

Clostridium thermocellum JW20가 생성하는 섬유소분해 효소복합체 (cellulosome) 구성단백질의 특성에 관한 연구

최 상 기*

생명공학연구소 미생물공정연구실

*Clostridium thermocellum*이 생성하는 섬유소분해 효소복합체인 cellulosome은 26개의 서로 다른 단백질로 구성되어 있으며 그 구성물질로서 calcium을 포함하고 있다. 견고한 구조의 이 복합체에서 구성단백질을 분리하여 그 기능을 연구할 목적으로 이 복합체를 해체(dissociation)하려 시도하였다. 이 복합체는 calcium을 제거하였을 때 해체되었다. 해체된 구성단백질들은 MonoQ column chromatography에 의해 구조단백질인 CipA를 포함한 분획, 91 kDa (CelK-tr), 60 kDa 과 57 kDa 단백질로 구성된 분획과 주로 46 kDa (CelA-tr), 또는 71 kDa (CelS-tr) 단백질을 포함하는 분획들로 크게 분리되었다. 대부분의 분획들은 crystalline cellulose 분해활성을 보였다. 순수 분리된 71 kDa 단백질은 60°C~70°C에서 섬유소분해 시 calcium에 의존적이었으나, 46 kDa 단백질은 그렇지 않았다. 46 kDa 단백질은 cellodextrin을 cellobiose 및 cellotriose단위로 절단하며 cellotetraose로부터 glucose가 생성되는 것이 관찰되었다. Cellulosome의 섬유소분해 최종산물이 cellobiose인 것을 고려할 때 개개 구성단백질의 활성이 이 효소복합체 내에서 조절되고 있음을 알 수 있다.

Key words □ Avicelase, calcium, cellulose, cellulosome, *Clostridium*, endoglucanase.

대부분의 곰팡이 및 호기성세균은 일반적으로 cellulose를 분해하는 데 필요한 endoglucanase와 cellobiolyticase 등을 세포외에 분리된 형태로 배출한다(5,6). 반면에 혐기성 고온성 균주인 *Clostridium thermocellum*은 cellulosome이라 명명된 섬유소분해 효소 복합체를 세포표면에 형성한다(1). 이 복합체는 26개의 서로 다른 단백질들로 구성되어 있다(14). 그 구성단백질들은 1개의 활성이 없는 구조단백질 (CipA)과 나머지 대부분의 활성을 갖는 단백질들로 구성되어 있다(8) 대부분의 활성을 갖는 단백질에는 dockerin이라 불리는 conserved duplicated region(CDR)이 존재한다. 이는 활성을 갖는 단백질이 CipA에 결합하는 데 관여한다(24). 구조단백질인 CipA는 지지대(scaffold)로서 작용한다(27). 이 구조단백질에는 활성을 갖는 단백질들이 결합하는 데 필요한 cohesin이라 명명된 IRE(internally repeated elements)가 존재한다(9,10)

Cellulosome은 높은 섬유소 분해활성을 갖고 있기 때문에 이 효소복합체의 구조와 기능을 이해하는 데 많은 관심이 집중되어 왔다. 따라서 이 효소복합체의 구성성분에 대한 연구가 진행되어 왔으나 그 구조가 매우 견고하기 때문에 이로부터 개개의 구성성분을 얻는 것이 거의 불가능했다. 최근에 cellulosome에서 calcium, zinc, copper, iron과 phosphorus가 존재함이 보고되었으며, 그 중 calcium을 EDTA 나 EGTA를 사용하여 제거하였을 때 그 복합체구조가 해체(dissociation)된다고 보고되었다. 그 해

체된 cellulosome은 원래의 효소에 비해 섬유소분해활성이 약 30%로 떨어졌지만 endoglucanase활성에는 변화가 없었다(3). 해체된 단백질 중의 하나인 71 kDa 단백질은 cellulosome이 해체되면서 그 원래 단백질인 CelS의 C-terminal 부위가 절단된 분해산물이며 절단된 부위는 첫 번째 CDR의 중앙이었다. 이러한 절단현상은 46 kDa, 91 kDa 단백질 등에서도 특이성을 보일 것으로 추정된다. 첫 번째 CDR은 calcium에 결합하는 특성을 보였으며, calcium 존재 하에 CipA에 결합하는 sequence를 함유한다(4). 본 논문에서는 calcium이 제거되면서 해체되는 cellulosome 구성 단백질들의 분리양상을 분석하였으며, 순수분리된 두 단백질의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

