

*Bacillus subtilis*의 Pho Regulon을 통한 인산 결핍 스트레스 반응

박재용

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Phosphate Deficiency Stress Response Mediated by Pho Regulon in *Bacillus subtilis*

Jae-Yong Park

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Republic of Korea

(Received June 3, 2010/Accepted June 16, 2010)

Bacillus subtilis PhoP-PhoR two-component system (TCS) senses phosphate deficiency conditions, and then controls expression of the Pho regulon to prolong survival. The sensor histidine kinase, PhoR, is autophosphorylated and transfers the phosphate to the response regulator, PhoP. Phosphorylated PhoP (PhoP~P) binds to repeated 6-bp consensus PhoP binding sequences of Pho regulon promoters and activates or represses gene expression. Pho signal transduction systems are part of interconnected signal transduction network involving at least three TCSs (PhoP-PhoR, ResD-ResE TCS, SpoOA phosphorelay), a global carbon metabolism regulator (CcpA), and transition state regulators (AbrB, ScoC). In addition, PhoP-PhoR TCS is cross related with YycF-YycG TCS by cross-regulation. While indescribable progress has been made in understanding phosphate deficiency stress response through refined expression of the Pho regulon in the recent past years, many important questions still remain. Solving these questions may provide important information for application study using *B. subtilis*.

Keywords: *B. subtilis*, PhoPR two component system, Pho regulon, phosphate deficiency, signal transduction network

대표적인 그람양성 세균이며, 된장 및 청국장과 같은 대두 발효식품에서 중요한 역할을 하는 *Bacillus subtilis*는 토양과 같은 무기인산(Pi)이 부족한 자연적 환경에 자주 놓이게 된다. 이때에 인산은 *B. subtilis*의 생육에 결정적인 제한요소가 되며, *B. subtilis*는 인산이 결핍되는 스트레스 상황에 직면할 때 이를 극복하기 위한 스트레스 반응 시스템(stress response system)을 작동시켜 여러 가지 유전자들의 발현을 제어한다(19). *B. subtilis*에서 인산결핍에 의해 발현이 조절되는 유전자들은 크게 일반 스트레스 반응(general stress response)을 유도하는 RNA 중합효소(RNA polymerase)의 대체 전사인자(alternative transcription factor)인 σ^B (sigma B)에 의한 조절과 PhoP-PhoR two-component signal transduction system (TCS)에 의해 조절되는 Pho regulon으로 구분 할 수 있다(3). 또한 인산 결핍 시 발현되는 PhoP-PhoR TCS과 σ^B 에 의존적이지 않은 몇 개의 유전자들이 동정되어, 알려지지 않은 인산결핍 조절 시스템이

존재하는 것으로 추정되고 있다(4).

PhoP-PhoR TCS에 의해 조절되는 *B. subtilis*의 Pho regulon 유전자들의 발현 조절의 결과는 여러 구성성분으로부터 인산을 얻고(14, 20), 인산을 세포 내로 흡수하는 역할 뿐만 아니라(44, 46), 필수적인 세포벽의 구성성분의 생산을 전환시키고(29, 31, 45), 호기적·혐기적 호흡에 필요한 조절자(regulator)의 생산을 증가시키는 역할도 수행한다(8).

본 총설에서는 먼저 대장균 Pho regulon에 대해서 간략하게 살펴본 다음, *B. subtilis*의 Pho regulon에 대해서 PhoP-PhoR TCS, Pho regulon에 속하는 유전자들과 조절 메커니즘, 이 신호전달 시스템과 긴밀하게 연결된 여러 다른 조절 시스템과의 상관관계, 다른 TCS와의 상호조절에 대해서 소개하고자 한다.

본론

대장균의 Pho regulon

박테리아에서 외부의 환경조건들에 대한 신호는 여러 종류

* For correspondence. E-mail: jaepark@cu.ac.kr; Tel: +82-53-850-3521; Fax: +82-53-850-3516

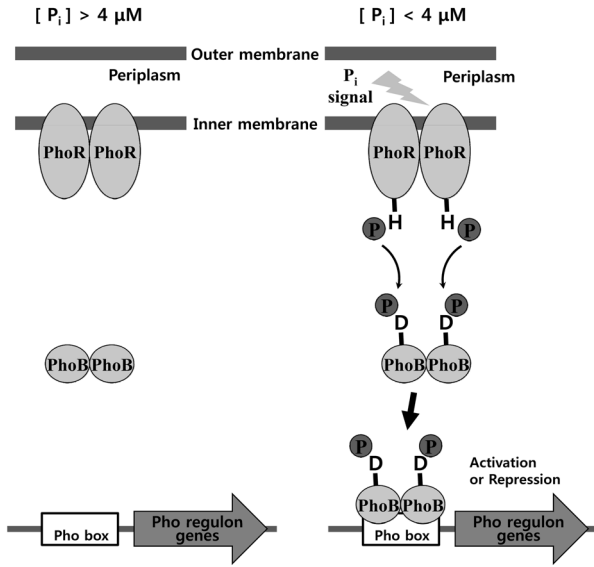


Fig. 1. Control of the Pho regulon via PhoB-PhoR two-component system(TCS) in *E. coli*. See text for detail.

의 TCS들을 통해서 감지되고 유전자의 발현이 조절되게 된다. 이러한 TCS들은 환경에 대한 적응과 생존, 그리고 세균의 병원성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(17, 58). 일반적으로 대장균과 같은 프로테오박테리아(Proteobacteria)의 Pho regulon은 PhoB-PhoR TCS에 의해 조절된다(27). PhoB-PhoR에 의한 Pho regulon의 조절을 Fig. 1에서 요약하여 나타내었다. 세포 내막에 결합되어 있는 histidine kinase (HK)인 PhoR은 페리플라즘(periplasm)의 인산 농도가 $4 \mu M$ 이하일 때 이를 인식하여 히스티딘 잔기를 스스로 인산화되며, 인산화된 PhoR (PhoR~P)는 자신과 짝을 이루는 response regulator (RR)인 PhoB에 인산을 전달한다. 인산화된 PhoB (PhoB~P)는 DNA 결합 단백질로 작용하여 유전자의 전사를 활성화 시키거나 억제하여, 인산이 결핍된 스트레스 상황에 대처한다(52). PhoB~P가 전사 조절자로 작용하는 유전자들을 통칭하여 Pho regulon이라 부르며 최소 47개의 유전자가 여기에 속하는 것으로 알려져 있다(5). PhoB~P는 Pho box라고 불리는 Pho regulon 유전자들의 프로모터에 존재하는 5'-CTGTCATN₄CTGTCAT-3'의 서열에 결합하여 전사를 조절한다(59). 이러한 PhoB의 인산화는 PhoR에 의한 인산화뿐만 아니라, Acetyl phosphate와 같은 저분자 인산-전달체(small molecule phosphonor)에 의해서도 인산화 될 수 있는 것이 확인되었다(25, 34).

