

*Corynebacterium glutamicum*의 탄소대사 및 총체적 탄소대사 조절

이정기*

배재대학교 생명유전공학과

Carbon Metabolism and Its Global Regulation in *Corynebacterium glutamicum*. Lee, Jung-Kee*. Department of Life Science & Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea – In this review, the current knowledge of the carbon metabolism and global carbon regulation in *Corynebacterium glutamicum* are summarized. *C. glutamicum* has phosphotransferase system (PTS) for the utilization of sucrose, glucose, and fructose. *C. glutamicum* does not show any preference for glucose when various sugars or organic acids are present with glucose, and thus cometabolizes glucose with other sugars or organic acids. The molecular mechanism of global carbon regulation such as carbon catabolite repression (CCR) in *C. glutamicum* is quite different to that in Gram-negative or low-GC Gram-positive bacteria. GlxR (glyoxylate bypass regulator) in *C. glutamicum* is the cyclic AMP receptor protein (CRP) homologue of *E. coli*. GlxR has been reported to regulate genes involved in not only glyoxylate bypass, but also central carbon metabolism and CCR including glycolysis, gluconeogenesis, and tricarboxylic acid (TCA) cycle. Therefore, GlxR has been suggested as a global transcriptional regulator for the regulation of diverse physiological processes as well as carbon metabolism. Adenylate cyclase of *C. glutamicum* is a membrane protein belonging to class III adenylate cyclases, thus it could possibly be a sensor for some external signal, thereby modulating cAMP level in response to environmental stimuli. In addition to GlxR, three additional transcriptional regulators like RamB, RamA, and SugR are also involved in regulating the expression of many genes of carbon metabolism. Finally, recent approaches for constructing new pathways for the utilization of new carbon sources, and strategies for enhancing amino acid production through genetic modification of carbon metabolism or regulatory network are described.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*, carbon metabolism, global carbon regulation, carbon catabolite repression, gene regulation

서 론

*Corynebacterium glutamicum*은 1957년 Kinoshita 등[53]에 의해 분리된 이후 아미노산 및 핵산의 공업적 생산을 위해 사용되고 있다[40]. *C. glutamicum*은 G+C 함량이 높은 그람 양성균의 비병원성이며, 운동성이 없고 포자를 형성하지 않는 통성혐기성 세균이다. 식품의 풍미제인 글루탐산 나트륨(MSG)의 제조에 사용되는 L-glutamic acid는 년 150만 톤이 생산되며, 가축 사료 첨가제로 사용되는 L-lysine의 경우 년 80만 톤이 생산되고 있다. 또한 최근에는 ethanol, lactic acid, succinate, panthothenate 와 같은 범용 및 정밀 화학물질이나 재조합 단백질의 생산을 위한 host로서의 사용 가능성도 제시되고 있다[43, 48, 72]. 이와 같은 산업적 중요성으로 인해 지난 50여 년간 아미노산의 생산성을 향상시키기 위한 다양한 연구가 수행되어 왔다. 오랜 기간 행해

왔던 전통적인 균주 육종 방법은 UV나 화학적 변이유기체를 사용하여 무작위적으로 유전자를 변형시킨 후 아미노산 생산성이 증대된 돌연변이 균주를 선별하는 작업을 반복적으로 수행하는 것이었다. 이후 유전공학이 도입되면서 목적하는 유전자를 특이적으로 변형시키거나 특정 유전자를 증폭하는 등의 유전자 조작을 이용한 분자 육종 연구가 이루어졌다. 최근 들어서는 *C. glutamicum*의 전체 유전체 DNA 염기서열이 규명되고, system biology 및 'omics'연구를 위한 혁신적 기술이 도입됨에 따라 유전체 수준에서의 총체적 분석을 통한 세포 재설계 연구가 활발히 진행되고 있다[88, 99]. 그 동안 아미노산의 생산성을 높이기 위해 세포의 대사 제어 및 발효 생산에 대한 연구가 상당한 수준에 도달하였음에도 불구하고, 일부 탄소 대사 및 관련 조절 메커니즘은 아직도 많은 부분이 명확히 밝혀져 있지 않으며, 특히 총체적 탄소 대사 조절 메커니즘 및 조절 network 연구는 최근에 들어서 활발히 발표되고 있다[2, 13, 100].

*C. glutamicum*은 glucose, fructose, sucrose, ribose, maltose와 같은 당, myo-inositol, ethanol과 같은 알코올 및 acetate, propionate, pyruvate, lactate, citrate, glutamate와

*Corresponding author

Tel: 82-42-520-5940, Fax: 82-42-520-5385

E-mail: leejk@pcu.ac.kr

같은 유기산들을 단일 탄소원과 에너지원으로서 이용할 수 있다[2, 13, 98]. 최근 들어 아미노산 생산을 위한 새로운 발효 기질로서 당밀 대신에 전분을 이용하는 추세로 변하고 있지만 아직은 당밀을 가장 많이 사용하고 있으며, 당밀은 주로 sucrose로 구성되어 있고 glucose와 fructose가 함께 존재한다. 따라서 sucrose, glucose 및 fructose의 당 대사 시스템과 조절에 대한 연구는 효과적인 당 이용 및 아미노산의 생산성과 관련되어 있는 중요한 연구분야이다[68]. 본 총설에서는 *C. glutamicum*의 당 전달 phosphotransferase system (PTS)을 포함한 다양한 탄소 기질에 대한 대사 및 아직 상세하게 밝혀져 있지 않은 탄소 대사 관련 총체적 조절 메커니즘에 대한 최근 연구 동향을 분석한다. 또한 새로운 탄소원으로서 최근에 대두되고 있는 biomass 관련 기질들을 이용할 수 있는 *C. glutamicum* 균주 구축을 통하여 이용 기질의 범위를 확대하고자 하는 다양한 연구 동향에 대해 소개한다. 마지막으로 탄소 대사 및 조절과 관련하여 L-lysine의 발효 수율 혹은 생산성을 향상시키고자 하는 다양한 균주 육종 전략들에 대해 기술하고자 한다.

C. glutamicum의 탄소대사

C. glutamicum의 당 수송 phosphotransferase system 분석 및 관련 당 대사의 특징

대부분의 통성 및 편성 혐기성 세균들은 다양한 당류를 이용하기 위해 phosphoenolpyruvate(PEP)에 의존적인 PTS를 통해 세포 내로 당을 수송한다. PTS는 당의 인산화 뿐만 아니라, non-PTS 당의 이용과 관계된 유전자의 전사를 조절하는 등, 다른 탄소 대사 경로의 조절에도 관여되어 있는 복잡하고 중요한 당 전달 시스템이다[78, 79]. PTS에서 당 수송의 에너지원으로서 PEP가 사용되며, 모든 PTS당의 수송에 공통적으로 관여하는 general protein인 enzyme I (EI)과 Histidine-containing phosphocarrier protein (HPr)이 있고, 막 단백질로서 당 특이적 enzyme II (EII)나 혹은 별도의 enzyme III (EIII)와 함께 EII/EIII 쌍을 이루고 있다. PEP로부터의 인산기가 이러한 일련의 enzyme cascade (EI, HPr, EII 혹은 EII/EIII pair)를 통해 최종적으로 당에 전달된다 (Fig. 1)[78]. High-GC 그람 양성 Actinobacteria 중에서 *Mycobacterium tuberculosis*의 경우에는 PTS가 존재하지 않는 반면, *Streptomyces coelicolor*와 *C. glutamicum*의 경우에는 비교적 적은 수의 PTS 단백질을 가지고 있다[68, 73, 93]. *C. glutamicum* ATCC 13032의 경우 genome 상에 총

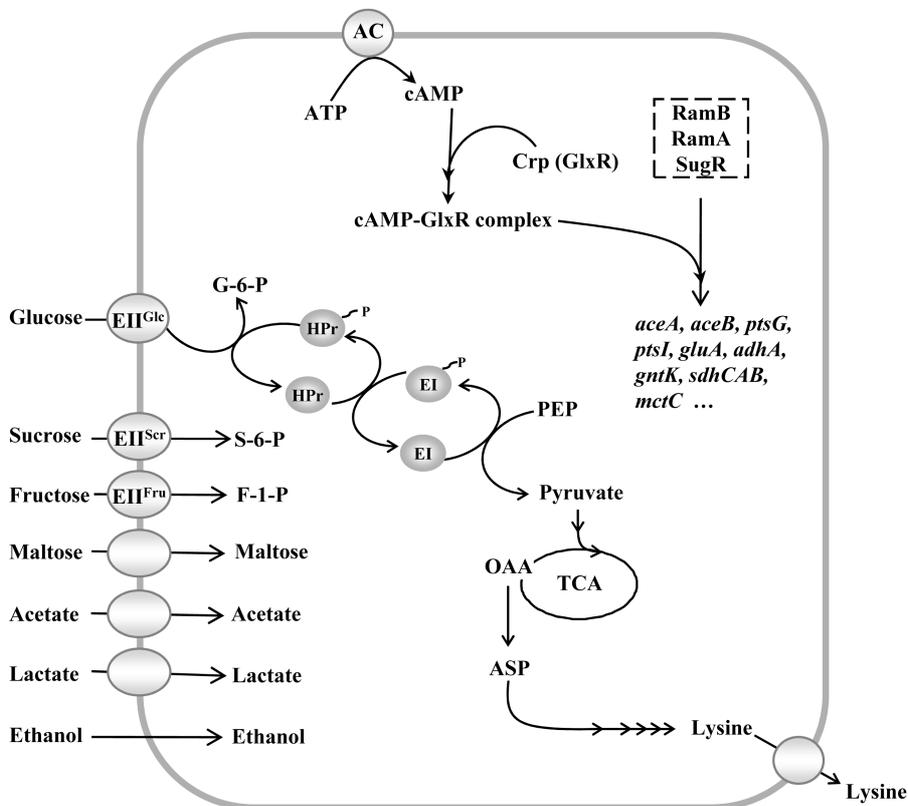


Fig. 1. Schematic overview of the carbohydrate utilization and global carbon regulation in *C. glutamicum*. Abbreviations used: AC, Adenylate cyclase; PEP, phosphoenolpyruvate; OAA, oxaloacetate; ASP, aspartate.