세균배양 및 cellulosome의 분리

Clostridium thermocellum JW20는 Ljungdahl 등이 보고한 방법에 따라 혐기성 상태에서 배양하였다(19). Cellulosome의 분리는 Choi등이 사용한 방법을 이용하였으며, Avicel을 주 탄소원으로 사용하여 균 배양한 후 생성된 노란색 Avicel 잔해물을 분리하였으며, 이에 부착되어 있는 효소복합체를 증류수로 elution시켜 분리한 후 Sepharose 4B (Pharmacia)로 추가 분리하였다(3).

Cellulase assay

Endoglucanase와 Avicelase(crystalline cellulose 분해능력)활성은 보고된 방법에 의해 측정하였다(3). Phosphoric acid swollen Avicel은 전에 기술한 방법에 따라서 제조하였으며(26), 이 기질

*To whom correspondence should be addressed.
Tel. 042-860-4458, FAX: 042-860-4594
E-mail: skchoi@mail.kribb.re.kr

에 대한 분해활성은 Avicelase활성측정 방법과 동일하게 측정하였다(3). 분리된 단백질의 Avicelase활성에 미치는 온도의 영향을 보기 위하여 46 kDa 단백질을 완충액(50 mM Bis-Tris, pH 6.5)에 용해한 1%(w/v) Avicel 에, 71 kDa 단백질을 완충액(50 mM Bis-Tris, pH 6.0)에 용해한 1% Avicel 에 넣어 40°C로 부터 80°C 사이의 온도에서 7 시간 반응시킨 후에 그 활성을 측정하였다. Avicelase 활성에 calcium의 영향을 보기 위해 7 mM의 CaCl_2 을 반응 시 첨가하였다.

해체된 cellulosome에서 개개의 구성단백질의 분리

Cellulosome을 해체하기 위해 보고된 방법에 따라서 순수분리된 cellulosome을 50 mM Tris, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA 용액에서 37°C에서 48시간 반응시켰다. 그 반응용액을 완충액(30 mM Tris, pH 7.5)에서 12 시간 투석시킨 후에 같은 완충액으로 평형시킨 MonoQ HR5/5 column(Pharmacia)에서 분리시켰다. 분리조건은 1 ml/min의 속도로 NaCl gradient(0-0.45 M)를 이용하여 분리하였다. 46 kDa 과 71 kDa 단백질의 순수분리는 전에 기술한 방법에 따라 행하였다(4).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 단백질정량

SDS-PAGE는 Laemmli에 의한 방법을 따랐고(17). Acrylamide 농도는 7.5% (w/v) 이었다. 단백질의 농도는 Bicinchoninic acid 방법(Pierce)에 따라서 정하였으며 bovine serum albumin을 기준 단백질로 사용하였다.

Thin layer chromatography(TLC)를 이용한 분리단백질에 의한 cellodextrin의 분해산물분석

Cellulase에 의한 cellodextrin(Sigma)의 분해산물은 silica gel plate(Analtech, Inc.)을 사용하여 TLC로 분석하였다. 0.3 μg 의 46 kDa 혹은 71 kDa 단백질을 cellodextrin (5 μg)이 포함된 완충액(50 mM Tris, pH 7.5)에 넣어 60°C에서 20 시간 반응시켰다. 반응용액 (10 μg)은 TLC plate에 점적한 후 chloroform-glacial acetic acid-water [6:7:1(vol/vol)]에서 3 시간 동안 분리시켰다. TLC에서 분리된 당은 Lake와 Goodwin이 기술한 방법에 따라 diphenylamine staining에 의해 확인할 수 있었다(18).

