

호박(*Cucurbita moschata* D_{UCHESNE})잎에서 리보솜불활성화 단백질의 분리 및 특성

조강진* · 이시명 · 김영태 · 황영수

*농업과학기술원 생물자원부 생화학과

초 록 : 리보솜불활성화 단백질(Ribosome-inactivating protein, RIP)을 생성하는 식물을 탐색하여 그중 호박(*Cucurbita moschata* D_{UCHESNE}) 잎에서 ammonium sulfate 침전, DE 52-Cellulose, S-Sepharose, FPLC Superose 12 HR, FPLC Mono-S column chromatography에 의하여 ribosome-inactivating 활성이 있는 단백질(PRIP 1, PRIP 2)을 분리하였다. 정제된 단백질의 분자량은 SDS-PAGE에서 약 31,000과 30,500인 염기성 단백질로서, 특히 PRIP 1은 열에도 안정하여 50°C에서 30분간 처리한 경우에도 활성이 유지되었다. 이 단백질들의 ribosome-inactivating 활성을 *in vitro* translation system에서 측정된 결과 50% 활성저해농도(IC₅₀)는 PRIP 1은 0.82 nM, PRIP 2은 0.79 nM이었다. PRIP 1과 PRIP 2의 N-말단부분의 아미노산 서열을 분석하여, 이미 밝혀진 리보솜불활성화 단백질들과 아미노산서열의 유사성을 분석해 본 결과, PRIP 1은 *Luffa cylindrica*에서 분리된 Luffin B 및 *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz에서 분리된 Trichokirin과, PRIP 2은 *Momordia charantia*에서 분리된 Momordin II 및 MAP 30과 유사성이 매우 높았다.(1997년 8월 13일 접수, 1997년 9월 1일 수리)

서 론

식물은 각종 환경스트레스와 병해충 등의 침해에 대해서 자신을 보호할 수 있는 방어기작을 가지고 있으며 대부분 세포에서 생산되는 특수한 기능을 가진 단백질에 의해서 이루어지고 있다. 최근 생화학 및 분자생물학의 발달로 이러한 방어기능성 단백질을 분리하고 특성을 구명하여 작용기작을 해명하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.^{1,2)} 이 중에서도 리보솜불활성화 단백질(Ribosome-inactivating protein, RIP)은 진핵세포 및 원핵세포내 ribosomal-RNA의 특정위치에 있는 adenine잔기의 N-glycosyl bond를 절단하므로써 미소기관(ribosome)을 불활성화시켜서 단백질합성을 저해하는 촉매적 기능을 가지고 있다.^{3,5)} 이러한 RIP의 세포독성은 식물 방어기작과 관련이 있음을 의미하며, 보리와 옥수수 종자 등에서 분리된 RIP이 식물병원균에 대한 저해효과가 있었으며 이 유전자를 형질전환한 식물에서 내병성이 증가되었음이 보고된 바 있다.^{6,8)} 또한, *Phytolacca americana*, *Mirabilis jalapa*, 참비름 등에서 분리된 RIP은 식물 바이러스의 감염을 저해하는 효과가 있으며, 분리된 단백질의 유전자를 형질전환한 담배와 감자에서 감염을 저해하는 효과가 있으며, 분리된 단백질의 유전자를 형질전환한 담배와 감자에서 여러종류의 바이러스에 저항성을 나타내었다.⁹⁻¹³⁾

이러한 리보솜불활성화 단백질은 많은 종류의 식물에서 발견되고 있으며, 식물종류에 따라서는 종자, 잎, 뿌리 등에서 발견되며 그 농도는 조직세포 100 g 당 수μg에서 수백 mg까지 다양하다.^{2,5,14-16)} 따라서 본 연구는 내병성 작물개발

을 위한 기초연구로서 국내 자원식물에서 리보솜불활성화 단백질을 탐색하여 몇종의 식물을 선발하였으며 그중 호박(*Cucurbita moschata* D_{UCHESNE})잎에서 분리정제한 단백질의 특성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

시료로 사용한 호박 (*Cucurbita moschata* D_{UCHESNE})은 1995년 여름에 야생채집하여 그 잎만을 분리하여 -80°C 냉동고에서 사용시까지 보관하였다.

