

УДК 577.2.08:681.3

## РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА МЕТИОНИНА/ЦИСТЕИНА В *Corynebacterium glutamicum* И РОДСТВЕННЫХ ОРГАНИЗМАХ

© 2007 г. Г. Ю. Ковалева<sup>1, 2\*</sup>, М. С. Гельфанд<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

<sup>2</sup>Институт проблем передачи информации Российской академии наук, Москва, 127994

Поступила в редакцию 10.05.2006 г.

Принята к печати 14.06.2006 г.

Метионин является одной из незаменимых аминокислот и, кроме того, первой аминокислотой в последовательности большинства белковых молекул; возможности его синтеза в промышленных масштабах уделяется большое внимание, что, в свою очередь, требует детального изучения пути биосинтеза метионина. Ранее при изучении *Corynebacterium glutamicum* был найден транскрипционный регулятор пути биосинтеза метионина/цистеина, продукт гена *mcbR*, и была предложена вероятная оперонная структура регулона McbR. Мы показали, что регуляторы, ортологичные McbR, присутствуют еще в шести геномах бактерий порядка Actinomycetales. Регулон McbR в *C. glutamicum* и регулоны ортологичных регуляторов в родственных геномах были исследованы с помощью методов сравнительной геномики. Показано, что уровень оперонных перестроек высок даже в близкородственных геномах, несмотря на генетическую стабильность геномов коринебактерий. Кроме того, позиционное сравнение оперонов и анализ регуляторных сигналов дали возможность предложить несколько новых потенциальных членов регулона McbR, таких как глутаминамидотрансфераза и метилтиоаденозин-нуклеаза.

**Ключевые слова:** сравнительная геномика, биосинтез метионина, McbR.

REGULATION OF METHIONINE/CYSTEINE BIOSYNTHESIS IN *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* AND RELATED GENOMES, by G. Yu. Kovaleva<sup>1, 2\*</sup>, M. S. Gelfand<sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>Moscow State University, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow, 119992 Russia; <sup>2</sup>Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127994 Russia, \*e-mail: kovaleva@iitp.ru). Methionine is an essential amino acid and the universal N-terminal amino acid of proteins. The biosynthesis of methionine is extensively studied in various organisms that could be used in biotechnological production of methionine. Transcriptional regulation of the methionine synthesis in the *Corynebacterium glutamicum* genome is well studied. The McbR protein is a transcriptional regulator of methionine/cysteine biosynthesis genes. The operon structures for members of the McbR regulon also were predicted. We identified candidate regulatory proteins orthologous to McbR in six additional genomes of the order Actinomycetales. The McbR regulon as well as regulons of the orthologous regulators in related genomes were analyzed using the comparative genomics methods. The obtained data demonstrated multiple and diverse positional rearrangements even in the closest genomes despite early observations of the high level of genome stability in corynebacteria. Moreover, the comparison of the operon structures combined with the regulatory signal analysis allowed us to predict some new potential members of the McbR regulons, such as glutamine amidotransferase and methylthioadenosine nuclease.

**Key words:** comparative genomics, methionine biosynthesis, McbR.

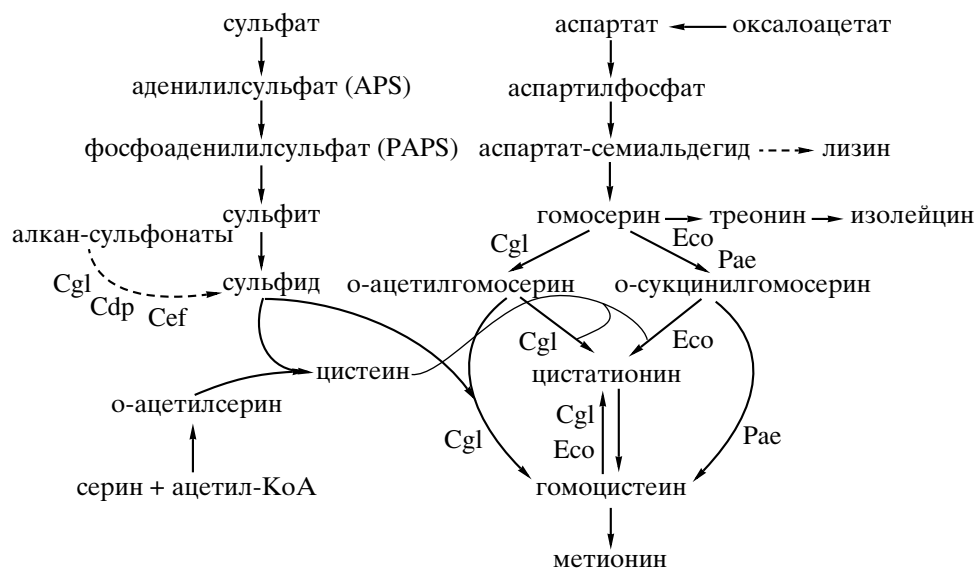
Вид *Corynebacterium glutamicum* представлен свободноживущими почвенными бактериями, которые используются в промышленном производстве аминокислот, в основном, лизина, аргинина, треонина, изолейцина, валина, серина, триптофана, фенилаланина и гистидина [1], но не метионина, – несмотря на общность путей биосинтеза лизина, треонина и метионина. В последние годы

биосинтез метионина в *C. glutamicum* детально изучали с целью использования этой бактерии как промышленного продуцента метионина.

Структурные гены пути синтеза метионина можно разделить на две группы – гены пути включения серы в углеродный скелет и гены пути биосинтеза непосредственно метионина (рис. 1). Ассимиляция серы происходит, в основном, за счет восстановления сульфата до сульфида. Сера сульфида включается в путь биосинтеза метионина либо в составе цистеина, либо в составе циста-

Принятые сокращения: МТА – метилтиоаденозин.

\*Эл. почта: kovaleva@iitp.ru



**Рис. 1.** Схема биосинтеза метионина. Отмечены используемые различными микроорганизмами (альтернативные) пути прямого сульфгидрирования и *транс*-сульфурирования. Подробности в тексте. Сокращения названий геномов: Cgl – *C. glutamicum*; Cdp – *C. diphtheriae*; Cef – *C. efficiens*; Eco – *E. coli*; Pae – *P. aeruginosa*.

тионина, в зависимости от микроорганизма [2]. Гены ферментов восстановления сульфата образуют в геноме *C. glutamicum* единый оперон (рис. 2а). Помимо сульфата, в качестве источника серы для почвенных бактерий могут выступать и другие соединения, такие как сульфатные эфиры и сульфонаты, утилизация которых требует наличия соответствующих ферментов. Они также организованы в единые опероны.

Для генов белков, участвующих непосредственно в синтезе метионина, объединение в крупные опероны не характерно. Биосинтез метионина начинается от аспартата, проходит стадию образования гомосерина, который, в свою очередь, преобразуется либо в ацетилгомосерин (в *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* и *C. glutamicum*), либо в суццинилгомосерин (в *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*). Затем образуется гомоцистеин, или по прямому пути сульфгидрирования (в *C. glutamicum*, *P. aeruginosa* и *S. cerevisiae*) или по пути *транс*-сульфурирования с образованием промежуточного продукта – цистатионина (в *E. coli*, *N. crassa* и *C. glutamicum*) [2, 3]. Таким образом, в отличие от большинства микроорганизмов, которые используют один из путей синтеза гомоцистеина, в *C. glutamicum* используются оба полностью функциональные пути [3] (рис. 1).

