

Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum NCIB 8327로부터 Glutamine Synthetase의 분리 및 특성분석

나종욱 · 김지윤 · 윤 환 · 강사옥

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

녹색황세균인 *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327을 glutamate가 질소원으로 포함된 변형 Pfennig 배지에서 배양한 다음 균체를 얻고, glutamine synthetase 효소를 초심심분리, DEAE-Sephacryl S-300 이온교환 크로마토그래피, Sephacryl S-300 겔여과 크로마토그래피, 분취용 액체크로마토그래피의 과정을 통해 2% 수율에 46.3배의 정제배수로 효소를 분리정제하였다. UV-VIS 흡수스펙트럼과 polyacrylamide 겔 전기영동을 통해 분리된 효소의 순수도는 확인하였다. Sephacryl S-300 겔을 이용하여 얻은 효소의 분자량은 280 kDa 정도였으며, SDS-polyacrylamide 겔 전기영동 결과, 30 kDa 정도의 분자량을 갖는 단위체의 복합체로 추정된다. 이 효소의 최적 온도와 pH는 각각 30°C와 pH 7.0이었으며, 두 기질 L-glutamine과 hydroxylamine-HCl에 대한 Km 값은 각각 27.9 mM과 0.92 mM이었다. 이 효소의 활성은 alanine, glycine, tryptophan 등의 아미노산에 의해 상당한 저해를 받는 것으로 나타났으며, asparagine, lysine, leucine, valine 등에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다.

KEY WORDS □ amino acid inhibition, glutamine synthetase, molecular weight

Glutamine synthetase [L-glutamate: ammonia ligase (ADP-forming), EC 6.3.1.2]는 암모니아 동화 작용에서 주요한 역할을 수행한다. *E. coli*에서의 연구는 glutamine synthetase의 조절기작과 분자량 결정에 집중되어 gene expression, multiple feed-back inhibition, kinetic control 및 AMP에 의한 adenylation 등에 의해 조절됨이 밝혀졌다(22). Feedback inhibition과 covalent modification의 측면에서 볼 때 *Rhodobacter capsulata*(10, 16), *Rhodospseudomonas palustris*(1, 2), *Rhodobacter sphaeroides*(6) 및 *Rhodospirillum rubrum*(23)은 *E. coli*와 유사하지만, adenylation된 효소에 대한 Mg¹² ion의 효과는 전반적으로 *Rhodospirillaceae*가 *E. coli*와는 다른 작용양상을 보여주고 있다(7, 19). 광합성세균 중에서 *R. rubrum*(21, 24), *R. palustris*(1, 2), *R. sphaeroides*(6) 및 *R. capsulatus*(4, 10)에서 분리되어 특성이 분석되었다. 그러나, *Chlorobiaceae*에서 glutamine synthetase의 특성에 대한 연구는 *C. vibrioforme f. thiosulfatophilum* 이외에는 보고되지 않았다(12). 따라서, 본 논문에서는 glutamate를 유일한 질소원으로 배양한 *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327 세포로부터 glutamine synthetase를 순수분리하여 생화학적, 분광학적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주는 R. Sirevag(Department of Biology, University of Oslo, Norway)로부터 분양받은 *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327로서, 녹색황세균을 위한 계대배양용 배지에서 30°C로 배양하여 계대하였다.

시약

고순도의 상용용 표준제품이 본 실험에서 시약으로 사용되었다.

배지

배지는 Na와 Kang(17)의 방법이 사용되어 제조되었고, 질소원으로는 glutamate가 사용되었다.

배양조건과 성장도 측정

배양조건과 성장도 측정에는 Na와 Kang(18)의 방법이 사용되었다.

효소활성 측정

Glutamine synthetase 활성도는 Na와 Kang(18)의 방법에 따라 측정되었다. Adenylation된 효소에 대한 Mg⁻² ion의 효과는 60 mM MgCl₂가 첨가된 반응 혼합액이 사용되어 측정되었다(19). 효소 활성단위는 1분당 1 μmol의 γ-glutamyl hydroxamate를 생성하는 양을 1 unit로 정하였다.

단백질 정량

단백질 양은 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 표준단백질로 하여 Lowry 등(15)의 방법과 Bradford(3) 방법으로 측정되었다.

