 assay buffer(0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.0), 1 mM  $MgCl_2$ , 20 mM pyruvic acid, 0.1 mM TPP, 0.1 mM FAD)와 효소 용액을 첨가하여 전체 반응액 부피를 1 ml가 되게 하여 37°C에서 30분 동안 pre-incubation하였다. 이 반응액에 50%(v/v)  $H_2SO_4$  용액 5  $\mu$ l를 넣어 반응을 중지시킨 다음, 200  $\mu$ l의 0.5%(w/v) creatine 용액과 200  $\mu$ l의 2.5 N NaOH 용액에 녹아 있는 5%(w/v)  $\alpha$ -naphthol 용액을 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시켜 발색시킨 후 상층액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Acetolactate synthase의 1 unit는 37°C에서 1분간 1  $\mu$ mole의 acetoin을 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의했고, 비활성도는 unit/mg protein으로 표시했다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 이용하여 Lowry 방법을 사용했다(18).

### 효소활성에 미치는 여러 아미노산들의 영향

최소 배지에 각각 다른 농도의 isoleucine과 valine 및 leucine을 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕 배양한 후 효소활성도를 측정하였다. 한편 branched chain 아미노산들과 다른 아미노산들의 영향을 비교하기 위해서는 최소 배지에 각각 10 mM의 branched chain 아미노산과 threonine, serine, histidine, methionine 및 arginine을 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕배양한 후 효소활성도를 비교하였다.

### Isoleucine, valine, leucine의 동시첨가가 효소활성에 미치는 영향

Isoleucine과 valine, valine과 leucine, isoleucine과 leucine 그리고 세 아미노산을 함께 2 mM, 10 mM의 농도로 최소 배지에 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕배양한 후 효소활성도를 측정하였다.

### 여러 metabolite들의 첨가가 효소활성에 미치는 영향

최소 배지에 각각 1 mM의 imidazole, homoserine,  $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -ketobutyrate, pyruvate 또는 2 mM의  $\alpha$ -aminobutyrate, glyoxylate, AMP, cAMP, IPTG를 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕배양한 후 효소활성도를 측정하였다. cAMP의 영향을 좀더 자세히 살펴보기 위한 실험에서 여러 농도의 cAMP를 가한 다음 37°C에서 9시간 동안 진탕배양한 후 효소활성도를 측정하였다.

## 결 과

### 여러 아미노산들이 효소활성에 미치는 영향

ALS 생합성에 대한 아미노산의 영향을 알아보고자 branched chain 아미노산들과 threonine, serine, histidine, methionine 및 arginine 등을 사용하였다. Threonine은 isoleucine 생합성의 전구체이며 대사분해물질인  $\alpha$ -ketobutyrate 또한 isoleucine의 생합성에 사용된다. Serine의 대사분해물질인 pyruvate는 valine 생합성의 전구체이고 histidine과 arginine은 분해되어  $\alpha$ -ketoglutarate를 생성하며 methionine은 homoserine을 통해 threonine을 생성하는 경로의 전구체이다. 최소 배지에 10 mM의 여러 아미노산을 첨가한 후 세포 추출물의 ALS의 비활성도를 조사한

Table 1. The effects of various amino acids in growth media on the specific activity of ALS.

Addition to minimal medium (mM)	Specific activity of ALS (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.016±0.001	100
Ile(10)	0.008±0.001	50
Val(10)	0.016±0.001	100
Leu(10)	0.010±0.001	60
Thr(10)	0.008±0.001	50
Ser(10)	0.017±0.002	106
His(10)	0.017±0.001	106
Met(10)	0.009±0.001	55
Arg(10)	0.009±0.001	55

Experiments were carried out in modified Davis-Mingoli medium (16) supplemented with each of amino acids.

The concentration of each amino acid added to the medium was 10 mM. Values are mean± range of variation for three experiments.

