

## 미국자리공 항바이러스 단백질 II 유전자의 돌연변이 및 PVY-VN 저항성 담배식물체 생산

강신웅\* · 이영기 · 박성원 · 한규웅<sup>1</sup> · 김선원 · 이종철 · 이청호  
한국인삼연초연구원 원료연구부, 한남대학교 생물학과<sup>1</sup>  
(2001년 11월 13일 접수)

### Deletion Mutation of Pokeweed Antiviral Protein II Gene and Development of PVY-VN Resistant Tobacco Plants

S. W. Kang\*, Y. G. Lee, S. W. Park, K. W. Hahn<sup>1</sup>, S. W. Kim, J. C. Lee, C. H. Lee  
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Hannam University<sup>1</sup>  
(Received November 13, 2001)

**ABSTRACT** : In order to transform pokeweed antiviral protein cDNA to tobacco plant, total RNA was extracted from *Phytolacca americana*. PAP-II cDNA was synthesized from purified total RNA via RT-PCR and subcloned to recombinant vector pBluescript II SK-. 10 deletion mutant PAP-II cDNA fragments which were sequentially deleted from N-terminal by 90bp were synthesized from PAP-II cDNA except leading frame by PCR with primers designed in our laboratory. To select non-cytotoxic clone, pAc55M was constructed with yeast expression vector pAc55 and multicloning site(MCS). Sequentially deleted mutant PAP-II cDNAs were cloned on downstream of *gal1* promoter of pAc55M. 6 non-cytotoxic deletion mutant PAP-II cDNA were selected. Selected cDNAs were cloned into plant expression vector pKGT101BH for transformation of these clones to plant through *Agrobacterium tumefaciens*. After cloning, recombinant pKGT101BH carrying deleted mutant PAP-II cDNA were transformed to *Nicotiana tabacum* cv. NC567. Transformed tobacco plants cultured on shooting and rooting media were transferred to green-house. About four weeks later, these plants were infected with physically infection using carborandum with PVY-VN strain. After 4 weeks, plants resistant to virus were selected, and seeds of these plants were gathered. Southern blot hybridization showed deleted fragments by 220bp and 420bp, so resistant ability of these plants is due to mutant PAP-II cDNA.

**Key words** : tobacco, RT-PCR, PAP-II, *Phytolacca americana*, PVY resistant

식물의 항바이러스 단백질에 관한 연구가 보다 많은 과학자들에 의하여 각광을 받고 있는 바(Audy *et al.*, 1994; Bass *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*,

1996; Park *et al.*, 1996), Poty 바이러스 그룹에 대한 저항성 기작은 전사된 RNA의 분해로 나타나는 RNA 매개 저항성으로 이해되고 있다.

\*연락처 : 305-345 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, 한국인삼연초연구원

\*Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinseong-Dong, Yusong-Gu, Daejeon 305-345, Korea

유전공학 기법에 의해 바이러스에 저항성을 갖는 형질전환 식물체가 개발된 이래 (Powell *et al.*, 1986), “pathogen-mediated protection” 방법은 여러 작물이 바이러스 병에 대한 저항성을 갖게 하는데 많이 사용되었다 (Tumer *et al.*, 1987 ; Loesch-Fries *et al.*, 1987; Van Dun *et al.*, 1987; Cuozzo *et al.*, 1988). 그러나 바이러스 유전자를 식물체내에 도입시켜 항바이러스능을 지니는 형질전환 식물체를 만들 경우, 도입시킨 바이러스 유전자에 의하여 새로운 돌연변이가 유발되고 이로 인한 새로운 형태의 바이러스가 생길 수 있다는 경고 (USDA-APHIS Workshop, 1995; Paoletti and Pimentel, 1996; Michael and Wilson, 1993)가 있고 난 후 본 연구에서 시행한 바와 같은 항바이러스 단백질에 관한 연구가 보다 많은 과학자들에 의하여 관심을 끌게 되었다 (Audy *et al.*, 1994; Bass *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996). Poty 바이러스 그룹에 대한 저항성 기작은 전사된 RNA의 분해로 나타나는 RNA 매개 저항성으로 이해되고 있다. 즉, 바이러스 저항성으로 나타나는 형질전환체는 매우 높은 외래유전자의 전사체를 만들지만, 이병성인 형질전환체에 비하여 상대적으로 매우 적은 양의 전사체가 세포내에 축적된다는 것이 알려졌다 (Smith *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1996).

