

*Corynebacterium glutamicum*에서 분리된 프로모터를 이용한 메치오닌 생합성 유전자의 조절해제

박수동 · 박익현 · 최종수¹ · 김일권¹ · 김연희² · 이흥식^{3*}

고려대학교 생명공학원, ¹한국 BASF 기술연구소, ²세명대학교 한의과대학 한의학과,
³고려대학교 과학기술대학 생명정보공학과

*Corynebacterium glutamicum*에서 promoter-probe vector인 pSK1Cat을 이용해 분리된 프로모터를 함유하는 단편들 중 가장 높은 활성을 나타낸 P₁₉ 단편에 대한 심도 있는 분석을 수행하였다. Subcloning을 실시하여 프로모터 활성을 지닌 DNA 영역을 180 bp로 압축할 수 있었고 (P₁₈₀), 이를 *C. glutamicum*의 균주개량 측면에서 그 활용성을 분석하였다. *C. glutamicum*에서 메치오닌 생합성에 관여하는 *metX* 유전자의 메치오닌에 의한 repression을 해제시키기 위하여 *metX* 유전자의 promoter를 P₁₈₀ promoter로 교체하였고(P₁₈₀-*metX*), P₁₈₀-*metX*를 *C. glutamicum*에 도입하여 발현되는 homoserine acetyltransferase 활성을 다양한 성장 조건에서 측정하였다. MB 영양배지에서 배양하는 경우 P₁₈₀-*metX*를 함유하는 균주는 wild type보다 약 24배 높은 homoserine acetyltransferase 활성을 나타내었다. Tac 프로모터에 연계하는 경우 (P_{lac}-*metX*), 약 13배의 활성 증가만이 관찰되었다. 최소배지에서 배양한 후 분석한 결과, P₁₈₀-*metX*에서의 발현양상은 배지에 첨가된 methionine에 의해 영향받지 않음을 확인하였는데, 이는 P₁₈₀ 단편이 생합성 유전자의 derepression에 의한 아미노산 생산균의 개량에 효율적으로 이용될 수 있음을 의미한다. P₁₈₀-*metA*를 라이신 생산균에 도입하는 경우 최대 약 0.8 g/l의 메치오닌이 생산됨을 확인하였다.

Key words □ *Corynebacterium glutamicum*, homoserine acetyltransferase, *metX*, methionine, promoter

*Corynebacterium glutamicum*은 Gm 양성균이며 glutamic acid와 lysine과 같은 아미노산들을 생산하는 균으로 널리 알려져 있다(2, 4, 12, 22, 24). 아미노산 및 핵산과 같은 대사산물의 생산에 있어서 *C. glutamicum*의 산업적인 중요성에도 불구하고 유전자적 특성은 많이 밝혀졌지만, 그 유전자발현을 조절하는 프로모터에 대한 정보는 아직까지도 미흡한 수준이며, 일반적인 프로모터의 구조와 전형적인 프로모터보존 서열 또한 확립되어 있지 않은 상태이다. 따라서 아미노산 생산을 위하여 생합성 목표유전자를 증폭하고 외래 유전자를 도입하는 유전공학 기술을 이용하여 transcriptional level에서 목표유전자를 통제하기 위해서는 우수한 프로모터의 확보와 그 특성이 규명되어야 하는 것이 선결과제이다.

세균의 프로모터는 -10, -35 그리고 UP 영역 등 3개의 요소로 구성되어 있다(7, 20, 21). 요소 -10과 -35는 RNA polymerase holoenzyme의 σ subunit에 의해서 인지되며(7, 20), UP 요소는 core enzyme의 σ subunit의 C-terminal 영역에 의해서 인지된다(11, 21). *E. coli*의 -10과 -35 영역은 각각 TATAAT와 TTGACA의 보존서열을 가지고 있으며(7, 20), UP 요소는 2개의 AT rich region으로서 -40과 -60 사이에 위치해있다(11, 21). 요소 -10의 상부에 TG motif도 존재하며, -10과 -35 사이의 거리는 17±1

bp 정도 분리되어 있다(7).