인산결핍기에서 다시 인산이 풍부한 상태로 돌아올 경우 대장균의 PhoR은 탈인산화효소(phosphatase) 역할을 통해 PhoB~P로부터 인산을 제거시킴으로써 PhoB~P에 의한 Pho regulon 유전자들의 전사조절 기능을 소거시킨다(26). 이는 PhoB-PhoR TCS가 인산 결핍신호를 전달 할 뿐만 아니라, 인산 결핍 신호를 끊어주는 기능을 동시에 가지고 있어, Pho regulon의 전사 조절을 유기적으로 할 수 있다는 사실을 보여준다.

*B. subtilis*의 Pho regulon

*B. subtilis*의 Pho regulon은 대장균과는 달리 PhoP-PhoR TCS에 의해 조절된다. 인산이 결핍되는 시기에 *B. subtilis*는 PhoR의 아미노말단 센서 도메인을 통해 인산 결핍신호를 인식하며 인식된 신호는 세포내부로 전달된다. 이때 PhoR의 360번 히스티딘 잔기는 자동 인산화된다. 인산화된 PhoR (PhoR~P)은 PhoP의 53번 아스파라긴산 잔기에 인산을 전달하고, PhoP~P는 *phoPR* 자기자신의 전사를 증가시킬 뿐만 아니라 인산결핍 극복에 필요한 일련의 유전자들의 전사를 조절한다 (Table 1)(19). 현재까지 알려진 *B. subtilis*의 Pho regulon 중 인산 결핍 시 발현이 증가되는 것들은 *phoA* (20, 38), *phoB ydhF* 오페론(operon) (4, 20, 38), *phoD tatAd* 오페론(14, 23, 38), *tatCd* (23), *pstSCABaBb* 오페론(38, 46, 56), *glpQ* (4, 38), *tuaABCDEFGH* 오페론(31, 38, 45), *yycOPQ* 오페론(38), *glnQH* 오페론(38), *ykoL* (41, 47), *yhbH* (41), *ytpP* (41), *yfkN* (3), *bsn* (3), *yjdB* (3, 38), *vpr* (3), *ydjM* (9), 그리고 *resABCDE* 오페론(8, 28) 등이다. 또한 PhoP~P는 *phoPR* 오페론의 전사도 활성화 시키는 자기유도(autoinduction) 현상도 나타낸다(19). PhoP~P에 의해 전사가 억제되는 경우는 *tagAB* 오페론(29, 31), *tagDEF* 오페론(29, 31), *dctP*(38)와 *resABCDE* 오페론 내부의 *resDE* 프로모터가 있다(8).

Alkaline phosphatase (APase)를 암호화하는 *phoA*와 *phoB*, 여러 가지 종류의 phosphodiesterase를 암호화하는 *phoD* (phosphodiesterase), *glpQ* (glycerophosphoryl diester phosphodiesterase), *yfkN* (2',3'-cyclic nucleotide 2-phosphodiesterase), RNase의 한 종류인 RNase Bsn을 암호화하는 *bsn*, 그리고 serine protease를 암호화하는 *vpr* 등의 유전자들에 의해 생성되는 단백질들은 세포 밖으로 분비되어 nucleotide, 단백질, alkaloid 등의 분자들로부터 무기인산을 분해하여 이용할 수 있도록 한다. 한편 twin-arginine translocation 경로의 *tatCd*는 PhoD를 세포 외로 분비하는데 반드시 필요한 것으로 확인되었는데, *phoD*와 함께 오페론을 이루고 있는 *tatAd* 또한 비슷한 역할을 하는 것으로 추정된다(23). *pstSCABaBb*의 다섯 개의 유전자로 구성된 오페론은 high-affinity phosphate transporter를 구성하는 단백질을 암호화하는데, 앞서 언급된 단백질들에 의해 세포외부에서 분해되어 형성된 무기인산을 세포 내로 전달하는 역할을 한다. *tuaABCDEFGH*는 인산을 포함하지 않은 세포벽 구성성분인 teichuronic acid 생합성에 관련 유전자들의 오페론이고, *tagAB*와 *tagDEF*는 인산이 포함된 세포벽 구성성분인 teichoic acid 생합성 관련 유전자들의 오페론이다. 따라서, 인산결핍 시 teichoic acid의 합성은 억제하고 teichuronic acid의 합성을 증가시킴으로써 결핍된 인산을 효율적으로 사용할 수 있도록 하는 역할을 한다. 또한 *ydjM* 유전자는 인산결핍 시에 펩티도글리칸(peptidoglycan) 합성에 관여하는 유전자로, Pho~P에 의해서 발현이 증가되는 것이 시험관내에서 확인되었다(9).

resABCDE 오페론은 cytochrome *c* 생합성관련 유전자(8)와 ResD-ResE TCS (28)를 암호화 하고 있어, 호기적·혐기적 호흡의 조절과 Pho regulon 사이에 밀접한 상호작용이 있는 것

을 알 수 있다. 인산 결핍 시에 *resABCDE* 오페론의 전사에 PhoP가 반드시 필요하지만, PhoP만으로 *resA* 앞쪽의 프로모터의 전사를 충분히 이끌기에는 부족하며 ResD가 같이 있어야만 세포 내에서 충분히 발현될 수 있다. 인산 결핍 시기를 제외한 다른 상황에서는 ResD만으로도 충분히 발현을 유도할 수 있다(36, 55).

phoB ydhF 오페론의 *ydhF*는 lipoprotein을 암호화 하는 것으로 추정되고, 인산결핍 시 세포 외부로 분비되는 것이 확인되었으나, 그 정확한 기능은 아직 밝혀지지 않았다(4). 기능이 알려지지 않은 *ykoL*은 *yzkB ykoL* 오페론의 두 번째 유전자로, 이 오페론은 질소 결핍 시에 TnrA 의존적으로 *yzkB* 위쪽 프로모터를 통해 발현이 유도되는데, 인산 결핍 시에는 *ykoL*만 독립적으로 전사되는 것이 확인되었다(47). *yhbH*, *yjdB*, *yycOPQ* 오페론 또한 기능이 알려져 있지 않고, 인산 결핍 시 *phoR* 변이주에서만 이들 유전자의 전사가 극적으로 감소하거나 PhoP 과발현에 의해 전사량의 변화가 생겨, PhoP-PhoR 시스템에 의해 전사가 조절된다는 사실만이 확인되었다(3, 38, 41). 또한 *glnQH* 오페론의 경우 글루타민 ABC transporter로 알려져 있는데, 인산결핍반응에서 어떤 역할을 담당하는지는 알려져 있지 않다(38).

