

*Saccharomyces cerevisiae*에서 *Neurospora crassa coq-4* 유전자의 기능적 발현

김은정 · 최상기¹ · 천재우² · 오계현² · 이병욱*

고신대학교 생명과학부, ¹순천대학교 생명과학과, ²순천향대학교 생명과학부 유전공학과

Coenzyme Q는 지용성 퀴는 유도체로서 미토콘드리아의 내막과 원핵생명체의 세포막에 위치하는 전자전달계에서 전자 운반체로 이용되며 또한 항산화제의 기능도 갖는다. Coenzyme Q의 생합성에 관여하는 *Saccharomyces cerevisiae*의 *coq4* 유전자에 유사성을 나타내는 *Neurospora crassa coq-4* 유전자를 클로닝하여 *S. cerevisiae coq4* 돌연변이체에서 기능적으로 발현하였다. 상보된 *S. cerevisiae* 균주들은 coenzyme Q₆의 생산능력을 회복하였으며 정상적인 성장률을 보였다. 또한 linoleic acid 및 linolenic acid와 같은 불포화지방산에 대한 낮은 감수성을 보였다. *N. crassa*의 COQ4 단백질은 39.7 kDa의 분자량을 갖는 347개의 아미노산으로 구성되어 있는 것으로 예상되며, *S. cerevisiae*의 Coq4p와 35%의 일치도 및 52%의 유사도를 보인다.

Key words □ *Neurospora crassa*, ubiquinone, coenzyme Q, *Saccharomyces cerevisiae*

Coenzyme Q(CoQ 또는 ubiquinone)는 진핵생명체의 미토콘드리아의 내막 및 원핵생명체의 세포막에 존재하는 전자전달계 내의 NADH-coenzyme Q reductase(complex I), succinate coenzyme Q reductase(complex II) 및 cytochrome *bcl* 복합체의 조효소로서 전자를 전달하는 기능을 하며, 이외에도 핵막, 리소솜(lysosome) 및 골지체의 막에도 존재하는 것으로 알려졌다(4). *S. cerevisiae*의 *coq* 돌연변이 균주들은 호흡을 못하므로 산소를 최종 전자 수용체로 이용하는 호흡을 불가능하며, 또한 글리세롤 혹은 에탄올 같은 발효가 불가능한(non-fermentable) 탄소원에서는 자라지 못한다(29).

Coenzyme Q는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 생체에너지 생산 과정에 관여하는 효소들의 조효소로서 참여하는 것이 1차 기능이지만 최근 다른 생리 현상에도 참여하는 것이 밝혀지고 있다. Echtay 등에 의한 햄스터의 연구 결과에 따르면 미토콘드리아에서 배출된 H⁺ 이온의 수송에 관여하는 uncoupling protein 들인 UCP-1, UCP-2 및 UCP-3의 기능을 위한 조효소로서 coenzyme Q가 필수적으로 참여하는 것이 밝혀졌다(6, 7). 또한 현재 지용성 항산화제로서의 역할에 대한 연구가 활발하게 수행 중인데, 환원형의 coenzyme Q는 강력한 항산화제로서 인지질 및 lipoprotein들을 지질과산화 현상으로부터 보호하고, 산소 라디칼의 공격으로부터 막단백질 및 DNA를 보호하는 기능을 보유한 것으로 보고되었다(11, 12). Coenzyme Q를 생산하지 못하는 *S. cerevisiae*의 경우에 불포화지방산인 linoleic acid 혹은 linolenic acid가 과량으로 포함된 배지에서 성장 시에 치사되는 것으로 보고되었다(5). 또한 coenzyme Q를 생산하지 못하는 *Escherichia*

coli 균주는 thioglycerol 혹은 dithiothreitol 등의 thiol 화합물에 매우 민감하여 배지 첨가 시에 성장률이 크게 저하되는 것으로 밝혀졌다. 이런 불포화지방산에 의한 치사는 항산화제로 알려진 α -토코페롤 등의 첨가에 의해서 감소가 되는 것으로 보고가 되었다(20).

*S. cerevisiae*의 경우에는 1990년대 초반에 상보성 분석에 의해서 *coq1*부터 *coq8*까지의 8개의 유전자가 coenzyme Q₆의 생합성에 관여하는 것이 밝혀졌으며, 이 후에 화학적으로 합성된 중간체를 이용한 연구 등을 통해서 전 단계가 규명되어 가는 중이다(29). *S. cerevisiae* 균주 이외에도 coenzyme Q₁₀을 생산하는 *S. pombe*에서 관련 유전자들에 대한 연구가 진행 중인데, coenzyme Q₁₀은 인간을 비롯한 포유류가 이용하는 형태로서 특히 의약품 혹은 건강식품으로 이용하기 위한 산업적인 생산 연구가 활발하게 진행 중이다(27).

본 연구에서는 최근 유전체 서열 해독이 완료된 *Neurospora crassa*의 유전체(23)를 분석하여 *S. cerevisiae*의 *coq4* 유전자와 유사할 것으로 예상되는 유전자를 분리하여, 이 유전자가 *S. cerevisiae*의 *coq4* 돌연변이 균주에서 발현하였을 때에 상보성을 갖는지의 여부를 조사하였다. 현재까지 coenzyme Q의 생합성에 관여하는 유전자들 중에서 *coq4*에 대한 연구가 가장 미약한데, 그 이유 중의 하나는 Coq4p 단백질은 효소로서의 촉매작용을 하지 않는 것으로 알려졌으며 기타의 기능에 대해서도 알려진 것이 거의 없기 때문이다.

