

CoQ₁₀ 生物合成限速酶及其编码基因对布莱凯特黑牛品种培育的实践意义

牛召珊^{1,2}, 董雅娟^{1,2,3*}, 赵仕全^{1,2}, 杨莉^{1,2}, 柏学进^{1,2,3}

(1. 山东省黑牛繁育工程技术研究中心, 山东青岛 266109; 2. 青岛农业大学动物胚胎工程中心, 山东青岛 266109; 3. 山东布莱凯特黑牛科技股份有限公司, 山东淄博 256306)

摘要 辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 作为人体线粒体呼吸链中的递氢体具有较高的学术研究及应用价值。由 *ubiA/coq2* 基因编码的对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶是原核和真核生物 CoQ 生物合成途径的限速步骤, 因此对该酶及其编码基因的研究显得尤为重要。对该酶及其编码基因的研究成果和现状进行综述和展望, 旨在为布莱凯特黑牛品种培育的实践研究提供理论指导意义。

关键词 CoQ₁₀; 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶; *ubiA/coq2*; 布莱凯特黑牛

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00154-03

在分子生物学时代, 如何利用分子生物学手段提高我国肉牛肉用品质是当务之急。布莱凯特黑牛是由布莱凯特黑牛科技股份有限公司精心培育的高档肉牛, 其牛肉含有丰富的蛋白质, 氨基酸组成比猪肉更接近人体需要, 能提高机体抗病能力, 对生长发育及手术后、病后调养的人在补充失血和修复组织等方面特别适宜, 同时 CoQ₁₀ 含量也相对较高, 具有营养心肌的功能。

CoQ₁₀ 的生物合成有 2 个关键步骤: 聚异戊二烯焦磷酸合成酶催化合成侧链结构聚异戊二烯焦磷酸 (PPP) 的聚合反应; 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶催化核心结构苯醌环的前体对羟基苯甲酸 (PHB) 与侧链结构 PPP 的缩合反应。前者决定了生物体合成的 CoQ 的类型, 而后者则是整个 CoQ 生物合成途径的限速步骤。对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶在原核生物和真核生物中的编码基因分别为 *ubiA* 和 *coq2*。笔者研究了该酶编码基因变异对肉牛 CoQ₁₀ 生物合成量的影响, 对实现布莱凯特黑牛分子标记辅助育种, 以获得 CoQ₁₀ 高产肉牛具有重要的实践意义。

1 辅酶 Q₁₀

CoQ 是生物体内广泛存在的脂溶性醌类化合物, 不同来源的 CoQ 侧链异戊烯单位的数目不同, 人类和哺乳动物是 10 个异戊烯单位, 故称辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀)。CoQ₁₀ 主要存在于细胞线粒体内膜上, 并参与线粒体呼吸链上的电子传递。1957 年威斯康辛大学的 Crane 等^[1] 最先从牛心脏细胞线粒体中分离和纯化出 CoQ₁₀, 并确定其是线粒体呼吸链上的组分之一。化学渗透假说的提出, 进一步证实了 CoQ₁₀ 在能量转化系统对质子转移起关键作用^[2], 参与 ATP 的形成, 是生物体重要的抗氧化剂。

1.1 辅酶 Q₁₀ 的化学性质 辅酶 Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀, 简称为 CoQ₁₀), 又称泛醌, 是脂溶性醌类化合物, 分子式为 C₅₉H₉₀O₄, 分子量为 863.36, 化学名称为 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸异戊烯基苯醌^[3], 其结构式如图 1 所示。

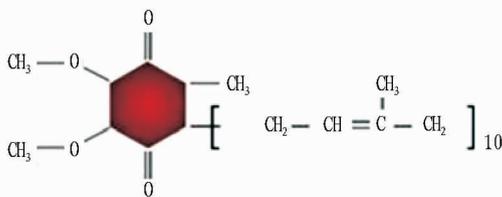


图 1 CoQ₁₀ 结构式

CoQ₁₀ 具有醌类物质的化学性质, 有 1 个苯醌环核心和 1 条含有 10 个异戊二烯单元的侧链, 其功能主要来自于醌基的氧化还原特性和侧链的物理特性。醌环中的羟基取代基使其倾向于极性, 而聚异戊二烯侧链使其在疏水环境中具有较低的自由能, 能在线粒体内膜中迅速扩散^[4]。醌环中虽然存在着碳碳双键间的共轭体系, 但是 X 射线分析证明醌环并不是芳香烃, 不属于芳香族化合物。它具有典型的烯烃和羰基化合物的化学性能, 可以进行多种形式的加成反应与氧化还原反应, 因此在细胞中它有氧化型醌、还原型醌和自由基半醌 3 种形态。