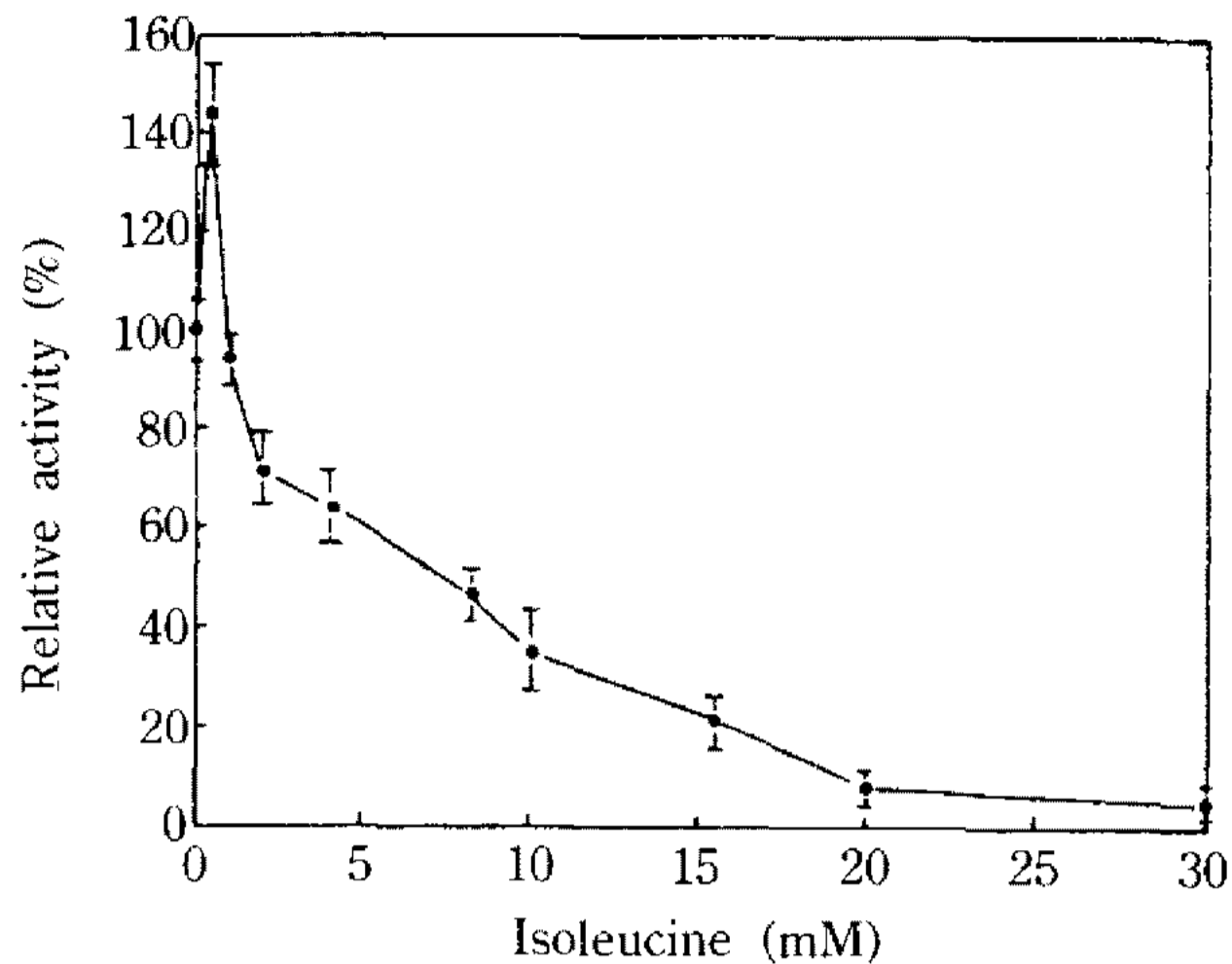
결과는 Table 1에서 나타난 바와 같이 10 mM의 isoleucine 또는 threonine을 최소 배지에 첨가했을 경우 효소의 비활성도를 대조군보다 각각 50% 감소시켰으며 leucine, methionine 또는 arginine은 대조군보다 효소의 비활성도를 45~40% 감소시켰다. 그러나 10 mM의 valine, serine 또는 histidine을 첨가했을 경우 효소의 비활성도에 별 영향을 주지 못하였다.