완충용액

겔여과 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피

및 분취용 고압액체 크로마토그래피에 사용된 완충용액은 각각 100 mM, 10 mM과 50 mM Tris-HCl (pH 7.9)이다. 각 완충용액은 사전에 감압된 상태에서 질소가스가 불어 넣어진 뒤 dithiothreitol이 첨가된 다음 사용되었다.

효소의 정제

원심분리로 수확된 균체는 세척용 완충용액(1 mM $MnCl_2$ 와 2 mM dithiothreitol을 포함하는 100 mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 두번 세척한 다음 세척용 완충용액을 두 배 부피로 넣어 초음파발생기로 파쇄한 후 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 100,000×g에서 90분간 초원심분리하여 얻은 상층액을 조효소로 사용하였다. DEAE-Sepharose CL-6B 이온교환 크로마토그래피는 완충용액으로 평형된 컬럼(4.4×15 cm)에 초원심분리로 얻은 조효소를 얻고 150 ml의 같은 완충용액으로 세척한 다음 동일 완충용액에서 NaCl 0.1~0.45 M의 농도기울기로 용출하는 조건에서 행하였다. Sephacryl S-300 젤여과 크로마토그래피는 완충용액으로 평형된 컬럼(2.6×140 cm)에 PM-10 Amicon membrane으로 농축된 효소분획시료를 얻어 같은 완충용액으로 용출하는 조건에서 행하였다. 분취용 고압액체 크로마토그래피는 Waters Delta Prep 4000 chromatography system (Waters사)의 음이온 교환수지 크로마토그래피용 Protein-Pak DEAE 5PW 컬럼에 PM-10 Amicon membrane으로 농축된 효소분획시료를 얻은 다음, 완충용액으로 세척하고 동일 완충용액에서 NaCl 0.25~0.4 M의 농도기울기로 용출하는 조건에서 행하였다.

전기영동

Nondissociating polyacrylamide gel 전기영동은 Davis(5) 방법을 변형하여 8% slab gel에서 행하였다. SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동은 Lambin 등(13)의 방법을 변형하여 SDS-discontinuous buffer system에서 acrylamide의 최종농도가 5~10%인 linear gradient slab gel에서 행하였다.

분자량 측정

SDS-PAGE 전기영동에 의한 분자량 측정의 표준단백질로는 α_2 -macroglobulin(170,000; reduced form), phosphorylase b(97,000), glutamate dehydrogenase(55,400), lactate dehydrogenase(36,500),

trypsin inhibitor(20,100; 이상 Boehringer Mannheim Biochemica)가 사용되었다. 젤여과 크로마토그래피에 의한 분자량 측정에는 Sephacryl S-300이 사용되었으며, 표준단백질로는 ferritin(450,000), catalase(240,000), alcohol dehydrogenase(150,000), chymotrypsinogen(25,000; 이상 Boehringer Mannheim Biochemica)이 사용되었다.

효소 활성도에 대한 온도와 pH의 영향

효소활성에 대한 온도의 영향은 25~50°C 사이의 반응 온도에서 측정되었고, 온도에 대한 효소의 안정성은 5~60°C 사이의 해당온도에서 30분간 전처리된 다음 측정되었다. 효소활성에 대한 pH의 영향은 pH 5.0~9.0 사이의 0.1 M citrate-borate-phosphate 완충용액에서 측정되었다. pH에 대한 효소의 안정성은 pH 5.0~10.0 사이의 동일 완충용액에서 30분간 전처리된 다음 측정되었다.

Km값 측정

기질 L-glutamine과 hydroxylamine-HCl에 대한 각각의 친화도는 각 기질 농도를 변화시키면서 측정된 활성도를 Lineweaver-Burk plot에 적용하여 구한 값으로부터 Km값을 결정하였다.

효소활성에 대한 아미노산의 영향

효소활성에 미치는 아미노산의 영향은 asparagine, lysine, leucine, valine, glycine, alanine과 tryptophan을 사용하여 각각의 최종 농도를 10 mM로 한 다음 아미노산을 넣어주지 않은 것과의 활성도를 비교하여 결정하였다.

