



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

理學碩士學位論文

포도당에 의한 만니톨 오피론  
억제 현상에 관여하는 MtIR의  
아미노산 잔기 규명

2018年 8月

서울대학교 大學院

生命科學部

鄭 俊 憲

## 국문 초록

탄소이화대사 억제 (Carbon catabolite repression, CCR)란 환경에 들 이상의 당이 존재할 경우 선호당을 비선호당보다 먼저 소모하는 기작으로, 선호당이 존재할 경우 비선호당의 수송과 물질대사에 필요한 유전자의 발현을 억제하거나 발현된 단백질의 기능을 저해하는 방식을 통해 이루어진다. 당수송 인산전달계 (Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system, PTS)는 대부분의 세균에서 많은 당의 수송을 담당하는데, 수송뿐만 아니라 수송과 동시에 PTS 당과 비 PTS 당 사이의 당 선호도에 관여한다고도 연구된 바 있다. 예를 들어 PTS 당인 포도당은 비 PTS 당인 젓당에 대해 선호도를 가지는데, 이 CCR은 포도당 특이적 PTS 구성단백질인 EIIA<sup>Glc</sup>의 인산화 상태에 의해 조절된다.

본 연구진은 PTS를 통하여 수송되는 포도당과 만니톨 사이에도 CCR이 존재하며, 포도당과 젓당 사이의 CCR과 달리 일반 PTS 구성단백질인 HPr이 당 선호도에 관여한다는 것을 밝혔다. HPr은 같은 PTS 당이더라도 포도당과 만니톨을 수송할 때 탈인산화되는 정도에 차이가 있고, 따라서 포도당이 존재할 때 다수의 탈인산화된 HPr이 만니톨 오페론 억제자인 MtlR과 결합하여 만니톨 오페론의 발현을 억제한다.

MtlR과 HPr 모두 DNA에 결합할 수 있는 도메인을 가지고 있지 않기 때문에 MtlR-HPr 복합체가 만니톨 오페론의 발현을 조절하기 위해서는 cognitive DNA-binding protein이 필요할 것이라고 생각하였고 이를 찾기 위해 구조학적으로 접근하였다. MtlR-HPr 복합체의 구조를 풀어 MtlR의 아미노산 잔기 중 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요할 것으로 생각되는 세 종류의 잔기를 선정하였고, 각 잔기에 돌연변이를 일으킨 균주를 가지고 만니톨 오

페론의 발현 양상 및 생장곡선 확인 실험을 통해 Arg92 잔기가 상호작용에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다. 이후 돌연변이 MtlR을 사용해 직접적으로 cognitive DNA-binding protein을 찾기 위한 실험을 진행하여 QseB라는 후보군을 확인하였다.

주요어 : 탄소이화대사 억제, MtlR, HPr, cognitive DNA-binding protein

# 목차

국문 초록	1
목차	3

## I. 서론

1. Carbon catabolite repression (CCR)에 의한 특정 당 선호 현상	6
2. 대장균의 phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS)과 PTS에 의한 생리 활성 조절	6
3. CCR에 영향을 미치는 요인	8
3.1. PTS 당인 포도당과 비 PTS 당인 젓당 사이의 CCR에 영향을 미치는 요인	8
3.2. PTS 당인 포도당과 만니톨 사이의 CCR에 영향을 미치는 요인	9
4. 연구 목표	11

## II. 재료 및 방법

1. MtlR 잔기 돌연변이 균주 제작	13
1.1. 돌연변이 서열을 포함하는 PCR product 제작	13
1.2. PCR product 재조합을 통한 돌연변이 균주 제작	14
2. qRT-PCR	15
3. pACYC184-HPr(H15A) 형질전환 균주 제작과 생장곡선 확인	17
4. 단백질 과발현 균주 제작과 단백질 정제	17
5. Binding test	19
5.1. MtlR mutant-HPr binding test	19
5.2. MtlR-QseB binding test	20
6. Metal affinity chromatography를 이용한 <i>in vivo</i> protein ligand fishing	21
7. MADLI-TOF	22

### III. 결과 . . . . . 24

1. qRT-PCR을 통한 MtlR 돌연변이 균주의 만니톨 오페론 발현량 측정	24
2. MtlR 아미노산 잔기 돌연변이에 따른 균주의 생장 곡선 차이	29
3. MtlR 돌연변이와 HPr의 binding test	31
4. MtlR(R92M) 돌연변이를 사용한 <i>in vivo</i> protein ligand fishing	32
5. MtlR과 QseB의 binding test	35

IV. 고찰 . . . . . 39

1. 돌연변이를 일으킬 MtlR 아미노산 잔기 선정 . . . . . 39
2. *in vivo* protein ligand fishing을 통해 확인한 cognitive DNA-binding protein 후보군 . . . . . 40
3. Cognitive DNA-binding protein . . . . . 42

V. 참고 문헌 . . . . . 45

Abstract . . . . . 49

# I. 서론

## 1. Carbon catabolite repression (CCR)에 의한 특정 당 선호 현상

생물체는 여러 종류의 탄소원을 사용할 수 있는데, 주변 환경에 여러 종류의 탄소원이 동시에 존재할 때 특정 탄소원을 다른 탄소원에 비해 선호하는 현상을 보인다. Carbon catabolite repression (CCR)은 이러한 탄소원의 순차적인 소모를 가능하게 해주는 현상으로 알려져 있는데, 선호당이 존재할 때 비선호당의 물질대사에 관련된 단백질의 발현 또는 기능을 억제함으로써 작용한다. (Magasanik, 1961). 일반적으로 빠르게 물질대사가 가능한 탄소원이 다른 탄소원에 비해 선호되기 때문에, 이러한 CCR 현상은 생물체가 다양한 탄소원이 존재하는 환경에서 효율적으로 성장하고 살아남을 수 있도록 해준다.

대부분의 세균에서 phosphoenolpyruvate:sugar phospho-transferase system (PTS)에 의해 수송되는 당은 PTS가 아닌 경로를 통해 수송하는 당에 비해 선호된다고 알려져 있다. 예를 들어 대장균에서 PTS에 의해 수송되는 포도당, 만니톨 같은 당은 PTS가 아닌 경로로 수송되는 젓당, 맥아당, 글리세롤 같은 당에 비해 선호되는 현상이 관찰된다 (Gorke et al., 2008).

## 2. 대장균의 phosphoenolpyruvate:sugar phospho-transferase system (PTS)과 PTS에 의한 생리



## 활성 조절

PTS는 enzyme I (EI), histidine phosphocarrier protein (HPr), enzyme II (EII) 단백질과 같은 여러 종류의 단백질로 구성되어 있고, EI과 HPr은 여러 종류의 당 수송에 모두 관여하는 일반 PTS component이며 EII는 당 특이적 PTS component로 여러 종류가 존재한다. EII는 보통 EIIA, EIIB로 구성된 cytosolic domain과 당을 수송하는 channel로 기능하는 membrane domain인 EIIC 총 세 종류의 도메인으로 구성된다. EI은 PEP로부터 유래한 인산기를 전달받아 다시 HPr로 전달해주고, HPr은 다시 인산기를 EIIA와 EIIB로 전달하며 이 인산기는 EIIC를 통해 세포 내부로 수송되는 당을 인산화시킨다 (Deutscher et al., 2014).

PTS는 당 수송 이외에도 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. PTS를 구성하는 단백질들은 세균의 주변 환경에 존재하는 당의 종류에 따라 인산화 상태가 변하게 된다. 예를 들어 대장균의 경우 포도당과 같은 PTS 당이 존재할 때 포도당 특이적인 EIIA<sup>Glc</sup>와 HPr은 대부분 인산기를 포도당에 전달하고 탈인산화된 상태로 존재한다. 반대로 PTS 당이 존재하지 않을 때는 인산기를 전달하지 못하기 때문에 인산화된 상태의 단백질이 증가하게 된다 (Postma et al., 1993). 따라서 인산화된 PTS 단백질과 탈인산화된 PTS 단백질의 비율은 세균의 주변에 존재하는 당의 종류를 구분할 수 있는 센서의 기능을 할 수 있고, 이를 통해 세균이 CCR을 포함한 다양한 생리 활성을 조절한다고 알려져 있다 (Deutscher et al., 2014).

실제로 PTS를 구성하는 단백질의 인산화, 탈인산화 상태에 따른 생리 활성 조절은 많은 연구가 이루어지고 있다. 탈인산화된 HPr은 anti- $\sigma^{70}$  factor인 Rsd를 억제하고 (Park et al., 2013), glycogen phosphorylase를 활성화한다 (Seok et al., 1997). 탈인산화된 EIIA<sup>Glc</sup>

는 FrsA를 조절하고 (Koo et al., 2004), glycerol kinase의 활성을 방해하며 (Hurley et al., 1993), 탈인산화된 EIIB<sup>Glc</sup>는 다양한 유전자의 억제자로 기능하는 Mlc를 억제한다 (Nam et al., 2001). 그리고 인산화된 EIIA<sup>Glc</sup>는 adenylate cyclase를 활성화시킨다 (Park et al., 2006). CCR 역시 당을 선택적으로 수송하는 현상으로, 당의 수송에 관련된 PTS와 밀접한 관련이 있다 (Deutscher et al., 2006).

### 3. CCR에 영향을 미치는 요인

#### 3.1. PTS 당인 포도당과 비 PTS 당인 젓당 사이의 CCR에 영향을 미치는 요인

선호도에 따른 탄소원의 순차적인 사용은 대장균에서 많은 연구가 이루어졌고, 그중에서도 포도당과 젓당 사이의 CCR이 가장 잘 알려져 있다. 포도당은 PTS 당으로 비 PTS 당인 젓당에 비해 선호되고 먼저 소모되는 것이 알려져 있다. 포도당과 젓당이 같이 존재하는 환경에서 대장균을 배양했을 때, 우선 포도당만을 선택적으로 소모하고 젓당을 소모하는데 필요한 단백질을 발현하는데 걸리는 시간인 짧은 lag phase를 지난 후 젓당을 소모하는 diauxic한 성장 곡선을 관찰할 수 있다 (Monod, 1942).

현재까지 이러한 젓당에 대한 포도당 선호 현상은 ‘inducer exclusion’과 ‘induction prevention’이라는 두 가지의 기작을 통해 일어난다고 받아들여지고 있다. 두 기작은 모두 EIIA<sup>Glc</sup>의 인산화 상태에 따라 조절된다. 우선 대장균이 세포 외부의 포도당을 PTS를 통해 세포 내부로 수송하는 과정에서 PTS 구성 단백질들이 탈인산화

된다. 이때 탈인산화된 EIIA<sup>Glc</sup>는 젖당을 수송하는 lactose permease를 포함한 여러 가지 비 PTS 당의 transporter에 결합하여 당의 수송을 억제한다고 알려져 있다. 이러한 현상을 ‘inducer exclusion’이라고 하며 당의 수송을 억제하여 당이나 당의 대사물에 의해 물질대사 기작이 유도되는 것을 방해하는 현상을 말한다 (Postma et al., 1996).

