

Isoprenoid Quinone Profiles와 미생물 분류

신용국 · 이정숙 · 이근철 · 전창욱 · 김홍중 · 주우홍* · 이재동** · 박용하†

한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행
창원대학교 자연과학대학 생물학과*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과**

Isoprenoid Quinone Profiles in Microbial Taxonomy

Yong Kook Shin, Jung-Sook Lee, Keun Chul Lee, Chang Ouk Chun,
Hong-Joong Kim, Woo-Hong Joo*, Jae-Dong Lee** and Yong-Ha Park†

*Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea**
*Department of Biology, College of Natural Science, Changwon National University, Changwon, 641-773, Korea**
*Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea***

태양계에 원시 지구가 탄생된 이후, 약 45억년간의 진화 과정을 거치면서 현재 우리가 살고있는 지구가 형성되어졌다. 이 지구상에는 현재 수많은 종류의 생물들이 서로 공존하고 있으며, 지금 이 순간에도 끊임없는 진화과정을 통하여 새로운 종이 탄생하고 있다. 인류는 고대부터 이러한 여러가지 생물들을 분류해 왔으며, 18세기 스웨덴의 박물학자 Linne의 이명법(binominal nomenclature)이후 형태학적 분류방법이 주류를 이루어 왔다. 그러나, 동·식물과는 다르게 형태가 단순한 세균의 경우 형태학적 분류방법이 어려우므로, Kluver와 van Niel¹⁾은 형태 및 생화학적 특징으로 세균을 분류할 것을 제안했다. 또한 최근의 분석기기 및 컴퓨터의 발달은 미생물의 화학분석을 가능하게 하였으며, 이러한 생물정보의 데이터베이스화를 가능하게 하였다. 미생물의 화학분류학적 특성 가운데 중요한 성분 중의

하나인 isoprenoid quinone은 생물의 respiratory chain 혹은 광합성에 의한 전자전달계의 필수 지용성 성분으로서 생물계에 폭 넓게 존재하며, 생리학적으로도 매우 중요하다^{2,3)}. 진핵생물의 경우 isoprenoid quinone은 mitochondria에 존재하며, 원핵생물의 경우 세포막에 존재한다. 이러한 isoprenoid quinone은 benzene 핵의 골격구조에 의해 naphthoquinone과 benzoquinone으로 크게 나누어진다.(Fig. 1). Naphthoquinone에는 대표적으로 menaquinone^{2,4)}이 있으며, 그 외에도 demethylmenaquinone⁵⁾, thermoplasmaquinone⁶⁾, methionaquinone⁷⁾, chlorobiumquinone⁸⁾이 보고되고 있다. Benzoquinone에는 대표적으로 ubiquinone이 있으며, 그 외에도 rhodoquinone⁹⁾, caldariellaquinone¹⁰⁾, epoxyubiquinone이 보고되고 있다. 또한 benzene 핵의 골격구조에 따른 차이 외에도, isoprenoid 단위의 측쇄가

† Corresponding author ; Yong-Ha Park

Mailing address : Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea.

Phone) +82-42-860-4620

Fax) +82-42-860-4625

Electronic mail address) yhpark@biosys.geri.re.kr

Fig. 1. Isoprenoid quinones found in microorganisms.