결과 및 고찰

효소의 순수분리

균체생산물 배지에서 glutamine synthetase의 활성은 지수생장 말기 이후에 최대치를 보이므로 접종 후 90시간 정도 배양하여 세포를 수확하였다. 얻어진 조효소(crude extract)에는 광합성 색소를 포함하는 세포조각들이 많이 존재하고 있으므로 원심분리하여 광합성 색소의 양을 줄인 후, DEAE-Sepharose CL-6B 이온교환 크로마토그래피의 시료로 용출한 결과 NaCl 0.24~0.38 M에 해당되는 분획에서 효소활성도가 나타났다. 이 분획들을 농축한 다음 Sephacryl

Table 1. Purification step of glutamine synthetase from *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327

Purification Step	Total Protein (mg)	Enzyme Activity (unit)	Specific Activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification Fold
Crude Extract	651.00	8659.00	13.30	100.00	1.0
Ultracentrifugation	238.00	6966.00	29.30	80.45	2.2
DEAE-Sepharose CL-6B Chromatography	13.00	916.40	70.49	10.6	5.3
Sephacryl S-300 Chromatography	3.25	684.40	199.50	7.50	15.0
Preparative HPLC Chromatography	0.28	173.20	615.80	2.0	46.3

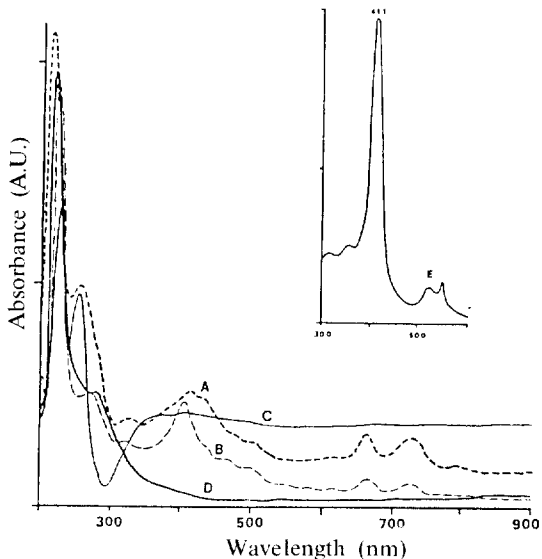


Fig. 1. UV-visible absorption spectra of enzyme fractions after ion exchange chromatograph (B), gel filtration chromatograph (C), preparative HPLC (D), and that of cytochrome C (E) compared with that of crude enzymes (A).

S-300 젤여과 크로마토그래피하였다. 이 중에서 활성도가 나타난 분획들을 모아 분취용 고속액체 크로마토그래피한 결과 NaCl 0.31~0.35 M에 해당하는 분획에서 효소활성도가 나타났다. 이 중에서 활성도가 나타난 분획들을 모아 효소의 특성을 분석하기 위한 시료로 사용하였다. 위의 과정을 통해 효소를 분리하였을 때 수율은 2%. 정제배수(purification fold)는 46.3배 증가하였다(Table 1). 컬럼상에서 효소의 특징을 보면, DEAE-Sepharose CL-6B 이온교환 크로마토그래피에서 이 효소는 pH 8.3 이상에서도 컬럼에 부착되어 있고 높은 염 농도(300 mM NaCl)에서 용출되는 것으로 보아 산성 단백질임을 알 수 있었고, Sephacryl S-300 젤여과 크로마토그래피 결과 앞쪽에서 효소활성이 최대치를 보이는 것으로 보아 분자량이 큰 단백질임을 추정할 수 있었다.