### 여러 농도의 isoleucine, valine, leucine이 효소활성에 미치는 영향

ALS의 최종산물인 branched chain 아미노산들이 ALS의 생합성에 미치는 영향을 여러 농도에서 조사한 결과 isoleucine은 효소의 비활성도를 0.5 mM에서 40% 증가시킨 반면 8 mM에서 60%, 20 mM에서 90% 감소시켰다(Fig. 1). Valine은 2~4 mM에서 효소의 비활성도를 20~40% 정도 증가시킨 반면 20 mM에서 10% 정도 감소시켰다(Fig. 2). Leucine은 효소의 비활성도를 4~8 mM에서 40% 정도, 20 mM에서 80% 감소시키는 등 확실한 감소 양상을 보여주었다(Fig. 3).

### Isoleucine, valine, leucine의 동시 첨가가 효소활성에 미치는 영향

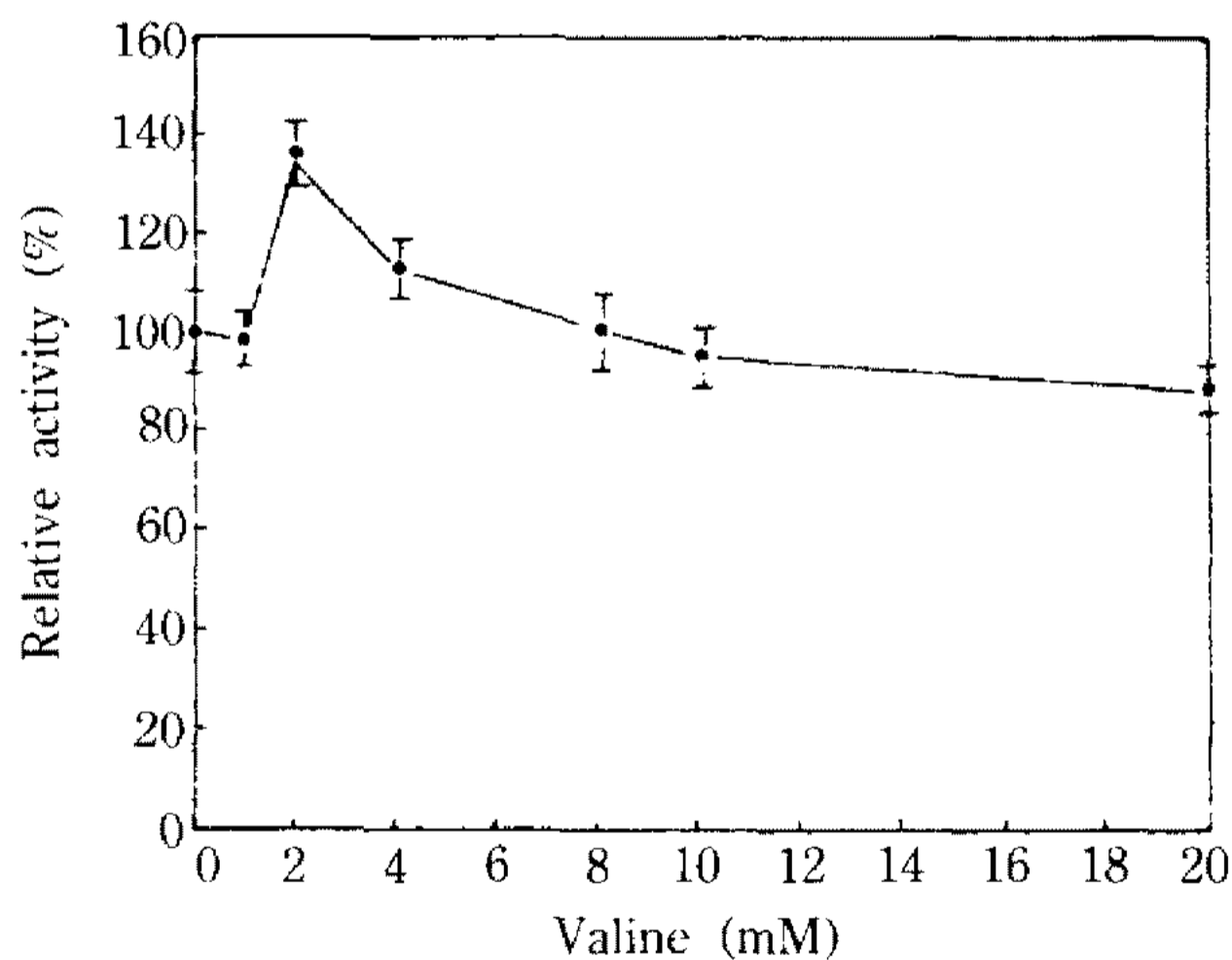
최소 배지에 2 mM, 10 mM의 isoleucine, valine



**Fig. 1. Effect of varying concentrations of isoleucine in growth media on the specific activity of acetolactate synthase.**

Cells were grown aerobically for 9 hr at 37°C in modified Davis-Mingioli medium. Crude extracts for enzyme assay were prepared by sonication of the harvested cells as described in Materials and Methods. Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of isoleucine.

Values are mean  $\pm$  range of variation for three experiments.