자리공에서 발견된 단백질인 pokeweed antiviral protein (PAP)은 virus(TMV strain)와 함께 접촉하였을 때 바이러스에 대한 저항성을 나타내며 자리공으로부터 PAP를 분리한 후 PAP I 이 분리되었다 (Irvin, 1975). 이러한 PAP는 ribosome inactivating protein (RIP)의 일종으로 항바이러스능을 지니고 있음이 알려져 있으며, RIP는 이미 10개 이상의 식물 속(屬)에서 발견되었고, 식물의 씨, 잎, 뿌리, 줄기 등에서 발견되어진다. RIP는 세 개의 그룹으로 구분하는데, 첫째는 single chain RIP 로 분자량이 30 KDa 정도 되는 type 1으로서 여기에 속하는 것으로는 본 연구에 사용된 PAP 등이 있으며, 둘째로 dimeric RIP로 독성이 있는 subunit와 cell binding subunit를 가지고 있는 type 2 로서 ricin 이나 abrin 등이 이에 속한다. 또한 proteolysis에 의해 type 1의 형태로 변화되는 유형을 최근에

type 3로 추가하여 구분하기도 한다(Nielsen and Boston, 2001). 식물에서의 박 과, 자리공 과 및 석죽 목에 속하는 식물들은 조직 100 g 내에 수 mg에서 수백 mg 정도의 농도로 RIP가 존재하는 것으로 보고 된 바 있다 (Barbieri *et al.*, 1993). RIP의 기능으로 현재까지 알려진 바에 의하면 항바이러스 효과, 항 동물효과, 항 진균 및 항 박테리아효과와 저장단백질(PAP-S)로 이해되고 있다.

자리공과에 속하는 미국자리공에서 발견된 PAP는 분자량이 약 30 KDa 정도 되는 single chain으로 이루어진 basic protein으로 type 1 RIP에 속하며, 봄철에 미국자리공의 잎에서 주로 발견되는 기본적인 형태의 단백질로서 잎의 mesophyll cell의 세포벽 matrix에 존재한다 (Irvine *et al.*, 1980). 또한 PAP-S(seed form)는 씨에서 발견되는 단백질이며, PAP-II (late summer form)는 여름철에 주로 많이 생산되는 단백질로 알려져 있다.

식물에서 발견되는 RIP는 리보솜의 rRNA에 존재하는 특정한 N-glycosidic 결합을 끊어 단백질 합성에 중요한 역할을 하는 elongation factor 2가 붙지 못하게 하여 단백질 합성과정을 저해하는 기능을 지니고 있는 단백질이며 강한 세포 독성을 지니고 있고 광범위한 항바이러스능을 지니고 있어, 면역독소 단백질 및 HIV(Human Immunodeficiency virus), 백혈병 치료제로서 최근 각광을 받기 시작하고 있다. 이러한 일반적인 RIP의 N-glycosidase의 활성에 의하여 단일 adenine base가 절단되고 ribosomal RNA중 소수의 subunit 중에서 inactivation 기작이 일어나게 된다(Fig. 3. Katalin *et al.*, 2001, Girbes *et al.*, 1996). 특정 부위 중  $\alpha$ -sarcin site에 대한 공격은  $\alpha$ -sarcin domain에 직접적으로 일어나며 28S rRNA G4325 와 A4326 site에서 절단 효과가 일어나고, 이로 인해 리보솜 기능을 상실하게 된다 (Fiorenzo, *et al.*, 1992).

또한, PAP는 식물체가 성숙하였을 때 매우 독성이 강하여 동, 식물의 DNA 전사 과정에서 리보솜을 inactivation 시켜 세포증식이 되지 못하게 하는 독성 물질이다. PAP의 종류별로 많이 만들어지는 부위로는 첫째, PAP-I은 자리공의 식물체 전체에서, PAP-II는 뿌리 부분에서, PAP-S는 종자에서 각각 가장 많이 생산되고 있음이 확인되었다.

