

Neurospora crassa 유전자에 의한 *Saccharomyces cerevisiae coq7* 돌연변이의 회복

김은정 · 김상래 · 이병욱*

고신대학교 생명과학과

Restoration of *Saccharomyces cerevisiae coq7* Mutant by a *Neurospora crassa* Gene

Eun Jung Kim, Sang Rae Kim and Bheong-Uk Lee*

Dept. of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-701, Korea

Abstract

Coenzyme Q is a quinone derivative with a long isoprenoid side chain. It transports electrons in the respiratory chain located in the inner mitochondrial membrane of eukaryotes and the plasma membrane of prokaryotes. It also functions as an antioxidant. *Saccharomyces cerevisiae coq* mutants, that are deficient coenzyme Q biosynthesis fail to aerobically grow. They are not able to grow on non-fermentable carbon sources, such as glycerol, either. The putative *coq-7* gene involved in coenzyme Q biosynthesis of *Neurospora crassa* was cloned and used for complementation of *S. cerevisiae coq7* mutant. The predicted amino acid sequence of *N. crassa* COQ7 showed about 58% homology with Coq7p of *S. cerevisiae*. The growth rate of *S. cerevisiae coq7* mutant transformed with the *N. crassa coq-7* gene was restored to the wild-type level. The complemented *S. cerevisiae* strain was able to grow with glycerol as a sole carbon source and showed less sensitivities to linolenic acid, a polyunsaturated fatty acid.

Key words – *Neurospora crassa*, COQ7, coenzyme Q, Ubiquinone, antioxidant, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

1957년에 Crane에 의해서 발견된 coenzyme Q (CoQ 또는 ubiquinone)는 진핵생명체의 미토콘드리아의 내막 및 원핵생명체의 세포막에 존재하는 전자 전달계에서 전자를 전달하는 기능을 하는 조효소이다[4]. Coenzyme Q는 전자 전달계 내의 NADH-coenzyme Q reductase (complex I),

succinate coenzyme Q reductase (complex II) 및 cytochrome *bc1* 복합체의 조효소로 참여한다[5]. Coenzyme Q는 미토콘드리아 외에도 핵막, 리소솜 (lysosome) 및 골지체의 막에도 존재하는 것으로 알려졌다[5]. Coenzyme Q는 하나의 quinone에 isoprenoid unit이 연결된 구조로서, 일반적으로 isoprenoid 결사슬의 길이에 따라서 번호를 붙이는데 대다수의 포유류는 isoprenoid의 개수가 10개인 것, 즉 coenzyme Q10을 생산하여 이용하고, *Saccharomyces cerevisiae*는 6개인 coenzyme Q6, *Escherichia coli*는 coenzyme Q8, *Schizosaccharomyces pombe*는 coenzyme Q10,

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-990-2321, Fax : 051-405-9905
E-mail : bulee@kosin.ac.kr

대부분의 fungi들은 coenzyme Q9개 혹은 coenzyme Q10을 생산하는 것으로 보고가 되었다[22].

Coenzyme Q는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 생체 에너지 생산 과정에 필수 조효소로서 참여하는 것이 1차 기능이지만, 최근에 제기된 자료들에 의하면 지용성 항산화제의 기능을 돕는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 또한 밝혀졌다. 생명체에서 산소 라디칼의 발생에 의한 산화는 노화 및 암의 주된 원인 중의 하나가 된다[10]. 환원형의 coenzyme Q는 강력한 항산화제로서 인지질 및 lipoprotein들을 지질과산화 현상으로부터 보호하고, 산소 라디칼의 공격으로부터 막단백질 및 DNA를 보호하는 기능을 보유한 것으로 보고되었다[9].

현재 Clarke 그룹 등에서 활발한 연구가 진행 중인 *S. cerevisiae*의 coenzyme Q 합성에 관한 연구는 1990년대 초반에 상보성 분석에 의해서 COQ1부터 COQ8까지의 8개의 유전자가 coenzyme Q의 생합성에 관여하는 것이 밝혀졌으며(Fig. 1) 이 후에 화학적으로 합성된 중간체를 이용한 연구 등을 통해서 전 과정이 규명되어 가는 중이다[28]. *S. cerevisiae* 균주 이외에도 *S. pombe*와 같은 효모류에서도 Coenzyme Q10 생합성 관련 유전자들에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다[27].

*S. cerevisiae*의 COQ 돌연변이 균주들은 호흡을 못하므로 산소를 최종 전자 수용체로 이용하는 호흡은 불가능하며, 또한 글리세롤 같은 발효가 불가능한(non-fermentable) 탄소원에서는 자라지 못한다[28]. 또한 polyunsaturated fatty acid인 linoleic acid 혹은 linolenic acid가 과량으로 포함된 배지에서 성장 시에 치사되는 것으로 보고가 되었다[6].

*S. cerevisiae*의 COQ7 유전자는 DMQ mono-oxygenase를 암호화하며[26], 이 효소가 결여된 균주에서는 DMQ, 즉 2-hexaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone이 세포 내에 축적이 되는 것으로 보고가 되었다[17]. COQ7 유전자는 coenzyme Q의 생산과는 독립적으로 연구가 되었는데, *S. cerevisiae*에서 글루코스 derepression 및 gluconeogenesis에 관여하는 CAT5 유전자가 COQ7과 동일함이 밝혀졌다[12]. CAT5 유전자에 돌연변이가 발생할 경우에는 gluconeogenesis에 관련된 유전자들의 전사 활성이 불가능하다는 것로부터 보고되었으며[23], 현재는 coenzyme Q의 생합성과 글루코스 derepression의 상관관계에 대한 연구가 계속되고 있다[12,23]. 또한 선충류인 *Caen-*

*orhabditis elegans*에는 Coq7p와 높은 유사도를 보이는 단백질인 Clk-1이 존재하는데, 이 유전자도 역시 coenzyme Q9의 생합성에 관여하는 것으로 밝혀졌으며, 결여 시에는 어린 유충에서 발생 과정이 중지되며, coenzyme Q의 외부 공급에 의해서 성체가 될 경우에도 공급을 중지하는 시점에 따라서 생식 능력을 상실하는 것으로 보고가 되었다. 최근에는 Clk-1이 *C. elegans*의 생존 기간의 연장에도 관여한다는 사실이 보고되어 활발한 연구가 진행 중이다[2].