효소의 순수분리 확인

조효소(crude extract)에 대한 분광학적 분석결과 (Fig. 1A) 광합성색소(세균엽록소 a, d 및 chlorobactene) 스펙트럼이 강하게 나타났으나 이온교환 크로마토그래피(Fig. 1B)와 젤여과 크로마토그래피 (Fig. 1C)를 거친 후에는 이들 스펙트럼이 약해진 반면 cytochrome 스펙트럼(410 nm)이 강하게 나타났다 (Fig. 1E). 그러나, 분취용 액체크로마토그래피 결과 이들이 사라진 스펙트럼을 얻을 수 있었고(Fig. 1D), 아울러 각 단계를 거쳐 분리정제한 단백질을 non-dissociating polyacrylamide gel 전기영동에서 전개하여 살펴본 결과 단일 단백질띠를 관찰할 수 있었으므로, 이러한 결과를 종합해 볼 때 glutamine syn-

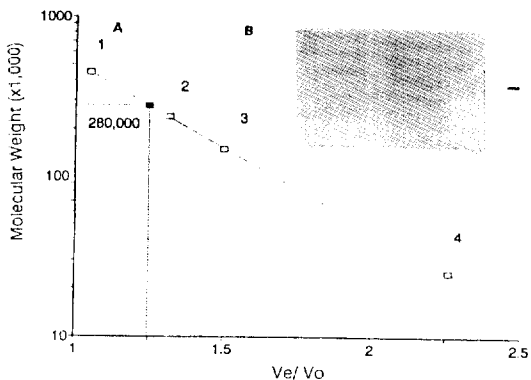


Fig. 2. Nondissociating polyacrylamide gel electrophoresis of glutamine synthetase (A) and molecular weight estimation of glutamine synthetase by Sephacryl S-300 (B). Molecular weight markers were used 1 (ferritin: 450,000), 2 (catalase: 240,000), 3 (alcohol dehydrogenase: 150,000), and 4 (chymotrypsinogen A: 25,000).

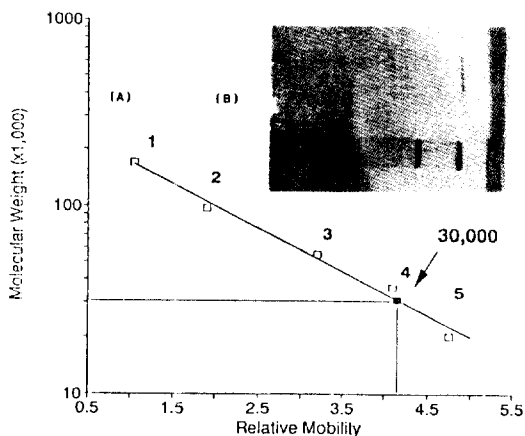


Fig. 3. SDS-linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis of glutamine synthetase (A) and molecular weight estimation of glutamine synthetase from SDS-linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis (B). Molecular weight markers were used 1 (α_2 -macroglobulin: 170,000, reduced), 2 (phosphorylase: 97,500), 3 (glutamate dehydrogenase: 55,400), 4 (lactate dehydrogenase: 36,500), and 5 (trypsin inhibitor: 20,100).

thetase가 순수분리되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2 B).

효소의 분자량 결정

표준단백질의 V_e/V_o (V_e : 용출부피, V_o : void 부피)값에 대해 분자량의 상용대수값을 대응시켜 얻은 일차회귀곡선을 표준곡선으로 사용하여, 젤여과 크로-

