

Crystal Structure of Thiolase from *Clostridium butyricum*

Eun-Jung Kim and Kyung-Jin Kim*

School of Life Sciences, KNU Creative BioResearch Group, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received March 2, 2016 / Revised March 15, 2016 / Accepted March 15, 2016

Thiolase is an enzyme that catalyzes condensation reactions between two acetyl-CoA molecules to produce acetoacetyl-CoA. As thiolase catalyzes is the first reaction in the production of *n*-butanol, knowledge of the molecular and regulatory mechanism of the enzyme is crucial for synthesizing high-value biofuel. Thiolase from *Clostridium butyricum* (CbTHL) was expressed, purified, and crystallized. X-ray diffraction data were collected from the crystals, and the 3-dimensional structure of the enzyme was determined at 2.0 Å. The overall structure of thiolase was similar to that of type II biosynthetic thiolases, such as thiolase from *C. acetobutylicum* (CaTHL). The superposition of this structure with that of CaTHL complexed with CoA revealed the residues that comprise the catalytic and substrate binding sites of CbTHL. The catalytic site of CbTHL contains three conserved residues, Cys88, His349, and Cys379, which may function as a covalent nucleophile, general base, and second nucleophile, respectively. For substrate binding, the way in which CbTHL stabilized the ADP moiety of CoA was unlike that of other thiolases, whereas the stabilization of β -mercaptoethylamine and pantothenic acid moieties of CoA was quite similar to that of other enzymes. The most interesting observation in the CbTHL structure was that the enzyme was regulated through redox-switch modulation, using a reversible disulfide bond.

Key words : *Clostridium butyricum*, disulfide bond, redox-switch modulation, structure, thiolase

서 론

발효에 의한 *n*-butanol의 생산은 1861년 Louis Pasteur에 의해 처음 보고되었으며, 대량생산에 의한 산업화는 20세기 초 Chaim Weizmann에 의해 시도 되었다[18]. *Clostridium*에 의한 “acetone-butanol-ethanol”(ABE) 발효가 *n*-butanol의 생산을 위한 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다[7, 28]. 에너지 고갈, 기후변화 등의 문제가 세계적으로 심각한 문제를 야기하고 있는 시점에서 *n*-butanol의 생물공학적 생산은 최근 새로운 각광을 받고 있다. 이는 *n*-butanol이 ethanol에 비해 높은 열함유량을 가지고 있으며 휘발성, 폭발성이 낮고 기존의 가솔린이나 디젤유와 쉽게 혼합이 가능하다는 여러 장점을 가지고 있기 때문이다[2, 3, 16].

n-butanol은 혐기성 미생물인 *Clostridium* 속 미생물에서 acetyl-CoA로부터 6단계의 독립적인 효소에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다[8]. 지난 20년간 유전자로부터 생산공정에 이르기까지 *n*-butanol의 생산성을 향상시키기 위한 수많은 노력이 있어왔다. 하지만 이러한 노력에도 불구하고 *n*-butanol의 수율은 20 g/l에 머물러 있으며, 경쟁력 있는 상업화를 위하

여 이런 수율의 향상이 요구되고 있다[5]. *n*-butanol의 생합성 기작을 분자수준에서 이해하고 *n*-butanol의 수율을 향상시키기 위하여 *n*-butanol의 합성에 관여하는 유전자를 *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* 등의 산업적으로 이용되고 있는 미생물에 주입하여 *n*-butanol을 생산하는 연구도 진행되어 왔으며, 이러한 균주들은 그 생리학적 특성이 잘 규정되어 있고 균주 번이를 위한 여러 유전공학적 방법들이 발달되어 있기 때문이다[1, 26, 29].