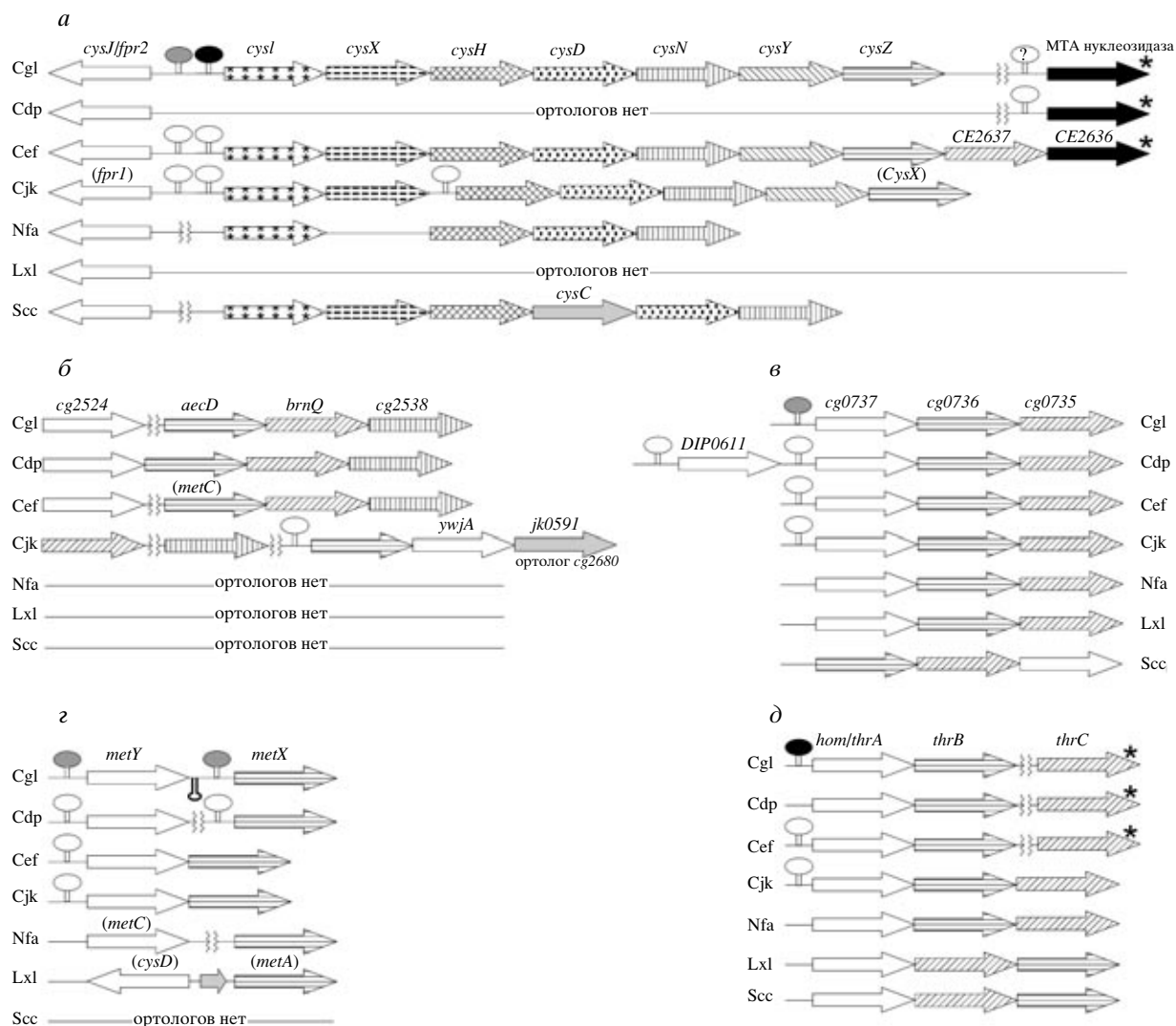
Гены, участвующие в биосинтезе метионина в геноме *C. glutamicum*, находятся под контролем, как минимум, двух регуляторов, механизм взаимодействия между которыми пока не ясен. Одним из них является непрямой регулятор, кодируемый геном *cg3031*. Соответствующий белок Cg3031p подавляет биосинтез метионина, но при этом не

связывается с ДНК [4]. Кроме этого, недавно описан [5, 6] транскрипционный регулятор генов пути биосинтеза метионина, McbR. Это димерный репрессор, принадлежащий к TetR-семейству белков, связывающихся с палиндромной последовательностью TAGAC-N6-GTCTA [6] в регуляторных областях генов метаболического пути. Большая часть сайтов связывания этого регулятора в геноме *C. glutamicum* предсказана на основании выравнивания регуляторных областей генов-мишеней, и предсказание экспериментально подтверждено в случае пяти регулируемых генов, таких как *hom*, *cysI*, *cysK*, *metK* и *mcbR* [6]. В упомянутой работе [6] предсказана оперонная организация генов, кодирующих ферменты биосинтеза метионина (рис. 2, *C. glutamicum*) и указаны потенциальные сайты связывания транскрипционного репрессора, расположенные перед большей частью оперонов в геноме *C. glutamicum* (рис. 2).

Несмотря на то, что биосинтез метионина детально исследован в большинстве таксономических групп бактерий, в бактериях класса актиномицетов этот метаболический путь изучен недостаточно. В данной работе мы исследовали регулон McbR во всех геномах, где присутствует данный регулятор, – это семь геномов порядка Actinomycetales.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Определение членов регулона.** Для поиска потенциальных сайтов связывания McbR использовали метод матриц позиционных весов нуклеотидов [7]. Процедура построения такой матрицы



**Рис. 2.** Структура пяти оперонов (а–д) регулона McbR, претерпевших наибольшие эволюционные перестройки. Даны тривиальные названия генов для *C. glutamicum*; для ортологов, имеющих в ГенБанке [20] другие названия, названия генов приведены в скобках над соответствующим геном. Ортологичные гены одинаково окрашены. Сокращения названий генов: Cgl – *C. glutamicum*; Cdp – *C. diphtheriae*; Cef – *C. efficiens*; Cjk – *C. jeikeium*; Nfa – *N. farcinica*; Lxl – *L. xyli*, Scc – *S. coelicolor*. Условные обозначения: – терминаторная шпилька, предсказана в работе [6]; – сайт связывания McbR, экспериментально подтвержден в работе [6]; – сайт связывания McbR, предсказан в работе [6]; – сайт связывания McbR, предсказан в данной работе; – сайт связывания McbR с весом ниже порогового значения; – гены разнесены по геному; – неортологичное замещение.

для поиска сайтов связывания McbR подробно описана в разделе “Результаты исследования”.

Для определения принадлежности гена к регулону применяли метод проверки соответствия. Согласно данному методу, ген считается членом регулона, если в его регуляторной области обнаружен потенциальный сайт, который сохраняется перед ортологичными генами в родственных геномах [7].

В данной работе потенциальные сайты искали в области от –300 до +50 п.н. относительно старта трансляции гена. В случае, если оперонная структура данного фрагмента последовательности не-

известна, гены рассматривались как принадлежащие к одному оперону, если они имели одинаковое направление считывания, а расстояние между ними не превышает 100 п.н.