결 과

EDTA로 처리되어 해체된 cellulosome 구성단백질의 MonoQ column chromatography에 의한 분리

Cellulosome은 *C. thermocellum*이 생성하는 견고한 구조의 효소복합체로서 EDTA를 처리하여 calcium을 제거하였을 때 주로 CipA를 포함한 복합체와 다른 많은 단백질로 분리된다(3). CipA를 포함한 분획은 해체된 이후에도 다른 subunit들을 포함하지만 그 양은 원래의 cellulosome에 비해 매우 적은 양이다. 이는 많은 subunit들이 해체된 후에도 CipA에 연결되어 있음을 보여준다. CipA와 연결되지 않은 subunit들은

cellulosome에서 잘 분리되었다. 또한 gel filtration에 의해 분리된 분획들은 비교적 높은 섬유소분해활성을 나타내었다(3). Calcium제거에 의해 cellulosome에서 해체된 단백질들이 개개의 단백질인지, 혹은 여러 단백질의 복합체 형태인지 알기 위하여 그 해체된 cellulosome을 더 분리하였다. MonoQ column chromatography는 그 해체된 cellulosome을 5개의 subfraction들로 잘 분리시켰다(Fig. 1). 대부분의 subfraction들은 Avicelase 활성을 보였고 각 분획들을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다(Fig. 2) Subfraction I (#52, #53)은 주로 CipA와 아주 적은 양의 다른 subunit들로 구성되었다. 해체되지 않은 cellulosome 역시 subfraction I과 비슷하게 같은 salt 농도에서 분리되었다(data not shown). 이는 두 분획이 anion-exchange column chromatography에서 비슷한 특성을 갖는 것을 나타낸다. Subfraction IV (#31-33)와 V (#4)는 주로 46 kDa 및 71 kDa 단백질을 각각 포함하였다. Subfraction III (#37)는 많이 존재하는 단백질로서 60 kDa, 57 kDa subunit들과 적은 양의 91 kDa subunit을 포함하였다. Subfraction II (#42)는 주로 91 kDa subunit와 적은 양의 60 kDa과 57 kDa subunit들을 포함하였다. Subfraction II와 III에 존재하는 subunit들을 여러 과정의 추가적인 phenyl-Sepharose, hydroxyapatite 와 gel filtration chromatography에 의해서도 더 이상 분리되지 않았다(data not shown). 이는 그 분획들에 존재하는 subunit들이 서로 결합되어 있을 가능성을 보여주는 것이다. 그 subfraction들에 있는 각 subunits는 그 구성 비율이 같지 않았다(Fig. 1 & 2). 46 kDa 와 71 kDa 단백질은 각각 CelA와 CelS와 같은 N-terminal sequence를 갖고 있었다(2,3,25). CelA는 그 질량이 56 kDa이며 전에 *C. thermocellum*의 배양액에서 6M urea존제 하에서

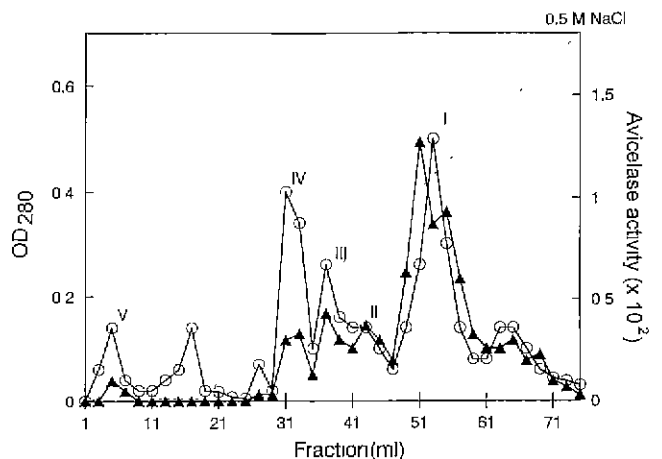


Fig. 1. MonoQ column chromatography of EDTA-treated cellulosome. Cellulosome was incubated at 37°C in Tris, pH 7.5 and 0.1 M NaCl and 5 mM EDTA for 48 h, dialyzed against 30 mM Tris, pH 7.5 for 12 hr, and loaded on a MonoQ column(0.5×5 cm, Pharmacia). The column was eluted with 10 ml of the starting buffer and then with NaCl gradient from 0 to 0.45 M at a flow rate of 0.8 ml/min. Fraction size collected was 0.5 ml. Protein elution was monitored at 280 nm (○). (▲) indicates Avicelase activity and one unit denotes μmole of glucose formed per min.: dotted line, NaCl gradient.

