

*Corynebacterium ammoniagenes*에서 *purF* 유전자의 조절 및 이에 특이적인 조절 단백질의 분리

이석명¹ · 김연희² · 이흥식^{1*}

¹고려대학교 과학기술대학 생명정보공학과, ²세명대학교 한의과대학 한의학과

*Corynebacterium ammoniagenes*의 *purF* 유전자의 발현을 *purF*의 프로모터 추정 부위에 *cat* 유전자를 융합시킨 transcriptional fusion 플라스미드를 제작하여 분석하였다. 유전자 *purF*는 adenine과 guanine에 의해 20~30%의 전사 저해효과를 나타내지만, hypoxanthine에는 저해를 받지 않는 것으로 나타났다. 또한 *purF*의 발현은 대수기 중반에 최대에 달한 후 정지기 후반부까지 일정한 것으로 나타났다. 동시에, *C. glutamicum*에서 사용되는 강력한 프로모터인 P_{180} 이 *Escherichia coli*의 P_{lac} 보다 *C. ammoniagenes*에서 모든 성장 단계에서 40~50%의 향상된 프로모터 활성을 나타내었고 대수기 후반부에 최고 활성에 달해, *C. ammoniagenes*의 연구에도 활용 가능성을 확인하였다. DNA-affinity purification에 의해 *C. ammoniagenes*의 *purF* 프로모터에 결합하는 단백질로서 *C. glutamicum*의 Crp-family transcriptional regulator (NCgl0120)와 상동성이 높은 단백질을 검출하였다. 이 단백질은 크기가 40.1 kDa으로서 PAGE에서 관찰된 단백질 크기와 일치하였다. 이에 상응하는 *C. ammoniagenes*의 단백질은 400 개의 아미노산으로 구성되어 있고, 42 kDa의 단백질을 만들며, pI는 4.9일 것으로 추정되었다. 이는 기존에 알려져 있는 *E. coli* 및 *Bacillus subtilis*의 PurR과 각각 14.1%, 15.8%의 아미노산 상동성을 보여, PurR과는 다른 종류의 단백질일 것으로 여겨진다.

Key words □ *C. ammoniagenes*, *purF*, purine biosynthesis

*Corynebacterium ammoniagenes*는 그람양성 세균으로서 IMP와 GMP 등의 핵산 화합물을 생산하는데 널리 사용된다(4, 13). 그러나, 이 미생물의 산업적인 중요성에도 불구하고, 이 균의 핵산 생합성에 관한 연구는 다른 미생물들에 비해 활발히 이루어지지 않았다. 대표적인 그람음성 미생물인 *Escherichia coli*와 그람양성 미생물인 *Bacillus subtilis*의 핵산 생합성의 경우 학문적인 중요성으로 인해 현재까지 생합성 경로 및 조절 기작을 중심으로 비교적 많은 연구가 이루어졌다(15, 23). Purine계 핵산의 경우 중간물질인 PRPP (5'-phosphoribosyl 1-pyrophosphate)로부터 *E. coli*의 경우 11단계, *B. subtilis*의 경우 10단계의 생합성 반응을 거쳐 IMP를 합성하고(Fig. 1A), 이 후 각각 두 단계의 반응을 거쳐 AMP와 GMP를 생성하게 된다. 이들 두 미생물의 purine 생합성 경로는 비교적 유사하지만, 생합성 유전자의 구성은 상당한 차이를 보인다. *E. coli*의 경우 purine 생합성을 담당하는 효소를 발현하는 유전자들은 monocistron이나 작은 polycistronic operon들로 구성되어 있으나(15), *B. subtilis*의 경우에는 12개의 유전자가 하나의 operon으로 구성되어 있다(23). 이 두 미생물에서 feedback inhibition에 의한 생합성 조절작용이 보고된 바 있으며, 조절 단백질인 PurR에 의한 전사수준에서의 조절도 함께 이루어지고 있는 것으로 알려져 있다(17, 19). *C. ammoniagenes*

