

대장균의 동역학 네트워크 모델을 이용한 L-threonine 생합성에 관한 모사 연구

정의섭 · 이진원[†]

서강대학교 화공생명공학과
121-742 서울시 마포구 신수동 1
(2006년 1월 12일 접수, 2006년 2월 3일 채택)

Simulation Study of Dynamic Network Model for L-Threonine Biosynthesis in *Escherichia coli*

Uisub Jung and Jinwon Lee[†]

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University,
1, Sinsu-dong, Mapo-gu, Seoul 121-742, Korea
(Received 12 January 2006; accepted 3 February 2006)

요 약

본 연구에서는 대장균 내에서 L-threonine의 생합성에 영향을 미치는 저해제들에 대한 모사 연구를 위하여 L-aspartate에서 L-threonine까지의 아미노산 생합성 대사 네트워크를 문헌 및 데이터베이스를 통해 구축하였다. 또한 L-threonine 생합성에 영향을 미치는 저해제들을 수학적으로 모델링하여 효소 반응식에 적용시켰다. 모사 연구를 위해 초기 농도 값을 L-aspartate 5 mM, ATP 5 mM, NADPH 2 mM으로 설정하고 저해제의 농도 변화에 따른 세포내 대사 물질들의 농도변화를 확인하였다. 그 결과 저해제 L-lysine, L-methionine, L-glutamate는 저해제 농도 변화에 따라 대사 물질들의 농도 변화가 없었다. 그러나 저해제 L-serine, L-cysteine 그리고 L-threonine의 경우 저해제의 농도 변화에 따라 세포내 대사물질들의 농도 곡선이 서로 다른 결과를 얻었다. 대장균 내에서 소비되어진 L-aspartate의 농도는 세포 내 생성되는 L-threonine과는 관련이 없었고, 생성되는 L-threonine의 농도는 세포 내에 축적된 D,L-aspartic β-semialdehyde에 반비례하였다.

Abstract – In order to investigate the effect of inhibitors on L-threonine biosynthesis in *Escherichia coli*, we have constructed a metabolic network model of amino acid biosynthesis from L-aspartate to L-threonine by using available informations from literatures and databases. In the model, the effects of inhibitors on the biosynthesis of L-threonine was included as an appropriate mathematical form. For simulation study, we used initial values as L-aspartate 5 mM, ATP 5 mM, NADPH 2 mM, and observed the concentration changes of intermediate metabolites over concentration changes of respective inhibitors. As a result, we found that concentrations of intermediate metabolites were not significantly changed over concentration changes of L-lysine, L-methionine, and L-glutamate. But, there were considerable changes of intermediates over concentration changes of L-serine, L-cysteine, and L-threonine, which can be considered as essential effectors on L-threonine synthesis. Contrary, the synthesis of L-threonine seems to be not related to the amounts of L-aspartate, and inversely proportional to the accumulated amount of D,L-aspartic β-semialdehyde.

Key words: L-Threonine Synthesis, Metabolic Modeling, *Escherichia coli*, *in silico* Simulation, Metabolic Inhibitors

1. 서 론

미생물 내에서 합성되는 아미노산 중에서 대표적으로 TCA cycle 내 대사 물질인 L-oxaloacetate를 전구체로 하여 만들어지는 아미노산은 L-threonine, L-lysine, L-methionine, L-isoleucine이 있다[1]. 그 중 L-threonine은 화학식이 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 으로 영양

상 필수 아미노산 중의 하나이며 분자 내에 2개의 비대칭 탄소원자를 가지므로 4개의 광학이성질체(L-threonine, D-threonine, L-allo-threonine, D-allo-threonine)가 있으며 천연에 존재하는 것은 L-threonine이다. 단백질을 구성하는 아미노산으로 널리 분포하지만 동물성 단백질에는 많고 식물성 단백질에는 적다. 곡류에 함유되는 L-threonine은 그 함량은 낮지 않지만 동물에 의해서 이용되기 어려운 것으로 알려지고 있다. 또한 L-threonine은 다른 아미노산보다도 결핍증이 생기기 쉬운 아미노산이다[2].

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jinwonlee@sogang.ac.kr

효모·세균에서는 L-aspartate에서 L-homoserine을 거쳐거나 L-glycine에 threonine aldolase 효소가 작용하여 합성된다. L-threonine의 생리적 기능은 지방산을 방지하며, 교원질, 탄성소(Elastin) 그리고 에나멜 단백질의 주요 성분이다. 또한 면역 체계에 관여하는 것으로 알려져 있으며 L-threonine의 심각한 결핍 시 신경기능 장애를 유발하고 소아의 성장 발육, 성인의 질소대사와 평형에 필수적인 아미노산으로 알려져 있다[1, 2].

이에 본 연구에서는 이렇게 중요한 L-threonine을 생합성하는 동역학 네트워크 모델을 구축하여 L-threonine 생합성에 관여하는 저해제들을 수학적 모델링에 적용시킨 후 대장균 내에서의 L-threonine 생합성을 컴퓨터상에서 모사(simulation) 프로그램을 이용하여 대사물질들이 시간대별로 농도가 어떻게 변하는지 모사 분석을 하고 대장균이 L-threonine을 생산하는 데에 관련된 저해제 중 어떠한 저해제가 큰 영향을 미치는지에 대해 목표로 삼았다.

목적 균주의 선정은 현재까지 대사 네트워크 연구가 가장 많이 연구되어진 대장균으로 삼았고 L-threonine의 대사 경로는 앞서 말한 두 가지 경로 중 L-aspartate에서 L-homoserine을 거치는 대사 과정을 선택하였다[3-5]. 대장균에서의 L-threonine 생합성 네트워크에 관한 대사 정보는 다른 연구팀에서 연구되어진 문헌자료와 대사 경로 및 관련 효소 정보는 웹상에서 제공하고 있는 BioCyc, KEGG, EMT project 및 BRENDA의 자료를 바탕으로 하여 L-aspartate를 시작점으로 하여 L-threonine까지의 5단계의 대사 경로를 구축하였다[6-8]. 또한 L-threonine 생합성에 관여하는 여섯 개의 효소에 영향을 미치는 조효소(cofactor), 금속이온(metal ion), 저해제(inhibitor), 활성제(activating compound)들을 조사하여 L-threonine 생합성 네트워크에 적용시켰다[9].

