

## *Corynebacterium glutamicum*의 *sigH* 유전자의 분리 및 기능분석

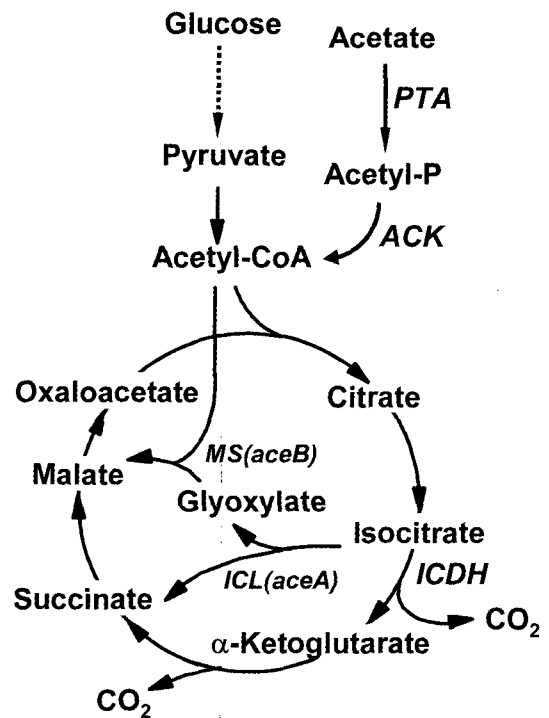
김태현 · 김형준 · 박준성 · 김연희<sup>1</sup> · 이흥식<sup>2\*</sup>

고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>세명대학교 한의과대학 한의학과, <sup>2</sup>고려대학교 과학기술대학 생명정보공학과

유전자 *lacZYA*가 *aceB* 유전자의 프로모터 하단에 연계된 ( $P_{aceB}$ -*lacZYA*) 리포터 플라스미드를 함유하는 *Escherichia coli*를 이용하여 glyoxylate bypass를 매개하는 유전자중 하나인 *aceB*의 발현을 조절하는 것으로 여겨지는 *Corynebacterium glutamicum* 클론들을 색판독에 의해 분리하였다. 이 중 한 개의 클론을 선택하여 분석한 결과 이 클론을 함유한 *E. coli*는 리포터 플라스미드에서 발현되는  $\beta$ -galactosidase의 활성이 약 40% 감소하였고 이는 클론에서 발현되는 단백질이 *aceB* 프로모터에 작용함에 기인한 것으로 판단되었다. 서열분석결과 ORF1과 ORF2의 두 개의 인접한 ORF가 발견되었고 이 중 ORF2가 reporter plasmid의  $\beta$ -galactosidase의 활성 감소에 직접적으로 기여함을 알 수 있었다. ORF1은 206아미노산으로 구성된 23,218 Dalton의 단백질을 발현하는 것으로 여겨졌고, 유사성 분석결과 ECF-type에 해당되는 RNA polymerase의 sigma factor를 암호화하는 것으로 보여 *sigH*로 명명하였다. 유전자 *sigH*의 기능을 밝히기 위해 gene disruption technique을 이용하여 *sigH* 유전자가 기능을 하지 못하는 돌연변이 균을 제작하였으며 이 균주는 야생형에 비해 성장속도가 저하됨을 관찰하였다. 또한 변이균은 oxidative stress를 유발하는 pumbagin등에 대해서도 민감성을 나타내었다. 이들 결과는, 유사성 분석결과에서도 볼 수 있듯이 *sigH* 유전자가 세포성장과정 중 처하게 되는 각종 stress 중 특히 oxidative stress에 대한 대응과 관련되어 발현될 수 있음을 암시한다.