**Программное обеспечение.** Для поиска потенциальных сайтов связывания регулятора McbR, а также анализа ортологов использовали пакет программ GenomeExplorer [8]. Для построения матриц позиционных весов использовали программу SignalX [8]. Поиск гомологов в базах данных проводили с помощью программы BLAST [9]. Для построения множественных выравниваний аминокислотных и нуклеотидных последователь-

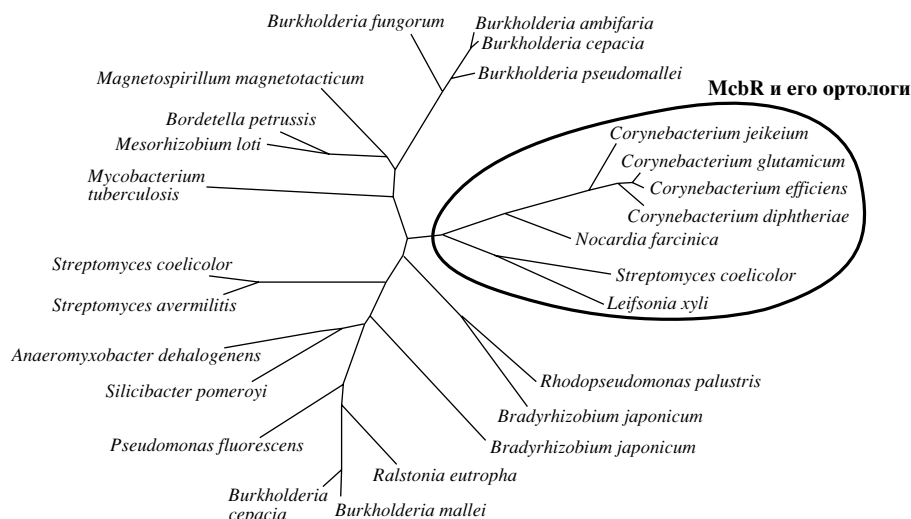


Рис. 3. Эволюционное дерево McbR. Выделена ветвь, на которой находится McbR *C. glutamicum* и его ортологи.

ностей использовали программу ClustalX [10]. Эволюционные деревья строили по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) [11] с помощью программы proml из программного пакета PHYLIP 3.63 (<http://evolution.genetics.washington.edu/>).

**Исследованные геномы.** В общей сложности рассмотрены геномы семи видов актинобактерий. Полные последовательности геномов *C. glutamicum* ATCC 13032 [12], *C. diphtheriae* NCTC 13129 [13], *C. efficiens* YS-314 [14], *C. jeikeium* K411 [15], *Nocardia farcinica* IFM 10152 [16], *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* str. СТСВ07 [17] и *Streptomyces coelicolor* A3(2) [18, 19] взяты из ГенБанка [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эволюционное дерево регулятора McbR (рис. 3) свидетельствует, что данный регулятор сохраняется в геномах рода *Corynebacterium* (*C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens* и *C. jeikeium*), а также в других геномах порядка Actinomycetales, таких как *Nocardia farcinica*, *Leifsonia xyli* и *Streptomyces coelicolor*. На следующих этапах работы исследовали только эти геномы.

### Позиционное сравнение

Гены метаболического пути и их организация в опероны у *C. glutamicum* уже известны [6]. Мы предприняли поиск ортологов белков пути биосинтеза метионина в остальных геномах и предсказали их организацию в опероны (рис. 2). Анализ предсказанных оперонных структур позволяет выделить несколько типов эволюционных событий.

1. Неортологичные замещения. Бактерии *C. jeikeium*, *N. farcinica*, *L. xyli* и *S. coelicolor* ис-

пользуют треонинсинтетазу (ген *thrC*), характерную для большинства актиномицетов. Ген треонинсинтетазы входит в состав оперона с генами гомосериндегидрогеназы (*hom*, или *thrA*) и гомосеринкиназы (*thrB*). Последовательность генов в опероне может изменяться, и в геноме *C. jeikeium* и *N. farcinica* гены оперона расположены в порядке *hom-thrB-thrC*, а в геноме *L. xyli* и *S. coelicolor* – *hom-thrC-thrB* (рис. 2д).

В то же время, в бактериях *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* и *C. efficiens* функции треонинсинтетазы выполняет белок, не ортологичный продукту гена *thrC* актиномицетов. Его картирование и функциональность были проверены экспериментально [21], хотя происхождение этого белка не очевидно. Характерно, что ген этой треонинсинтетазы уже не входит в состав оперона и, таким образом, имеется два независимых оперона – *hom-thrB* и нерегулируемый моноцистронный оперон *thrC*, расположенные в разных частях генома [21] (рис. 2д).

Для почвенных бактерий одними из основных источников серы являются сульфатные эфиры и сульфонаты. Сульфатные эфиры утилизируются при посредстве сульфатаз, которые присутствуют практически в каждом микроорганизме [22]. Тем не менее, в геноме *C. glutamicum* для этой цели имеется отдельный оперон, *seuABC*, кодирующий три потенциальных фермента десульфуризации [6], в состав которого входит также *ssuD2* (см. ниже). Для утилизации же сульфонатов обязательно необходимы специфические ферменты. Во всех описанных случаях гены утилизации сульфонатов формируют один оперон, включающий в себя гены ABC-транспортера и NAD(P)H-зависимой монооксигеназы [23]. В геноме *C. glutamicum* этот оперон, *ssuABC-D1* (*ssu* – sulfonate-sulfur utilization), уже описан [24]. Интересно, что

во всех исследованных нами геномах оба оперона практически полностью утрачены (см. ниже), однако в геноме *C. efficiens* в опероне утилизации сульфата (*cysIXHHDNYZ*, рис. 2а) появляется новый потенциальный член – ген белка SE2637, ближайшими ортологами которого являются члены белкового семейства люцифераз из геномов протеобактерий. Сравнение с консервативными белковыми доменами, извлеченными из ГенБанка [20], позволяет более точно предсказать функцию белка SE2637: это алкансульфонат-монооксигеназа, которая, по всей видимости, появилась в геноме *C. efficiens* вследствие неортологичного замещения. В опероне утилизации сульфата нет гена АВС-транспортера, однако субстрат для алкансульфонат-монооксигеназы, возможно, поставляется одним из двух АВС-транспортеров (гены *cg0735-cg0737* и *cg2675-cg2678* в геноме *C. glutamicum*) с неизвестной специфичностью. Оба транспортера и регуляторные сигналы перед кодирующими их оперонами (см. ниже) сохраняются в геноме *C. efficiens* (рис. 2а).

2. Оперонные перестройки. Выше уже упоминалось, что в опероне *thrABC* происходит перестановка генов. Аналогичные случаи характерны и для других оперонов. Так, гены гомосерин-ацетилтрансферазы (*metX*) и ацетилгомосеринлиазы (*metY*) в разных геномах по-разному расположены относительно друг друга (рис. 2г). В геноме *C. glutamicum* они находятся рядом, транскрибируются в одном направлении, расстояние между генами относительно невелико – 144 п.н., и, тем не менее, гены разделены потенциальным терминатором [6]. В геномах *C. diphtheriae* и *N. farcinica* эти гены также транскрибируются в одном направлении, однако еще более разнесены по геному. Для геномов *C. efficiens* и *C. jeikeium* характерно формирование единого оперона *metXY*. Кроме того, известны случаи и дивергентного расположения этих генов, когда *metY* (здесь *cysD*) расположен конвергентно с геном потенциальной дегидрогеназы, а дивергентно к ним расположен ген *metX* (здесь *metA*). Такая ситуация наблюдается в геноме *L. xyli* (рис. 2г).

Внутриоперонные перестановки генов характерны и для оперона *cg0735-cg0737*, кодирующего АВС-переносчик неизвестного субстрата (рис. 2в). В геномах рода *Corynebacterium* (кроме *C. diphtheriae*) так же, как и в геномах *N. farcinica* и *L. xyli*, структура оперона сохраняется, тогда как в геноме *S. coelicolor* порядок изменен на *cg0737-cg0735-cg0736*. В геноме *C. diphtheriae* оперон удлинен за счет появления гена паралога белка *cg0737p* перед опероном. Возможно, удлинение оперона наблюдается и в случае гена регулятора McbR (см. ниже).