*C. glutamicum*에서의 유전자 발현과 조절을 위해 현재까지 널리 이용되고 있는 프로모터는 *E. coli*에서 유래한 것들로서 발현 정도가 높고 조절 가능한 프로모터인 P_{lac}, P_LP_R과 T₇ 등이 있다(3, 8, 16). 그러나 이들 프로모터는 *C. glutamicum*내로 도입시 발현량이 현저히 감소하거나 불안정한 발현 양상을 보이기도 하여 많은 양의 발현이 필요한 경우에는 그 역할을 충분히 수행하지 못하는 것으로 알려져 있다. Pátek 등은 pEKpIcM promoter-probe vector를 이용하여 *C. glutamicum* chromosome과 phage로부터 33개의 프로모터를 수집 및 분석하여 -35의 ttGcca와 -10의 TanaaT를 보존서열로 주장하였다(16). 이들 motif는 다른 Gm 양성균과 Gm 음성균(*E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*)에서 발견된 -35와 -10위치의 프로모터 서열과 비교하여 -35의 서열이 -10의 서열보다 낮은 보존성을 보이지만, 이러한 결과는 *C. glutamicum*에서 다른 균들과 약간의 차이를 보이는 프로모터 보존서열의 존재가능성을 확인시켜주고 있다(17, 18, 19). 이렇듯 GC 함량이 높은 *C. glutamicum*의 promoter는 AT 함량이 높은 Gm 양성균보다 -35, -10서열의 보존성이 낮다는 사실은 이미 알려져 있다(18, 19). 이러한 *C. glutamicum*의 promoter에 대한 많은 연구결과가 *C. glutamicum*의 promoter의 구조에 관한 일부 정보를 제공하기는 하였지만 그의 활용을 위한 세부정보와 다양한 기능의 promoter의 정보 그리고 그 보존서열에 대한 확립을 위한 정보를 제공하는 수준에는 아직 이르지 못하고 있다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-3290-3436, Fax: 02-3290-3436
E-mail: hlee@korea.ac.kr

본 연구에서는 *C. glutamicum*에서 효율적으로 이용될 수 있는 프로모터 중 활성이 강한 프로모터를 선택해 이에 대한 심도있는 분석을 수행하였다. 특히 메치오닌 생합성의 첫 단계를 매개하는 *metX* 유전자를 이 프로모터에 연계해 그 응용성을 분석하였고, 동시에 메치오닌 생산에 미치는 영향도 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

일상적인 형질전환 및 유전자 조작을 위해 *Corynebacterium glutamicum* AS019E12, *Escherichia coli* DH5 α F를 이용하였다 (Table 1). *C. glutamicum*은 일상적인 경우에 영양배지인 MB 배지(3)에서 배양 하였으며, 필요시에는 최소배지로서 MCGC 배지 (5, 27)를 사용하여 30°C에서 배양하였으며 경우에 따라서 kanamycin을 15 μ g/ml 혹은 chloramphenicol 10-50 μ g/ml 농도로 첨가하여 사용하였다. 최소배지의 배양에 사용된 탄소원은 1% glucose 를 이용하였고, *E. coli*의 경우 영양배지로는 LB 배지를 사용하였으며 필요시 M9 최소배지(23)를 이용하여 배양하였다.

DNA 조작

기본적인 DNA조작은 Molecular Cloning에 기재된 방법으로 수행하였다(23). *C. glutamicum*의 형질전환은 Follettie의 방법을

이용하였다(5). *C. glutamicum*으로부터의 plasmid DNA의 분리는 Yoshihama(27) 방법을 따랐다. 염기 서열 결정은 기초과학지원 연구소(대전)에 의뢰하여 결정하였다. 염기서열 결정에는 프라이머 A와 B (Table 1)를 이용하였다. 결정된 염기서열 및 주변 서열 정보는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 이용하였다.