특이한 점은 대장균의 L-threonine 생합성 첫 단계인 L-aspartate에서 β -aspartyl phosphate로 대사될 때 효소 복합체(enzyme complex)가 작용하여 aspartokinase I와 aspartokinase III 두 효소가 작용한다는 것이다. 이 효소들은 각각 양론식(stoichiometry)은 같지만 서로 영향을 미치는 저해제가 서로 다른 것으로 조사되었다. Aspartokinase I의 경우엔 최종 생성물인 L-threonine이 저해하며 aspartokinase III의 경우엔 L-lysine과 L-glutamate가 저해제 역할을 한다.

2. 본 론

2-1. L-threonine 생합성 네트워크 구축

본 연구팀에서는 미생물 내 전체 아미노산 생합성 과정을 조사하고 그 중에 산업적으로 유용하게 사용되는 L-threonine의 합성 경로를 이용하여 Fig. 1과 같이 L-aspartate에서 L-threonine까지의 대사 네트워크를 구축하였다[3-5]. 총 여섯 개의 관련 대사 물질 및 효소를 찾아냈으며 효소 저해제도 Fig. 1에 표시하였다. L-threonine 생합성 관련 효소 중 저해제의 영향을 가장 많이 받는 효소는 homoserine kinase(EC 2.7.1.39)로 다섯 개의 저해제에 대해 영향을 받는다. 또한 하나의 저해제는 하나의 효소만을 저해하지 않고 두 개 이상의 효소를 저해하며(L-serine은 제외) L-threonine은 세 가지의 효소에 대해서 저해제 역할을 하는 것으로 나타났다.

2-2. L-threonine 생합성 네트워크에 대한 양론식 구성

본 연구를 통해 구축한 대장균의 L-threonine 생합성 네트워크를 이용하여 양론식(stoichiometry)을 구성하였다(Table 1). L-aspartate에서 L-threonine으로 생합성되는 반응은 총 다섯 단계로 구분할 수 있으며 실제로 작용하는 효소는 반응 첫 단계에서 효소 복합체로 작용하는 aspartokinase I, III에 의해 총 여섯 개의 효소반응으로 구성되어 있다[7]. 또한 5단계의 반응 중 앞선 세 반응은 가역반응(reversible reaction)이고 뒤의 나머지 두 반응은 비가역반응(irreversible reaction)이다. 여기서 AK I/III와 HSK 효소에서 소모된 한 개의 phosphate는 ASADH와 TS 효소에서 생성된다.

Table 1. Stoichiometric equations for L-threonine biosynthesis metabolic network

Enzyme	Stoichiometry
AK I/III	$ASP + ATP \leftrightarrow ASPP + ADP$
ASADH	$ASPP + NADPH \leftrightarrow ASPSA + NADP^+ + P_i$
HDH	$ASPSA + NAD(P)H \leftrightarrow HSER + NAD(P)^+$
HSK	$HSER + ATP \rightarrow PHSER + ADP$
TS	$PHSER + H_2O \rightarrow THR + P_i$

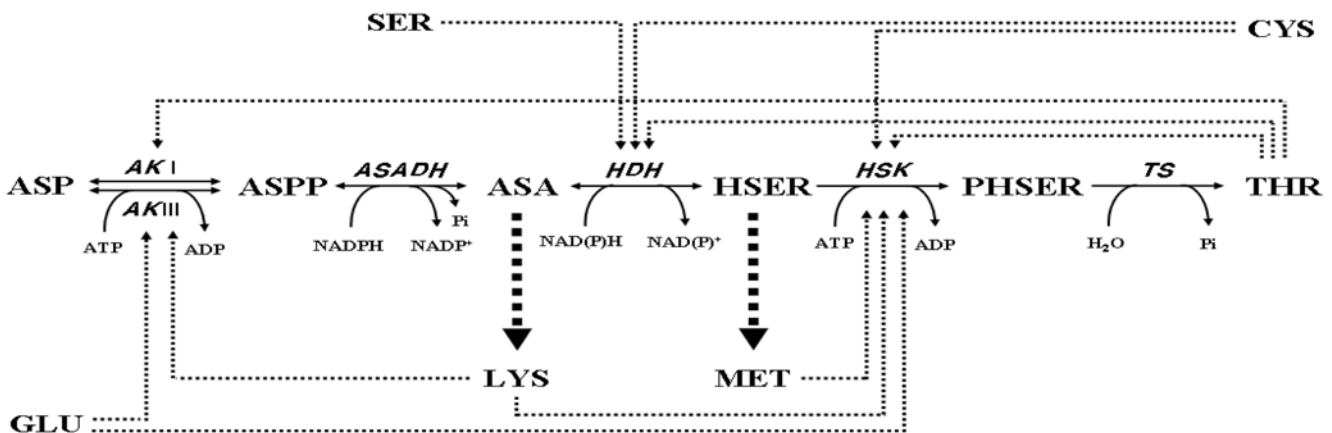


Fig. 1. L-threonine biosynthesis metabolic pathway in *E. coli*: Inhibitors (SER, CYS, GLU, LYS, MET, THR).

2-3. 동역학 모델을 위한 효소 반응식

대장균 내의 L-threonine 생합성 관련 동역학 대사 네트워크를 모사(simulation)하기위해 관련된 효소 반응들은 두 기질/두 생성물 반응(ASADH 효소 반응 제외: 두 기질/세 생성물 반응)으로 표현할 수 있다. 이를 양론식으로 간단히 표현하면 $A+B \leftrightarrow P+Q$ 로, 생성물 P와 Q는 기질인 A와 B에 경쟁적으로 반응한다. 즉 생성물이 효소의 활성부위에서 기질과 함께 반응하여 저해제 역할을 함으로써 효소 반응속도에 영향을 미친다. 이러한 두 기질 반응 속도식의 일반적인 형태를 간략하게 수학적으로 표현하면 (1)식과 같이 나타낼 수 있다[10, 11].

$$v = \frac{V_f \left(AB - \frac{PQ}{K_{eq}} \right)}{\left[K_A \left(1 + \frac{P}{K_P} \right) + A \right] \left[K_B \left(1 + \frac{Q}{K_Q} \right) + B \right]} \quad (1)$$

여기서, V_f 는 정반응의 최대속도(V_{max})를 나타낸다. 위의 (1)식은 역반응의 제한 속도 V_r 값을 Haldane relationship으로 관련된 파라미터들을 이용해 (2)식과같이 표현하여 유도되었다.