본 연구는 최근 완료된 *Neurospora crassa*의 genome data[21]를 분석하여 발견된 coenzyme Q 생합성에 관여하는 유전자들 중에서 효모의 Coq7p 효소에 높은 유사도를 나타내는 단백질을 암호화하는 유전자(*coq-7*이라 이름붙임)를 클로닝하고, *S. cerevisiae*의 *coq7* 돌연변이체에 도입하여 돌연변이에 따른 표현형들이 회복되는 것을 확인하는 실험에 관한 것이다.

재료 및 방법

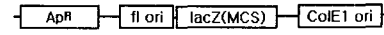
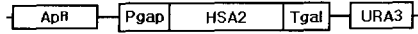
사용 균주, 플라스미드 및 배지

본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에서 볼 수 있다. *S. cerevisiae*의 야생형 균주와 *coq7* 돌연변이 균주[17]는 UCLA의 Cathy Clarke에 의해서 제공되었고, 이들 균주의 배양에 사용된 배지는 YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), YPG(1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol), SD(0.17% yeast nitrogen base without amino acid, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 2% glucose)이다. SD 배지는 루이신, 트립토판 혹은 히스티딘을 필요에 따라서 첨가하였다. 상보성을 알아보기 위한 벡터 조립에는 pYGAP2가 사용되었다 (Table 1).

N. crassa cDNA의 분리

S. cerevisiae *coq7*의 상동성을 보이는 유전자를 분리하기 위해서 *N. crassa* genome data[21]의 BLAST 프로그램을 이용하여 예상 유전자 부위를 찾아서 각각 제한효소 부위를 분석하였고, PCR[20]에 이용될 프라이머를 디자인하였다. *coq-7* 예상 유전자 5'말단의 프라이머(AATGAATTCATATGAAGATGCTTCGTCCAGCAACC)에는 *EcoRI*, *NdeI* 과 KOZAK(AAG) 부위가 도입되었고, 3'말단의 프라이머(ATTTCTAGAAGCTTAAGAAAACCCCTCTTACAC)

Table 1. Strains and plasmids used in this paper

Strains	Plasmids
<i>E. coli</i>	
DH5a: <i>F</i> ⁻ , ϕ 80 Δ lacZAM15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>THI-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, λ -	pBluescript : 
<i>S. cerevisiae</i>	
CEN.PK2-1C : MATa, <i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp</i>	pYGAP2 : 
<i>S. cerevisiae</i>	
CEN Δ COQ7 : CENPK2-1C, <i>coq7</i> / <i>cat5::HIS3</i>	

에는 *Xba*I과 *Hind*III 부위가 인위적으로 도입되었다. PCR 조건은 최종 부피를 100 μ l로 한 reaction mixture에는 *N. crassa* cDNA library 1 μ l를 template로 하고, 10X reaction buffer 10 μ l, primer 각 200 nM, dNTPs 각 200 μ M와 ExTaq DNA polymerase(Takara) 2.5 unit를 첨가했다. *coq-7* 유전자를 증폭하기 위한 program은 95 $^{\circ}$ C에서 10분; 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 2분의 30 times; 72 $^{\circ}$ C에서 5분으로 MJ Research(Cambridge, MA) thermocycler를 이용하였다. PCR 조건으로 증폭된 771 bp의 *coq-7* 예상 유전자 단편을 정제한 후에 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단하여 각각 pUC19벡터로 클로닝하여 auto-sequencing 방법으로 서열을 분석하였다. 일반적인 DNA의 조작 및 분자생물학 기술은 Maniatis *et al.*의 방법을 따랐다[16].

발현 벡터 조립 및 형질전환

분리된 *N. crassa*의 cDNA는 각각 *S. cerevisiae*의 GAP 프로모터를 갖는 pYGAP2 플라스미드 벡터로 삽입하였다. *coq-7* 유전자가 클로닝된 pBluescript 벡터를 *Eco*R I과 *Xho*I으로 절단하고 *Eco*R I과 *Sal*I으로 절단된 pYGAP2으로 클로닝하여 pEJ-YQ7을 조립하여 이들을 발현 벡터로 사용하였다.

S. cerevisiae coq7 돌연변이체로 발현 벡터를 형질전환하기 위해 균주를 YPD 배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. 40 ml의 YPD 배지에 100배 희석하여 흡광도가 1.3에서 1.5(OD₆₀₀)이 될 때까지 배양한 후, 5000 rpm에서 6분간 원심분리하였다. 40 ml과 20 ml의 ice-cold water로 세포를 두 차례 씻어 주되 0 $^{\circ}$ C를 유지시켜 주었다. 마지막으로 1 M sorbitol로 세포를 현탁시키고, \leq 100 ng의 transforming DNA를 첨가하여 40 μ l의 세포 현탁액을 미리 차

게 해 둔 폭이 2 mm인 electroporation cuvette에 넣은 후, electric field pulse (1.5 kV; 25 μ F; 200 Ω , pulse length 4.2 ~ 4.9 msec.)를 수행하였다. 1 ml의 1 M sorbitol로 현탁하고 30 $^{\circ}$ C에서 1시간을 진탕 없이 배양하고 마지막으로 1 ml의 YPD 배지를 첨가하여 1시간 키운 후에 우라실이 없는 SD 배지에서 2~3일 배양하여 형질전환체들을 확인할 수 있었다.