플라스미드의 제작

플라스미드 pSK1P_{tac}-*metX*는 다음과 같이 제작되었다. 플라스미드 pSL75의 *metX* 유전자를 프라이머 C와 D (Table 1)를 이용해 증폭하였고, 증폭된 1.2 kb의 단편을 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단한 후 같은 효소로 절단된 pKK223-3 벡터에 삽입해 플라스미드 pSL314를 제작하였다. P_{tac}-*metX*를 함유하는 플라스미드 pSL314의 1.4 kb *BamHI*-*PstI* 단편을 분리해 이를 같은 제한효소로 절단된 pSK1Cat 벡터에 삽입하였다. 마지막으로 플라스미드의 1.5 kb *cat* 유전자를 *KpnI*과 *PstI*으로 절단해 제거하였고 벡터를 T4 DNA polymerase로 처리한 후 재결합시켜 P_{tac}-*metX* 클론을 완성하였다.

플라스미드 pSK1P₁₈₀-*metX*는 다음과 같이 제작하였다. 플라스미드 pSK1CatP₁₉의 P₁₉의 프로모터인 약 180 bp 영역을 프라이머 E와 F를 이용해 증폭하였고, 이를 *BamHI*과 *PstI*으로 절단한 후 같은 효소로 절단된 pSK1Cat에 삽입하여 pSK1CatP₁₈₀을 완성하였다. 플라스미드 pSL75의 *metX* 유전자를 프라이머 G와 H

Table 1. Bacterial strains, plasmids, and primers

Strains	Genotypes or phenotypes ^a	Source or references
<i>E. coli</i> DH5 α F	Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-,mk+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169,	Bethesda Research Laboratory
<i>C. glutamicum</i> AS019E12	Restriction-deficient variant of AS019	8
<i>C. glutamicum</i> MH20-22B	Lysine producing mutant, feedback inhibition resistant aspartate kinase, isopropyl-malate dehydratase negative	15
Plasmids		
pSK1Cat	Corynebacterial promoterless <i>cat</i> fusion vector; Km ^R , 6.3 kb	20
pSK1CatP _{tac}	pSK1Cat with 267 bp insert carrying P _{tac}	20
pSK1CatP ₁₉	pSK1Cat with 2.8 kb insert carrying a corynebacterial promoter	20
pSL360	pSK1Cat with 180 bp insert carrying promoter region subcloned from pSK1Cat19	This study
pKK223-3	<i>E. coli</i> expression vector carrying P _{tac} , Km ^R	Pharmacia Biotech.
pMT1	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector; Km ^R , Ap ^R , 6.6 kb	7
pSL365	pSK1Cat carrying 1.4 kb <i>BamHI</i> - <i>PstI</i> fragment of pSL314, P _{tac} - <i>metX</i> , Km ^R , 6.2 kb	This study
pSL366	pSK1Cat carrying 1.2 kb PCR fragment of <i>metX</i> P ₁₈₀ - <i>metX</i> , Km ^R , 6.2 kb	This study
Primers		
A	5- GGAAGATCTTTCAAGAATTCCCAGGCA -3 (<i>Bgl</i> III)	This study
B	5- GGGGTACCTACCGTATCTGTGGGGGG -3 (<i>Kpn</i> I)	This study
C	5- TAGAATTCATGCCACCCCTCG -3 (start codon for <i>metA</i>)	This study
D	5- TACTGCAGGAGATCCCCTGTCT -3	This study
E	5- GCGGATCCTAATAAAGGTGGAGAA3-3 (<i>Bam</i> HI)	This study
F	5- GTCGAAGCTCGGCGGATTTG -3	This study
G	5- GCCTGCAGAGGATTTTCATGCC3-3 (<i>Pst</i> I, italics indicate RBS and start codon for <i>metA</i> , respectively)	This study
H	5- GGGGTACCTGTCTATTTGTCGT3-3 (<i>Kpn</i> I)	This study

^aR superscripts indicate resistance. Ap, ampicillin Km, kanamycin.