앞서 언급한 *ykoL* 이외에도 다수의 Pho regulon 유전자들이 하나 이상의 프로모터를 가지는 것이 확인되었다. *glpQ*의 경우 인산 결핍 시에는 *glpQ*만 전사가 되나, glycerol-3-phosphate에

의해 유도되는 전사는 *glpQ* 앞에 위치한 *glpT*의 프로모터에서 시작되어 두 유전자가 같이 전사된다(4). *phoB ydhF* 오페론의 경우 *phoB* 앞쪽에 포자형성 특이적인 프로모터(sporulation-specific promoter, Ps)와 Pho~P에 의해 조절되는 영양세포 프로모터(vegetative cell promoter, Pv)의 두 개의 프로모터가 각각 존재할 뿐만 아니라(2), 1.4 kb의 *phoB* 전사물과 2.2 kb의 *phoB ydhF* 전사물도 각각 생산한다(Chesnut and Hulett, unpublished data). 이러한 Pho regulon 유전자들의 전사는 σ^A 와 결합된 RNA 중합효소만으로도 충분한 것으로 대부분 조사되어, Pho regulon의 발현에는 특별한 시그마 요소(sigma factor)가 요구되는 것은 아닌 것으로 보인다(2, 44, 45).

***B. subtilis*의 PhoP-PhoR TCS**

*B. subtilis*는 34개의 RR과 36개의 HK를 가지고 있어 최소한 34개 이상의 TCS을 보유하고 있는 것으로 추정된다(16). 이들 중 인산결핍에 의한 신호전달 시스템을 담당하는 PhoP-PhoR TCS의 PhoP는 날개 형태의 helix-turn-helix (HTH) 도메인을 가진 DNA 결합 단백질에 속하는 OmpR family에 속하는 RR이다(33). PhoP는 240개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 그 구조는 Fig. 2와 같다. 자신과 짝을 이루는 HK인 PhoR에 의해 PhoP의 아미노 말단의 signal receive (REC) 도메인에 위치한 53번 아스파라긴산 잔기가 인산화 되는 것이 시험관 내에서 확인되었으며(50), Phos-Tag Acrylamide gel

Table 1. The list of identified *B. subtilis* Pho regulon genes/operons

Gene/operon	Function	References
<i>phoA</i>	Alkaline phosphatase (APase)	(20, 38)
<i>phoB ydhF</i>	APase, putative lipoprotein	(4, 20, 38)
<i>phoD tatAd</i>	Phosphodiesterase, Secretion of PhoD	(14, 23, 38)
<i>tatCd</i>	Secretion of PhoD	(23)
<i>pstSCABaBb</i>	High-affinity phosphate transport	(38, 46, 56)
<i>tuaABCDEFGH</i>	Teichuronic acid biosynthetic genes	(31, 38, 45)
<i>tagAB</i>	Teichoic acid biosynthetic genes	(29, 31)
<i>tagDEF</i>	Teichoic acid biosynthetic genes	(29, 31)
<i>yycOPQ</i>	Unknown	(38)
<i>glnQH</i>	Glutamine ABC transporter	(38)
<i>ykoL</i>	Unknown	(41, 47)
<i>glpQ</i>	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	(4, 38)
<i>yhbH</i>	Unknown	(41)
<i>yttP</i>	Putative transcriptional regulator	(41)
<i>yfkN</i>	2',3'-cyclic nucleotide 2-phosphodiesterase	(3)
<i>bsn</i>	Extracellular ribonuclease Bsn (RNase Bsn)	(3)
<i>yjdB</i>	Unknown	(3, 38)
<i>vpr</i>	Extracellular serine protease	(3)
<i>ydjM</i>	Cell-wall associated protein	(9)
<i>dctP</i>	C4-dicarboxylic acid transport	(38)
<i>resABCDE</i>	Cytochrome <i>c</i> biosynthetic genes, ResD-ResE two-component systems	(1, 8, 12) (28)
<i>phoPR</i>	PhoP (response regulator), PhoR (histidine kinase)	(19, 38)

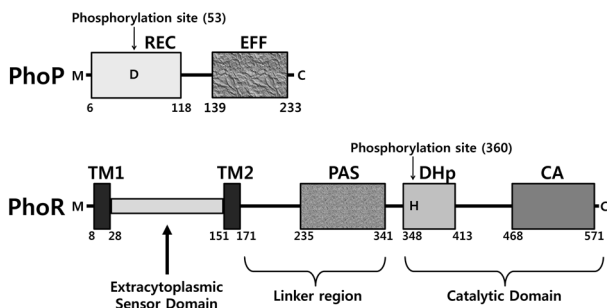


Fig. 2. Topology of PhoP and PhoR in *B. subtilis*. Boxes labeled REC, EFF, PAS, DHP, and CA indicate signal receiver domain, effector domain, PER-ARNT SIM domain, dimerization and histidine phosphotransfer domain, and catalytic and ATP-binding domain, respectively. Boxes labeled TM1 and TM2 represent the transmembrane domains.

(6)을 사용한 최근 연구에서 세포 내에서도 PhoR에 의한 PhoP의 인산화가 일어나는 것이 증명되었으나(Park and Hulett, unpublished data), 대장균의 경우처럼 acetyl phosphate와 같은 저분자 인산-전달체에 의한 인산화는 일어나지 않는 것이 확인되었다(30). PhoP의 effector (EFF) 도메인(Fig. 1) 내에는 DNA-binding 도메인이 존재하고 있어 아스파라긴산 잔기가 인산화되었을 때, Pho regulon 유전자들의 잘 보존된 6-bp의 PhoP 결합서열이라 불리는 5'-TTHAYA-3'에 결합하여 이들 유전자의 발현을 조절한다(13). 이러한 PhoP 결합서열은 2-7 bp 떨어진 위치에 연속적으로 두 개가 존재하는 경우가 대부분이며, 이는 PhoP가 이합체(dimer) 형태로 DNA에 결합하는 것을 보여준다. PhoP의 REC 도메인 이합체의 입체결정에서 113번 아르기닌 잔기와 63번 아스파라긴산의 상호작용이 PhoP 이합체에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었고(7), PhoP_{R113E}는 인산화는 가능하나, 이합체 형성이나 PhoP 결합서열에 결합은 되지 않는다(10). 이는 PhoP가 인산화된다 하더라도 이합체가 형성되지 않을 경우 DNA에 결합하지 못하므로, PhoP 이합체 형성은 Pho regulon의 조절에 필수적이라는 것을 보여준다.