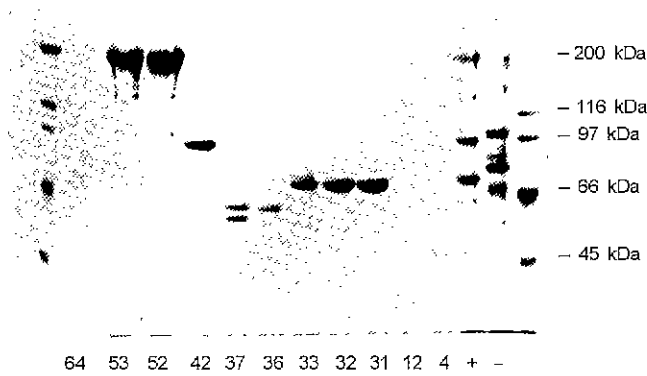


Fig. 2. SDS-PAGE (7.5%) of fractions separated by MonoQ column chromatography as performed in Fig. 1. The numbers at the bottom of the gel represent the fraction. - indicates control sample without EDTA. + indicates cellulosome incubated with EDTA. CipA corresponds to band of about 200 kDa as shown in fractions 52 & 53.

순수 분리되어 endoglucanase로 특정 지워졌다(22) 따라서 46 kDa 단백질은 C-terminus에서 약 10 kDa가량의 peptide가 절단된 것으로 추정할 수 있다. CelA는 또한 재조합 *E. coli*에서 분리되고 그 특성이 더 정하여졌다(23). 반면에 CelS (S8과 동일)는 *C. thermocellum*에서 intact하게 순수 분리되지는 않았지만 cellulosome을 proteinase K로 처리했을 때 구성단백질 S8이 절단된 형태 S8-tr로 분리되었다. S8-tr은 C-terminus에서 약 7 kDa 정도가 절단된 것으로 추정되었으며 cellobiohydrolase로 확인되었다(21) CelS는 또한 재조합 *E. coli*에서 분리되었는데, 유전자에서 유추되어 얻어진 질량은 76 kDa이었다(16).

분리된 단백질의 섬유소 분해활성에 미치는 calcium의 영향

Calcium과 thiol은 cellulosome의 섬유소 분해활성을 증진시키는 것으로 알려져 있다. Cellulosome에서 분리되거나 혹은 재조합 *E. coli*에서 분리된 개개의 subunit들은 여러 종류의 섬유소기

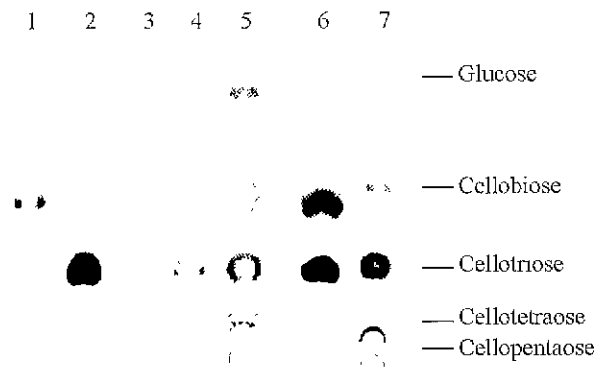


Fig. 4. Analysis of the degradation products of cellodextrin by the 46 kDa protein by thin layer chromatography (TLC). 5 µg of each cellodextrin was incubated with 0.3 µg of 46 kDa protein for 20 hr at 60°C. spotted to TLC plate and partitioned for 3 hr at room temperature in chloroform-glacial acetic acid-water [6:7:1 (vol/vol)]. Sugars were visualized by diphenylamine staining as described in Materials and Methods. Lanes 1, 2, 3 and 4 indicate degradation products from cellobiose, cellotriose, cellotetraose and cellopentaose, respectively; lanes 5 and 7, cellodextrin markers; lane 6, degradation products from phosphate-swollen cellulose (26).