В уже упоминавшемся выше опероне утилизации сульфата в геноме *S. coelicolor* в центре оперо-

на *cysIXHCDN* возникает новый член, *cysC*, потенциально кодирующий аденилилсульфаткиназу (рис. 2а). Происхождение этого белка неизвестно, поскольку его ортологи присутствуют только в геномах рода *Streptomyces*. В гомологичном опероне *cysIXHHDNYZ* генома *C. efficiens*, помимо алкансульфонат-монооксигеназы (см. выше), появляется еще один новый потенциальный член регулона (рис. 2а), кодирующий метилтиоаденозин-нуклеозидазу (см. ниже). Ортологи этого белка обнаруживаются также в *C. glutamicum* и *C. diphtheriae*, где их гены образуют моноцистронные опероны.

Оперон *cg2679 C. glutamicum*, расположенный дивергентно к оперону *cg2674-cg2678* [6], может включать в себя и ген *cg2680* (кодирующий аминотрансферазу), поскольку межгенное расстояние составляет всего 52 п.н. и потенциального *Rho*-независимого терминатора между этими генами не было предсказано [6]. Дивергон *cg2574-cg2680* консервативен только в геноме *C. efficiens* и полностью утрачен во всех остальных геномах. Только для гена *cg2680* имеется ортолог в геноме *C. jeikeium*, где он входит в состав другого регулируемого оперона (рис. 2б), также включающего в себя ген *aecD* (цистатионин-β-лиазы) и *uwjA* (ген АТР-азы АВС-транспортера). В геномах *C. glutamicum* и *C. efficiens* ортологи гена *uwjA* образуют моноцистронные нерегулируемые опероны, а ортологи гена *aecD* входят в состав нерегулируемого оперона, также включающего в себя ген *brnQ* (переносчик аминокислот с разветвленной цепью) и алканалмонооксигеназу, кодируемую геном *cg2538* (рис. 2б). В геноме *C. diphtheriae* ортолог гена *uwjA* входит в состав нерегулируемого оперона *aecD-brnQ-DIP1738* (*DIP1738* кодирует алканалмонооксигеназу). В геноме *C. jeikeium* ортологичные гены алканалмонооксигеназы и транспортера аминокислот с разветвленной цепью образуют нерегулируемые моноцистронные опероны (рис. 2б).

3. Паралоги и дубликации. Выше описана ситуация, когда в геноме *C. diphtheriae* появляется паралог гена *cg0737* в опероне, ортологичном оперону *cg0735-cg0737 C. glutamicum* (рис. 2в). Кроме того, в геноме *C. glutamicum* произошла дубликация гена *ssuD N. farcinica*, кодирующего алкансульфонат-монооксигеназу, с образованием паралогов *ssuD1* и *ssuD2*, выполняющих, вероятно, ту же функцию. Ген *ssuD1* входит в состав оперона *ssuABC-D1*, отвечающего за утилизацию сульфатов. Ген *ssuD2* включен в оперон утилизации сульфатных эфиров *seuABC-ssuD1*. Оба оперона полностью утрачены во всех исследованных геномах, кроме *N. farcinica*, где, помимо белка гена *ssuD*, сохраняется и ортолог гена *seuA*, кодирующего фермент десульфуризации. Оба гена формируют оперон, в состав которого также, вероятно, входит ген *fadE14*, кодирующий потенциальный ацил-СоА-дегидрогеназу.

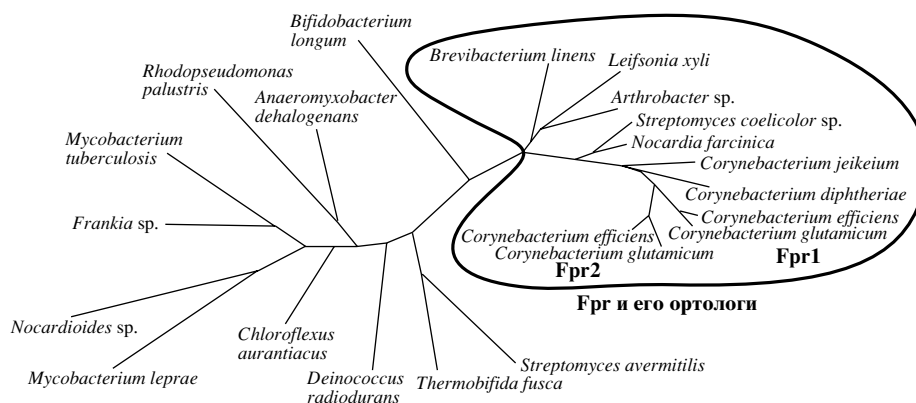


Рис. 4. Эволюционное дерево белка Fpr. Выделена ветвь, на которой находятся Fpr *C. jeikeium* и его ортологи.

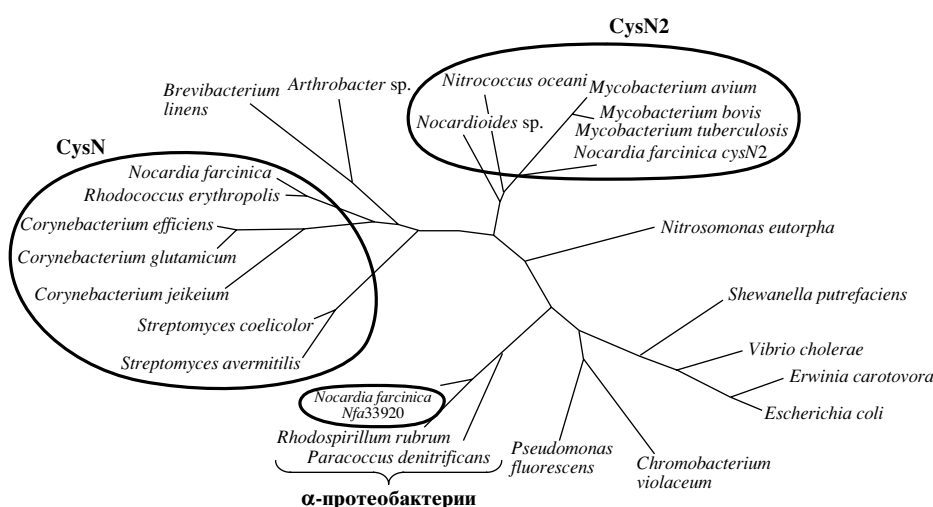


Рис. 5. Эволюционное дерево белка CysN. Выделены ветвь ортологов белков CysN и CysN2, белок Nfa33920 и его ближайшие гомологи из группы α-протеобактерий.

Дивергентно к оперону утилизации сульфата (*cysIXHDNYZ*) расположен ген *cysJ/fpr2* (сульфат-редуктазы), консервативный для всех исследованных геномов, несмотря на то, что основной оперон может быть полностью утрачен (рис. 2а). Необходимо отметить, что на эволюционном дереве (рис. 4) все ортологичные гены расположены на одной ветви, за исключением гена *fpr* белка *L. xyli*, который расположен ближе к гомологам из геномов *Arthrobacter* и *Brevibacterium*. В каждом из исследованных геномов ген белка Fpr представлен в виде одной копии, тогда как в геномах *C. efficiens* и *C. glutamicum* – в виде двух паралогов, *fpr1* и *fpr2* (рис. 4). В каждом из двух геномов один из паралогов входит в состав дивергона утилизации сульфата, второй формирует моноцистронный регулируемый оперон.

