초 청 강 연

좌 장: 정 봉 구

10:00 1. Suppression of plant defense response by fungal pathogen.
----------김 홍 모

좌 장 : 유 승 헌

10:40 2. Isolation, Characterization and Functional Analysis of New Chromosomal Virulence Gene(*acv B*) of *Agrobacterium tumefaciens.*
---------- 강 희 완

좌 장 : 유 화 영

11:20 3. 배추와 무에서 분리한 순무 모자이크 바이러스의 생물적 성질 및 유전자 분석에 관한 연구----------최 국 선

초 청 강 연 요 지

1. Suppresion of plant defense response by fungal pathogen(병원균에 의한 식물방어반응 의 제어). 김홍모. KIST 생명과학연구소 생물소재연구.

식물도 침입하려는 미생물에 대항하여 자신을 지키기 위한 방어기구를 갖추고 있다. 그럼에도 불구하고 어떤 종의 미생물은 특정 식물의 방어벽을 극복하고 기생에 성공하게 된다. Oku(1977)는 완두와 흑반병균의 연구를 통하여 이 균이 Elicitor(또는 Inducer; 완두의 저항반응을 유도하는 물질의 총칭)를 생산하고 있슴에도 불구하고 완두의 방어반응을 억제하여 감염에 성공하고 있는 것을 발견, 그러한 역할을 담당하는 물질을 "Suppressor"로 정의하였다. 또한 완두흑반병균 외의 식물병원균에서도 Suppressor의 존재가 보고되고 있어 병원성 결정인자로서의 그 중요성이 부각되고 있으나 이들 Suppressor의 구조는 밝혀지지 않았다.

이 연구는 처음으로 완두 흑반병균의 포자 발아액으로 부터 suppressor를 정제하여 그 화학구조를 결정하고 활성을 담당하는 구조를 특정지었으며, 그 작용기작을 규명하였다.

(1) **완두 흑반병균 Suppressor의 정제 및 구조해석**

완두 흑반병균[*Mycosphaerella pinodes*(Berkley et. Bloxam) Vestergren, Strain OMP-1]의 포자 발아액(Germination fluid)의 저분자량(L.M.W.)부분에서 얻은 Suppressor 활성부분을 계속해서 gel-filtration (Toyopearl™ HW-40F, TOSOH)HPLC, Sep-pak™ C_{18}(Waters), ODS™ (Gaskuro Kyogyo)-HPLC, Ion 배위자HPX-42A (Biorad)-HPLC로 정제하여 Pisatin(완두의 Phytoalexin)축적억제 활성을 비롯한 Suppressor 활성을 나타내는 2물질을 정제하였다. NMR과 Amino acid analyzer 등의 기기분석 결과 그 화학구조는 GalN Ac-O -Ser - Ser-Gly(분자량 459Da.; Supprescin A)과 Gal(β-1,4) -Gal NAc- O- Ser -Ser -Gly-Asp-Glu-Thr (분자량 959Da.; Supprescin B)으로 밝혀졌다. 또한 Supprescin A와 B는 Mutin형의 당 Peptide로서 Peptide부분은 α-Helix구조를 취하고 있으며, 당과 Peptide는 V자형 굴절구조의 대단히 특이한 입체배좌를 유지하며 굴절부분은 강한 정전하를 띄고 있음을 알수 있었다.

(2) **Suppressin A의 생리작용**

1) 완두 방어응답의 억제효과 ; 완두의 Phytoalexin인 Pisatin축적을 지표로 Suppressin A의 방어응답 억제효과를 조사한 결과 1000㎍/㎖에서는 완전히 억제하였고 10㎍/㎖이하의 저농도에서도 억제에 대한 유의차가 인정되었다. 이러한 Pisatin축적 억제효과는 반 길항과 비 길항의 혼합형 저해에 의한 것으로 판명되었다. 또 그러한 효과는 Elicitor에 의한 Pisatin축적이 개시되는 9시간 이후에 있어서도(21시간까지) 유지되어 Elicitor 단독처리 레벨과 차이가 없어지는 이른바 지연효과로 나타났다. 이러한 지연효과는 Pisatin 생합성계의 Key enzyme의 하나인 Phenylalanine ammonia lyase(PAL) 활성의 직접적인 저해가 아닌 PAL활성화를 3~6시간 지연시킨 결과에 의한 것으로 밝혀졌다. 한편 Suppressin A는 타 콩과식물의 Phytoalexin축적에 대하여 억제활성을 나타내지않고 오히려 Elicitor로 작용하였는데, 이 결과에서 즉 Suppressin A에 의한 식물방어 반응의 억제는 종특이적으로 작용하고 있음을 알았다.