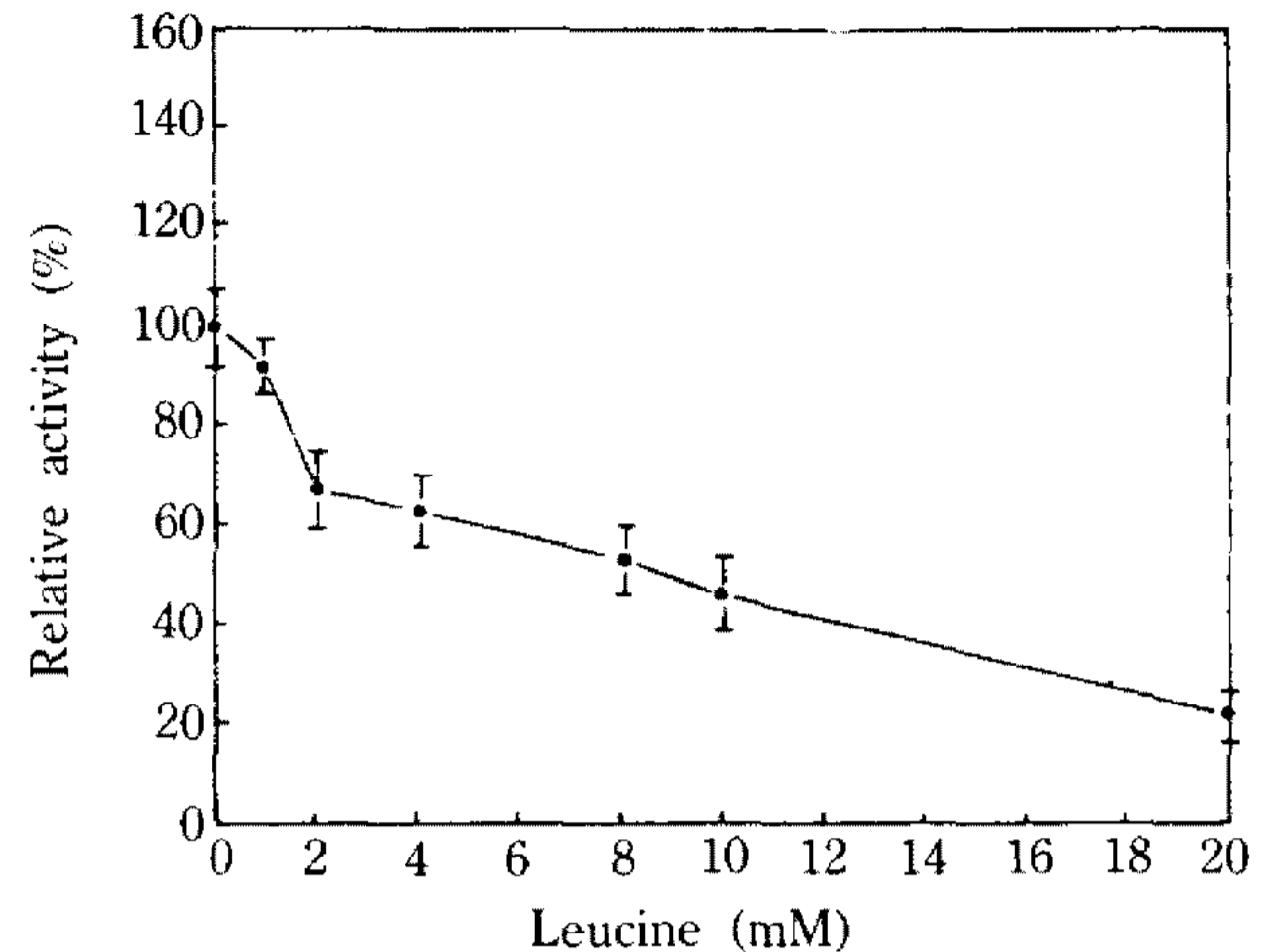


**Fig. 2. Effect of varying concentrations of valine in growth media on the specific activity of acetolactate synthase.**

Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of valine.

Values are mean  $\pm$  range of variation for three experiments.

또는 leucine을 combination으로 동시 첨가한 실험에서 valine과 leucine을 각각 2 mM씩 동시 첨가했을 경우 대조군보다 효소의 비활성도를 13% 증가시켰고, isoleucine과 valine, isoleucine과 leucine을 각각 2



**Fig. 3. Effect of varying concentrations of leucine in growth media on the specific activity of acetolactate synthase.**

Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of leucine.

Values are mean  $\pm$  range of variation for three experiments.

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

Addition to minimal medium (mM)	Specific activity of ALS (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.016 $\pm$ 0.002	100
Ile(2) + Val(2)	0.017 $\pm$ 0.002	106
Val(2) + Leu(2)	0.018 $\pm$ 0.001	113
Ile(2) + Leu(2)	0.016 $\pm$ 0.002	100
Ile(2) + Val(2) + Leu(2)	0.012 $\pm$ 0.001	75
None	0.018 $\pm$ 0.002	100
Ile(10) + Val(10)	0.012 $\pm$ 0.002	75
Val(10) + Leu(10)	0.012 $\pm$ 0.002	75
Ile(10) + Leu(10)	0.010 $\pm$ 0.002	56
Ile(10) + Val(10) + Leu(10)	0.005 $\pm$ 0.001	28

Experiments were carried out in modified Davis-Mingioli medium supplemented with combination of branched chain amino acids.

The concentrations of each amino acid added to the medium were 2 mM and 10 mM. Values are mean  $\pm$  range of variation for three experiments.