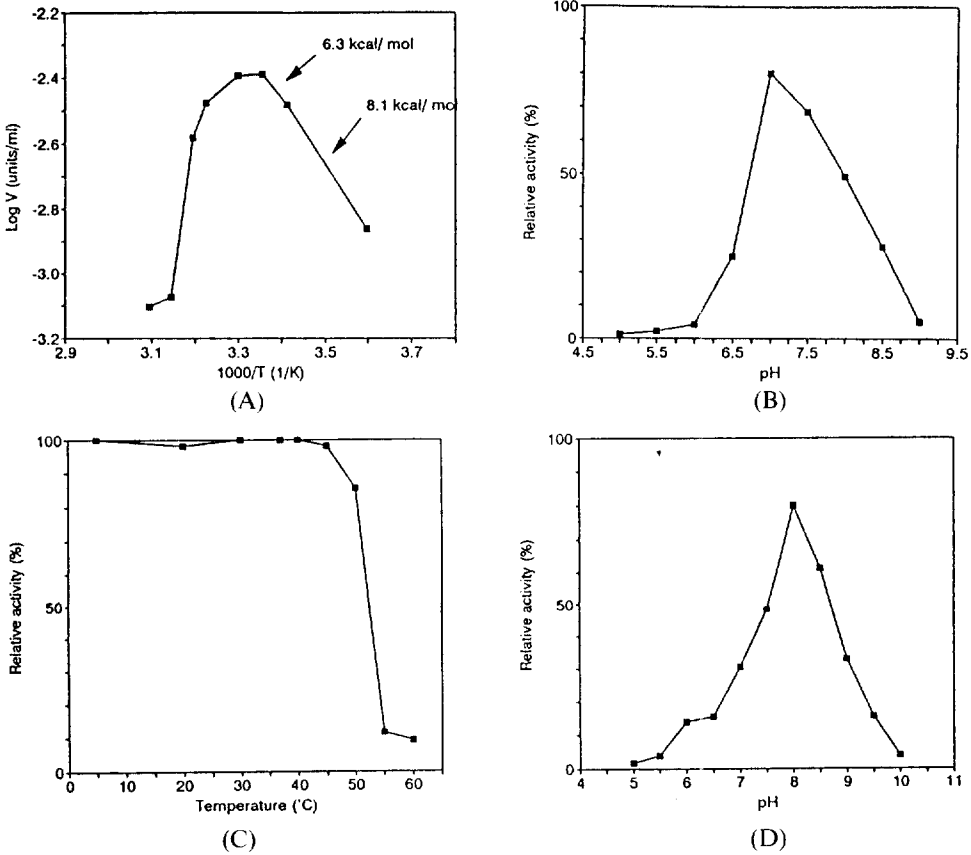


Fig. 4. Arrhenius plot (A), optimal pH, thermal stability (C) and pH stability of glutamine synthetase (B). 0.1 M citrateborate-phosphate buffer was used for pH 5~10.

마토그래피로 이 효소의 분자량을 측정한 결과 약 280,000 Da인 것으로 추정되었다(Fig. 2A). Acrylamide 농도가 5~10%인 겔상에서 표준단백질들을 이용하여 얻은 표준곡선을 사용하여, 순수분리된 효소로 SDS-linear polyacrylamide gradient gel 전기영동을 실시한 결과, 겔상에서 효소는 단일띠로 나타났고 분자량은 30,000 Da임을 알 수 있었다(Fig. 3). 이상의 결과를 종합하여 볼 때 이 효소는 약 30,000 Da 정도의 동일한 10개의 단위체(decamer)로 구성된 것으로 추정되며, 이러한 결과는 *Rhodopseudomonas capsulata*(4), *Rhodopseudomonas palustris*(1)와 *E. coli*(20)에서 glutamine synthetase가 12개의 동일한 단위체(dodecamer)로 구성되어 있다는 보고와 차이가 있지만, *Rhodospirillum rubrum*에서 이 효소가 10개의 동일한 단위체로 구성되어 있다는 결과와 일치한다(21).

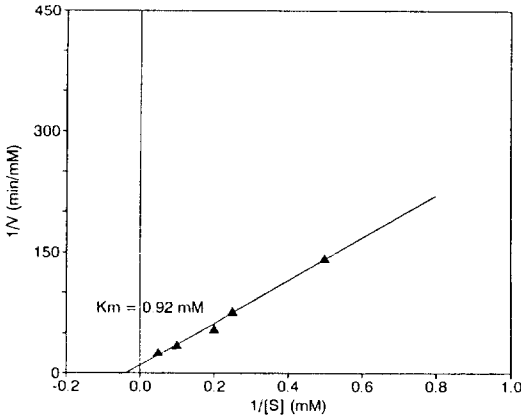
효소활성에 대한 온도와 pH의 영향

효소활성에 대한 온도의 영향을 알아본 결과 효소활성은 30°C에서 높게 나타났다. 이것에 대한 Arrhenius plot을 한 결과 활성화에너지가 5~20°C에