Для того же оперона утилизации сульфата (*cysIHDNY*) в разных частях генома *N. farcinica* имеются две дополнительные пары генов, ортоло-

гичных генам *cysDN*, кодирующим АТФ-сульфурилазу, а именно, гены *cysD2-N2* и *nfa33930-nfa33920*. На эволюционных деревьях белков CysN (рис. 5) и CysD (рис. 6) видно, что ближайшими гомологами генов белков CysD2 и CysN2 у *N. farcinica* являются белки бактерий рода *Mycobacterium*; и, по всей видимости, пара генов *cysD2-N2* в геноме *N. farcinica* появилась вследствие горизонтального переноса от других бактерий порядка Actinomycetales (вероятнее всего, от бактерий рода *Mycobacterium*). Аналогично, для белков, кодируемых генами *nfa33930-nfa33920*, ближайшими гомологами являются белки протеобактерий (рис. 5 и 6), и, скорее всего, пара генов *nfa33930-nfa33920* в геноме *N. farcinica* также появилась в результате горизонтального переноса, но, в данном случае, от геномов протеобактерий. В обоих случаях (*cysD2-N2* и *nfa33930-nfa33920*) гены, по-видимому, формируют опероны (о регуляции см. ниже). Функциональное значение существования трех копий

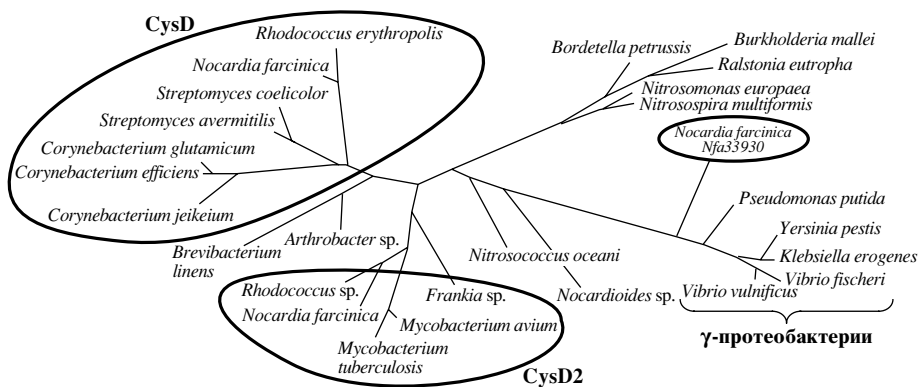


Рис. 6. Эволюционное дерево CysD. Выделены ветвь ортологов белков CysD и CysD2, белок Nfa33930 и его ближайшие гомологи из группы  $\gamma$ -протеобактерий.

АТР-сульфуриказы в геноме патогенной бактерии не ясно.

4. Утрата ортологов. Показано полное отсутствие ортологов для следующих генов *C. glutamicum*: *ssuR* (регулятор генов утилизации сульфатов и сульфатных эфиров [25]), *cg3372* (белок с неизвестной функцией), *ssuI* (флавинредуктаза), *seuBC* и *ssuABC* (см. выше). Многие ортологи утрачены только в филогенетически более далеких геномах. Так, в геномах *N. farcinica*, *L. xyli* и *S. coelicolor* отсутствуют ортологи генов *cysK* (ацетилсеринлиаза), *cysE* (серинацетилтрансфераза), *aecD* (см. выше) и *brnQ* (см. выше) *C. glutamicum* и ортологи гена *uwjA* *C. jeikeium*. В далеких геномах также отсутствует ортолог гена *cg1739* (см. ниже). Некоторые ортологи утрачены не только в более далеких геномах, но также в геномах *C. diphtheriae* и *C. jeikeium*, – это почти все гены оперона, ортоголичного оперону *cg2674-2680* *C. glutamicum* (см. выше), и ортологи гена *cg3132* с неизвестной функцией. В геномах всех далеких организмов и в *C. jeikeium* отсутствуют ортологи гена потенциального транскрипционного регулятора *cg0156*.

Среди более частных случаев можно упомянуть утрату ортологов генов *seuA* и *ssuD* (см. выше) во всех изученных геномах, кроме *N. farcinica*. Также не найдены ортологи генов *metX* и *metY* в геноме *S. coelicolor*, гена *metB* (цистатинин- $\gamma$ -синтаза) в геноме *C. diphtheriae*, гена *methH* (гомоцистеин-метилтрансфераза) в геномах *C. jeikeium* и *L. xyli*, генов *efrAB* (флавопротеин) в геноме *L. xyli*.

Ортологи гена *metE* (гомоцистеин-метилтрансфераза) и оперон утилизации сульфата *cysIXHDNYZ* (рис. 2a) полностью утрачены в геномах *C. diphtheriae* и *L. xyli*. В состав оперона *cysIXHDNYZ* *C. glutamicum* входит ген короткого белка *cysX* (потенциально участвует в переносе электронов [26]), ортологи которого сохраняются в геномах *C. efficiens*, *C. jeikeium* и *S. coelicolor* (рис. 3a). Из геномов, сохранивших оперон утилизации сульфата, в геноме *S. coelicolor* отсутствуют ортологи

генов *cysYZ* (*cysY* принимает участие в биосинтезе кофактора, *cysZ* – потенциальная сульфатпермеаза [26]), а в геноме *N. farcinica* отсутствуют ортологи генов *cysX* и *cysZ*.

5. Полная консервативность структуры оперона во всех изученных геномах наблюдается только в случае гена *metK* (аденозилметионинсинтаза), и, возможно, гена *mcbR* (см. ниже).

#### Исследование регуляторных сигналов

Ранее были предсказаны регуляторные мотивы перед практически всеми членами регулона McbR в *C. glutamicum*, и некоторые из них подтверждены экспериментально [6]. Эти же авторы определили консенсус палиндромного сайта связывания регулятора вида TAGAC-N6-GTCTA. Используя поиск по консенсусу, мы подтвердили предсказание регуляторных сигналов перед ферментами, участвующими в биосинтезе метионина, и на основании предсказанных и подтвержденных экспериментально сигналов составили обучающую выборку и построили матрицу для поиска сайтов связывания McbR.

#### Исследование регуляторных сигналов в геномах рода *Corynebacterium*

В геномах рода *Corynebacterium* проводили поиск сайтов с весом выше порогового значения 4.1. Все найденные потенциальные сайты связывания McbR представлены в таблице.

В геноме *C. glutamicum*, помимо уже предсказанных [6] сигналов, обнаружен новый потенциальный сайт связывания McbR – перед геном *cg1739*, кодирующим белок с консервативным доменом глутамин-амидотрансферазы. Ортологи данного белка представлены во всех геномах рода *Corynebacterium* и отсутствуют в более филогенетически далеких организмах. Перед всеми ортологами этого белка имеется сайт связывания с весом выше заданного

Потенциальные сайты связывания McbR перед генами пути биосинтеза метионина *C. glutamicum* и их ортологами в родственных геномах