**Key words** □ *Corynebacterium glutamicum*, *sigH*, sigma factor, stress

*Corynebacterium glutamicum*은 Gm<sup>+</sup> 미생물로서 *Mycobacterium*이나 *Streptomyces*와 함께 Actinomycetes목에 속하며 호기성 또는 통성 혐기성(facultative anaerobic)의 호흡 특성을 보인다. *Corynebacterium*은 전통적으로 아미노산과 핵산등의 공업적 생산에 중추적인 역할을 담당해온 산업미생물 중 하나이기 때문에 (13) *Corynebacterium glutamicum*을 비롯한 여러 생산 균주들을 대상으로 공업적 유용성이 높은 대사산물의 생산이나 생성속도의 최적화등을 위한 끊임없는 노력이 기울여져왔다(9, 23, 30, 35). *Corynebacterium*에 의한 대사 경로 연구는 특히 lysine과 threonine등의 aspartate계통 아미노산의 생합성을 중심으로 분자 유전학 측면에서 활발한 연구가 이루어 졌는데(7, 11, 16, 19, 21, 25, 26, 27, 29) 이들 aspartate계통 아미노산은 그 탄소 골격의 대부분이 TCA 회로(Tricarboxylic acid cycle)의 중간물질인 oxaloacetate로부터 유래한다. 세포내 oxaloacetate의 농도를 일정하게 유지하기 위해 TCA 회로는 끊임없이 보충되어야만 하는데, 세포내 glyoxylate bypass는 이와 같은 역할을 하는 보충경로(anaplerotic pathway) 중 하나이다(Fig. 1). Glyoxylate bypass는 isocitrate lyase (ICL)와 malate synthase (MS)로 구성되어있으며, *C. glutamicum*의 경우 acetate, fatty acid, 혹은 ethanol과 같은 기질에 의해 acetyl-CoA가 중심경로로 유입시에 활성화된다(18). Glyoxylate bypass는 여러 측면에서 중요성을 보이는데 이는



**Fig. 1.** Central metabolism of *C. glutamicum* during growth on glucose or acetate. Dotted arrows represent pathways consisting of several reactions. Abbreviation: AK, acetate kinase; PTA, phosphotransacetylase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; ICL, isocitrate lyase; MS, malate synthase.

\*To whom correspondence should be addressed.  
 Tel: 041-860-1415, Fax: 041-864-2665  
 E-mail: hlee@korea.ac.kr

lysine, glutamic acid 등의 생산(11, 35), isocitrate 분지점에서의 조절 기작, glucose에 대한 repression, acetate 존재시의 stress 반응 측면 등으로 요약할 수 있다. 특히 glyoxylate bypass의 작용을 유도하는 acetate와 같은 열악한 탄소원은 세포내에서 oxidative stress를 유발하는 것으로 알려져 있다(17).

세포는 그 성장과정 중, 인접한 환경과 자체내의 생리적 특성에 따라 각종 stress에 노출되게 된다(17, 34). 정상적인 성장과정 중에서도 세포가 정체가 이르게 되면 영양분의 고갈이나 생성된 부산물 등에 따른 acidic stress, osmotic stress, carbon starvation 등의 stress 인자에 직면하게 된다. 이처럼 세포가 처한 특수 환경에서 야기되는 각종 stress 인자에 대응하는 유전자들의 전사를 조절하는 단백질들의 존재가 보고되고 있다(1, 2, 10, 25).

본 연구에서는 이처럼 세포 내 대사과정에서 중요한 역할을 수행하고 있는 glyoxylate bypass 상의 유전자의 발현에 영향을 미치는 조절 유전자들을 분리하기 위한 접근을 시도하였으며, transcriptional fusion 벡터와 *C. glutamicum*의 게놈 라이브러리를 이용한 검색 작업 중 glyoxylate bypass 상의 *aceB* 유전자의 프로모터와 결합하는 유의성 있는 ORF들을 분리하였으며, 이에 대한 기능적인 분석을 분자적 수준에서 시도해 보았다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Corynebacterium glutamicum* AS019E12와 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F이다. 유전자 *sigH*의 돌연변이 균주는 *Corynebacterium glutamicum* AS019E12를 모체로 제작되었으며 HL1032로 명명하였다. *C. glutamicum*은 일상적인 경우에 영양배지인 MB배지(5)에서 배양 하였으며, 필요시에는 최소배지로서 MCGC배지(36)를 사용하여 30°C에서 배양하였으며 경우에 따라서 kanamycin을 15  $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 사용하였다. 최소배지의 배양에 사용된 탄소원은 1% glucose 혹은 2% acetate였으며 *E. coli*의 경우 영양배지로는 LB배지를 사용하였으며 필요시 M9 최소배지(31)를 이용하여 배양하였다.