질을 분해하는데 calcium이나 thiol에 의해 그 활성이 좌우된다(8). 그러나 각각의 subunit에 의해 crystalline cellulose를 분해하는데 있어서의 calcium의 영향에 대해서는 조사되지 않았다. 71 kDa subunit에 의한 섬유소 분해활성은 특히 60°C 이상의 온도에서 매우 calcium에 의존적이었다. Calcium이 없을 때는 그 활성이 60°C에서 45%, 70°C에서 70%까지 감소되었다(Fig. 3B). 그러나 46 kDa subunit의 활성에는 calcium의 영향이 없었다(Fig. 3A). 71 kDa subunit에 상당하는 S8-tr은 전에 50°C이상에서 amorphous cellulose를 분해하는 데 calcium에 의존성을 보였다(21). 71 kDa subunit는 calcium에 그 활성이 의존성을 보이

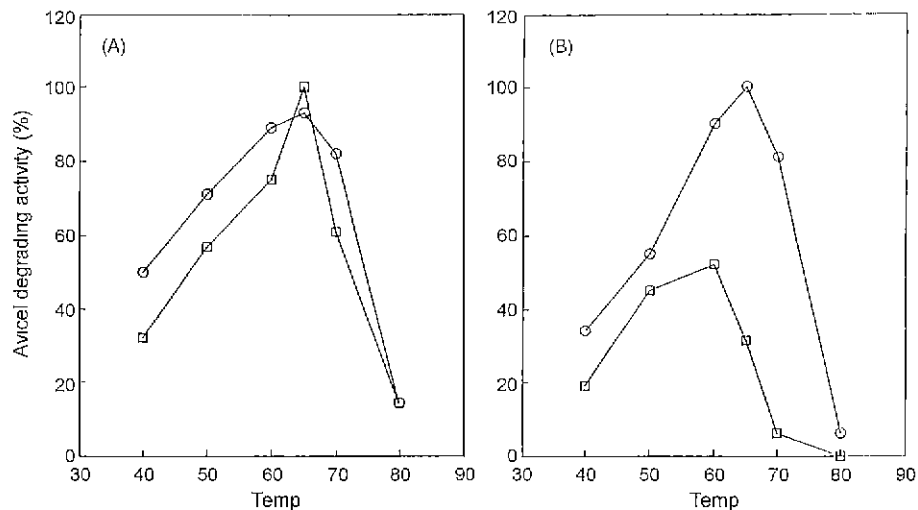


Fig. 3. Effect of calcium on cellulose degrading activities of the 46 kDa protein (A) and 71 kDa protein (B). The 46 kDa protein of amount indicated was mixed with cellulose in 50 mM Bis-Tris, pH 6.5 and the 71 kDa protein in 50 mM Bis-Tris, pH 6.0, in the presence of 7 mM CaCl₂ (○) or in the absence of CaCl₂ (□), and then incubated for 7 h at given temperatures. Reducing sugars produced were determined with tetrazolium blue reagent, using glucose as a standard (12).

므로 cellulosome 중 기능적으로 주요한 단백질일 것으로 추정된다. 그러나 CelA는 calcium에 의존적이지 않았다. 이는 cellulosome의 모든 subunit들의 열안정성이 calcium에 의존적이지는 않음을 보여 주는 것이다.