$$K_{eq} = \frac{V_f K_P K_Q}{V_r K_A K_B} \quad (2)$$

또한 L-threonine 생합성과 관련된 6개의 효소와 관련하여 효소 반응식에 영향을 미치는 저해제들을 문헌 및 웹 자료를 통해 조사하였다. 그런 다음 기존의 문헌에 보고된 저해제와 웹 자료에서 새롭게 찾은 저해제들 중에서 L-threonine 생합성 대사 네트워크와 가장 가깝게 인접해 있는 대사 물질들을 선별하고 기질로 반응하는 대사물질들과의 화학적인 구조도 비교하였다. 또한 저해제들이 각각의 효소 반응에 경쟁적(competitive)으로 반응할지 비경쟁적(non-competitive)으로 저해하는지를 조사하였다. 그리하여 L-threonine 생합성과 관련하여 6개의 저해제(L-serine, L-cysteine, L-threonine, L-lysine, L-methionine, L-glutamate)를 찾아냈으며 이를 수학적으로 모델링하여 효소 반응식에 저해제 영향인자를 포함시켜 좀 더 정확한 효소 반응식으로 표현하였다. 이들 저해제들은 한 효소에만 저해하지 않으며(L-serine의 경우 제외) 두 개 이상의 효소에 영향을 미치는 것으로 확인하였다(L-threonine의 경우 세 개의 효소에 영향을 미침). L-threonine 생합성과 관련된 효소들의 반응식들을 수학적으로 표현한 것을 Table 2에 나타내었다[3, 6-9].

Table 2. Enzyme kinetics for L-threonine biosynthesis in *E. coli* metabolic network

Enzyme	Kinetics
	$\frac{V_{AKI} \left([ASP][ATP] - \frac{[ASPP][ADP]}{K_{eq}} \right)}{\left[K_{ASP} \frac{1 + \left(\frac{[THR]}{K_{iTHR}} \right)^{h_{rim}}}{1 + \left(\frac{[THR]}{\alpha \times K_{iTHR}} \right)^{h_{rim}}} + [ASPP] \frac{K_{ASP}}{K_{ASPP}} + [ASP] \right] \times \left[K_{ATP} \left(1 + \frac{[ADP]}{K_{ADP}} \right) + [ATP] \right]}$
AK I	
	$\frac{V_{AK3} \left([ASP][ATP] - \frac{[ASPP][ADP]}{K_{eq}} \right)}{\left[\left[1 + \left(\frac{[LYS]}{K_{iLYS}} \right)^{h_{lys}} \right] \times \left[1 + \frac{[GLU]}{K_{iGLU}} \right] \times \left[K_{ASP} \left(1 + \frac{[ASPP]}{K_{ASPP}} \right) + [ASP] \right] \times \left[K_{ATP} \left(1 + \frac{[ADP]}{K_{ADP}} \right) + [ATP] \right] \right]}$
AK III	
	$\frac{V_{ASD} \left([ASPP][NADPH] - \frac{[ASPSA][NADP][P_i]}{K_{eq}} \right)}{\left[\left[K_{ASPP} \left(1 + \frac{[ASPSA]}{K_{ASPSA}} \right) \times \left(1 + \frac{[P_i]}{K_{P_i}} \right) + [ASPP] \right] \times \left[K_{NADPH} \left(1 + \frac{[NADP]}{K_{NADP}} \right) + [NADPH] \right] \right]}$
ASADH	
	$\frac{V_{HDH} \left([ASA][NADPH] - \frac{[HSER][NADP]}{K_{eq}} \right)}{\left[\frac{1 + \left(\frac{[THR]}{K_{iTHR}} \right)^{h_{rim}}}{1 + \left(\frac{[THR]}{\alpha \times K_{iTHR}} \right)^{h_{rim}}} \right] \left[1 + \frac{[CYS]}{K_{iCYS}} \right] \left[1 + \frac{[SER]}{K_{iSER}} \right] \left[K_{ASA} \left(1 + \frac{[HSER]}{K_{HSER}} \right) + [ASA] \right] \left[K_{NADPH} \left(1 + \frac{[NADP]}{K_{NADP}} \right) + [NADPH] \right]}$
HDH	
	$\frac{V_{HK} [HSER][ATP]}{\left[\left[K_{HSER} \left(1 + \frac{[ATP]}{K_{iATP}} \right) \right] \left(1 + \frac{[THR]}{K_{iTHR}} \right) \left(1 + \frac{[LYS]}{K_{iLYS}} \right) \left(1 + \frac{[MET]}{K_{iMET}} \right) \left(1 + \frac{[CYS]}{K_{iCYS}} \right) \left(1 + \frac{[GLU]}{K_{iGLU}} \right) + [HSER] \right] \times \left[K_{ATP} \left(1 + \frac{[HSER]}{K_{iHSER}} \right) + [ATP] \right]}$
HSK	
	$\frac{V_{TS} [PHSER]}{K_{PHSER} + [PHSER]}$
TS	

2-4. 효소 저해제

L-threonine 생합성 과정에서 ASP로부터 ASPP로 넘어가는 첫 단계에 영향을 미치는 AK I 효소는 THR이 저해제 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이 때 THR은 ASP에 대해 알로스테릭(allosteric)하고 경쟁적(competitive)으로 작용한다[12, 13]. 첫 단계에 작용하는 또 다른 효소인 AK III의 경우에는 L-lysine이 비경쟁적(non-competitive)이고, 코오퍼리티브(cooperative)하게 저해하고 L-glutamate도 역시 저해제로서 기질과 비경쟁적으로 반응속도에 영향을 미친다[14-16]. 다음 효소로 ASADH는 L-threonine 생합성 경로와 가까운 대사 물질로 저해제 역할을 하는 물질이 없는 것으로 조사되었다. HDH 효소를 저해하는 물질로 조사된 것은 L-serine, L-cysteine 그리고 L-threonine이 있으며 L-threonine의 경우엔 비경쟁적(non-competitive) 저해제로 영향을 미친다[18-20]. 또한 HSK 효소는 조사되어진 저해제들 중 L-serine을 제외한 모든 저해제의 영향을 받는 것으로 조사되었다[21-24]. 기질인 L-homoserine의 경우 1 mM 이상일 때, 다른 기질인 ATP는 3 mM 이상일 때 기질 저해제 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 THR은 L-homoserine에 대해 경쟁적(competitive)이고 난알로스테릭(non-allosteric)한 저해제이며, L-lysine의 경우엔 L-homoserine과는 비경쟁적인(non-competitive) 저해제라고 알려져 있다[3]. 또한 L-glutamate, L-methionine, L-cysteine의 경우도 HSK 효소의 저해제 역할을 한다[9]. L-threonine 생합성 과정에서 마지막 단계인 TS 효소 반응에서는 ASADH 효소와 마찬가지로 직접적으로 저해제 역할을 하는 대사 물질을 없는 것으로 조사되었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 모사(simulation)

본 연구에서는 대장균에서 L-threonine 생합성과 관련된 대사 네트워크 및 동역학 모델을 세웠으며, 효소들의 반응식과 관련된 파라미터들은 다른 문헌들과 웹상에 제공되는 자료를 참고하였다. 이와 관련된 파라미터들은 Table 3에 나타내었다[3, 9]. 사용한 모사(simulation) 프로그램은 생체 대사 네트워크를 분석하고 모사하는데 응용하는 COPASI 프로그램을 사용하였고[11] 조사를 통해 얻은 파라미터를 통해 COPASI의 time course simulation을 이용하여 L-aspartate의 농도가 5 mM일 때 대장균 내의 대사 물질인 β -aspartyl phosphate, D,L-aspartic β -semialdehyde, L-homoserine, O-phospho-homoserine 그리고 L-threonine의 농도가 어떻게 변하는지 처음 10분 동안은 1분 간격으로 그 후엔 5분 간격으로 100분 동안의 데이터를 얻어낸 후, 이것을 그래프로 표현하였다.