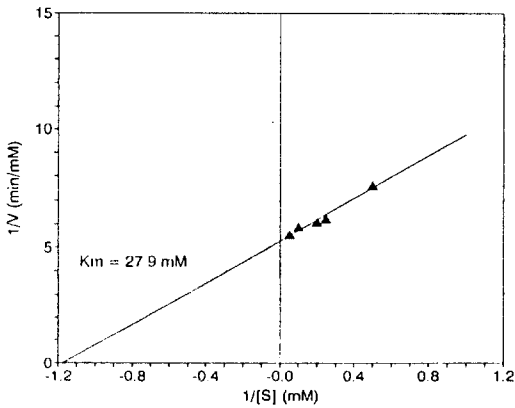
서는 8.1 kcal/mol, 20~25°C에서는 6.3 kcal/mol이었다(Fig. 4A). 효소활성에 대한 pH의 영향을 알아본 결과 최적 활성은 pH 7.0에서 나타났다(Fig. 4B). 온도에 대한 효소의 안정성을 알아본 결과 효소활성은 50°C까지 비교적 안정된 상태를 보여주고 있으며(Fig. 4C), pH에 대한 효소의 안정성은 pH 8.0에서 효소활성이 가장 안정된 상태를 보여주고 있다(Fig. 4D).

효소활성에 대한 아미노산의 영향

Glutamine synthetase의 γ -glutamyl transferase 활성에 관여하는 두 기질인 L-glutamine과 hydroxylamine에 대한 Lineweaver-Burk plotting을 실시한 결과 각각에 대한 Km값이 27.9 mM과 0.92 mM이었다(Fig. 5). 여러 아미노산에 대한 glutamine synthetase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 tryptophan에 대한 저해도가 62%로 가장 크게 나타났으며 glycine과 alanine에 의해서도 상당한 저해를 받는 것으로 나타났다. 반면 asparagine, lysine, leucine, valine 등은 이 효소의 활성에 거의 영향을 미치지 않았다(Table 2). 이러한 결과는 다른 녹황색



A



B

Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of glutamine synthetase for L-glutamine (A) and hydroxylamine-HCl (B).

Table 2. Effects of amino acids on the purified glutamine synthetase activity.

Substrate (10 mM)	Relative activity (%)	Inhibition rate (%)
None	100	0
Asparagine	100	0
Lysine	100	0
Leucine	100	0
Valine	100	0
Glycine	70	30
Alanine	57	43
Tryptophan	38	62

세균에서 나타난 결과와 유사하다(12). 60 mM Mg⁺²에 의해 효소활성은 65%의 저해를 받고 있으며, γ -glutamyl transferase 활성측정법에 의해 측정된 효소의 활성은 50 mM NH₄Cl과 L-glutamine에 의해 각각 21%와 18%의 저해를 받고 있다. 이러한 결과는

Anabaena cylindrica, *Nitrosomonas europaea*와 *C. vibrioforme f. thiosulfatophilum*으로부터 분리된 효소에서의 결과와 일치하며, Gass와 Meister(8)가 제시한 모델인 'L-glutamine의 아미노그룹이 암모니아 부착 부위를 차지할 수 있도록 L-glutamine과 효소가 반응하며, L-glutamine의 산소가 부착하는 부위에는 glutamate가 부착된다'는 것을 뒷받침하고 있다.

사 사

본 연구는 1992년도 서울대학교 대학발전기금의 지원을 받아 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Alef, K., H.-J. Burkardt, H.-J. Horstmann and W. G. Zumft, 1981. Molecular characterization of glutamine synthetase from the nitrogen-fixing phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z. Nat* 36(c), 246-254.
2. Alef, K.E. and W.G. Zumft, 1981. Regulatory properties of glutamine synthetase from the dinitrogen fixing phototrophic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris*. *Z. Nat* 36(C), 784-789.
3. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method of the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
4. Caballero, F.J., F.J. Cejudo, F.J. Florencio, J. Cardenas and F. Castillo, 1985. Molecular and regulatory properties of glutamine synthetase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* EIF1. *J. Bacteriol.* 162, 804-809.
5. Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis II : method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 121, 404-427.
6. Engelhardt, H. and J.H. Klemme, 1982. Purification and structural properties of adenylated and deadenylated glutamine synthetase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 133, 202-205.
7. Falk, G., B.C. Johansson and S. Nordlund, 1982. The role of glutamine synthetase in the regulation of nitrogenase activity ("switch off" effect) in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* 132, 251-253.
8. Gotto, J.W. and D.C. Yoch, 1985. Regulation of nitrogenase activity by covalent modification in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 141, 40-43.
9. Heda, G.D. and M.T. Madigan, 1986. Aspects of nitrogen fixation in *Chlorobium*. *Arch. Microbiol.* 143, 330-336.
10. Johansson, B.C. and H. Gest, 1977. Adenylation/deadenylation control of the glutamine synthetase of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 81, 365-371.
11. Keppen, O.I., N.V. Lebedeva, S.A. Petukhov and Y.V. Rodionov, 1985. Nitrogenase activity in the