또 다른 기작에는 cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein (CRP) 복합체가 관여한다. 대장균의 유전자 발현에서 cyclic AMP-CRP 복합체는 물질대사에 관련된 유전자를 포함하는 많은 종류의 유전자의 발현을 조절하는 역할을 한다. cyclic AMP는 adenylate cyclase에 의해 합성되는데 adenylate cyclase는 인산화된 EIIA<sup>Glc</sup>에 의해 활성화된다. 포도당이 존재하는 상황에서는 대부분의 EIIA<sup>Glc</sup>가 탈인산화된 상태로 존재하기 때문에 adenylate cyclase를 활성화시키지 못하고, 따라서 세포 내의 cyclic AMP 농도가 낮아지게 된다. 이로 인해 cyclic AMP-CRP 복합체에 의해 조절 받는 비 선호당의 수송과 물질대사에 필요한 유전자들은 제대로 발현되지 못해서 대장균이 비선호당을 소모하지 못하게 된다. 이러한 현상을 ‘induction prevention’이라고 한다 (Park et al., 2006).

### 3.2. PTS 당인 포도당과 만니톨 사이의 CCR에 영향을 미치는 요인

포도당과 젖당 사이의 CCR을 비롯한 PTS 당과 비 PTS 당 사이의 선호도에 대해서는 많은 연구가 진행되었지만, PTS 당 사이의 선호도에 대해서는 아직까지 알려진 바가 많지 않다. 본 실험실에서는 포도당과 만니톨 두 종류의 PTS 당 사이의 선호 관계에 대해

연구해왔고, 포도당과 만니톨 사이의 선호도는 포도당과 젓당 사이의 선호도와 달리 EIIA<sup>Glc</sup>가 아닌 포도당 PTS와 만니톨 PTS에 모두 관여하는 일반 PTS component인 HPr의 인산화 상태에 의해 조절되는 것을 밝혔다 (Choe et al., 2017).

포도당이 존재할 때 HPr은 EIIA<sup>Glc</sup>와 마찬가지로 대부분 탈인산화된 상태로 존재한다. 만니톨 오페론의 억제자인 MtlR은 탈인산화된 HPr을 인식하여 MtlR-HPr 복합체를 형성하여 만니톨 오페론의 강력한 억제자로 기능한다. 반면 만니톨이 존재할 때 HPr은 마찬가지로 탈인산화되긴 하지만 포도당과 달리 50% 이상의 HPr이 여전히 인산화된 형태로 존재하여 MtlR과 상호작용하지 못한다. 이처럼 포도당과 만니톨은 같은 PTS 당이더라도 HPr이 인산화되는 정도에 차이가 있기 때문에 MtlR과 상호작용할 수 있는 HPr의 수가 달라지고, 따라서 포도당의 존재 유무에 따라 만니톨 오페론의 발현을 조절할 수 있게 된다.

HPr의 인산화 상태가 중요하다는 것은 HPr의 His15를 alanine으로 치환시킨 HPr(H15A) 돌연변이를 사용하여 확인하였다. HPr의 15번째 histidine은 EI으로부터 인산기를 전달받는 역할을 하여 HPr의 인산화에 매우 중요하며, alanine으로 치환되면 인산화되지 못해 탈인산화된 HPr의 기능을 한다. 야생형 HPr을 번역하는 *ptsH* 유전자를 결손시키고 HPr(H15A) 돌연변이 단백질을 발현하도록 만들어진 돌연변이 균주는 다시 야생형 HPr을 발현할 수 있도록 회복시켜 준 균주에 비해 만니톨 배지에서의 성장 속도가 느려진다. 따라서 탈인산화된 HPr이 만니톨 오페론의 억제에 중요한 역할을 한다는 사실을 알 수 있다.

또 MtlR과 HPr의 상호작용이 만니톨 오페론 발현의 억제에 중요하다는 것은 HPr의 Lys27을 glutamate로 치환시킨 HPr(K27E) 돌연변이를 사용하여 밝혔다. HPr(K27E) 돌연변이는 EI으로부터 인산

기를 전달받고 다시 인산기를 EIIA로 전달하는 PTS component로써의 HPr의 기능은 유지하지만 MtlR과는 결합하지 못한다. *ptsH* 유전자를 결손시킨 균주에 야생형 HPr을 발현할 수 있도록 회복시켜준 균주와 HPr(K27E) 돌연변이를 발현하도록 만들어준 돌연변이 균주를 각각 포도당과 만니톨이 존재하는 환경에서 배양하면, 야생형 HPr을 발현하는 균주는 만니톨보다 포도당을 선호하는 현상이 나타나지만 HPr(K27E) 돌연변이를 발현하는 균주는 만니톨과 포도당 사이의 선호도가 사라지는 것을 통해 MtlR과 HPr이 상호작용하지 못하면 만니톨 오페론 억제현상이 사라지는 것을 관찰하였다.

#### 4. 연구 목표

MtlR이 탈인산화된 HPr과 결합하여 만니톨 오페론의 발현을 억제한다는 사실을 밝혔지만, MtlR과 HPr은 모두 DNA-binding domain을 갖지 않는다 (Tan et al., 2009). 따라서 MtlR-HPr 복합체에 추가적으로 DNA에 결합할 수 있도록 도와주는 단백질인 cognitive DNA-binding protein이 존재할 것으로 생각하여 이를 찾기 위한 다양한 실험을 수행했지만 현재까지는 cognitive DNA-binding protein으로 생각되는 단백질을 찾지 못했다.

본 실험에서는 구조학적으로 새롭게 접근하여 MtlR-HPr 복합체의 구조를 풀어 MtlR의 아미노산 잔기 중 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 세 가지의 잔기를 선정하였고, 만니톨 오페론의 발현 양상 및 성장곡선 확인 실험을 통해 잔기에 돌연변이를 일으킨 균주의 표현형이 어떻게 변하는지 확인하는 실험을 진행하였다. 이후 유의미한 표현형 차이를 보이는 돌연변이 균주의 MtlR을 가지고 직접적으로 cognitive

DNA-binding protein을 찾기 위한 *in vivo* protein ligand fishing 실험을 진행하여 후보군 단백질을 찾고, 이 단백질이 MtlR과 결합하는지 확인해보는 실험을 통해 cognitive DNA-binding protein을 찾고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. MtlR 잔기 돌연변이 균주 제작

염색체 상에 MtlR 잔기 돌연변이를 일으킨 균주를 제작하기 위해 *mtlD* 유전자를 결손시킨 MG1655  $\Delta$ *mtlD* 균주에 *mtlD* 유전자와 돌연변이 *mtlR* 유전자를 포함하는 PCR product를 만들어서 재조합시키는 방법을 사용하였다.

#### 1.1. 돌연변이 서열을 포함하는 PCR product 제작

*mtlR*의 서열상에 돌연변이를 일으키기 쉽도록 우선 pBR322 플라스미드에 야생형 *mtlD*, *mtlR* 유전자를 클로닝하였다. 먼저 *mtlD*, *mtlR* 유전자, 재조합될 수 있도록 필요한 유전자로부터 앞쪽으로 100 bp, 뒤쪽으로 500 bp의 서열, 제한효소를 처리할 수 있도록 제한효소 서열을 모두 포함하는 PCR product를 만들었다. pBR322 플라스미드와 PCR product를 각각 제한효소로 자른 후 제한효소 처리한 플라스미드는 alkaline phosphatase를 처리하고 둘을 ligation하여 pBR322-MtlDR 플라스미드를 제작하였다.

이후 돌연변이 MtlR을 번역하도록 변형시키려고 하는 *mtlR* 유전자 서열을 포함하면서 동일한 서열을 반대 방향으로 PCR하는 프라이머로 플라스미드를 PCR하여 양쪽에 동일하게 변형된 *mtlR* 유전자 서열을 가지고 있는 선형의 플라스미드를 얻었다. PCR product에서 PCR 주형으로 사용한 원형 플라스미드를 없애기 위해 DpnI을

처리한 후 ER2566 균주에 형질전환하여 선형의 플라스미드가 재조합을 통해 원형의 플라스미드가 되도록 하였다. 이를 통해 변형된 *mtlR* 유전자 서열을 포함하고 있는 pBR322-MtIDR mutant 플라스미드를 제작하였다. 해당 플라스미드를 주형으로 가장 처음에 사용했던 재조합에 필요한 서열까지 포함하는 프라이머로 PCR하여 돌연변이 균주 제작에 필요한 PCR product를 만들었다.

## 1.2. PCR product 재조합을 통한 돌연변이 균주 제작

PCR product를 MG1655  $\Delta$ *mtlD* 균주에 재조합시키기 위해 우선 pKD46 플라스미드를 MG1655  $\Delta$ *mtlD* 균주에 형질전환하였다. pKD46 플라스미드는 파지로부터 유래한, 재조합에 필요한 단백질을 발현하는 플라스미드로 파지로부터 유래했기 때문에 42 °C의 고온에서는 사라진다. PCR product를 제작한 MG1655  $\Delta$ *mtlD*/pKD46 균주에 형질전환시키고 LB를 1 ml 넣어준 후 37 °C에서 2 시간 regeneration 시켰다. 이후 세포를 0.2% 만니톨을 포함하는 M9 agar 최소배지에 깔았다. MG1655  $\Delta$ *mtlD* 균주의 경우 만니톨 대사 과정에 필요한 MtID 단백질이 없기 때문에 만니톨 배지에서 자라지 못하지만, 재조합이 일어난 균주는 *mtlD* 유전자가 회복되기 때문에 만니톨 배지에서 자랄 수 있게 된다.

이때 재조합을 위해 추가적으로 넣어준 앞쪽의 100 bp와 뒤쪽의 500 bp에서 재조합이 일어나야 하지만, 뒷부분의 경우 *mtlR* 유전자에서 돌연변이를 위해 변형시킨 서열의 앞부분은 야생형 균주의 서열과 동일하기 때문에 이 부분 역시 재조합이 일어날 수 있다. 따라서 뒤쪽은 앞쪽보다 훨씬 긴 500 bp를 겹치게 만들었지만 여전히



중간에서 재조합이 일어날 가능성이 존재하기 때문에 agar 배지에서 자란 콜로니를 골라 시퀀싱을 보내 돌연변이가 제대로 생겼는지 확인하여 최종적으로 염색체 상에서 *mtlR* 유전자의 잔기 부분에 돌연변이를 일으킨 균주를 제작하였다 (그림 1).