이를 위해 대사 물질들의 초기 농도 값을 L-aspartate 5 mM, ATP 5 mM, NADPH 2 mM로 설정하고 나머지 대사 물질들의 농도 값은 0 mM, L-threonine 생합성에 저해제로 작용하는 대사 물질들은 고정 농도 값을 1 mM로 고정하였다. 단, L-threonine은 저해제이면서 최종 생성물이기에 다른 저해제들의 영향에 대해 모사(simulation) 분석을 하기 위해서는 농도 값을 0 mM로 설정하고 L-threonine에 의한 저해 영향을 분석할 때에는 다른 저해제는 1 mM로 고정하고 L-threonine의 농도 값을 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM로 설정하여 모사하였다.

Table 3. Parameters of enzyme kinetics for L-threonine biosynthesis in *E. coli*

Enzyme	K_m (mM)		Inhibition		K_{eq}
AK	ASP	0.97±0.48	K_{iTHR}	0.167±0.003 mM	6.4×10^{-4}
	ATP	0.98±0.5	h_{THR}	4.09±0.26	
	ASPP	0.017±0.004	a	2.47±0.17	
	ADP	0.025			
AK	ASP	0.32±0.08	K_{iLYS}	0.391±0.08 mM	6.4×10^{-4}
	ATP	0.22±0.02	h_{LYS}	2.8±1.4	
	ASPP	0.017±0.004	K_{iGLU}	128 mM	
	ADP	0.25			
ASADH	ASPP	0.022±0.001			2.84×10^5
	NADPH	0.029±0.002			
	ASA	0.11±0.008			
	NADP ⁺	0.144±0.02			
	P _i	10.2±1.4			
HDH	ASA	0.24±0.03	K_{iTHR}	0.097 mM	$1 \times 10^{11} M^{-1}$
	NADPH	0.037±0.006	h	1.41	
	HSER	3.39±0.006	a	3.93	
	NADP ⁺	0.067±0.006	K_{iCYS}	0.1 mM	
			K_{iSER}	0.1 mM	
HSK	HSER	0.11	K_{iTHR}	1.09 mM	
	ATP	0.072	K_{iLYS}	9.45 mM	
			K_{iHSER}	4.7 mM	
			K_{iATP}	4.35 mM	
			K_{imet}	35 mM	
			K_{iCYS}	1 mM	
			K_{iGLU}	0.5 mM	
TS	PHSER	0.31±0.03			

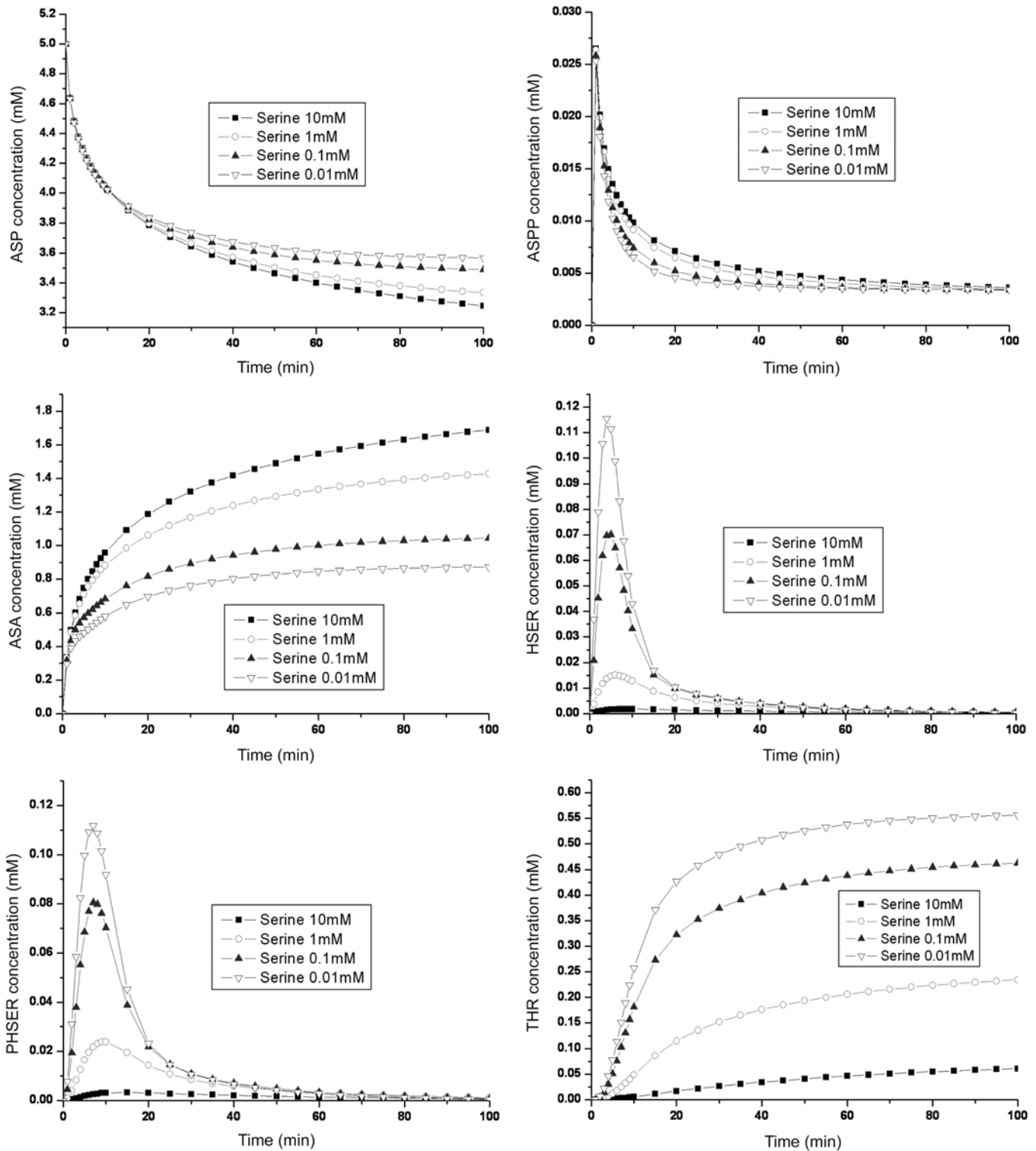


Fig. 2. Intermediate metabolite concentration profiles in the presence of L-serine as an inhibitor.