2) 완두 원형질막 ATPase 저해효과 ; Suppressin A 단독 처리에서는 저해 활성이 없었다. 그러나 *in vivo*에서는 Elicitor와 공존한 경우에 한하여 ATPase활성을 억제하였다.

3) 수용성 유도 효과 ; Suppressin A는 완두에 병원성이 없는 국화 꽃썩음병균(*M. ligulicola*)과 오이류 줄기마름병균(*M. melonis*)의 완두 감염을 유도하지 않았으며 타 콩과 식물에 대해서도 감염유도 효과를 나타내지 않았다.

(3) **Suppressin A의 활성부위**

Suppressin A의 활성부위를 규명하기 위하여 그 구성 Peptide인 Ser-Ser-Gly(SSG)과 구성 당 인 N-acetyl galactosamine(GalNAc)의 생리활성을 조사하였다. 즉 화학합성한 SSG에 관하여 Pisatin 축적억제효과 및 완두 원형질막 ATPase활성 저해효과(*in vivo*), 완두 흑반병균의 감염유도효과를 조사하였다. 이 결

과 원래의 Supprescin A에는 미치지 못하였으나 Pisatin축적 억제효과가 인정되었다. 한편 SSG는 Supprescin A와는 달리 *in vitro*에서도 ATPase활성저해를 나타내었다. 이것은 Supprescin A가 원형질막 ATPase에 그 원인이 명확하지는 않으나 영향을 주고 있음을 입증하는 결과였다. 그러나 완두 흑반병균의 감염유도효과는 인정되지 않았다. 한편 Supprescin A를 구성하는 GalNAc는 Supprescin A에 의한 Pisatin 축적 억제 활성을 저하시키는 활성이 인정되었고 완두 흑반병균의 감염을 저해하는 효과도 인정되었다. 따라서Supprescin A가 Recepter site에 결합하는 과정에 있어서 대단히 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 추정되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 Supprescin A는 기존의 부분순화 Suppressor가 갖고 있는 활성, 즉 1) 수용성유도(Accessibility induction) 2)완두 원형질막 ATPase활성의 저해(Inhibition of ATPase activity) 등의 종특이적 작용(활성)중에서 방어응답 억제에 가장 깊이 관여하는 인자로 결론 지을수 있었다. 덧붙여 Suppressor의 정제 과정에서 Supprescin A, B 외에도 복수의 Suppressor 활성부분을 확인하였으며, 이로서 기주-병원균의 특이성 결정인자로서의 Suppressor 활성은 복수의 활성 성분에 의한 종합적인 효과로 나타나고 있음이 판명되었다. 즉 *Mycosphaerella pinodes*는 Supprescin A, B를 포함한 복수의 Suppressor를 생산하고 분비함으로서 기주 완두의 방어반응을 교란시키고 감염에 성공하는 것으로 밝혀졌다.

2. Isolation, Characterization and Funtional Analysis of New Chromosomal Virulence Gene(*acv B*) of *Agrobacterium tumefaciens*. 강희완. 농업기술연구원 생물자원부 분자유전과.

Agrobacterium tumefaciens incites crown gall tumors on dicotyledons and some monocotyledonous plants. It is assumed that *Agrobacterium* pathogensis entails a large assembly of virulence genes expressed in many stages of infection, which are present on the Ti-plasmid as well as on the chromosome. Despite that many virulence genes on the Ti-plasmid have been identified by extensive genetic analysis, the mechanism of tumogenesis is still obscure. To investigate the unknown aspects of crown gall formation, new chromosomal virulence gene was isolated and analyzed. Transposon 5 (Tn5) was introduced into the genome of *A. tumefaciens* (A208 strain harboring a nopaline type Ti-plasmid) by conjugating plasmid, pJB4JI, containing Tn5. Six thousand transconjugants were tested for virulence on carrot(*Daucus carota* L) root disks. Of these transconjugants, 15