단백질 분리정제

시료 1 Kg을 액체질소에 얼린 후 Waring blender에 갈아서 50 mM NaCl, 0.2 mM PMSF를 첨가한 완충용액 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol)으로 추출하였다. 이후 전 실험과정은 4°C저온실 내에서 수행하였다. 추출액을 Miracloth로 1차 여과하고 15,000 g에서 30분 원심분리하여 얻은 상등액을 단백질 조추출액으로 하였다. 조추출액은 다시 ammonium sulfate 30%~80%로 침전시킨 후 완충액에서 투석하였다. 이 농축액을 완충액으로 미리 평형화 시킨 S-Sepharose column (5×20 cm)과 연속적으로 연결된 DE-52 Cellulose column (5×20 cm)에 주입하여 완충액으로 용출시킨 다음, S-Sepharose column (5×20 cm)에 흡착된 단백질을 0-0.5 M NaCl 완충액으로 직선 농도구배로 용출시켰다. 용출액중 활성분획을 모아서 ammonium sulfate 80%로

찾는말 : 호박, 리보솜 불활성화 단백질, 아미노산 서열, 기내 단백질합성 저해력

*연락처

단백질을 침전시킨 후 완충액에서 투석처리된 농축액을 FPLC system(Pharmacia)에서 Superose 12 HR 10/30 column(25 ml)으로 분리하여 활성분획을 Mono-S column (1 ml)에 흡착시켜 0-0.5 M NaCl 직선 농도구배로 용출시켰다.

기내 단백질 합성 저해력 측정

기내 단백질 합성 저해력은 Walsh *et al.*¹⁷⁾의 방법을 참조하여 rabbit reticulocyte lysate을 사용하는 *in vitro* translation system (Promega)을 본 실험조건에 맞도록 변형하여 측정하였다. 먼저 Eppendorf tube(1.5 ml)에 ribonuclease free H₂O 3.5 μ l, RNasin ribonuclease inhibitor(40 u/ μ l) 0.5 μ l, 1 mM amino acid mixture (minus leucine) 0.5 μ l, [¹⁴C] leucine(50 μ Ci/ml) 2.5 μ l, Brome mosaic virus mRNA(0.5 μ g/ μ l) 1.0 μ l을 넣어서 혼합한 후, 여기에 단백질 분획 3 μ l와 rabbit reticulocyte lysate 17.5 μ l를 넣고 30°C에서 60분간 반응을 진행시켰다. 이 때 control은 정제시료 대신 완충용액을 사용하였으며, 단백질 농도는 초기 분리단계에서는 용출액을, Superose 12 및 Mono-S column 용출액은 2ng/ μ l, 정제된 단백질을 이용한 온도별 안정성 시험에서는 0.34 ng/ μ l을 사용하였다. 반응은 1.5 M KOH 10 μ l를 넣어 중지시킨 후 glass filter에 반응액 8 μ l를 흡착시켰다. 합성된 단백질외에 포함된 radioactive amino acid 잔기는 세척하여 제거하였다. 세척은 냉각된 10% trichloro acetic acid (TCA)용액에 10분, 끓는 물에 중탕시킨 5% TCA 용액에 5분, 5% TCA 용액에서 세척 2회, ethanol 세척 2회 순으로 하였다. Glass filter는 세척후 건조시킨 다음 Liquid Scintillation Counter (Beckman LS5801)에서 cpm을 측정하여 단백질합성 저해율을 계산하였다.

분자량 측정

정제단백질의 분자량은 12.5% SDS-Polyacrylamide Gel 전기영동으로 측정하였다. 분자량 측정에 사용된 표준 단백질은 phosphorylase B (M.W. 97,400), bovine serum albumin (M.W. 66,200), ovalbumin (M.W. 45,000), carbonic anhydrase (M.W. 31,000), trypsin inhibitor (M.W. 21,500), lysozyme (M.W. 14,400)들이었다.