4종류의 당 특이적 EII 유전자와 EI 및 HPr 에 대한 변이주의 분석을 통해 sucrose, glucose, fructose 수송을 위한 EII의 기능은 규명 되었으나, 나머지 L-ascobate(ASC)-type family에 속하는 EII 단백질(*sgcA*, cg3366)의 기질 및 기능은 아직 밝혀져 있지 않다[39, 68]. Sucrose의 경우 sucrose EII(*ptsS*, cg2925)에 의해 sucrose 6-phosphate 유입된 후 sucrose 6-phosphate hydrolase(*scrB*, cg2927)에 의해 fructose와 glucose 6-phosphate로 분해된다. 이때 *C. glutamicum*의 탄소 대사 특징 중에 하나로서 *C. glutamicum*은 fructokinase 유전자를 가지고 있지 않기 때문에 세포 내 fructose는 더 이상 대사되지 못하고 아직 밝혀져 있지 않은 메커니즘에 의해 세포 밖으로 배출된 후(fructose efflux), 다시 fructose EII(*ptsF*, cg2120)에 의해 세포 내로 유입되어 fructose 1-phosphate가 된다[25]. Fructose 수송을 위한 fructose EII 유전자는 인접한 fructose 1-phosphate kinase 유전자(*pfkB1*, cg2119) 및 PTS regulator(*fruR*, cg2118)와 fructose-specific PTS operon(*fruR-pfkB1-ptsF-ptsH*)을 구성하고 있다[2, 82]. 아울러 general PTS 단백질인 HPr 유전자(*ptsH*, cg2121)와 EI 유전자(*ptsI*, cg2117), DoeR-type transcriptional regulator 유전자(*sugR*, cg2115)도 *ptsF* 유전자 주변에 집단으로 존재한다. Glucose EII는 N-말단 부위에 EIII domain이 존재하여 단일의 polypeptide(EIIBCA)를 구성하고 있으며, glucose 이외에 fructose 에 대해서도 미약한 수송 능력을 가지고 있다[26, 61]. Glucose는 주로 glucose EII에 의해 수송되나, 상대적으로 낮은 glucose 수송 능력을 가지고 있는 non-PTS glucose permease 도 존재하는 것으로 추정하고 있다[22, 35]. 이러한 아직 규명되어 있지 않은 non-PTS glucose permease를 통하여 유입된 glucose는 세포 내 glucokinase(*glk*, cg2399)에 의하여 인산화되는데, 이러한 제2의 부가적인 glucose transporter의 기능은 과량의 glucose 존재 시에 작동하는 것으로서, 세포의 빠른 생육을 위한 당의 수송 능력과 관련이 있는 것으로 알려져 있다[22, 35, 74].

Non-PTS 당, 유기산 및 ethanol 대사

*C. glutamicum*이 기질로서 잘 이용하는 maltose는 starch의 액화 산물로서 두 분자의 glucose가 α -1,4 결합을 이루고 있는 이당류이다. Maltose는 maltose-H⁺ symporter나 혹은 ATP-binding cassette type transporter라 추정되나 아직 알려져 있지 않은 수송 시스템에 의해 세포 내로 유입된 후 4- α -glucanotransferase(*malQ*, cg2523)에 의해 다양한 maltodextrin과 glucose로 전환된다[85]. 생성된 glucose는 glucokinase에 의해 인산화되며, maltodextrin은 maltodextrin phosphorylase(*glgP1*, cg1479)에 의해 glucose 1-phosphate로 분해된 후 α -phosphoglucomutase(*pgm*, cg2800)에 의해 glucose 6-phosphate로 전환된다[85]. MalQ와 maltodextrin glucosidase(MalZ, 아직 규명되어 있지 않음)에 의해 생성된

glucose역시 glucokinase에 의해 glucose 6-phosphate로 인산화 된다[85].

*C. glutamicum*에 존재하는 pentose 대사 경로는 궁극적으로 pentose phosphate pathway(PPP)의 중간 대사물을 만든다. D-Ribose의 경우에 특정한 ATP-binding cassette type transporter(*rbsACBD*, cg1411-1414)에 의해서 세포 내로 유입된 후 두 종류의 ribokinase 인 *rbsk1*(cg1546)과 *rbsk2*(cg2554)에 의해 PPP 중간 대사물인 D-ribose-5-phosphate가 형성된다[13, 16, 69]. Gluconate 이용의 경우 gluconate permease(*gntP*, cg3216)에 의해 세포 내로 유입된 후 gluconate kinase(*gntK*, cg2732)에 의해 인산화되어 PPP 중간 대사물인 6-phosphogluconate와 D-xylose 5-phosphate를 거쳐 대사된다[62]. Gluconate 대사에 관계된 *gntP*와 *gntK*는 glucose 존재 하에서 global 탄소 조절자인 GlxR(cg0350)에 의해 발현이 억제되는 것으로 보고되어 있다[62]. *C. glutamicum*은 호기적 상황에서 respiratory lactate dehydrogenase(LDH)를 사용하여 L-lactate를 단일 탄소원과 에너지원으로서 생육할 수 있다. L-lactate의 수송 시스템으로서 아직 확실하게 규명되어 있지 않은 putative L-lactate permease gene(cg3226)이 보고되어 있으며 [31, 89], 막 단백질인 quinone-dependent L-lactate dehydrogenase(*lldD*, cg3227)가 수송된 L-lactate를 pyruvate로 산화시키고, pyruvate dehydrogenase complex(PDHC)와 anaplerotic 효소인 pyruvate carboxylase에 의해 TCA cycle로 유입된다. *C. glutamicum*을 L-lactate에서 생육 시 gluconeogenesis 효소인 PEP carboxykinase(*pck*)와 fructose 1,6-bisphosphatase(*fbp*)를 필요로 한다[31, 89].

최근에 규명된 acetate 수송단백질은 acetate/proton symport 메커니즘의 특징적인 secondary transporter이며, propionate도 기질로서 수송하는 acetate/propionate uptake carrier(monocarboxylic acid transporter, *mctC*, cg0953)이다[45]. 세포 내로 유입된 acetate는 acetate kinase(*ack*)와 phosphotransacetylase(*pta*)의 작용에 의해 acetyl-CoA로 활성화된 후 TCA cycle과 glyoxylate cycle로 유입되며, acetate를 단일 탄소원과 에너지원으로 사용하였을 경우에는 gluconeogenesis 효소(PEP carboxykinase, fructose 1,6-bisphosphatase, malic enzyme, oxaloacetate decarboxylase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B)를 이용하여 대사된다[33]. 이때 *ack* 및 *pta* 뿐만 아니라 glyoxylate cycle의 핵심 효소인 isocitrate lyase(ICL, *aceA*, cg2560)와 malate synthase(MS, *aceB*, cg2559)가 acetate에 의해 활성화되며, 이러한 효소들은 RamA(cg2831), RamB(cg0444), GlxR(cg03501) 등 여러 전사조절단백질들에 의해 복합적으로 조절된다[23, 34, 52]. *C. glutamicum*은 acetate/glucose mixture에서 생육 시 다른 세균들과 달리 acetate와 glucose를 동시에 사용하는 특징을 가지고 있으며, DNA microarray 방법을 사용하여 acetate와 glucose상에서 단독으로 생육시

켰을 때 genome 수준에서 전체 유전자의 발현 패턴을 비교한 바 있다[38].

비교적 최근에 연구된 ethanol 이용의 경우, 세포 내에서 alcohol dehydrogenase(*adhA*, cg3107)와 acetaldehyde dehydrogenase(*ald*, cg3096)의 작용으로 인해 acetate로 산화된 후 acetyl-CoA로 활성화 되어 중심대사 경로로 유입된다[1-3]. 따라서 acetate 상에서 생육시킬 경우와 동일하게 AK와 PTA 뿐만 아니라 ICL과 MS와 같은 glyoxylate cycle 및 anaplerotic pathway가 ethanol 대사의 핵심적 역할을 한다. *C. glutamicum*을 ethanol/glucose 혼합물에서 생육시키면 초반에 glucose를 먼저 이용하고 난 후에 두 번째 생육을 위하여 ethanol을 소모하는 biphasic한 생육 패턴을 보인다[3, 58]. 이러한 biphasic한 생육 패턴의 이유는 glucose 존재 하에서 AK, PTA, ICL, MS 뿐만 아니라 alcohol dehydrogenase(ADH)와 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성이 낮게 유지되어 glucose가 먼저 소모된 후 앞서 열거한 6 종류의 효소 활성이 높아져 ethanol을 이용한 두 번째 생육이 가능하기 때문이다[3, 58]. 이러한 결과는 *C. glutamicum*에는 glucose 존재 하에서 ethanol 대사가 저해 받는 carbon catabolite repression과 같은 탄소원에 의존적인 조절이 존재하고 있음을 시사하는 것이다[3, 58]. 두 유전자의 promoter에는 GlxR을 비롯하여 RamB와 RamA 결합 부위가 모두 존재하며, RamA는 activator로서 두 유전자의 발현에 필수적이고 RamB와 GlxR은 repressor로서 glucose나 acetate 존재 하에서 두 유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다[1, 4].