의 purine 생합성에 관한 연구는 일부 유전자의 기능분석에 그친 정도이고 최근에는 생합성 경로상의 핵심 유전자로 간주되는 *purF*의 저해조건 및 *lacZ* fusion을 이용한 *E. coli*에서의 *purF* 조절 단백질의 검색이 시도된 바 있다(2, 8, 9). 이 방법에 의해 일부 유전자들이 분리되기는 하였지만 조절유전자로서의 기능성은 매우 낮은 상태로서 그 후속연구도 이루어지지 못하고 있다(9). 본 연구에서는 *purF* 유전자의 조절유전자를 분리하기 위한 목적으로 일차적으로 *C. ammoniagenes*의 *purF* 유전자의 조절이 어떻게 이루어지는지를 reporter gene fusion 방법을 통해 전사수준에서 분석하였고, 또한 *purF* 유전자의 프로모터 영역에 결합하는 조절 단백질을 affinity chromatography 방법을 적용해 분리하였고 이들 단백질의 정체를 규명하였다.

재료 및 방법

사용된 미생물과 성장조건

본 실험에 사용한 균주는 *C. ammoniagenes* ATCC 6872와 *E. coli* DH10B (7)이고, 일반적인 경우 *E. coli*는 37°C에서 LB에서, *C. ammoniagenes*는 MB (5)와 2%의 glucose를 함유한 FMCA 최소배지(12)에서 배양하였다. 플라스미드가 도입된 균주는 kanamycin을 30 µg/ml의 농도로 함유한 배지에서 배양하였다. 또한, repression의 측정을 위해서는 adenine, guanine, hypoxanthine과 같은 염기들을 해당 농도만큼 최소배지 내에 첨가하여 배양을 진행하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-860-1415, Fax: 82-41-864-2665
E-mail: hlee@korea.ac.kr

생화학적 분석

Crude extract는 FMCA 배지를 사용하여 대수기 후반까지 성장시킨 세포를 원심분리를 통해 회수한 후 이전 연구에서 기술된 방법대로 제작하여 실험에 사용하였다(12). Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 활성은 Shaw 등(20)의 방법에 의해 측정하였다. 100 mM Tris·Cl (pH 7.8), 1 mM DTNB, 0.1 mM acetyl-CoA, 0.25 mM chloramphenicol을 포함한 반응액에 적절한 양의 crude extract를 첨가한 후, 412 nm에서 흡광도의 변화로 CAT 활성을 측정하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법에 의해 측정하였다(1).

DNA 조작 및 플라스미드의 제작

기본적인 DNA 조작은 기존에 확립된 방법에 근거하여 수행하였으며(18), *C. ammoniagenes*의 형질전환은 *E. coli* restriction-deficient strain인 ET12567 (14)를 거쳐 획득된 플라스미드를 전 기영동에 의해 *C. ammoniagenes* 내로 도입하는 방식으로 이루어졌다. 유전자 *purF*의 프로모터 영역과 *cat* 유전자가 융합된 (P_{purF} -*cat*) 플라스미드는 다음의 방법에 의해 제작되었다. 프로모터 영역을 Table 1에 기술된 프라이머 *purF* CAT F1과 *purF*

CAT R2를 사용하여 Ex Taq polymerase (TaKaRa, Japan)를 이용하여 증폭한 후, *Bam*HI과 *Pst*II로 제한효소 절단하였고 이 단편을 같은 효소로 절단된 pSK1CAT 내로 도입하여 pSL436을 제작하였다. Affinity chromatography 방법에 사용된 5' 말단에 biotin이 결합된 DNA 단편은 다음과 같이 제작되었다. 프라이머 *purF* PR F1과 *purF* PR R1을 사용하여 해당 DNA를 증폭한 후, Gel Extraction kit (GeneAll, Korea)로 추출하고 에탄올침전에 의해 농축하여 실험에 사용하였다. 또한, Fig. 1B에 기술된 대로 프로모터 추정영역과 함께 ORF 내에서 같은 길이의 영역을 *purF* OR F1 및 *purF* OR R1으로 증폭하여 위에서 기술된 방법과 동일하게 5' 말단에 biotin이 결합된 DNA 단편을 준비하여 대조군으로 사용하였다.