분리된 subunit들에 의한 cellodextrin의 분해

Cellulosome는 섬유소를 분해하여 cellobiose를 주요 산물로 생산한다. 여러 종류의 cellulosome subunit들은 cellodextrin 혹은 amorphous cellulose를 분해하여 여러 종류의 oligosaccharide들을 생성한다(11). 따라서 각각의 서로 다른 특성의 subunit들이 효소 복합체를 형성하여 어떻게 최종산물인 cellobiose를 형성할 수 있는지를 조사하는 것이 흥미있는 일이다. CelS는 여러 연구실에서 recombinant 형태나 절단된 형태로 cellodextrin을 분해하는 특성에 대해 조사되었다(16,21). 그러나 CelA에 의한 cellodextrin의 분해특성에 대해서는 알려진 바 없다. CelA는 amorphous cellulose를 분해하여 cellobiose, cellotriose를 주요 산물로, glucose를 적은 양의 산물로 생성하였다(22). Glucose는 cellulosome에 의한 섬유소 분해산물이 아니다. 어느 기질에서 glucose가 생성되는지를 알기 위해 46 kDa 단백질에 의한 cellodextrin의 분해양상을 조사하였다. Amorphous cellulose는 보고된 바와 같이 cellotriose, cellobiose와 glucose로 분해되었다(Fig 4, lane 6). 이 subunit는 cellobiose와 cellotriose를 분해하지 못하였다. Cellotetraose는 cellotriose, cellobiose와 glucose로 분해되었다. Cellopentaose는 cellobiose와 cellotriose로 분해되었다(Fig. 4). 이는 CelA가 cellodextrin을 cellobiose 및 cellotriose단위로 인식하여 분해함을 보여 준다.

활성을 갖는 subunit들 간의 synergism

곰팡이와 약간의 세균에서 분리된 endoglucanase와 exoglucanase사이에서 synergism이 관찰되어 왔다. 최근에 세균에서의 exoglucanase에는 섬유소에 binding하는 부위(CBD)와 활성을 보이는 부위 사이에 intrasynergism이 일어난다고 보고되었다(7). 이와 비슷하게 cellulosome 역시 CelS와 CipA의 CBD사이에서 intersynergism이 보고되었다(15). Synergism은 또한 재조합 CelD와 S8-tr사이에서도 관찰되었다(21). Cellulosome에는 많은 종류의 섬유소기질에 대해 서로 다른 특성을 갖는 많은 endoglucanase들과 두 종류의 exoglucanase가 존재한다(13,25). 본 연구에서는 위에서 보고된 cellulosome의 subunit들 이외에도 다른 활성을 갖는 subunit들 사이에 synergism이 존재하는지를 조사하였다. 46 kDa와 71 kDa 단백질을 혼합하여 섬유소 분해여부를 조사하였는데 그 활성이 같은 양의 개개의 단백질을 사용했을 때와 비교했을 때 별 차이를 보이지 않았다. 이는 두 단백질사이에서 synergism이 일어나지 않음을 보여 준다 (data not shown).