성장 및 성장 속도 관찰 및 측정

N. crassa cDNA가 형질전환된 *S. cerevisiae* 균주들에서 상보성을 나타내는지의 유무를 확인하기 위해 성장속도를 측정하였다. *coq-7* 유전자가 각각 도입된 형질전환체들, *S. cerevisiae coq7* 돌연변이 균주들과 positive control로 이용되는 야생형 균주를 글리세롤 2%를 포함하는 YPG 배지에 접종하여 밤새 배양하였다. 균주들을 동일한 배지에서 10배 희석하고 분광광도계(HITACHI, Tokyo)를 이용하여 OD₆₀₀에서의 균 밀도를 1시간 단위로 10시간동안 측정하였다.

발효가 불가능한 탄소원인 글리세롤을 포함하는 배지에서의 성장 속도를 비교하기 위해 5종류의 균주들을 YPD 배지에서 성장시킨 후, 각각의 콜로니들을 YPG 배지에 접종하여 이를 동안 배양하였다.

불포화지방산의 영향

불포화지방산에 대한 감수성 조사는 Do 등의 방법에 따라 수행되었다[6]. 5종류의 균주들을 YPD 배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C 진탕 배양기에서 밤새 배양하였다. 배양액을 같은 배지에 100배 희석하여 대수기 (A₆₀₀ = 0.1-1.0)까지 배양하였다. 멸균 증류수 (4 $^{\circ}$ C, 1000 \times g, 5분)로 세포를 씻어주고, 세

포 pellet은 0.1 M sodium phosphate, pH6.2/0.2% glucose 용액으로 재혼탁하였다. 5종류의 배양액에 oleic acid 및 linolenic acid를 각각 최종 농도가 820 μM가 되도록 첨가하여 30°C에서 배양하였다. 지방산을 첨가하기 전의 표본과, 1, 2, 4 시간동안 배양한 후의 표본을 2% agar가 첨가된 YPD 및 YPG 고체 배지에 도말하였다. 생존한 균들의 비율을 측정하기 위하여 30°C에서 3일 동안 배양한 후, 지방산을 처리하기 전의 표본으로부터 나온 콜로니들의 수를 100%로 하여 계산하였다.

결과 및 고찰

N. crassa coq-7 및 예상 아미노산 서열 분석

*N. crassa*의 coq-7 유전자의 coding 서열은 771bp로 예상되며, 유전체 DNA와 cDNA의 서열을 비교하여 분석한 결과에 따르면 intron은 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이는 대부분의 *N. crassa* 유전자들은 intron을 보유하고 있다는 사실에 비추어 볼 때 흥미로우며, intron이 없는 경우

가 자주 관찰되는 *S. cerevisiae* 유전자들과 유사하다 할 것이다. DNA 염기 서열로 추정된 COQ7 단백질은 예상 크기가 28.4 kDa로서 256개의 아미노산으로 구성되어 있으며, *S. cerevisiae*의 Coq7p과 42%의 아미노산 서열의 일치도 (identity)와 58%의 유사도 (similarity)를 보였다 (Fig. 3).

*S. cerevisiae*의 COQ7 유전자에 점돌연변이가 발생한 경우에는 coenzyme Q의 생산이 중지되어 단지 발효를 통해서 성장이 가능하고, 중간체인 DMQ가 축적되는 현상이 보고가 되었는데[17], COQ7 유전자의 완전한 deletion이 일어난 경우에는 DMQ보다도 전단계에서 생산되는 3-hexprenyl-4-hydroxybenzoate, HHB가 축적되는 것으로 관찰되어 Coq7p의 coenzyme Q의 생합성 과정에 대한 조절 기능이 제기되기도 하였다[12]. 더욱이 *C. elegans*에는 Coq7p에 높은 유사도를 갖는 Clk-1 단백질이 존재하는데, 이 단백질을 암호화하는 clk-1 유전자의 돌연변이체는 생존기간의 연장, 지연되는 발생 과정 및 성체가 된 후에 반응 주기의 증가 등을 보였으며[14], 미토콘드리아 내의 전자 전달 과정을 통한 호흡도 정상적이었으므로 coenzymeQ의 생합

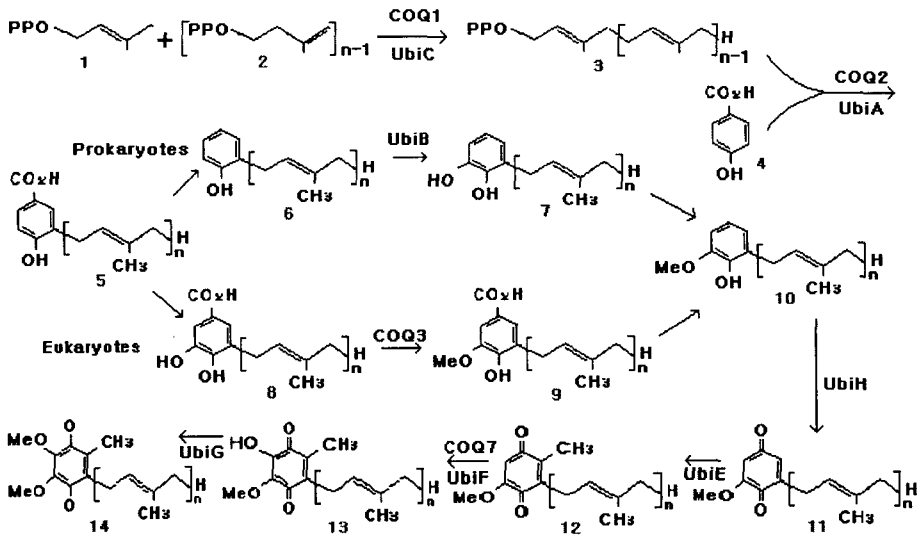


Fig. 1. Coenzyme Q biosynthesis pathway. Dimethylallyl diphosphate (1)와 isopentenyl diphosphate (2) are precursors to form all-trans polyprenyl diphosphate (3). Prenylation of 4-hydroxybenzoic acid (4) is catalyzed by CoQ2p. Coenzyme Q biosynthetic pathways are taken different paths after assembly of 3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate (5). Lengths of isoprenoid chain(n) depend on Species and vary from n = 6 (*S. cerevisiae*) to n = 10 (*Homo sapiens*). Intermediates are below; 2-polyprenylphenol (6); 2-polyprenyl-6-hydroxy-phenol (7); 3,4-dihydroxy-5-polyprenylbenzoate (8); 3-methoxy-4-hydroxy-5-polyprenylbenzoate (9); 2-polyprenyl-6-methoxy-phenol (10); 2-polyprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone (11); 2-polyprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone or DMQ (12); 2-polyprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinone (13); and CoQ-n (14). Compound 11-14 are hydroquinones. Compound 10, 11 and 13 are hypothetical intermediates.