DNA 결합 단백질의 분리 및 규명

DNA affinity purification를 위해 Dynabead® M-280 streptavidin (Dyna)을 사용하였다. 우선 100 μ l (6.7×10^7 beads)의 streptavidin 이 둘러싸인 beads를 2×B&W buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.5)로 2회 세척하였고, 이어서 100 μ l의 biotinylated DNA (100 μ g/ml)와 100 μ l의 세척된 beads를 상온에

Table 1. Bacterial strains, plasmids, and primers

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	(7)
ET12567	<i>dam</i> <i>dcm</i> <i>hsd</i> , restriction deficient	(14)
<i>C. ammoniagenes</i>		
ATCC 6872	<i>C. ammoniagenes</i> type strain	ATCC
HL1103	<i>C. ammoniagenes</i> harboring pSK1CAT	This study
HL1104	<i>C. ammoniagenes</i> harboring pSK1CAT::P _{tac}	This study
HL1187	<i>C. ammoniagenes</i> harboring pSL360	This study
HL1200	<i>C. ammoniagenes</i> harboring pSL436	This study
Plasmids		
pSK1CAT	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle promoter-probe vector carrying a promoterless <i>cat</i> gene, Km ^R	(16)
pSL360	pSK1CAT carrying P ₁₈₀	(16)
pSK1CAT::P _{tac}	pSK1CAT carrying P _{tac}	(16)
pSL436	pSK1CAT carrying P _{purF}	This study
Primers		
<i>purF</i> CAT F1	CCGGGATCCTGCGACATATCAAACAAAA	This study
<i>purF</i> CAT R2	AGCCTGCAGCCACGACGCTGATTCTACTAA	This study
<i>purF</i> PR F1	(Biotin)TTGGCTGTGATTGCGACATA	This study
<i>purF</i> PR R1	TTCACGTCGCTGGGGAAAGTA	This study
<i>purF</i> OR F1	(Biotin)TCTGTCTTTGACGCCGCTAA	This study
<i>purF</i> OR R1	GGTTGAGCTTGAGGCGAATA	This study

서 3시간 동안 반응시켜 고정화시켰다. 서로 결합하지 않는 DNA를 제거해 낸 후, beads는 TGED binding buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, pH 7.5)로 세척하였다. 준비된 beads들과 crude extract 약 50 mg을 4°C에서 12 h 동안 부드럽게 섞어 결합시켰다. 이때, salmon sperm DNA를 competitor DNA로 사용하였다. 반응이 종료된 후, 결합되지 않았거나 비특이적으로 결합된 단백질들은 TGED buffer로 세척하여 제거하였다. 세척 후, 특이적으로 결합되어 있는 단백질들을 분리하기 위하여, elution buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.01% Triton X-100, pH 7.5)를 첨가하여 높은 염 농도에서 단백질을 이탈시켰고, Microcon YM-3 (Miliopore)을 사용하여 농축 및 탈염 과정을 거친 후, 12% SDS-PAGE로 분석하였다(11). 최종적으로 Bio-Rad Mini Protean III를 사용한 전기영동을 통해 분리된 단백질의 band들을 기존에 확립된 방법대로 silver 염색하여 시각화하였다(21). 단백질 band의 분석은 상업적인 ESI-MS 방법을 사용하였으며, *C. glutamicum*의 genome DB를 사용하여 분석하였다(In2gen, Korea).