## 2. qRT-PCR

qRT-PCR 하기 위한 균주를 LB 배지에서 overnight 배양한 후 수확해서 새 LB 배지로 resuspension 하였다. 세포들을 LB 배지에 OD<sub>600</sub> 0.2에 맞춰서 새로 접종하고 40 분 후 메탄올과 1:1 비율로 섞어 4 °C에서 1시간 incubation하여 세포를 고정했다. 세포를 다시 수확해서 aspirator로 상등액을 제거한 후 lysozyme를 10 mg/ml의 농도가 되도록 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여서 10 분 처리했다. 이후 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (Takara)를 사용하여 RNA를 뽑았다.

RNA to cDNA EcoDry™ Premix (Takara)에 2,500 ng의 RNA를 넣고 reverse transcription-PCR을 통해 cDNA를 합성했다. 합성된 cDNA를 1/20 비율로 희석하여 qRT-PCR에 사용하였고, *mtlA*, *mtlR* 유전자 각각에 특이적인 프라이머와 TranStart Top Green qPCR SuperMix (TransGen)를 사용하였으며 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 발현량을 정규화시키기 위해 세포 내에서 발현량이 일정하다고 알려진 *rrsH* 유전자의 발현량을 대조군으로 측정하였다. 측정하고자 하는 유전자의 발현량은 일정 수치에 도달할 때까지 걸린 PCR 주기 (Ct)를 *rrsH* 유전자의 주기에 대한 상댓값을 통해 계산하였다.

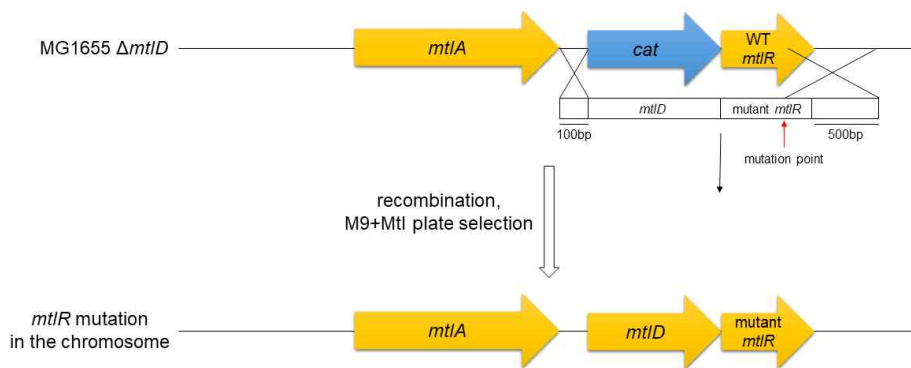


그림 1. MtlR 잔기 돌연변이 균주 제작 방법

### 3. pACYC184-HPr(H15A) 형질전환 균주 제작과 생장곡선 확인

생장곡선 확인을 위해 필요한 균주를 제작하기 위해 야생형 MG1655, 염색체상의 *mtlR* 유전자에 돌연변이를 일으킨 MG1655 *mtlR::mtlR*(D83A), MG1655 *mtlR::mtlR*(R92M), MG1655 *mtlR::mtlR*(R117M) 균주를 각각 competent cell을 만들었다. 야생형 MG1655 균주에는 대조균으로 사용하기 위해 pACYC184 플라스미드와 HPr(H15A)를 발현하는 pACYC184-HPr(H15A) 플라스미드를 각각 형질전환했고, 돌연변이 균주에는 각각 pACYC184-HPr(H15A) 플라스미드를 형질전환 하였다.

형질전환시킨 균주 다섯 종류를 각각 LB 배지에서 overnight 배양한 후 수확해서 M9 최소배지로 씻었다. 이후 동일한 M9 배지로 resuspension하고, 0.2% 만니톨을 포함하는 M9 배지 1 ml에 각각 OD<sub>600</sub> 0.1을 맞추어 접종하고 Cell Culture 96-well Plate (SPL)에 각각을 한 well당 150 µl씩 3개의 well에 triplet으로 넣은 후 Spark Microplate Reader (Tecan)을 통해 OD<sub>600</sub> 값을 측정하였다. 30분 간격으로 측정한 OD<sub>600</sub> 값을 엑셀을 통해 분산형 그래프로 나타내어 성장곡선을 확인하였다.

### 4. 단백질 과발현 균주 제작과 단백질 정제

단백질 과발현을 위해서 IPTG를 이용해 단백질을 inducible하게 과발현시킬 수 있는 ER2566 균주와 pET43.1a 또는 pETDuet 플라스미드를 사용했다. MtlR과 HPr의 binding test에 사용할 His tag

달린 MtlR과 tag 없는 HPr은 모두 pET43.1a 플라스미드에 클로닝 했고, MtlR과 QseB의 binding test에 사용할 MtlR과 His tag 달린 MtlR은 pET43.1a 플라스미드, QseB와 His tag 달린 QseB는 pETDuet 플라스미드에 각각 클로닝했다.

클로닝할 유전자의 서열을 자르지 않으면서 플라스미드를 자를 수 있는 제한효소 두 가지를 선정하여 앞, 뒤로 제한효소로 자를 수 있는 서열을 포함하는 PCR product를 만들었다. 플라스미드와 PCR product를 각각 제한효소로 자른 후 제한효소 처리한 플라스미드는 alkaline phosphatase를 처리하고 둘을 ligation하여 pET43.1a-HPr, pET43.1a-MtlR, pET43.1a-HisMtlR, pET43.1a-HisMtlR(R92M), pET43.1a-HisMtlR(D83A R92M R117M), pETDuet-QseB, pET Duet-HisQseB 일곱 종류의 플라스미드를 제작하였다. 이후 각각의 플라스미드를 ER2566 균주에 형질전환 시켰다.

각각의 균주를 LB 400 ml에 접종하고 37 °C에서 OD<sub>600</sub> 0.4 이상이 될 때까지 키운 후 1 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 넣고 37 °C에서 추가로 3시간 더 키워 induction 했다. Induction한 세포를 수확하고 10 ml의 binding buffer (20 mM HPEPS pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% β-mercaptoethanol)로 resuspension한 후 protease inhibitor를 넣었다. 이후 French Press와 Sonicator를 사용하여 세포를 깨고 10,000 rpm, 20 분 원심분리해서 cell lysate를 얻었다. 원심분리하는 동안 Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-Rad)에 Talon Superflow Affinity Resin (Takara) 300 μl를 넣고 TDW, binding buffer로 씻었다. Cell lysate를 talon resin에 넣고 4 °C에서 30 분 동안 흔들어서 His tag 달린 단백질이 talon resin에 결합할 수 있도록 했다. Cell lysate를 흘려보내고 washing buffer (20 mM HPEPS pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05% β-mercaptoethanol, 10

mM imidazole)를 3 ml 넣고 4 °C에서 10 분 동안 흔들어서 talon resin을 씻는 과정을 3번 반복하였다. 이후 elution buffer (20 mM HPEPS pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.05%  $\beta$ -mercaptoethanol, 200 mM imidazole) 1 ml을 talon resin에 흘려서 결합해있는 His tag 달린 단백질을 elution하는 과정을 3번 반복했다. 마지막으로 elution된 단백질과 같이 들어있는 imidazole은 이후 실험에서 단백질을 다시 talon resin에 붙일 때 이를 방해하기 때문에, imidazole을 제거하기 위해 Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Thermo) 에 elution한 단백질을 넣고 cassette를 500 ml의 binding buffer에 넣은 후 4 °C에서 overnight으로 dialysis를 하였다.

## 5. Binding test

### 5.1. MtlR mutant-HPr binding test

His tag 달린 MtlR 돌연변이들을 각각 talon resin에 먼저 붙여두기 위해, 우선 4 개의 5 ml tube에 talon resin 50  $\mu$ l를 넣었다. Talon resin의 capacity (5-15 mg/ml)를 생각하여 야생형 MtlR, MtlR(R92M), MtlR(D83A R92M R117M) 단백질의 양을 각각 250  $\mu$ g에 맞춰 넣고 buffer를 더 넣어 서로 부피를 맞춰줬으며, 대조군으로 동량의 단백질 없는 buffer를 마찬가지로 넣어준 후 4 °C에서 30 분 동안 흔들었다.

HPr은 cell lysate 상태로 HisMtlR이 붙어있는 talon resin에 흘려준 후 elution할 때 HisMtlR과 co-elution 되는지 보기 위해 HPr을 과발현시킨 세포를 키우고 French Press와 Sonicator를 이용하여 깨

고 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. Cell lysate를 대조군과 실험군에 같은 양을 넣어준 후 4 °C에서 30 분 동안 흔들었다. 이후 상등액을 파이펫으로 따서 버리고 1 ml의 binding buffer로 talon resin을 resuspension해서 1.5 ml tube로 옮겼다. 상등액을 버린 후 binding buffer 1 ml을 넣고 vortexing으로 talon resin을 씻어주는 과정을 3번 반복했다. 씻은 talon resin에 50 µl의 elution buffer를 넣고 vortexing해서 HisMtlR을 talon resin으로부터 떨어트리려고 buffer를 따서 HPr이 HisMtlR과 co-elution 되는지 SDS-page gel 달려 확인했다.

## 5.2. MtlR-QseB binding test

His tag 달린 MtlR, QseB를 각각 talon resin에 붙인 후 QseB, MtlR을 과발현시킨 cell lysate를 흘려주어 QseB 또는 MtlR이 co-elution 되는지 확인하여 MtlR과 QseB가 결합하는지 교차확인하였다. 그리고 MtlR과 QseB는 MtlR과 HPr과 달리 서로 상호작용하는지 알려지지 않았기 때문에, 확실하게 확인하기 위해 MtlR mutant-HPr binding test와 다르게 bait으로 쓰인 His tag 달린 단백질의 양이 다른 두 개의 실험군으로 실험을 진행하여 bait의 양에 따라 co-elution되는 단백질의 양이 달라지는지를 확인하였다.

HisMtlR, HisQseB를 각각 talon resin에 먼저 붙여두기 위해, 우선 각각 3개씩 6개의 5 ml tube에 talon resin 50 µl를 넣었다. Talon resin의 capacity를 생각하여 단백질의 양을 각각 125 µg, 250 µg에 맞춰 넣고 buffer를 더 넣어 서로 부피를 맞춰줬으며, 대조군으로 동량의 단백질 없는 buffer를 마찬가지로 넣어준 후 4 °C에서 30 분 동안 흔들었다.