성 과정에서 Clk-1의 역할에 대한 많은 의문이 존재하였다. 하지만 최근의 연구에 따르면 *clk-1* 돌연변이체는 coenzyme Q를 전혀 생산하지 못하는 것으로 밝혀졌고, 위에서 언급되었던 모든 표현형들은 *C. elegans*가 먹이로 취하는 *E. coli* 등 세균으로부터 얻는 coenzyme Q에 의해서 가능한 현상들이며, coenzyme Q를 생산하지 못하는 *E. coli*를 먹이로 공급하였을 경우에는 발생 자체가 중단되는 것으로 보고가 되었다[11].

Coq7p 및 유사도를 나타내는 단백질들은, 효모류에서부터 포유류까지 그 아미노산 서열이 보존되어 있는 DMQ mono-oxygenase들로서, 새로운 di-iron carboxylase의 family의 일원인 것으로 밝혀졌다[26]. 이 단백질들은 E Xn1 EXXH Xn2 E Xn3 EXXH의 공통된 motif를 갖는데 이 부분들이 di-iron 센터를 향한 ligand들이 존재하는 부위들로 생각되고 있으며[26], *N. crassa*의 COQ7 예상 아미노산 서열에도 잘 보존되어 있다 (Fig. 3의 boxed residues). 3차 구조를 분석한 결과에 따르면 4개의 글루탐산 (E)와 2개의 히스티딘 (H)이 Fe 원자와 연결되어 있는 형태로 예상되며, Fig. 3에서 *로 표시된 글루탐산이 다른 아미노산으로 변형된 경우에는 coenzyme Q의 생합성이 중지되는 것으로 알려졌다[8].

Coq7p 및 유사효소들은 미토콘드리아의 내막 혹은 원핵생명체의 세포막 내에 존재하는 단백질 (integral protein)인 것으로 알려졌는데[26], 그 세포막에 삽입되는 부분은 원통형의 α -나선을 이루며, 다량의 소수성 아미노산들이 존재하는 부위이다. *N. crassa* COQ7 예상 아미노산 서열의 hydropathy profile인 Fig. 2 B에서 보듯이 약 150번째 아미노산 부근에서 강한 소수성 부위가 존재하는 것을 인지할 수 있으며, Fig 3에서는 이 소수성의 α -나선을 이루는 부위에 밑줄로 표시하였다.

N. crassa coq-7 유전자에 의한 돌연변이의 회복

*S. cerevisiae*의 *coq* 돌연변이는 여러 종류의 표현형을 나타내지만, 가장 분명한 것은 성장 속도가 매우 늦고, 콜로니가 매우 작은 'petite' 표현형이다 [28]. 즉 coenzyme Q는 미토콘드리아 내막에 존재하는 전자 전달계에서 NADH-coenzyme Q reductase (complex I), succinate coenzyme Q reductase (complex II) 및 cytochrome *bc1* 복합체의 조효소로 참여하는데, coenzyme Q가 결핍됨에 따라서 호흡,

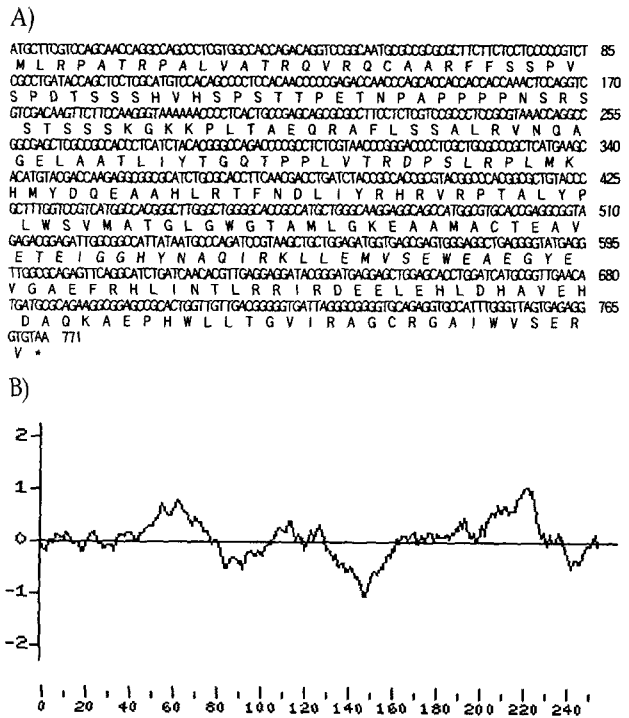


Fig. 2. Predicted amino acid sequence and hydropathy profile of *N. crassa* COQ7.

즉 호흡에 의한 ATP의 생산이 중지되고 단지 발효에 의한 성장만이 가능하기 때문이다 [28]. 따라서 에탄올 혹은 글리세롤 등과 같이 발효 과정을 통하여 이용이 불가능한 탄소원을 유일한 탄소원으로 배지에 첨가하여 주면, 정상적인 호흡과 발효에 의한 ATP의 생산이 불가능해짐으로 *coq* 유전자가 결여된 돌연변이 균주는 거의 성장을 못하는 것으로 관찰된다 [28](Fig. 5). 좀더 고등한 진핵생물체인 *C. elegans*나 포유류인 mouse의 경우에는 coenzyme Q가 결핍된 경우에는 초기 발생 과정이 중지되는 등, 특히 발생 초기에는 필수적으로 요구되지만, 이후에 미토콘드리아의 호흡에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고가 된 경우가 있으나, 이는 외부에서 먹이 등으로 공급된 coenzyme Q가 미토콘드리아 내로 이동하여서 그 기능을 수행하기 때문으로 밝혀졌다[11,15]. 최근 *S. cerevisiae*의 경우에도 외부에서 coenzyme Q6를 섭취하면 호흡이 회복되며, 발효로 이용이 불가능한 탄소원에서의 성장이 가능하게 되는데, 이때는 cytochrome *bc1* 복합체도 안정적인 구조로 회복되는 것으로 보고가 되었다[24].