결과 및 고찰

유전자 *purF*와 주변 유전자의 배열

*C. ammoniagenes*는 전체 게놈 서열은 NCBI에 등재되어 있지 않고, 개별 유전자 수준에서만 부분적으로 등재되어 있다. 본 연

구를 위해 NCBI의 *C. ammoniagenes purF*를 검색하였을 때, 부분 서열은 AB003158으로 등록되어 있고, *purF*와 *purM*이 가까이 위치하고 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B). 그러나, 주위의 다른 유전자들은 아직 기능적 분석이 이루어져 있지 않아서 ORF1부터 ORF4까지로 명명되어 있는 상태인데, 이미 게놈 서열이 공개된 유사균인 *C. glutamicum* ATCC 13032의 서열과 비교해 그 기능을 유추할 수 있었다(Fig. 1B). CLUSTAL W 방법에 의해 분석해 본 결과 *C. ammoniagenes*의 ORF1은 NCgl2498과 63%, ORF2는 NCgl2497과 72.6%, ORF3는 NCgl2496과 56.2%, *purF*는 NCgl2495와 69.5%, *purM*은 NCgl2494와 80.9%, ORF4는 NCgl2492와 60.3%의 아미노산 상동성을 보였고, *C. ammoniagenes*의 유전자들이 좀 더 작은 크기의 유전자들로 존재함을 확인 할 수 있었다.

유전자 *purF*의 조절

전사 수준에서 *purF*의 발현이 조절받는 것을 알아보기 위해 NCBI에 등재된 *purF*의 서열을 중심으로 Fig. 1B와 같이 *purF*의 프로모터 추정 부위를 증폭한 후, *cat* 유전자에 융합시킨 transcriptional fusion 플라스미드를 제작하였다. 제작된 pSL436을 *C. ammoniagenes* ATCC 6872 야생형 균주에 전기영동에 의해 도입한 후 이 균을 HL1200으로 명명하였다. 일차적으로, *purF*의 repression 양상을 알아보기 위해 배지에 다양한 농도의 염기를 첨가하고 성장시켜 얻어진 crude extract를 이용해 CAT 활성을 측정하였다. Table 2에 나타난 것처럼 *purF*는 1 mM adenine에