재료 및 방법

사용 균주 및 성장 배지

야생형 균주 *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C (*MAT α* , *ura3*, *his3*,

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

leu2, *trp1*)와 *coq4* 돌연변이 균주 *S. cerevisiae* CENΔCOQ4 (CEN.PK2-1C, *coq4* :: *TRP1*)(13)의 배양에 사용된 배지는 YPD [1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 2%(w/v) glucose], YPG [1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 3%(v/v) glycerol], SD [0.17%(w/v) yeast nitrogen base without amino acid, 0.5% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 2%(w/v) glucose]이다. SD medium은 leucine, tryptophan 과 histidine이 첨가되었고 형질전환 후 선별을 위해 필요에 따라서 첨가하지 않았다. Coenzyme Q의 분리를 위한 배지는 glucose 5.0%(w/v), urea 0.4%(w/v), (NH₄)₂SO₂ 0.5%(w/v), KH₂PO₄ 0.2%(w/v), MgSO₄·7H₂O 0.05%(w/v), malt extract 0.2% (w/v), yeast extract 0.2% (w/v), pH5.0, 30°C(150 rpm)에서 36 시간 배양하였다. 효모에 대한 기본적인 기술은 참고문헌 9를 따랐다.

cDNA 분리 및 서열분석

S. cerevisiae coq4 유전자에 상동성을 갖는 *N. crassa* 유전자를 분리하기 위해서 *N. crassa* 유전체(23)를 분석하여 유사성이 높은 유전자를 찾은 후에 제한효소 부위를 분석하여, PCR(22)에 이용될 프라이머를 합성하였다. 먼저 *coq-4* 예상 유전자 5'말단의 프라이머(5'-AATGAATTCATATGAAGATGGAAGTGACGGCC CTC-3)에는 *EcoRI* 및 *NdeI*과 Kozak부위가 도입되었고, 3'말단의 프라이머(5'-ATTAGTCGACTGCCCCACGATCCGTC'TATCC - 3')에는 *SalI*부위가 도입되었다.

PCR 조건은 최종 부피를 100 μl로 *N. crassa* cDNA library 1 μl를 template로 하고, 10X 효소완충액 10 μl, 프라이머 각 200 nM, dNTPs 각 200 μM와 ExTaq DNA polymerase (Takara) 2.5 unit를 첨가했다. *coq-4* 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 95 °C에서 10분; 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 그리고 72°C에서 3분의 과정을 30회 반복; 72°C에서 5분으로 MJ Research (Cambridge, MA) thermocycler를 이용하였다. 증폭된 *coq-4* 예상 유전자 단편을 정제한 후에 *coq-4* 유전자는 *EcoRI*과 *SalI*로 절단하여 각각 pUC19벡터로 클로닝하여 자동서열 분석법으로 서열을 분석하였다. *S. cerevisiae* 균주로 형질전환 후에 발현여부 조사는 RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)으로 분리된 총 RNA로부터의 RT-PCR은 RT-PCR Kit(Clontech)을 이용하여 수행되었다. 일반적인 DNA의 조작 및 분자생물학 기술은 참고문헌 19를 따랐다.

발현 벡터 조립 및 형질전환체의 성장

분리된 *N. crassa*의 cDNA는 각각 *S. cerevisiae*의 GAP 프로모터를 갖는 pYGAP2 플라스미드 벡터로 삽입하였다. *coq-4* 유전자는 *EcoRI*과 *SalI*로 절단된 pYGAP2 벡터로 클로닝하여 pEJ-YQ4(Fig. 4A)를 조립하였다. 조립된 발현 벡터를 *S. cerevisiae coq4* 돌연변이 균주로 넣어주는 형질전환은 1.5 kV; 25 μF; 200 Ω pulse length 4.2 - 4.9 msec.의 조건으로 전기천공법을 이용하였다. 전기천공 후에 1 ml의 1 M sorbitol로 현탁하고 30°C에서 1시간을 진탕없이 배양하고 마지막으로 1 ml의 YPD 배지를 첨가하여 1시간 더 키운 후에 우라실이 결여된 SD 배지에서 2-3 일 배양하여 형질전환체를 확인하였다. *N. crassa coq-4* 유전자가 도입된 형질전환체, *coq4* 돌연변이 균주와 야생형 균

주들은 밤새 배양된 후에 YPG 배지에서 100배 희석되어 배양되었고, 600 nm 파장을 갖는 빛의 흡광도를 이용하여 균 밀도가 1 시간 단위로 측정되었다.

Coenzyme Q의 HPLC를 이용한 분석

Coenzyme Q의 분리를 간단히 요약하면 수거된 균주를 씻은 세포 4 g 당 메탄올 8 ml, 60% KOH 1.2 ml, pyrogallol 0.08 g, 증류수 0.3 ml 첨가하여 비누화하고, 80°C에서 60분간 혼합한 후에, 즉시 냉각하고 10,000 rpm에서 15분간 냉동 원심분리하였다. 수거된 세포에 heptane 50 ml을 가해 재혼탁하고 다시 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 이후에 용액이 중성이 될 때까지 증류수로 세척하고, 감압 농축하여 heptane 제거하였다. 이 후에 아세톤 5 ml에 용해하여 이를 -20°C에서 밤새 놓아두고, 저온 원심분리하여 상층액을 분리하여 감압 농축하여 아세톤을 제거하고, 샘플을 에탄올 0.5 ml에 용해하였으며, 이를 약 50배 희석하여 HPLC를 이용한 분석에 이용하였다. HPLC system은 SPD-10A UV/VIS detector가 부착된 Shimadzu사의 LC-10AT 제품이었으며, DuPont사의 ZORBAX reverse phase ODS(C₁₈) 컬럼 (250 mm × 4.6 mm, 입자크기 5 μm)을 사용하였다. Coenzyme Q 분석에 사용되는 UV/VIS detector는 파장 275 nm에 맞추어 사용하였고, mobile phase는 HPLC용 메탄올과 에탄올(Fisher Scientific Co.)를 6:4(vol/vol)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 속도는 1 ml/min이고, 20 μl Hamilton syringe를 이용하여 주입하였다.