Alkaline phosphatase와 같은 Pho regulon 유전자들의 발현은 세포 외부의 무기인산 농도가 100 μM 이하가 되면 일어난다(2, 54), 이때 PhoR의 360번 히스티딘 잔기는 자동인산화되어 PhoP의 53번 아스파라긴산 잔기에 인산을 전달한다. Fabret 등은 *B. subtilis*의 36개의 HK를 인산화되는 히스티딘 잔기 주

변의 아미노산 서열과 Transmembrane (TM) 서열의 크기와 숫자에 따라서 분류하였는데, PhoR은 ResE와 YycG 두 개의 HK와 같은 소그룹에 속하며(16), 이들 소그룹의 HK들은 아미노 말단에 두 개의 TM 도메인을 가지고 있다(Fig. 1). PhoR의 경우 두 TM 도메인 사이의 extracytoplasmic 센서 도메인(Fig. 1)에서 세포외부의 인산농도를 인식해서 PhoR의 자동인산화가 일어나는 것으로 추측했으나, PER-ARNT-SIM (PAS) 도메인(61) 이후의 서열만이 존재하는 변이주에서도 인산 농도 저하에 따른 Pho regulon 유전자들의 발현이 wild type 균주의 약 30% 수준에서 일어나는 것이 확인되어(50), PAS 도메인에서도 인산의 부족한 상황을 어느 정도 인식할 수 있는 것으로 보여진다. 또한 PAS 도메인 내의 303번 시스테인 잔기가 알라닌으로 변이된 균주에서 Pho induction이 75% 감소하였으며, PhoR~P는 대부분의 인산을 PhoP에 전달할 수 있는 반면에 PhoR_{C303A}~P는 세포 내에서 PhoP에 인산을 10% 정도만을 전달하여(15), PAS 도메인 내의 303번 시스테인 잔기가 PhoR에서 PhoP로 인산이 전달되는데 있어서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 한편, *B. subtilis*의 PhoR은 탈인산화효소 역할은 없고 단지 인산화된 PhoP (PhoP~P)로부터 PhoR로의 역인산화(reverse-phosphorylation) 반응만 일어날 수 있다는 것이 확인되었는데(51), 인산 결핍기에서 다시 인산이 풍부한 상태로 돌아오는 경우에 어떠한 메커니즘으로 PhoP~P로부터 인산을 제거하여 Pho regulon의 전사조절 기능을 소거하는지에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았다.

대장균의 PhoB-PhoR TCS와 *B. subtilis*의 TCS 사이에는 몇 가지 특징적인 차이점을 보이고 있는데, 이러한 특징적인 차이점들에 의해 두 미생물간의 Pho regulon의 차이를 보이는 것으로 생각된다. 대장균과 *B. subtilis*의 Pho regulon의 조절에서 특징적인 차이들을 Table 2에 정리하여 나타내었다.

*B. subtilis*의 *phoPR* operon 전사 조절

*B. subtilis*는 복잡한 조절 장치에 의해서 *phoPR* 오페론의 전사를 조절하는 것으로 밝혀지고 있는데, *phoP*의 앞쪽에는 현재까지 6개의 프로모터가 발견되었으며(Table 3), 각각은 프로모터들에서 생육시기와 환경에 따라 전사가 일어나는 시기와 전사량은 달라진다(39, 42). *phoPR* 오페론의 전사에는 각각의 프로모터에 대응하는 여러 가지 형태의 RNA 중합효소의 전효소(holoenzyme)가 필요한데, E σ^A 와 대응하는 세 개의 프

Table 2. Comparison of Pho regulon between *E. coli* and *B. subtilis*

	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
TCS	PhoB-PhoR	PhoP-PhoR
RR binding sequence	Pho box CTGTCAN ₄ CTGTCA	PhoP binding sequence TTHAYAN ₂₋₇ TTHAYA
Other phosphor-donor	Small molecule phosphor donor (Acetyl phosphate)	None
Pi concentration for Pho regulon induction	4 μM	100 μM
Phosphatase activity of PhoR	Phosphatase activity	None Reverse phosphorylation

Table 3. The list of promoters identified within *phoPR* operon promoter region in *B. subtilis*

promoters	Transcription start site	σ factor ^a	Regulator	References
P _{B1}	-23	σ^B	ScoC ^b	(24, 39)
P _{E2}	-36~38	σ^E	PhoP~P ^c , ScoC ^b	(24, 39)
P _{A3}	-48~49	σ^A	Unknown ^d	(39, 42)
P _{A4}	-69	σ^A	PhoP~P ^c , ScoC ^b	(24, 39)
P _{A6}	-175	σ^A	CcpA ^b , ScoC ^b	(24, 42)

^a identified by *in vitro* transcription using Core RNA polymerase with purified σ factor

^b repressor

^c activator

^d missing or poor -35 element; very weak promoter *in vitro* compared to *in vivo*

^e not σ^A , σ^B , σ^E or σ^H responsive. (Unpublished data; Paul and Hulett)

^f transcript only observed in a σ^B mutant

로모터(P_{A3}, P_{A4}, P_{A6}), E σ^B 와 대응하는 프로모터(P_{B1}), 그리고 E σ^E 와 대응하는 프로모터(P_{E2})이다(Table 1). 다섯 번째 프로모터인 P₅의 경우 *sigB* 변이주에서만 전사가 일어나는 것이 확인되었고(39), E σ^A , E σ^B , E σ^E , E σ^H 와 각각 대응하여 시험관 내에서 전사가 일어나지 않아, 어떤 시그마 요소가 필요한지에 아직 알려지지 않았다(Paul and Hulett, Unpublished data). *sigB* 변이주에서는 인산 결핍시기에는 일반 스트레스 반응을 유도하는 σ^B 에 의존적인 인산결핍 유도 유전자들의 발현이 일어나지 않기 때문에, Pho regulon에 의한 스트레스 반응을 증가시키기 위해, *phoPR*의 전사가 더욱 증가되기 위한 현상으로 추정되고 있다(19, 39, 40).