3-2. 저해제 glutamate, lysine, methionine에 대한 영향

본 연구에서 조사한 L-threonine 생합성 과정에 영향을 미치는 저해제 중 L-glutamate, L-lysine, L-methionine의 경우에 각각의 저해제 농도를 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM로 변화를 주어 모사 (simulation)를 통해 각 대사 물질들의 시간대별 농도변화를 확인해

보았다. 그 결과 ASP, ASPP, ASA, HSER, PHSER, THR의 농도변화는 각각의 저해제의 농도가 증가를 해도 농도 패턴의 변화가 거의 없었으며, 대사 물질들의 농도변화는 Fig. 2와 비슷한 패턴을 보였다.

ASP의 경우엔 100분이 지난 후 약 3.33 mM정도로 일정하게 나

왔으며, ASPP는 모사(simulation) 후 1분에 최고 농도인 약 0.028 mM을 나타내다가 감소하였다. 또한 ASA는 100분 동안 농도가 증가하다가 100분 후에 약 1.42 mM 정도의 농도를 유지하고 HSER과 PHSER은 각각 6분에서 9분 사이, 9분에서 12분 사이에 최고 농도를 나타내다가 감소하였다. 마지막으로 THR은 100분이 지난 후 모든 경우에 약 0.23 mM 정도로 유지되는 것을 확인했다.

3-3. 저해제 serine 에 대한 영향

L-serine은 해당과정(glycolysis)의 마지막 대사 물질인 L-pyruvate로부터 생성되는 아미노산으로 L-threonine의 중간산물인 L-homoserine과는 다섯 단계의 과정만 거치면 생성되는 아미노산이다. 이에 L-serine은 대장균의 L-threonine 생합성 과정에서 homoserine dehydrogenase(HDH, EC 1.1.1.3) 효소에 매우 중요한 저해제 역할을 하는 것으로 알려져 있다[17]. L-serine의 저해 능력은 칼륨 농도와 pH의 영향을 매우 크게 받는다. L-serine은 칼륨 농도가 100에서 200 mM이고 pH가 7.5일 경우 D,L-aspartic β-semialdehyde와 L-homoserine사이에서 작용하는 HDH 효소의 정반응과 역반응 모두 강한 저해제 역할을 한다[18].

본 연구에서 저해제인 L-serine을 주목하는 이유는 다른 저해제를 1 mM로 고정(L-threonine의 경우 초기 값을 0 mM으로 설정)하고 L-serine의 농도를 변화시켜 L-threonine 생합성과 관련된 대사 산물의 시간대별 농도변화를 100분 동안 모사(simulation)한 결과 저해제의 초기 농도를 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM으로 변화시킬 경우 각 대사 물질 농도의 그래프가 아래 Fig. 2와 같이 서로 다른 농도 값을 나타내는 것을 확인하였다.

ASP 농도의 경우 저해제인 L-serine농도가 증가할수록 ASP의 소비농도가 증가하는 것으로 확인되었다(10 mM의 경우엔 약 1.8 mM 정도 소비). ASPP의 농도변화는 거의 1분에 최고 농도이다가 시간이 지날수록 줄어들어 100분이 지나면 거의 모든 조건에서 약 0.03 mM 정도의 ASPP가 대장균 내에 존재한다. 또한 ASA 농도의 경우엔 L-serine의 농도가 증가할수록 ASA의 농도가 더 많이 축적되었고(10 mM의 경우엔 약 1.7 mM정도 축적), HSER의 경우 모사(simulation) 후 약 4분 뒤에 최고의 농도 피크를 보였다가 15분 뒤에 급격하게 줄어드는 경향을 확인할 수 있었으며(0.01 mM의 경우엔 최고 농도가 약 0.115 mM정도) 100분 후에는 거의 0 mM에 가깝게 존재한다.

또한 L-serine의 농도가 감소할수록 농도변화의 피크가 완만해지는 것을 알 수 있었다. PHSER의 경우엔 HSER의 그래프와 비슷한 경향을 보이는데 약 7분 뒤 최고 농도 피크였다가 20분 뒤에는 PHSER의 농도가 급격하게 줄어들었다. 마지막으로 시간대별 THR의 농도는 S자형 그래프를 보이며 L-serine의 농도가 적을수록 보다 높은 THR가 대장균 내에 존재하는 것으로 확인되었다(10 mM의 경우엔 약 0.06 mM정도 존재).

3-4. 저해제 cysteine 에 대한 영향

L-cysteine의 경우 대장균 내에서 L-serine으로부터 만들어지는 아미노산으로 homoserine dehydrogenase(HDH, EC 1.1.1.3)와 homoserine kinase(HSK, EC 2.7.1.39) 효소에 영향을 미치는 저해제로 알려져 있다. L-cysteine은 HSK 효소인 경우 기질인 ATP에 대해서는 비경쟁적인 저해제이고 또 다른 기질인 L-homoserine에 대해서는 경쟁적인 저해제로서 작용을 한다[20, 21].

L-serine과 마찬가지로 다른 저해제의 농도를 고정시키고 L-cysteine

의 농도를 변화를 주어 모사(simulation) 프로그램인 COPASI를 이용하여 100분 동안의 대장균 내 대사 물질들의 농도 변화를 Fig. 3과 같이 얻었다. L-serine과 마찬가지로 저해제 L-cysteine의 농도를 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM로 변화를 주었을 때 전체적인 그래프 경향은 비슷하게 나왔다.

두 결과 그래프에서 다른 점은 HSER의 농도가 L-serine의 경우보다 최고 농도 값이 약 1/2정도 줄어든 것을 확인할 수 있었으며 L-cysteine의 농도가 10 mM일 경우에는 약 15분 후부터는 대장균 내에 존재하는 HSER의 농도가 다른 조건(0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM)일 때보다 높은 것으로 나타났다. 또한 PHSER의 경우 L-cysteine의 농도가 0.01 mM과 0.1 mM일 때 L-serine의 경우보다 최고 농도가 약간씩 더 높은 것으로 확인되었다. 그러나 이러한 차이가 L-threonine의 농도에는 L-serine과 비교하여 크게 다른 것이 없었다.