1.2 辅酶 Q₁₀ 的生理生化作用 CoQ₁₀ 广泛存在于能量代谢活跃的组织, 尤其是心肌细胞的线粒体中, 在线粒体呼吸链即电子传递系统中起到递氢体的作用, 是细胞呼吸链的重要组成部分。同时, 它也是一种公认的氧自由基清除剂。若线粒体中的 CoQ₁₀ 含量不足, 会导致多种酶活力明显下降。

CoQ₁₀ 是线粒体中不同呼吸链酶氧化呼吸的汇合点, 处于 NADH 和琥珀酸脱氢酶到细胞色素 b 之间, 主要作用是在电子传递链上的复合体间转移电子, 以此产生穿过生物膜的电子梯度^[5]。CoQ₁₀ 可以从复合物 I 及复合物 II 接受氢后, 将质子释入线粒体基质内, 电子则传递给细胞色素。该过程促进了氧化磷酸化及电子的主动转移, 形成机体的主要储能物质 ATP, 并通过减少心肌 AMP 损失提高 ATP 水平, 减少钙离子流失, 稳定细胞膜及钙离子通道的完整性。CoQ₁₀ 通过传递氢给自由基后, 在抗氧化酶的作用下发生反应, 从而清除自由基, 抑制其对生物膜的损伤^[6]。

CoQ₁₀ 能在线粒体膜中自由扩散, 在膜间隙 (C 侧) 还原型 CoQ₁₀ 的 1 个电子经 Fe-S → 细胞色素 c1 → 细胞色素 c 传递, 自身被氧化为半醌, 同时将 1 个质子释放到膜间隙; 半醌再将电子交给细胞色素 b566 → b562, 释放另外 1 个质子

基金项目 国家科技支撑计划项目 (2012BAD39B05)。
作者简介 牛召珊 (1986-), 女, 山东邹城人, 硕士研究生, 研究方向: 分子标记辅助育种。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: etcenter@126.com。
收稿日期 2012-10-31

到膜间隙。细胞色素 b566 得到的电子为循环电子,其传递路线为半醌 → b566 → b562 → CoQ₁₀。在基质 (M 侧), CoQ₁₀ 可被复合体 I (复合体 II) 或细胞色素 b562 还原为氢醌。1 对电子经 CoQ₁₀ 到复合物 III 的电子传递过程中,共有