고 찰

Cellulosome는 매우 정교하고, 견고하며 해체(dissociation)하기 어려운 구조를 가지고 있다. 그러나, 이 효소복합체의 구성성분

인 calcium을 제거하였을 때 해체되었다. 이러한 과정 중에 관찰된 몇 가지 현상을 통해 이 효소복합체의 특성을 다음과 같이 추정할 수 있다 첫째, subunit들은 해체된 이후에도 계속 CipA에 결합되어 있다 이는 calcium 혹은 다른 금속이온이 subunit들 사이의 접촉을 증진시키는 데 필요한 충분한 요소가 아닐 수 있다는 것을 시사한다 두 번째, 71 kDa (CelS-tr)이나 91 kDa (CelK-tr) 단백질이 많은 여러 subfraction들 (Fig. 1)은 CipA가 없는 상태에서도 높은 섬유소분해능력을 보였다. 이는 CipA가 섬유소 분해에 필수적인 단백질이 아님을 보여 준다. 셋째, 효소 복합체 해체 시에 subcomplex가 존재하는 것은 어떤 subunit들이 구조단백질인 CipA가 없는 상태에서 물리적으로 연결되어 있음을 시사한다. 그러한 subunit들이 위치적으로 근접되어있는지는 좀 더 연구되어야 할 부분이다 CelA-tr은 전에 배양액에서 분리한 CelA와 마찬가지로 phosphate swollen Avicel을 분해하여 cellotriose, cellobiose와 glucose를 생산한다(22). 섬유소는 cellulosome에 의해 cellobiose로 분해되기 때문에 이 기질은 CelA에 대한 실제적인 기질은 아닐 수 있다. Cellulosome에 존재하는 endoglucanase는 우선적으로 섬유소에 작용하고 동시에 생성된 oligodextrin들을 다른 endoglucanase와 exoglucanase가 glucose가 아닌 cellobiose를 생성하도록 그 활성이 조절될 것으로 추정된다 현재 CelS는 CelK(13)와 함께 cellulosome에 존재하는 주요한 exoglucanase이며 많은 endoglucanase들과 함께 작동할 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 C-terminal 부위가 절단된 CelA와 CelS는 섬유소를 분해하는데 효율적인 synergism을 보이지 않았다. 그 이유 중 하나로는 두 단백질이 효소복합체에서나, 개개의 단백질사이에서 활성을 보이는 접촉이 없을 수 있다. 또 다른 가능성으로는 cellulosome은 exoglucanase에 비해서 우선적으로 많은 종류의 endoglucanase가 존재하는 것으로 보아, 곰팡이의 섬유소분해효소에서 주로 보이는 synergism이 중요치 않은 현상일 수 있다 현재 cellulosome에 의한 높은 효율의 섬유소분해는 multi-cutting event, 즉 활성을 갖는 많은 subunit들이 CipA에 일렬로 부착되고, 섬유소에 부착되어 동시에 섬유소를 절단하는 현상으로 설명된다(20). 이러한 가설을 뒷받침하는 결과로는 cellulosome이 해체되었을 때 그것에 의한 섬유소 분해활성은 intact cellulosome보다 30%로 떨어지는 것이다 (3). 다시 설명하면 cellulosome의 구조적인 특성이 활성을 갖는 subunit들 사이의 synergism을 대신할 것으로 추정된다

참고문헌

1. Bayet, E. A., R. Kenig, and R. Lamed. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.* 156, 818-827.
2. Beguin, P., P. Cornet, and J. P. Aubert. 1985. Sequence of cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 162, 102-105.
3. Choi, S. K. and L. G. Ljungdahl. 1996. Dissociation of the cellulosome of *Clostridium thermocellum* in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid occurs with the formation of truncated polypeptides. *Biochemistry*, 35, 4897-4905.
4. Choi, S. K. and L. G. Ljungdahl. 1996. Structural role of calcium for the organization of the cellulosome of *Clostridium thermocel-*