인산 결핍시기 이전의 대수기에는 P_{A4}에 의한 낮은 수준의 전사만 일어나는데 비해 인산 결핍시기에 도달하면, P_{A3}와 P_{E2}에서의 전사가 극적으로 증가하게 된다(24, 39). P_{E2}의 경우 Pho~P가 활성자(activator)로 작용하여 자가유도 현상을 일으키나, P_{A3}의 경우 시험관에서 보다 세포 내에서 더 높은 수준으로 전사가 일어나는 것이 확인되어, 알려지지 않은 조절자에

의해서 인산 결핍시기에 전사가 유도되는 것으로 보인다(39). 가장 최근에 발견된 여섯 번째 프로모터 P_{A6}는 광범위한 탄소 대사억제(carbon catabolite response)를 조절하는 CcpA가 존재하지 않을 때와, CcpA가 결합하는 서열인 *cre* (catabolite responsive element) 변이주에서만 그 존재가 확인되어, 탄소대사억제 현상과 Pho regulon 조절이 상호 연결되어 있음을 시사하고 있다(24, 42). 최근에 6개중 4개의 프로모터(P_{B1}, P_{E2}, P_{A4}, P_{A6})의 전사가 영양세포에서 포자로의 전위기(transition state)의 조절자(regulator) 중의 하나인 ScoC에 의해 억제되는 사실 또한 확인 되었다(24).

신호전달 네트워크에 의해 조절되는 *B. subtilis*의 Pho regulon

*B. subtilis*에서 PhoP-PhoR TCS에 의해 조절되는 인산 결핍 반응은 여러 개의 TCS을 포함한 상호 의존적인 조절 네트워크(regulatory network)에 의해 연결되어 있는 것이 확인되었으며, 이러한 조절 네트워크를 통해 *B. subtilis*는 복잡한 환경

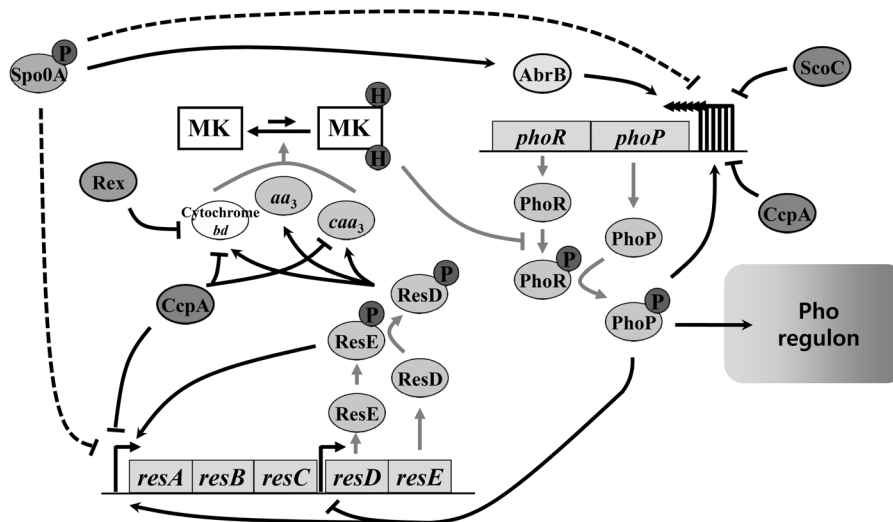


Fig. 3. Model of the interconnected signal transduction network involving Pho regulon in *B. subtilis*. Box labeled MK indicate menaquinone. Direct interactions that have been demonstrated are represented with solid lines. Dashed lines are utilized for interactions that could either be direct or indirect. Positive regulation is labeled with an arrow, while repression is labeled with a \perp .

적 조건에서도 최적의 반응이 일어나도록 미세조정이 가능하다. PhoP-PhoR TCS는 최소한 세 개의 TCS (PhoP-PhoR, ResD-ResE, Spo0A phosphorelay)와 전위기 조절자인 AbrB, ScoC, 그리고 탄소대사억제 조절자 CcpA 등을 포함하고 있는 복잡한 신호전달 네트워크(signal transduction network)의 일부이다(Fig. 3)(54). Spo0A phosphorelay는 정상기 초기와 포자형성에 필수적이며, ResD-ResE는 늦은 생장기에 호흡조절에 관여한다(35, 37, 55, 60).

Pho regulon은 ResD-ResE TCS와 AbrB를 포함하는 두 가지 경로를 통해서 활성화 되는데, *resD* 변이주에서 Pho regulon의 반응이 약 80% 감소한 반면, *abrB* 변이주에서 약간 감소하였다(21, 22, 54). *resD abrB* 변이를 모두 가진 변이주는 Pho regulon의 발현이 전혀 일어나지 않아 AbrB는 나머지 20%의 Pho regulon 유도를 담당하고 있음을 보여준다(19). AbrB가 어떻게 Pho regulon 활성을 유도하는지에 대해서 정확하게 규명되지는 않았으나, *phoPR* 프로모터와 강하게 결합을 하는 것이 확인되어 활성화로서 *phoPR*의 전사를 증가시키는 것으로 추정하고 있다(Strauch and Hulett, unpublished data). ResD-ResE TCS에 의한 Pho regulon 발현 유도는 ResD~P에 의해 유도되는 terminal oxidase들(*aa3/caa3*)에 의해 간접적으로 일어나는데, 환원된 형태로 존재하던 menaquinone (MK)과 같은 퀴논(quinone)들은 이들 terminal oxidase들에 의해 산화된 형태로 바뀌게 된다(60). 환원된 형태의 퀴논들은 시험관 내에서 PhoR의 자동인산화(auto-phosphorylation)를 저해하는 것이 확인되었는데, ResD가 환원된 형태의 퀴논들을 산화시켜 제거함으로써 Pho regulon 유도를 증가시키는 것이다(49). 이러한 사실에 대한 또 다른 증거로 cytochrome *bd* oxidase를 암호화하는 *cydABCD* 오페론의 억제자인 *rex* (*ydiH*)와 *resD*의 변이를 동시에 가진 변이주에서는, *cydABCD*의 발현이 일어나 ResD~P가 없는 상황에서도 Pho regulon의 유도가 완전히 일어나는 현상을 들 수 있다(49). 이는 cytochrome *bd* oxidase가 *resD* 변이주에서 *aa3*와 *caa3*가 줄어드는 것을 대체하여, 환원된 형태의 퀴논을 산화시키는 terminal oxidase의 기능을 대신하기에 충분하다는 것을 보여준다. Spo0A phosphorelay 시스템에 의해 형성되는 Spo0A~P는 *abrB*의 발현을 억제함으로써(53) Pho regulon의 발현을 간접적으로 억제하고, *resA* 프로모터의 전사를 억제함으로써 *resDE*의 발현을 억제한다(Sun and Hulett, unpublished data). 또 다른 전이기 조절자인 ScoC도 *phoPR*의 전사에서 억제자로 작용하여 발현의 억제하는 것으로 확인되었는데(24), *scoC* 변이주에서 Pho regulon의 유도가 증가되었는지는 아직 확인되지 않았다. 탄소대사억제를 조절하는 CcpA는 *phoPR* (42), *resABCDE* (12), *cydABCD* (43), heme A 합성에 필요한 CtaB와 *caa3* oxidase를 암호화하는 *ctaBCDEF* (32) 오페론의 전사를 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 Pho regulon을 포함하는 신호전달 네트워크가 탄소대사와도 밀접한 관련을 맺고 있다고 유추할 수 있다. CcpA의 부재는 이러한 신호전달 네트워크의 신호를 증폭시켜 Pho regulon의 발현을 증가시킬 것으로 예상되었으나, *ccpA* 변이주에서 PhoP의 발현량이 증가하는데 반하여, Pho regulon 유전