불포화지방산의 영향 및 토코페롤 첨가배지에서의 영향

불포화지방산에 대한 감수성 조사는 Do 등의 방법에 따라 수행되었다(5). 5종류의 균주들을 YPD 배지에 접종하여 30°C 진탕배양기에서 밤새 배양하였다. 배양액을 같은 배지에 100배 희석하여 대수기 (A₆₀₀=0.1-1.0)까지 배양하였다. 멸균 증류수 (4°C, 1000 × g, 5분)로 세포를 씻어주고, 세포 pellet은 0.1 M sodium phosphate, pH6.2/0.2% glucose 용액으로 재혼탁하였다. 5종류의 배양액에 oleic acid, linoleic acid 및 linolenic acid를 각각 최종 농도가 820 μM가 되도록 첨가하여 30°C에서 배양하였다. 지방산을 첨가하기 전의 시료와, 1, 2, 4 시간동안 배양한 후 시료를 2%(w/v) agar가 첨가된 YPD 및 YPG 고체 배지에 spreading하였다. 생존한 균들의 비율을 측정하기 위하여 30°C에서 3일 동안 배양한 후, 지방산을 처리하기 전의 시료로부터 나온 콜로니의 수를 100%로 하여 계산하였다. 항산화 실험을 위한 α-토코페롤은 최종 농도가 200 μM가 되도록 배지에 첨가하였다.

결과 및 고찰

N. crassa coq-4 유전자 및 예상 단백질 서열

N. crassa coq-4 유전자의 클로닝은 인위적으로 *EcoRI* 및 *SalI*이 각각 도입된 프라이머들을 사용하여 cDNA library로부터 PCR을 이용하여 혹은 RT-PCR을 통하여 이루어졌다. 증폭된 DNA는 *EcoRI* 및 *SalI*로 절단이 된 후에 역시 동일한 제한효소로 절단된 pUC19 플라스미드에 삽입되었다(Fig. 1). Genomic

DNA와 cDNA의 서열을 비교하여 분석한 결과에 따르면, *N. crassa*의 *coq-4* 유전자의 코딩 서열은 1,123bp로 예상되며 1개의 인트론이 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 2). DNA 염기 서열로 추정된 COQ4 단백질은 예상 크기가 39.7 kDa로서 347개의 아미노산으로 구성되어 있으며, *S. cerevisiae*의 Coq4p과 35%의 아미노산 서열의 일치도와 52%의 유사도를 보였다(Fig. 3).

*S. cerevisiae*의 Coq4p는 유사 단백질이 진핵생명체에 보존되어 있는 것으로 보이지만 정확한 기능은 밝혀져 있지 않다. 하지만 coenzyme Q의 생합성 과정에 참여하는 필수 인자로서, 최근 Belogradov 등의 연구에 의하면 세포를 분획하여 Coq4p를 특이적으로 인식하는 antisera를 이용한 Western blot을 수행한 결과 Coq4p는 미토콘드리아에 특이적으로 존재하며, osmotic shock을 통해 분리될 수 있는 단백질에 속해 있는 것으로 밝혀졌으므로 미토콘드리아 내막의 주변 단백질로 생각되고 있다(3). 미토콘드리아 내막으로 이동하기 위한 신호 서열이 Coq4p의 N 말단에 존재하며 도입 과정에서 단백질 내에 존재하는 특정 tyrosine의 N 말단 쪽이 절단되는 것으로 보고가 되었다(3, Fig. 3).

현재까지 Coq4p의 정확한 기능은 물론 어떤 효소적 기능도 알려지지 않았지만 *S. cerevisiae*의 *coq4* 유전자가 완전히 제거된 돌연변이체의 경우에는 Coq4p는 물론 Coq7p의 생산이 전혀 관찰되지 않았고, 따라서 coenzyme Q의 합성도 불가능한 것으로 조사되었다(3, 13). 따라서 Coq4p의 한 가지 기능은 coenzyme Q 생합성 과정의 필수 효소인 Coq7p 단백질의 발현을 위해서 필수적이라는 것이다. 최근 *S. cerevisiae*에서의 연구에 따르면 coenzyme Q의 생산을 위해서는 관여하는 효소와 단백질들이 미토콘드리아 내에 복합체를 형성해야 하는 것으로 나타나고 있다. 따라서 DMQ mono-oxygenase를 암호화하는 Coq7p가 완전히 결여된 균주에서는 Coq7p가 촉매하는 2-hexaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone(DMQ)가 아닌 초기 중간체인 3-hexaprenyl-4-

hydroxybenzoic acid(HHB)가 축적되는 것으로 밝혀졌다(3, 13). 흥미롭게도 Coq7p 유전자가 완전한 삭제가 아니고 점 돌연변이만 갖는 Coq7p가 존재하는 경우에는, 이 단백질이 효소 활성을 갖지 못함에도 불구하고 HHB가 아닌 DMQ가 축적되는 것으로 보고되었다(3). 반면에 *E. coli*의 경우에는 coenzyme Q₈의 생합성에 관여하는 *ubi* 유전자들이 존재하는데, 각 유전자가 결여될 경우에는 그 유전자에 의해서 발현되는 효소에 의해서 촉매되는 중간체가 축적이 된다. 즉 *S. cerevisiae*의 Coq7p와 같은 단계를 촉매하는 UbiF 단백질이 완전히 결여된 경우에는 DMQ가 축적이 된다(13).