Ген	Сайт связывания	Геном	Ген	Сайт связывания	Геном	
<i>hom</i>	T g a A C A G c T t g G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	<i>cysI-CysJ</i>	T A G A C c G A T C T G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	
	T g a A C A G c T t g G T C T A	<i>C. efficiens</i>		c A G A C c a A g C g G T C T A		
	T g G A C A G c T t T G T C T A	<i>C. jeikeium</i>		c A G A C c a A g C g G T C T A	<i>C. efficiens</i>	
<i>metY</i>	T A G A C c a A g C T G T t c A	<i>C. glutamicum</i>	<i>cysH</i>	T A G A C A a t T C T G T C T g		
	T A G A C c G A T C g G T t T c	<i>C. diphtheriae</i>		T A G A C A a c T C T G T C T A	<i>C. jeikeium</i>	
	T A G A C c G A g C g G T t c A	<i>C. efficiens</i>		T A G A C t G A T C T G T C T g		
<i>metX</i>	T A G A C A G A g C g G T t T A	<i>C. jeikeium</i>	<i>CE2636</i>	T g G A C A G A T t g G T C T A	<i>C. jeikeium</i>	
	T A G A C A G A g C T G T C c A	<i>C. glutamicum</i>		T A G A C t a A a t T G T C T A	<i>C. diphtheriae</i>	
	T A G A C A G A g C T G T C c A	<i>C. diphtheriae</i>		T A G A C t G A a t T G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	
<i>metB</i>	T g G A C A G c T t g G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	<i>ssuI</i>	T A G A C A a A g a T G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	
	T g G A C A G c T t g G T C T A	<i>C. efficiens</i>		T A G A C A t c T C g G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	
	T A G A C t G c T t g G T C T A	<i>C. jeikeium</i>		T A G A C c a A g C T G T a c A	<i>C. glutamicum</i>	
<i>metE</i>	c A G A C c G A g C a G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	<i>cg0737</i>	T A G A C c G A g C T G T a c A	<i>C. diphtheriae</i>	
	c A G A C c a t g C T G T C T g	<i>C. efficiens</i>		T A G A C c G A g C T G T a c A	<i>C. efficiens</i>	
	c A G A C t a A g C T G T C T A	<i>C. jeikeium</i>		T A G A C t a A g t T G T t c A	<i>C. jeikeium</i>	
<i>metH</i>	c g t A C t a A g C T G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	<i>DIP0611</i>	T A G A C A a A g C T G T a c A	<i>C. diphtheriae</i>	
	c A t A C t a A g C T G T C T A	<i>C. diphtheriae</i>		<i>cg2678-79</i>	T A t A C c G A T C a G T C T A	<i>C. glutamicum</i>
	c g t A C t a A g C T G T C T A	<i>C. efficiens</i>			T A G A C A G A T t g G T C T A	<i>C. efficiens</i>
<i>metK</i>	T A G A C A G c T t g G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	<i>mcbR</i>	c g a A C c G g T t T G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	
	T A G A C A G c T t g G T C T A	<i>C. diphtheriae</i>		T A G A C t G A T C T G T t c A	<i>C. diphtheriae</i>	
	T A G A C A G c T t g G T C T A	<i>C. efficiens</i>		c g a A C c G g T t T G T C T A	<i>C. efficiens</i>	
	c A G A C A G c T t g G T C T A	<i>C. jeikeium</i>		T A G A C c G g T C T G T C T A	<i>N. farcinica</i>	
<i>Cg3372</i>	T A G A C A G c a t g G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	<i>cg3132</i>	T A G A C t a t g C a G T C T A	<i>C. glutamicum</i>	
<i>etfB</i>	T A G A C t G g T t T G T C T g	<i>C. glutamicum</i>		T A G A C A a t T C T G T C T g	<i>C. efficiens</i>	
<i>Cg0156</i>	T A G A C t G t T C T G T C T A	<i>C. efficiens</i>	<i>cg1739</i>	T A G A C t a A g C g G T a T g	<i>C. glutamicum</i>	
	T A G A C A G c g t T G T C T A	<i>C. glutamicum</i>		T A G A C A a A g t a G T C T A	<i>C. diphtheriae</i>	
	T A G A C A a g c t g G T C T A	<i>C. glutamicum</i>		T A G A C t a A g C g G T a T g	<i>C. efficiens</i>	
<i>aecD</i>	T A G A C A G c T C T G T C T A	<i>C. jeikeium</i>		T A G A C c a A g C g G T C T g	<i>C. jeikeium</i>	

Примечание. Наименования генов и ортологов соответствуют названиям генов в геноме *C. glutamicum*, за исключением *DIP0611 C. diphtheriae*, у которого отсутствует ортолог в геноме *C. glutamicum*, и ортолога гена *CE2636 C. efficiens* в *C. diphtheriae*.

порогового значения (таблица). Таким образом, согласно методу процедуры проверки соответствия, ген *cg1739* является новым потенциальным членом регулона McbR. Косвенным экспериментальным подтверждением этого предсказания является то, что в делеционном *mcbR*-мутанте *C. glutamicum* происходит активация экспрессии этого гена [6].

Анализируя другие геномы рода *Corynebacterium*, мы также смогли предсказать появление перед основной частью регулируемых ортологов генов *C. glutamicum* потенциальных сайтов связывания регулятора McbR (таблица). Так, сигнал сохраняется перед всеми найденными в этих гено-

мах ортологами генов *metK*, *metH*, *metE*, *metB*, *cysK* и *cg3132* и перед генами дивергона *cg2674-cg2680*.

Однако иногда, даже в близких геномах рода *Corynebacterium*, регуляторные сигналы отсутствуют перед ортологичными генами. Так, оперон *hom-thrB*, регулируемый в *C. glutamicum*, имеет потенциальные сигналы перед гомологичными оперонами только в геномах *C. efficiens* и *C. jeikeium*, но не в *C. diphtheriae* (рис. 2d). В случае гена *cg0156* ситуация обратная: ортолог данного гена в геноме *C. diphtheriae* сохраняет сайт связывания регулятора, тогда как ортолог в *C. efficiens* – нет (таблица). В случае оперона *etfAB* регуляция сохраняется только перед ортологичным опероном в геноме *C. efficiens*.



К более частным случаям относится регуляция генов гомосерин-ацетилтрансферазы (*metX*) и ацетилгомосеринлиазы (*metY*). Эти гены в геноме *C. glutamicum* расположены тандемно, но разделены потенциальным Rho-независимым терминатором [6], и перед каждым из этих генов находится сайт связывания McbR. В геноме *C. diphtheriae* эти гены формируют моноцистронные опероны, разделенные по геному, перед каждым из генов сохраняется регуляторный сигнал (таблица). В геномах *C. efficiens* и *C. jeikeium* имеется уже единый регулируемый бицистронный оперон *metYX*, а сайт связывания McbR находится перед первым геном оперона, *metY* (рис. 2г).

В геноме *C. diphtheriae* перед опероном *DIP0608-DIP0610*, гомологичным оперону *cg0735-cg0737* *C. glutamicum*, появляется паралог гена *DIP0610* – ген *DIP0611*, который образует независимый моноцистронный оперон. Сайты связывания регулятора расположены перед всеми ортологами гена *cg0737* в геномах рода *Corynebacterium*, а также перед геном *DIP0611* (рис. 2в; таблица).

Для транскрипционного регулятора McbR была предсказана и экспериментально подтверждена авторегуляция [6]. Ортологи регулятора в геномах рода *Corynebacterium* имеются в геноме *C. diphtheriae* и утрачиваются в геноме *C. jeikeium*. В геноме *C. efficiens* перед геном *mcbR* имеется предсказанная тандемная, перекрывающаяся с ним на 28 п.н., короткая открытая рамка считывания, кодирующая гипотетический белок из 57 а.о. При этом потенциальный сайт связывания McbR расположен в регуляторной области этого гипотетического гена. Однако не существует ни одного ортолога этого гипотетического белка среди всех белков ГенБанка [20], и, возможно, он является результатом неточного предсказания при картировании генома *C. efficiens*. Если это так, то оперон *mcbR* полностью консервативен во всех исследованных геномах, и сайт связывания регулятора в геноме *C. efficiens* расположен на расстоянии –143 п.н. от точки старта транскрипции гена *mcbR*.

Выше описаны оперонные перестройки ортологов, характерные для ортологов генов *aecD*, *brnQ* и монооксигеназы *C. glutamicum*, а также ортологов гена *uwjA* *C. jeikeium* (рис. 2б). В геномах *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* и *C. efficiens* все эти гены (и их ортологи) не регулируются McbR. В геноме *C. jeikeium* гены, кодирующие монооксигеназу и белок гена *brnQ*, образуют два нерегулируемых моноцистронных оперона, тогда как гены *aecD*, *uwjA* и ортолог гена *cg2680* *C. glutamicum* находятся в едином, потенциально регулируемом опероне: перед геном *aecD* находится предсказанный сайт связывания McbR (рис. 2б; таблица).