Clostridium 속 균주들이나 이종의 균주에 의한 *n*-butanol의 생산성 향상을 위해서는 *n*-butanol의 생합성에 관여하는 핵심 효소들의 반응 및 조절기작의 이해가 반드시 필요하다[6, 15]. 최근 본 연구진에서는 acetyl-CoA acetyl transferase (THL) [13], 3-hydroxybutyryl-CoA reductase (HBD) [9], crotonase (CRT) [10] 등 *C. acetobutylicum* 유래 *n*-butanol의 생합성에 관여하는 효소들의 입체구조규명 및 생화학적 특성연구를 수행하였다. 이들 효소들 중 THL은 2분자의 acetyl-CoA를 acetoacetyl-CoA로 중합하는 반응을 수행하며 *n*-butanol의 생합성 첫 번째 반응에 관여하는 효소이다. 본 연구진에서 보고한 바와 같이 *C. acetobutylicum* 유래 THL (CaTHL)은 다른 균주 유래 THL과 달래 환경의 산화환원적 변화에 의해 가역적 이황화결합을 매개로 하는 산화환원스위치로 그 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이는 환원된 환경에서 CaTHL이 활성을 가지며 *n*-butanol이 합성되고 산화된 환경에서 비활성으로 전환되며 결과적으로 *n*-butanol의 합성이 저해되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 *C. acetobutylicum*과 같은 속에 속하면서 *n*-butanol의 합성능력을 가지고 있는 *C. butyricum* 유래

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5377, Fax : +82-53-955-5522

E-mail : kkim@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

THL (*Cb*THL)의 분자수준의 입체구조를 엑스선회절 방법을 통하여 규명하였으며, 이를 통하여 *Cb*THL이 *Ca*THL과 같이 환경의 산화환원적 변화에 따라 산화환원스위치로 그 기능을 조절하는 것을 보고한다.

재료 및 방법

*Cb*THL의 발현 및 정제

*Cb*THL를 암호화하는 유전자는 *C. butyricum* chromosomal DNA를 주형으로 사용하여 PCR방법을 통하여 증폭하였다 (Met1- Met 393, MW. 41 kDa). 증폭된 DNA 단편을 pQE30a 벡터에 클로닝하였으며 제한효소는 BamH1과 Xho1을 사용하였다. 재조합 단백질 클로닝을 위해 프라이머는 5'-GCGCG GGATCCATGAAA GACGTAGTTATAGTAAGCGC-3'와 5'-GCGCGCTCGAGTTACATTCTTTCAACGAT GACAGCAG-3'을 사용하였다. 클로닝된 플라스미드인 pQE30a:*Cb*THL을 *E. coli* B834균주에 주입하였으며, 100 mg/ml ampicillin 항생제를 LB배지에 주입하고 37°C에 인큐베이터에 키운다. O.D₆₀₀에서 0.6이 되면 1.0 mM 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)를 주입하고 22°C에서 20시간 키운다. 그리고 원심분리기 5,000x g로 4°C에서 15분 동안 균을 수확한다. 수확한 균을 버퍼 A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl)에서 잘 섞은 후 초음파분산기를 사용하여 균을 깨어준다. 그리고 난 후 세포 파괴물을 원심분리기에 11,000x g로 1시간 동안 제거해 준다. 그리고 난 뒤에 상층액을 Ni-NTA 아가로스 컬럼 (QIAGEN)에 결합시킨다. 버퍼 A에 20 mM imidazole을 첨가한 버퍼 A로 Ni-NTA에 결합된 단백질을 씻어주고 500 mM imidazole을 첨가한 버퍼 A를 사용하여 우리가 원하는 단백질만 일투선되어 나온다. 그 다음은 HiTrap Q 이온 교환 크로마토그래피와 사이즈 배제 크로마토그래피(GE Healthcare)를 수행한다. 깨끗하게 정제된 단백질은 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl이 들어 있는 버퍼 안에 단백질 농도는 30 mg/ml이며 -80°C 냉동고에 보관해두었다. SDS-PAGE로 정제된 단백질이 싱글밴드이며 사이즈는 41 kDa으로 확인할 수 있었다.