### $P_{aceB}$ -*lacZAY* 리포터 플라스미드의 제작과 선별

*C. glutamicum*의 *aceB* 유전자의 프로모터 부분과 상호작용하여 이를 조절하는 단백질을 생산하는 유전자를 분리하기 위하여 *lac* operon을 이용한 리포터 플라스미드를 제작하였으며 그 과정은 다음과 같다. 먼저 *aceB* 유전자의 프로모터 부분을 포함한 약 2.5 kb의 DNA 단편( $P_{aceB}$ )을 pSL08(20)을 주형으로 PCR 증폭하여 플라스미드 pRS415(33)의 *Sma*I 부분에 삽입하여 pSL130을 제작하였다. 이때 forward primer로는 5'CTTAAGTGAATCGCAATGGG3', 그리고 reverse primer로는 5'GCGTGCCTAGITTTTTGCTTTGA ACTC3'를 사용하였다. 플라스미드 pRS415는 프로모터가 결핍된 *lacZAY* 유전자를 보유하고 있으므로  $\beta$ -galactosidase의 발현은 *lacZAY* 유전자의 upstream 쪽에 위치한 multiple cloning site 내에 삽입된 DNA 단편의 발현 여부에 따라 결정되게 된다. 다음 단계로, pSL130내의 *aceB* 프로모터가 *lacZAY* 유전자에 연결된 부분 (9.1

kb,  $P_{aceB}$ -*lacZAY*)을 각각 forward primer인 5'ACCAGTACTAA TAGGCGTATCACGAGGCC3'과 reverse primer인 5'TGTAGT ACTTGGTGTGTGTGGGTAGGCTCGG3'을 이용하여 PCR 증폭하여 *Sca*I로 절단한 후 pACYC184 vector (New England Biolabs, Beverly, U.S.A.)의 *Sca*I 지역에 삽입하여 리포터 플라스미드인 pSL145를 제작하였다(15). 리포터 플라스미드를 함유한 *E. coli* DH5 $\alpha$ F' (*E. coli* DH5 $\alpha$ F'-145)는 LB plate (40  $\mu$ g/ml X-gal, 20  $\mu$ g/ml tetracycline, 40  $\mu$ g/ml ampicillin)에서 blue 콜로니를 형성한다(31). 이때 *C. glutamicum*의 라이브러리(5) 중 *aceB* 프로모터 부분을 조절할 수 있는 단백질 산물을 암호화하는 클론들은 *lacZ* 유전자의 발현에 영향을 미치게 되고 결과적으로 콜로니 색에 변화를 가져오게 된다. 이와 같은 원리를 이용하여 *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-145 균주에 *C. glutamicum* 게놈 라이브러리를 형질 전환한 후 X-gal이 함유된 LB plate에 도말하여 형성된 콜로니의 색을 관찰하였다. 이때 *C. glutamicum*의 라이브러리 클론이 들어가 있지 않은 공벡터인 pMT1(5)을 함유한 *E. coli*를 HL258이라고 명명하였으며, *aceB*의 발현을 약 40% 감소시키는 것으로 보이는 라이브러리에서 분리된 약 3.4 kb 정도의 DNA 단편이 들어 있는 플라스미드 pSL370을 함유한 *E. coli*를 HL275라고 명명하였다.

### 목표 유전자가 disruption된 균주의 제작

플라스미드 pSL370의 1,743 bp *Sac*II 단편을 함유하고 있는 플라스미드 pSL152-4에서 *sigH* 내부의 321 bp인 *Bgl*II 단편을 제거하기 위하여 *Bgl*II를 처리한 후 라이게이션하였고 이 벡터에서 내부가 결손된 *sigH* 단편을 분리하기 위해 *Sac*II와 Klenow fragments 처리를 거친 후 다시 *Sal*I 처리하여, *Sal*I-*Sma*I 처리를 거친 gene-disruption vector인 pK19mobsacB(32)에 라이게이션하였다. 이렇게 구축된 플라스미드를 *C. glutamicum* AS019E12에 도입함으로써 *sigH*의 disruption을 시도하였다(32). 제작된 변이균주는 PCR에 의한 증폭 단편의 크기로 확인하였다.

### 효소 활성의 측정

Glyoxylate bypass 상의 두 효소인 isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)와 malate synthase (EC 4.1.3.2) 활성 측정은 각각 Dixon 등의 방법(3)과 Gubler 등의 방법(8)을 이용하였으며, 대조 실험으로 사용된 isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) 활성의 측정은 Garnak (6) 등의 방법에 기초하였다. 또한 프로모터 억제 효과를 관찰하기 위해 이용된  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23)의 활성 측정은 Miller의 방법(24)을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### $P_{aceB}$ -*lacZAY*의 발현에 영향을 미치는 클론들의 분리