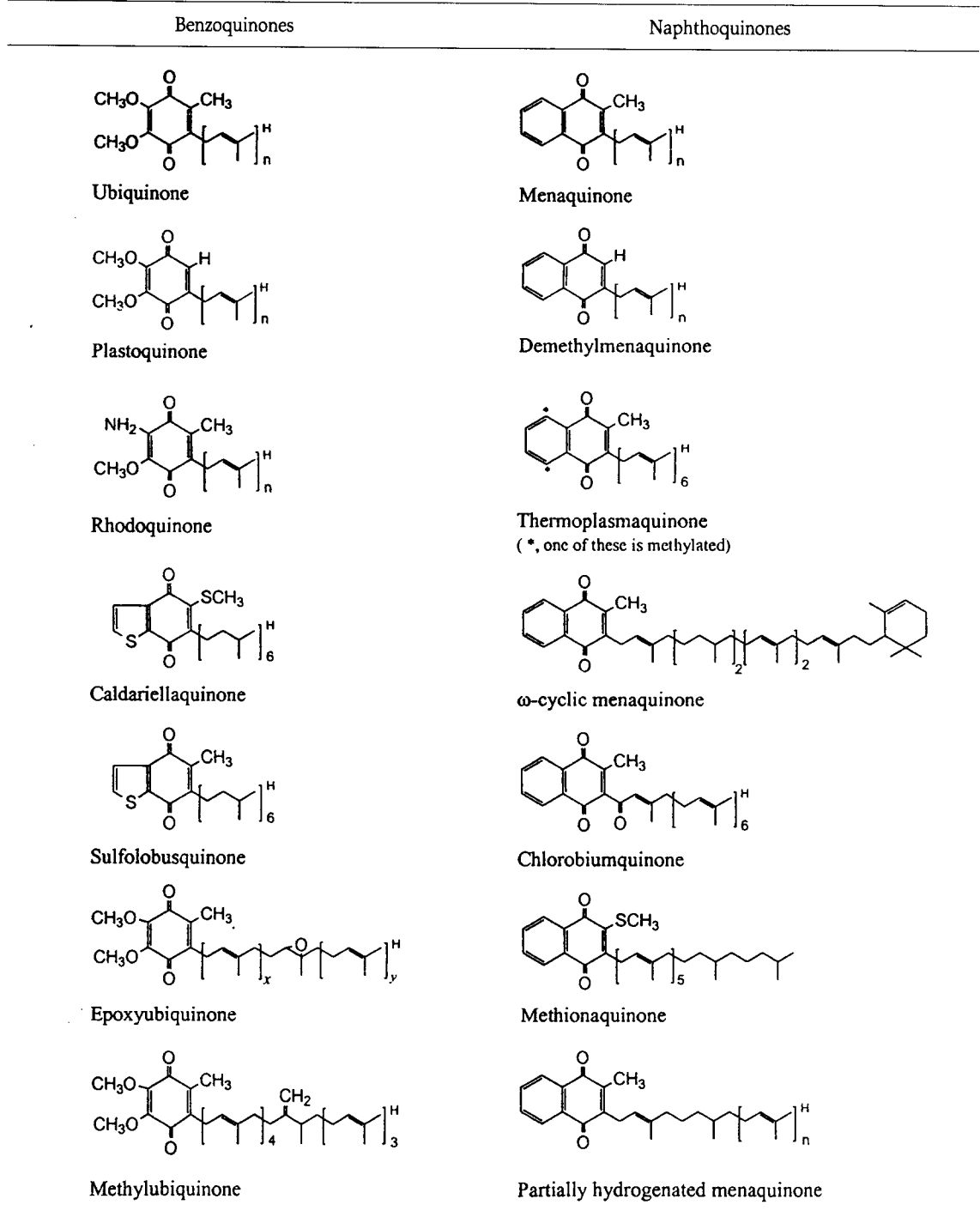


Table 1. Quinone profiles of the *Eubacteria*

Taxon	Main Quinone system
Proteobacteria	
α -Subclass	
<i>Agrobacterium</i>	Q-10
<i>Caulobacter</i>	Q-10
<i>Erythrobacter</i>	Q-10
<i>Gluconobacter</i>	Q-10
<i>Paracoccus</i>	Q-10
<i>Rhodobacter</i>	Q-10+RQ-10
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	Q-10+RQ-10
<i>Rhodoplanes roseus</i>	Q-10+RQ-10
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	Q-10+RQ-10+MK-10
<i>Rhodospirillum salexigens</i>	Q-10+MK-10
β -Subclass	
<i>Alcaligenes</i>	Q-8
<i>Brachymonas</i>	Q-8+RQ-8
<i>Comamonas</i>	Q-8
<i>Hydrogenophaga</i>	Q-8
<i>Rhocyclus</i>	Q-8+MK-8
<i>Rhodoferax</i>	Q-8+RQ-8
<i>Rhodospirillum photometricum</i>	Q-8+RQ-8
<i>Zoogloea</i>	Q-8+RQ-8
γ -Subclass	
<i>Acinetobacter</i>	Q-9
<i>Azotobacter</i>	Q-8
<i>Chromatiaceae</i>	Q-8+MK-8
<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	Q-7+MK-7, Q-8+MK-8
<i>Enterobacteriaceae</i>	Q-8+MK-8+DMK-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q-9
<i>Vibrio</i>	Q-8+MK-8(+DMK-8)
δ -Subclass	
<i>Desulfobulbus</i>	MK-5(H ₂)
<i>Desulfococcus</i>	MK-7
<i>Desulfovibrio</i>	MK-6, MK-6(H ₂)