QseB와 MtlR을 cell lysate 상태로 HisMtlR, HisQseB가 붙어있는 talon resin에 흘려준 후 elution할 때 HisMtlR, HisQseB와 co-elution 되는지 보기 위해 QseB, MtlR을 과발현시킨 세포를 키우고 French Press와 Sonicator를 이용하여 깨고 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. Cell lysate를 대조군과 실험군에 같은 양을 넣어준 후 4 °C에서 30 분 동안 흔들었다. 이후 상등액을 파이펫으로 따서 버리고 1 ml의 binding buffer로 talon resin을 resuspension해서 1.5 ml tube로 옮겼다. 상등액을 버린 후 binding buffer 1 ml을 넣고 vortexing으로 talon resin을 씻어주는 과정을 3번 반복했다. 씻은 talon resin에 50 µl의 elution buffer를 넣고 vortexing해서 HisMtlR, HisQseB를 talon resin으로부터 떨어트리고 buffer를 따서 QseB 또는 MtlR이 각각 HisMtlR 또는 HisQseB와 co-elution 되는지 SDS-page gel 달려 확인했다.

## 6. Metal affinity chromatography를 이용한 *in vivo* protein ligand fishing

His tag 달린 야생형 MtlR과 MtlR(R92M) 돌연변이를 세포 내에서 야생형 균주보다 많은 양 발현시키기 위해서 단백질을 constitutive하게 발현시킬 수 있는 pBR322 플라스미드를 사용했고, pBR322 플라스미드의 경우 프로모터가 없기 때문에 세포 내에 많은 양이 발현되는 Crp 단백질의 프로모터를 달아주었다. 돌연변이 MtlR를 발현하는 균주의 경우 염색체에서 발현되는 야생형 MtlR이 실험 결과에 영향을 미칠 수 있기 때문에 *mtlR* 유전자를 결손시킨 MG1655  $\Delta$ *mtlR* 균주를 사용하였다.

*mtlR* 유전자와 *crp* 유전자의 프로모터 (313 bp)의 서열을 자르지

않으면서 플라스미드를 자를 수 있는 제한효소 두 가지를 각각 선정하여 앞, 뒤로 제한효소로 자를 수 있는 서열을 포함하는 PCR product를 만들었다. 이때 *crp* 프로모터의 뒷부분을 자르는 제한효소와 *mtlR* 유전자의 앞부분을 자르는 제한효소는 동일한 제한효소를 사용하였다. 플라스미드와 PCR product들을 각각 제한효소로 자른 후 제한효소 처리한 플라스미드는 alkaline phosphatase를 처리하고 셋을 ligation하여 pBR322-Pcrp HisMtlR, pBR322-Pcrp HisMtlR(R92M) 두 종류의 플라스미드를 제작하였다. 이후 대조군으로 사용할 pBR322 플라스미드와 함께 각각을 MG1655  $\Delta$ *mtlR* 균주에 형질전환 시켰다.

각각의 균주를 LB 400 ml에 접종하고 37 °C에서 overnight 배양해서 세포를 수확하고 10 ml의 binding buffer로 resuspension한 후 protease inhibitor를 넣었다. 이후 French Press와 Sonicator를 사용하여 세포를 깨고 10,000 rpm, 20 분 원심분리해서 cell lysate를 얻었다. 원심분리하는 동안 15 ml tube에 talon resin 50  $\mu$ l를 넣고 TDW, binding buffer로 씻었다. Cell lysate를 각각 talon resin에 넣고 4 °C에서 30 분 동안 흔들어서 HisMtlR이 talon resin에 결합할 수 있도록 했다. 이후 상등액을 파이펫으로 따서 버리고 1 ml의 binding buffer로 talon resin을 resuspension해서 1.5 ml tube로 옮겼다. 상등액을 버린 후 binding buffer 1 ml을 넣고 vortexing으로 talon resin을 씻어주는 과정을 3번 반복했다. 씻은 talon resin에 50  $\mu$ l의 elution buffer를 넣고 vortexing해서 HisMtlR, HisMtlR(R92M)을 talon resin으로부터 떨어뜨리고 buffer를 따서 SDS-page gel 달렸다. 그리고 SDS-page gel에서 단백질이 나온 패턴을 확인하여 우선 대조군에는 MtlR이 없는걸 확인하고, MtlR(R92M)을 걸어준 lane에서 야생형 MtlR을 걸어준 lane보다 적은 양이 co-elution된 단백질이 있는지 확인했다.



## 7. MALDI-TOF

MALDI-TOF 말기기 위해 SDS-page gel에서 단백질을 추출했다. 우선 SDS-page gel에서 야생형 MtlR에 비해서 MtlR(R92M) 돌연변이를 걸어준 lane에서 더 적게 co-elution된 단백질 밴드를 잘라서 1.5 ml tube에 넣었다. Isopropyl alcohol 200  $\mu$ l를 넣어서 씻어준 후 따서 버리고, 마찬가지로 TDW 200  $\mu$ l를 넣어서 씻어준 후 버렸다. 200 mM ammonium bicarbonate 200  $\mu$ l를 넣고 20 분 동안 반응시키고 버린 후 200  $\mu$ l 팁을 사용해 gel을 작은 조각으로 잘랐다. 100% acetonitrile 200  $\mu$ l를 넣어서 gel을 탈수시키는 과정을 3번 반복하고 50  $^{\circ}$ C로 설정해둔 진공 원심분리기에서 2,500 rpm으로 30분 돌려서 건조시켰다. trypsin을 10 ng/ $\mu$ l의 농도가 되도록 50 mM ammonium bicarbonate에 녹여서 tube에 25  $\mu$ l를 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시켰다.

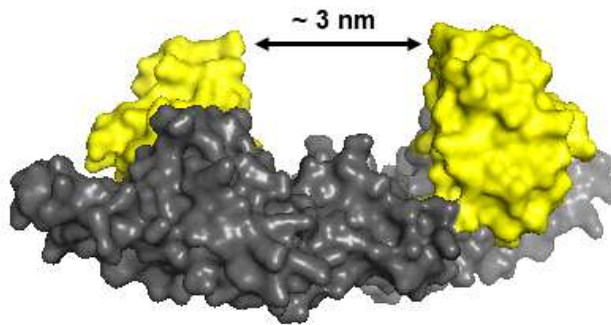
이후 반응시킨 상등액을 따서 새로운 1.5 ml tube에 넣고, 5% trifluoroacetic acid를 포함하는 100% acetonitrile 20  $\mu$ l를 넣어 gel로부터 단백질 조각을 추출한 후 같은 1.5 ml tube에 모으는 과정을 3번 반복했다. 모은 용액을 50  $^{\circ}$ C로 설정해둔 진공 원심분리기에서 2,500 rpm으로 돌려서 5~10  $\mu$ l가 될 때까지 농축시켰다. 농축시킨 샘플을 기초과학공동기기원에 있는 MALDI-TOF를 통한 분석을 맡겼다.

### III. 결과

#### 1. qRT-PCR을 통한 MtlR 돌연변이 균주의 만니톨 오페론 발현량 측정

본 실험실에서는 선행연구를 통해 만니톨 오페론의 억제자인 MtlR은 PTS component 중 탈인산화된 HPr과 결합하여 만니톨 오페론의 발현을 조절한다는 것을 밝혔다 (Choe et al., 2017). 하지만 MtlR과 HPr은 모두 DNA binding domain이 없는 것으로 알려져 있기 때문에 DNA와의 결합을 도와주는 cognitive DNA-binding protein이 추가적으로 필요할 것으로 예상하였다. 앞서 cognitive DNA-binding protein을 찾기 위한 다양한 실험을 수행했지만 유의미한 결과를 얻지 못했고, 따라서 MtlR-HPr 복합체의 구조를 분석하여 구조학적으로 접근해보기로 하였다.

MtlR-HPr 복합체의 구조 분석을 통해 MtlR-HPr 복합체가 이합체로 배 모양을 이루고 있고 (Choe, unpublished), 빈 공간에 cognitive DNA-binding protein이 결합할 것이라고 예측할 수 있었다 (그림 2). 다른 종과의 MtlR 아미노산 서열을 비교하여 잘 보존되어 있으면서 (그림 3A), 빈 공간의 표면으로 노출되어있는 잔기들이 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요한 역할을 할 것이라고 생각하여 Asp83, Arg92, Arg117 세 종류의 잔기를 선정하였다 (그림 3B). MtlR의 구조에 미치는 영향을 최소화하는 방향으로 각각 염색체상에 D83A, R92M, R117M로 돌연변이를 일으킨 균주와, 2개 혹은 3개의 잔기에 동시에 돌연변이를 일으킨 균주를 각각 제작하였다. MtlR과 cognitive DNA-binding protein의 상호작



## 그림 2. MtlR-HPy 복합체의 구조

HPy은 각각 노란색, MtlR 이합체는 회색으로 표현하였고, 복합체는 배 모양을 이루고 있음을 관찰하였다.

**A**

```

*          *          *          *
ecMt1R : MVDQAGDTRFNNRLSDMGATMEQTCAPENRVLERLNAGKTVRSFLITAVELLEAVNIVLQVFRK : 67
vpMt1R : -----NDINRDELIERLNSASVRSFFDAVIVFNFSIDGILQIFFRK : 45
vvMt1R : -----EHTNEELIERLNASVRSFFQEVVITTEAVDGLVQIFFRK : 45
vcMt1R : -----MSRAVTRSRNLNSTTDQPLKIKINEELIERLNQTRVRSFFITIVVWITEIDAALMQRIFFRK : 62
          ma nE 66ERLN 3VRgff6 tvd61tEa61 L6qr6FRK

*          *          *          *
ecMt1R : DDYAKYA80V81PEL82DG83GLG84DL85SV86R87L88K89L90IY91GL92GV93NR94Q95Y96D97A98L99L100AL101RE102L103N104H105GN106VA107FD108DI : 134
vpMt1R : DNFAVQSV110PEL111Q112SG113PLG114DL115SV116R117L118K119LL120F121GL122GV123PD124IY125HD126ED127IT128IL129N130QL131NS132AD133V134FTD135DI : 112
vvMt1R : DNFAVQSV110PEL111Q112SG113PLG114DL115SV116R117L118K119LL120F121GL122GV123PD124IY125HD126ED127IT128IL129N130QL131NS132AD133V134FTD135DI : 112
vcMt1R : DNFAVQSV110PEL111Q112SG113PLG114DL115TV116R117L118K119LL120F121GL122GV123PE124VY125HD126ED127IT128IL129N130QL131NS132AD133V134FTD135DI : 129
          D15AV svV P140LL d GPLGD63V141R142L143K144L65GL145GV6 d 5hdIE 66kL4n LN D eY FTDP I

*          *          *          *
ecMt1R : GGF140PEL141CVAA142PP143PP144PE145FADS-----EL146MM147QI148QR149Q150CA151VR152SN153MS154IN155IS156L157SK158ISL159KK160AK161OK : 195
vpMt1R : EEP162PEL163LV164AK165RG166W167Q168LV169NE170EP171DD172DE173TY174LQ175LQ176QQ177IK178SG179SL180LIV181EIGN182CG183DS184PF-- : 176
vvMt1R : EEP162PEL163LV164AK165RG166W167Q168LV169NE170EP171DD172DE173TY174LQ175LQ176QQ177IK178SG179SL180LIV181EIGN182CG183DS184PF-- : 176
vcMt1R : EEP162PEL163LV164AK165RG166W167Q168LV169NE170EP171DD172DE173TY174LQ175LQ176QQ177IK178SG179SL180LIV181EIGN182CG183DS184PF-- : 193
          L Pik Lhiv k6 m qliev pd di lsFY 606OR QQ 643g6sLa6 26c 6 kdspf