단백질의 정량

단백질 정량은 BCA법¹⁸⁾에 따랐고 bovine serum albumin을 표준단백질로 하였다.

N-말단 아미노산 서열분석

정제된 단백질 약 4 μ g을 SDS-PAGE에서 전기이동시킨 후, PVDF membrane에 상온, 50 V, 170 mA 상태에서 30분간 electroblotting 하였다. Blotting buffer로는 10 mM 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid(CAPS) in 10% MeOH를 사용하였다. Blotting한 단백질 band는 Coomassie Blue 염색으로 확인하고 절단하였다. N-말단 아

미노산 서열 결정은 phenylthiohydantoin 유도체에 대하여 Applied Biosystems사의 protein sequencer 476A로 liquid phase 조건으로 분석하였다.

결과 및 고찰

단백질의 분리 정제

단백질 조추출액을 ammonium sulfate로 침전시켜 분리한 후 완충액에서 투석시킨 용액을 DE-52 Cellulose anion exchange 칼럼을 거쳐서 S-Sepharose cation exchange 칼럼 크로마토그래피로 분리한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 단백질합성 저해력이 높은 2개의 활성분획 S1, S2를 분리할 수 있었다. 이 2개의 활성분획을 각각 FPLC system에서 Superose 12 HR 10/30 칼럼으로 분리한 후 Fig. 2에서와 같이 FPLC Mono-S 칼럼으로 활성이 높은 분획을 순수하게 분리할 수 있었다. 그리고 Fig. 3에서 보는 바와 같이 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 활성분획이 단일

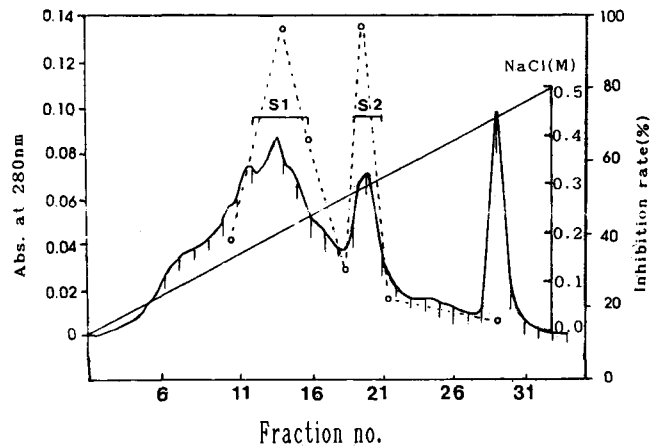


Fig. 1. S-Sepharose column chromatogram of the active fraction separated from DE-52 Cellulose chromatography: (----), absorbance at 280 nm; (o---o), inhibition rate of protein synthesis. Active fraction S1 and S2 were pooled by the bar.

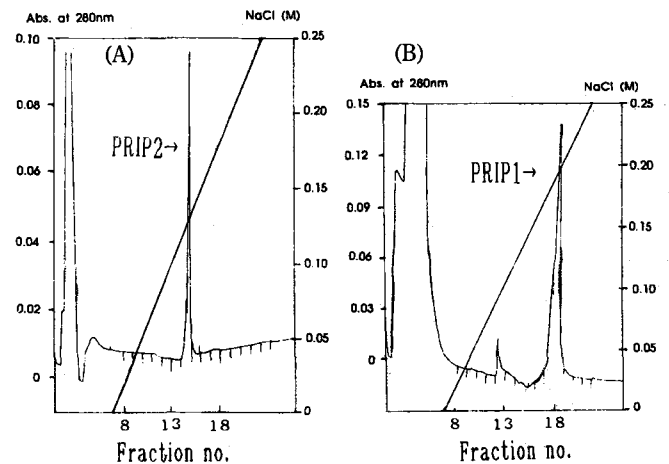


Fig. 2. Elution profile of active fraction S1 and S2 by FPLC Mono-S column. (A), S1 fraction from S-Sepharose column; (B), S2 fraction from S-Sepharose column.