Table 1. (Continued)

Taxon	Main Quinone system
Gram(+) bacteria	
Low G+C group	
<i>Bacillus</i>	Mk-7
<i>Clostridium</i>	MK-7
<i>Enterococcus</i>	MK-8, DMK-9
<i>Marinococcus</i>	MK-7
<i>Staphylococcus</i>	MK-7
High G+C group	
<i>Arthrobacter</i>	MK-9(H ₂)
<i>Aureobacterium</i>	MK-11 + 12
<i>Corynebacterium</i>	MK-8(H ₂), MK-9(H ₂)
<i>Mycobacterium</i>	MK-9(H ₂)
<i>Streptomyces</i>	MK-9(H ₆) + MK-9(H ₈)
<i>Tsukamurella</i>	MK-9
Cyanobacteria	
<i>Nostoc</i>	PQ-9 + K ₁
<i>Synechococcus</i>	PQ-9 + K ₁
Spirosoma group	
<i>Spirosoma</i>	MK-7
<i>Flectobacillus</i>	MK-7
Bacteroides/Flavobacteria group	
<i>Bacteroides</i>	MK-10 + 11
<i>Capnocytophaga</i>	MK-6
<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	MK-6, MK-7
<i>Sphingobacterium</i>	MK-7
Others	
<i>Chlorobium</i>	MK-7 + CK
<i>Chloroflexus</i>	MK-8 + 8
<i>Deinobacter</i>	MK-8
<i>Deinococcus</i>	MK-8
<i>Thermus</i>	MK-8

Q-n, ubiquinone-n ; RQ-n, rholoquinone-n, PQ-n, plastoquinone-n, MK-n, menaquinone-n ; DMK-n, demethylmenaquinone-n ; MMK-n, methylmenaquinone-n ; K₁, phylloquinone(vitamine K₁) ; CK, chlorobiumquinone

몇 개 결합되어 있는가, 또 isoprenoid 측쇄의 일부가 수소 원자로 포화되어지는 정도에 의해 quinone의 분자종이 결정되어진다. 특히 Gram(-)세균은 ubiquinone(UQ)을, Gram(+)세균은 menaquinone(MK)을 주로 함유하고 있으므로, 미생물 동정에 중요한 Gram염색이 어려운 균주의 경우 isoprenoid quinone 분석을 통해 쉽게 Gram(-)균과 Gram(+)균을 구별할 수 있다. 통성혐기성균으로 알려진 *E. coli*¹¹⁾는 UQ, MK 그리고, demethylmenaquinone(DMK)을, 해양성세균인 *Schewanella*¹³⁾는 UQ, MK, 그리고 methylmenaquinone(MMK)을 함유하고 있다. Rhodokinone(RQ)은 UQ를 전구체로 하여 생합성 되어지는 quinone으로서, 광합성세균의 일부^{11,12)} 및 황성슬러지에서 분리된 전형적인 *Zoogloea*^{11,13)} 및 *Brachymonas*속 세균¹⁴⁾에서, 다른 quinone과 함께 존재한다. 이와같이 quinone은 미생물의 신속동정을 위한 key marker로서 활용되고 있다.