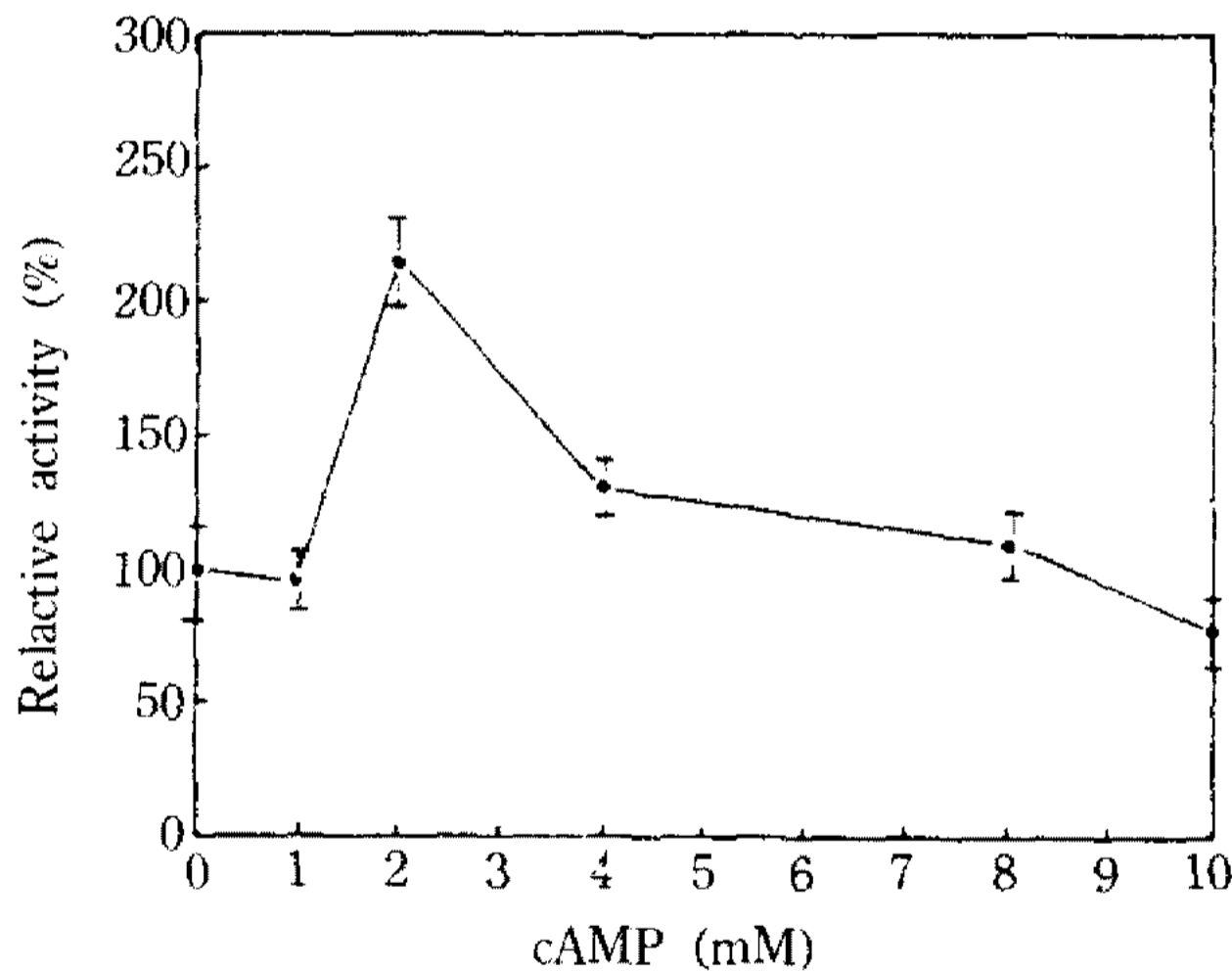
mM씩 동시 첨가했을 경우 대조군과 별 차이가 없었으나, 세 아미노산을 각각 2 mM씩 동시 첨가했을 경우에는 효소의 비활성도를 25% 감소시켰다(Table 2). 한편 isoleucine과 valine, valine과 leucine, isoleucine과 valine, isoleucine과 leucine을 각각 10



**Table 3. The effects of several metabolites in growth media on the specific activity of ALS**

Addition to minimal medium (mM)	Specific activity of ALS (units/mg)	Relative activity (%)
None	0.017 ± 0.002	100
Imidazole(1)	0.009 ± 0.001	50
Homoserine(1)	0.015 ± 0.002	86
α-Ketoglutarate(1)	0.014 ± 0.001	82
α-Ketobutyrate(1)	0.009 ± 0.002	54
α-Aminobutyrate(2)	0.010 ± 0.002	60
Pyruvate(1)	0.008 ± 0.001	46
Glyoxylate(2)	0.012 ± 0.002	74
AMP(2)	0.015 ± 0.001	89
cAMP(2)	0.037 ± 0.003	215
IPTG(2)	0.012 ± 0.001	80

Experiments were carried out in modified Davis-Mingoli medium supplemented with each of metabolites. The concentration of each metabolite added to the medium was 1 mM or 2 mM. Values are mean ± range of variation for three experiments.



**Fig. 4. Effect of varying concentrations of cAMP in growth media on the specific activity of acetolactate synthase.**

Activities were expressed relative to the specific activities in the absence of cAMP.

Values are mean ± range of variation for three experiments.

mM씩 동시 첨가했을 경우에는 효소의 비활성도를 각각 25%, 25%, 44%, 72%씩 감소시켰다(Table 2).