$P_{aceB}$ -*lacZAY* 리포터를 함유한 *E. coli*를 이용하여 *C. glutamicum*의 게놈 라이브러리를 검색하였고 LB 배지에서 푸른색의 콜로니를 흰색으로 전환시키는 클론들을 분리하였다. 검색 결과 콜로니의 색 변화 결과가 대조구와 차이를 보이는 총 15개의 클론을 확

보하였다. 이들 클론들 중 한 클론만이 dark blue 콜로니를 나타내었으며 나머지 14개의 클론들은 정도의 차이는 있지만 모두 대조구인 HL258(pMT1함유)에 비하여 상대적으로 흰색에 가까운 콜로니를 보여주었다. 이들 클론들의 상호 중복성 여부를 알아보기 위하여 일차적으로 기본적인 제한효소처리를 통해 클론들의 전체적인 크기 및 배열을 조사하였다. 제한효소 처리에 의한 일차적인 선별 작업 후에 중복된 클론들을 제외하고 남은 클론들 중 대조구로 쓰인 HL258을 제외한 나머지 8개의 클론들에 대한  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정해본 결과 HL275(pSL370 함유)의 경우 대조구에 비해 약 40%의 활성감소를 보여주었다 (Fig. 2). 이와 같은 사실은 pSL370내에 클로닝된 DNA단편에서 *aceB* 프로모터에 결합해 활성을 억제할 수 있는 단백질이 발현됨을 시사해주고 있다. 따라서 본 연구에서는 pSL370(3.4 kb insert)과 중복된 DNA 단편을 포함하고 있는 플라스미드 pSL152(3.9 kb)를 이용하여 유의성 있는 ORF에 대해 심층적인 분석을 실시하였다.

#### 분리된 클론의 특성

3.9 kb의 삽입 DNA단편을 가진 pSL152에 대하여 제한 지도를 작성한 후, 이에 기초하여 서브클로닝을 시행하였다. 서브클로닝결과에 기초해 플라스미드 pSL152가 함유하고 있는 2.6 kb의 *XhoI-KpnI* DNA 단편을 pBluescript SK (+) (Stratagene, USA) 에 옮긴 후 양 가닥 DNA에 대한 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 토대로 가능한 ORF를 조사해본 결과, 개시코돈 ATG로 시작하여 종결코돈 TAA로 끝나는 621 bp의 ORF (ORF1) 및 ATG로 시작하여 TAA로 종결하는 261 bp의 ORF (ORF2)가 발견되었으며 각 ORF는 서로 반대 방향으로 향하고 있음을 알 수 있었다. 서브클로닝에 의한 분석결과 이들 두 ORF 중 ORF2가  $\beta$ -galactosidase의 활성감소에 직접적으로 기여함을 알 수 있었다(자료미제시). ORF1을 함유하는 클론을 *C. glutamicum*에 도입해 glyoxylate bypass 효소인 malate synthase와 isocitrate lyase의 활성에 미치는 영향을 분석한 결과에서도

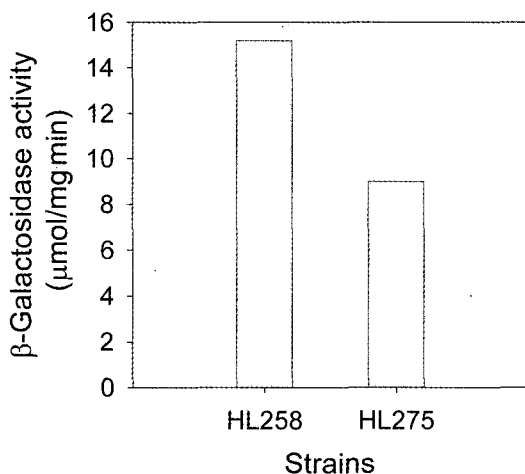


Fig. 2.  $\beta$ -galactosidase activity of the *E. coli* cells carrying the empty vector (HL258; pMT1) or the isolated clone (HL275; pSL370).

ORF1의 존재는 이들 효소의 활성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(자료미제시). 본 연구에서는 glyoxylate bypass의 조절과 관련된 것이 없는 것으로 여겨지지만 중요한 조절단백질을 발현하고 ORF2의 발현과도 연관이 있을 것으로 여겨지는 ORF1에 집중해 분석하였다.