^bUnderlined sequences indicate recognition sites for restriction enzymes as shown in parentheses.

를 이용해 증폭하였고, 이를 *Pst*I과 *Kpn*I으로 절단한 후 같은 효소로 절단해 *cat* 유전자가 제거된 pSK1CatP₁₈₀에 삽입하여 P₁₈₀-*metX* 클론을 완성하였다.

효소활성의 측정

Crude extract는 Jetten과 Sinskey (8)의 방법에 의해 제작되었고, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 활성은 Shaw 등의 (25) 방법에 의해 측정하였다. 반응액은 100 mM Tris · Cl pH7.8, 1 mM DTNB, 0.1 mM acetyl-CoA, 0.25 mM chloramphenicol, 그리고 적절한 양의 효소로 구성되었다. 흡광도의 변화는 412 nm에서 측정하였다. Homoserine acetyltransferase (*metX*)의 활성은 Park 등에 의해 기술된 방법에 따라 측정하였다(14). 단백질 정량은 기술된 방법을 따랐다(1).

발효조건

분석을 원하는 균주를 2% glucose가 함유된 CGIII 영양배지 (12) 4 ml에서 전배양하였다. 균주가 stationary phase에 진입하는 시점 (약 20시간)에서 15 ml CGIII 영양배지를 포함한 250 ml baffled flask에 1/100 (v/v)의 비율로 접종 하였다. 약 20시간 배양 후 균주가 정제기에 진입하는 시기에 균체를 회수하여, 초기 균체 농도 OD₆₀₀에서 1이 되도록 60 ml의 CGX fermentation 최소배지(2, 24)을 함유한 500 ml baffled flask에 접종하여 flask scale의 fermentation을 실시하였다. 30°C, 250 rpm의 조건에서 배양하면서 정제기 후반, 사멸기 초반까지 일정시간의 간격을 두고 배양액 1 ml 씩 회수하였다. 회수한 배양액 일부로 균체의 성장을 확인한 후 나머지는 15,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 균체와 상등액을 분리, 수거하였다. 시간별로 거둔 상등액은 HPLC 분석을 위한 유도체화를 하기 직전까지 -20°C에 보관하였다.

아미노산의 분석

Micro tube에 위에서 준비한 배양액의 상등액(unknown sample)과 각 아미노산의 정량, 정성 분석을 위하여 Amino Acid Standard H (PIERCE, USA)를 각각 25 µl씩 첨가하였다. 그 후 각각에 처리 과정 중의 손실이나 변성 등을 추정할 수 있는 근거가 되는 internal standard로 10 mM DL-norleucine을 동량 첨가하였다. 또한 이때 특정 아미노산의 정량, 정성 분석을 위해서 각 아미노산을 농도별 (1~8 mM)로 제조하여 동일한 유도체화 과정을 거친후, standard curve를 만들어 분석하였다. Rotary vacuum oven을 이용하여 완전히 건조시킨 후, 각각의 시료에 re-dry solution을 가한 후, sonicator를 이용해 완전히 용해하였다. 이를 다시 rotary vacuum oven을 이용하여 완전히 건조하였다. 사용 직전에 phenylisothiocyanate (PITC)를 함유한 derivatizing solution을 만든 후 각 tube에 20 µl씩을 가하고 10분간 sonication에 의해 용해하였다. Rotary vacuum oven에서 1시간 동안 건조시켜 HPLC를 이용한 분석 직전까지 -20°C에서 공기 중의 수분과 차단하여 저장하였다. 유도체화가 끝난 각각의 시료들을 diluent solution으로 희석하여 Nova-pak C18 Column

(Waters Corporation, Massachusetts, USA)을 통해 분리 및 탐지 하였다. 농도 기술기는 기초과학연구원 연구소의 아미노산 분석조건을 모델로 하여 이를 변형하여 작성하였다. HPLC pump와 UV detector는 각각 영린기기(Kyong-ki, Korea)의 영린 SP930D 용매 이송펌프와 같은 회사의 영린 UV730D 검출기를 사용하였다.