Дивергоны, гомологичные дивергону утилизации сульфата *cysJIXHDNZY* *C. glutamicum*, сохраня-

ют регуляцию со стороны McbR в геномах *C. efficiens* и *C. jeikeium*, в которых этот дивергон сохранился (рис. 2а). Структура оперона консервативна во всех трех геномах, однако межгенные расстояния отличаются. В геномах *C. glutamicum* и *C. efficiens* расстояние между генами *cysX* и *cysH* составляет 3 п.н., тогда как в геноме *C. jeikeium* – 247 п.н. То, что гены *cysHDNZY* образуют самостоятельный оперон, подтверждается наличием перед геном *cysH* потенциального сайта связывания McbR (рис. 2а; таблица). Тем самым, гены утилизации сульфата в *C. jeikeium* образуют дивергон *cysJIX* и оперон *cysHDNZY*.

Как уже упоминалось, в геноме *C. efficiens* оперон *cysJIXHDNZY* включает два дополнительных члена, кодирующих алкансульфонат-монооксигеназу (CE2637) и метилтиоаденозин-нуклеозидазу (CE2636). Ген белка CE2637 не имеет ортологов ни в одном из рассматриваемых геномов (см. выше). Ортологи гена белка CE2636 присутствуют в геномах *C. glutamicum* и *C. diphtheriae* в виде моноцистронных оперонов, причем перед ортологом в геноме *C. diphtheriae* находится сайт связывания McbR (рис. 2а; таблица). Регуляторная область перед ортологичным геном в геноме *C. glutamicum* также содержит потенциальный сайт связывания, но вес данного сигнала ниже заданного порогового значения и составляет 3.79. Таким образом, принадлежность гена белка CE2636 к регулону McbR является весьма гипотетической, хотя и заслуживающей экспериментальной проверки.

#### Исследование регуляторных сигналов в далеких геномах

Матрица позиционных весов, созданная на основе сайтов связывания McbR в геноме *C. glutamicum*, позволяет проводить поиск регуляторных сайтов в геномах рода *Corynebacterium*. Однако при поиске сигналов в более филогенетически далеких геномах эта матрица находит только один сильный сайт связывания регулятора (вес сайта 5.02) перед генами исследуемого метаболического пути, – сайт авторегуляции *mcbR* в геноме *N. farcinica* (таблица). Все остальные гены пути биосинтеза метионина в этих геномах имеют сигналы со слишком слабым весом (меньше 3.0). Возможное объяснение этому наблюдению может состоять в том, что у регулятора мог измениться ДНК-связывающий домен и, соответственно, распознаваемый им сигнал. Для поиска сигнала, специфичного для более далеких геномов, в случае каждого генома проверяли следующие предположения.

Первое из них – возможность небольшого изменения сигнала. Мы попытались построить новую матрицу на основании выборки тех слабых сайтов, которые распознавала исходная матрица.

Второе предположение – возможность значительного изменения сигнала. Учитывая принадлежность McbR к TetR-семейству транскрипционных регуляторов, мы предположили, что структура сигнала осталась палиндромной. Мы пытались найти более или менее строгий палиндромный сигнал разной четности и длины в 5'-областях основных и, отдельно, “вторичных” генов метаболического пути.

Ни один из этих подходов к созданию новой матрицы не дал результатов. Возможным объяснением этому является крайне высокий GC-состав всех трех далеких геномов: средний уровень GC-пар по геному составляет в среднем 70% (для *C. glutamicum* – 54%), что затрудняет поиск специфичного сигнала.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы проанализировали структуру и потенциальную регуляцию регулона McbR во всех семи геномах актинобактерий, в которых сохраняются близкие ортологи данного регулятора.

Несмотря на невозможность изучения регуляции в филогенетически более далеких геномах вследствие высокого содержания GC в них, исследование потенциальных сигналов в четырех геномах рода *Corynebacterium* позволяет заключить, что большинство генов регулона McbR сохраняет регуляцию со стороны этого репрессора. В большей части случаев потенциальный сигнал сохраняется перед исследуемым ортологичным геном, однако в некоторых случаях, вследствие различного относительного расположения генов, потенциальный сайт связывания может находиться в регуляторной области другого гена. Например, гены *metX* и *metY* могут формировать независимо регулирующие моноцистронные локусы или же единый оперон с сигналом перед геном *metY* (рис. 2z), а дивергон утилизации сульфата *cysJHHDNZY* *C. glutamicum* в геноме *C. jeikeium* распадается на независимо регулирующие дивергон *cysJIX* и оперон *cysHDNYZ* (рис. 2a).

Позиционное сравнение и исследование регуляции ортологичных регулонов позволили нам предсказать новый потенциальный член регулона McbR в геномах рода *Corynebacterium*, – ген *cg1739* *C. glutamicum*. Поиск консервативных доменов в ГенБанке [20] выявляет сходство кодируемого белка с доменом глутамин-амидотрансферазы, кодируемой геном *guaA* *Bacillus subtilis* [27], и отдаленную гомологию белка с гомосерин-сукцинилтрансферазным доменом. Гомосерин-сукцинилтрансфераза выполняет функцию, аналогичную функции гомосерин-ацетилтрансферазы в геномах некоторых бактерий, таких как *E. coli* и *P. aeruginosa* [2]. Насколько нам известно, одновременное наличие этих двух ферментов еще не

было показано, и, более того, экспериментально доказано, что единственным ферментом утилизации гомосерина в геноме *C. glutamicum* является гомосерин-ацетилтрансфераза [28]. Роль белка, гомологичного белку *GuaA* *B. subtilis*, в биосинтезе метионина также не очевидна. Функция этого фермента состоит в отщеплении иона аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) от молекулы глутамина с образованием молекулы глутамата и последующем присоединении иона аммония к акцепторной молекуле [29, 30]. Для объяснения роли данной ферментативной активности в биосинтезе метионина/цистеина можно предположить, что имеется регуляция биосинтеза на стадии образования аспартата из глутамата и оксалоацетата. Но такая интерпретация представляется маловероятной в силу того, что глутамат вовлечен в большую часть процессов биосинтеза, и регуляция его уровня в клетке со стороны специфичного регулятора биосинтеза метионина нецелесообразна. Таким образом, мы не можем предсказать роль белка гена *cg1739p* в биосинтезе метионина в геномах рода *Corynebacterium*.

Кроме того, наши данные свидетельствуют о том, что белок CE2636p *C. efficiens* и его ортологи в *C. glutamicum* и *C. diphtheriae* также могут входить в регулон McbR (см. “Результаты”). Этот белок имеет значительную степень сходства с представителями семейства нуклеозидфосфорилаз, которое включает в себя 5'-метилтиоаденозин-нуклеозидазы (МТА-нуклеозидазы). В процессе биосинтеза полиаминов одним из побочных продуктов является 5'-метилтиоаденозин. Процесс восстановления метионина из этого соединения состоит из нескольких реакций, первой и лимитирующей из которых является его расщепление на аденин и 5'-метилтиорибозу, катализируемое МТА-нуклеозидазами [31, 32]. Таким образом, увеличение пула метионина за счет расщепления 5'-метилтиоаденозина также регулируется, по-видимому, со стороны McbR, по крайней мере, в геномах *C. diphtheriae* и *C. efficiens*.

Несмотря на общую высокую стабильность геномов коринебактерий [33], мы во многих случаях наблюдали утрату ортологичных генов как в далеких, так и в близкородственных геномах. Большая часть таких случаев, по всей видимости, связана с особенностями паразитического образа жизни, характерного для четырех микроорганизмов из описываемых семи, а именно, *C. diphtheriae* [34], *C. jeikeium* [35], *N. farcinica* [36] и *L. xyli* [17]. По-видимому, эти микроорганизмы способны получать серосодержащие органические вещества из организмов хозяев, в силу чего отсутствует острая необходимость в ферментах пути биосинтеза метионина, и, как следствие, путь биосинтеза метионина в этих микроорганизмах редуцирован. Так, к примеру, в геноме *C. diphtheriae* полностью утрачен оперон утилизации сульфата и оба опе-

рона утилизации алкансульфонатов, что только частично возмещается появлением новой алкансульфонат-монооксигеназы в результате неортологичного замещения. Кроме того, утрачен ген *metB* (цистатионин- $\gamma$ -синтаза), кодирующий первый фермент пути *транс*-сульфурирования, и единственно возможным способом синтеза гомоцистеина остается путь прямого сульфгидрирования с участием белка MetY (ацетилгомосеринлиаза). Утрачен ген *metE*, кодирующий высокоэффективную метионинсинтазу. Тем не менее, путь биосинтеза метионина остается функциональным благодаря наличию метионинсинтазы MetH, эффективность которой, впрочем, гораздо ниже.