Fig. 3에서 나타나듯이 Coq4p 단백질들의 중간 부분은 유사도는 매우 높은 반면에 N-말단은 그리 높지 않은 것으로 나타났다. 하지만 *N. crassa*의 COQ4가 *S. cerevisiae*의 Coq4p를 정상적인

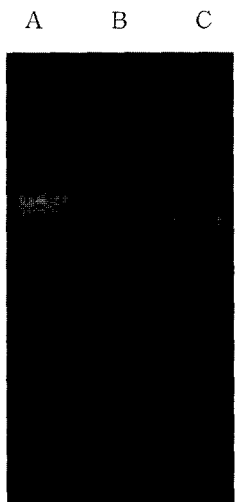


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the DNA fragments containing the *N. crassa coq-4* gene. A: λ bacteriophage DNA digested with *Hind*III, B: PCR DNA product containing the *coq-4* gene, C: pUC19 plasmid inserted with an 1.2 kbp *Eco*RI-*Sall* digested *coq-4* DNA.

```

ATGGAAGTACGGCCCTCAGACGATCCGCGCTCTAGTAGCTCGCGCCAGCAGCCAGAAT 60
M E V T A L R R S A A L V A R A S S Q N
GCAATCCGGCCTGCGGTATGCGCCGCATCAGCAGCACATCACCACACCGACCCAGCCG 120
A I R P A V C A A I S S T S P T P T Q
ATCCAGACAGCAACAAGACAATTCTCGGCCCTTAACCGCCACCCACCAACTACCCCT 180
I Q T Q Q T R Q F S A L N R P P P N Y P
GGCCATGTCCTCTCACCGCCTCGAGCGCTTCGGCCTCTTCGTGGCTCAGGCCATC 240
G H V P L T R L E R F G L F V G S G L I
TCCCTCGCCGACCCCTGCGCGGGGTCGGTTTCGCCGTCATCTCCACCCACCTAG 300
S L A D P L R G
TCTCGTGTCCAACAACTAATCACCCCTCTTGATATTCACAGACCTAATAGCCTCCT 360
D L I A S F
CGCGGAAGCCACCAGCAACGCCCTACTTTCATCTACCGCCTGCGCGACGCCATGTGTCCA 420
A E A T A T P Y F I Y R L R D A M L S H
CCCCAGGGAGCGTCGCATCTGCGCCAACGACCGCGCATCACCTCCCAATCTCTCAACAT 480
P T G R R I L R Q R P R I T S Q S L N I
CCCTACCTGGGTTCCCTGCGGCCAACACCGTCCGAGCAACCTACATTTGACTGGCTCGA 540
P Y L R S L P P N T V G R T Y I D W L D
CCGCGAAGGGGTATCTCCCGATACGCGCTCGCGGGTGCCTGACATCGACGACGAGGAGTG 600
R E G V S P D T R S A V R Y I D D E E C
CGCATAGTGTGACAGCGGTACCGGAGTGCCACGATTTCTACCAGCTTTGACGGGCTT 660
A Y V M Q R Y R E C H D F Y H A L T G L
GCCGATCGTCCGGAGGGGAGGTGGCGCTGAAGCGTTTGTAGTTTGCAGAAATCCCTGTT 720
P I V R E G E V A L K A F E F A N T L L
GCCGATGACGGGGTTCAGCGTTTTTCGCGGCTTACGATGAAGAAGAGCGAGCAGAAGCG 780
P M T G F S V F A A F T M K K S E Q K R
GTTTAGGAAGATTTACTTCCCTGGGCGATTAAAGATGACTGCGGCCAAGGAGGTGAT 840
F R K I Y F P W A V K N G L R A K E V I
TAACGTCTTTGGGAGGAGGAGTTGGAGCGGATGTAATGATTGAGGAGGGAGTTGGG 900
N V F W E E E L E R D V N D L R R E L G
CGTGGAACCGCCCGGATCTGAGGGAGATCAGGAAGCGGGAGAGGGAAGAGAAGGAGGAG 960
V E P P P D L R E I R K R E R E E K R R
GAGAAAGGAGATGGAACGGATGCTGAGCGGGCGGGACAGAGACGTCAATCCAGAAGGC 1020
R K E M E R M L S G R G T E D V I Q K A
GGAGAAGGAAGCTGAAGTGGTGGCGGAACCGGTGAAGGAGATGAGGAATGAGGTGGTGA 1080
E K E A E V V A E R V K E M R N E V V E
GAAGGTTGGCGAGGTTGTCGGGCTTCGGCTATGAGAGGATAG 1123
K V G E V V G S S A M R G *
    
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of *N. crassa coq-4*. As shown is the deduced sequence of the *N. crassa* COQ4 protein. Doubly underlined sequences indicate conserved splice junctions and lariat sequence of the one intron.

<i>N. crassa</i>	-MEVTALRRSAALVARASSQNAIRPAVCAAI S-----STSPTPTQIQTQ----
<i>S. pombe</i>	-----MFYLNHALEINKVVDVMS-----LSKKFLKPSVASN-----
<i>S. cerevisiae</i>	MLRSLLRSTATLPVKCQRRLILPAAAMYTLGSLIFGKEARLADAMERGELHNKNDVYA
<i>H. sapiens</i>	-----MATLLRPVLRRLCG-----LPGLQRPAEMP-----
*	
<i>N. crassa</i>	-----QTRQFSALNRPPNYPGHVPLTRLERFGLFVGSGLISLADPLRG-DLIASF
<i>S. pombe</i>	-----QLRLLFTAERKVNYPGHVPLSPLQRIFLVAGSAIMGLKAPWRGGDMISVL
<i>S. cerevisiae</i>	KEAEERTELRI RALANTRPMEPRYNHGHVPLHRYEKLLLFASIGWNSFFHPEDG-YNIVQL