*C. glutamicum*의 독특한 탄소대사 조절 메커니즘

PTS관련 특이적 전사조절자: SugR

*C. glutamicum*의 경우 PTS 유전자들의 조절 메커니즘은 기존에 보고된 *E. coli*나 *B. subtilis*에서 밝혀진 것들과는 다른 조절 메커니즘을 나타내고 있다. 가장 잘 알려진 PTS 조절단백질은 DeoR-type의 전사조절단백질인 SugR(cg2115)로서, fructose PTS operon 주변에 존재한다[29]. SugR의 기능은 *C. glutamicum*을 gluconeogenic 탄소원인 pyruvate, acetate, citrate에서 생육시킬 때 주변에 함께 존재하는 fructose PTS 유전자(*ptsF*, *ptsI*, *ptsH*) 뿐만 아니라 glucose와 sucrose의 EII 유전자(*ptsG*, *ptsS*) 발현을 억제하는 repressor로 알려져 있다[29]. 이러한 SucR repressor는 glucose를 비롯한 세포 내 fructose 6-phosphate 농도가 높아지는 탄소원 기질 조건하에서는 target 유전자의 promoter에 결합하지 못해 derepression이 일어나는 것으로 알려져 있다[29]. 그러나 Toyoda 등[94]과 Gaigalat 등[30]은 fructose 1-phosphate와 fructose 1,6-bisphosphate를 SugR의 binding 활성을 저해하는 effector 분자로 보고하였다. 이러한 결과들은 *C. glutamicum*이 주변에 이용 가능한 탄소원을 용이하게

획득하기 위해 SugR 조절 시스템을 사용한다는 것을 나타내며, SugR을 탄소대사의 조절체계에 있어 상당히 상위에 존재하는 일종의 master regulator로 구분하고 있다[82]. Target 유전자들의 operator에 존재하는 특징적인 consensus SugR binding site는 TCRRACA로 이루어진 7-bp motif이나, 최근에 TGT₍₂₋₅₎G의 서열도 SugR에 의해 인식되는 서열임이 보고되었다[82]. *ptsG*의 promoter 부위에는 SugR, RamB, GlxR 결합부위가 존재하고 있으며, 따라서 SugR 이외에도 acetate와 ethanol 대사에 관여하는 것으로 알려진 RamB 및 GlxR 전사조절단백질들이 *ptsG*의 발현 조절에도 관여하는 것으로 보고하였다[82]. 최근 들어 SugR이 자신의 유전자 및 PTS 유전자 이외에 중심탄소대사(*pfkA*, *gapA*, *eno*, *fbp*, *pyk*)의 조절에도 관여하고 있는 것으로 보고되었으며[82], L-lactate dehydrogenase(*ldh*)[95] 등을 포함하여 약 40종류의 유전자 발현까지도 저해하는 것으로 보고되었다(<http://coryneregnet.cebitec.uni-bielefeld.de/v5/>).

Acetate 대사 및 중심탄소대사 전사조절자; RamA와 RamB

당초 RamA(regulator of acetate metabolism A, cg2831)와 RamB(cg0444)는 acetate 대사(*aceA*, *aceB*, *pta*, *ack*)에 대한 전사조절단백질로서 발견되었다[23, 34]. Glyoxylate bypass 효소인 ICL(*aceA*)와 MS유전자(*aceB*)는 서로 반대 방향으로 전사되는 구조를 가지고 있으며, RamA와 RamB는 두 유전자 사이의 597-bp 부위에 결합하여 두 유전자의 발현을 조절한다. RamB는 단지 glucose 존재 하에서만 두 유전자를 억제하는 반면, RamA는 탄소원에 관계없이 작용하는 activator로서 알려져 있으며, acetate에서의 생육을 위해 필수적인 전사조절자이다[23, 34]. 그러나 최근 들어 RamA의 기능이 이러한 acetate 대사 외에도 succinate dehydrogenase(*sdhCAB*)[20], aconitase(*acn*)[28], glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(*gapA*)[96] 및 ethanol대사(*adhA*, *ald*)[1, 4], glycogen 합성유전자(*glgA*, *glgC*)[86], citrate synthase 유전자(*glcA*)[97], acetate-propionate-pyruvate 수송에 관계된 *mctC* 유전자[45]와 같은 다른 탄소대사의 조절에도 관여하고 있음이 밝혀졌다[94]. RamA는 28 종류의 유전자 발현에 관여하고 있으며, RamA가 결합할 수 있는 operator sequence는 A/C/TG₍₄₋₆₎T/C나 AC₍₄₋₅₎A/G/T가 알려져 있다. 주로 많은 target 유전자의 발현을 활성화시키는 activator로 작용하고 있으나 자신의 유전자 발현을 억제하는 repressor로서도 작용할 수 있기 때문에 dual transcription regulator로서의 기능을 할 수 있다[17, 82]. 이와는 대조적으로 RamB는 자신의 유전자 및 acetate와 ethanol 대사를 포함해 55 종류의 유전자들의 조절에 주로 repressor로 기능을 하지만, pyruvate dehydrogenase complex subunit E1p 유전자(*aceE*)[12]는 활성화시키기 때문에 역시 dual transcription regulator로서의 기능을 한다[17, 82]. *aceA/aceB* promoter 부위를 포함하여 RamB가 결합할 수 있는 consen-

한 염기서열은 13-bp motif로서 AA/GAACTTTGCAAA로 알려져 있다. RamB는 RamA에 의해 유전자 발현이 활성화 되나, 자체 유전자의 발현은 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 RamA와 RamB가 resuscitation promoting factor 2 (*rpf2*) 유전자의 조절 등과 같이 탄소대사와 크게 관련성이 없는 일부 효소의 조절도 보고되어 있으나 본 총설에서는 자세히 언급하지 않겠다[46]. 이상과 같이 RamA와 RamB는 acetate 대사뿐만 아니라 당 수송, glycolysis, gluconeogenesis, L-lactate, ethanol 대사 등 중심탄소대사의 조절에 관련되어 있어 SugR 보다는 좀더 광범위한 유전자들을 조절하는 총체적 전사조절자로서의 역할이 제시되고 있다[5].

총체적 전사조절자 GlxR과 cAMP 합성효소

*C. glutamicum*은 glucose, fructose, sucrose, maltose, acetate, L-lactate, ethanol 등을 탄소원과 에너지원으로 이용하여 생육할 수 있으며, Embden-Meyerhof-Parnas(EMP) 경로와 관련된 효소 활성화와 hexose monophosphate(HMP) shunt의 주 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 활성을 가지고 있다[27]. *C. glutamicum*의 탄소 대사 특징 중 하나는 *E. coli*나 *B. subtilis*와는 달리 여러 탄소원이 혼합된 기질을 사용해서 배양할 때 많은 경우 한 탄소원에 대한 선호도를 나타내지 않고 다른 탄소원들을 동시에 대사하는 경향을 보이는 것이다. 예로서 glucose가 다른 당이나 유기산 등(sucrose, fructose, xylose, ribose, L-lactate, pyruvate, acetate)과 함께 존재할 때 glucose와 이러한 탄소원 들을 동시에 이용하여 monophasic 한 생육을 나타낸다[2, 98]. 즉 *C. glutamicum*은 fructose나 lactate, pyruvate, acetate를 glucose와 동시에 대사한다. 그러나 glucose/glutamate, glucose/ethanol, acetate/ethanol의 혼합물에서는 탄소원의 순차적 이용으로 인해 나타나는 diauxic growth 현상이 나타난다[1, 3, 59, 60]. 이와 같이 glucose 존재 하에서 다른 탄소원의 이용을 위해 필요한 효소의 생합성이 억제되는 carbon catabolite repression (CCR) 현상은 *E. coli*나 *B. subtilis*에서는 잘 알려져 있으나, *C. glutamicum*에서는 아직 명확히 규명되어 있지 않다. *E. coli*의 CCR은 global 전사조절자로 알려진 cAMP receptor protein(CRP)과 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 복합체가 핵심적 역할을 담당하며, 이러한 CRP-cAMP 복합체가 target 유전자들의 promoter 부위에 결합하여 전사를 조절한다. *E. coli*의 경우 cAMP 합성효소(adenylate cyclase)의 활성을 조절하는 것은 PTS의 glucose enzyme III (EIII^{Glc}) 단백질로서, 인산화된 EIII^{Glc}-P는 adenylate cyclase 활성을 촉진하는 반면 EIII^{Glc}는 non-PTS 당의 permease를 저해한다[78, 79]. 한편 *B. subtilis*와 같은 low GC 그람 양성세균의 CCR은 cAMP에 비존재적인 메커니즘으로서, HPr kinase에 의해 인산화된 HPr(Ser-P)와 catabolite control protein A(CcpA)가 복합체를 이루어 target 유전자의 조절 부위에 결