**여러 metabolite들이 효소활성에 미치는 영향**

Table 3에서 나타난 것처럼 조사한 metabolite들 중에서 cAMP는 2 mM에서 효소의 비활성도를 115%

증가시켰다. Histidine의 전구체인 imidazole은 ALS의 비활성도를 대조군보다 50% 감소시켰고, serine의 대사분해물질이며 valine 생합성의 전구체인 pyruvate는 효소의 비활성도를 56% 감소시켰다. Methionine에서 시작해서 threonine을 생성하는 경로의 중간물질인 homoserine은 ALS의 비활성도를 14% 감소시켰고 threonine의 대사분해물질이며 isoleucine 생합성의 전구체인 α-ketobutyrate와 histidine과 arginine의 대사분해물질인 α-ketoglutarate 또한 효소의 비활성도를 각각 46%, 18%씩 감소시켰다. cAMP 농도를 세분해서 최소 배지에 첨가했을 경우 2 mM에서 가장 큰 효소의 비활성도 증가를 야기시켰으며 10 mM에서는 효소의 비활성도를 40% 감소시켰다(Fig. 4).

**고찰**

*E. coli* K-12에서 *ilv B* gene(ALSI 또는 AHAS I)의 regulation은 catabolite repression과 관련이 있다고 보고되었으며(19, 20) attenuation에 의한 negative control(21)과 cAMP-CRP(3) 등 여러 factor들에 의한 positive control(22, 23)을 포함하여 복잡하게 이루어진다고 알려졌다. *Serratia marcescens* ALS와 threonine deaminase(Choi and Kim : unpublished data)가 세 branched chain 아미노산이 동시에 배지에 존재할 때 비활성도가 감소되는 것으로 보아 *S. marcescens ilv* gene도 세 branched chain 아미노산에 의해 multivalent repression을 받는 것으로 나타났다. *E. coli* K-12의 경우 valine의 낮은 농도(0.4 mM)에서 ALS의 비활성도가 절반 정도 감소한다고 보고되었다(11). 그러나 *S. marcescens* ATCC 25419의 경우 isoleucine 또는 valine의 낮은 농도에서 ALS의 비활성도가 증가한 반면 높은 농도에서는 ALS의 비활성도가 감소하는 것으로 보아 isoleucine 또는 valine의 농도에 따라 ALS의 생합성이 조절되는 것으로 나타났다. 한편, leucine의 경우에는 효소의 비활성도가 모든 leucine의 농도에서 억제되는 현상을 보였다. 조사한 여러 metabolite들 중에서 cAMP가 2 mM 농도에서 2배 정도 효소의 비활성도를 증가시키는 것으로 보아 *S. marcescens* ATCC 25419의 경우에도 cAMP가 *ilv* gene에서 positive effector로 작용한다고 생각된다. 이상과 같은 결과들을 종합해 보면 *S. marcescens* ALS는 *E. coli*와 *S. typhimurium*(24)에서처럼 비교적

높은 농도(8 mM 이상)의 isoleucine, valine 그리고 leucine에 의해 multivalent regulation과 cAMP에 의한 positive control을 받지만, 비교적 낮은 농도의 isoleucine(0.5 mM)과 valine(2~4 mM)에 의해서는 ALS의 생합성이 증가되는 것으로 나타났다.

## 요 약

최소 배지에 여러 아미노산들을 첨가하여 배양한 *Serratia marcescens* ATCC 25419 세포 추출물에서 acetolactate synthase(ALS)의 비활성도를 조사한 결과 isoleucine은 효소의 비활성도를 0.5 mM에서 40% 증가시킨 반면 8 mM에서 60%, 20 mM에서 90% 감소시켰다. Valine은 효소의 비활성도를 2~4 mM에서 20~40% 정도 증가시켰고 20 mM의 높은 농도에서 10% 정도 감소시켰다. 한편, leucine은 효소의 비활성도를 4~8 mM에서 40% 정도, 20 mM에서 80% 감소시켰다. 여러 metabolite들이 효소의 비활성도에 미치는 영향을 조사한 결과, 1 mM의 pyruvate, imidazole, 그리고  $\alpha$ -ketobutyrate와 2 mM의  $\alpha$ -aminobutyrate와 glyoxylate 등은 효소의 비활성도를 54~26% 정도 감시킨 반면 2 mM의 cAMP는 효소의 비활성도를 115% 증가시켰다.