- lum Biochemistry* 35, 4906-4910.
5. Coughlan, M. P. 1991. Cellulose degradation by fungi. In W. M. Fogarty, C. T. Kelly (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*, pp. 1-36. Elsevier, Amsterdam.
 6. Coughlan, M. P. and F. Mayer. 1990. Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. In A. B. Balows (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
 7. Din, N., H. G. Damude, N. R. Gilkes, R. C. Jr. Miller, R. A. Warren, D. J. Kilburn. 1994. C1-Cx revisited: Intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11383-11387.
 8. Felix, C. R. and L. G. Ljungdahl. 1993. The cellulosome: the extracellular organelle of *Clostridium*. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 791-819.
 9. Fujino, T., P. Beguin, and J. P. Aubert. 1992. Cloning of a *Clostridium thermocellum* DNA fragment encoding polypeptides that bind the catalytic components of the cellulosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 94, 165-170.
 10. Gemgross, V. T., P. M. Romanec, N. S. Huskisson, and A. L. Demain. 1993. Sequencing of a *Clostridium thermocellum* gene (*cipA*) encoding the cellulosomal S1 protein reveals an unusual degree of internal homology. *Mol. Microbiol.* 8, 325-334.
 11. Hazlewood, G. P., M. P. N. Romanec, K. Davidson, O. Grepinet, P. Beguin, J. Millet, O. Raynaud, and J. P. Aubert. 1988. A catalogue of *Clostridium thermocellum* endoglucanase, β -glucosidase and xylanase genes cloned in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51, 231-236.
 12. Jue, C. K. and P. N. Lipke. 1985. Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 11, 109-115.
 13. Kataeva, I., X. L. Li, H. Chen, S. K. Choi, and L. G. Ljungdahl. 1999. Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum* evidence for gene duplication and recombination. *J. Bacteriol.* 181, 5288-5295.
 14. Kohring, S., J. Wiegel, and F. Mayer. 1990. Subunit composition and glycosidic activities of the cellulase complex from *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3798-3804.
 15. Kruus, K., A. C. Lua, A. L. Demain, and J. H. D. Wu. 1995. The anchorage function of *CipA*(*Cell*), a scaffolding protein of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9254-9258.
 16. Kruus, K., W. K. Wang, J. Chung, and J. H. D. Wu. 1995. Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* *CelS*, a major cellulosome component. *J. Bacteriol.* 177, 1641-1644.
 17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
 18. Lake, B. D. and H. J. Goodwin. 1976. Lipids, p. 345-366. In I. Smith and J. W. T. Seakins (ed.), *Chromatographic and electro-phoretic techniques*, Vol. 1, 4th ed. Pitman Press, Bath, England.
 19. Ljungdahl, L. G., M. P. Coughlan, F. Mayer, Y. Mori, and K. Honnami. 1988. Macromolecular complexes and yellow affinity substance from *Clostridium thermocellum*. *Methods Enzymol.* 160, 483-500.
 20. Mayer, F., M. P. Coughlan, Y. Mori, and L. G. Ljungdahl. 1987. Macromolecular organization of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2785-2792.
 21. Morag, E., I. Halevy, E. A. Bayer, and R. Lamed. 1991. Isolation and properties of a major cellobiohydrolase from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 173, 4155-4162.
 22. Petre, J., R. Longin, and J. Millet. 1981. Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie.* 63, 629-639.
 23. Schwarz, W. H., F. Grebnitz, and W. L. Staudenbauer. 1986. Properties of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1293-1299.
 24. Tokatlidis, K., S. Salamatou, S., P. Beguin, P. Dhurjati, and J. P. Aubert. 1991. Interaction of the duplicated segment carried by *Clostridium thermocellum* cellulase with cellulosome components. *FEBS Lett.* 291, 185-188.
 25. Wang, W. K., K. Kruus, and J. H. D. Wu. 1993. Cloning and DNA sequencing of the gene coding for *Clostridium thermocellum* cellulase Ss (*CelS*), a major cellulosome component. *J. Bacteriol.* 171, 1293-1232.
 26. Wood, T. M. 1971. The cellulase of *Fusarium solani*. Purification and specificity of the β -1,4-D-glucanase and β -glucosidase components. *Biochem. J.* 121, 353-362.
 27. Wu, J. H. D., W. H. D. Johnson, and A. L. Demain. 1988. Two components of an extracellular protein aggregate of *Clostridium thermocellum* together degrade crystalline cellulose. *Biochemistry.* 27, 1703-1709.

(Received July 18, 2000/Accepted August 30, 2000)

ABSTRACT: Characterization of Subunits Dissociated from Cellulosome of *Clostridium thermocellum* JW20

Sang Ki Choi (Microbial and Bioprocess Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea)

The cellulosome of *Clostridium thermocellum* consisting of 26 different polypeptides contains calcium. The polypeptides dissociated when calcium was removed. Most of dockerin region in the catalytic polypeptides cleaved during dissociation. The dissociated polypeptides were well separated by MonoQ column chromatography into CipA containing fraction, a fraction still complexed with 91 kDa (CelK-tr), 60 kDa and 57 kDa polypeptides, and fractions containing mainly single polypeptide of 46 kDa (CelA-tr) or 71 kDa polypeptide (CelS-tr). Most of the fractions hydrolyzed crystalline cellulose. The purified 71 kDa polypeptide was strictly dependent on calcium for crystalline cellulose hydrolyzing activities at 60°C-75°C but 46 kDa polypeptide was not. 46 kDa polypeptide digested cellodextrin as cellobiose or cellotriose unit, and glucose was produced together with cellobiose and cellotriose from cellotetraose. It seems that cellulosome produces final product, cellobiose, through coordinated regulation of activities of various subunits.