isolates were avirulent or very attenuated. The inserted regions(plasmid or chromosome) of Tn5 in those isolates were identified by Southern hybridization. Nine avirulent mutants had a Tn5 insertion in the chromosome, while six mutants had it in the Ti-plasmid. A mutant strain B119 was selected and characterized, because of its distinctive avirulent phenotype. The growth rates of the mutant on L agar and minimal medium(AB) plates were similar to those of the parent strain(A208). The mutant strain B119 was avirulent on all host plants such as kalanchoe stem, potato tuber disk, sunflower stem, pumpkin stem and cucumber hypocotyl. The attachment ability of the mutant to carrot cells was not impaired. The mutant had one Tn5 insertion site in its chromosome. In order to confirm that the avirulent phenotype of B119 was due to the Tn5 insertion in the chromosome DNA fragment(8.8Kb) containing the Tn5 insertion region in the strain B119 was cloned. The fragment was used to replace the wild type DNA in parent strain A208 by marker exchange. The marker exchanged A208 was avirulent on carrot root disk, that was same as B119. A wild type target locus(3.0kb) in strain A208 was cloned and sequenced. One open reading frame(1350bp) was identified in the sequence and named as *acv*B gene. No homologous genes to *acvB* gene were found in GeneBank database, although *acvB* gene had some similarity to the open reading frame of downstream of virA gene locus on Ti plasmid(octopine type). Therefore, *acvB* gene appeared to be new chromosomal virulence gene of *A. tumefaciens*. To locate the Tn5 insertion site in the chromosome of strain B119, the DNA fragment including the boundary part between the Tn5 and the flanking DNA region was sequenced. The sequence showed that Tn5 is inserted in the middle of *acvB* gene of B119. The Whole and deleted fragments of *acvB* gene were transformed into strain B119. The transformants containing wholoe *acv*B gene complemented strain B119 and produced big galls on cucumber hypocotyls, while the transformants containing *acvB*-deleted DNA fragmants was not able to complement strain B119.

The *acv*B gene was over-expressed in *Escherichia coli* and its gene product of a 47kDa protein was produced in periplasmic space of the bacterium. The protein was purified by ion exchange and gel filtration chromatograpies. N-terminus of the purified AcvB protein was analyzed by Edman degradation method. The N-terminal amino acid sequence (QDKDAYETGMIPADMIMVP) was determined and the sequence corresponded exactly to the 25th to 43th amino acid sequence of *acv*B gene.

According to the result of hydropathy profile, the amino acids from 1 th 24 of AcvB protein appeared to be hydrophobic in N-terminus. The 24 amino acids was assumed to be cleaved as a signal peptide that is required to produce a natured protein(47kDa). To locate AcvB protein in *A. tumefaciens*, strains A208 and B119 cells were fractionated into periplasmic, membrane and cytoplasmic fraction. The puririty of the fractions were tested by assaying the activities of marker enzymes of each fractions. The proteins from each fractions were examed by Western-blot analysis using the antiserum against AcvB protein. The AcvB protein was detected only in the periplasmic space of the strain A208, but not detected in other fractions. However, no AcvB protein was detected in any fractions of strain B119. The amount of AcvB protein was not increased in strain A208 by induction with acetosyringone.

To investigate the functional role of *acv*B gene in regulation of *vir* genes, *virB::lacZ*, *virD::lacZ*, and *virE::lacZ* fusion genes were introduced into strains B119 and A208 and fusion genes in both strains was induced by acetosyringone(100μM). All fusion genes were expressed normally in both strains in the presence of acetosyringone. In addition, the T-stand (lower strands of T-DNA) was generated in respond to acetosyringone in strains B119 as well as A208.These results indicated that AcvB protein is not involved in perception and signaling of acetosyringone in *vir* genes regulation and T-stand generation.

To examine of AcvB protein can bind to T-strand, gel retardation assay was carried out. AcvB protein bound to single-stranded T-DNA without having sequence specificity.

Taken together, new chromonomal virulence gene (*acv*B) of *A. tumefaciens* was isolated and it was proposed that AcvB protein binds to the T-stand in periplasm and mediates the transfer of the T-strand from *A. tumefaciens* to the host plant cells.

3.배추와 무에서 분리한 순무 모자이크 바이러스의 생물적 성질 및 유전자 분석에 관한 연구. 최 국 선. 농촌진흥청 원예연구소 원예환경과.

국내의 배추와 무에서 분리 동정한 순무 모자이크 바이러스(turnip mosaic virus, TuMV)의 생물적 성질, 바이러스 게놈 RNA에 대한 cDNA 클로닝, 외피단백질 유전자를 포함한 RNA 3′ 말단부위의 염기서열 및 분자교잡을 이용한 TuMV-RNA의 유

전자진단을 실시하였다.