3-5. 저해제 L-threonine에 대한 영향

본 연구에서 대상물질로 삼고 있는 L-threonine 역시 최종 생성물인 동시에 저해제로서 aspartokinase I(AK I, EC 2.7.2.4), homoserine dehydrogenase(HDH, EC 1.1.1.3)와 homoserine kinase(HSK, EC 2.7.1.39) 효소에 영향을 미친다고 알려져 있다[19, 21-23]. AK I의 경우엔 기질인 L-aspartate와 알로스테릭(allosteric)하고 경쟁적(competitive)으로 저해를 하며 HDH 효소에 대해서도 L-threonine은 알로스테릭(allosteric)하게 작용하나 비경쟁적(non-competitive)으로 반응속도를 저해한다. 마지막으로 HSK 효소에 대해서는 L-homoserine과 경쟁적(competitive)이지만 난알로스테릭(non-allosteric)하게 영향을 미친다. 다른 저해제보다 많은 효소에 영향을 미치어 Fig. 4와 같이 저해제들의 농도변화 영향에 따라 다른 패턴을 보였다.

ASP가 소비되는 것을 보면 L-threonine의 농도가 1 mM일 때를 제외하고는 시간대별 농도변화가 비슷하게 나타나고 ASPP는 L-threonine의 농도가 0에서 0.1 mM가 변화하는 동안 1분이 지난 후 최고 농도 값인 0.026 mM까지 올라갔다가 급격히 감소하나 1 mM일 때 최고 농도가 0.007 mM로 감소한다. ASA는 모사(simulation) 후 70분 전까지 시간대별 축적되는 농도가 1 mM일 경우 다른 농도일 때보다 적다가 70분 후부터 많아지는 경향을 보였다.

HSER은 저해제 농도변화에 따른 그래프 패턴은 비슷하나 최고 농도는 L-serine에 비해서는 7.6배, L-cysteine의 경우엔 4배정도로 감소한 0.015 mM을 나타내었다. 또한 PHSER의 경우엔 HSER과 비슷한 패턴을 보이며 최고 농도 값도 L-serine에 비해서는 4.6배, L-cysteine의 경우엔 5배정도로 감소한 0.015 mM을 나타내었다. THR은 농도가 증가할수록 초기와 최종 농도의 차이가 급격하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 컴퓨터상에서 모사(simulation) 프로그램을 이용하여 세포 내의 동역학적인 거동을 분석하기 위한 접근방법을 시도하였고, 이를 위해 대상 균주인 대장균(*Escherichia coli*) 내에서 L-threonine 생합성을 모사(simulation)하고 분석해 봄으로써 실제 대장균과 가까운 L-threonine의 시간대별 농도변화를 보고자 하였다. 본 연구 수행을 위하여 기존에 보고되고 있는 대장균의 대사 네트워크보다 실제와 가까운 모델을 구축하기 위해 L-threonine 생합성에 참여하는 효소들의 저해제를 모두 조사하고 이를 동역학 모델에

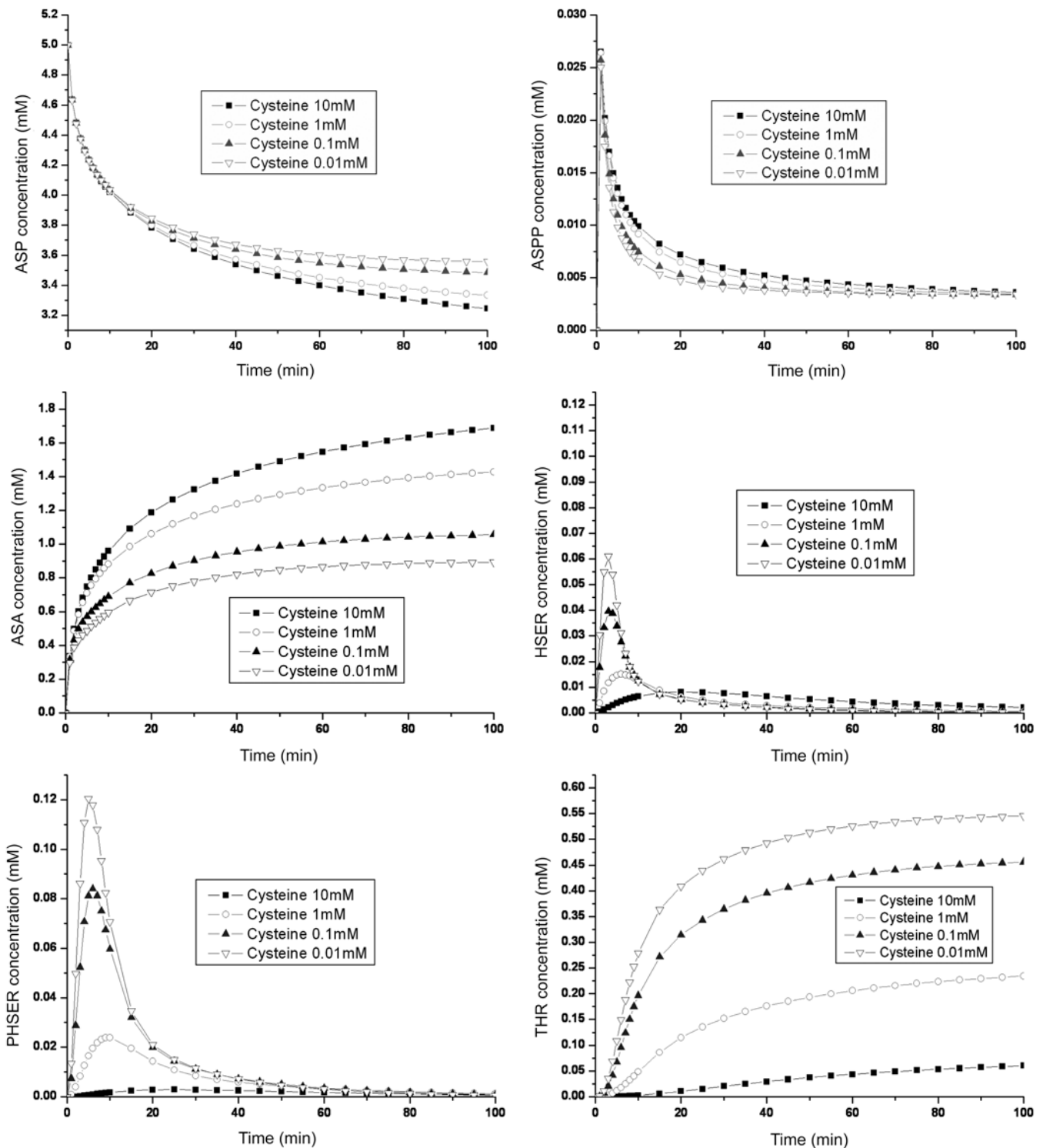


Fig. 3. Intermediate metabolite concentration profiles in the presence of L-cysteine as an inhibitor.