В целом, позиционное сравнение генов биосинтеза аминокислот в геномах *C. glutamicum*, *C. efficiens* и *C. diphtheriae* [1] показало, что в геноме *C. diphtheriae* нет большого числа ортологов, что приводит к уменьшению размера генома этой бактерии. Из изученных нами микроорганизмов, для ведущих паразитический образ жизни также характерен заметно меньший размер генома (за исключением генома *N. farcinica*), что может свидетельствовать о массовой утрате ортологов и косвенно свидетельствовать о паразитическом использовании необходимых соединений из организма хозяина.

В некоторых случаях отсутствие ортологов возмещается наличием гомологичных, но не ортологичных белков, как это было показано в случае треонинсинтазы и алкансульфонат-монооксигеназы. Так, геномы *C. glutamicum*, *C. efficiens* и *C. diphtheriae* несут гены треонинсинтазы, которая не характерна для большинства актиномицет и получена, по всей видимости, за счет горизонтального переноса в геном общего предка этих трех бактерий. Более частным сходным случаем горизонтального переноса генов является появление в геноме *C. efficiens* алкансульфонат-монооксигеназы, характерной для протеобактерий.

Таким образом, наше исследование регулона McbR показало, что имеются многочисленные и разнообразные оперонные перестройки, несмотря на показанную ранее общую стабильность генома; это позволило нам предложить несколько новых потенциальных членов данного регулона на основании позиционного сравнения геномов и исследования сайтов связывания регулятора McbR. Большинство новых потенциальных членов регулона ранее были приписаны ферментативные активности, которые позволили нам предсказать роль кодируемых белков на пути биосинтеза метионина в геномах бактерий порядка Actinomycetales.

Работа получила финансовую поддержку Медицинского института Ховарда Хьюза (55000309) и Программы "Молекулярная и клеточная биология" Российской академии наук.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nishio Y., Nakamura Y., Usuda Y., Sugimoto S., Matsui K., Kawarabayasi Y., Kikuchi H., Gojobori T., Ikeo K. 2004. Evolutionary process of amino acid biosynthesis in *Corynebacterium* at the whole genome level. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1683–1691.
2. Lee H.S., Hwang B.J. 2003. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 459–467.
3. Hwang B.J., Yeom H.J., Kim Y., Lee H.S. 2002. *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J. Bacteriol.* **184**, 1277–1286.
4. Mampel J., Schroder H., Haefner S., Sauer U. 2005. Single-gene knockout of a novel regulatory element confers ethionine resistance and elevates methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 228–236.
5. Rey D.A., Puhler A., Kalinowski J. 2003. The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **103**, 51–65.
6. Rey D.A., Nentwich S.S., Koch D.J., Ruckert C., Puhler A., Tauch A., Kalinowski J. 2005. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol. Microbiol.* **56**, 871–887.
7. Mironov A.A., Koonin E.V., Roytberg M.A., Gelfand M.S. 1999. Computer analysis of transcription regulatory patterns in completely sequenced bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2981–2989.
8. Миронов А.А., Винокурова Н.П., Гельфанд М.С. 2000. Програмное обеспечение анализа бактериальных геномов. *Молекуляр. биология.* **34**, 253–262.
9. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z.M.W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
10. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
11. Felsenstein J. 1996. Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods Enzymol.* **266**, 418–427.
12. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D. et al. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**, 5–25.
13. Cerdano-Tarraga A.M., Efstratiou A., Dover L.G. et al. 2003. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6516–6523.
14. Nishio Y., Nakamura Y., Kawarabayasi Y., Usuda Y., Kimura E., Sugimoto S., Matsui K., Yamagishi A., Kikuchi H., Ikeo K., Gojobori T. 2003. Comparative complete

- genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* **13**, 1572–1579.
15. Tauch A., Kaiser O., Hain T. et al. 2005. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* **187**, 4671–4682.
  16. Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M. 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 14925–14930.
  17. Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E., van Sluys M.A. et al. 2004. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol. Plant. Microb. Interact.* **17**, 827–836.
  18. Redenbach M., Kieser H.M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H., Hopwood D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77–96.
  19. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M. et al. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* **417**, 141–147.
  20. Benson D.A., Boguski M.S., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F., Rapp B.A., Wheeler D.L. 1999. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **27**, 12–17.
  21. Han K.S., Archer J.A., Sinsky A.J. 1990. The molecular structure of the *Corynebacterium glutamicum* threonine synthase gene. *Mol. Microbiol.* **4**, 1693–1702.
  22. Kertesz M.A. 2000. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 135–175.
  23. Cook A.M., Laue H., Junker F. 1998. Microbial desulfonation. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 399–419.
  24. Koch D.J., Ruckert C., Rey D.A., Mix A., Puhler A., Kalinowski J. 2005. Role of the *ssu* and *seu* genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6104–6114.
  25. Koch D.J., Ruckert C., Albersmeier A., Huser A.T., Tauch A., Puhler A., Kalinowski J. 2005. The transcriptional regulator *SsuR* activates expression of the *Corynebacterium glutamicum* sulphonate utilization genes in the absence of sulphate. *Mol. Microbiol.* **58**, 480–494.
  26. Ruckert C., Koch D.J., Rey D.A., Albersmeier A., Mormann S., Puhler A., Kalinowski J. 2005. Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *fpr2-cysIXHDNYZ* gene cluster involved in assimilatory sulphate reduction. *BMC Genomics.* **6**, 121.
  27. Mantsala P., Zalkin H. 1992. Cloning and sequence of *Bacillus subtilis* *purA* and *guaA*, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP. *J. Bacteriol.* **174**, 1883–1890.
  28. Park S.D., Lee J.Y., Kim Y., Kim J.H., Lee H.S. 1998. Isolation and analysis of *metA*, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Cells.* **8**, 286–294.
  29. Raushel F.M., Thoden J.B., Holden H.M. 1999. The amidotransferase family of enzymes: molecular machines for the production and delivery of ammonia. *Biochemistry.* **38**, 7891–7819.
  30. Weng M.L., Zalkin H. 1987. Structural role for a conserved region in the CTP synthetase glutamine amide transfer domain. *J. Bacteriol.* **169**, 3023–3028.
  31. Sekowska A., Denervaud V., Ashida H., Michoud K., Haas D., Yokota A., Danchin A. 2004. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiol.* **4**, 9.
  32. Sufirin J.R., Meshnick S.R., Spiess A.J., Garofalo-Hannan J., Pan X.Q., Bacchi C.J. 1995. Methionine recycling pathways and antimalarial drug design. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2511–2515.
  33. Nakamura Y., Nishio Y., Ikeo K., Gojobori T. 2003. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene.* **317**, 149–155.
  34. Mattos-Guaraldi A.L., Moreira L.O., Damasco P.V., Hirata Junior R. 2003. Diphtheria remains a threat to health in the developing world—an overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**, 987–893.
  35. Funke G., von Graevenitz A., Clarridge J.E. 3rd, Bernard K.A. 1997. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 125–159.
  36. Saubolle M.A., Sussland D. 2003. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4497–4501.