```

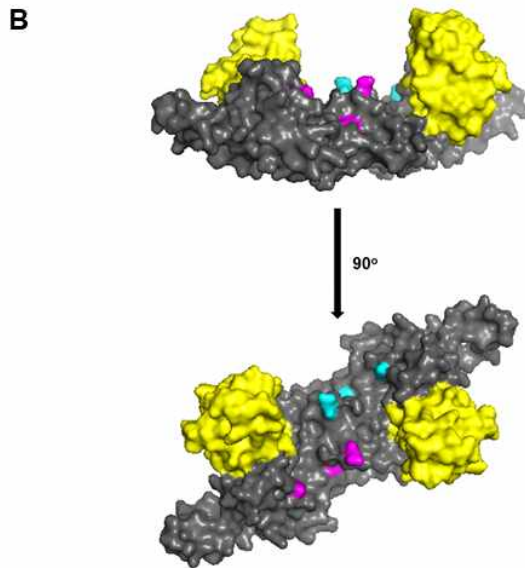


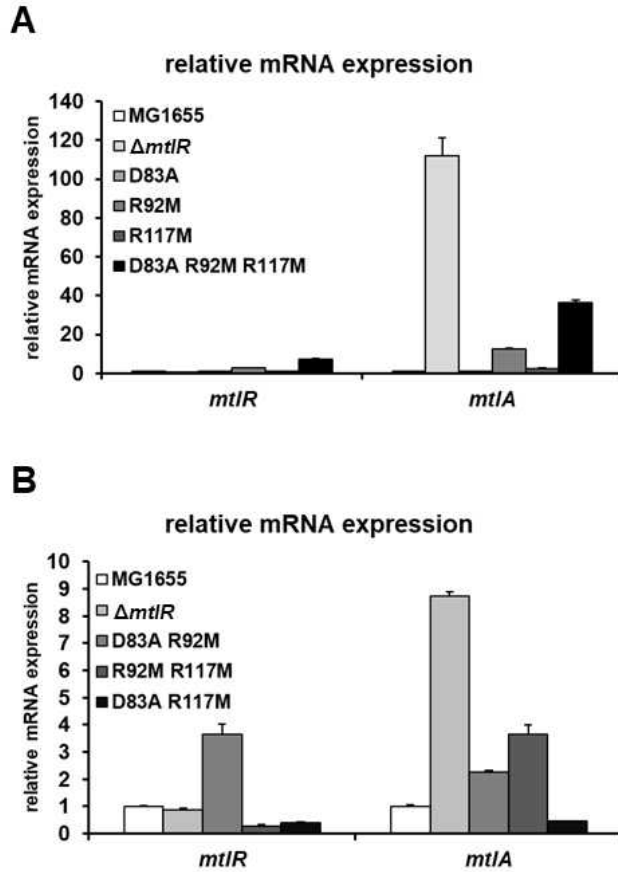
그림 3. Cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 MtlR 잔기의 위치

(A) 다른 종과의 아미노산 비교를 통해 잘 보존되어 있는 아미노산 잔기를 확인하였다. Asp83, Arg92, Arg117의 위치를 빨간색 화살표로 표시하였다. (B) MtlR-HPr 복합체에 Asp83, Arg92, Arg117 잔기의 위치를 표시하였다. 각 MtlR에 있는 잔기의 위치를 자주색과 하늘색으로 구분하여 표시하였다.

용에서 돌연변이가 둘 사이의 결합을 더 강하게 만든다면 만니톨 오페론의 발현이 더욱 억제되어 발현량이 줄어들 것이고, 둘 사이의 결합을 더 약하게 만든다면 그 반대의 결과가 나타날 것이다. 따라서 돌연변이들이 만니톨 오페론의 발현에 어떤 영향을 끼치는지 확인해보기 위해 만니톨 오페론의 발현량을 확인하기 위한 qRT-PCR을 진행하였다.

각 돌연변이 균주와 함께 야생형 MG1655 균주와 *mtlR* 유전자가 결손된 MG1655  $\Delta$ *mtlR* 균주를 대조군으로 사용하였고, 균주들을 LB 배지에서 키워서 RNA를 뽑은 후 cDNA를 합성하여 qRT-PCR을 진행하였다. 만니톨 오페론은 *mtlADR*의 순서로 존재하기 때문에 가장 앞쪽에 존재하는 *mtlA* 유전자의 발현량을 측정하여 만니톨 오페론의 발현량을 확인하였고, 추가적으로 *mtlR* 유전자의 발현량도 같이 측정하였다. qRT-PCR 결과에서 단일 잔기에 돌연변이가 일어난 균주 중에서는 R92M 돌연변이 균주만이 야생형 대조군의 *mtlA* 발현량과 유의미한 차이를 보였고 (그림 4A), 2개의 돌연변이를 일으킨 균주 중에서는 R92M 돌연변이를 가지고 있는 균주만이 야생형 대조군의 *mtlA* 발현량과 유의미한 차이를 보이며 세 개의 돌연변이를 일으킨 균주는 R92M 돌연변이 균주보다도 *mtlA*의 발현량이 더 높아진 것을 확인할 수 있었다 (그림 4A, B).

이를 통해 Asp83, Arg92, Arg117 세 종류의 잔기 중 Arg92 잔기가 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 가장 중요한 역할을 한다는 것을 예상할 수 있었다. 그리고 Asp83 잔기와 Arg117 잔기는 MtlR이 cognitive DNA-binding protein와 상호작용 하는데 있어서 결정적인 역할을 하지는 않지만 세 개의 잔기에 모두 돌연변이를 일으킨 균주가 R92M 돌연변이 균주보다 *mtlA*의 발현량이 더 높아진 것을 통해 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 보조적인 역할을 할 것이라고 생각할 수 있었다.



**그림 4. MtlR 돌연변이 균주의 만니톨 오피론 발현량 변화**  
MtlR 돌연변이 균주의 만니톨 오피론 발현량 변화를 확인하기 위해 qRT-PCR을 통해 만니톨 오피론의 가장 앞쪽에 존재하는 *mtlA* 유전자의 발현량을 측정하였고, 추가적으로 *mtlR* 유전자의 발현량을 측정하였다. 대조균으로 야생형 MG1655, MG1655  $\Delta mtlR$  균주를 사용하였다. (A) 단일 잔기에 돌연변이를 일으킨 균주, 세 개의 잔기에 모두 돌연변이를 일으킨 균주의 qRT-PCR 결과. (B) 두 개의 잔기에 돌연변이를 일으킨 균주의 qRT-PCR 결과.

## 2. MtlR 아미노산 잔기 돌연변이에 따른 균주의 성장 곡선 차이

Arg92 잔기가 MtlR과 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 결정적인 역할을 한다는 것을 추가적으로 확인해보기 위해 균주의 성장 속도를 측정하는 실험을 진행하였다. 균주는 야생형 균주와 단일 아미노산 잔기에 돌연변이를 가지고 있는 균주에 HPr(H15A) 돌연변이를 발현하는 플라스미드를 형질전환시킨 균주를 사용하였다. HPr(H15A) 돌연변이는 HPr의 인산화에 중요한 His15 잔기가 인산화되지 못하여 탈인산화된 HPr처럼 기능하기 때문에 해당 돌연변이를 발현하는 균주는 만니톨 오페론의 발현을 억제할 수 있는 MtlR의 수가 많아져 만니톨 배지에서 성장 속도가 느려진다는 것을 확인했다 (Choe et al., 2017). 이때 돌연변이 균주 중 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용이 약해진 MtlR을 가지고 있는 균주가 있다면 HPr(H15A)가 결합하더라도 DNA에 제대로 결합할 수 없기 때문에 만니톨 배지에서 키웠을 때 만니톨 오페론이 발현되어 성장 속도가 회복될 것이라고 예측할 수 있다.

형질전환시킨 균주들과 함께 빈 pACYC184 플라스미드를 야생형 MG1655에 형질전환시킨 균주를 대조군으로 사용하였고, 균주들을 0.2% 만니톨을 넣은 M9 최소배지에서 키우면서 성장 속도를 확인하였다. 실험 결과 HPr(H15A)를 발현하는 플라스미드가 들어있는 야생형 균주가 빈 플라스미드가 들어있는 야생형 균주에 비해 저해된 성장 속도를 보이는 상태에서, R92M 돌연변이 균주에 HPr(H15A)를 발현하는 플라스미드를 형질전환시킨 균주만이 야생형 균주에 빈 플라스미드를 넣어준 균주와 비슷한 정도로 성장 속도가 회복된 것을 확인하였다 (그림 5). 이는 앞서 수행한 qRT-PCR 결과와 일치하는 결과로, MtlR의 Arg92 잔기가

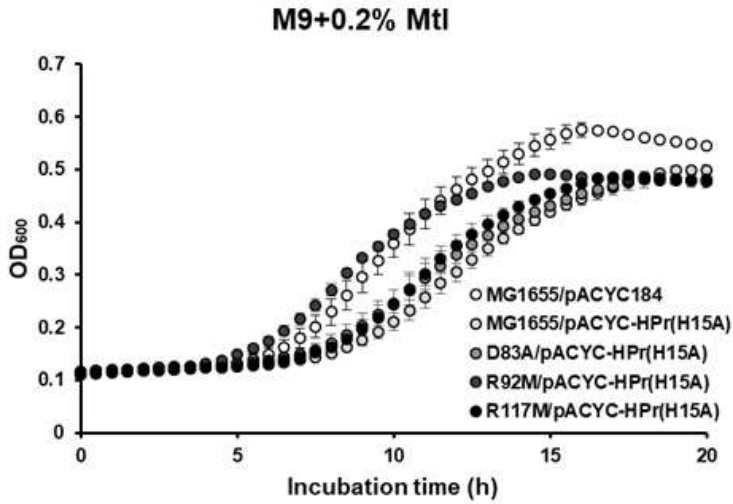


그림 5. HPr(H15A)를 발현하는 MtlR 돌연변이 균주의 성장 곡선 변화

MtlR 돌연변이에 따른 성장 곡선의 변화를 Spark Microplate Reader를 통해 30분마다 OD<sub>600</sub>값을 측정하여 확인하였다. 대조군으로 MG1655/pACYC184 균주와 MG1655/pACYC-HPr(H15A) 균주를 사용하였고, 각 균주당 세 개의 실험군으로 실험을 진행하였다. 실험군마다 triplet으로 OD<sub>600</sub> 값을 측정하여 결과의 평균값으로 분산형 그래프를 그리고 오차를 표시하였다.



cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 결정적인 역할을 한다는 것을 확인하였다.