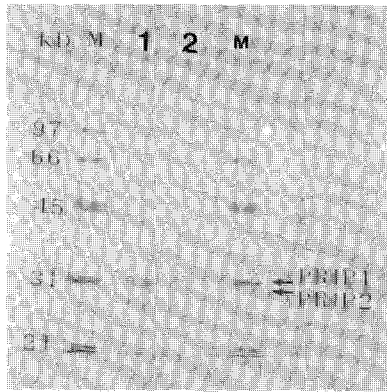


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the purified PRIP 1 and PRIP 2. A gel of 12.5% acrylamide was used. Lane M, mixture of low molecular weight markers; Lane 1, PRIP 2 (M_r 30,500); Lane 2, PRIP 1 (M_r 31,000).

단백질임을 확인하였으며 표준단백질과 비교하여 분자량을 측정하였다. 이후 분자량이 약 31,000인 단백질을 PRIP 1, 분자량이 약 30,500인 단백질을 PRIP 2로 기재한다.

대부분의 리보솜활성화 단백질(RIP)은 ribosomal RNA의 특정부위에 있는 adenine을 depurination 시켜서 단백질합성을 저해하는 기능이 있기 때문에^{2,14,19-21} 각 분리 단계에서 단백질 분획에 대한 기내 단백질합성 저해력을 측정하여 단백질을 분리하였다. 이러한 리보솜활성화 단백질은 단백질의 구조적 특성에 따라서 한가닥의 아미노산 체인구조로 된 type I과 두가닥의 아미노산 체인구조로 된 type II로 분류된다.² Type II의 RIP 단백질은 주로 독성단백질로서 대표적인 것으로는 피마자 종자에서 분리된 Ricin을 들 수 있다.^{22,23} Type I RIP은 세포독성은 약하나 단백질합성 저해력이 높아서 내병성 작물 개발^{7,12,24}, 치료용 면역독소 개발²⁴ 등에 활용되고 있다. 이러한 RIP 단백질을 식물에서 탐색 및 분리한 연구결과들을 보면, Sairam & Marci²⁵은 *Gelonium multiflorum*에서 분자량이 29,200-31,500인 3종의 type I RIP을, Irvin *et al.*²⁶, Irvin²⁷은 *Phytolacca americana*에서 분자량이 27,000-32,000인 type I RIP들을 분리하였다. 이외에도 대부분의 RIP 분자량은 25,000-32,000 정도이며 cation exchanger에 흡착되는 염기성 단백질이다.^{214,28,29} 따라서 PRIP 1과 PRIP 2의 분자량도 이들과 큰 차이가 없었으며 type I RIP에 속함을 알 수 있었다.

기내 단백질합성 저해력

Rabbit reticulocyte lysate와 Brome mosaic virus mRNA를 사용하는 기내 단백질합성 시스템에서 PRIP 1과 PRIP 2 농도별로 단백질합성 저해력을 측정해 본 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 단백질합성 50% 저해농도(IC_{50})는 각 0.82 nM과 0.79 nM이었다. 이는 Gelonin의 0.4 nM²⁰, Pokeweed antiviral protein(PAP)의 0.24 nM³⁰, Bryodin의 0.12 nM³¹ 보다는 다소 높은 수준이었다.

온도 안정성

PRIP 1과 PRIP 2의 온도별 안정성을 알아보기 위하여

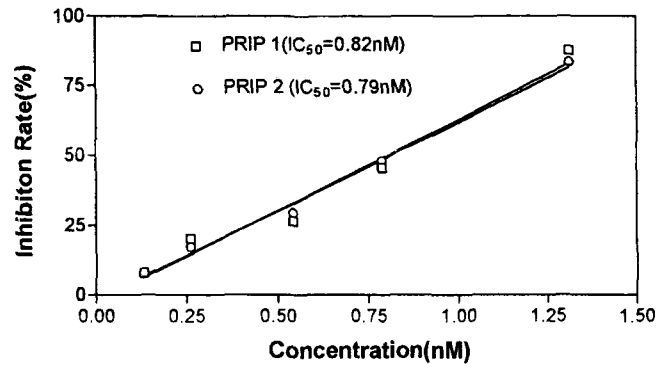


Fig. 4. Inhibition of protein synthesis by PRIP 1 and PRIP 2 in *in vitro* translation system with rabbit reticulocyte lysates. IC_{50} was calculated from two replications.