<i>H. sapiens</i>	-----LRARSDGAGPLYSHHLPTSPLQKALLAAGSAAMALYNPYRH-DMVAVL
<i>N. crassa</i>	AEATATPYFIYRLRDAMLSHPTGRRILRQRPRITSQSLNIPYLRSLPPNTVGRTYIDWLD
<i>S. pombe</i>	GDASGQPFHLHRLLNKMLVDKTGREILKDKPRMTSKSLNLPFLRTLPPNTLGKIYVDWID
<i>S. cerevisiae</i>	GEATALPVFLENLKQTMLSDSGRRILKEQPNITTEILHMDKLAKLPHNTFGYVYQWLK
<i>H. sapiens</i>	GETTG-HRTLKVLRDQMRDPEGAQILQERPRISTSTLDLGKLSLPEGLGREYLRFLD
<i>N. crassa</i>	REGVSPDTRSAVRYIDDEECAYVMQRYRECHDFYHALTGLPIVREGEVALKAFEFANTLL
<i>S. pombe</i>	KEHVGPDTRSPTRFVDDPEEAYVMQRYRESHDFYHAICNMPTNIEGELAIKWLEFVNMGL
<i>S. cerevisiae</i>	RENVSPDTRAPVKFIDDPMHAYIFKRYRQCHDFYHAITNMPITIEGEITIKALEGANLGV
<i>H. sapiens</i>	VNRVSPDTRAPTRFVDDPELAYVIRQRYREVDMLHTLLGMPNTNILEIIVVWFEAVQTGL
<i>N. crassa</i>	PMTGFS-VFAAFMKKSEQKRFKIFYPWAVKNGLRAKEVINVFWEELERDVNDLRREL
<i>S. pombe</i>	PVGALSALFGPLRLNCEQASRFRVYIPWSIRNGLNAKTLINVVYEKELTNDIEDVRRRI
<i>S. cerevisiae</i>	PMAILGGILAPLRLKVKQRKLYNLYLWAVRTGLSCKPLINVVYEEMLEKDVTLAKEL
<i>H. sapiens</i>	PMCI LGAFFGPIRLGAQSLQVLVSELIPWAVQNGRRACVNLNYERRWEQSLRALREL
<i>N. crassa</i>	GVEPPDLREIRKREEREKRRRKEMERMLSGRGTEVDIQKAEKEAEVVAERVKEMRNEVV
<i>S. pombe</i>	RIEAAAPLV-----
<i>S. cerevisiae</i>	KIT---LLRI-----
<i>H. sapiens</i>	GI TAPPMHVQGLA-----
<i>N. crassa</i>	EKVGEVWGSSAMRG
<i>S. pombe</i>	-----
<i>S. cerevisiae</i>	-----
<i>H. sapiens</i>	-----

Fig. 3. Amino acid sequence comparison between *N. crassa* COQ4 and the homologs. The N-terminal residues from * may serve as mitochondrial-targeting sequences.

로 보완하였다는 것은 미토콘드리아로 잘 수송이 되었으며, coenzyme Q의 생합성을 위한 복합체에도 정상적으로 참여할 정도로 유사도가 높다는 의미이다.

돌연변이의 회복

*S. cerevisiae*의 *coq4* 돌연변이는 여러 표현형을 나타내지만, 가장 분명한 것은 성장 속도가 매우 늦고, 콜로니가 매우 작은 'petite' 표현형이다 (29). 즉 coenzyme Q는 미토콘드리아 내막에 존재하는 전자전달계에서 NADH-coenzyme Q reductase(complex I), succinate coenzyme Q reductase(complex II) 및 cytochrome *bcl* 복합체의 조효소로 참여하는데, 조효소의 결핍은 산소를 최종 전자수용체로 하는 호흡이 불가능하도록 한다. 즉 전자전달계를 통한 호흡에 의한 효율적 ATP 생산이 중지되고 단지 발효에 의한 생산만이 가능해진다(29). 에탄올 혹은 글리세롤 등과 같이 발효 과정을 통하여 에너지 생산이 불가능한 탄소원을 유일한 탄소원으로 배지에 첨가하여주면, 정상적인 호흡과 발효에 의한

ATP의 생산이 불가능해짐으로 *coq4* 유전자가 결여된 돌연변이 균주는 성장을 못하는 것으로 나타났다. *S. cerevisiae coq4* 돌연변이 균주의 경우에 외부에서 coenzyme Q₆를 섭취하면 호흡이 회복되며, 발효로 이용이 불가능한 탄소원에서의 성장이 가능하게 되는데, 이때는 cytochrome *bcl* 복합체도 안정적인 구조로 회복되는 것으로 보고가 되었다(26). 더 고등한 진핵생물체인 *C. elegans*나 포유류인 mouse의 경우에도 coenzyme Q가 결핍된 경우에는 초기 발생 과정이 중지되는 등 발생 초기에는 필수적으로 요구되는 것으로 보고가 되었다. *C. elegans*의 경우 돌연변이 체도 미토콘드리아의 호흡에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고가 된 경우가 있었으나 이는 외부에서 먹이 등으로 공급된 coenzyme Q가 미토콘드리아 내로 이동하여서 그 기능을 수행하기 때문으로 밝혀졌다(15).

본 실험에서는 *N. crassa*의 *coq-4* cDNA를 *S. cerevisiae*의 GAP 프로모터의 조절을 받도록 삽입하여 pEJ-YQ4를 조립하였다 (Fig. 4A). 이 플라스미드를 *S. cerevisiae* CENΔCOQ4(CEN.PK2-1C,

coq4 :: TRP1) 균주에 형질전환한 후에 글리세롤 2%(w/v)가 첨가된 액체 배지에서 성장속도를 조사하여 균 성장 밀도를 측정 한 결과를 보면 *N. crassa coq-4* 유전자가 도입된 경우에는 야생형 *S. cerevisiae* 균주와 비슷한 성장 속도를 보였다(Fig. 4B). 이 경우에는 형질전환 균주로부터 분리한 총 RNA로부터 RT-PCR을 이용하여 *N. crassa coq-4* mRNA의 존재 여부를 조사한 결과를 보면 RNA로부터 증폭된 약 1.2 kbp의 DNA 절편을 관찰할 수 있었다(Fig. 4C). 반면에 동일한 조건에서 *coq4* 돌연변이 균주는 거의 성장을 보이지 않았으며(Fig. 4B), 발현 벡터만이 도입된 경우에도 거의 성장하지 않는 것으로 나타났다(data not shown).