### 3. MtlR 돌연변이와 HPr의 binding test

앞선 실험의 결과에서 MtlR의 Arg92 잔기가 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요한 역할을 하고 Asp83 잔기와 Arg117 잔기들은 보조적인 역할을 한다는 결과를 얻었는데, 이는 표현형의 변화를 통해 간접적으로 확인한 결과이다. 하지만 이러한 결과는 해당 아미노산 잔기들이 cognitive DNA-binding protein이 아닌 HPr과의 상호작용에 관련되어 돌연변이로 인해 HPr과 상호작용하지 못하게 되더라도 나타날 수 있는 결과이다. 실제로 선행연구를 통해 HPr(K27E) 돌연변이는 MtlR과의 결합에 문제가 생겨 만니톨 오페론의 발현을 제대로 억제하지 못하는 것을 확인했기 때문에 (Choe et al., 2017), 해당 잔기에 일으킨 돌연변이들이 HPr과의 상호작용이 아닌 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 영향을 미친다는 것을 밝히기 위해 MtlR 돌연변이와 HPr의 binding test를 진행하였다.

실험을 위해 His tag이 달린 야생형 MtlR과 MtlR(R92M), MtlR(D83A R92M R117M) 돌연변이 단백질을 과발현시키는 균주를 제작하였고 metal affinity chromatography를 통해 해당 단백질을 각각 정제하여 다시 talon resin에 결합시켰다. 그리고 tag이 없는 HPr을 과발현시키는 균주를 제작하여 키우고 세포를 깨서 cell lysate를 talon resin에 결합해있는 상태의 각 MtlR들에 동량 결합시키고 MtlR을 elution했을 때 HPr이 co-elution 되는지를 확인하였다.

실험 결과 MtlR이 들어있지 않은 대조군에서는 HPr이 나오지 않았지만, 야생형 MtlR과 MtlR(R92M), MtlR(D83A R92M R117M) 돌연변이를 넣어준 실험군에서는 모두 HPr이 같이 나오는 것을 관찰하였다 (그림 6). 이를 통해 D83A, R92M, R117M 돌연변이는 모두 MtlR과 HPr과의 상호작용에는 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인하였고 따라서 각 돌연변이 균주에서 나타난 만니톨 오페론 발현량의 변화는 돌연변이에 의한 MtlR과 cognitive DNA-binding protein의 상호작용 저해에 의한 것임을 알 수 있었다.

#### 4. MtlR(R92M) 돌연변이를 사용한 *in vivo* protein ligand fishing

제작한 돌연변이 균주를 가지고 cognitive DNA-binding protein을 찾기 위한 실험을 진행하였다. MtlR과 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 영향을 미치는 Arg92 잔기에 돌연변이를 가지고 있는 MtlR(R92M) 돌연변이는 야생형 MtlR과 비교했을 때 cognitive DNA-binding protein과의 결합력이 약할 것이다. 따라서 야생형 MtlR과 MtlR(R92M) 돌연변이 각각에 His tag을 달아준 단백질을 과발현시키는 균주를 제작하고, 각 균주를 키운 후 세포를 깨서 cell lysate를 가지고 metal affinity chromatography를 이용한 *in vivo* protein ligand fishing 실험을 진행했을 때 HisMtlR과 함께 co-elution 되는 단백질들을 분석하면 MtlR(R92M) 돌연변이를 사용한 실험군에서 야생형 MtlR을 사용한 대조군에 비해 적게 나오는 단백질이 cognitive DNA-binding protein일 가능성이 높다.

pBR322 플라스미드를 형질전환 시킨 균주를 사용한 대조군에서는 MtlR 밴드가 나타나지 않고, 두 실험군에서는 MtlR 밴드가 나타난

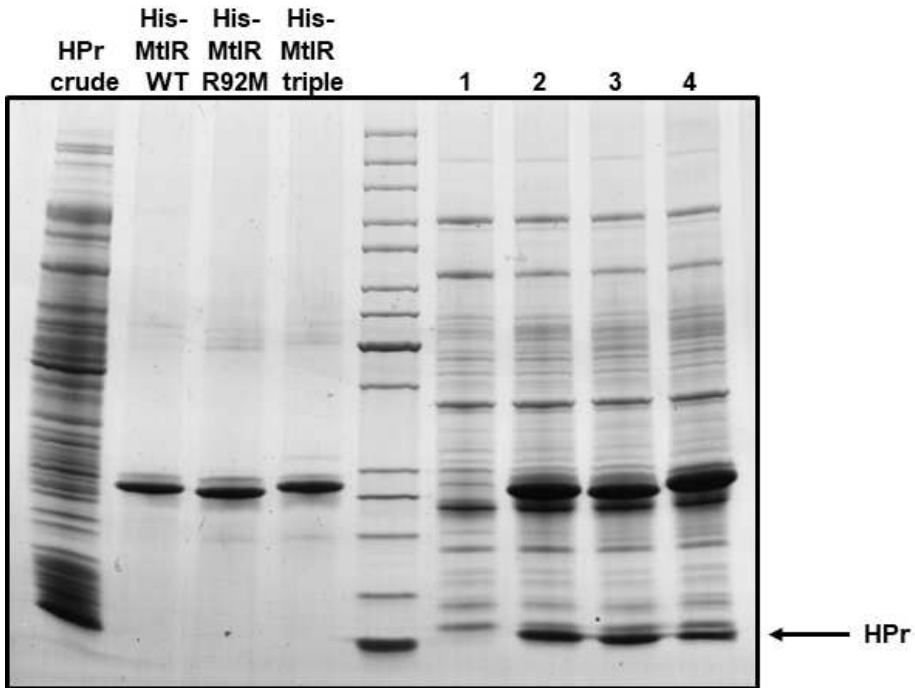


그림 6. MtlR 돌연변이와 HPr의 binding test 결과

Bait으로 사용한 야생형 HisMtlR (HisMtlR WT), HisMtlR(R92M) 돌연변이 (HisMtlR R92M), HisMtlR(D83A R92M R117M) 돌연변이 (HisMtlR triple) 단백질과 HPr crude를 대조군으로 걸어주었고, 1에는 HisMtlR을 넣지 않은 대조군, 2에는 야생형 HisMtlR, 3에는 HisMtlR(R92M), 4에는 HisMtlR(D83A R92M R117M)을 각각 bait으로 넣고 진행한 실험군의 elution product를 각각 걸어주었다.

결 확인했다 (그림 7). 반복실험 결과 여러 단백질이 MtlR(R92M)을 사용한 실험군에서 더 적게 나왔고 각 단백질이 있는 gel 부분을 잘라 단백질을 추출하여 MALDI-TOF 분석을 맡긴 결과 cognitive DNA-binding protein의 가장 유력한 후보로 QseB라는 단백질을 확인하였다. QseB는 QseC와 함께 two component regulatory system을 이루는 단백질로 (Sperandio et al., 2002), DNA binding domain을 가지고 있기 때문에 cognitive DNA-binding protein이 맞는지 확인하기 위한 실험을 추가로 진행하였다.

## 5. MtlR과 QseB의 binding test

QseB가 cognitive DNA-binding protein이 맞는지 확인하기 위해 MtlR과 결합하는지 확인하는 binding test 실험을 진행하였다. MtlR과 QseB는 MtlR과 HPr과 달리 상호작용하는지 알려져 있지 않기 때문에 MtlR을 bait으로 QseB crude를 흘려주는 실험과 QseB를 bait으로 MtlR crude를 흘려주는 실험을 각각 진행하여 상호작용 여부를 교차 확인하였다. 그리고 bait의 양에 차이를 줘서 bait의 양에 따라 co-elution되는 단백질의 양이 달라지는지를 확인하였다.

실험 결과 MtlR을 bait으로 진행한 실험에서는 MtlR의 양과 상관없이 QseB가 co-elution 된걸 확인할 수 있었고 (그림 8), QseB를 bait으로 진행한 실험에서는 MtlR이 나타나지 않은걸 확인할 수 있었다 (그림 9). MtlR을 bait으로 진행한 실험에서 우선 MtlR을 넣지 않은 lane에서도 QseB가 나온 것을 통해 QseB는 자체적으로 talon resin에 붙는다는 것을 알 수 있었고, MtlR과 QseB는 크기 차이가 많이 나지 않지만 SDS-page gel 상에서 같은 lane에 있을 경우 충분히 구분되어 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 QseB를

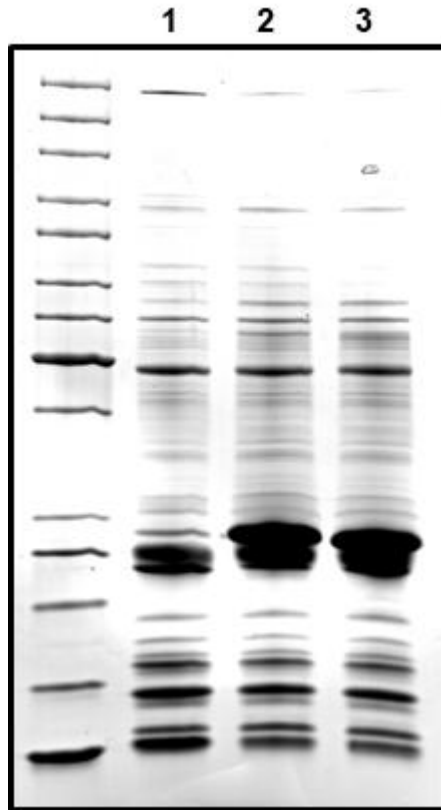


그림 7. Metal affinity chromatography를 이용한 *in vivo* protein ligand fishing 결과

야생형 HisMtlR (HisMtlR WT), HisMtlR(R92M) 돌연변이 (HisMtlR R92M)를 각각 bait으로 metal affinity chromatography를 이용한 *in vivo* protein ligand fishing 실험을 진행하였다. 1에는 pBR322를 형질전환시킨 대조군, 2에는 pBR322-Pcrp HisMtlR을 발현하는 실험군, 3에는 pBR322-Pcrp HisMtlR(R92M)을 발현하는 실험군의 crude를 각각 사용하였다.

bait으로 진행한 실험을 통해서는 MtlR과 QseB가 충분히 구분되어 보임에도 불구하고 MtlR 밴드가 나타나지 않은 것으로 보아 MtlR과 QseB는 결합하지 않는다는 걸 확인하였다.