합한다[18]. 이와 같이 *E. coli*와 *B. subtilis*에서 관측되는 외견상 유사한 CCR 현상이 전혀 다른 조절 메커니즘을 사용해 일어나고 있다[18]. High-GC 세균인 *Corynebacteria*나 *Streptomyces* sp., *Mycobacteria*에서의 CCR은 기존에 알려진 메커니즘과는 다소 다른 것으로 보고되어 있다[73, 93]. 특히 *C. glutamicum*의 경우 세포 내 cAMP가 존재하나 배지 내의 탄소원에 따른 cAMP의 농도 변화가 *E. coli*의 변화 양식과는 상반되게 나타나고[21, 52], genome 상에 CRP homologue 유전자가 존재하나 CCR과 관련하여 이것들의 역할은 아직 확실히 규명되어 있지 않다[68]. 또한 그람 양성 세균임에도 불구하고 low-GC 그람 양성 세균에서 CCR에 중요한 역할을 하는 조절단백질인 CcpA 나 HPr kinase/phosphatase의 homologue 유전자가 존재하지 않는다[68]. 따라서 *C. glutamicum*의 경우 *E. coli*나 *B. subtilis*와는 다른 독특한 메커니즘의 CCR이 있으리라 생각된다(Fig. 1)[2, 68]. CRP-cAMP 복합체에 의한 signal transduction system은 *M. tuberculosis*의 경우 병독성과 starvation의 조절과 관련되어 있으며[6, 76], *Streptomyces*에서는 germination 및 형태학적 발달과 같은 복잡한 생리적 과정에 관여되어 있다[24]. *C. glutamicum*의 경우 genome 상에 3개의 CRP homologue 유전자와 하나의 adenylate cyclase 유전자를 가지고 있다[19, 48]. *C. glutamicum*에서의 탄소대사에 관한 많은 연구에도 불구하고 CRP homologue-cAMP 복합체에 관한 기능 연구는 매우 제한적이다[19]. GlxR(glyoxylate bypass regulator, Cg0350)로 명명된 CRP homologue는 당초에 glyoxylate bypass enzyme인 isocitrate lyase(ICL, *aceA*, cg2560)와 malate synthase(MS, *aceB*, cg2559)의 유전자 발현을 조절하여 acetate 대사의 조절에 관련된 것으로 보고된 이래로[52], 탄소 대사 뿐만 아니라 다양한 세포 기능을 조절에 관여하여 약 150여종의 유전자를 조절하는 global regulator로서 많은 관심을 받고 있다[55, 56]. Acetate 대사 조절과 관련하여 RamA, RamB와 함께 GlxR도 *aceA/aceB* 유전자의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 GlxR의 경우 RamA, RamB와는 다르게 탄소원에 관계없이 두 유전자를 억제하는 것으로 알려져 있다[2, 52, 75]. 서로 반대방향으로 전사되는 *aceA* 유전자와 *aceB* 유전자 사이의 DNA부위에 세 종류의 조절단백질(RamA, RamB, GlxR) 들이 각각 결합하여 *aceA/aceB* 발현을 조절하며, 아직 규명되지 않은 조절단백질이 추가적으로 존재할 가능성도 있다[2, 52, 75]. 이러한 다수의 조절단백질에 의한 *aceA/aceB* 발현 조절은 주변의 영양적 환경 변화에 대해 좀 더 정교한 조절을 위한 것으로 추정된다. 정제한 GlxR 단백질을 이용한 electrophoretic mobility shift assay(EMSA) 실험등의 *in vitro* 실험 결과 glycolysis, gluconeogenesis, 및 tricarboxylic acid(TCA) cycle 등을 포함하는 중심탄소대사 경로에 있는 많은 유전자의 상류부에 결합하는 것을 보고하였으며, Kohl 등[55]은 genome 상의 consensus GlxR binding site(TGTGA-N₆-

TCACA) 추정 분석 등의 *in silico* 분석 등을 통하여 201 곳의 잠재적인 GlxR 결합부위를 발표하였다. 이러한 보고들은 GlxR이 acetate 대사를 포함한 탄소대사 조절 뿐만 아니라, 더 나아가 세포 내 다양한 대사의 조절에 관여하는 총체적 조절단백질(global regulatory protein)이라는 것을 나타내고 있다[56, 82]. GlxR 단백질을 이용한 EMSA 실험결과 cAMP가 존재하는 조건에서만 DNA 결합 활성을 나타내는 것으로 보아 CRP homologue인 GlxR의 활성화에 cAMP와의 복합체 형성이 필수적이라는 것을 나타내고 있다[36, 37, 52, 55]. 한편 second messenger로서 작용하는 cAMP는 adenylate cyclase(AC)에 의해 합성되는데, *C. glutamicum*과 가까운 *M. tuberculosis* H37Rv의 genome상에서는 모두 16 개의 putative class III AC 유전자가 존재하나[87], *C. glutamicum*은 단 하나만의 adenylate cyclase 유전자(*cyaB*, cg0375)를 가지고 있다[21]. *C. glutamicum*의 adenylate cyclase는 *E. coli*의 adenylate cyclase와 달리 막을 가로지르는 membrane-bound class III AC로서, membrane helices domain, HAMP domain, catalytic domain으로 이루어져 있다[21, 63, 75, 87]. 아마도 이러한 막 단백질의 특성 상 아직 규명되어 있지 않은 세포 외부의 환경 변화에 대응하여 세포 내 cAMP 합성 수준을 조절할 수 있는 sensor로 추정할 수 있다. 본 연구실에서는 이러한 CyaB 및 GlxR의 세포 내 기능을 규명하기 위해 독특한 phenotype을 나타내는 각각의 변이주를 구축하여 특성화하였다[21, 75]. *glxR* 변이주의 경우 세포 생육에 결함이 생겨 아주 미약한 생육만을 나타냈고, 이러한 결과로 미루어 보더라도 GlxR이 세포 내의 핵심적 유전자 발현에 영향을 주는 중요한 조절단백질이라는 것을 알 수 있었다[75]. *cyaB* 변이주의 경우 특히 acetate를 첨가한 배지에서 생육에 결함을 보였으므로 acetate 대사와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었으며, cAMP signaling system이 탄소 대사 뿐만 아니라 역시 다양한 세포 내 대사에도 영향을 미치고 있는 것으로 생각된다[21, 75]. *cyaB* 유전자 결손 변이주에서도 *glxR* 변이주와 같이 glyoxylate bypass 효소(ICL, MS) 활성이 derepression 되었으므로 cAMP-GlxR complex가 이 두 효소의 repression에 관여하고 있음을 보여주는 결과이다[21]. *glxR*과 *cyaB* 각 변이주의 경우 두 유전자에 의한 단백질의 기능이 cAMP-GlxR complex 형성과 연계되어 있어 상당히 유사한 phenotype을 나타내리라 예상했지만 두 변이주의 phenotype은 상당한 차이를 나타내었다[21, 75].

새로운 탄소원 이용 균주 개발 연구 및 아미노산 생산성 향상을 위한 탄소대사 관련 균주 육종 전략

*C. glutamicum*의 발효기질로서 대체 탄소원 이용을 위한 균주 개발

*C. glutamicum*은 전분이나 hemicellulose의 오탄당 성분

인 xylose와 arabinose를 비롯하여 cellobiose, 유청에 주로 존재하는 lactose와 galactose 등을 이용하지 못한다[44]. 따라서 최근 들어 *C. glutamicum*을 이용한 산업적 발효 시 탄소원으로 사용할 수 있는 기질의 범위를 확장하기 위해 다양한 유전자 재조합 및 대사공학 연구를 수행하고 있다. 일반적으로 *C. glutamicum*은 D-xylose를 탄소원으로 이용할 수 없으며, 일부의 *C. glutamicum*만이 L-arabinose 이용을 위한 유전자가 존재한다[49, 50, 51]. 그러나 *C. glutamicum*이 D-xylose를 이용할 수 없음에도 불구하고 D-xylose 대사의 마지막 단계인 xylulokinase 유전자(*xyiB*)만은 존재하기 때문에[13, 49], 대장균의 xylose isomerase 유전자 (*xyiA*)를 *C. glutamicum* R에서 발현 시 D-xylose를 이용하여 생육할 수 있었다[13, 50]. D-xylose의 수송 시스템은 아직 밝혀져 있지 않은 transporter에 의해 이루어지지만, 다른 *C. glutamicum* 유래의 L-arabinose transporter 유전자(*araE*)를 *C. glutamicum* R에서 발현 시 D-xylose 수송에 기여할 수 있는 것으로 보고하였다[80, 81]. *C. glutamicum* ATCC 13032와 달리 *C. glutamicum* R에는 β -glucoside인 salicin, arbutin 및 methyl- β -glucoside 이용을 위한 β -glucoside specific transporter 유전자(*bglFI*, *bglFII*)가 존재한다[90]. D-cellobiose는 cellulose의 부분적 분해산물로서 cellulosic biomass 가수분해물에 존재하며, 대부분의 산업미생물들은 이 당을 발효할 수 없다. 일본의 Yukawa 교수 연구실에서는 *C. glutamicum*이 이용하지 못하는 D-cellobiose를 기질로 하여 오랜 시간 배양함으로써 β -glucoside transporter 유전자에 무작위적인 point mutation이 일어나 궁극적으로 D-cellobiose를 기질로 이용할 수 있게 하는 adaptive mutation 방법을 통해 변이주를 제조한 바 있다[57]. 유청의 경우 5%의 lactose를 가지고 있으나, *C. glutamicum*은 lactose의 수송, 분해 및 galactose를 이용할 수 있는 효소를 가지고 있지 않다[15]. 따라서 *Lactobacillus* 속 등의 lactose 이용 유전자를 *C. glutamicum*에서 발현시켜 lactose를 이용할 수 있는 균주를 구축한 바 있다[7]. 또한 L-lysine 생산을 위하여 가용성 녹말이나, 옥수수 생전분을 직접 이용할 수 있는 균주 개발에 관한 연구가 수행되었다[84]. *C. glutamicum*은 전분을 직접 이용할 수 없기 때문에 *Streptomyces* 속 등의 α -amylase 유전자를 *C. glutamicum*에서 발현시켜 가용성 녹말이나 옥수수 생전분을 직접 분해하여 적은 양이지만 L-lysine을 생산하는 균주를 구축하였다[91, 92].