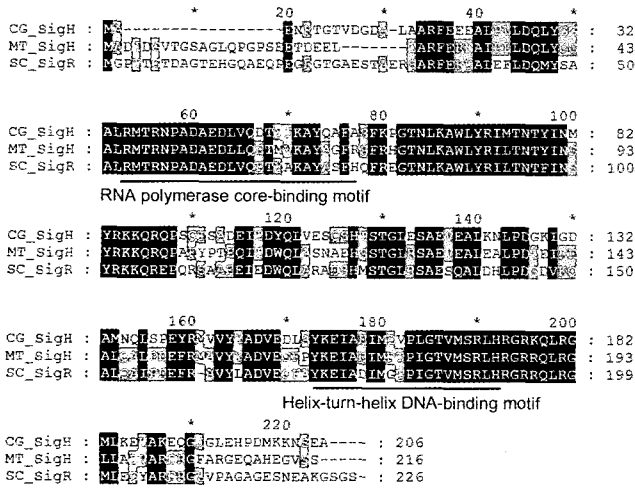
ORF1 개시코돈의 7 bp상단에는 ribosome binding site로 추정되는 AAG서열이 존재하고 있었으며, 전체 염기중의 G 또는 C의 비율은 50.9%로 나타났다. ORF1은 206개의 아미노산으로 구성된 분자량 23,218 Daltons의 polypeptide를 암호화하고 있다. 예상 pI값은 5.0이며, pH 7.0에서 6.6의 charge를 나타내는 acidic protein을 암호화하고 있었다. 암호화하고 있는 polypeptide 서열은 25개의 basic (+) 아미노산(K, R), 32개의 acidic (-) 아미노산(D, E), 63개의 hydrophobic 아미노산(A, I, L, F, W, V), 그리고 52개의 polar 아미노산(N, C, Q, S, T, Y)으로 구성되어 있었다. ORF1의 codon usage를 조사해본 결과, 기존에 보고된 *C. glutamicum*으로부터의 유전자가 일반적으로 나타내는 codon preference와 대체적으로 일치하고 있음을 알 수 있었다. ORF2의 경우, 개시코돈의 10 bp 상단에는 ribosome binding site로 추정 가능한 AGGA서열이 존재하고 있었으며, GC 함량은 61.69%로 비교적 높게 나타났다.

#### 목표 클론의 분석

각 ORF에 대한 BLAST software를 이용한 유사 유전자에 대한 조사결과, ORF1의 염기서열은 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv에 대한 genome project 결과 유추된 RNA polymerase sigma factor H를 암호화하는 *rpoH*유전자(O05843) 및 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 *sigR*유전자(CAA090888), 그리고 *Mycococcus xanthus*의 *rpoE1*유전자(ACC98488)와 높은 상동성을 나타내었다. 아미노산을 이용한 상동성을 조사해 본 결과, *M. tuberculosis* RpoH의 아미노산 서열과 상동성 68%, 유사성 82%, *S. coelicolor* SigR의 아미노산 서열과 상동성 61%, 유사성 78%를 그리고 *M. xanthus* RpoE1의 아미노산 서열과 상동성 44%, 유사성 63%를 나타냈다. 이들 단백질은 모두 공통적으로 세포의 외부 환경 변화에 따라 기능이 조절되는 ECF family에 분류되는 alternative sigma factor로 이들 단백질 중 기능이 어느 정도 잘 알려진 SigR의 경우, 세포의 redox변화에 따라 기능이 조절되는 것으로 알려져 있다. 이는 본 연구과정에서 분리된 ORF1의 단백질 산물 또한 이와 유사한 기능을 가지는 단백질일 가능성을 추측할 수 있었다. 한편 아미노산 상동성에 기초하여 ORF1 발현 단백질 내 motif를 추정해본 결과, N-terminal 부근에서 RNA polymerase core-binding motif를, 그리고 C-terminal 부근에서는 helix-turn-helix DNA-binding motif를 추정할 수 있었다(Fig. 3). 이상의 분석 결과를 토대로 ORF1 유전자를 *sigH*라고 명명하였다.