자들의 발현은 오히려 감소하는 현상을 나타내었는데(11), 최 등은 CcpA가 *phoPR*의 억제자로서의 역할 뿐만 아니라 활성화자로서도 작용 할 것이라고 예상하기도 했다(11). 그러나, 최근 연구에서 PhoP~P의 절대적인 양보다는 PhoP와 PhoP~P의 세포 내 비율에 의해서 Pho regulon의 발현 정도가 결정되는 것으로 확인되어, *ccpA* 변이주에서 PhoP의 양의 증가로 PhoP~P의 비율이 줄어들었기 때문에 예상되고 있다(Park and Hulett, unpublished data).

B. *subtilis*에서 PhoPR TCS와 다른 TCS와의 상호조절

TCS를 구성하는 HK와 RR은 다른 TCS의 HK와 RR들과 매우 구조가 유사한 도메인들을 공유하고 있기 때문에, 다른 TCS와 혼선(cross-talk)이 생길 가능성이 존재한다. 시험관내에서 실험을 통해 이러한 TCS간의 혼선에 대해서 널리 보고되고 있으나, 대체적으로 상호 다른 경로의 TCS 사이에서 혼선은 HK가 가지고 있는 탈인산효소(phosphatase) 역가와 인산의 경쟁을 통해 방지되기 때문에, 실제로 세포 내에서 이러한 현상이 보고된 예는 많지 않다(27). 그러나 특정한 조건에서는 세균이 이러한 혼선을 허용했을 때 여러 가지 신호를 통합하거나 하나의 신호를 분별화시키는 등의 이로인한 현상이 될 수 있는데, 이러한 경우를 상호조절(cross-regulation)이라 한다(57).

*B. subtilis*에서는 PhoP-PhoR과 YycF-YycG 사이에서 상호조절이 일어난다고 보고되었다. Autolysin으로 추정되는 단백질을 암호화 하고 있는 *yocH*의 경우 인산결핍시기에 발현이 증가됨에도 불구하고 PhoP에 의존적이지 않았고, YycF에 의존적인 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 인산 결핍기에 *phoR*의 변이주에서는 *yocH*의 전사가 일어나지 않았고, 시험관 내에서 PhoR에 의한 YycF의 인산화가 확인되어 인산 결핍 시기의 PhoR에 의한 YycF의 상호조절 작용으로 *yocH*의 발현이 조절된다고 제안되었다(18). 이와 반대로 YycG에 의한 PhoP의 인산화도 최근에 확인되었는데, *phoR ccpA* 변이주에서 인산 결핍과 관계없이 Pho regulon 유전자들의 발현이 일어났을 뿐만 아니라 PhoP의 인산화도 세포 내에서 확인되었다. 또한 YycG와 PhoP가 상호작용하는 것을 공동면역침강법(co-immunoprecipitation)을 통해 확인되었을 뿐만 아니라, 시험관 내에서 YycG가 PhoP를 인산화시킬 수 있는 것이 확인되었다(Park and Hulett, unpublished data). 이러한 두 TCS 사이의 상호조절은 PhoR과 YycG가 같은 소그룹에 속할 정도의 구조적인 유사성을 가지고 있음에서 기인하는 것으로 보인다(16). 또한 상호 구조적인 유사성을 가지고 있음에도 불구하고 PhoR의 경우 탈인산효소 도메인도 가지고 있지 않고 탈인산화 역가를 가지고 있지 않고, 역인산화(reverse-phosphorylation)만이 가능해(51) 이러한 상호조절이 더욱 잘 일어나는 것으로 보인다.

결론

지금까지 살펴본 바와 같이 인산이 결핍된 환경에서 *B. subtilis*는 PhoP-PhoR TCS를 이용한 신호전달시스템을 사용하여 스트레스를 극복하기 위한 여러 유전자들의 발현을 조절하

여, 인산이 결핍된 환경을 극복한다. 특히 *B. subtilis*는 대장균에 비해서 훨씬 높은 농도의 무기인산이 존재할 때도 Pho regulon이 발현되는 점에서, 자연환경에서 인산이 *B. subtilis*의 생육을 결정적인 영향을 미치는 영양인자라는 것을 짐작 할 수 있다. 따라서 *B. subtilis*에서 인산 결핍은 자주 직면할 수 있는 스트레스 상황이므로, Pho regulon은 *B. subtilis*에서 가장 중요한 스트레스 반응 중의 하나로 보여지며, 상호 연결된 복잡한 신호전달 시스템들에 의해서 상황에 적합하도록 이들 유전자들의 발현이 미세 조정된다. 지난 30년 동안 그램 양성 모델 세균인 *B. subtilis*의 Pho regulon에 대한 연구가 지속되어 왔고, Pho regulon이 어떻게 조절되는지 많은 부분이 밝혀졌지만, 아직도 밝혀지지 않은 부분들이 존재한다. *ykoL*, *yhbH*, *yjdB*, *yyeOPQ* 등의 기능이 아직 밝혀지지 않은 *B. subtilis*의 Pho regulon 유전자들의 기능을 밝혀야 할 것이며, *glnQH*와 *dctP*가 인산결핍기에 어떤 역할을 하는지 규명하는 것 또한 필요하다. 다른 조절네트워크와의 연결이 더 되었는지에 대한 연구도 필요한데, 방선균인 *Streptomyces coelicolor*의 경우 Pho regulon과 질소대사가 연결되어 있는 것으로 확인되었다(48). *B. subtilis*의 경우 arginase와 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase를 암호화하는 *rocF*와 *rocA*의 변이주들이 Pho regulon의 발현유도가 상실되는 현상(Qi and Hulett, unpublished data), *ykoL*이 인산 결핍기뿐만 아니라 질소 결핍기에도 발현이 유도된다는 사실(47), *glnQH*가 PhoP에 의해 발현이 증가된다는 점(38) 등의 Pho regulon과 질소대사조절 사이의 연관 가능성을 암시하는 증거들이 있다. 이러한 밝혀지지 않은 부분에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야만 스트레스에 대한 방어기작 중의 하나인 Pho regulon의 복잡한 신호전달 시스템에 대한 완전한 이해가 될 것이며, 이러한 연구들은 *B. subtilis*를 이용한 여러 가지 응용연구에 중요한 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 기대한다.