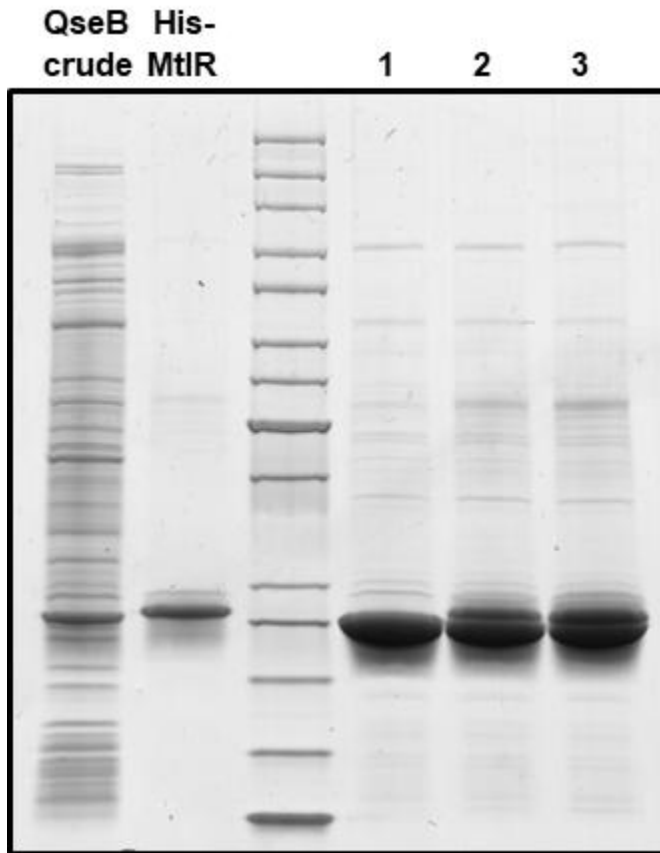


그림 8. HisMtlR bait과 QseB crude를 사용한 binding test 결과

His tag 달린 MtlR과 tag 달리지 않은 QseB의 크기 차이를 확인하기 위해 HisMtlR과 QseB crude를 각각 대조군으로 걸어주었고, 1에는 HisMtlR을 넣지 않은 대조군, 2에는 125 ng의 HisMtlR을 넣은 실험군, 3에는 250 ng의 HisMtlR을 넣은 실험군의 elution product를 각각 걸어주었다.

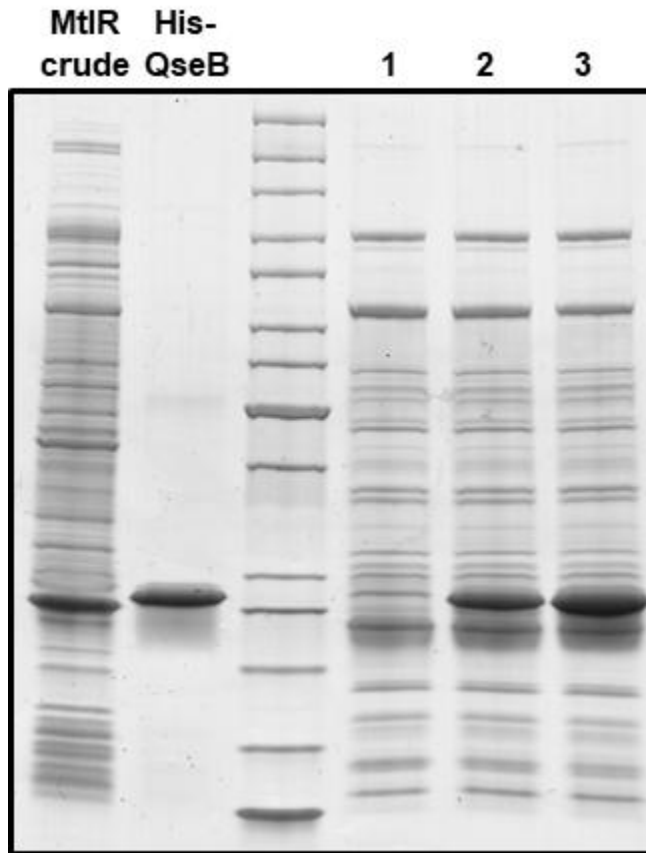


그림 9. HisQseB bait과 MtlR crude를 사용한 binding test 결과

His tag 달린 QseB와 tag 달리지 않은 MtlR의 크기 차이를 확인하기 위해 HisQseB와 MtlR crude를 각각 대조군으로 걸어주었고, 1에는 HisQseB를 넣지 않은 대조군, 2에는 125 ng의 HisQseB를 넣은 실험군, 3에는 250 ng의 HisQseB를 넣은 실험군의 elution product를 각각 걸어주었다.



## IV. 고찰

### 1. 돌연변이를 일으킬 MtlR 아미노산 잔기 선정

본 실험을 통해 MtlR의 아미노산 잔기 중 Arg92가 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다. 우선 MtlR-HPr 복합체의 구조 분석을 통해 복합체가 배 모양을 이루고, 가운데 빈 공간에 cognitive DNA-binding protein이 결합할 것으로 예측했다 (Choe, unpublished). MtlR의 아미노산 잔기 중에서 다른 종의 세균에도 잘 보존되어 있으면서 빈 공간으로 노출되어 있는 잔기들이 cognitive DNA-binding protein과의 상호작용에 중요한 역할을 할 것으로 생각했고, 따라서 Asp83, Arg92, Arg117 세 종류의 잔기를 실험 후보군으로 선택하였다. Asp83 잔기의 경우 다른 종에는 보존되어있지 않지만, 빈 공간에 가장 노출되어 있어 선택하였다. 각 잔기에 돌연변이를 일으킨 후 qRT-PCR을 통한 만니톨 오페론의 발현량 변화 혹은 돌연변이 균주의 생장곡선 변화를 관찰하여 Arg92에 돌연변이가 생긴 균주만이 유의미한 표현형의 변화를 보인다는 것을 확인하였다.

돌연변이를 일으킬 때 상호작용에 영향을 미칠 수 있는 요인으로 크게 두 가지를 생각할 수 있다. 첫 번째는 잔기의 화학적 성질로 아미노산의 잔기는 친수성 잔기와 소수성 잔기로 구분된다. 따라서 다른 성질의 잔기를 가지는 아미노산으로 치환시킨다면 상호작용하던 잔기와 같은 성질이 되어 반발력이 생길 할 것이다. 두 번째로는 잔기의 크기로 잔기의 크기가 작아진다면 상호작용하던 잔기와의 거리가 멀어지기 때문에 상호작용을 더 못하게 될 것이다. 따라서 세 종류의 아미노산 잔기에 돌연변이를 일으킬 때 이러한 요

인을 고려하였다.

우선 Asp83은 alanine으로 치환하였는데, Asp83의 잔기는 MtlR 구조의 바깥쪽으로 돌출되어 있어 돌연변이를 일으키더라도 구조에 영향이 거의 없다고 생각할 수 있다. 따라서 친수성 잔기를 가지는 aspartate를 소수성 잔기를 가지면서 잔기의 크기가 가장 작은 alanine으로 치환시켰다. 반면 Arg92, Arg117은 마찬가지로 친수성 잔기를 가지지만 alanine이 아닌 methionine으로 치환시켰는데, 이는 두 잔기가 Asp83에 비해 MtlR 본체에 더 가까이 존재하기 때문이다. Arg92, Arg117을 마찬가지로 alanine으로 치환시킨다면 화학적 성질이 달라지기 때문에 상호작용하던 cognitive DNA-binding protein의 잔기와의 결합력이 약해지는 효과가 나타나겠지만, MtlR의 구조를 유지하던 MtlR 내부의 다른 잔기와의 상호작용도 약해져서 이로 인해 구조에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 소수성 잔기 중에서도 잔기의 크기가 arginine과 가장 유사하여 MtlR의 구조에 영향을 덜 미칠 것으로 생각되는 methionine으로 치환시켰다.

D83A, R92M, R117M 돌연변이 이외에도 cognitive DNA-binding protein과 더 잘 결합할 가능성이 있다고 생각되는 돌연변이를 만들기 위해 Asp83은 glutamate로, Arg92, Arg117은 각각 lysine으로 돌연변이를 일으킨 D83E, R92K, R117E 돌연변이 균주도 제작하여 마찬가지로 오페론의 발현량과 성장곡선의 변화를 확인하였지만 유의미한 표현형 변화를 관찰하지 못했다.

## 2. *in vivo* protein ligand fishing을 통해 확인한 cognitive DNA-binding protein 후보군

제작된 균주 중 유의미한 결과를 보였던 R92M 돌연변이를 포함

하는 균주를 가지고 cognitive DNA-binding protein을 직접적으로 찾기 위한 실험을 진행하였고, 그 후보균으로 QseB라는 two component regulatory system의 response regulator 역할을 하는 단백질을 찾을 수 있었다. Two component regulatory system은 생물체가 외부의 자극을 인식하고 그에 반응하여 생리 활성을 조절할 수 있도록 해주는 기작으로 (Stock et al., 2000), 특정한 환경 자극을 감지하는 membrane-bound histidine kinase와 신호를 전달받아 유전자의 발현을 조절하는 response regulator로 구성되어 있다 (Mascher et al., 2006). QseB는 histidine kinase인 QseC와 함께 two component regulatory system을 이루고, quorum sensing과 관련된 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Sperandio et al., 2002).