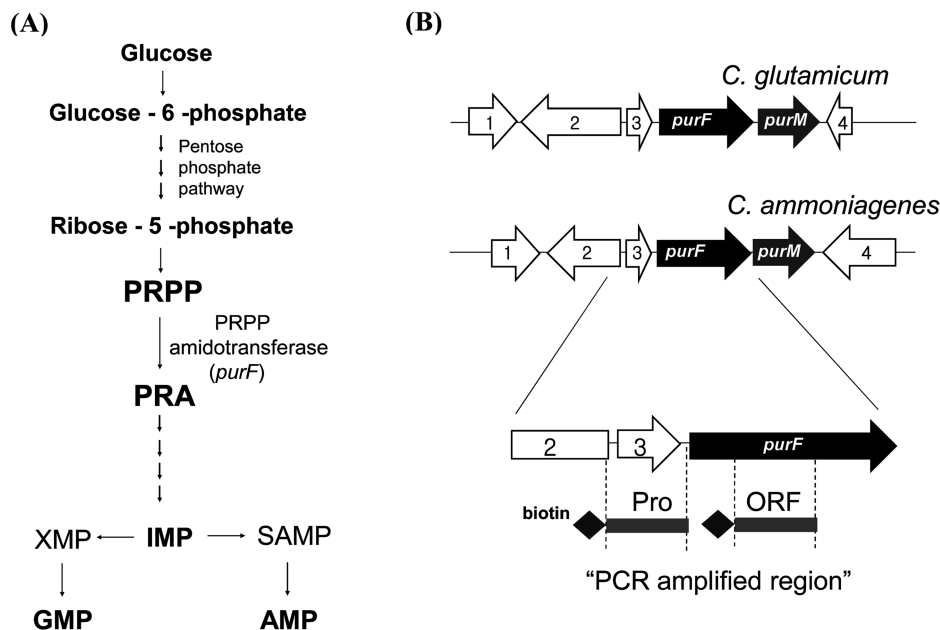


Fig. 1. Representative pathways for purine biosynthesis (A) and comparison of genomic organization including *purF* and its flanking region between *C. glutamicum* and *C. ammoniagenes* (B). Orthologous genes are indicated by identical color and numbers. For *C. glutamicum*: 1, predicted membrane protein (NCgl2498); 2, acyl-CoA hydrolase H (NCgl2497); 3, hypothetical protein (NCgl2496); 4, hypothetical protein (NCgl2493), *purM*: phosphoribosylaminoimidazole (AIR) synthetase (NCgl2494). For *C. ammoniagenes*, number 1, 2, 3, and 4 represents ORF1, ORF2, ORF3, and ORF4 respectively. PCR amplified DNA fragments for DNA affinity chromatography is shown in gray box in panel (B). Abbreviations: PRPP, 5'-phosphoribosyl 1-pyrophosphate; PRA, 5'-Phosphoribosylamine; IMP, inosine monophosphate; GMP, guanosine monophosphate; SAMP, adenylosuccinate; XMP, xanthosine monophosphate.

Table 2. Effects of base on *purF* expression^a

Plasmids	Base added (mM)	CAT activities ^b
pSK1CAT	None	0.01±0.0
pSK1CAT::P _{tac}	None	16.0±1.2
	None	2.5±0.2
	1	1.9±0.2
	3	1.6±0.3
	5	1.9±0.2
	10	1.9±0.2
pSK1CAT::P _{purF} (pSL436)	1	2.2±0.3
	3	2.2±0.1
	5	1.9±0.1
	10	2.0±0.1
	1	2.6±0.1
	3	2.5±0.5
	5	2.5±0.1
	10	2.5±0.1
	Hypoxanthine	

^a Bases were added to the growth medium as described in 'Materials and Methods'.

^b CAT activities (μmol/mg/min) represent data from three independent experiments.

의해 25%의 저해를 나타내었고, 3 mM, 5 mM, 및 10 mM의 농도에서도 유사한 저해를 나타내었다. Guanine의 경우 1 mM과 3 mM에서 12% 저해를 나타냈고 5 mM과 10 mM에서는 20~25% 저해를 나타내어 adenine에 비해서는 그 효과나 농도 측면에서 저해 정도가 작은 것으로 파악되었다. Hypoxanthine에는 저해를 받지 않는 것으로 나타났다. 위의 결과에서 유전자 *purF*는 전사수준에서 repression에 의해 약 20~30% 수준에서 조절을 받는 것에 그쳐 충분한 저해수준에 도달하지 못하고 있음을 알 수 있었는데, 이는 높은 수준의 조절을 달성하기 위해 PurF 단백질이 발현되는 경우 feedback inhibition에 의한 효소수준에서의 추가적인 조절이 존재할 수 있음을 의미한다. 다음 단계로 *purF*의 발현양상을 파악하기 위해 각각의 성장단계별로 CAT 활성을 측정해 보았는데, Fig. 2에 나타난 것처럼 대수기 중반으로부터 정체기까지 일정한 CAT 활성을 보여, *purF*의 발현은 성장과 비례하여 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 또한, *C. glutamicum*에서 promoter probe vector (16)를 이용해 분리된 promoter인 P₁₈₀은 *C. glutamicum*에서 우수한 유전자 발현 활성을 보이는 것으로 파악되었는데(16), 이 프로모터가 *C. ammoniagenes*에서도 사용이 가능한지 분석하였고, 그 결과 *E. coli*에서 강한 promoter로 기존에 알려진 P_{tac}보다 모든 성장 단계에서 40~50%의 향상된 promoter 활성을 나타내는 것으로 보여, *C. ammoniagenes*의 연구에도 역시 사용 가능함을 확인하였다(Table 2 and Fig. 2). 본 연구를 통해 *C. glutamicum*에 이어 *C. ammoniagenes*에서도 P₁₈₀의 강한 활성이 확인되어서, 해당 프로모터의 향후 *Corynebacterium* species에서 응용가능성이 높아