또한 최근 바이오 디젤과 관련하여 부산물로 생기는 glycerol의 이용에 많은 관심이 집중되고 있는데, 대장균과 달리 *C. glutamicum* ATCC 13032는 glycerol을 탄소원으로 이용하지 못한다[77]. 대장균을 호기적으로 생육시킬 경우 glycerol은 glycerol transporter인 aquaglyceroporin(*glpF*)에 의해 유입된 후 glycerol kinase(*glpK*)와 glycerol 3-phosphate dehydrogenase에 의해서 glycerol 3-phosphate로 산화되어 이용된다[77]. 그러나 흥미롭게도 glycerol을 이용하지

못하는 *C. glutamicum*의 경우 genome 상에 glycerol transporter인 *glpF* homologue가 존재하지 않는 반면 나머지 glycerol 대사에 관련된 *glpK*와 *glpD* homologue 유전자가 존재한다. 최근 Rittmann 등은 대장균의 glycerol transporter (*glpF*) 만을 *C. glutamicum*에서 발현시킨 경우 glycerol을 이용하지 못하였으나, *glpF*없이 *glpK*와 *glpD* 만을 *C. glutamicum*에서 발현시켰을 경우 glycerol을 유일한 탄소원으로 하여 L-lysine 과 같은 아미노산 생산을 가능하게 하였다 [77]. 이때 이러한 재조합 균주에 대장균 유래 glycerol transporter인 *glpF* 유전자를 추가로 발현시킨 경우에 생육 속도와 biomass 형성이 증가되었다[77]. 따라서 *C. glutamicum*의 genome 상에 존재하는 *glpK*와 *glpD* homologue 유전자의 기능은 glycerol의 대사를 위한 것이 아닌 다른 기능일 것이라고 보고하였다[77]. 그러나 필자의 연구실에서 수행한 실험의 경우 야생주는 glycerol에서 자라지 못하는 반면 대장균의 glycerol transporter 유전자(*glpF*) 만을 도입시킨 재조합 *C. glutamicum* 균주는 glycerol상에서 약하게나마 생육할 수 있음을 관찰하였으며, 이러한 결과는 *C. glutamicum*의 *glpK*와 *glpD*가 glycerol 대사를 위해서도 사용될 수 있음을 시사한다.

탄소대사 관련 L-lysine 생산성 향상을 위한 균주 육종 전략

지난 수십 년 동안 전통적 변이 방법인 UV 처리나 화학적 변이유기체등을 사용해 개량한 아미노산 고생산 균주들의 경우 아미노산의 생산성은 높아졌지만 무작위적인 돌연변이로 인해 원하지 않는 부위까지 돌연변이가 축적되어 생육이 느려지는 등의 문제점을 가지고 있다. 그러나 최근 들어 *C. glutamicum*의 genome 분석과 ‘omics’ 관련 새로운 기술이 도입됨에 따라 전통적 균주 개량 방식에서 탈피하여 전적으로 새로운 균주 개량 방식을 취하게 되었으며, 이러한 예로서 일본 아지노모토사의 연구팀에서는 “계놈에 기반한 균주 재설계” 방법에 의해 L-lysine 생산 균주를 구축하였다[70]. 이를 위해 L-lysine 생산 균주의 유전체 염기서열을 완전히 분석하고, 이미 발표되어 있는 야생주 유전체와의 비교분석을 수행하였다. 이러한 두 유전체의 비교 분석을 통하여 L-lysine 생산에 유리한 유전자 변이들만을 결정하고, 이러한 돌연변이를 다시 야생주에 도입하였다. 결과적으로 “genome breeding”이라는 방법을 사용해 L-lysine 생산과 관련된 최소한의 돌연변이만을 갖게 되어 L-lysine 생산성과 성장 속도가 모두 성공적으로 개선된 균주를 개발하였다[70]. 이러한 방법을 통해 L-lysine 생산에 유리한 변이로 밝혀진 유전자로는 homoserine dehydrogenase (*hom*, cg1337), aspartokinase(*lysC*, cg0306), pyruvate carboxylase(*pyc*, cg0791), 6-phosphogluconate dehydrogenase (*gnd*, cg1643), malate:quinone oxidoreductase(*mgo*, cg2192) 등 이었다[41, 42, 66, 70, 71]. Homoserine dehydrogenase 유전자(*hom*)와 aspartokinase 유전자(*lysC*)는 threonine/L-

lysine 경로에 존재하는데, 돌연변이로 인해 aspartokinase에 대한 allosteric 저해가 완화되어 L-lysine으로의 탄소 흐름이 증가되었다[70]. Anaplerotic 효소인 pyruvate carboxylase의 경우에는 *pyc* 유전자의 돌연변이가 aspartate 전구체인 oxaloacetate 로의 탄소 흐름을 향상시켰다. 또 다른 돌연변이 대상인 6-phosphogluconate dehydrogenase는 pentose phosphate pathway(PPP) 상에 존재하며, 이 돌연변이가 또한 ATP와 NADPH에 의한 allosteric 조절을 완화하여 PPP로의 흐름을 향상시킴으로써 L-lysine의 생산을 위해 필요한 NADPH를 좀 더 공급할 수 있게 되었다[71]. 마지막으로 malate:quinone oxidoreductase 유전자의 돌연변이로 인한 효소의 불활성화는 TCA cycle로의 탄소 흐름을 낮추어 L-lysine의 생산에 유리하게 작용하였다[66]. 이 중 세 가지 유전자의 점 돌연변이인 *pyc*^{P458S}, *hom*^{V59A}, *lys*^{T311I}를 야생주에 도입한 결과 생산균주와 비교하여 배양액에서의 L-lysine의 생산 농도는 80 g/L로 동일하였으나 문제가 되었던 배양 시간은 반으로 단축되었다[41, 70]. 이러한 생산성의 향상은 생산 균주에서 불필요한 변이에 의해 유발되는 성장 지연 문제가 해결되어 나타난 결과이다. 이상의 예에서 보듯이 L-lysine 생합성을 향상 시키기 위한 전략은 크게 다음과 같이 나눌 수 있다: 1) L-lysine 생합성 경로 효소들의 allosteric 조절을 완화하여 생합성 경로로 좀 더 많이 대사흐름을 유도시키는 방법. 2) TCA cycle로의 흐름을 억제함으로써 탄소를 호흡으로부터 L-lysine 합성 방향으로 전환시키는 방법. 3) Aspartate의 전구체인 oxaloacetate 및 pyruvate 합성을 증진시키기 위해 phosphoenolpyruvate carboxykinase의 불활성화, pyruvate carboxylase의 고발현 등 anaplerotic 경로의 강화 및 pyruvate dehydrogenase의 불활성화 등을 통한 전구체인 pyruvate /oxaloacetate 공급의 강화 전략[54]. 4) L-lysine 생합성에 필요한 환원력을 공급하기 위한 PPP의 강화 등을 들 수 있다. 열거한 전략 중 탄소대사와 관련하여 lysine 고생산을 위한 전략들을 좀 더 상세히 기술하면, 첫째로 TCA cycle engineering이 있다[10, 66]. 즉 TCA cycle로의 흐름을 낮추어 줌으로써 호흡과 CO₂ 방출로 인한 탄소의 소비를 줄이고 L-lysine 생합성을 위한 탄소 흐름을 만들어 준다[10, 11, 66]. 이외에도 최근 oxaloacetate로의 공급을 증가시키기 위해 isocitrate dehydrogenase의 활성을 약화시킴으로서 L-lysine의 합성에 유리한 결과를 보고하였다[10]. 또한 가장 중요한 L-lysine 생산 균주 육종 전략 중 하나가 특히 L-lysine 생합성을 위해 많이 요구되는 cofactor인 NADPH(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)의 공급을 강화시키는 것이다[8, 32, 71]. Oxaloacetate에서 시작했을 때 1mole의 L-lysine 생합성을 위해 4mole의 NADPH를 필요로 한다. 따라서 NADPH의 공급을 증가시키기 위한 다양한 대사공학 전략으로서 phosphoglucoisomerase 유전자(*pgi*, cg0973)[65]의 결실과 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PD, *zwf*)의 고발현 및 변형[9, 65], 대장균