Quinone 분석방법

1) 원핵생물

원핵생물(세균, 방선균 등)의 경우, isoprenoid quinone은 세포막에 존재하며, isoprenoid quinone의 분석을 위해 약 200~300ml의 액체배지에 진탕배양한다. 일반적으로 균의 생육이 정지기 초기에 도달하면 집균하여, 50mM의 potassium-phosphate buffer로 세척한 후 quinone을 분석하거나, -20℃에서 보존하여 필요시 사용한다. 이 집균체에 chloroform/methanol(2 : 1, v/v) 20ml을 넣고 10분간 잘 흔들어, 세포막에 존재하는 isoprenoid quinone을 추출한다. 추출액은 종이여과지(110 mmφ, No. 2, Whatman, England)를 이용하여 여과한다. 여과액을 vacuum rotary evaporator에서 농축한다. 이 과정을 3번 되풀이하여 isoprenoid quinone을 완전히 추출한다. 이 evaporator flask에 hexane 2ml와 증류수 2ml를 넣고 흔들어, flask 벽면에 붙어있는 농축 quinone이 hexane층에 잘 추출되어 나오게 한다. 이 flask를 실온에 2~3분 정치하면, 수층과 hexane층으로 나뉘어진다. 이 때 상등액인 hexane층만을 다른 evaporator flask에 옮겨 농축한다. 이 과정을 3번 되풀이하여 isoprenoid quinone을 농축한다. 최종적으로 상등액을 농축한 evaporator flask에 소량의 acetone을 넣고, 이것을 silica-gel의 Thin Layer Chromatography(TLC)(Merck Kiesel-gel 60 F₂₅₄, 0.5mm thickness)에 spot하여 petro-

leum benzene/diethylether(9 : 1, v/v) 전개액으로 전개시킨다. 전개후 UV 254nm에서 isoprenoid quinone band를 확인하고, silica-gel TLC에서 그 band를 긁어내어 eppendorf tube에 모아서 소량의 acetone를 넣고 잘 섞은 다음 4℃에서 15,000rpm으로 10분간 원심분리한다. 원심 분리후 상등액만을 깨끗한 tube에 모은다. 이 과정을 3번 되풀이 한다. 모은 상등액을 질소가스로 농축하여 유리로 된 microtube에 옮겨서 시료로 사용한다. 추출된 quinone은 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 분석한다.

2) 진핵생물

진핵생물(효모, 곰팡이 등)의 경우, isoprenoid quinone은 mitochondria에 존재한다. 따라서 isoprenoid quinone의 추출은 세균에서와는 다른 방법이 사용된다. 균을 액체 배지에 접종 후, 균의 생육이 정지기의 초기에 도달하면 집균하여, 50mM의 potassium-phosphate buffer로 세척한 후 동결건조한다. 1.5~2.5g의 건조균체를 500ml의 배지병(screw-capped bottle, pyrex)에 넣은 후, 물 50ml, methanol 150ml, pyrogallol 5g, sodium hydroxide 20g을 넣고 잘 녹인 후, 뚜껑을 닫는다. 중탕으로 90℃에서 1시간 동안 열을 가하면서 반응을 시킨다. 가끔, 배지병을 흔들어 반응액의 균일성을 유지한다. 반응이 끝나면 흐르는 수도물에서 실온까지 냉각한 후, 100ml의 hexane을 넣고 격렬하게 흔들어, 반응액에 추출된 isoprenoid quinone을 hexane층으로 옮겨 분리를 쉽게 한다. 배지병을 정치시킨 후 2개의 층으로 분리되면, 상등액인 hexane 층을 pasteur pipet으로 evaporator flask에 옮긴 뒤, evaporator로 건조시킨다. 다시 100ml의 hexane을 넣고 위의 방법을 3번 반복하여 isoprenoid quinone의 추출을 행한다. hexane층을 evaporator로 완전히 건조시킨 후, 소량의 acetone을 evaporator flask에 넣어 isoprenoid quinone을 추출한 후, TLC에 전개하여 isoprenoid quinone을 분리 정제한다. 이 이후의 방법은 원핵생물에서의 추출방법과 동일하다.

3) HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석

HPLC사용법은 각 제조회사에 따라 다르지만, 다음과 같은 조건으로 isoprenoid quinone을 분석한다. HPLC분석시

column의 길이는 가능한한 4.6 x 250mm 정도의 것이 분리 능이 우수하다. eluent : methanol-isopropyl ether(3 : 1, [v/v] for ubiquinone ; 4 : 1, [v/v] for menaquinone), 유속 : 1ml/min ; 검출파장 : 270nm for menaquinone, 275nm for ubiquinone, 283nm for rhodoquinone.

isoprenoid quinone을 분석하기 위해 필요한 standard는 Sigma Chemicals Co.에서 구입이 가능하며, 혹은 기존의 보고되어진 균주에서 추출하여 사용하면 된다.

4) Quinone의 standard

5) HPLC chromatography의 분석

HPLC로 quinone 정제 샘플을 분석한다(Fig. 2). Peak의 동정은 retention time에 의해 이루어지므로, 이를 위해서

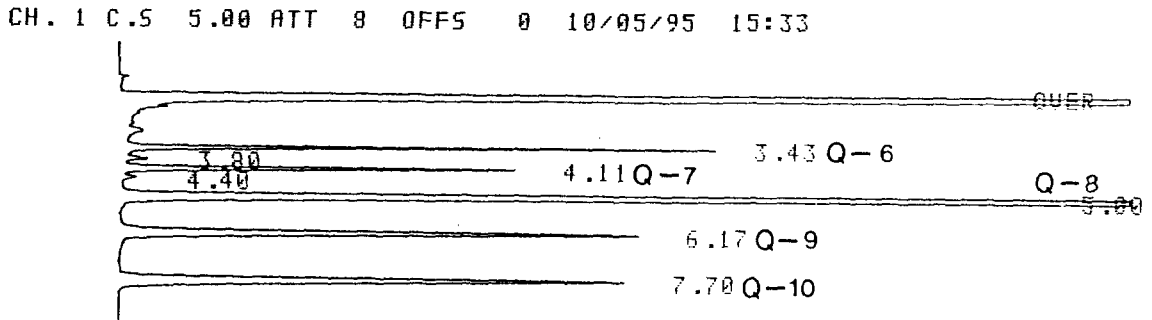


Fig. 2. High-performance liquid chromatography of ubiquinone standard.