4 个质子被转移到膜间隙,其中 2 个质子是 CoQ₁₀ 转移的^[7]。因此,CoQ₁₀ 能促进氧化磷酸化反应及质子的主动转移,是细胞代谢及细胞呼吸的激活剂。

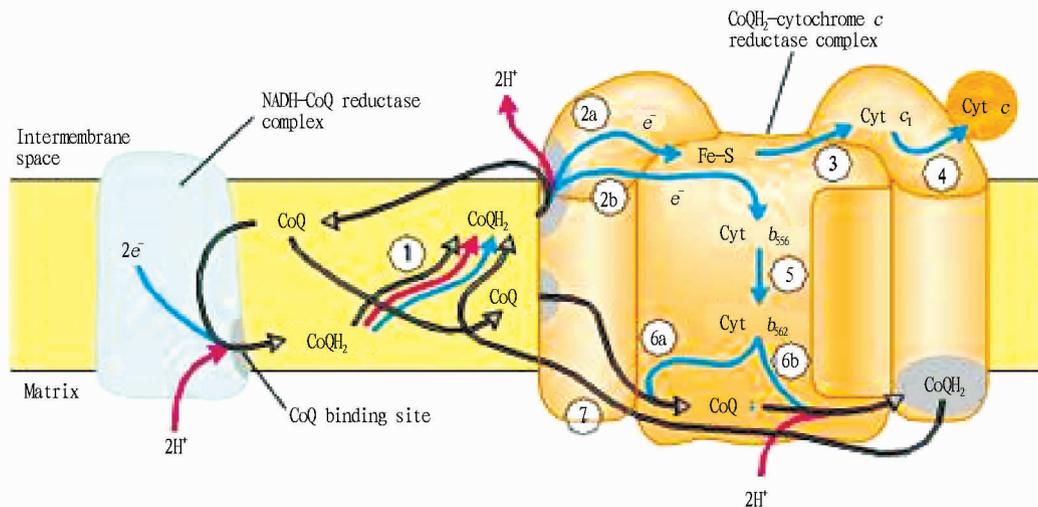


图 2 CoQ₁₀ 循环

1.3 辅酶 Q₁₀ 研究现状 人体中 CoQ₁₀ 的总含量仅为 500 ~ 1 500 mg, 并且 CoQ₁₀ 总含量随着年龄的增长而减少。在人的器官中, CoQ₁₀ 含量在 20 岁时达到高峰, 然后迅速减少, 而在心脏中 CoQ₁₀ 浓度的减少尤为明显。CoQ₁₀ 在人类脏器 (心脏、肝脏、肾脏)、牛肉、豆油、沙丁鱼、鲑鱼和花生等食物中含量相对较高, 摄入大约 0.5 kg 沙丁鱼、1.0 kg 牛肉或 1.5 kg 花生可分别提供约 30 mg CoQ₁₀。

近年来研究表明, CoQ₁₀ 是人体细胞中重要的生化辅酶之一, 具有抗脂质过氧化作用, 能显著改善心肌功能, 改善缺血、栓塞及减缓动脉硬化的潜能, 稳定和修复细胞结构, 具有清除自由基、维持细胞膜的通透性、提高免疫功能等多种药理作用。它还能降低血压, 在治疗坏血病、病毒性肝炎以及促进胰腺功能和分泌等方面也有显著效果。CoQ₁₀ 作为药物和保健品在发达国家已被广泛使用, 但是由于 CoQ₁₀ 分子量较大、水溶性差, 传统的片剂、胶囊在小肠中的生物利用度较低。迄今为止, CoQ₁₀ 的研究热点一直集中在其生物能学及抗氧化性方面, 因此如何安全有效地提高 CoQ₁₀ 的体内生物利用度已成为国外近年来研究的主要方向。

目前, CoQ₁₀ 的生产方法主要有 3 种: 动植物组织提取法、微生物发酵法和化学合成法。国内主要采用第 1 种方法, 而国外则多采用第 2 种方法。由于微生物法生产 CoQ₁₀ 具有经济实用、不受原料的限制、易大规模生产、产品活性好等特点, 颇受研究者的青睐。但是受菌种、发酵工艺以及下游提取纯化工艺的限制, 其产量并不高, 目前还无法满足工业化生产的需求^[8]。因此, 诱变育种、构建工程菌、优化发酵工艺、优化提取纯化工艺等已成为新一轮的研究热点。

人们越来越关注 CoQ₁₀ 的研究价值和实践意义, 对于其研究虽是多方面的, 但对于大型哺乳动物的研究还未见报道。基于此, 笔者尝试通过对 CoQ₁₀ 生物合成过程中的主要

限速酶——对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶进行分子标记, 用以辅助选育高产 CoQ₁₀ 的优质布莱凯特黑牛, 以期提高高档牛肉中 CoQ₁₀ 的含量, 使其营养更为丰富。

2 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶及其编码基因 *ubiA/coq2*

2.1 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶的特性 不同微生物种属能合成不同 CoQ 系列的化合物, 如大肠杆菌合成 CoQ₈, 整个合成过程有一系列的酶参与。在与其生物合成途径相关的若干种酶中, 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶是主要限速酶, 其在各物种之间具有较高的同源性。序列分析表明, 酿酒酵母 *coq2* 存在 1 个 1 116 bp 的开放阅读框, 编码 1 个含 372 个氨基酸、分子量为 41 001 Da 的蛋白质, 此蛋白具有 1 个典型的线粒体前导序列, 具有形成 α -螺旋的预测性的趋势, 以及 6 个潜在的跨膜域^[9]。该酶与膜结合, 对聚异戊二烯焦磷酸的专一性不强, 即具有相对专一性, 可接受不同数目的侧链。

