

## Metabolic Characterization of the *Corynebacterium glutamicum* using DNA Microarray Technology

조광명, 장계우, 김성준, 박영훈  
제일제당 종합기술원 바이오연구소  
전화 (031) 639-4364, FAX (031) 632-2784

### ABSTRACT

DNA microarray with a set of 37 *Corynebacterium glutamicum* genes encoding enzymes for primary metabolism of glycolysis, TCA cycle and lysine biosynthesis, anaplerosis etc was constructed on slide glass in triplicate. With this DNA microarray, metabolic characteristics of the lysine-producing strain was analyzed during different phase of the cultivation. The major differences in using glucose as a carbon source instead of sucrose was found in the anaplerolytic enzymes, which control the interconversion of C3 and C4 metabolites. Also, the expression profile of these major enzymes was found to be quite distinct among different phases of growth.

### 서 론

최근까지 Public domain에 85종을 포함하여 약 265종 미생물 Genome 해석이 완료되었으며 이러한 미생물 genome data의 축적은 DNA microarray기술과 결합되어 기존의 연구방법으로는 불가능했던 전체 genome상의 유전자들의 발현양상에 대한 종합적인 정보를 제공함으로써 특히 산업용 미생물의 대사공학적 응용을 통한 생산성의 향상에 크게 기여할 수 있으리라 판단된다<sup>1,2</sup>. 본 논문에서는 아미노산 및 핵산 생산에 주로 사용되는 산업용 미생물인 *Corynebacterium glutamicum*의 주요 대사관련 유전자 37종을 cloning하여 최근에 개발된 DNA microarray기술을 이용하여 DNA microarray를 제작하고 이를 이용한 서로 다른 탄소원과 배양단계에 따른 주요 대사특성을 분석, 고찰해 보았다.

### 재료 및 방법

#### DNA Microarray 제작

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032의 염색체 DNA로부터 지금까지 알려진 유전자 중에서 주요 대사과정 (glycolysis, TCA cycle, Anaplerosis, Lysine biosynthesis, Pentose phosphate, 기타)에 관련된 37종의 유전자에 대한 specific primer를 제작하여 PCR반응을 수행하여 각 유전자의 ORF를 확보한 후 이들을 분리정제하고 control DNA로 human에서 유래된 3종류의 유전자를 같이 사용하여 전체 40개의 유전자를 triplicate로 하는 120개의 spot을 가진 DNA microarray를 제작하였다.

#### DNA Microarray 분석 및 Data Analysis

*Corynebacterium glutamicum* YS1, 라이신 생산균주를 포도당과 원당조건에서 각각 배양하면서 초기적응기, 성장기, 라이신 생산기 등의 배양단계별로 샘플을 취해 전체 RNA를 hot phenol법으로 분리한후 RNeasy column을 이용하여 정제한 후 random hexamer를 primer로 하는 Reverse Transcription 방법을 이용하여 cDNA를 Cy3 or Cy5-dUTP 로 labeling하여 합성한 후 이를 automatic hybridization station을 이용하여 hybridization 시킨후 laser scanner로 scanning하여 결과를 얻었음. 또한 결과해석을 위해서 먼저 global normalization과 rank invariant method<sup>3</sup>를 동시에 사용한 normalization으로 결과의 정확성을 기하였다.

### 결과 및 고찰

40개의 유전자를 triplicate로 spotting한 DNA microarray를 제작하여 이를 CALIBRATION 실험을 통해 검증해 본 결과 유전자 발현양상의 분석에 매우 적합한 것으로 나타났다. 이를 이용하여 라이신 생산균주인 *Corynebacterium glutamicum* YS1의 포도당과 원당을 각각 탄소원으로 하여 각각 적응기, 대수성장기, 라이신 생합성기로 나누어 주요 유전자의 발현을 비교 분석한 결과 포도당을 사용시 원당을 사용할 경우에 비해 pyruvate carboxylase, PEP carboxylase등의 발현이 repression을 받는 것으로 나타났으며 라이신 생합성기에는 대수성장기에 비해 glycolysis 및 TCA 유전자 발현이 억제되는 것으로 나타났으며 대신 라이신합성과 관련된 유전자들의 발현이 증대되는 것이 확인되었다. 따라서 이러한 분석을 기초로 산업용 미생물의 대사공학적 응용을 위한 전략이 수립될 수 있었다.

### 요 약

37종의 주요 대사관련 유전자를 triplicate로 사용하여 DNA microarray를 제작하여 라이신 생산균주의 포도당과 원당을 탄소원으로 하여 배양시기에 따른 대사특성을 분석하였다. 포도당과 원당 사용시 C3, C4 대사산물의 변환에 관련된 anaplerosis에 관여하는 유전자의 발현변화가 매우 중요함을 파악할 수 있었다. 또한 배양시기에 따라 매우 특이적인 유전자 발현 양상을 보임을 확인할 수 있었다.

### 참고문헌

1. Andrea Loos et al., "Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays" (2001), Appl. Environ. Microbiol., 67(5), 2310-2318.
2. Soren Peterson et al., "In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*" (2000), J. Biol. Chem., 275(46), 35932-35941.
3. Tseng G.C. et al., "Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects" (2001), Nucleic Acid Res. 29: 2549.