*Cb*THL의 결정화

고순도로 정제된 단백질을 결정화 하기 위해서 헵턴 리서치와 에메랄드 바이오시스템에서 판매되는 스크린 키트를 사용하여 hanging-drop vapor 확산 방법을 이용하여 22°C 인큐베이터에 보관해둔다. Hanging drop방법은 cover slip위에 정제된 단백질(농도 30 mg/ml, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM β-mercaptoethanol) 1.5 μl과 리저브 용액 1.5 μl를 1:1로 섞고 cover slip을 뒤집어 플레이트에 올리면 된다. 실험을 수행하기 전에 결정화 플레이트에 먼저 리저브 용액을 0.5 ml을 미리 분주해놓고 cover slip이 고정될 수 있도록 바세린을 발라준다.

10일이 지난 후 *Cb*THL의 결정을 현미경을 통해 볼 수 있었는데, 결정화 조건은 35% 2-methyl-2,4-pentanediol, 0.1 M imidazole pH 8.0, 0.2 M MgCl₂에서 결정을 만들었다.

*Cb*THL의 데이터 수집과 구조규명

*Cb*THL에 대한 결정화의 데이터 수집은 포항 가속기연구소 내에 7A 빔라인에서 실험을 수행하였고, QUANTUM 270 CCD detector(San Diego, CA, USA)를 사용하고 파장은 1 Å 이었다. *Cb*THL결정의 엑스레이 회절은 해상도 2.0Å으로 데이터를 수집할 수 있었다. 수집한 데이터는 index, integration, scale과정을 *HKL2000* 프로그램을 사용하여 수행하였다[27]. 그 결과 *Cb*THL의 공간군(Space group)은 *P*2₁2₁이며, 단위 격자의 크기는 a=95.132, b=116.096, c=169.832이며 α=β=γ=90°였다. 1개의 비대칭 단위에 4개 분자가 존재하며 Matthews coefficient는 2.32 Å³ Da⁻¹이며 대략, 용매 함유율은 47%이다. *Cb*THL의 구조는 유사한 *Ca*THL (아미노산 서열 유사성이 73%)을 기반으로 *MOLREP*을 사용한 분자 대체 방법으로 규명하였다[17]. 그리고 모델빌딩은 *COOT* 프로그램을 사용하여 수행하고, *CCP4*에 *REFMAC5* 프로그램을 동시에 사용하여 구조를 규명할 수 있었다[4, 25, 30].

결과 및 고찰

*Cb*THL의 생산 및 결정구조규명

*Cb*THL의 입체구조 규명을 위하여 pQE30a 벡터 시스템을 이용하여 *E. coli*에서 발현하고, Ni-NTA, size-exclusion chromatography방법을 이용하여 순도 95 % 이상의 단백질을 대량생산하였다. 정제된 *Cb*THL의 단백질을 사용하여 결정화를 시도하였으며 35% 2-methyl-2,4-pentanediol, 0.1 M imidazole pH 8.0, 0.2 M MgCl₂ 조건에서 양질의 결정성장에 성공하였다. 엑스선회절 데이터는 포항방사광가속기에서 획득하였으며, 본 연구진에서 규명한 *Ca*THL의 입체구조를 모델로 사용하여 *Cb*THL의 입체구조를 2.0 Å 해상도로 규명하였다. *Cb*THL의 입체구조는 엑스선결정학적 통계치에 모두 부합하며, Table 1에 상세히 기술되어 있다.

*Cb*THL의 전체적 구조

규명된 *Cb*THL의 구조를 보면, 하나의 비대칭단위 안에 4개의 *Cb*THL의 분자가 존재하고 있으며 이는 size-exclusion chromatography 결과에서 보는 것과 같이 *Cb*THL이 4중합체로 존재한다는 것을 알 수 있다(Fig. 1). *Cb*THL의 전체적 입체구조는 *Ca*THL과 매우 유사하며 본 연구진에서 규명한 THL종인 *ReBktB* [11], *RePahA* [12] 등과도 매우 유사하다. *Cb*THL의 입체구조는 3개의 뚜렷이 구분되는 3개의 도메인으로 구성되어 있는데, 카복실도메인, 아미노도메인, 그리고 고리도메인이다. 카복실도메인은 효소반응이 주로 일어나는 부위를 포