#### 유전자 sigH 결손 균주의 제작과 성장형태의 관찰

BLAST 분석결과 RNA polymerase의  $\sigma$  subunit과 높은 상동성을 보여준 ORF1 (*sigH*)의 부재가 세포의 생리적, 생화학적 상

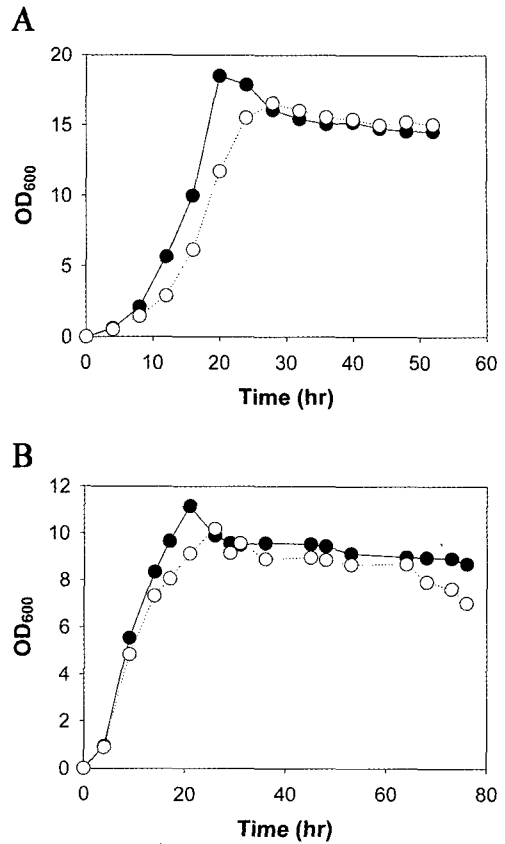


**Fig. 3.** Multiple-sequence alignment of *C. glutamicum* SigH with other homologous sequences. Putative SigH proteins from *Mycobacterium tuberculosis* (MT-SigH) and SigR from *Streptomyces coelicolor* (SC-SigR) are shown. Gaps are indicated by bars. The conserved region in all amino acid sequences are shown on a black background. Highly conserved RNA polymerase core binding and helix-turn-helix DNA binding motifs are displayed below the alignment. Multiple sequence alignments were performed using Clustal W program.

태에 미치는 영향을 파악함으로써, 간접적으로 그 기능을 유추해 보기 위하여 *C. glutamicum*의 염색체 DNA상에서 *sigH* 유전자를 disruption 시켜보았다. RNA polymerase의  $\sigma$  subunit에 대한 연구는 *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis* 등을 비롯한 여러 eubacteria에서 활발하게 연구되고 있으며 (1, 2, 22, 25) 특히 *sigH*의 경우 열이나 온도 등의 각종 외부 stress 인자에 대응하는 유전자들의 발현과 밀접한 연관이 있다는 보고들이 나오고 있다(4, 12, 28). Pre-culture한 HL004 (*C. glutamicum* AS019E12)와 HL1032 (*C. glutamicum* AS019E12/ $\Delta sigH$ )의 2가지 균주를 각각 영양 배지인 MB배지와 최소 배지인 MCGC배지를 이용하여 액체 배양하였다(Fig. 4). 실험결과 MB 영양배지와 MCGC 최소배지 모두 비슷한 양상의 성장패턴을 보여주었는데, 유전자 *sigH* 결손 균주의 경우 모 균주인 HL004에 비해 유도기에서의 정체 시간이 길어짐을 알 수 있었다. 이와 같은 사실은 여러 외적 내적인 요인들에 의해 성장을 위해 준비하는 시간이 길어졌다는 것을 의미함과 동시에 *sigH*의 부재시 세포의 적응성면에서 야생형에 비해 그 능력이 감소함을 간접적으로 시사해준다.

***sigH* 결손 균주의 oxidative stress에 대한 민감성 분석**

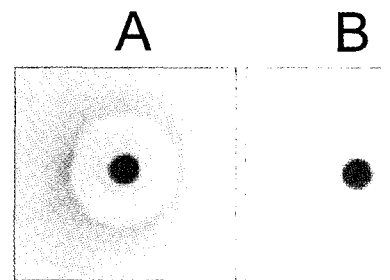
*sigH* 유전자가 stress 대응에 관여하는지 여부를 변이균을 이용해 분석하였다. Fig. 5에 나타난 것처럼 배양 결과 *glutamicum* AS019E12(HL004)에 비해 *C. glutamicum sigH* 변이(HL1032) 균주의 경우 redox cycling compound에 속하는 plumbagin의 존재하에서 성장저해에 의해 환의 크기가 증가함을 알 수 있었다. 이와 같은 사실은 *sigH* 변이균이 야생형에 비해 상대적으로



**Fig. 4.** Growth of *sigH* mutant strain on MCGC (panel A) or MB (panel B) medium. Symbols: ●, HL004 (*C. glutamicum* AS019E12); ○, HL1032 (*C. glutamicum sigH* mutant)

oxidative stress에 민감해진다는 사실을 시사해 주고 이는 *sigH* 유전자가 oxidative stress에 관여하는 유전자의 발현에 직접 또는 간접으로 영향을 줄 수 있음을 의미한다. 변이균의 경우 plumbagin 외에도 menadione과 diamide 등의 oxidative stress를 유발하는 물질에도 민감성을 나타내었다(자료미제시).