coq4 돌연변이체는 탄소원을 글리세롤이 아닌 발효가 가능한 포도당으로 한 경우에도 매우 낮은 성장 속도를 보인다. *N. crassa coq-4* 유전자가 도입된 균주의 경우에 포도당 배지에서도 성장 속도가 완전히 회복되는 것으로 나타났는데, 이는 GAP 프로모터가 지속적으로 발현되는 프로모터임으로 배지에 포도당만이 첨가되어 GAP 프로모터의 발현 유발이 없이도 충분한 양의 COQ4를 생산하는데 기인한 것으로 생각된다(data not shown).

다른 종으로부터 분리한 *coq-4* 유전자에 의한 *S. cerevisiae coq4*의 상보성에 대한 실험은 본 연구가 최초이지만, coenzyme Q 생합성 관련 유전자에 의한 기능적 보완에 대한 연구는 최근의 *C. elegans*의 *clk-1* 유전자에 의한 *E. coli ubiF* 돌연변이체에 대한 상보성에 대한 연구(1)를 비롯하여 다수가 존재한다. 이 연구들에서 나타나는 흥미로운 점은 각 종마다 이용하는 coenzyme Q의 isoprenoid의 side chain의 길이의 다양함에도 불구하고 종간에 상보성을 보이는 경우가 많기 때문이다. *N. crassa*의 *coq-7* 유전자도 coenzyme Q₆을 이용하는 *S. cerevisiae*의 *coq7*을 대체하는 것은 밝혀졌다(18). 또 다른 예로는 coenzyme Q₉을 생산하여 이용하는 *C. elegans*로부터 분리된 *clk-1* 유전자가 coenzyme Q₈을 이용하는 *E. coli*를 보완하거나(14), *E. coli*의 *ubiG* 유전자가 coenzyme Q₆을 이용하는 *S. cerevisiae*의 미토콘드리아로 targeting 되었을 경우에는 완전한 상보성을 나타낸다는 보고 등이 있었다(2, 24). 하지만 coenzyme Q의 생산에서 같은 단계를 촉매하는 효소일지라도 모든 경우에 상보성을 보이지는 않는데 이는 유사도와 관련이 되는 것으로 생각된다. 앞에서도 언급하였

듯이 진핵생물체에서 coenzyme Q의 생산에 참여하는 효소는 독립적으로 존재하는 것이 아니라 미토콘드리아 내에 복합체를 형성하는 것으로 나타나고 있다. 따라서 동일한 단계를 촉매하는 것으로 알려진 단백질들이라도 둘 사이의 유사도가 너무 낮은 경우에는 상보성을 나타내지 못하는 경우가 있는데, 이는 유사도의 큰 차이로 인해서 복합체에 참여를 못하기 때문일 것으로 생각이 된다(13). 예로 Coq5p가 결여된 *S. cerevisiae* 경우에, *E. coli*에서 동일한 기능을 보유했을 것으로 예상되는 *ubiE* 유전자를 도입하였을 때에 상보성을 나타내지 않는 것으로 보고가 되었는데 이는 두 단백질 간의 유사도가 너무 낮아 *E. coli*의 UbiE가 효모의 효소 및 단백질 복합체에 참여를 못하는 것에 기인하는 것으로 생각되고 있다(3, 13). 따라서 진핵생물체에서는 현재 Coq5p를 비롯하여 Coq4p 및 Coq7p 등 coenzyme Q의 합성에 참여하는 효소 및 단백질의 복합체의 형성이 coenzyme의 생산에 필수적일 것이라는 가설에 대한 검증 연구가 진행 중이다(13).

Coenzyme Q의 isoprenoid의 길이는 생합성 과정의 첫 효소인 Coq1p이 결정하는 것으로 보고가 되었다(17, 24). 인간을 포함한 포유류들은 isoprenoid가 10개인 coenzyme Q₁₀을 이 생산하여 이용하고, 선충인 *C. elegans*는 coenzyme Q₉, *S. pombe*는 coenzyme Q₁₀, *E. coli*는 coenzyme Q₈을 생산하는 것으로 조사되었다. *S. cerevisiae*의 경우에는 Coq1p가 6개의 isoprenoid를 갖는 전구물질을 생산하므로 최종적으로 coenzyme Q₆가 생산된다. 본 실험에서는 coenzyme Q 생합성의 중간과정인 *coq4*를 상보하였으므로 HPLC 분석결과 *S. cerevisiae*의 야생형과 동일한 coenzyme Q₆가 생산되었음을 볼 수 있다(Fig. 5).

불포화지방산에 대한 감수성 연구

전자전달계에서 조효소로 작용하는 것이 가장 중요한 coenzyme Q의 역할이지만 uncoupling protein의 조효소로 참여하는 등 다른 기능도 보고가 되고 있다. 또 다른 연구로는 coenzyme Q의 항산화제로서의 역할에 대한 것이다(8, 10). 생물체에서 산소 라디칼의 발생에 의한 산화는 암과 같은 치명적 질병의 주된 원인 중의 하나가 된다. 생물체는 이런 산소 라디칼 등에 의한 산화를 방지하기 위한 다양한 항산화 기작을 발전시켜 왔는데 그 중 하

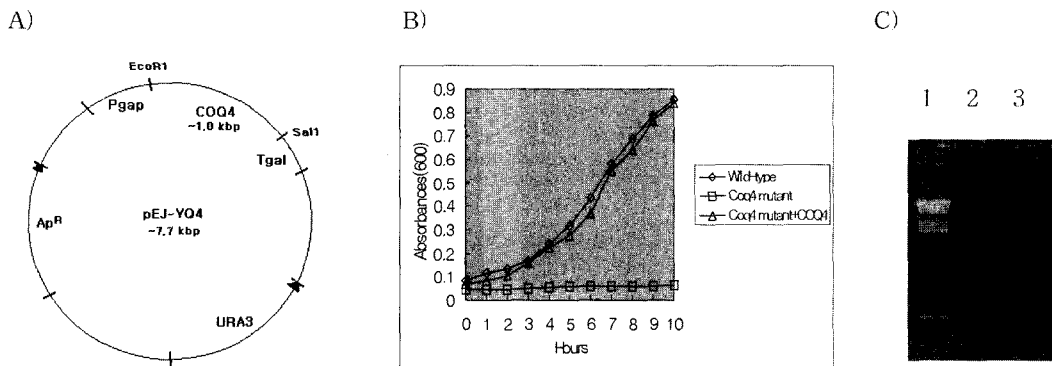


Fig. 4. A) Vectors used for *N. crassa coq-4* gene expression in yeast. B) Restoration of growth rate. C) DNA product from RT-PCR. 1: λ DNA digested with *HindIII*, 2: *S. cerevisiae* strain transformed with the *N. crassa coq-4* gene, 3: *S. cerevisiae* mutant strain transformed with an expression vector only.

나가 coenzyme Q에 의한 항산화 작용이다. Coenzyme Q에 의한 항산화 기작에 대해서는 아직 완전하게 밝혀지지 않았지만, 환원형의 coenzyme Q(QH₂)는 특히 지용성 항산화제의 기능을 감당하는 것으로 알려지고 있으며(28) 지방성 과산화 라디칼을 제거하거나 혹은 비타민 E와 유사한 기능을 할 것으로 생각되고 있다(10, 20). QH₂는 강력한 항산화제로서 인지질 및 lipoprotein 들을 지질과산화 현상으로부터 보호하고, 산소 라디칼의 공격으로부터 막단백질 및 DNA를 보호하는 기능을 보유한 것으로 보고가 되었다(11, 12).