Table 1. Data collection and refinement statistics

CbTHL	
Data collection	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	95.132, 116.096, 169.832
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	50.00-2.02 (2.09-2.02)*
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{merge}	7.0 (24.0)
<i>I</i> / <i>σI</i>	28.95 (4.72)
Completeness (%)	94.4 (89.0)
Redundancy	4.7 (4.0)
Refinement	
Resolution (Å)	95.84-2.02
No. reflections	110923
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	21.3 / 25.0
No. atoms	11523
Protein	11335
Ligand/ion	0
Water	286
<i>B</i> -factors	32.668
Protein	
Ligand/ion	
Water	
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.416
Bond angles (°)	0.028

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

함하고 있어 중심도메인이라고 부를 수도 있으며 고리도메인은 아미노도메인과 카복실도메인 사이에 존재하고 있다. 아미노도메인과 카복실도메인은 알파헬릭스와 베타스트랜드의 조합으로 구성되어 알파-베타-알파-베타-알파 구조를 형성하고 있으며, 전형적인 THL 단백질 family의 기하학적 구조를 보여주고 있다[19, 23]. 아미노도메인에는 6개의 베타스트랜드가 베타평면을 구조를 보여주고 있으며 이 4개의 알파헬릭스가 베타평면을 감싸고 있는 형태를 취하고 있다[20, 21]. 카복실도메인도 아미노도메인과 유사한 구조를 취하고 있으며 4개 알파헬릭스가 베타평면구조를 감싸고 있다[22, 26]. 고리도메인은 4개의 알파헬릭스와 3개의 베타스트랜드로 구성된 짧은 베타평면으로 구성되어 있으며 삼각형 구조를 취하고 있다[23]. 특히, 이 도메인은 4중합체 형성을 위한 아미노산 서열을 포함하고 있다.

CbTHL의 활성부위

기존에 보고된 THL 구조연구에 의하면, THL 단백질은 2개의 시스틴 잔기를 활성화 잔기로 사용하는 것으로 알려져 있으며, CbTHL의 구조에서도 2개의 잘 보존된 시스틴 잔기가 활성부위를 구성하는 것으로 보인다. CbTHL에서는 Cys88 잔기와 Cys379 잔기가 활성화 잔기로 사용되고 있으며, 이들 잔