본 실험에서는 *N. crassa*의 *coq-7* cDNA를 *S. cerevisiae*의

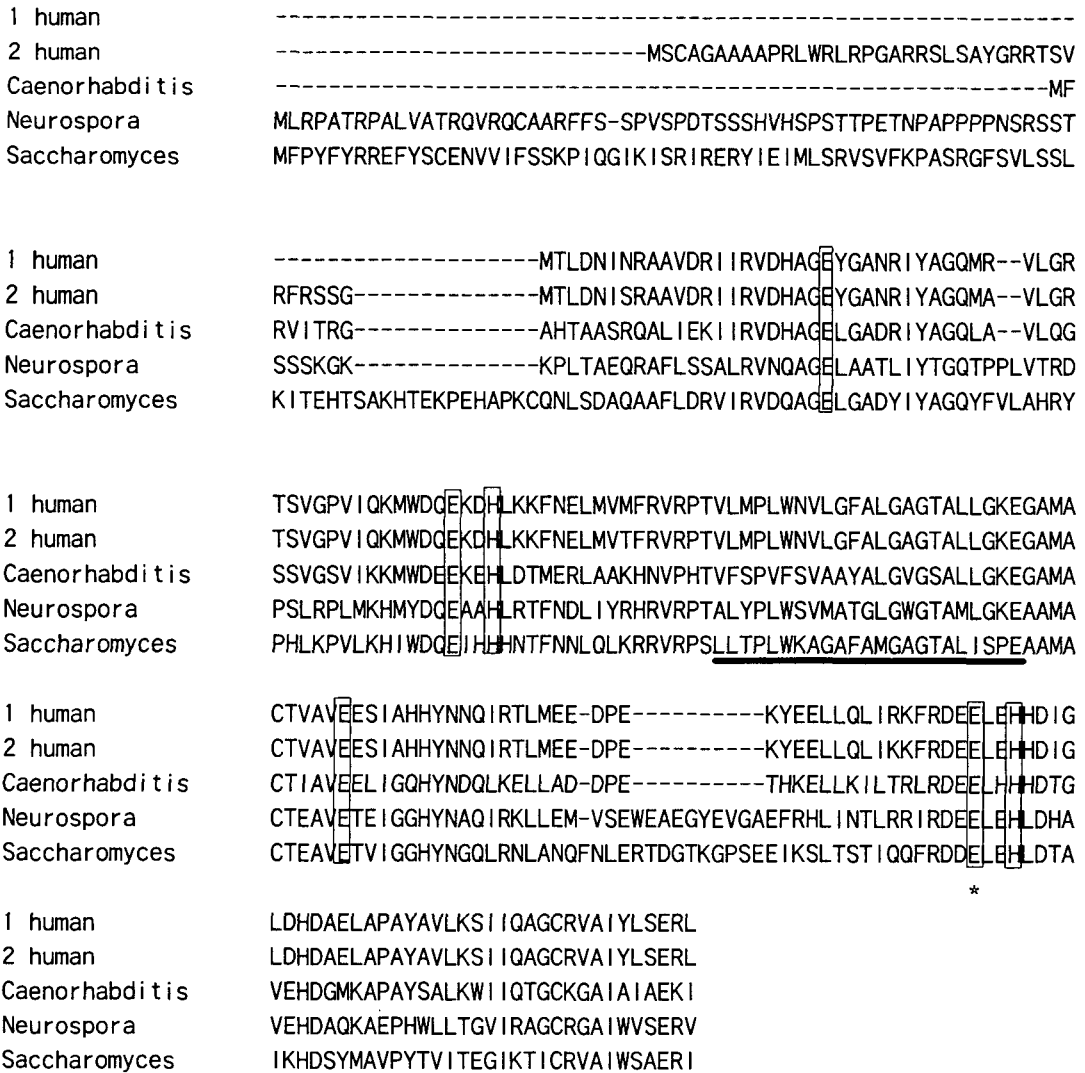


Fig. 3. Alignment of amino acid sequences of *N. crassa* COQ7 and its homologous proteins. A α -helical membrane integration region is underlined. The putative amino acids participated in the di-iron center are boxed. *indicates a mutation site that disrupts enzyme activity[8].

GAP 프로모터의 조절을 받도록 삽입하여 pEJ-YQ7을 조립 하였다(Fig. 4). 이 플라스미드를 *S. cerevisiae* CEN Δ COQ7 균주에 형질전환한 후에 글리세롤 2%(w/v)가 첨가된 액체 배지에서 성장속도를 조사하여 균 성장 밀도를 측정함과 동시에 글리세롤을 유일한 탄소원으로 첨가한 고체 배지에서의 성장도 관찰한 결과를 보면 *coq7* 돌연변이체는 거의 성장을 보이지 않음 반면에, *N. crassa coq-7* 유전자가 도입된 경우에는 야생형 *S. cerevisiae* 균주와 비슷한 성장속도를 보였다(Fig. 5A). 글리세롤만을 유일한 탄소원으로 첨가한 고체 배지 상에서도 뚜렷한 성장을 관찰할 수가 있었

다(Fig. 5B).

coq7 돌연변이체는 탄소원을 글리세롤이 아닌 발효가 가능한 글루코스으로 한 경우에도 매우 낮은 성장 속도를 보였다. *N. crassa coq-7* 유전자가 도입된 균주의 경우에 글루코스 배지에서도 성장 속도가 완전히 회복되는 것으로 나타났다. 이는 GAP 프로모터가 지속적으로 발현되는 프로모터임으로 충분한 양의 COQ7 단백질을 생산하는데 기인한 것으로 생각된다.