S. cerevisiae coq 돌연변이는 linolenic acid와 같은 불포화지방산을 처리하면 매우 높은 감수성을 나타내며 치사하는 것으로 보고가 되었다(5, 25). 불포화지방산은 자가산화(autoxidation)에 의해서 지방성 과산화물 및 지방성 과산화 라디칼을 생산하는 것으로 알려졌는데, 특히 linolenic acid가 자가산화 시에는 hydroxy acid류, oxo acid류, epoxy acid류 및 알데하이드 등 세포에 독성을 갖는 다양한 종류의 화학물들이 생산되는 것으로 알려졌다(21). *S. cerevisiae coq4* 돌연변이 균주를 linoleic acid 혹은 linolenic acid를 처리하여 생존율을 조사한 결과에 따르면, 동일한 지방산으로 처리한 야생형과 비교하여 약 10% 정도의 생존율만을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 6B, 6C). 이는 *coq4* 돌연변이 균주는 지용성 항산화제로서의 역할을 하는 QH₂를 생성하지 못함으로 linoleic acid 혹은 linolenic acid의 자가산화에 의한 산물에 대해서 민감하여 치사되는 것을 의미한다. *coq4* 돌연변이 균주에 *N. crassa*의 *coq-4* 유전자가 도입될 경우에는 야생형 *S. cerevisiae* 수준의 생존율을 보였는데 이는 coenzyme Q의 생산 회복에 따른 과산화물 및 라디칼 저항성의 회복에 기인한다고 판단된다(Fig. 6B, 6C). 지방산 중에서도 자가산화가 쉽게

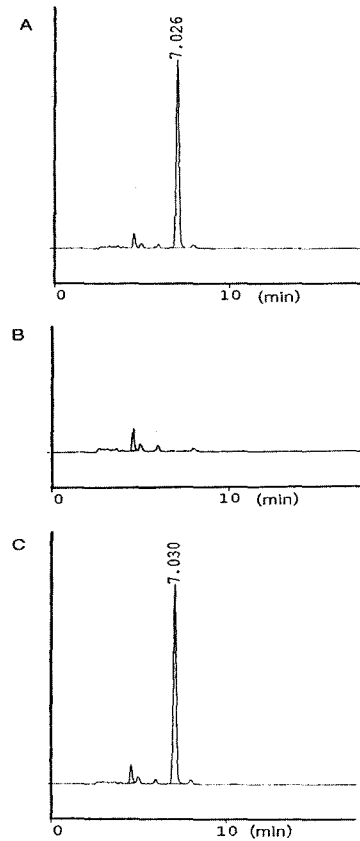


Fig. 5. Analysis of coenzyme Q₆ by HPLC. Shown are the absorption peaks at 275 nm. (A) wild-type *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C strain, (B) *coq4* mutant *S. cerevisiae* CEN Δ COQ4, strain and (C) *coq4* mutant strain complemented with *N. crassa coq-4*.

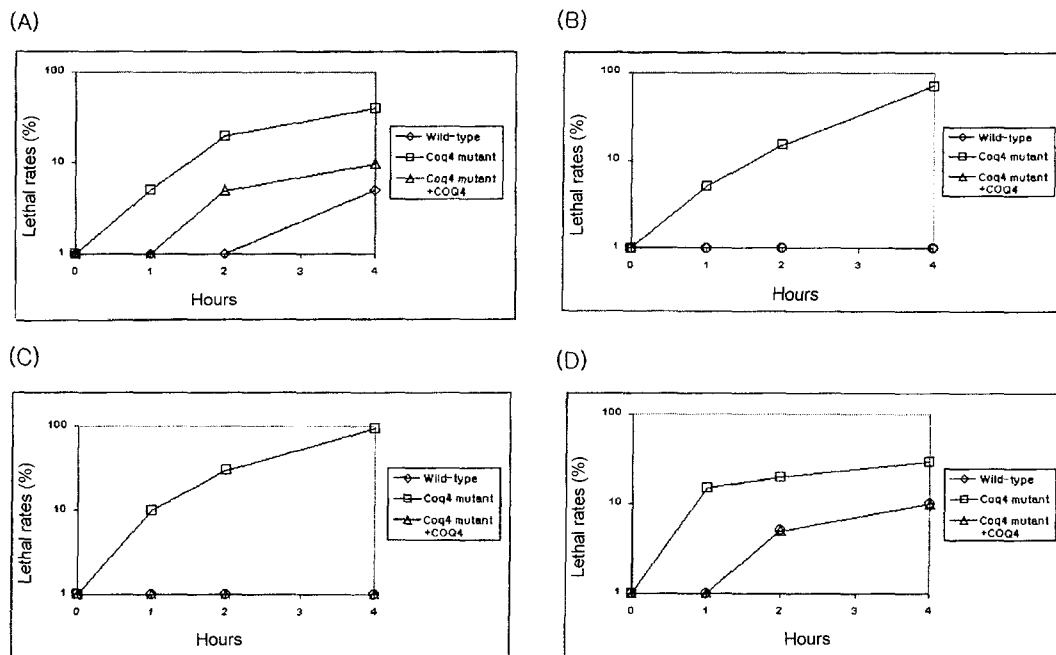


Fig. 6. Lethality when polyunsaturated acids such as linolenic acid or linoleic acid were supplemented. (A) addition of 820 μM oleic acid, (B) 820 μM linoleic acid, (C) 820 μM linolenic acid and (D) 820 μM linolenic acid + 20 μM α-tocopherol.

일어나지 않는 단일 불포화지방산인 oleic acid로 처리된 경우에는 *S. cerevisiae coq4* 돌연변이 균주의 경우에도 치사율이 낮아지는 것으로 관찰되었으며, 흥미롭게도 야생형 균주나 *N. crassa coq-4*에 의해서 상보된 균주에서는 도리어 치사율이 linoleic acid나 linolenic acid가 첨가된 경우보다 약간 증가하는 것으로 관찰되었는데 그 원인에 대해서는 알 수가 없다(Fig 5A). 또한 *S. cerevisiae coq4* 돌연변이 균주의 성장 시에 항산화제의 첨가는 치사율을 감소시키는 것으로 알려졌는데, 잘 알려진 항산화제인 α -토코페롤을 200 μ M의 농도로 배지에 첨가하면 치사율이 크게 감소하는 것을 볼 수 있다. 하지만 야생형 균주나 *N. crassa coq-4*에 의해서 상보된 균주에서는 도리어 치사율이 10% 정도 증가하는 것으로 관찰되었는데 그 원인에 대해서는 알려진 바가 없으며 더 자세한 조사가 필요할 것으로 생각된다(Fig 6D).

감사의 글

본 실험을 위해 *S. cerevisiae coq4* 돌연변이체를 제공해주신 UCLA의 Clarke 교수에게 감사를 드립니다.

참고문헌

- Adachi, A., N. Shinjo, 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.
- 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.
- Belogradov, G. I., P. T. Lee, T. Janassen, A. Y. Hsu, P. Gin, and C. F. Clarke. 2001. Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 48-58.
- 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.
- Echtay, K. S., E. Winkler, K. Frischmuth, and M. Klingenberg. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1416-1421.
- Echtay, K. S., E. Winkler, and M. Klingenberg. 2000. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408, 609-613.
- Ernster, L and P. Forsmark-Andree. 1993. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* 71(8 Suppl.), S60-5.
- Evans, I. H. 1996. Yeast protocols. Human Press, Totowa, New Jersey.
- Forsmark, P., F. Aberg, B. Norling, K. Nordenbrand, G. Dallner, and L. Ernster. 1991. Inhibition of lipid peroxidation by ubiquinol in submitochondrial particles in the absence of vitamin E. *FEBS Lett.* 285, 39-43.
- Genova, M. L., E. Bonacorsi, M. D'Aurelio, G. Formiggini, B. Nardo, S. Cuccomarino, P. Turi, M. M. Pich, G. Lenaz, and C. Bovina. 1999. Protective effect of exogenous coenzyme Q in rats subjected to partial hepatic ischemia and reperfusion. *Biofactors* 9, 345-349.