결과 및 고찰

프로모터 단편 P₁₉의 분석

Promoter-probe vector인 pSK1Cat은 프로모터가 없는 chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) 유전자 및 이 유전자의 상부에 적절한 제한효소 자리를 갖고 있어 프로모터 활성을 갖는 DNA 단편의 분리에 이용될 수 있다(15). Park 등은(15) 이 벡터를 이용하여 일련의 프로모터 활성을 갖는 단편들을 *C. glutamicum*으로부터 분리하였는데, 본 연구에서는 분리된 클론들 중 가장 높은 활성을 보인 P₁₉ 클론을 선택해 이에 대한 심도있는 분석을 수행하였다.

P₁₉는 약 2.8 kb의 단편으로서 이에 대한 염기서열분석 결과 왼쪽 5' 쪽에는 dihydroliipoamide dehydrogenase/glutathione oxidoreductase를 발현하는 *gorA* 유전자의 C-말단 부분의 369개의 base를 함유하는 것으로 판명되었다(Fig. 1). P₁₉ 클론의 오른쪽 3' 부분은 hypothetical membrane protein의 프로모터로 여겨지는 부분이 함유되어 있다. 염기서열을 분석한 결과 -10과 -35에 각각 TAGACT와 TTTCCA가 발견되었는데 이들은 염기서열의 유사성에 비추어 hypothetical membrane protein의 프로모터로서 작용할 것으로 예상되었다. 그러나, 이들 서열이 실제로 프로모터로 작용할 것인지는 보다 심도있는 연구에 의해 증명되어야 할 것이다.

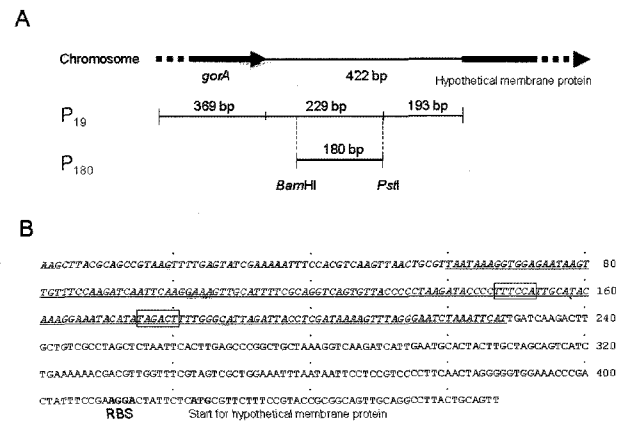


Fig. 1. Map of the P₁₉ clone and its subclone P₁₈₀ (Panel A). Sequence information near the cloned fragments was from the *C. glutamicum* ATCC13032 genome sequence. The sequences in italics (Panel B) represent the 229 bp sequence in P₁₉. The underlined sequences represent the 180 bp sequence in P₁₈₀. Additional sequences are from *C. glutamicum* ATCC13032 genome sequence. The ribosome binding site (RBS) and the start site for the hypothetical membrane protein are shown. The boxes indicate the putative -10 and -35 regions.

P_{19} 에 대한 최소 단위의 프로모터 활성 부위를 결정하기 위하여 subcloning을 실시하였다. Subcloning 결과, 프로모터 활성을 그대로 유지하며 또한 본래 pSK1CatP19 클론 보다도 오히려 약간 높은 수준의 CAT 활성을 나타내는 0.6 kb 절편을 함유하는 클론을 분리하였고, 계속된 subcloning을 통해 강력한 프로모터 활성을 보이는 180 bp의 절편 P_{180} 을 획득하였다(Fig. 1).