다른 종의 coenzyme Q 생합성 관련 유전자에 의한 기능적 상보성에 관한 보고는, 최근 *C. elegans*의 *clk-1* 유전자

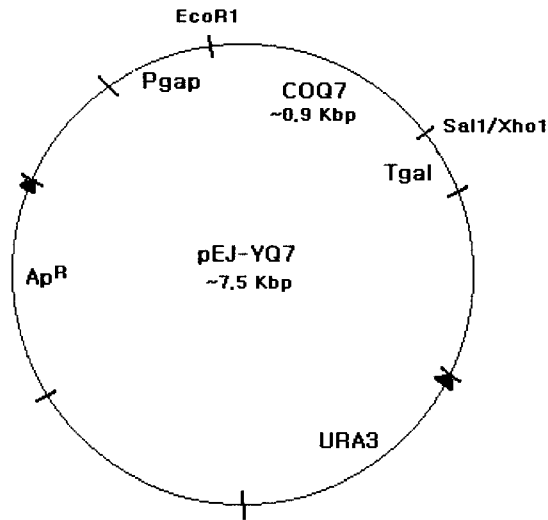


Fig. 4. Yeast vector containing *N. crassa* *coq-7* gene. The *coq-7* gene was expressed under GAP promoter control.

에 의한 *E. coli* *ubiF* 돌연변이체에 대한 상보성 연구[1]를 비롯하여 다수가 존재하는데 이 연구에서의 흥미로운 점은 각 종마다 이용하는 coenzyme Q 결가지의 길이가 다양함에도 불구하고 상보성이 일어나는 경우가 많고, 진핵과 원핵생물체 간의 교환도 가능하기 때문이다. 대부분의 진균류와 같이 coenzyme Q10을 이용하는 것으로 조사된 (B.-U. Lee, unpublished data) *N. crassa*의 *coq-7* 유전자도

coenzyme Q6을 이용하는 *S. cerevisiae*의 *coq7*을 대체하는 것은 물론이며, 기존의 예로 *C. elegans*는 본래 coenzyme Q9을 이용하지만 *clk-1*은 coenzyme Q8을 이용하는 *E. coli*를 보완하거나, *E. coli*의 *ubiG* 유전자가 발현하는 효소가 coenzyme Q6를 이용하는 *S. cerevisiae*의 미토콘드리아로 targeting 되었을 경우에는 완전하게 보완하는 등 여러 보고가 있었다[3,10,22]. Coenzyme Q 결가지의 길이는 생합성 첫 효소인 *coq1*에 기인하는 것으로 보고가 되었다[13, 22].

*N. crassa*의 *coq-7* 돌연변이체를 조립하는 것이 가능한지를 알아보기 위해서 RIP (repeat-induced point mutation)[25]을 이용하여 돌연변이를 유도한 결과, 정상적인 자낭 및 검은색의 숙성된 자낭포자 (ascospore)의 형성은 관찰되었으나, 자낭 포자를 발아시킨 결과 매우 낮은 발아율을 보였으며, 발아된 경우에는 모두 정상적인 성장 및 포자 형성을 보임으로 *coq-7* 돌연변이체는 아닌 것으로 판단되었다. 이는 생장을 위해서 산소가 절대적으로 필요한 호기성 생명체이고 발효가 불가능한 *N. crassa*의 경우에, *coq-7* 유전자에 돌연변이가 도입되면 전자 전달계의 불활성화에 기인하여 성장하지 못하고 치사(lethal)하기 때문으로 생각된다. 외부에서 공급되는 coenzyme Q10이 발아율에 변화를 주는지의 여부를 조사하기 위하여 배지에 coenzyme Q10을 다량으로 첨가한 경우에도 역시 매우 낮은 발아율

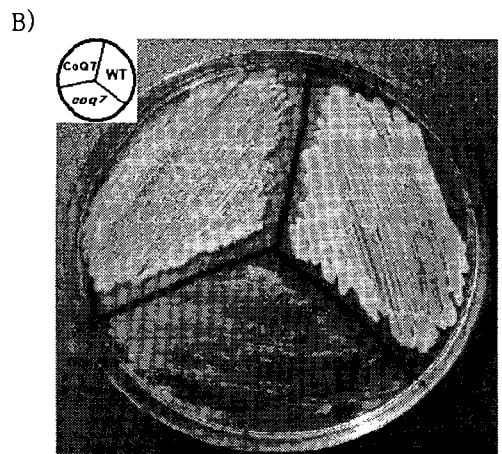
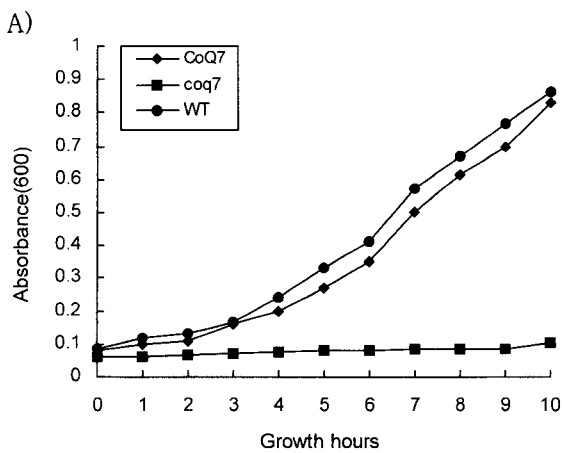


Fig. 5. Complementation of *S. cerevisiae* *coq7* mutation by the *N. crassa* *coq-7* gene. A) Growth rates. *S. cerevisiae* CENΔCOQ7 mutant hardly grew (■, *coq7*), meanwhile mutant complemented with *N. crassa* *coq-7* gene grew normally (◆, Coq7). B) Growth of yeast *coq7* mutant in 3% glycerol agar medium. *coq7*Δ yeast (CENΔCOQ7) was not able to grow normally (*coq7*), CENΔCOQ7 yeast transformed with pEJ-YQ7 showed a normal growth (Coq7).