적용하였다. 그리하여 14개의 대사 물질(저해제 포함), 5개의 효소 반응(3개의 가역반응과 2개의 비가역반응)의 L-threonine 생합성 관련 효소 반응식들을 새롭게 구성하였다. 또한 모사(simulation) 연구 수행을 위하여 문헌자료나 웹자료를 활용하여 효소 반응식들과 파라미터들에 관한 연구도 함께 수행하였다.

이렇게 새롭게 구축한 모델을 이용하여 L-threonine 생합성 모사

(simulation)를 위해 초기 농도 값을 L-aspartate 5 mM, ATP 5 mM, NADP 2 mM로 설정하고 저해제는 1 mM로 고정하였다. 각각의 저해제에 대한 영향을 모사할 때는 농도 값을 변경해가며 결과를 분석하였다. 결과로, 대장균 내에 축적된 D,L-aspartic β -semialdehyde 농도에 따라 최종 생성물인 L-threonine 농도에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 예를 들면, 저해제 L-serine의 경우에 L-serine의 농도

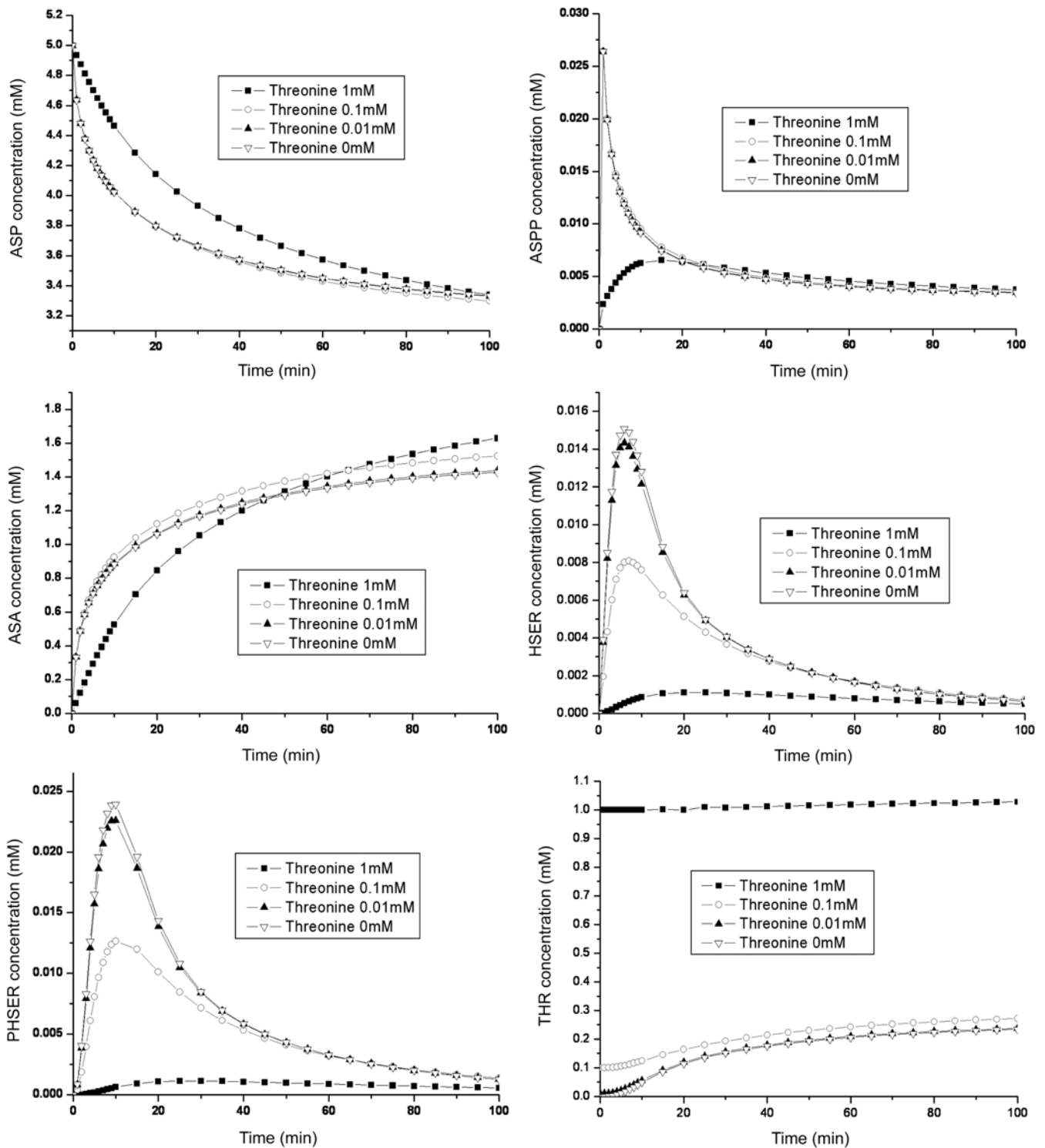


Fig. 4. Intermediate metabolite concentration profiles in the presence of L-threonine as an inhibitor.

가 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM으로 증가할수록 100분 후 대장균 내에 축적된 D,L-aspartic β -semialdehyde 농도는 대략 0.8 mM, 1.0 mM, 1.4 mM, 1.7 mM이었으며 최종 생성물인 L-threonine의 농도는 0.55 mM, 0.45 mM, 0.23mM, 0.07 mM이었다. 즉 생성되는 L-threonine은 세포 내에 축적된 D,L-aspartic β -semialdehyde에 반비례하였다.

또한 저해제 L-serine, L-cysteine 그리고 L-threonine의 경우일 때 다른 저해제들의 모사(simulation) 결과와는 다른 농도변화를 보이는 것으로 파악되었다. L-serine과 L-cystein의 경우엔 서로 비슷한 농도변화 패턴을 보였으나 다른 점은 L-homoserine의 세포 내 최고 농도 값이 저해제 L-serine일 때보다 L-cysteine일 경우 1/2로 감소하는 것으로 분석되었다(두 저해제의 농도 값이 0.01 mM일 때 L-serine

의 경우 0.115 mM, L-cysteine의 경우 0.06 mM). 그리고 L-threonine의 경우엔 저해제 농도가 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM일 때와 1 mM일 때 서로 다른 대사 물질들의 농도 변화의 패턴을 보였다.