적요

인산 결핍기에 직면한 *Bacillus subtilis*는 PhoP-PhoR two-component system (TCS)를 통해 이러한 상황을 인식하고 생존을 유지하기 위해 Pho regulon으로 불리는 일련의 유전자들의 발현을 조절한다. 이때 histidine kinase인 PhoR은 자동 인산화되어, 인산을 response regulator인 PhoP에 전달한다. 인산화된 PhoP (PhoP~P)는 Pho regulon 유전자의 프로모터(promoter) 부위에 존재하는 반복되는 6 bp의 잘 보존된 PhoP 결합서열에 결합하여 해당 유전자의 발현을 활성화시키거나 억제한다. 이러한 Pho regulon 신호전달 시스템은 최소한 세 개의 TCS (PhoP-PhoR, ResD-ResE TCS, SpoOA phosphorelay), 광범위한 탄소대사 조절자(CcpA), 전위기 조절자(AbrB, ScoC) 등을 포함하는 신호전달 시스템과 밀접하게 상호 연결되어 있을 뿐만 아니라, 생육에 필수적인 YycF-YycG TCS와 상호조절을 통한 밀접한 관련을 가지고 있다. Pho regulon에 의한 인산결핍 스트레스 반응을 이해하는데 많은 진척이 있었으나, 많은 의문들은 여전히 남아있다. 이러한 의문들을 푸는 일은 *B.*

*subtilis*의 응용연구에 중요한 정보를 제공할 것이다.

감사의 말

본 연구는 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 되었음(KRF-2007-357-00040). 본 논문이 쓰이는데 필요한 자료들을 제공하고, 많은 조언을 해준 F. Marion Hulett 교수에게 감사한다.

참고문헌

1. Abdel-Fattah, W.R. 2007. *Bacillus subtilis* PhoP~P direct roles in Pho and Res regulation in response to Pi-stress. PhD Thesis, University of Illinois, Chicago, USA.
2. Abdel-Fattah, W.R., Y.H. Chen, A. Eldakak, and F.M. Hulett. 2005. *Bacillus subtilis* phosphorylated PhoP: Direct activation of the $E\sigma^A$ - and repression of the $E\sigma^E$ -responsive *phoB*- P_{S-V} promoters during Pho response. *J. Bacteriol.* 187, 5166-5178.
3. Allenby, N.E.E., N. O'Connor, Z. Prágai, A.C. Ward, A. Wipat, and C.R. Harwood. 2005. Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187, 8063-8080.
4. Antelmann, H., C. Scharf, and M. Hecker. 2000. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics approach and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* 182, 4478-4490.
5. Baek, J.H. and S.Y. Lee. 2006. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 264, 104-109.
6. Barbieri, C.M. and A.M. Stock. 2008. Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both *in vitro* and *in vivo* using Phos-tag-based reagents. *Anal. Biochem.* 376, 73-82.
7. Birck, C., Y.H. Chen, F.M. Hulett, and J.P. Samama. 2003. The crystal structure of the phosphorylation domain in PhoP reveals a functional tandem association mediated by an asymmetric interface. *J. Bacteriol.* 185, 254-261.
8. Birkey, S.M., W. Liu, X.H. Zhang, M.F. Duggan, and F.M. Hulett. 1998. Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. *Mol. Microbiol.* 30, 943-953.
9. Bisicchia, P., E. Lioliou, D. Noone, L.I. Salzberg, E. Botella, S. Hübner, and K.M. Devine. 2010. Peptidoglycan metabolism is controlled by the WalRK (YycFG) and PhoPR two-component systems in phosphate-limited *Bacillus subtilis* cell. *Mol. Microbiol.* 75, 972-989.
10. Chen, Y.H., C. Birck, J.P. Samama, and F.M. Hulett. 2003. Residue R113 is essential for PhoP dimerization and function: a residue buried in the asymmetric PhoP dimer interface determined in the PhoPN three-dimensional crystal structure. *J. Bacteriol.* 185, 262-273.
11. Choi, S.K. and M.H. Saier. 2005. Regulation of pho regulon gene expression by the carbon control protein A, CcpA, in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10, 40-50.
12. Choi, S.K. and M.H. Saier. 2006. Mechanism of CcpA-mediated glucose repression of the *resABCDE* Operon of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 104-110.
13. Eder, S., W. Liu, and F.M. Hulett. 1999. Mutational analysis of the *phoD* promoter in *Bacillus subtilis*: Implications for PhoP binding and promoter activation of Pho regulon promoters. *J. Bacteriol.* 181, 2017-2025.