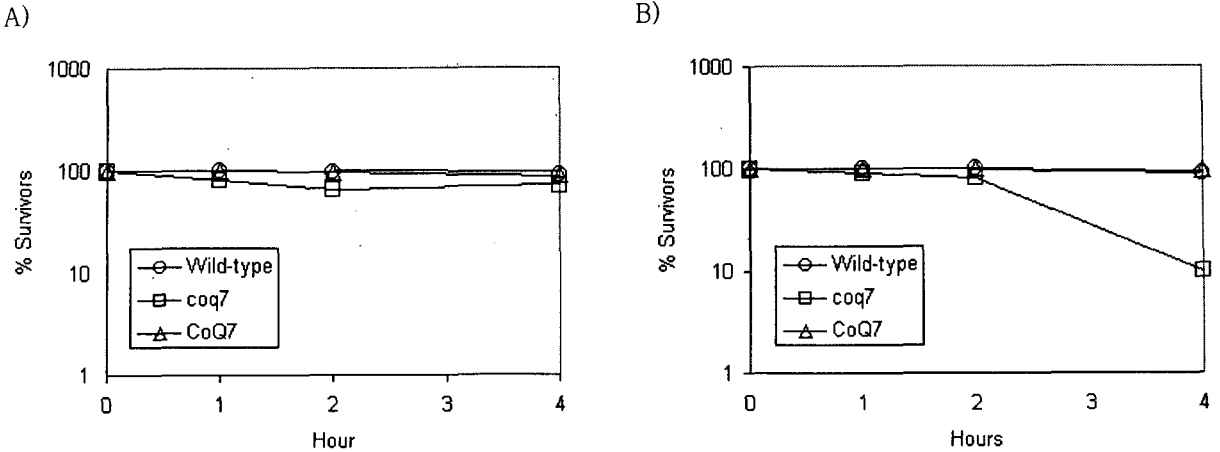


Fig. 6. Susceptibility to PUFA. Yeast lacking coenzyme Q biosynthesis showed high sensitivity to PUFA such as linolenic acid. Wild-type (○), *coq7Δ* (□), and complemented *coq7* (△) strains incubated with 820μM oleic acid (A) or linolenic acid (B) were spread on YPD or YPG agar plates. Incubation with oleic acid, saturated fatty acid did not effect survivor rates. However, incubation with linolenic acid for more than 2 hours dramatically increased lethal effect to yeast *coq7* mutant (B, □).

을 보였다.

불포화지방산에 대한 감수성 연구

생명체에서 산소 라디칼의 발생에 의한 산화는 암과 같은 치명적 질병의 주된 원인 중의 하나가 된다. 전자 전달계에서 조효소로 작용하는 것이 가장 중요한 coenzyme Q의 역할이지만 최근에는 생체 내에 존재하는 항산화제로서의 역할에 대한 연구도 활발하게 수행 중이다[7]. 항산화기작에 대해서는 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만, 환원형의 coenzyme Q (QH₂)는 특히 지용성 항산화제의 기능을 감당하는 것으로 알려지고 있으며, 지방성 과산화 라디칼을 제거하거나 혹은 vitamin E와 유사한 기능을 할 것으로 생각되고 있다[18]. QH₂는 강력한 항산화제로서 인지질 및 lipoprotein들을 지질과산화 현상으로부터 보호하고, 산소 라디칼의 공격으로부터 막단백질 및 DNA를 보호하는 기능을 보유한 것으로 보고가 되었다[9].

S. cerevisiae coq 돌연변이는 linolenic acid와 같은 polyunsaturated fatty acid (PUFA)를 처리하면 매우 높은 감수성을 나타내며 치사하는 것으로 보고되었다[6]. PUFA는 자가산화 (autoxidation) 기작에 의해서 지방성 과산화물 (lipid peroxide) 및 지방성 과산화 라디칼을 생산하는 알려졌는데, 특히 linolenic acid가 자가산화 되면, 세포에 독성을 갖는 다양한 종류의 hydroxy acid류, oxo acid류,

epoxy acid류 및 알데하이드를 생산하는 것으로 보고가 되었다[19].

S. cerevisiae coq7 돌연변이 균주를 linolenic acid를 처리하여 생존율을 조사한 결과에 따르면 동일한 지방산으로 처리한 야생형의 약 10% 정도인 것으로 나타났다 (Fig. 6B). 이는 *coq7* 돌연변이 균주는 지용성 항산화제로서의 역할을 하는 QH₂를 생성하지 못하여 자가산화 기작에 의한 linolenic acid의 산물에 대해서는 민감하여 치사가 빠르게 일어나지만 야생형 균주는 저항을 나타내는 것을 의미한다. *coq7* 돌연변이 균주에 *N. crassa*의 *coq-7* 유전자가 도입될 경우에는 야생형 *S. cerevisiae* 수준의 생존율을 보였다 (Fig. 6B). 자가산화가 쉽게 일어나지 않는 포화지방산인 oleic acid로 처리된 경우에는 치사를 나타내지 않았다 (Fig 6A).

요 약

Coenzyme Q은 긴 isoprenoid 사슬을 갖는 quinone의 유도체이다. Coenzyme Q는 진핵생명체의 미토콘드리아의 내막과 원핵생명체의 세포막에 위치하는 전자전달계에 존재하는 지용성 물질이며, 또한 항산화제로의 기능도 갖는다. Coenzyme Q는 *Saccharomyces cerevisiae*의 호기적 성장에 필수적이며, *coq* 돌연변이체는 발효가 불가능한 탄소

원에서의 성장이 불가능하다. *S. cerevisiae*의 Coq7p 효소들과 유사성을 나타내는 단백질을 암호화하는 *Neurospora crassa* cDNA를 효모의 발현 벡터에 삽입하였다. *N. crassa* COQ7의 예상 서열은 *S. cerevisiae*의 효소와 58% homology를 보였다. *N. crassa* coq-7 유전자의 *S. cerevisiae* coq7 형질전환체는 야생형 균주와 유사한 성장률을 보였다. 형질전환 균주들은 발효가 불가능한 탄소원인 글리세롤을 유일한 탄소원으로 배양하였을 경우에도 정상적인 성장을 나타냈다. 또한 불포화지방산인 linolenic acid를 성장 배지에 첨가하여도 야생형 균주와 유사한 생존율이 관찰되었다.