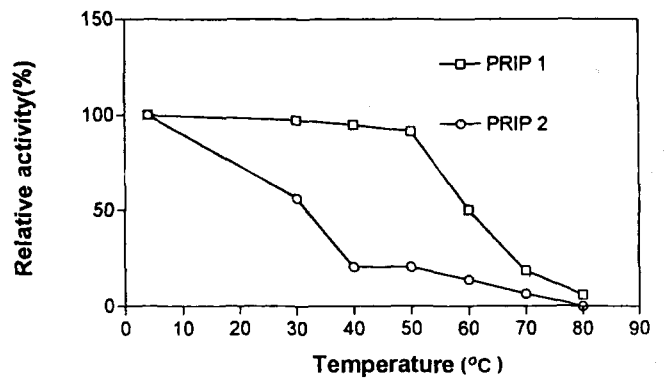


Fig. 5. Effect of temperature on the stability of PRIP 1 and PRIP 2. PRIP 1 and PRIP 2 (0.34 ng/ μ l, 20 μ l) were incubated at different temperatures (4, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C) for 30 min. and the inhibition of protein synthesis was examined.

Fig. 5에서와 같이 온도별로 30분간 항온처리한 후 기내 단백질합성 저해력을 측정해 본 결과 PRIP 1은 50°C 수준까지는 활성의 변화가 거의 없었으나 60°C 이후 부터는 활성이 급격히 떨어지는 것으로 보아서 비교적 열에 안정하였다. 이는 대부분의 단백질들이 열에 불안정한 것에 비하여 RIP 단백질들이 열에 비교적 안정하다는 보고^{14,31}와 일치하였으나, PRIP 2는 30°C에서는 50% 정도 활성을 유지하였으나 40°C 이후 활성이 급격히 떨어져서 열에 비교적 불안정 하였다.

N-말단 아미노산 서열

PRIP 1과 PRIP 2의 N-말단 아미노산 서열을 분석하여 Data-base 검색(Swiss-PROT Release 33.0)을 통하여 보고된 RIP들의 아미노산 서열과 유사성을 비교한 결과는 Table 1과 같다. PRIP 1은 Kamenosono³²가 *Luffa cylindrica* (sponge gourd) 종자에서 분리한 type I RIP인 Luffin B 및 Casellas *et al.*³³이 *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz 종자에서 분리한 type I RIP인 Trichokirin과 유사성이 매우 높았다. PRIP 2는 *Momodica charantia* 종자에서 Barbieri *et al.*³⁴이 분리한 Momordin II과 Lee-Huang *et al.*³⁵이 분리한 HIV-1 감염 및 증식을 저해하는 단백질인 MAP 30과 유사성이 매우 높았다.

Table 1. Comparison of N-terminal amino acid sequences of the PRIP 1 and PRIP 2 with known RIPs

Name		Amino acid sequence	
PRIP 1	1	DNLSFSLSG	9
Luffin-B	2	NVSFSLSG	9
Trichokirin	1	DVSFSLSG	8
PRIP 2	1	DIALDLSTATKATY	14
Momordin II	24	DVNFDLSTATAKTY	37
MAP 30	1	DVNFDLSTATAKT	13

The protein amino acid sequences were aligned to maximize similarities between proteins. The numbers indicate the number of amino acid residues from N-terminal.