14. Eder, S., L. Shi, K. Jensen, K. Yamane, and F.M. Hulett. 1996. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, phoD. *Microbiology* 142, 2041-2047.
15. Eldakak, A. and F.M. Hulett. 2007. Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189, 410-421.
16. Fabret, C., V.A. Feher, and J.A. Hoch. 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. *J. Bacteriol.* 181, 1975-1983.
17. Hoch, J.A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 165-170.
18. Howell, A., S. Dubrac, D. Noone, K.I. Varughese, and K. Devin. 2006. Interaction between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: the PhoR kinase phosphorylates the noncognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Mol. Microbiol.* 59, 1199-1215.
19. Hulett, F.M. 2002. The Pho Regulon, pp. 193-201. In A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick (eds.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C., USA.
20. Hulett, F.M., E.E. Kim, C. Bookstein, N.V. Kapp, C.W. Edwards, and H.W. Wyckoff. 1991. *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase III and phosphatase IV. Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure. *J. Biol. Chem.* 266, 1077-1084.
21. Hulett, F.M., J.W. Lee, L. Shi, G.F. Sun, R. Chesnut, E. Sharkova, M.F. Duggan, and N. Kapp. 1994. Sequential action of two-component genetic switches regulates the Pho regulon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 1348-1358.
22. Jensen, K.K., E. Sharkova, M.F. Duggan, Y. Qi, A. Koide, J.A. Hoch, and F.M. Hulett. 1993. *Bacillus subtilis* transcription regulator, Spo0A, decreases alkaline phosphatase levels induced by phosphate starvation. *J. Bacteriol.* 175, 3749-3756.
23. Jongbloed, J.D.H., U. Martin, H. Antelmann, M. Hecker, H. Tjalsma, G. Venema, S. Bron, J.M.v. Dijl, and J. Müller. 2000. TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 41350-41357.
24. Kaushal, B., S. Paul, and F.M. Hulett. 2010. Direct regulation of *Bacillus subtilis* *phoPR* transcription by transition state regulator ScoC. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00089-10.
25. Kim, S.K., M.R. Wilmes-Riesenberg, and B.L. Wanner. 1996. Involvement of the sensor kinase EnvZ in the *in vivo* activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol. Microbiol.* 22, 135-147.
26. Lamarche, M.G., B.L. Wanner, S. Crépin, and J. Harel. 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 461-473.
27. Laub, M.T. and M. Goulian. 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* 41, 121-145.
28. Le Brun, N.E., J. Bengtsson, and L. Hederstedt. 2000. Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 36, 638-650.
29. Liu, W., S. Eder, and F.M. Hulett. 1998. Analysis of *Bacillus subtilis* *tagAB* and *tagDEF* expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP~P. *J. Bacteriol.* 180, 753-758.
30. Liu, W. and F.M. Hulett. 1997. *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J. Bacteriol.* 179, 6302-6310.
31. Liu, W. and F.M. Hulett. 1998. Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site. *Microbiology* 144, 1443-1450.
32. Liu, X. and H.W. Taber. 1998. Catabolite regulation of the *Bacillus subtilis* *ctaBCDEF* gene cluster. *J. Bacteriol.* 180, 6154-6163.
33. Martínez-Hackert, E. and A.M. Stock. 1997. The DNA-binding domain of OmpR: crystal structure of a winged helix transcription factor. *Structure* 5, 109-124.
34. McCleary, W.R. and J.B. Stock. 1994. Acetyl phosphate and the activation of 2-component response regulators. *J. Biol. Chem.* 269, 31567-31572.
35. Nakano, M.M. and F.M. Hulett. 1997. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 1-7.
36. Nakano, M.M., Y. Zhu, K. Haga, H. Yoshikawa, A.L. Sonenshein, and P. Zuber. 1999. A mutation in the 3-phosphoglycerate kinase gene allows anaerobic growth of *Bacillus subtilis* in the absence of ResE kinase. *J. Bacteriol.* 181, 7087-7097.
37. Nakano, M.M., Y. Zhu, M. LaCelle, X.H. Zhang, and F.M. Hulett. 2000. Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 37, 1198-1207.
38. Ogura, M., H. Yamaguchi, K.I. Yoshida, Y. Fujita, and T. Tanaka. 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems *Nucleic Acids Res.* 29, 3804-3813.
39. Paul, S., S. Birkey, W. Liu, and F.M. Hulett. 2004. Autoinduction of *Bacillus subtilis* *phoPR* operon transcription results from enhanced transcription from $E\sigma^A$ - and $E\sigma^E$ -responsive promoters by phosphorylated PhoP. *J. Bacteriol.* 186, 4262-4275.
40. Prágai, Z., N.E. Allenby, N. O'Connor, S. Dubrac, G. Rapoport, T. Msadek, and C.R. Harwood. 2004. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186, 1182-1190.
41. Prágai, Z. and C.R. Harwood. 2002. Regulatory interactions between the Pho and σ^B -dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 148, 1593-1602.
42. Puri-Taneja, A., S. Paul, Y.H. Chen, and F.M. Hulett. 2006. CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P_{A6}. *J. Bacteriol.* 188, 1266-1278.
43. Puri-Taneja, A., M. Schau, Y.H. Chen, and F.M. Hulett. 2007. Regulators of the *Bacillus subtilis* *cydABCD* operon: Identification of a negative regulator, CcpA, and a positive regulator, ResD. *J. Bacteriol.* 189, 3348-3358.
44. Qi, Y. and F.M. Hulett. 1998. PhoP~P and RNA polymerases σ^A holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP~P activator sites within the coding region stimulate transcription *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 28, 1187-1197.
45. Qi, Y. and F.M. Hulett. 1998. Role of PhoP similar to P in transcriptional regulation of genes involved in cell wall anionic polymer biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 4007-4010.
46. Qi, Y., Y. Kobayashi, and F.M. Hulett. 1997. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the Pho regulon. *J. Bacteriol.* 179, 2534-2539.
47. Robichon, D., M. Arnaud, R. Gardan, Z. Prágai, M. O'Reilly, G. Rapoport, and M. Debarbouille. 2000. Expression of a new operon from *Bacillus subtilis*, *yzkB-ykoL*, under the control of the TnrA and PhoP-PhoR global regulator. *J. Bacteriol.* 182, 1226-1231.
48. Rodríguez-García, A., A. Sola-Landa, K. Apel, F. Santos-Beneit, and J.F. Martín. 2009. Phosphate control over nitrogen metabolism

- in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Res.* 37, 3230-3242.
49. Schau, M., A. Eldakak, and F.M. Hulett. 2004. Terminal oxidases are essential to bypass the requirement for ResD for full Pho induction in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186, 8424-8432.
50. Shi, L. and F.M. Hulett. 1999. The cytoplasmic kinase domain of PhoR is sufficient for the low phosphate-inducible expression of Pho regulon genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 31, 211-222.
51. Shi, L., W. Liu, and F.M. Hulett. 1999. Decay of activated *Bacillus subtilis* Pho response regulator, PhoP~P, involves the PhoR~P intermediate. *Biochemistry* 38, 10119-10125.
52. Smith, M.W. and J.W. Payne. 1992. Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 183-190.
53. Strauch, M., V. Webb, G. Spiegelman, and J.A. Hoch. 1990. The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1801-1805.
54. Sun, G.F., S.M. Birkey, and F.M. Hulett. 1996. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19, 941-948.
55. Sun, G.F., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M.F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S.D. Ehrlich, and F.M. Hulett. 1996. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 1374-1385.
56. Takemaru, K., M. Mizuno, and Y. Kobayashi. 1996. A *Bacillus subtilis* gene cluster similar to the *Escherichia coli* phosphate-specific transport (*pst*) operon. *Microbiology* 142, 2017-2020.
57. Wanner, B.L. 1992. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator protein important in bacteria? *J. Bacteriol.* 174, 2053-2058.
58. West, A.H. and A.M. Stock. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26, 369-376.
59. Yuan, Z.C., R. Zaheer, R. Morton, and T.M. Finan. 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 34, 2686-2697.
60. Zhang, X.H. and F.M. Hulett. 2000. ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: *ctaA* promoter regulation. *Mol. Microbiol.* 37, 1208-1219.
61. Zhulin, I.B. and B.L. Taylor. 1997. PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22, 331-333.