감사의 글

본 실험을 위한 *S. cerevisiae* coq7 돌연변이체를 제공해주신 UCLA의 Clarke 교수님과 배지 및 시약 제조에 도움을 준 어나영 학생에게 감사를 드립니다. 본 연구는 2003년 고신대학교 교내 연구비에 의해서 수행되었습니다.

참고 문헌

- Adachi, A., N. Shinjyo, D. Fujita, H. Miyoshi, H. Amino, Y. Watanabe and K. Kita. 2003. Complementation of *Escherichia coli* ubiF mutation by *Caenorhabditis elegans* CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm. *FEBS Lett.* **543**, 174-178.
- Asencio, C., J. C. Rodriguez-Aguilera, M. Ruiz-Ferrer, J. Vela and P. Navas. 2003. Silencing of ubiquinone biosynthesis genes extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **17**, 1135-1137.
- Avelange-Macherel, M. H. and J. Joyard. 1998. Cloning and functional expression of AtCOQ3, the *Arabidopsis* homologue of the yeast COQ3 gene, encoding a methyltransferase from plant mitochondria involved in ubiquinone biosynthesis. *Plant J.* **14**, 203-213.
- Crane, F. L., Y. Hatefi, R. L. Lester and C. Widmer. 1957. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **25**, 220-221.
- Dallner, G. and P. J. Sindelar. 2000. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 285-294.
- Do T. Q., J. R. Schultz and C. F. Clarke. 1996. Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 7534-7539.
- Ernster, L and P. Forsmark-Andree. 1993. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* **71(8 Suppl)**, S60-5.
- Ewbank, J. J., T. M. Barnes, B. Lakowski, M. Lussier, H. Bussey and S. Hekimi. 1997. Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* **275**, 980-983.
- Gillman, I. G., T. N. Clarke and R. A. Manderville. 1999. Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1066-1076.
- Hsu, A. Y., W. W. Poon, J. A. Shepherd, D. C. Myles and C. F. Clarke. 1996. Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* **35**, 9797-9806.
- Jonassen, T., B. N. Marbois, K. F. Faull, C. F. Clarke and P. L. Larsen. 2002. Development and fertility in *Caenorhabditis elegans* *clk-1* mutants depend upon transport of dietary coenzyme Q8 to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **277**, 45020-45027.
- Jonassen, T., M. Proft, F. Randez-Gil, J. R. Schultz, B. N. Marbois, K. D. Entian and C. F. Clarke. 1998. Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 3351-3357.
- Kainou, T., K. Okada, K. Suzuki, T. Nakagawa, H. Matsuda and M. Kawamukai. 2001. Dimer formation of octaprenyl-diphosphate synthase (IspB) is essential for chain length determination of ubiquinone. *J. Biol. Chem.* **276**, 7876-7883.
- Larsen, P. L. and C. F. Clarke. 2002. Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* **295**, 120-123.
- Levavasseur, F., H. Miyadera, J. Sirois, M. L. Tremblay, K. Kita, E. Shoubbridge and S. Hekimi. 2001. Ubiquinone is necessary for mouse embryonic development but is not essential for mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **276**, 46160-46164.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. pp. 68. CSH. Cold Spring Harbor, New York.

17. Marbois, B. N. and C. F. Clarke. 1996. The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 2995-3004.
18. Matura, T., K. Yamada and T. Kawasaki. 1992. Antioxidant role of cellular reduced coenzyme Q homologs and alpha-tocopherol in free radical-induced injury of hepatocytes isolated from rats fed diets with different vitamin E contents. *Biochim. Biophys. Acta* **1127**, 277-283.
19. Mlakar, A and G. Spiteller. 1994. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1214**, 209-220.
20. Mullis, K, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51 Pt1**, 263-73.
21. *Neurospora* Sequencing Project. Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research "assembly version 3" [www-genome.wi.mit.edu]
22. Okada, K., Y. Kamiya, X. Zhu, K. Suzuki, K. Tanaka, T. Nakagawa, H. Matsuda and M. Kawamukai. 1997. Cloning of the *sdsA* gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Rhodobacter capsulatus* and its functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 5992-8.
23. Proft, M., P. Kotter, D. Hedges, N. Bojunga and K. D. Entian. 1995. CAT5, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 6116-6126.
24. Santos-Ocana, C., T. Q. Do, S. Padilla, P. Navas and C. F. Clarke. 2002. Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for *bc1* complex stability in yeast *coq* mutants. *J. Biol. Chem.* **277**, 10973-10981.
25. Selker, E. U. 1990. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Ann. Rev. Genet.* **24**, 579-613.
26. Stenmark, P., J. Grunler, J. Mattsson, P. J. Sindelar, P. Nordlunda and D. A. Berthold. 2001. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (*clk-1*), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 33297-33300.
27. Suzuki K., K. Okada, Y. Kamiya, X. F. Zhu, T. Nakagawa, M. Kawamukai and H. Matsuda. 1997. Analysis of the decaprenyl diphosphate synthase (*dps*) gene in fission yeast suggests a role of ubiquinone as an antioxidant. *J. Biochem.* **121**, 496-505.
28. Tzagoloff A. and C. L. Dieckmann. 1990 PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **54**, 211-225.
29. Young, I. G., P. Stroobant, C. G. Macdonald and F. Gibson. Pathway for ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: gene-enzyme relationships and intermediates. *J. Bacteriol.* **114**, 42-52.

(Received July 31, 2003; Accepted December 3, 2003)