P_{180} 에 의한 *metX*의 조절해제

최소단위로 제작된 P_{180} 의 활성 가능성을 *C. glutamicum*의 메치오닌 생합성에 관여하는 *metX* 유전자를 이용하여 확인하였다. *C. glutamicum*의 *metX* 유전자는 메치오닌 생산경로에서 homoserine을 acetylhomoserine으로 전환시켜주는 homoserine acetyltransferase (HAT)를 발현하는 유전자로, 메치오닌에 의해 강한 repression을 받고 있는 것으로 보고되어 있다(6, 9, 14). *C. glutamicum metX* 유전자의 프로모터 부위를 P_{180} 으로 교체한 뒤, HAT 효소 활성을 측정하여 *metX* 유전자의 조절기작 해제를 확인하였다(Table 2).

프로모터 영역이 교체된 *metX* 유전자를 pSK1(pSK1Cat에서 *cat* gene이 deletion된 vector)에 클로닝하여 *C. glutamicum* AS019E12에서 *metX* 유전자의 발현에 의한 HAT 활성을 측정하였다. MB 영양배지에서 P_{tac} 을 함유한 pSL365 clone의 경우 약 240 unit의 효소활성을 나타내었고, P_{180} 을 함유하는 pSL366의 경우에는 이의 약 2배에 해당하는 440 unit의 효소활성을 나타내었다(Table 2). MCGC 최소배지에서는 본래의 *metX* 프로모터의 경우 repressing 조건과 derepressing 조건에서 약 20배의 활성 차이를 나타낸 반면에, P_{tac} 과 P_{180} 프로모터를 함유하는 *metX* 유전자는 2배 정도의 활성 차이만을 나타내었다. 이는 본래의 *metX* 프로모터가 메치오닌 등의 아미노산이 다량으로 함유된 배지에서 강력한 repression을 받는 반면, P_{tac} 프로모터와 P_{180} 프로모터는 메치오닌 등의 아미노산이 다량으로 함유된 배지에서 repression을 받지 않거나 혹은 최소 수준의 repression 받는다는 사실을 보여주며, 또한 P_{180} 프로모터를 가진 *metX* 클론이 MCGC 최소배지와 MB 영양배지에서 모두 발현되고 강한 HAT 활성을 가짐으로써 P_{180} 프로모터가 성장 단계에서 일정 하게 항상 발현된다는 사실을 함께 나타내는 것으로 여겨진다. 또한 *E. coli*에서 강력한 프로모터 중의 하나로 알려진 P_{tac} 보다 2배 정도

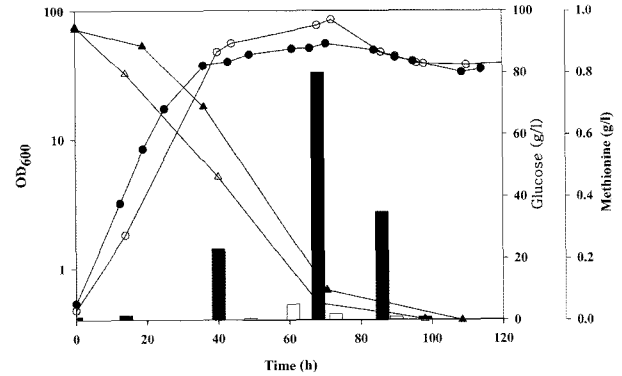


Fig. 2. Fermentation analysis. All strains were grown in CGX medium (3). Bars indicate methionine concentration. Triangle indicate residual glucose concentration in medium. Symbols: ●·▲, *C. glutamicum* MH20-22B; ○·△, *C. glutamicum* MH20-22B/pSL366; open bar, *C. glutamicum* MH20-22B; filled bar, *C. glutamicum* MH20-22B/pSL366.

강한 HAT 활성을 나타내는 것으로 확인 되었는데, 이는 P_{180} 의 이용가능성을 증대시켜 주는 것으로 판단된다. 대부분의 발효공정이 대사산물에 의하여 배지 내에 아미노산을 다량 함유하고 있는 조건에서 수행되므로 메치오닌에 의한 repression을 받지 않는 P_{180} -*metX* clone은 아미노산 생산을 위한 발효공정에서 유전자의 증폭에 유용하게 이용 될 것으로 판단되었다.