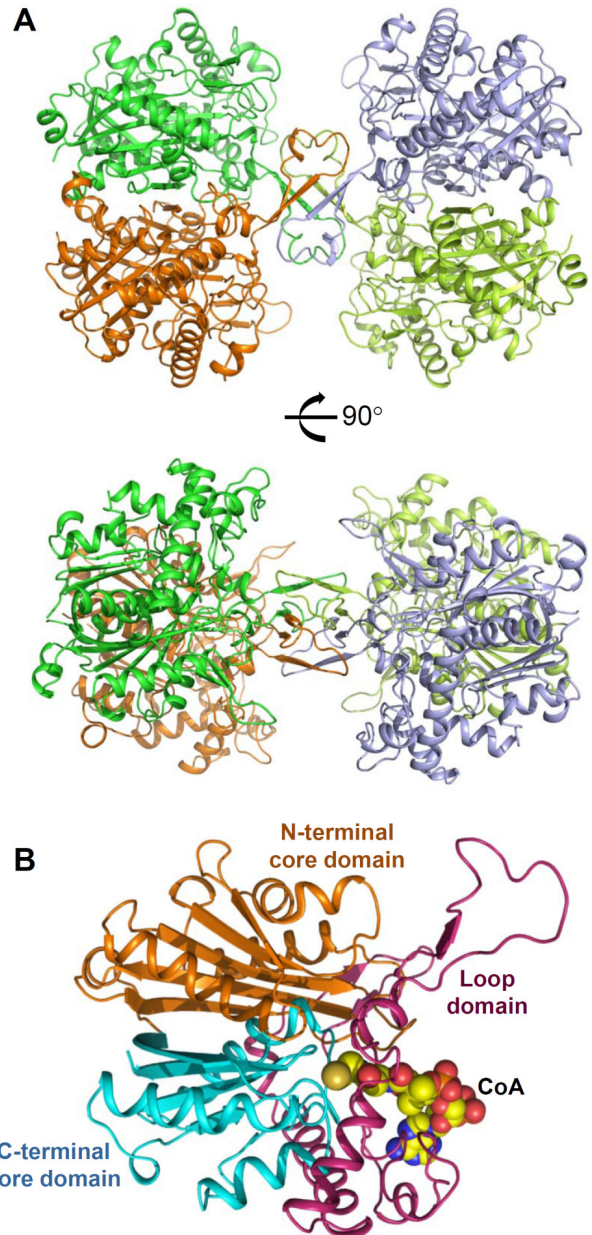


Fig. 1. Structure of CbTHL. (A) Tetrameric structure of CbTHL. The tetrameric structure of CbTHL is shown as a cartoon diagram. Each monomer is distinguished with different colors. (B) Monomeric structure of CbTHL. The monomeric structure of CbTHL is shown as a cartoon diagram. The N-terminal, the C-terminal, and the Loop domains are highlighted with colors of orange, cyan, and hot red, respectively. The CoA molecule is shown as a sphere model.

기는 각각 고유결합친핵체와 2번째 친핵체의 역할을 수행하는 것으로 보인다. 이들 잔기는 대부분의 THL 중에서 잘 보존되어 있으며 이들 잔기의 활성화잔기로서의 역할을 뒷받침해주고 있다. CbTHL에서는, Cys88 잔기가 아미노도메인의 3번 베타스트랜드와 3번 알파헬릭스의 연결고리에 위치하고 있으

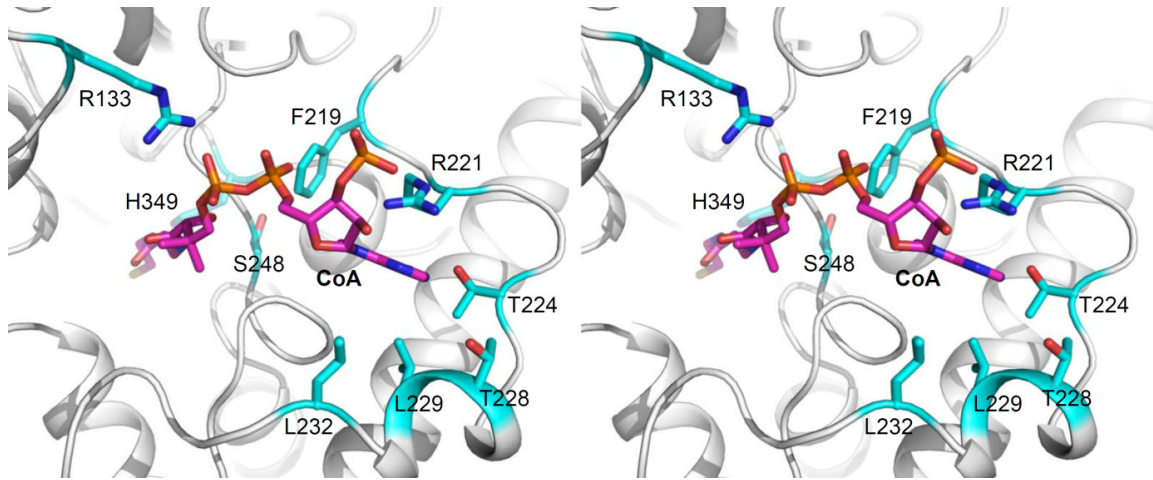


Fig. 2. Stereo view of substrate binding mode of *Cb*THL. The *Cb*THL structure is shown as a cartoon diagram. The CoA molecule is shown as a stick model with magenta color. The residues involved in the CoA binding are shown as stick models with cyan color, and labeled appropriately.