본 연구에서는, glyoxylate bypass상의 조절 유전자를 스크리닝하기 위해 glyoxylate bypass상에 있는 *aceB* 유전자의 프로모터 부분을 이용하여 P<sub>aceB</sub>-*lacZYA* 리포터플라스미드를 구축하였으며,



**Fig. 5.** Effect of plumbagin on the growth of *sigH* mutant strain. Ten  $\mu$ l of 0.1 M plumbagin was spotted on to the filter papers. Lawn cells: A, *C. glutamicum* AS019E12; B, *C. glutamicum sigH* mutant.

생성된 콜로니의 색과  $\beta$ -galactosidase의 활성측정을 통하여 몇 가지 후보 클론들을 분리하였다. 이들 중 한 클론의 ORF를 탐색하던 중 RNA polymerase의  $\sigma$  subunit (ECF type)과 높은 상동성을 보여주는 ORF를 분리할 수 있었으며 상동성 조사결과를 바탕으로 sigH라고 명명하였다. 유전자 sigH의 기능을 조사하기 위하여 gene disruption technique을 이용하여 sigH가 기능을 하지 못하는 돌연변이 균을 제작하였으며, 야생형과 돌연변이 균주를 배양해본 결과 야생형에 비해 돌연변이 균주에서 유도기가 길어지고 정체기에서 사멸기로 전환되는 시기가 단축된다는 사실을 알 수 있었으며, 변이균은 oxidative stress agent인 plumbagin에 민감성을 나타냄을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 sigH가 세포의 성장과정 중 발생하는 각종 stress 대응성과 관련이 있을 수 있음을 시사해준다.

### 감사의 말

이 연구는 한국과학재단의 기초연구지원사업 중 특정기초사업 (R01-2004-000-10093-0, 이홍식)에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Ades, S.E., I.L. Grigorova, and C.A. Gross. 2003. Regulation of the alternative sigma factor  $\sigma^E$  during initiation, adaptation, and shutoff of the extracytoplasmic heat shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 2512-2519.
- Antelmann, H., S. Engelmann, R. Schmid, A. Sorokin, A. Lapidus, and M. Hecker. 1997. Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 7251-7256.
- Dixon, G. H., and H. L. Kornberg. 1959. Assay method for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* 72, 3.
- Engels, S., S. J. E. Schweitzer, C. Ludbig, M. Bott, and S. Schaffer. 2004. *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor  $\sigma^H$ . *Mol. Microbiol.* 52, 295-302.
- 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.
- Garnak, M. and H. Reeves. 1979. Purification and properties of phosphorylated isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254, 7915-7920.
- Gerstmeir, R., A. Cramer, P. Dangel, S. Schaffer, and B.J. Eikmanns. 2004. RamB, a novel transcriptional regulator of gene involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186, 2798-2809.
- Gubler, M., M. Jetten, H.S. Lee, and A.J. Sinskey. 1994. Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2494-2500.
- Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* 104, 155-172.
- Jensen-Cain, D.M. and F.D. Quinn. 2001. Differential expression of *sigE* by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. *Microbial Pathol.* 30, 271-278.
- Jetten, M.S.M., M.E. Gubler, S.H. Lee, and A.J. Sinskey. 1994. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2501-2507.
- Kang, J.K., M.Y. Hahn, A. Ishihama, and J.H. Roe. 1997. Identification of sigma factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nuc. Acid. Res.* 25, 2566-2573.
- Kinoshita, S., S. Udaka, and M. Shimono. 1957. Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3, 193-205.
- Kim, H. J. 2001. Ph.D. thesis. Korea University.
- Kim, H.J., J.S. Park, and H.S. Lee. 2002. Utilization of *lacZ* to isolate regulatory genes from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 336-339.
- Kim, H.J., T.H. Kim, Y. Kim, and H.S. Lee. 2004. Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in the regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186, 3453-3460.
- Kirkpatrick, C., L.M. Maurer, N.E. Oyelakin, Y.N. yoncheva, R. Mauder and J. L. Slonczewski. 2001. Acetate and formate stress: Opposite response in the proteome of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 6466-6477.
- Kornberg, H.L. 1996. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 99, 1-11.
- Krömer, J.O., O. Sorgenfrei, K. Klopprogge, E. Heinzle, and C. Wittmann. 2004. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J. Bacteriol.* 186, 1769-1784.
- Lee, H.-S., and A.J. Sinskey. 1994. Molecular characterization of *aceB*, a gene encoding malate synthase in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4, 256-263.
- Malumbers M, and J.F. Martin. 1996. Molecular control mechanisms of lysine and threonine biosynthesis in amino acid producing *Corynebacteria*: redirecting carbon flow. *FEMS Microbiol Lett.* 143, 103-114.
- Manganelli, R., M.I. Voskuil, G.K. Schoolnik, and I. Smith. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor  $\sigma^E$ : role in global gene expression and survival in macrophage. *Mol. Microbiol.* 41, 423-437.
- Martin, J.F., R. Santamaria, H. Sandoval, G. Del Real, L.M. Mateos, J.A. Gil, and A. Aguilar. 1987. Cloning systems in amino acid-producing *Corynebacteria*. *Biotechnol.* 5, 137-146.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Paget, M.S.B., J.G. Kang, J.H. Roe, and M.J. Buttner. 1998.  $\sigma^R$ , an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO. J.* 17, 5776-5782.
- Peters-Wendisch, P.G., C. Kreutzer, J. Kalinowski, M. Patek, H. Sahm, and B.J. Eikmanns. 2001. Pyruvate carboxylase as a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 295-300.
- Raman, S., D.A., A.G. Vitreschak, A.A. Mironov, M.S. Gelfand. 2003. Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nuc. Acid. Res.* 31, 6748-6757.
- Raman, S., T. Song, X. Puyang, S. Vardarov, W.R. Jr. Jacobs, and R. N. Husson. 2001. The alternative sigma factor *sigH* regulates