이상의 결과로서 호박잎에서 분리된 PRIP 1과 PRIP 2는 단백질의 아미노말단 구조와 온도별 안정성은 상이하나 ribosome-inactivating 활성은 비슷하였으며, 기존의 박과 식물에서 분리된 RIP과 유사성이 매우 높음을 알 수 있었다. 금후 단백질의 아미노산서열 정보를 이용하여 유전자를 분리함으로써 내병성작물 개발용 유전자로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

참고 문헌

- Bowles, D. J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 873-907.
- Stirpe, F., L. Barbieri, M. G. Battelli, M. Soria and D. A. Lappi (1992) Ribosome-inactivating protein from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* **10**, 405-412.
- Endo, Y., K. Tsurugi and J. M. Lambert (1988) The site of action of six different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 1032-1036.
- Stirpe, F. and R. C. Hughes (1989) Specificity of ribosome inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity. *Biochem. J.* **262**, 1001-1002.
- Bolognesi, A., L. Barbieri, A. Abbondanza, A. I. Falasca, D. Carnicelli, M. G. Battelli and F. Stirpe (1990). Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA-N-glycosidase activity. *Biochimica et biophysica Acta* **1087**: 293-302.
- Leach, R., H. Tommerup, I. Svendsen and J. Mundy (1991) Biochemical molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* **266**, 1564-1573.
- Logemann, J., G. Jach, H. Tommerup, J. Mundy and J. Schell (1992) Expression of a barley ribosome-inactivating proteins leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* **10**, 305-308.
- Bass, H. W., C. Webster, G. K. O'Brien, J. K. Roberts and R. S. Boston (1992) A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator opaque-2. *The Plant Cell* **4**, 225-234.
- Irvin, J. D. (1975) Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 525-528.
- Habuka, N., K. Akiyama, H. Tsuge, M. Miyano, T. Matsumoto and M. Norma (1990) Expression and secretion of Mirabilis antiviral protein in *Escherichia coli* and its inhibition of *in vitro* eukaryotic and prokaryotic protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 10988-10992.
- Chen, J. C., R. F. White, J. F. Antoniw and Q. Lin (1991) Effect of pokeweed antiviral protein(PAP) on the infection of plant viruses. *Plant Pathology* **40**, 612-620.
- Lodge, J. K., W. K. Kaniewski and N. E. Tumer (1993) Broad-spectrum virus resistance on transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7089-7093.
- 조강진, 이승인, 김영태, 황영수 (1995) 참비름(*Amaranthus mangostanus*)에서 항바이러스성 단백질(AAP29)의 분리 및 특성. *한국농화학회지* **38**(6): 528-533.
- Stirpe, F., A. Gasperi-Campani, L. Barbieri, A. Falasca, A. Abbondanza and A. Stevens (1983) Ribosome-inactivating protein from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L.(asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem. J.* **216**, 617-625.
- Gasperi-Campani, A., L. Barbieri, M. G. Battelli and F. Stirpe (1985) On the distribution of ribosome-inactivating proteins among plants. *J. Natural Products* **48**(3), 446-454.
- Barbieri, L., M. G. Battelli and F. Stirpe (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 257-282.
- Walsh, T. A., A. E. Morgan and T. D. Hey (1991) Characterization and molecular cloning of apoenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. *J. Biol. Chem.* **266**: 23422-23427.
- Bollag, D. M. and S. J. Edelman (1991) Protein methods. pp. 60-62. Willy-Liss Inc. New York.
- Barbieri, L., A. Bolognesi, P. Cenini, A. I. Falasca, A. Minghetti, L. Garofano, A. Guicciardi, D. Lappi, S. P. Miller and F. Stirpe (1989) Ribosome-inactivating protein from plant cells in culture. *Biochem. J.* **257**, 801-807.
- Taylor, S., A. Massiah, G. Lomonosoff, L. M. Roberts, J. M. Lord and M. Hartley (1994) Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection. *Plant J.* **5**, 827-835.
- Stirpe, F., S. Olsnes and A. Pihl (1980) Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 6947-6953.
- Olsens, S. and A. Rihl (1973) Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochem.* **12**, 3121-3126.
- Fulton, R. J., D. C. Blakey, P. P. Knowles, J. W. Uhr, P.