며, Cys379는 카복실도메인의 12번 베타스트랜드 위에 위치하고 있다. 게다가, His349 잔기가 Cys88 잔기와 매우 근접거리에 위치하고 있으며 중합반응에서 일반염기로 작용하는 것으로 보인다. 타 THL에서도 비슷한 위치에 히스티딘 잔기가 위치하고 있다. 이러한 구조적 관찰은 *Cb*THL이 타 THL과 매우 유사한 방법으로 반응을 일으키는 것으로 해석할 수 있다.

***Cb*THL의 기질결합부위**

비록 acetyl-CoA와의 복합체구조 규명에 실패하였지만 기존에 규명된 *Ca*THL/acetyl-CoA 복합체와의 구조적 특성을 통하여 기질안정화에 관여하는 잔기를 확인할 수 있다. β-mercaptoethylamine와 pantothenic acid 부분의 안정화를 위해서 Ser248의 사이드체인 hydroxyl-기와 메인체인 carbonyl-기가 수소결합으로 관여하고 있으며 His156 잔기도 수소결합으로 안정화를 도와주고 있다. Pyrophosphate 부분은 주로 Arg133 잔기에 의해 안정화 되어 있으며 이 잔기는 4중합체 형성에 의해 도입되는 주변 소단위에 의해 제공되고 있다. Ribose ring에 공유결합하고 있는 phosphate 부분은 Arg221 잔기와 수소결합에 의해 안정화 되어 있다. Adenine ring은 소수성을 포함하는 포켓에 안정화 되어 있으며, 이 포켓은 Thr224, Thr 228, Leu229, Lue232, Ala243 잔기에 의해 형성되고 있다. 이러한 CoA 안정화 잔기들은 타 THL과는 상당히 다른 양상을 보여주고 있으며, *Ca*THL과 비교해도 약간의 차이를 보여주고 있다. 특히, adenine ring의 안정화에 관여하는 잔기는 *Ca*THL과도 매우 상이한 양상을 보여주고 있다(Fig. 2).

***Cb*THL의 산화환원스위치**

*Cb*THL의 입체구조에서 가장 주목할 부분은 환원제가 첨가된 결정화 조건에서도 두개의 활성화 잔기인 Cys88와 Cys379 사이에 이황화결합이 형성되어 있다는 것이다. 이러한 이황화결

합의 형성은 *Ca*THL을 제외한 타 THL에서는 발견되지 않은 것이며, *Cb*THL이 *Ca*THL과 유사한 구조적 특징을 가지는 것으로 이해할 수 있다. Cys88와 Cys379간에 이황화결합의 형성은 Cys379 잔기가 위치하는 베타스트랜드 부위에 큰 구조변형을 유도하고 있으며, 이 부분의 구조변형은 *Ca*THL에서 관측된 조절결정부위에서의 구조변형을 동반하고 있다. 이황화결합이 형성된 *Cb*THL의 구조를 산화된 환경에서의 *Ca*THL과 겹치기를 해보면 매우 유사하게 구조변형이 유도되는 것을 알 수 있다. *Cb*THL의 구조에서 관측된 이러한 구조적 특징은 이 단백질이 *Ca*THL과 유사하게 환경에 산화환원적 변화에 따라 가역적 이황화결합을 형성함으로써 그 기능을 조절하는 산화환원스위치 기작을 가지고 있다는 증거이다(Fig. 3). 여기