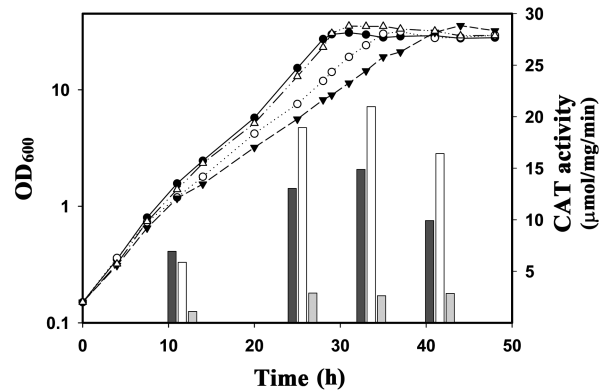


Fig. 2. Expression of *purF* during growth of *C. ammoniagenes* on FMCA minimal medium containing 2% glucose as a sole carbon source. Expression of *purF* was monitored by CAT activity as described in the text. The cell extracts were prepared from *C. ammoniagenes* cells harboring pSK1CAT, pSK1CAT::P_{tac}, pSK1CAT::P₁₈₀, or pSK1CAT::P_{purF}. Symbols for growth: (●) pSK1CAT; (○) pSK1CAT::P_{tac}; (▼) pSK1CAT::P₁₈₀; (△) pSK1CAT::P_{purF}. Dark gray, white, and gray bars represent CAT activity for cells carrying pSK1CAT::P_{tac}, pSK1CAT::P₁₈₀, and pSK1CAT::P_{purF} respectively.

진 것으로 분석되었다.

유전자 *purF*의 프로모터 추정 영역에 결합하는 조절 단백질의 탐색

최근 *Corynebacterium*에서 특정 유전자의 조절 단백질을 검색하기 위한 affinity chromatography 방법이 널리 쓰이고 있다(3, 6, 10). Purine 생합성에 관여하는 조절 단백질들로서 *E. coli* 및 *B. subtilis*에서 PurR이 보고되어 있는데, *E. coli*의 경우 38 kDa, *B. subtilis*는 62 kDa의 homodimer인 것으로 알려져 있다(17, 22). 본 연구에서는 *C. ammoniagenes*의 *purF*가 repression 되는 것으로 CAT 활성 측정결과 밝혀진 조건인 5 mM adenine 및 guanine을 첨가한 상태에서 대수기 후반까지 성장시킨 균체를 파쇄한 후, 얻어진 단백질을 streptavidin bead에 고정화된 *purF* 프로모터 추정영역의 DNA 단편에 결합시켜 조절 단백질을 검색하였다. Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼, adenine을 첨가한 조건과 guanine을 첨가한 조건에서 ORF 대조군에는 보이지 않거나 약한 단백질 band가 프로모터 부분에서는 생기거나 강해지는 후보 단백질 band들이 각각 3개와 5개 관찰되었다. 이 band들을 절단하여 ESI-MS 방법을 통한 동정을 해 본 결과, A2, G2~G4는 동정이 불가능하였다. 이는 silver 염색으로 인한 불충분한 단백질의 양 때문인 것으로 판단된다. 나머지 중에서 A1과 G1은 같은 단백질로 판명되었는데, *C. glutamicum*의 Crp-family transcriptional regulator (NCgl0120)와 상동성이 높은 것으로 나타났고, A3와 G4 역시 같은 단백질로 LuxR-family bacterial regulatory protein (NCgl2472)으로 동정되었다. 이 단백질들은 각각 계산된 단백질의 크기가 40.1 kDa, 30.8 kDa으로 Fig. 3에서 관찰된 band의 크기와 거의 유사하였다. 하지만, metabolite를 첨가하지 않은 조건