P_{180} 의 활용성 분석

아미노산 라이신 생산균으로 알려진 *C. glutamicum* MH20-22B를 이용하여 분리된 P_{180} 프로모터 단편의 유용성을 확인하였다. *C. glutamicum* MH20-22B는 1992년 Schrupf 등(24)에 의해 개발된 라이신 생산균으로, aspartate로부터 β-aspartate phosphate로의 전환을 담당하는 aspartate kinase의 feedback inhibition이 해제됨으로서 약 200 mM의 라이신을 생산하는 균으로 알려져 있다(24). P_{180} -*metX*를 *C. glutamicum* MH20-22B에 형질전환한 후 메치오닌 생산량의 변화를 관찰하였다(Fig. 2). *C. glutamicum* MH20-22B 균 자체는 메치오닌을 거의 생산하지 않지만 P_{180} -*metX*를 도입하는 경우 메치오닌의 생산량이 최대 약 0.8 g/l에 달함을 확인할 수 있었다. 메치오닌의 생산의 최대량에 도달한 후 급격한 감소가 일어나는데 이는 메치오닌이 재흡수 될 수 있음을 암시한다. 또한 methionine 생산은 탄소원의 소비 와도 밀접한 관계가 있음을 암시한다. 이러한 결과는 P_{180} 프로모터 단편의 효용성을 확인 시켜줌과 동시에 P_{180} 을 이용한 특정 metabolite의 생산 및 생합성 유전자의 증폭에 의한 생산성 향상 등에 이 단편이 유용하게 이용될 수 있음을 의미한다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부 21C 프론티어 미생물유전체활용기술개발사업단(과제번호 MG05-0302-2-0)과 한국 바스프 (주)의 연구

Table 2. Derepression of homoserine acetyltransferase by the P_{180} clone^a

Strain	Plasmids	Homoserine acetyltransferase, nmol min ⁻¹ mg ⁻¹		
		MB	MCGC	
			-Methionine	+ Methionine ^b
<i>C. glutamicum</i> AS019E12	pSK1Cat	18	370	18
	pSL365	240	522	206
	pSL366	440	1,090	567

^aCells were grown in MB or MCGC minimal media to the stationary phase. Cell extracts were prepared as described in the Materials and Methods.

^bMethionine of 10 mM was added to the growth medium.