본 연구 결과를 통해 L-threonine 생합성 관련 저해제들의 종류에 따라 대사 물질들의 시간대별 농도변화 결과와 L-threonine 생산에 큰 영향을 미치는 저해제들을 알아내었지만, 이는 대장균의 전체적인 대사 네트워크를 고려하였을 때, L-aspartate를 시작점으로 하는 단순한 대사 경로를 모사(simulation)하여 이를 실제와 가까운 동역학 모델이라고 말하기 어려우나 이를 보완하기 위해 보다 엄밀한 모사 연구 수행을 통하여 얻은 자료를 이용하여 정밀도 높은 파라미터 값들을 얻게 될 경우 최적의 대장균의 대사 시스템을 구축할 수 있을 것이다.

감 사

본 논문은 과학기술부 시스템 생물학 연구사업(M10503020003-05N0302-00300)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

사용기호

AK I/II	: aspartate kinase (EC 2.7.2.4)
ASADH	: aspartate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.11)
HDH	: homoserine dehydrogenase (EC 1.1.1.39)
HSK	: homoserine kinase (EC 2.7.1.39)
TS	: threonine synthase (EC 4.2.3.1)
ASP	: L-aspartate
ASPP	: β -aspartyl phosphate
ASA	: D,L-aspartic β -semialdehyde
HSER	: L-homoserine
PHSER	: O-phospho-homoserine
THR	: L-threonine
GLU	: L-glutamate
LYS	: L-lysine
MET	: L-methionine
SER	: L-serine
CYS	: L-cysteine
ATP	: adenosine 5-triphosphate
ADP	: adenosine 5-diphosphate
NADPH	: dihydrotetraphosphopyridine nucleotide

참고문헌

- Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A. and Nielsen, J., "Metabolic Engineering: Principles and Methodologies," *Academic press* (1998).
- Faurie, R., Kimura, E., Marz, A., Mockel, B., Mueller, U., Pfefferle, W. and Thommel, J., "Microbial Production of L-Amino Acids," *Springer Verlag*(2003).
- Chassagnole, C., Raïs, B., Quentin, E., Fell, D. A. and Mazat, J. P., "An Integrated Study of Threonine-pathway Enzyme Kinetics in *Escherichia coli*," *Biochem. J.*, **356**(2), 415-423(2001).
- Raïs, B., Chassagnole, C., Letellier, T., Fell, D. A. and Mazat, J. P., "Threonine Synthesis from Aspartate in *Escherichia coli* Cell-free Extracts: Pathway Dynamics," *Biochem. J.*, **356**(2), 425-443(2001).
- Chassagnole, C., Fell, D. A., Raïs, B., Kudla, B. and Mazat, J. P., "Control of the Threonine-synthesis Pathway in *Escherichia coli*: a Theoretical and Experimental Approach," *Biochem. J.*, **356**(2), 433-444(2001).
- <http://www.biocyc.org/>.
- <http://www.genome.ad.jp/6.kegg/>.
- <http://www.empproject.com>.
- <http://www.brenda.uni-koeln.de/>.
- Segel, I. H., "Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State," *Wiley*(1975).
- <http://www.copasi.org/tiki-index.php>.
- Starnes, W. L., Munk, P., Maul, S. B., Cunningham, G. N., Cox, D. J. and Shive, W., "Threonine-Sensitive Aspartokinase-homoserine Dehydrogenase Complex, Amino Acid Composition, Molecular Weight, and Subunit Composition of the Complex," *Biochemistry*, **11**(5), 677-687(1972).
- Veron, M., Falcoz-Kelly, F. and Cohen, G. N., "The Threonine-sensitive Homoserine Dehydrogenase and Aspartokinase Activities of *Escherichia coli* K12. The Two Catalytic Activities are Carried by two Independent Regions of the Polypeptide Chain," *Eur. J. Biochem.*, **28**(4), 520-527(1972).
- Keng, Y. F., Viola, R. E., "Specificity of Aspartokinase III from *Escherichia coli* and an Examination of Important Catalytic Residues," *Arch. Biochem. Biophys.*, **335**(1), 73-81(1996).
- Truffa-Bachi, P., "Microbial Aspartokinases; The Enzymes, 3rd Ed. (Boyer, P.D., ed.)," *Academic Press*, **8**, 509-553(1973).
- Funkhouser, J. D., Abraham, A., Smith, V. A. and Smith, W. G., "Kinetic and Molecular Properties of Lysine-sensitive Aspartokinase. Factors Influencing the Lysine-mediated Association Reaction and Their Relationship to the Cooperativity of Lysine Inhibition," *J. Biol. Chem.*, **249**(17), 5478-5484(1974).
- Hama, H., Kayahara, T., Tsuda, M., Tsuchiya, T., "Inhibition of Homoserine Dehydrogenase I by L-serine in *Escherichia coli*," *J. Biochem.*, **109**(4), 604-608(1991).
- Wedler, F. C. and Ley, B. W., "Kinetic and Regulatory Mechanisms for (*Escherichia coli*) Homoserine Dehydrogenase-I. Equilibrium Isotope Exchange Kinetics," *J. Biol. Chem.*, **268**(7), 4880-4888(1993).
- James, C. L. and Viola, R. E., "Production and Characterization of Bifunctional Enzymes. Domain Swapping to Produce New Bifunctional Enzymes in the Aspartate Pathway," *Biochemistry*, **41**(11), 3720-3725(2002).
- Burr, B., Walker, J., Truffa-Bachi, P. and Cohen, G. N., "Homoserine Kinase from *Escherichia coli* K12," *Eur. J. Biochem.*, **62**(3), 519-526(1976).
- Huo, X. and Viola, R. E., "Substrate Specificity and Identification of Functional Groups of Homoserine Kinase from *Escherichia coli*," *Biochemistry*, **35**(50), 16180-16185(1996).
- Huo, X. and Viola, R. E., "Functional Group Characterization of Homoserine Kinase from *Escherichia coli*," *Arch. Biochem. Biophys.*, **330**(2), 373-379(1996).
- Theze, J., Kleidman, L., St. Girons, I., "Homoserine Kinase from *Escherichia coli* K-12: Properties, Inhibition by L-threonine, and Regulation of Biosynthesis," *J. Bacteriol.*, **118**(2), 577-581(1974).