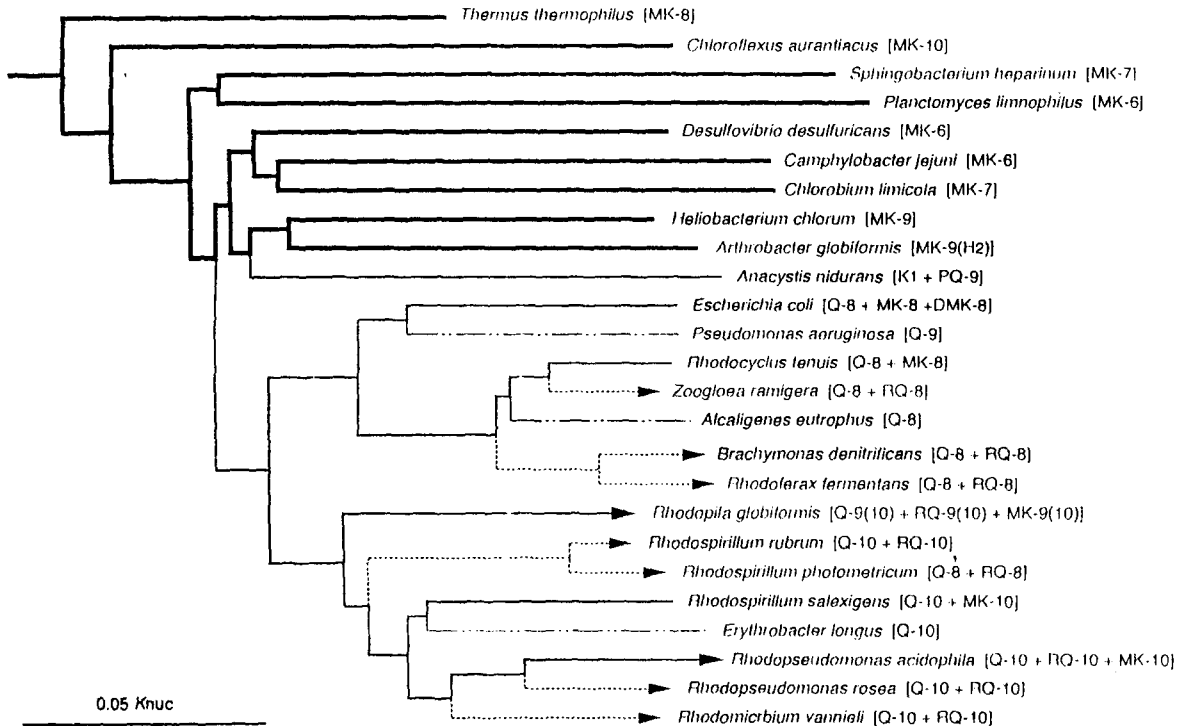


Fig. 3. Distribution of isoprenoid quinones and the phylogenetic relationships in the bacterial members with various quinone types.

는 column의 일정 온도유지 및 eluent의 유속을 정확히 유지하여야 한다.

6) Isoprenoid quinone system과 분자계통학적 관계

Fig. 3은 isoprenoid quinone의 type와 세균의 16S ribosomal RNA의 염기서열에 의한 분자진화학적 위치와의 상관관계를 나타내고 있다¹⁴⁾. Quinone의 화학진화는 세균의 분자진화와 깊은 관련성을 나타내고 있으므로, quinone을 분석하면 미생물의 계통학적 유연관계를 추정할 수 있다.

Quinone분석법이 과거에 비하면, 정성적·정량적 뿐만 아니라 시간적·경제적으로도 많이 개선되고 있다. 그 결과 얻어지는 quinone의 데이터를 다른 화학분류학적·분자생물학적 데이터와 함께 분석함으로써, 미생물의 신속하고 정확한 동정·분류에 응용이 가능하다.

참 고 문 헌

1. Kluver, A. J. and van Niel, C. B. *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg.* II. 94, 369-403(1936)
2. Collins, M. D. and Jones, D. *Microbiol. Rev.* 45, 316-354(1981)
3. Collins, M. D. In *Methods in Microbiology*, Vol. 18, G. Gottschalk(ed.), pp. 329-366. Academic Press, London(1985)
4. Kroppenstedt, R. M. In *Chemical methods in bacterial systematics*, Goodfellow, M. and Minnikin, D. E.(ed), pp. 173-199. Academic Press, London(1985)
5. Collins, M. D. and Jones, D. J. *Gen. Microbiol.* 114, 27-33(1979)
6. Carlone, G. M. and Anet, F. A. L. *J. Gen. Microbiol.* 128, 3385-3393(1983)
7. Ishii, M., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., and Minoda, Y. *Agric. Biol. Chem.* 47, 167-169(1983)
8. Redfearn, E. R. and Powls, R. *Biochem. J.* 106, 50p(1968)
9. Moore, H. W. and Folkers, K. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 567-570(1966)
10. De Rosa, M., De Rosa, S., Gambacorta, A., and Bu'Lock, J. D. *Phytochemistry* 19, 249-254(1980)
11. Hiraishi, A., Shin, Y. K., and Sugiyama, J. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 170-173(1992)
12. Akagawa-Matsushita, M., Itoh, T., Katayama, Y., Kuraishi, H., and Yamasato, K. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2275-2281(1992)
13. Hiraishi, A., Shin, Y. K., Komagata, K., and Sugiyama, J. *Antonie van Leeuwenhoek* 61, 231-236(1992)
14. Hiraishi, A., Shin, Y. K., and Sugiyama, J. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41, 99-117(1995)