비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cremer, J., L. Eggeling, and H. Sahm. 1991. Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1746-1752.
- Eikmanns, B.J., E. Kleinertz, W. Liebl, and H. Sahm. 1991. A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102, 93-98.
- Follettie, M.T. and A.J. Sinskey. 1986. Recombinant DNA technology for *Corynebacterium glutamicum*. *Food Technol.* 40, 88-94.
- Follettie, M.T., O. Peoples, C. Agoropoulou, and A.J. Sinskey. 1993. Gene structure and expression of the *Corynebacterium flavum* N13. *ask-asd* operon. *J. Bacteriol.* 175, 4096-4103.
- Hwang B.J., Y. Kim, H.B. Kim, H.J. Hwang, J.H. Kim, and H.S. Lee. 1999. Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of *metB* encoding cystathionine γ -synthase. *Mol. Cells* 9, 300-308.
- Harley, C.B., and R.P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15, 2343-2361.
- Jetten, M.S., and A.J. Sinskey. 1995. Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15, 73-103.
- Lee H.S., and B.J. Hwang. 2003. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 459-467.
- Kim J.W., H.J. Kim, Y. Kim, M.S. Lee, and H.S. Lee. 2001. Properties of the *Corynebacterium glutamicum metC* gene encoding cystathionine γ -lyase. *Mol. Cells* 11, 220-225.
- Meng, W., T. Belyaeva, N.J. Savery, S.J. Busby, W.E. Ross, T. Gaal, R.L. Gourse, and M.S. Thomas. 2001. UP element dependent transcription at the *Escherichia coli* *rrnBP1* promoter: positional requirements and role of the RNA polymerase alpha subunit linker. *Nucleic Acids Res.* 29, 4166-4178.
- Menkel, E., G. Thierbach, L. Eggeling, and H. Sahm. 1989. Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 684-688.
- Paik, J.E., and B.R. Lee. 2003. Isolation of transcription initiation signals from *Corynebacterium ammoniagenes* and comparison of their gene expression levels in *C. ammoniagenes* and *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1311-1316.
- Park, S.D., J.Y. Lee, Y. Kim, J.H. Kim, and H.S. Lee. 1998. Isolation and analysis of *metA*, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Cells* 8, 286-294.
- Park, S.D., S.N. Lee, I.H. Park, J.S. Choi, W.K. Jeong, Y. Kim, and H.S. Lee. 2004. Isolation and characterization of transcriptional elements from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 789-795.
- Pátek, M., B.J. Eikmanns, and H. Sahm. 1996. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology* 142, 1297-1309.
- Pátek, M., J. Hochmannova, M. Jelinkova, J. Nešvera, and L. Eggeling. 1998. Analysis of the *leuB* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 42-47.
- Pátek, M., G. Muth, and W. Wohlleben. 2003a. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, and *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 104, 325-334.
- Pátek, M., J. Nešvera, A. Guyonvarch, O. Reyes, and G. Leblon. 2003b. Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 311-323.
- Perez-Martin, J., F. Rojo, and V. de Lorenzo. 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* 58, 268-290.
- Ross, W., K.K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, and R.L. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407-1413.
- Sahm, H., L. Eggeling, B.J. Eikmanns, and R. Kramer. 1995. Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 243-252.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989, 2002. Molecular cloning—a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schrumpf, B., L. Eggeling, and H. Sham. 1992. Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 566-571.
- Shaw, W.V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods. Enzymol.* 43, 737-755.
- Von der Osten, C.H., C.K. Gionnetti, and A.J. Sinskey. 1989. Design of defined medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol. Lett.* 11, 11-16.
- Yoshihama, M., K. Higashiro, E.A. Rao, M. Akedo, W.G. Shanabruch, M.T. Follettie, G.C. Walker, and A.J. Sinskey, 1985. Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 162, 591-597.

(Received November 14, 2005/Accepted December 7, 2005)

ABSTRACT : Derepression of a Methionine Biosynthetic Gene by Utilizing a Promoter Isolated from *Corynebacterium glutamicum*

Soo-Dong Park, Ik-Hyun Park, Jong-Soo Choi¹, Il-Kwon Kim¹, Younhee Kim² and Heung-Shick Lee³ (Graduate School of Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul 136-701, Korea, ¹BASF Research Center, Kunsan 573-400, Korea, ²Department of Oriental Medicine, Semyung University, Checheon, 390-230, Korea, and ³Department of Biotechnology, Korea University, Jochiwon, 339-700, Korea)

A transcriptionally active fragment (P₁₉) isolated by utilizing the promoter-probe shuttle vector pSK1Cat was analyzed. By subcloning analysis, the 180 bp region (P₁₈₀) responsible for the activity was determined. Transcriptional fusion of the *C. glutamicum metX* gene to P₁₈₀ (P₁₈₀-*metX*) resulted in a 24-fold increase in MetX activity in a complex medium, while a 13-fold increase was observed with the P_{lac} promoter. Additionally, the expression conferred by P₁₈₀ was not affected by methionine added to the growth medium, suggesting that the P₁₈₀ clone is useful for the deregulated expression of biosynthetic genes in *C. glutamicum* during amino acid fermentation. Introduction of P₁₈₀-*metX* into a lysine-producing *C. glutamicum* resulted in the production of methionine to 0.8 g/l.