- E. Thorpe and E. S. Vitetta (1986) Purification of ricin A1, A2 and B chains and characterization of their toxicity. *J. Biol. Chem.* **261**(12), 5314~5319.
24. Pastan, I., V. Chaudhry and D. J. Fitz-Gerald (1992) Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 331~354.
25. Sairam, M. R. and J. Mareil (1991) Chromatographic separation of the isoform of the ribosome inactivating protein, Gelonin. *Biochemistry, International*, **25**(5), 905~912.
26. Irvin, J. D., T. Kelly and J. D. Robertus (1980) Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivates eukaryotic ribosomes. *Arc. Biochem. Biophys.* **200**, 418~425.
27. Irvin, J. D. (1983) Pokeweed antiviral protein. *Pharmac. Ther.* **21**, 371~387.
28. Stirpe, F., D. G. Williams, L. J. Onyon, R. F. Legg and W. A. Stevens (1981) Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Biochem. J.* **195**, 399~405.
29. Roberts, W. K. and T. S. Stewart (1979) Purification and properties of a translation inhibitor from wheat germ. *Biochemistry* **18**, 2615~2621.
30. Wyatt, S. D. and R. J. Shepherd (1969) Isolation and characterization of a virus inhibitor from *Phytolacca americana*. *Phytopathology* **59**, 1787~1794.
31. Stirpe, F., L. Barbieri, M. G. Battelli, A. I. Falasca, A. Abbondanza, E. Lorenzoni and W. A. Stevens (1986) Bryodin, a ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L. (white bryony). *Biochem. J.* **240**, 659~665.
32. Kamenosono, M., H. Nishida and G. Funatsu (1988) Isolation and characterization of two luffins, protein-biosynthesis inhibitory proteins from the seeds of *Luffa cylindrica*. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1223~1227.
33. Casellas, P., D. Dussory, A. I. Falasca, L. Barbieri, J. C. Guillent, P. Ferrara, A. Bolognesi, P. Cenini and F. Stripe (1988) Trichokirin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *Eur. J. Biochem.* **176**, 581~588.
34. Barbieri, L., M. Eamboni, E. Lorenzoni, L. Montanaro, S. Sperti and F. Stirpe (1980) Inhibition of protein synthesis *in vitro* by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (bitter melon). *Biochem. J.* **186**, 443~452.
35. Lee-Huang, S., P. L. Huang, P. L. Nara, H. C. Chen, H. F. Kung, P. Huang and H. I. Huang (1990) MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *FEBS Lett.* **272**, 12~18.

Purification and Properties of Ribosome-inactivating Proteins from the Leaves

of *Cucurbita moschata* D_{UCHESNE}

Kang-Jin Cho*, Si-Myung Lee, Yeong-Tae Kim and Young-Soo Hwang (National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea)

Abstract : Two ribosome-inactivating proteins, PRIP 1 and PRIP 2 have been isolated from the leaves of *Cucurbita moschata* D_{UCHESNE}. Crude extracts were purified through ammonium sulfate precipitation and column chromatography using DE-52 cellulose, S-Sepharose, FPLC Suprose 12 HR and FPLC Mono-S. The molecular weights of PRIP 1 and PRIP 2 were 31,000 and 30,500, respectively. PRIP 2 was thermostable and maintained its activity even after the incubation of the protein at 50°C for 30 min. In a cell free *in vitro* translation system using rabbit reticulocyte lysate, protein synthesis was inhibited by the addition of PRIP 1 and PRIP 2. The IC₅₀ of PRIP 1 and PRIP 2 were 0.82 nM and 0.79 nM, respectively. The comparison of N-terminal amino acid sequences of the PRIP 1 and PRIP 2 with known RIPs revealed that PRIP 1 shows sequence similarity with Luffin B from *Luffa cylindrica* and Trichokirin from *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz and PRIP 2 has sequence similarity with Momordin II and MAP 30 from *Momordica charantia*.

Key words : *Cucurbita moschata* D_{UCHESNE}, ribosome-inactivating protein (RIP), amino acid sequence, protein translation, protein synthesis

*Corresponding author