- 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., T. Q. Do, P. T. Lee, and C. F. Clarke. 2000. Genetic evidence for a multi-subunit complex in the *O*-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1484, 287-297.
- 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., P. L. Larsen, and C. F. Clarke. 2001. A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans clk-1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 421-426.
- 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.
- Kim, E. J., S. R. Kim, and B.-U. Lee. 2003. Restoration of *Saccharomyces cerevisiae coq7* mutant by a *Neurospora crassa* gene. *K. J. Life Science* 13, 933-942.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH, Cold Spring Harbor, New York.
- Matsura, 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.
- Mlakar, A. and G. Spiteller. 1994. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214, 209-220.
- 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.
- Neurospora* Sequencing Project. Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research "assembly version 3" [www-genome.wi.mit.edu]
- 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.
- Poon, W. W., T. Q. Do, B. N. Marbois, and C. F. Clarke. 1997. Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast *coq* mutants. *Mol. Aspects. Med.* 18 (Suppl.), S121-127.
- 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 *bcl1* complex stability in yeast *coq* mutants. *J. Biol. Chem.* 277, 10973-10981.

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. Szkopinska, A. 2000. Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochim. Pol.* 47, 469-80.
29. Tzagoloff A. and C. L. Dieckmann. 1990 PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 54, 211-225.

(Received April 21, 2004/Accepted May 27, 2004)

ABSTRACT : Functional Expression of the *Neurospora crassa coq-4* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Eun Jung Kim, Sang Ki Choi¹, Jae Woo Chun², Kye-Heon Oh² and Bheong-Uk Lee*
(Division of Biological Sciences, Kosin Univ., Busan 606-701, Korea, ¹Dept. of Biological Sciences, Sunchon National Univ., Suncheon 540-742, Korea, ²Dept. of Life Sciences, Soonchunhyang Univ., Asan 336-745, Korea)

Coenzyme Q is a quinone derivative that acts as a lipid electron carrier in the respiratory chain located at mitochondrial inner membrane in eucaryotes or plasma membrane in procaryotes and also functions as antioxidant. A putative *Neurospora crassa coq-4* gene was cloned and functionally expressed in *Saccharomyces cerevisiae coq4* mutant. Complemented *S. cerevisiae* mutant strain was able to produce coenzyme Q₆ and showed a normal growth rate. They also showed less sensitivities to polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid or linolenic acid. The predicted sequence of *N. crassa COQ4* is consisted of 347 amino acids with a molecular mass of 39.7 kDa and showed 35% identity and 52% similarity with that of *S. cerevisiae*.