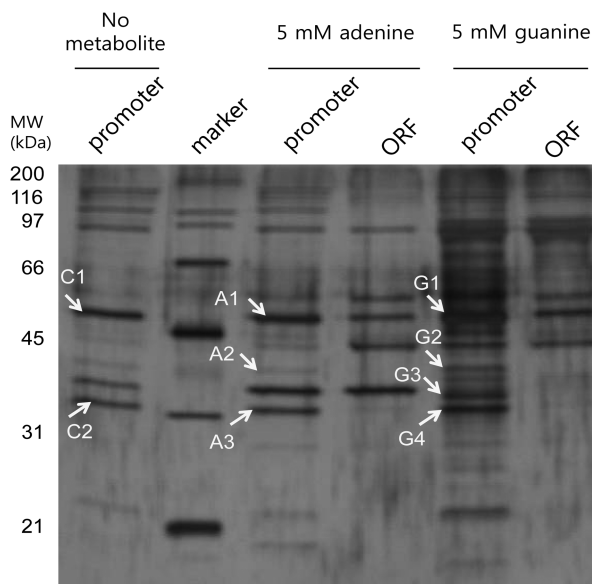


Fig. 3. SDS-PAGE of proteins isolated by affinity chromatography employing the *purF* promoter region as the binding target. Proteins were visualized by silver staining. DNA fragments designated as Promoter (Pro) and ORF are described in Fig. 1B.

의 프로모터 추정영역을 사용한 실험에서 위의 두 단백질과 크기가 유사한 band들이 관찰되었는데(Fig. 3), 이 band들 역시 분석해보니, C1의 경우에는 *C. efficiens* YS-314의 conserved hypothetical protein이었고, C2의 경우에는 A3나 G4와 같은 *C. glutamicum*의 bacterial regulatory protein이 검색되었다. 따라서, *purF*의 프로모터 추정영역에 purine base로부터 유도되어 결합한 단백질 중 LuxR-family bacterial regulatory protein은 비특이적인 결합에 의한 것으로 생각되며, Crp-family transcriptional regulator (NCgl0120) 만이 특이적인 결합에 의한 것으로 여겨진다. *C. glutamicum*의 아미노산 서열에 기반하여 *C. ammoniagenes* 게놈(unpublished data)으로부터 검색한 *C. ammoniagenes*의 NCgl0120 homologue 단백질의 경우 400개의 아미노산으로 구성되어 있으며, DNA star 프로그램을 사용한 분석결과, 42 kDa의 단백질을 만들며, pI는 4.9일 것으로 추정되었다. 또한, 기존에 알려져 있는 *E. coli* 및 *B. subtilis*의 PurR과 각각 14.1%, 15.8%의 아미노산 상동성을 보여, PurR과는 다른 종류의 단백질일 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 정부재원으로 한국학술진흥 재단의 지원을 받아 연구되었고 지원에 감사드립니다(KRF-2006-F00002 to H.-S. Lee).

참고문헌

1. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quan-

titation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

2. Chung, S.O., J.H. Lee, S.Y. Lee, and D.S. Lee. 1996. Genomic organization of *purK* and *purE* in *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872: *purE* locus provides a clue for genomic evolution. *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 265-268.

3. 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.

4. Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.* 18, 499-514.

5. Follettie, M.T., O.P. 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.

6. 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.

7. Grant, S.G., J. Jessee, F.R. Bloom, and D. Hanahan. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4645-4649.

8. Han, J., S.O. Chung, J. Lee, and S. Byun. 1997. 6'-Mercaptoguaninon-resistance is related with *purF* gene encoding 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate amidotransferase in inosine-5'-monophosphate overproducing *Brevibacterium ammoniagenes*. *Biotechnol. Lett.* 19, 79-83.

9. Han, R.N., I.H. Cho, S.O. Chung, J.K. Han, J.H. Lee, S.K. Kim, and K.Y. Choi. 2004. Identification of potential *Corynebacterium ammoniagenes* purine gene regulators using the *pur-lacZ* reporter in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 1249-1255.