Response regulator는 보통 histidine kinase에 의해 인산기를 전달받아야만 기능을 하기 때문에 QseB가 독자적으로 기능하지는 않을 것으로 생각했지만, 이전에 수행했던 cognitive DNA-binding protein을 찾기 위한 실험에서도 QseB가 후보균으로 나온 적이 있기 때문에 MtlR과 QseB가 결합하는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. Binding test는 일반적으로 두 단백질 중 하나를 정제하고 다른 단백질은 과발현시킨 세포를 깨서 cell lysate를 얻고, 정제된 단백질을 talon resin에 결합시키고 cell lysate를 흘려준 후 elution 하여 cell lysate에 들어있던 단백질이 co-elution 되는지 확인하는 방식으로 진행한다. 이때 MtlR은 21.99 kDa, QseB는 24.68 kDa으로 크기 차이가 거의 나지 않아서 binding test를 하더라도 co-elution 되는지 여부를 확인하지 못할 가능성이 있었다. 하지만 단백질을 SDS-page gel에 걸어줬을 때 단백질이 떠는 전하에 따라 SDS가 붙는 정도에 차이가 생겨 계산한 크기와 다른 위치에 밴드가 나올 수 있고, His tag에 의해서도 크기가 커지기 때문에 구분되어 보일 수 있어 우선 실험을 진행하였다.

실험 결과를 보면, 결과적으로 MtlR과 QseB는 결합하지 않는 것으로 보인다. 크기를 비교하기 위해 binding test한 실험군과 함께 대조군으로 걸어준 bait과 crude에서 각 단백질의 위치를 확인해보면 HisMtlR과 QseB, HisQseB와 MtlR은 모두 구분이 가능하다. 그리고 HisMtlR과 QseB로 진행한 binding test 결과를 보면 실제로 HisMtlR의 밴드와 QseB의 밴드가 구분 가능한 걸 볼 수 있다. 이 결과에서 QseB가 HisMtlR의 양에 관계없이 모든 실험군에서 일정한 양이 elution 된 걸 확인할 수 있는데 이는 QseB가 자체적으로 talon resin에 결합하기 때문으로 보인다. 실제로 QseB의 아미노산 서열을 보면 193, 195, 196번째에 연달아 histidine이 존재하여 따로 His tag을 달아주지 않더라도 talon resin에 결합할 수 있을 것으로 생각된다.

*in vivo* protein ligand fishing을 통하여 확인한 다른 후보군으로는 lipoyl synthase (LipA), universal stress protein G (UspG), UPF0227 protein (YcfP) 등이 있었다. 이 단백질들은 모두 DNA에 결합하는 기능이 없는 단백질이기 때문에 MtlR-HPr 복합체가 DNA에 결합할 수 있도록 도와주는 cognitive DNA-binding protein 일 가능성이 없다고 생각하여 추가적인 실험을 진행하지 않았다.

### 3. Cognitive DNA-binding protein의 존재 여부와 발견의 필요성

MtlR과 HPr 모두 DNA-binding domain을 가지고 있지 않기 때문에 MtlR-HPr 복합체가 만니톨 오페론으로부터 전사된 RNA의 활성을 조절하거나 다른 간접적인 방법을 통해 만니톨 오페론의 발현을 조절하는 등, cognitive DNA-binding protein을 통해 DNA에 직

접적으로 결합하여 전사 단계에서 만니톨 오페론의 발현을 조절하는 것이 아닐 가능성을 생각할 수 있다. 실제로 cognitive DNA-binding protein을 찾기 위한 다양한 실험을 진행하였음에도 불구하고 아직까지 찾지 못하였다.

하지만 이전 실험을 통해 MtlR-HPr 복합체가 cognitive DNA-binding protein를 통해 DNA에 직접적으로 결합하여 전사 단계에서 만니톨 오페론의 발현을 조절할 것이라고 생각할 수 있었다. 세포 내에서 copy number가 많다고 알려진 pET43.1a 플라스미드에 만니톨 오페론의 프로모터 부분을 클로닝하여 야생형 균주에 형질 전환 시킨 돌연변이 균주를 키워서 qRT-PCR을 통해 만니톨 오페론의 발현량을 확인하면 야생형 균주에 비해 발현량이 높아지는 현상을 관찰할 수 있다 (Choe, unpublished). 반면 만니톨 오페론의 5' UTR 부분을 클로닝하여 형질전환 시킨 돌연변이 균주는 야생형 균주와 발현량이 큰 차이 없다. 이 결과를 통해 프로모터 부분을 플라스미드를 통해 넣어준 균주는 MtlR-HPr 복합체가 플라스미드의 프로모터 서열에 sequester되어 염색체 상의 프로모터에 결합하지 못해 만니톨 오페론의 억제가 풀렸다고 생각할 수 있다. 이는 비록 MtlR과 HPr 모두 DNA-binding domain을 가지고 있지 않지만 MtlR-HPr 복합체는 DNA에 직접적으로 결합하여 전사 단계에서 만니톨 오페론의 발현을 조절한다는 것을 의미하고, 이를 통해 cognitive DNA-binding protein이 필요하다는 것을 시사한다.

PTS 당과 비 PTS 당 사이의 CCR 조절에는 EIIA<sup>Glc</sup>가 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 하지만 PTS 당 사이의 CCR 조절에 대해서는 많은 연구가 진행되지 않았었고, 이전 연구를 통해 포도당과 만니톨 사이의 CCR 조절에 HPr이 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다. 탈인산화된 HPr은 Rsd와도 강한 결합을 형성하여 Rsd의 활성을 억제하는데 이때 Rsd와의 결합에 중요한 HPr의 아미노산

잔기는 Arg17, Lys27, Ser46, Leu47, Phe48로 이 잔기들은 MtlR과의 결합에도 중요한 역할을 한다 (Park et al., 2015). 이 잔기들은 HPr의 표면에 집중되어 있기 때문에 다른 단백질과의 상호작용에도 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. 따라서 HPr이 포도당과 만니톨 뿐만 아니라 다른 PTS 당 사이의 CCR도 조절한다면 유사한 기작이 작용할 것으로 예상되고, 이때 현재 찾으려고 하는 cognitive DNA-binding protein이 global repressor 역할을 할 수 있다. 따라서 cognitive DNA-binding protein을 찾고 해당 단백질이 다른 PTS 당 물질대사 관련 유전자의 발현에도 관여하는지 밝히는 것은 PTS 당 사이의 CCR 연구의 시발점이 되는 매우 중요한 연구라고 생각된다.

## V. 참고문헌

Choe, M., Park, Y. H., Lee, C. R., Kim, Y. R., and Seok, Y. J. (2017). The general PTS component HPr determines the preference for glucose over mannitol. *Scientific reports* **7**, 43431.

Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**, 939-1031.

Deutscher, J., Ake, F.M., Derkaoui, M., Zebre, A.C., Cao, T.N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., Joyet, P. (2014). The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **78**, 231-256.

Gorke, B., Stulke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 613-624.

Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman S., Pettigrew, D.W., and Remington, S.J. (1993). Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III<sup>Glc</sup> with glycerol kinase. *Science* **259**, 673-677.

Koo, B.M., Yoon, M.J., Lee, C.R., Nam, T.W., Choe, Y.J., Jaffe, H., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2004). A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIA<sup>Glc</sup> in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**, 31613–31621.

Magasanik, B. (1961). Catabolite repression. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **26**, 249–256.

Mascher, T., Helmann, J. D., Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 910 - 938.

Monod, J. (1942). Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes. *Thesis, Hermann et Cie*, Paris.

Nam, T.W., Cho, S.H., Shin, D., Kim, K.H., Jeong, J.Y., Lee, J.H., Roe, J.H., Peterkofsky, A., Kang, S.O., Ryu, S., Seok, Y.J. (2001). The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *EMBO J* **20**, 491–498.

Park, Y.H., Lee, B.R., Seok, Y.J., and Peterkofsky, A. (2006). *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**, 6448–6454.

Park, Y. H., Lee, C. R., Choe, M., and Seok, Y. J. (2013). HPr antagonizes the anti-sigma70 activity of Rsd in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*



*States of America* **110**, 21142–21147.

Park, Y.H., Um, S.H., Song, S., Seok, Y.J., Ha, N.C. (2015), Structural basis for the sequestration of the anti- $\sigma(70)$  factor Rsd from  $\sigma(70)$  by the histidine-containing phosphocarrier protein HPr. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **71**, 1998–2008.

Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews* **57**, 543–594.

Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. (1996). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. Inneidhardt, F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Washington D.C., pp. 1149–1174.

Seok, Y.J., Sondej, M., Badawi, P., Lewis, M.S., Briggs, M.C., Jaffe, H., and Peterkofsky, A. (1997). High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *J Biol Chem* **272**, 26511–26521.

Sperandio, V., Torres, A.G., Kaper, J.B. (2002). Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol*

43, 809-821.

Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000).  
Two-component signal transduction. *Annual Review of  
Biochemistry* **69**, 183 - 215.

Tan, K., Clancy, S., Borovilos, M., Zhou, M., Horer, S., Moy, S.,  
Volkart, L.L., Sassoon, J., Baumann, U., Joachimiak, A. (2009).  
The mannitol operon repressor MtlR belongs to a new class of  
transcription regulators in bacteria. *J Biol Chem* **284**,  
36670-36679

## Abstract

Carbon catabolite repression (CCR) is the regulatory mechanism of consuming a preferred sugar before a less-preferred sugar when two or more carbon sources exist in the environment, through the inhibition of expression or activity of proteins required for the transport and metabolism of a less-preferred sugar in the presence of a preferred sugar. In most bacteria, the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) transports various sugars and is involved in the preference of PTS sugars over non-PTS sugars. For example, the PTS sugar glucose is preferred to the non-PTS sugar lactose and this CCR is regulated by the phosphorylation state of the glucose specific PTS component EIIA<sup>Glc</sup>.

Our group revealed that CCR is also observed between glucose and mannitol, which are both PTS sugars, and the general PTS component HPr is involved in this mechanism, different from CCR between glucose and lactose. HPr is dephosphorylated differently when transporting glucose and lactose although they are both PTS sugars, so when glucose is present, many dephosphorylated HPr binds to the mannitol operon repressor MtlR, repressing the expression of the mannitol operon.

Since MtlR and HPr both do not have a DNA-binding domain, we thought that a cognitive DNA-binding protein is required for the MtlR-HPr complex to regulate the mannitol operon. First, we solved the crystal structure of the MtlR-HPr complex to gain structural insight. We selected three amino acid residues of MtlR

that were thought to be important in the interaction with the cognitive DNA-binding protein. Mutant strains with a mutation in each of the three residues were used to confirm the expression level of the mannitol operon and the growth of these strains were also measured. From these experiments, the Arg92 residue was seen to play an important role in the interaction. Based on this finding, we then used mutant MtlR to find a cognitive DNA-binding protein and found the candidate QseB.

Keyword: Carbon catabolite repression, MtlR, HPr, cognitive DNA-binding protein