研究表明, 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶属于芳香族异戊烯转移酶家族中的膜结合型异戊烯转移酶^[10], 其氨基酸序列具有典型的异戊烯焦磷酸结合区 (N/D) DXXD, 酶活性依赖二价阳离子 (尤其是 Mg^{2+}), 主要参与泛醌的生物合成。由于目前尚没有准确的芳香聚异戊二烯转移酶或其相关蛋白质的结构模型, 因此对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶的高级结构及其功能域还没有准确的报道。Bräuer 等^[11]来自不同微生物的对羟基苯甲酸聚异戊二烯转移酶进行比较, 推断 PPP 和 PHB 可能结合在酶的 N 端附近, 同时发现, 对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶由第 59 ~ 81 位氨基酸及第 183 ~ 205 位氨基酸构成的 2 个 xDxxDD 序列在进化中高度保守, 其中 Asp68、Asp71、Asp75、Asp191 以及 Asp195 被认为是催化功能的关键位点。这 2 个

区域分别被称为 D1 和 D2。

2.2 编码基因 *ubiA/coq2* 根据 Esembl Genome Browser 数据库公布的基因序列可知,牛的 *coq2* 基因定位于 6 号染色体上,含有 7 个外显子和 6 个内含子;其 mRNA 长度为 1 546 bp,编码 371 个氨基酸。因此,可以利用公布的牛 *coq2* 基因序列设计引物,克隆布莱凯特黑牛的 *coq2* 基因序列。

对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶对参与反应的 PPP 链长缺乏特异性,可以转移从 C30 到 C50 范围的多种聚异戊二烯焦磷酸同系物与 PBH 发生缩合反应,而且在微生物体内侧链长度并不是电子转移的关键因素。这为利用基因工程手段改造大肠杆菌,从而合成 CoQ₁₀ 成为可能。Suzuki 等^[12] 高效表达了 *ubiA* 基因 (*Plactac*), 但仅使 CoQ 产量提高了 1.5 倍,表明 *ubiA* 基因的表达不是 CoQ 生物合成的唯一调节因素。由于 *ubiC* 基因编码的分支酸裂解酶 (UbiC) 催化第 1 步反应,即分支酸转化为 4-羟苯甲酸 (PHB),为 CoQ 提供核心结构苯醌环,苯醌环是形成醌环的关键一步,于是有人构建了 1 种 *ubiC* 和 *ubiA* 基因的共表达盒,并连同其他 4 个大肠杆菌 CoQ 生物合成相关基因 (*ubiB*、*ubiG*、*ubiH* 和 *ispB*) 的表达盒一起导入大肠杆菌,结果 CoQ 产量提高了 2 倍左右^[13]。因此,构建产 CoQ₁₀ 的大肠杆菌基因工程菌,可以从以下 2 个方面入手:一方面改造大肠杆菌链长控制基因使其能够合成 CoQ₁₀,另一方面强化表达其生物合成途径的关键酶基因,通过增强整个合成通路提高大肠杆菌 CoQ 生物合成能力^[14]。基于此,有人构建了关键基因 *ubiCA* 和 *ddsA* 基因的双质粒共表达系统,发现 CoQ 生物合成途径中多个功能基因的强化表达能进一步提高 CoQ 产量^[15],并能够改善 CoQ₁₀ 合成的专一性,为构建产 CoQ₁₀ 的大肠杆菌基因工程菌奠定了基础。由此可见,大多数研究者都是在大肠杆菌中,在结合表达外源 *dps* 基因的基础上,再强化对羟苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶的表达,从而提高 CoQ₁₀ 产量。

此外,对该基因的研究在医学领域也十分受到青睐。研究表明,*coq2* 的遗传性突变引发主要的肾小球疾病,当肾小囊细胞和肾小球细胞电子显微镜下线粒体数目增加时,则可能是由 *coq2* 基因突变引起的肾脏病变^[16]。另外,还有人演示了 *coq2* 的突变对人类的疾病的致病性,并利用人的 *coq2* 基因功能性补充 *coq2* 缺陷性酵母菌,建立了研究人类 CoQ₁₀ 缺陷的酵母菌模型^[17]。

然而,将该基因作为分子标记用于筛选高产 CoQ₁₀ 个体的研究还并未见报道。笔者已经利用 NCBI 网站上公布的牦牛的 *H-FABP* 基因序列,成功克隆并分析了布莱凯特黑牛的 *H-FABP* 基因^[18],并进行了微卫星标记辅助遗传多样性分析^[19],具有丰富的分子生物技术经验,为今后进一步研究奠定了基础。