- major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 183, 6119-6125.
29. Rodionov, D.A., A.G. Vitreschak, A.A. Mironov, M. S. Gelfand. 2003. Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nuc. Acid: Res.* 31, 6748-6757.
  30. Sahm, H., L. Eggeling, B. Eikmanns, and R. Kramer. 1995. Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 243-252.
  31. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor NY.
  32. Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69-73.
  33. Simons, R.W., F. Houtman, and N. Kleckner. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53, 85-96.
  34. Storz, G. and J. A. Imlay. 1999. Oxidative stress. *Curr. Opi. Microbiol.* 2, 188-194
  35. Vallino, J. and G. Stephanopoulos. 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 633-646.
  36. Von der Osten, C. Gioannetti, A.J. Sinskey. 1989. Design of a defined medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitate iron uptake. *Biotech. Lett.* 11, 11-16.

(Received April 5, 2005/Accepted June 3, 2005)

---

**ABSTRACT: Isolation and characterization of *sigH* from *Corynebacterium glutamicum***

**Tae-Hyun Kim, Hyung-Joon Kim, Joon-Sung Park, Younhee Kim<sup>1</sup>, Heung-Shick Lee<sup>2\*</sup>**  
 (Graduate School of Biotechnology, Korea University, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Oriental Medicine, Semyung University, Checheon 390-230, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University, Jochiwon, Chungnam 339-700, Korea)

*Corynebacterium* clones which exert regulatory effects on the expression of the glyoxylate bypass genes were isolated using a reporter plasmid carrying the enteric *lacZ* fused to the *aceB* promoter of *Corynebacterium glutamicum*. Some clones carried common fragments as turned out by DNA mapping technique. Subcloning analysis followed by the measurement of  $\beta$ -galactosidase activity in *Escherichia coli* identified the region responsible for the *aceB*-repressing activity. Sequence analysis of the DNA fragment identified two independent ORFs of ORF1 and ORF2. Among them, ORF2 was turned out to be responsible for the *aceB*-repressing activity. ORF1 encoded a 23,216 Da protein composed of 206 amino acids. Sequence similarity search indicated that the ORF may encode a ECF-type  $\sigma$  factor and designated *sigH*. To identify the function of *sigH*, *C. glutamicum sigH* mutant was constructed by gene disruption technique and the *sigH* mutant showed growth retardation as compared to the wild type strain. In addition, the mutant strain showed sensitivity to oxidative-stress generating agent plumbagin. This result imply that *sigH* is probably involved in the stress response occurring during normal cell growth.