유래 membrane-bound transhydrogenase 유전자(*pntAB*)의 발현[47], 또한 polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase 유전자(*ppnk*, cg1601)의 발현 등을 시도하였다[65]. 탄소대사와 관련하여 L-lysine 생산 조건 하에서는 TCA cycle로의 흐름이 낮아지고, 따라서 PPP의 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PD)와 gluconate 6-phosphate dehydrogenase(Gnd)가 NADPH 형성의 주된 경로이다. 두 효소는 모두 NADPH와 fructose 1,6-bisphosphate에 의해 저해된다. 따라서 L-lysine 고생산과 연결된 NADPH의 형성을 위해서는 phosphoglucoisomerase(Pgi)의 불활성화 및 feedback 저해 저항성 G6PD나 Gnd 변이를 통해 PPP로의 대사 흐름을 증가시키는 것이다[9, 54, 65, 70]. Fructose나 sucrose 배지에서는 glucose 배지에서 보다 fructose 1,6-bisphosphate의 세포 내 농도가 높아 이로 인한 G6PD와 Gnd의 저해로 인해 PPP로의 대사 흐름이 약해지고, 결과적으로 L-lysine의 고생산을 위해 충분하지 못한 NADPH를 생성하게 된다[26, 32]. 이런 경우 fructose 1,6-bisphosphatase(*fbp*)를 과발현하여 fructose 1,6-bisphosphate의 세포 내 농도를 낮춤으로서 PPP로 대사 흐름을 늘릴 수 있었으며, 결과적으로 sucrose 배지에서 2배 정도 수율을 향상시킬 수 있었다[71]. 또한 본 연구실에서는 sucrose 배지에서 PPP로의 탄소 흐름을 강화하기 위해 *C. glutamicum*에서 fructokinase 유전자 발현을 시도한 바 있다[67]. 전술한 바와 같이 *C. glutamicum*는 fructokinase 유전자를 가지고 있지 않아 sucrose를 분해해서 생성된 fructose를 세포 내에서 바로 대사하지 못하고 세포 밖으로 다시 유출한 후 fructose PTS에 의해 fructose 1-phosphate로 대사되므로[25], *Clostridium acetobutylicum* 유래의 fructokinase 유전자를 *C. glutamicum*에 heterologous하게 발현시켜 fructose 6-phosphate를 생성케 함으로서 PPP로의 대사흐름을 유도하였다[67]. 이상에서 언급한 PPP의 G6PD와 Gnd이외에도 TCA cycle의 isocitrate dehydrogenase나 malic enzyme도 NADPH 공급에 활용할 수 있다[27].

결론 및 전망

*C. glutamicum*을 이용한 아미노산의 공업적 생산성을 증가시키기 위해 지난 50여 년간 끊임 없이 다양한 균주 육종 기술을 사용하여 왔다. 생물공학적인 관점에서 *C. glutamicum*에서의 당 이용의 첫 단계인 PTS를 비롯한 다양한 탄소대사 및 이와 관련된 총체적 탄소 대사 조절에 대한 이해는 아미노산의 생산성과 밀접하게 관련되어 있음을 생각할 때 상당히 중요한 연구분야이다. L-glutamic acid나 L-lysine과 같은 저가의 bulk한 아미노산을 공업적으로 생산하는데 있어 특히 탄소원은 생산 단가 결정의 중요한 요소이기 때문에, 당밀이나 starch hydrolysate 뿐만 아니라 최근 들어서는 대안 기질로서 glycerol이나 lignocellulose 등과 같은 값싼 탄소원 들을 이용할 수 있는 균주 개발 연구가 진행되고 있다.

*C. glutamicum*은 glycerol 뿐만 아니라 D-xylose와 L-arabinose, cellobiose를 단일 탄소원과 에너지원으로 이용하여 생육할 수 없기 때문에 이러한 기질의 대사를 위한 적절한 경로를 만들어 주어야 한다. 이러한 탄소원으로부터 아미노산 생산에 관한 연구는 아직 초보적 단계지만, 향후 biomass의 이용성과 관련하여 중요한 과제가 될 것이다.

*C. glutamicum*의 경우 세포 내 모든 전사인자와 이들에 의한 유전자 조절 network에 대한 연구가 독일을 중심으로 활발히 진행되고 있으며, 독일 Bielefeld 대학의 생물공학연구소에서 이와 관련한 database (CoryneRegNet 5.0)를 구축하였다(<http://coryneregnet.cebitec.uni-bielefeld.de/v5/>). 최근 Schröder와 Tauch는 *C. glutamicum*에서 전사조절자를 크게 3가지 타입으로 분류하여, 직접 기능적으로 관련된 제한된 수의 유전자 발현만을 조절하는 'local regulator'와 유전자 조절 network상에서 기능적으로 관련성이 있는 일련의 유전자들을 조절하는 'master regulator', 마지막으로 최상위에서 cross-regulation에 의해 직접 혹은 간접적으로 많은 수의 유전자 발현을 조절하는 'global regulator'로 분류하였다[82]. 최근 들어 특히 탄소대사 관련 global 조절 메커니즘에 대한 새로운 연구들이 집중적으로 발표되고 있으며, *C. glutamicum*의 경우 다른 세균에서 알려진 것과는 다른 자신만의 독특한 분자적 메커니즘과 조절 circuits을 가지고 있음이 밝혀지고 있다. 과연 *C. glutamicum*에서도 *E. coli*나 *B. subtilis*에서 보여지는 CCR과 같은 총체적 탄소 조절 메커니즘이 존재할 것인가? 이러한 의문과 관련하여 탄소 대사의 최상위에 존재하며 잠재적 global 조절자인 GlxR을 비롯하여, GlxR와 말단의 국소적 조절자 사이에 존재하여 탄소 대사 조절의 차상위 단계 전사조절자인 RamB, RamA, SugR의 구체적 역할을 밝혀야 할 것이다. 이들 중 특히 CRP homologue로서 많은 관심을 받고 있는 GlxR의 경우 탄소 대사뿐만 아니라 세포 내 전반적 대사의 총체적 조절자(global regulator)로서의 역할이 제시되고 있으며, GlxR의 생리학적 기능, GlxR의 활성화에 기여하는 주변의 환경 신호와 분자 메커니즘, GlxR-의존적 regulon 등도 역시 향후 규명해야 할 과제로 남아있다. 특히 배지 내 glucose를 비롯한 탄소원과 cAMP 농도와의 관련성은 *E. coli*에서 알려진 교과서적 지식과는 오히려 상반되게 변화하는 경향을 보이고 있다. 또한 세포 내 cAMP의 농도를 결정하는 *C. glutamicum*의 adenylate cyclase는 막 단백질이라는 구조적 특성상 외부 환경 변화를 감지할 수 있는 sensor로 작용할 가능성이 많은 단백질로서, 과연 세포 내 cAMP의 수준을 조절하기 위해 인식하는 세포 내 혹은 세포 외 신호는 무엇일까? 또한 cAMP regulon의 regulatory network에 대한 의문 등도 여전히 풀려야 할 의문으로 남아있다. 여기에서 언급한 조절자 이외에도 당의 수송, glycolysis, TCA 조절에 관여하는 추가적 전사조절자들에 대한 연구가 필요하다.

이 총설에서는 주로 전사 수준에서의 탄소 대사 조절을

소개하였으나, 이 밖에도 *C. glutamicum*에서 eukaryotic-type Ser/Thr protein kinase를 이용해 TCA cycle의 2-oxoglutarate dehydrogenase complex(OGDHC)를 조절하는 대표적 전사 후 조절 메커니즘도 알려져 있다[14, 83]. 이와 같이 *C. glutamicum*에서 탄소 대사의 전사 및 전사 후 수준에서 복잡한 조절에 관한 지식은 산업적으로 중요한 미생물인 *C. glutamicum*이 어떠한 분자적 메커니즘을 사용하여 세포 내외의 영양 환경에 적응하는지에 대한 의문을 해결해 줄 수 있을 것이다. 또한 이러한 지식은 *C. glutamicum*의 중심 탄소 대사에서의 의도적으로 탄소 흐름을 조절 하여 좀 더 원하는 방향으로 흐르도록 유도할 수 있다. 최근 생물학 연구의 흐름은 기존의 환원주위적 연구방식에서 탈피하여 전체적이고 종합적인 분석의 연구방식을 추구하고 있다. 따라서 나날이 혁신적으로 발전하고 있는 'omics' 관련 기술과, 또한 새로운 학문 영역으로 떠오르고 있는 system biology 및 synthetic biology와 관련된 신기술의 출현으로 인하여 궁극적으로 *C. glutamicum* 세포 내에서 일어나는 탄소대사와 관련된 전체적인 조절 network를 규명하게 될 것이며, 이러한 지식을 좀 더 경쟁력 있는 아미노산 생산 균주 육종 개발 전략에 활용할 수 있을 것이다.

요 약

본 총설에서는 아미노산의 공업적 생산균인 *Corynebacterium glutamicum*의 탄소 대사 및 이와 관련된 총체적 조절 메커니즘에 대한 최근의 연구를 정리하였다. *C. glutamicum*의 산업적 발효를 위한 기질로서 사용되는 당밀은 주로 sucrose, glucose, fructose로 이루어져 있으며, 이들 당은 phosphotransferase system을 통해서 수송된다. *C. glutamicum*의 탄소 대사 특징은 glucose가 다른 당이나 유기산 등과 함께 존재할 때, glucose와 이러한 탄소원 들을 동시에 대사한다. 그러나 glucose/glutamate 혹은 glucose/ethanol 등의 혼합물에서는 탄소원의 순차적 이용으로 인해 나타나는 diauxic growth 현상을 나타내며, 이러한 carbon catabolite repression(CCR) 현상은 *E. coli*나 *B. subtilis* 등에서 알려진 것과는 다른 독특한 분자적 메커니즘과 조절 circuits을 가지고 있음이 밝혀지고 있다. *C. glutamicum*의 CRP homologue인 GlxR은 acetate 대사를 포함하여 glycolysis, gluconeogenesis 및 TCA cycle 등을 포함하는 중심탄소대사 조절 뿐만 아니라, 다양한 세포 기능의 조절에 관여하는 총체적 조절 단백질로서의 역할이 제시되고 있다. *C. glutamicum*의 adenylate cyclase(AC)는 막과 결합된 class III AC로서, 막 단백질의 특성상 아직 규명되어 있지 않은 세포 외부의 환경 변화에 대응하여 세포 내의 cAMP 합성 수준을 조절할 수 있는 sensor로 추정할 수 있다. 특히 *C. glutamicum*의 경우 배지 내 glucose를 비롯한 탄소원과 cAMP 농도와의 관련성이 *E. coli*에서 알려진 교과서적 지식과는 상반되게 변화하는 경

향을 보이고 있어, cAMP signaling에 의한 세포 내 regulatory network 등은 향후 풀어야 할 의문으로 남아있다. 탄소 대사 조절의 최상위에 존재하며 global 조절자인 GlxR-cAMP 복합체 이외에도 차상위 전사조절 단백질로서 RamB, RamA, SugR 등이 존재하여 다양한 탄소대사를 조절한다. 최근 들어서는 새로운 탄소원으로서 대두되고 있는 biomass 관련 기질들을 이용할 수 있는 *C. glutamicum* 균주 구축을 통하여 이용 기질의 범위를 확대시키고자 하는 연구 및 탄소 대사와 관련하여 L-lysine의 발효 수율 혹은 생산성을 향상시키고자 하는 다양한 분자적 균주 육종 연구 등이 수행되고 있다.