- green bacterium *Chlorobium limicola*. *Microbiol.* **54**, 28-32.
12. **Khanna, S. and D.J.D. Nicholas**, 1983. Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from *Chlorobium vibrioforma f. thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* **134**, 98-103.
 13. **Lambin, P.C.**, 1978. Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. *Ann. Biochem.* **85**, 114-123.
 14. **Lee, H.J.**, 1986. Regulation of nitrogen fixation and ammonia assimilation in *Rhodospseudomonas sphaeroides* D-230 Ph. D. theses in SNU.
 15. **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.
 16. **Michalski, W.P., D.J.D. Nicholas and P.M. Vignais**, 1983. ¹⁴C-labelling of glutamine synthetase and Fe protein of nitrogenase in toluene-treated cells of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Bioch. Biophys. Acta.* **743**, 136-148.
 17. **Na, J.-U. and S.-O. Kang**, 1992. Factors affecting hydrogen evolution in *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 553-557.
 18. **Na, J.-U. and S.-O. Kang**, 1992. Light-dependent hydrogen production in *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327: a possibility of regulation via glutamine synthetase. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 558-563.
 19. **Nordlund, S., R.H. Kanemoto, S.A. Murre and P. W. Ludden**, 1985. Properties and regulation of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **161**, 13-17.
 20. **Shapiro, B.M. and E.R. Stadtman**, 1970. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). 910-922. In: *Methods in Enzymology* (Vol. 17A), Tabor H. and C.W. Zabor (ed.), Academic Press, New York and London.
 21. **Soliman, A. and S. Nordlund**, 1989. Purification and partial characterization of glutamine synthetase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Bioch. Biophys. Acta.* **994**, 138-141.
 22. **Stadtman, E.R. and A. Ginsberg**, 1974. The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. 755-807. In: *The Enzymes* (Vol. 10), Boyer, P.D.(ed.), Academic Press, New York and London.
 23. **Woehle, D.L., B.A. Lueddecke and P.W. Ludden**, 1990. ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum in vitro*. *J. Biol. Chem.* **265**, 13741-13749.
 24. **Yoch, D.C, M. Cantu and Z.M. Zhang**, 1983. Evidence for a glutamine synthetase chromatophore association in the phototroph *Rhodospirillum rubrum*: purification, properties and regulation of the enzyme. *J. Bacteriol.* **154**, 632-639.

(Received December 3, 1992)

(Accepted December 18, 1992)

ABSTRACT: Purification and Some Properties of Glutamine Synthetase Isolated from *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327

Na, Jong-Uk, Ji-Yoon Kim, Hwan Youn and Sa-Ouk Kang (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

A green sulfur bacterium, *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327, was grown in modified Pfennig's medium including glutamate as a nitrogen source. Glutamine synthetase was isolated through a series of ultracentrifugation, DEAE-Sephacryl CL-6B ion exchange chromatography, Sephacryl S-300 gel permeation chromatography, and preparative HPLC. The recovery and purification fold of the enzyme were 2% and 46.3, respectively. The isolated enzyme was homogeneous on UV-Visible spectrum and polyacrylamide gel electrophoretogram. The relative molecular mass of the native enzyme was estimated to be 280,000 by gel permeation chromatography. The enzyme consisted of ten subunits with relative similar molecular mass, 30,000, which was estimated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimal temperature and pH of the enzyme were 30°C and 7.0. Km values were 27.9 mM for L-glutamine and 0.92 mM for hydroxylamine-HCl. The enzyme activity was inhibited by alanine, glycine, and tryptophan considerably, but was not affected by asparagine, lysine, leucine, and valine.