10. Jungwirth, B., D. Emer, I. Brune, N. Hansmeier, A. Puhler, 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.

11. Laemmli, U.K. 1976. SDS-PAGE to evaluate extent of hydrolysis, of proteins. *Nature* 227, 680-685.

12. Lee, S.M., B.J. Hwang, Y. Kim, and H.S. Lee. 2009. The *cmaR* gene of *Corynebacterium ammoniagenes* performs a novel regulatory role in the metabolism of sulfur-containing amino acids. *Microbiology* 155, 1878-1889.

13. Liebl, W. 2006. "Corynebacterium -Nonmedical" in The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria, 3rd ed. Springer, New York, N.Y., USA.

14. MacNeil, D.J., J.L. Occi, K.M. Gewain, T. MacNeil, P.H. Gibbons, C.L. Ruby, and S.J. Danis. 1992. Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase. *Gene* 115, 119-125.

15. Neidhardt, F.C. and R. Curtiss. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C., USA.

16. Park, S.D., S.N. Lee, I.H. Park, J.S. Choi, W.K. Jeong, Y.H. Kim, and H.S. Lee. 2004. Isolation and characterization of transcriptional elements from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 789-795.

17. Rolfes, R.J. and H. Zalkin. 1988. *Escherichia coli* gene *purR* encoding a repressor protein for purine nucleotide synthesis. Clon-

- ing, nucleotide sequence, and interaction with the *purF* operator. *J. Biol. Chem.* 263, 19653-19661.
18. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
 19. Schumacher, M.A., A. Glasfeld, H. Zalkin, and R.G. Brennan. 1997. The X-ray structure of the PurR-guanine-*purF* operator complex reveals the contributions of complementary electrostatic surfaces and a water-mediated hydrogen bond to corepressor specificity and binding affinity. *J. Biol. Chem.* 272, 22648-22653.
 20. Shaw, W.V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol.* 43, 737-755.
 21. Simpson, R.J. 2003. Proteins and proteomics: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
 22. Weng, M., P.L. Nagy, and H. Zalkin. 1995. Identification of the *Bacillus subtilis pur* operon repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7455-7459.
 23. Zalkin, H. and J.E. Dixon. 1992. De novo purine nucleotide biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 42, 259-287.

(Received August 17, 2009/Accepted September 21, 2009)

ABSTRACT : Regulation of *Corynebacterium ammoniagenes purF* and Isolation of *purF*-Specific Regulatory Proteins

Seok-Myung Lee¹, Younhee Kim², and Heung-Shick Lee^{1*} (¹Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University, Chungnam 339-700, Republic of Korea, ²Department of Oriental Medicine, Semyung University, Chungbuk 390-230, Republic of Korea)

The expression of *Corynebacterium ammoniagenes purF* was analyzed by utilizing a plasmid carrying a *cat* gene fused to the *purF* promoter region. Adenine and guanine repressed the expression of the *purF* gene by 20~30% but hypoxanthine did not exert such repressive effect. The expression *purF* was maximal at the late log phase and remained constant throughout the stationary phase. Promoter P₁₈₀ which was developed in *C. glutamicum* was also functional in *C. ammoniagenes*, achieving maximal activity at the late log phase. The promoter outperformed *Escherichia coli* P_{tac} promoter by 40~50% level. DNA-affinity purification identified a protein which could bind to the promoter region of the *purF* gene. The protein showed high similarity to the CRP-family transcriptional regulator encoded by NCgl0120 in *C. glutamicum*. The size of the screened protein agreed with the expected protein size from the ORF NCgl0120. The corresponding gene in *C. ammoniagenes* encoded a 42 kDa polypeptide composed of 400 amino acids with expected pI of 4.9. The encoded protein showed 14.1% and 15.8% identity with *E. coli* and *Bacillus subtilis* PurR, respectively, suggesting that the isolated protein might be a novel type of regulatory protein involved in the regulation of purine metabolism.