1991년 강원도 고냉지를 중심으로 배추와 무에 발생한 바이러스 이병율은 배추에서 34.9%,무에서 40.5%를 나타냈다. 각 지역별 이병율은 횡계 20.1%, 진부 37.2%,춘천 40.5%였다. 배추와 무에서 전형적인 괴사반점 또는 모자이크 증상을 나타낸 이병엽 36개체로 부터 바이러스를 분리하였고, 이들을 *Chenopodium quinoa*에 접종하였을 때 나타나는 병징에 따라 TuMV를 2종으로 구분되었으며 이들을 각각 TuMV-cqs 및 TuMV-cql로 명명하였다. TuMV-cqs는 이 식물체의 접종엽 및 상엽에 전신감염되었으나, TuMV-cql은 접종엽에 국부병반을 형성하였다. 이들 바이러스는 모두 *Brassica rapa, Nicotiana glutinosa* 및 *N. clevelandii*에서는 전신감염 되었며 *Gomphrena globasa, C. amaranticolor, N. tabacum* cv. Xanthi nc 및 *Tetragonia tetragonoides*는 국부병반을 형성하였다. 이들 검정식물중 *T. tetragonoids*는 TuMV의 새로운 검정식물로서의 활용성이 인정되었다. 전자현미경으로 검경한 바이러스는 720 x 12 nm의 사상형입자였으며 관상봉입체도 관찰되었다. 혈청학적검정에서는 2종의 바이러스 모두 같은 항원성을 보였다.

TuMV-cqs게놈 RNA에 대한 cDNA클로닝을 실시하였다. 순화 바이러스로부터 정제한 TuMV-RNA는 약 9,000 뉴클레오티드의 분자크기를 보였다. 이 RNA를 이용하여 합성한 cRNA를 PBR322에 재조합시키고 *E. Coli* HB101에 형질 전환시켰다. 선발된 클론들로부터 재조합플라스미드를 정제하여 삽입된 cDNA를 검전한결과 약 600bp-2,050bp 크기를 갖는 6종의 cDNA가 선발되었다. 이들 중 pTUS6에서 추출한 약 2,050pb의 cDNA에 대한 제한 효소지도를 작성한 결과, 3' 말단의 polyA site로 부터 *Pst*I-*Xba*I site 에 450bp, *Xba*I-*Eco*RI site에 2200bp, *Eco*RI-*Eco*T141 site에 930bp, *Eco*T141-*Eco*RI site에 120bp그리고 *Eco*RI-*Pst*I site에 350bp의 DNA절편으로 나타났다. 이들을 이용하여 TuMV-cqs게놈 RNA의 3'말단부위에 존재하는 1,328 뉴클레오티드에 대한 염기서열을 결정한 결과, 이 부위에는 NIb유전자, 외피단백질유전자 및 3'말단 비번역영역이 포함되어 있었다. 외피단백질유전자는 288개의 아미노산을 코드할 수 있는 864개의 염기로 구성되어 있으며, 이 염기로 부터 번역된 외피단백질의 N 말단에는 glutamine(CGA)-alanine(GCA) cleavage site가 존재하였다. 외피단백질 유전자는 adenine 33.8%, guanine 25.8%, cytosine 21.9%, uracil 18.5%의 비율로 조성되어 있었다. TuMV-cqs의 외피단백질유전자는 TuMV-중국계통과 94.3%, TuMV-일본계통과 94.7%, TuMV-카나다계통과 93.8%의 상동성을 보였고, 아미노산은 각각 98.3%, 96.9%, 94.8%의 상동성을 나타냈다. 또한 potyvirus group에 속하는 PPV, JGMV, PVY, PeMV, TVMV 및 TEV와 외피단백질의 조성을 비교한 결과, 각각 49.78%, 41.9%, 52.8%, 53.6%, 43.4% 및 53.1%의 유사성을 나타냈으며 외피단백질은 N 말단부위에서 더 높은 유상성이 인정되었다. TuMV-cqs-RNA의 3' 말단 비번역영역은 poly A를 제외하고 209 뉴클레오티드로 구성도어 있으며 polyadinylation signal인 UAUGU가 3'말단으로부터 -146- -142상류에 위치하였다.

pTUS 6의 cDNA를 ECL probe로 사용하였을때 TuMV-cqs-cDNA가 클로닝된 플라스미드나 cDBA를 분자교잡검정에 민감하고 특이적으로 반응을 나타냈다. 한편 pTUS 6의 cDNA를 SP6 promoter가 삽인된 *in vitro* 전사벡터 pSTP18에 서브클로닝시킨 후, cDNA의 3'말단에 존재하는 *Xba*I site를 절단한 다음 RNA polymerase를 이용한 run-off 전사방식으로 DIG표지 RNA probe를 합성하여 분자교잡검정을 실시하였다. 그결과 정제된 TuMV-cqs-RNA를 slot blot에서 3 pg의 희석농도까지 검출할 수 있었으며, 이병식물체의 직경 8mm leaf disk에 존재하는 바이러스 RNA의 검출도 가능하였다. 배추와 무의 재배지에서 채집한 시료를 이 DIG 표지 RNA probe로 분자교잡을 실시한 결과, 양성반응을 나타낸 시료는 모두 전자현미경 검결에서도 바이러스 입자가 검출되었으며, 특히 무병징의 식물체로부터 바이러스 RNA의 검출이 가능한 민감한 결과를 얻었다.