감사의 글

본 논문은 2007학년도 배재대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

REFERENCES

1. Arndt, A. and B. J. Eikmanns. 2007. The alcohol dehydrogenase gene *adhA* in *Corynebacterium glutamicum* is subject to carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* **189**: 7408-7416.
2. Arndt, A. and B. J. Eikmanns. 2008. Regulation of carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. In: Burkovski A. (ed) *Corynebacteria Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk UK, pp 155-182.
3. Arndt, A., M. Auchter, T. Ishige, V. F. Wendisch, and B. J. Eikmanns. 2008. Ethanol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 222-233.
4. Auchter, M., A. Arndt, and B. J. Eikmanns. 2009. Dual transcriptional control of the acetaldehyde dehydrogenase gene *ald* of *Corynebacterium glutamicum* by RamA and RamB. *J. Biotechnol.* **140**: 84-91.
5. Auchter, M., A. Cramer, A. Hüser, C. Rückert, D. Emer, P. Schwarz, A. Arndt, C. Lange, J. Kalinowski, V. F. Wendisch, and B. J. Eikmanns. 2010. RamA and RamB are global transcriptional regulators in *Corynebacterium glutamicum* and control genes for enzymes of the central metabolism. *J. Biotechnol.* [Epub ahead of print]
6. Bai, G., L. A. McCue, and K. A. McDonough. 2005. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRP_{Mt}), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J. Bacteriol.* **187**: 7795-7804.
7. Barrett, E., C. Stanton, O. Zelder, G. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2004. Heterologous expression of lactose- and galactose-utilizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of lysine in whey. *J. Bacteriol.* **70**: 2861-2866.
8. Becker, J., C. Klopprogge, O. Zelder, E. Heinzle, and C. Wittmann. 2005. Amplified expression of fructose 1,6-

- bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8587-8596.
9. Becker, J., C. Klopprogge, A. Herold, O. Zelder, C. J. Bolten, and C. Wittmann. 2007. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*-over expression and modification of G6P dehydrogenase. *J. Biotechnol.* **132**: 99-109.
 10. Becker, J., C. Klopprogge, H. Schröder, and C. Wittmann. 2009. Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7866-7869.
 11. Blombach, B., M. E. Schreiner, M. Moch, M. Oldiges, and B. J. Eikmanns. 2007. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 615-623.
 12. Blombach, B., A. Cramer, B. J. Eikmanns, and M. Schreiner. 2009. RamB is an activator of the pyruvate dehydrogenase complex subunit E1p gene in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 236-239.
 13. Blombach, B., and G. M. Seibold. 2010. Carbohydrate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* and applications for the metabolic engineering of L-lysine production strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1313-1322.
 14. Bott, M. 2007. Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends Microbiol.* **15**: 417-425.
 15. Brabetz, W., W. Liebl, and K. H. Schleifer. 1991. Studies on the utilization of lactose by *Corynebacterium glutamicum*, bearing the lactose operon of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **155**: 607-612.
 16. Brinkrolf, K., S. Plöger, S. Solle, I. Brune, S. S. Nentwich, A. T. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, and A. Tauch. 2008. The LacI/GalR family transcriptional regulator UriR negatively controls uridine utilization of *Corynebacterium glutamicum* by binding to catabolite-responsive element (*cre*)-like sequences. *Microbiology.* **154**: 1068-1081.
 17. Brinkrolf, K., J. Schröder, A. Pühler, and A. Tauch. 2010. The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: Reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production. *J. Biotechnol.* **149**: 173-182.
 18. Brückner, R. and F. Titgemeyer. 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 141-148.
 19. Brune, I, K. Brinkrolf, J. Kalinowski, A. Pühler, and A. Tauch. 2005. The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. *BMC Genomics.* **6**: 86.
 20. Bussmann, M., D. Emer, S. Hasenbein, S. Degraf, B. J. Eikmanns, and M. Bott. 2009. Transcriptional control of the succinate dehydrogenase operon *sdhCAB* of *Corynebacterium glutamicum* by the cAMP-dependent regulator GlxR and the LuxR-type regulator RamA. *J. Biotechnol.* **143**: 173-182.
 21. Cha, P. H., S. Y. Park, M. W. Moon, B. Subhadra, T. K. Oh, E. Kim, J. F. Kim, and J. K. Lee. 2010. Characterization of an adenylate cyclase gene (*cyaB*) deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1061-1068.
 22. Coccagn-Bousquet, M., A. Guyonvarch, and N. D. Lindley. 1996. Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 429-436.
 23. Cramer A, R. Gerstmeir, S. Schaffer, M. Bott and B. J. Eikmanns. 2006. Identification of RamA, a novel LuxR-type transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **188**: 2554-2567.
 24. Derouaux, A., D. Dehareng, E. Lecocq, S. Halici, H. Nothaft, F. Giannotta, G. Moutzourelis, J. Dusart, B. Devreese, F. Titgemeyer, J. Van Beeumen, and S. Rigali. 2004. Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**: 983-990.
 25. Dominguez, H. and N. D. Lindley. 1996. Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3878-3880.
 26. Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet, and N. D. Lindley. 1998. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* **254**: 96-102.
 27. Eikmanns, B. 2004. Central metabolism: Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions. *Handbook of Corynebacterium glutamicum* (Eggeling L & Bott M, eds), pp. 241-276. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
 28. Emer, D., A. Krug, B. J. Eikmanns, and M. Bott. 2009. Complex expression control of the *Corynebacterium glutamicum* aconitase gene: identification of RamA as a third transcriptional regulator besides AcnR and RipA. *J. Biotechnol.* **140**: 92-98.
 29. Engels, V., and V. F. Wendisch. 2007. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **189**: 2955-2966.
 30. Gaigalat, L., J. P. Schlüter, M. Hartmann, S. Mormann, A. Tauch, A. Pühler, and J. Kalinowski. 2007. The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC*

- Mol. Biol.* **8**: 104.
31. Gao, Y.G., H. Suzuki, H. Itou, Y. Zhou, Y. Tanaka, M. Wachi, N. Watanabe, I. Tanaka, and M. Yao. 2008. Structural and functional characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a transcriptional repressor involved in L-lactate and sugar utilization. *Nucleic Acids Res.* **36**: 7110-7123.
 32. Georgi, T., D. Rittmann, and V. F. Wendisch. 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab. Eng.* **7**: 291-301.
 33. Gerstmeir, R., V. F. Wendisch, S. Schnicke, H. Ruan, M. Farwick, D. Reinscheid, and B. J. Eikmanns. 2003. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 99-122.
 34. Gerstmeir R., A. Cramer, P. Dangel, S. Schaffer, and B. J. Eikmanns. 2004. RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **186**: 2798-2809.
 35. Gourdon, P., M. Raheirmandimby, H. Dominguez, M. Coccagn-Bousquet, and N. D. Lindley. 2003. Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 77-85.
 36. Han, S. O., M. Inui, and H. Yukawa. 2007. Expression of *Corynebacterium glutamicum* glycolytic genes varies with carbon source and growth phase. *Microbiology.* **153**: 2190-2202.
 37. Han, S. O., M. Inui and H. Yukawa. 2008. Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tri-carboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *Microbiology.* **154**: 3073-3083.
 38. Hayashi, M., H. Mizoguchi, N. Shiraiishi, M. Obayashi, S. Nakagawa, J. Imai, S. Watanabe, T. Ota, and M. Ikeda. 2002. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1337-1344.
 39. Hvorup, R., A. B. Chang, and M. H. Saier Jr. 2003. Bioinformatic analyses of the bacterial L-ascorbate phosphotransferase system permease family. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 191-205.
 40. Ikeda, M. 2003. Amino acid production processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**: 2-35.
 41. Ikeda M., and S. Nakagawa. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 99-109.
 42. Ikeda, M., J. Ohnishi, M. Hayashi, and S. Mitsuhashi. 2006. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 610-615.
 43. Inui, M., H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertès, and H. Yukawa. 2004. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 243-254.
 44. Jojima, T., C. A. Omumasaba, M. Inui, and H. Yukawa. 2010. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 471-480.
 45. Jolkver, E., D. Emer, S. Ballan, R. Krämer, B. J. Eikmanns, and K. Marin. 2009. Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **191**: 940-948.
 46. Jungwirth B, D. Emer, I. Brune, N. Hansmeier, A. Pühler, B. J. Eikmanns, and A. Tauch. 2008. Triple transcriptional control of the resuscitation promoting factor 2 (*rpf2*) gene of *Corynebacterium glutamicum* by the regulators of acetate metabolism RamA and RamB and the cAMP-dependent regulator GlxR. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**: 190-197.
 47. Kabus, A., T. Georgi, V. F. Wendisch, and M. Bott. 2007. Expression of the *Escherichia coli* *pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 47-53.
 48. Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegräbe, and A. Tauch. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**: 5-25.
 49. Kawaguchi, H., A. A. Vertès, S. Okino, M. Inui, and H. Yukawa. 2006. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3418-3428.
 50. Kawaguchi, H., M. Sasaki, A. A. Vertès, M. Inui, and H. Yukawa. 2008. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 1053-1062.
 51. Kawaguchi, H., M. Sasaki, A. A. Vertès, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3419-3429.
 52. Kim, H. J., T. H. Kim, Y. Kim, and H. S. Lee. 2004. Identification and characterization of *gltR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **186**: 3453-3460.
 53. Kinoshita, S., S. Udaka, and M. Shimono. 1957. Studies on the amino acid fermentation part.1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
 54. Koffas, M. A., G. Y. Jung, and G. Stephanopoulos. 2003.

- Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metab. Eng.* **5**: 32-41.
55. Kohl, T. A., J. Baumbach, B. Jungwirth, A. Pühler, and A. Tauch. 2008. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: *in silico* and *in vitro* detection of DNA binding sites of a global transcription regulator. *J. Biotechnol.* **135**: 340-350.
 56. Kohl, T. A. and A. Tauch. 2009. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *J. Biotechnol.* **143**: 239-246.
 57. Kotrba, P., M. Inui, and H. Yukawa. 2003. A single V317A or V317M substitution in Enzyme II of a newly identified β -glucoside phosphotransferase and utilization system of *Corynebacterium glutamicum* R extends its specificity towards cellobiose. *Microbiology.* **149**: 1569-80.
 58. Kotrbova-Kozak, A., P. Kotrba, M. Inui, J. Sajdok, and H. Yukawa. 2007. Transcriptionally regulated *adhA* gene encodes alcohol dehydrogenase required for ethanol and n-propanol utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 1347-1356.
 59. Krämer, R. and C. Lambert. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur. J. Biochem.* **194**: 937-944.
 60. Kronmeyer, W., N. Peekhaus, R. Krämer, H. Sahm, and L. Eggeling. 1995. Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 1152-1158.
 61. Lee, J. K., M. H. Sung, K. H. Yoon, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1994. Nucleotide sequence of the gene encoding the *Corynebacterium glutamicum* mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 137-145.
 62. Letek, M., N. Valbuena, A. Ramos, E. Ordóñez, J. A. Gil, and L. M. Mateos. 2006. Characterization and use of catabolite-repressed promoters from gluconate genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **188**: 409-423.
 63. Linder, J. U. 2006. Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol. Life. Sci.* **63**: 1736-1751.
 64. Lindner, S. N., H. Niederholtmeyer, K. Schmitz, S. M. Schoberth, and V. F. Wendisch. 2010. Polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase of *Corynebacterium glutamicum*: biochemical properties and impact of *ppnK* overexpression on lysine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 583-593.
 65. Marx, A., S. Hans, B. Möckel, B. Bathe, A. A. de Graaf, A. C. McCormack, C. Stapleton, K. Burke, M. O'Donohue, and L. K. Dunican. 2003. Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 185-197.
 66. Mitsuhashi, S., M. Hayashi, J. Ohnishi, and M. Ikeda. 2006. Disruption of malate:quinone oxidoreductase increases L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2803-2806.
 67. Moon, M.W., H. J. Kim, T. K. Oh, C. S. Shin, J. S. Lee, S. J. Kim, and J. K. Lee. 2005. Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *FEMS Microbiol. Lett.* **244**: 259-266.
 68. Moon, M. W, S. Y. Park, S. K. Choi and J. K. Lee. 2007. The phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*: features of sugar transport and carbon regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 43-50.
 69. Nentwich, S. S., K. Brinkrolf, L. Gaigalat, A. T. Hüser, D. A. Rey, T. Mohrbach, K. Marin, A. Pühler, A. Tauch, and J. Kalinowski. 2009. Characterization of the LacI-type transcriptional repressor RbsR controlling ribose transport in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Microbiology.* **155**: 150-164.
 70. Ohnishi J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, and M. Ikeda 2002. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 217-223.
 71. Ohnishi, J., R. Katahira, S. Mitsuhashi, S. Kakita, and M. Ikeda. 2005. A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**: 265-274.
 72. Okino, S., R. Noburyu, M. Suda, T. Jojima, M. Inui, and H. Yukawa. 2008. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 459-464.
 73. Parche, S., H. Nothaft, A. Kamionka, and F. Titgemeyer. 2000. Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **78**: 243-251.
 74. Park, S. Y., H. K Kim, S. K. Yoo, T. K. Oh, and J. K. Lee. 2000. Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**: 209-215.
 75. Park, S. Y., M. W. Moon, B. D. Subhadra, and J. K. Lee 2010. Functional characterization of *glxR* deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: involvement of GlxR in acetate metabolism and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol. Lett.* **304**: 107-115.
 76. Rickman, L., C. Scott, D. M. Hunt, T. Hutchinson, M. C. Menéndez, R. Whalan, J. Hinds, M. J. Colston, J. Green, and R. S. Buxton. 2005. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfa* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol. Microbiol.* **56**: 1274-1286.
 77. Rittmann, D., S. N. Lindner, and V. F. Wendisch. 2008. Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 6216-6222.
 78. Saier, M. H. Jr. 1989. Protein phosphorylation and allo-

- steric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* **53**: 109-120.
79. Saier, M. H. Jr. 1993. Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *J. Cell Biochem.* **51**: 62-68.
 80. Sasaki, M., T. Jojima, H. Kawaguchi, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 105-115.
 81. Schneider, J., K. Niermann, and V. F. Wendisch. 2010. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* [Epub ahead of print]
 82. Schröder, J., and A. Tauch. 2009. Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 685-737.
 83. Schultz, C., A. Niebisch, A. Schwaiger, U. Viets, S. Metzger, M. Bramkamp, and M. Bott. Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol. Microbiol.* **74**: 724-741.
 84. Seibold, G., M. Auchter, S. Berens, J. Kalinowski, and B. J. Eikmanns. 2006. Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: growth and lysine production. *J. Biotechnol.* **124**: 381-391.
 85. Seibold, G. M., M. Wurst, and B. J. Eikmanns. 2009. Roles of maltodextrin and glycogen phosphorylases in maltose utilization and glycogen metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* **155**: 347-358.
 86. Seibold, G. M., C. Hagmann, M. Schiezel, D. Emer, M. Auchter, J. Schreiner, and B. J. Eikmanns. 2010. The transcriptional regulators RamA and RamB are involved in the regulation of glycogen synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* **156**: 1256-1263.
 87. Shenoy, A. R., K. Sivakumar, A. Krupa, N. Srinivasan, and S. S. Visweswariah. 2004. A survey of nucleotide cyclases in actinobacteria: unique domain organization and expansion of the class III cyclase family in *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Funct. Genomics.* **5**: 17-38.
 88. Sindelar G, and V. F. Wendisch. 2007. Improving lysine production by *Corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 677-689.
 89. Stansen, C., D. Uy, S. Delaunay, L. Eggeling, J. L. Goergen, and V. F. Wendisch. 2005. Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5920-5928.
 90. Tanaka, Y., H. Teramoto, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Identification of a second β -glucoside phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in *Corynebacterium glutamicum* R. *Microbiology.* **155**: 3652-3660.
 91. Tateno, T., H. Fukuda, and A. Kondo. 2007. Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying alpha-amylase on its cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1213-1220.
 92. Tateno, T., H. Fukuda, and A. Kondo. 2007. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* α -amylase using *cspB* promoter and signal sequence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 533-541.
 93. Titgemeyer, F., J. Amon, S. Parche, M. Mahfoud, J. Bail, M. Schlicht, N. Rehm, D. Hillmann, J. Stephan, B. Walter, A. Burkovski, and M. Niederweis. 2007. A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **189**: 5903-5915.
 94. Toyoda, K., H. Teramoto, M. Inui, and H. Yukawa. 2008. Expression of the *gapA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by the global regulator SugR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 291-301.
 95. Toyoda, K., H. Teramoto, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Molecular mechanism of SugR-mediated sugar-dependent expression of the *ldhA* gene encoding L-lactate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**: 315-327.
 96. Toyoda, K., H. Teramoto, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Involvement of the LuxR-type transcriptional regulator RamA in regulation of expression of the *gapA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **191**: 968-977.
 97. van Ooyen, J., D. Emer, M. Bussmann, M. Bott, B. J. Eikmanns, and L. Eggeling. 2010. Citrate synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *gltA* transcripts which are controlled by RamA, RamB, and GlxR. *J. Biotechnol.* [Epub ahead of print]
 98. Wendisch, V. F., A. A. de Graaf, H. Sahm, and B. J. Eikmanns. 2000. Quantitative determination of metabolic flux during cointilization of two carbon source: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol.* **182**:3088-3096.
 99. Wendisch, V. F., M. Bott, J. Kalinowski, M. Oldiges, and W. Wiechert. 2006. Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *J. Biotechnol.* **124**: 74-92.
 100. Wendisch V. F. 2006. Genetic Regulation of *Corynebacterium glutamicum* Metabolism. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 999-1009.

(Received Sep. 18, 2010/Accepted Nov. 5, 2010)