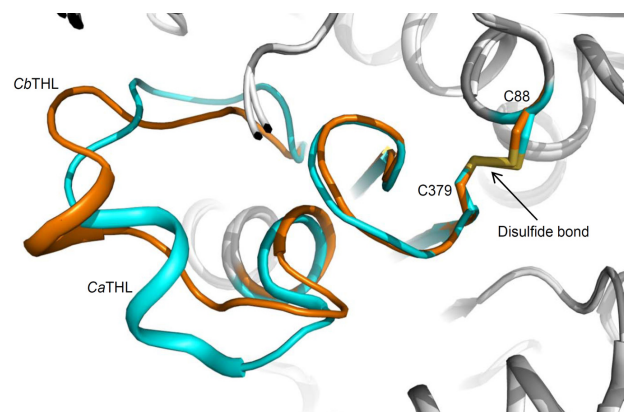


Fig. 3. Redox-switch modulation of *Cb*THL. The *Cb*THL structure is superposed with the oxidized form of *Cb*THL. The regions that undergo structural changes upon the formation of disulfide bond are shown as orange and cyan colors for *Cb*THL and *Ca*THL, respectively. The disulfide bond and two cysteine residues forming the disulfide bond are shown as stick models.

서 주목해야 할 사실은 기존에 규명된 THL은 주로 호기성균주 유래라는 것이다. 유일하게 혐기성균주 유래 THL은 *Ct*THL이다. 이러한 사실은 혐기성균주 유래 THL은 환경의 산화환원적 변화에 따라 그 기능을 조절하는 산화환원스위치로 기능을 조절하는 것을 의미하며 호기성균주 유래 THL은 이와 달리 이황화결합을 형성하지 않고 비교적 환경의 산화환원적 변화에 둔감하다는 것을 의미한다. 본 연구는 THL의 조절기작이 산소의 민감도가 다른 균주에 따라 다르다는 것을 보여주는 중요한 결과를 보여주고 있으며 *n*-butanol의 생산성 증가를 위한 중요한 구조적 정보도 제공해 줄 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 신입교수정착연구비에 의하여 연구되었음.

References

- Atsumi, S., Hanai, T. and Liao, J. C. 2008. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451**, 86-89.
- Durre, P. 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol. J.* **2**, 1525-1534.
- Durre, P. 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**, 353-362.
- Emsley, P. and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132.
- Ezeji, T., Milne, C., Price, N. D. and Blaschek, H. P. 2010. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1697-1712.
- Felnagle, E. A., Chaubey, A., Noey, E. L., Houk, K. N. and Liao, J. C. 2012. Engineering synthetic recursive pathways to generate non-natural small molecules. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 518-526.
- Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N. and Yukawa, H. 2008. Expression of clostridium acetobutylicum butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 1305-1316.
- Jones, D. T. and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**, 484-524.
- Kim, E. J., Kim, J., Ahn, J. W., Kim, Y. J., Chang, J. H. and Kim, K. J. 2014. Crystal structure of (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from clostridium butyricum and its mutations that enhance reaction kinetics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1636-1643.
- Kim, E. J., Kim, Y. J. and Kim, K. J. 2014. Structural insights into substrate specificity of crotonase from the n-butanol producing bacterium clostridium acetobutylicum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **451**, 431-435.
- Kim, E. J., Son, H. F., Kim, S., Ahn, J. W. and Kim, K. J. 2014. Crystal structure and biochemical characterization of beta-keto thiolase B from polyhydroxyalkanoate-producing bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 365-369.
- Kim, E. J. and Kim, K. J. 2014. Crystal structure and biochemical characterization of PhaA from *Ralstonia eutropha*, a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 124-129.
- Kim, S., Jang, Y. S., Ha, S. C., Ahn, J. W., Kim, E. J., Lim, J. H., Cho, C., Ryu, Y. S., Lee, S. K., Lee, S. Y. and Kim, K. J. 2015. Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from clostridium acetobutylicum. *Nat. Commun.* **6**, 8410.
- Kursula, P., Sikkilä, H., Fukao, T., Kondo, N. and Wierenga, R. K. 2005. High resolution crystal structures of human cytosolic thiolase (CT): a comparison of the active sites of human CT, bacterial thiolase, and bacterial KAS I. *J. Mol. Biol.* **347**, 189-201.
- Lee, S. K., Chou, H., Ham, T. S., Lee, T. S. and Keasling, J. D. 2008. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 556-563.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. and Jung, K. S. 2008. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 209-228.
- Matthews, B. W. 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- Mitchell, W. J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 31-130.
- Mathieu, M., Zeelen, J. P., Pauptit, R. A., Erdmann, R., Kunau, W. H. and Wierenga, R. K. 1994. The 2.8 Å crystal structure of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: a five-layered alpha beta alpha beta alpha structure constructed from two core domains of identical topology. *Structure* **2**, 797-808.
- Mathieu, M., Zeelen, J. P., Pauptit, R. A., Erdmann, R., Kunau, W. H. and Wierenga, R. K. 1997. The 1.8 Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* **273**, 714-728.
- Meriläinen, G., Poikela, V., Kursula, P. and Wierenga, R. K. 2009. The thiolase reaction mechanism: the importance of Asn316 and His348 for stabilizing the enolate intermediate of the Claisen condensation. *Biochemistry* **48**, 11011-11025.
- Meriläinen, G., Schmitz, W., Wierenga, R. K. and Kursula, P. 2008. The sulfur atoms of the substrate CoA and the catalytic cysteine are required for a productive mode of substrate binding in bacterial biosynthetic thiolase, a thioester dependent enzyme. *FEBS J.* **275**, 6136-6148.
- Modis, Y. and Wierenga, R. K. 1999. A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: the crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure* **7**, 1279-1290.
- Modis, Y. and Wierenga, R. K. 2000. Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *J. Mol. Biol.* **297**, 1171-1182.

25. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255.
26. Nielsen, D. R., Leonard, E., Yoon, S. H., Tseng, H. C., Yuan, C. and Prather, K. L. 2009. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab. Eng.* **11**, 262-273.
27. Otwinowski, Z. and Minor, W. 1997. Processing of X-ray diffraction data. *Methods Enzymo.* **276**, 307-326.
28. Papoutsakis, E. T. 2008. Engineering solventogenic clostridia. *Curr.Opin. Biotechnol.* **19**, 420-429.
29. Steen, E. J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C. J., Redding, A., Ouellet, M. and Keasling, J. D. 2008. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb. Cell Fact.* **7**, 36.
30. Vagin, A. and Teplyakov, A. 2010. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22-25.

초록 : *Clostridium butyricum* 유래 Thiolase의 입체구조규명 연구

김언정 · 김경진*

(경북대학교 생명과학부)

Thiolase는 두 분자의 acetyl-CoA를 중합하여 acetoacetyl-CoA를 생산하는 효소이다. 우리는 *Clostridium butyricum* 유래 thiolase (CbTHL)를 대장균에서 발현하고, 대량으로 정제하여 결정화에 성공하였다. 성장된 결정을 이용하여 엑스선회절 데이터를 획득하였으며, 3차원 입체구조를 2.0 Å으로 규명하였다. 전체적인 구조는 *C. acetobutylicum* 유래 thiolase (CaTHL)와 같은 type II biosynthetic thiolase와 매우 유사하다는 것을 확인하였다. CbTHL 구조를 CaTHL/CoA 복합체구조와 겹치기를 함으로써 활성화 잔기와 기질결합에 관여하는 잔기를 밝혀낼 수 있었다. CbTHL의 활성화부위는 3개의 잘 보존된 잔기인 Cys88, His349, Cys379로 구성되어 있으며, 이들 잔기는 각각, 공유결합친핵체, 일반염기, 2번째 친핵체의 역할을 하는 것으로 보인다. CbTHL에서 기질결합은, β-mercaptoethyamine과 pantothenic acid 부위는 타 thiolase와 매우 유사한 방법으로 안정화 되지만, ADP 부분은 타 thiolase와는 달리 매우 특이적인 잔기들을 사용한다. CbTHL 구조에서 가장 특징적인 것은 본 단백질이 가역적 이황화결합을 매개로 산화환원스위치를 통하여 그 활성을 조절한다는 것이다.