## 감사의 글

본 연구는 89년도 과학재단 목적 기초 연구비 지원에 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. 1965. Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. II. Identification of two operator genes. *J. Bacteriol.* **89**: 654-660.
3. Friden, P., J. Newman and M. Freundlich. 1982. Nucleotide sequence of the *ilvB* promoter-regulatory region: a biosynthetic operon controlled by attenuation and cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6156-6160.
4. Nargang, F.E., C.S. Subrahmanyam and H.E. Umbarger. 1980. Nucleotide sequence of *ilvGEDA* operon attenuator region of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1823-1827.
5. Hauser, C.A., J.A. Sharp, L.K. Hatfield and G.W. Hatfield. 1985. Pausing of RNA polymerase during *in vitro* transcription through the *ilvB* and *ilvGEDA* attenuator regions of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **260**: 1765-1770.
6. Hauser, C.A. and G.W. Hatfield. 1984. Attenuation of the *ilvB* operon by amino acids reflecting substrates or products of the *ilvB* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 76-79.
7. Sutton, A. and M. Freundlich. 1980. Regulation by cyclic AMP of the *ilvB*-encoded biosynthetic acetohydroxy acid synthase in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 179-183.
8. Friden, P., P. Tsui, K. Okamoto and M. Freundlich. 1984. Interaction of cyclic AMP receptor protein with the *ilvB* biosynthetic operon in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8145-8160.
9. Defelice, M. and M. Lenvinthal. 1977. The acetohydroxy acid synthase III isozyme of *Escherichia coli* K-12: Regulation of synthesis by leucine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**: 82-87.
10. Squires, C.H., M. Defelices, S.R. Wesseler and J. M. Calvo. 1981. Physical characterization of the *ilvHI* operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **147**: 797-804.
11. Dwyer, S.B. and H.E. Umbarger. 1968. Isoleucine and valine metabolism of *Escherichia coli*. XIV. Pattern of multivalent repression in strain K-12. *J. Bacteriol.* **95**: 1680-1684.
12. Squires, C.H., M. DeFelice, C.T. Lago and J.M. Calvo. 1983. *ilvHI* locus of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **154**: 1054-1061.
13. Yang, J.H. and S.S. Kim. 1992. Separation and some properties of two forms of acetolactate synthase from *Serratia marcescens*. *Korean Biochem. J.* **25**, 1, in press.
14. Kim, J.T. and S.S. Kim. 1992. The properties of Acetolactate synthase isozyme produced by *Serratia marcescens* ATCC 25419. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1, in press.
15. Davis, B.D. and E.S. Mingioli. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B<sub>12</sub>. *J. Bacteriol.* **60**: 17-28.
16. Kisumi, M., S. Komatsubara, M. Sugiura and I. Chibata. 1971. Multivalent repression and genetic depression of isoleucine-valine biosynthetic enzyme in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **107**: 824-827.
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. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  19. Sutton, A., T. Newman, J. McEwen, P.M. Silverman and M. Freundlich. 1982. Mutations in genes *cpxA* and *cpxB* of *Escherichia coli* K-12 cause a defect in acetohydroxyacid synthase I function *in vivo*. *J. Bacteriol.* **151**: 976-982.
  20. Whitlow, K.J. and W.J. Polglase. 1974. Relaxation of catabolite repression and loss of valine sensitivity in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **43**: 64-66.
  21. Hauser, C.A. and G.W. Hatfield. 1983. Nucleotide sequence of the *ilvB* multivalent attenuator region of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **11**: 127-134.
  22. Friden, P., K. Voelkel, R. Sternglanz and M. Freundlich. 1984. Reduced expression of the isoleucine and valine enzymes in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **172**: 573-579.
  23. Williams, A.L. 1986. Regulation of acetohydroxy and synthase activities in *Escherichia coli* K-12 by small metabolites. *Biochem. Biophys. Acta.* **866**: 15-18.
  24. Calvo, J.M., M. Freundlich and H.E. Umbarger. 1969. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: Isolation of regulatory mutants. *J. Bacteriol.* **97**: 1272-1282.

(Received December 24, 1991)