3 展望

目前,CoQ₁₀ 在西方国家已广泛用于食品添加剂、化妆品

和医药领域,但是在国内受成本的限制,CoQ₁₀ 主要用于医药领域。随着人们对 CoQ₁₀ 功能认识的不断深入和生活水平的不断提高,未来 CoQ₁₀ 的市场前景将非常广阔。在科研方面,关于 CoQ₁₀ 生物合成途径已经基本清晰;在基础研究领域,大多数学者都在对其代谢调节规律及对高产菌种的选育或构建方面进行研究;而对于大型哺乳动物的研究甚少,尤其在 CoQ₁₀ 高产肉牛选育方面更是不多见。因此,研究布莱凯特黑牛的对羟基苯甲酸聚异戊二烯焦磷酸转移酶及其编码基因的表达,对于培育高产 CoQ₁₀ 高档肉牛具有重大指导意义。

参考文献

- [1] CRANE F L, HATEFI Y, LESTER R L, et al. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1957, 25: 220 - 221.
- [2] MITCHELL P. The vital protonmotive role of coenzyme Q[J]. *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*, Elsevier, 1991, 6: 3 - 10.
- [3] 肖新才, 冯翔, 苏宜香. 辅酶 Q₁₀ 抗氧化作用研究进展[J]. *国外医学: 卫生学分册*, 2003, 30(4): 216 - 220.
- [4] 李伟静, 于群. 辅酶 Q 10 的生理作用及临床应用[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(5): 882 - 884.
- [5] MSKOTO K. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone[J]. *J Biosci Bioengin*, 2002, 94(6): 533.
- [6] 张鸿, 吴玉荷. 类维生素物质 - CoQ₁₀ 的研究进展[J]. *国外医学 - 卫生分册*, 2002, 29(6): 370 - 373.
- [7] 张勇, 时庆德, 文立. 呼吸链电子传递: 线粒体氧化磷酸化偶联的重要限速步骤[J]. *天津体育学院学报*, 2000, 3(15): 17 - 19.
- [8] 李焱生, 方建军, 钟卫鸿. 微生物法高产辅酶 Q₁₀ 的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009(2): 59 - 62.
- [9] ASHBY M N, KUTSUNAI S Y, ACKERMAN S, et al. COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate polyprenyltransferase[J]. *Biological Chemistry*, 1992, 267(6): 4128 - 4136.
- [10] 高娟, 曾英, 卢山. 芳香族异戊烯转移酶的研究进展[J]. *植物学报*, 2010, 45(6): 751 - 759.
- [11] BRÄUER L, BRANDT W, WESSJOHANN L A. Modeling the E. coli 4-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (*ubiA* transferase) and characterization of potential active sites[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2004, 10: 317 - 327.
- [12] SUZUKI K, UEDA M, YUASA M, et al. Evidence that *Escherichia coli ubiA* product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of *ubiA* gene expression[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(10): 1814 - 1819.
- [13] ZHU X F, YUASA M, OKADA K, et al. Production of ubiquinone in *Escherichia coli* by expression of various genes responsible for ubiquinone biosynthesis[J]. *J Ferment Bioeng*, 1995, 79(5): 493 - 495.
- [14] 张惠展. 途径工程: 第三代基因工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [15] 傅楠, 叶江, 吴海珍, 等. 基因替换及多基因共表达强化大肠杆菌辅酶 Q₁₀ 的合成能力[J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(5): 654 - 659.
- [16] DIOMEDI-CAMASSEI F, DI GIANDOMENICO S, SANTORELLI F M, et al. COQ2 Nephropathy: A Newly Described Inherited Mitochondriopathy with Primary Renal Involvement[J]. *American Society of Nephrology*, 2007, 18: 2773 - 2780.
- [17] LOPEZ-MARTIN J M, SALVIATI L, TREVISSON E, et al. Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and *de novo* pyrimidine synthesis[J]. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(9): 1091 - 1097.
- [18] 李兴芳, 柏学进, 董懿为, 等. 布莱凯特牛心脏脂肪酸结合蛋白基因的序列测定及分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 112 - 117.
- [19] 董懿为, 董雅娟, 柏学进, 等. 利用微卫星标记对 4 个肉牛品种进行遗传多样性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(8): 121 - 129.