자리공과에 속하는 미국자리공에서 발견된 PAP는 분자량이 약 30 KDa 정도 되는 single chain으로 이루어진 basic protein으로 type 1 RIP에 속하며, 봄철에 미국자리공의 잎에서 주로 발견되는 기본적인 형태의 단백질로서 잎의 mesophyll cell의 세포벽 matrix에 존재한다 (Irvine *et al.*, 1980). 또한 PAP-S (seed form)는 씨에서 발견되는 단백질이며, PAP-II (late summer form)는 여름철에 주로 많이 생산되는 단백질로 알려져 있다. 그러나 시기별로 약간의 차이는 있으나, PAP-I 과 마찬가지로 주로 잎 부위에서 발견되는 단백질로 밝혀졌다 (Irvine *et al.*, 1980).

본 연구에서는 PAP-II가 지니고 있는 항 바이러스능을 이용하기 위해 결손돌연변이를 제작하여 세포독성이 없는 유전자를 연초 내로 도입하여, PVY-VN에 대한 항 바이러스능의 발현을 나타내는 식물체를 생산하고자 하였다. 이를 위해 먼저 RT-PCR 방법으로 미국자리공 잎에서 PAP-II cDNA를 클로닝하고, 염기서열을 분석한 뒤, PAP-II cDNA 가닥을 식물발현벡터에 삽입시켜 미국자리공의 항 바이러스 단백질 유전자의 세포독성이 없는 유전자를 효모 발현벡터 시스템을 이용하여 확인한 후 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균을 이용하여 연초 식물체에 형질전환 시키고 바이러스 저항성이 발현되는지 여부를 알아보았다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용된 자리공식물체는 미국에서 자생하는 식물로서, 우리나라에 들어온 귀화식물인 미국자리공 (*Phytolacca americana*) 은 잎이 넓고 길며 종자는 약 60° 전후로 아래를 향하고 있다. 봄철부터 싹이 트기 시작하여 여름에 왕성하게 성장하였다가 가을이 되면 종자를 맺는 다년생 초본식물이다. 균주는 INV α F', *psy1*, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404등을 사용하였으며 plasmid는 pBluescript II SK-, pAc55, pAc55M, pKGT101BH, pBI121을 사용하였다. 식물바이러스는 PVY-VN을 비롯하여 TMV-common, pepper, tomato, PVX, CMV-K등을 본 연구원 온실에서 식물을 길러 직접 순화정제하여 사용하였다. 순화한 바이러스를

실험용 토끼(New Zealand White, male)에 주사하여 항체생산을 하여 이를 Immunoblot analysis에 사용하였다.

SDS-PAGE analysis 및 Western blot analysis를 통하여 단백질의 위치를 확인하였고 미국자리공의 total RNA를 분리하였으며 RT-PCR에 의해 PAP-II cDNA를 합성하였다. 합성된 PAP-II cDNA의 subcloning 및 염기서열을 분석하였고 이후 PCR에 의한 결손 돌연변이를 제작하여 PCR 산물의 정제를 하였으며 PAP-II cDNA의 식물발현 벡터내로의 재조합 및 확인, 돌연변이 PAP-II 클론의 세포독성 검정등을 통하여 세포독성이 제거된 클론에 대하여 *agrobacterium* 형질전환을 하여 식물체를 형질전환 하였다. 형질전환된 식물체에 virus를 인공접종하여 항 바이러스능 검정을 하고 여기에서 저항성으로 나오는 개체에 대하여 genomic Southern blot analysis를 통하여 삽입 여부를 확인하였다.

### 결 과

#### SDS-PAGE, Western blot hybridization analysis

12% SDS-PAGE를 시행하여 미국자리공의 PAP에 대한 생산부위별 전기영동을 실행하여 본 결과 PAP-I, II, S 모두 약 29 KDa 의 크기를 보여주고

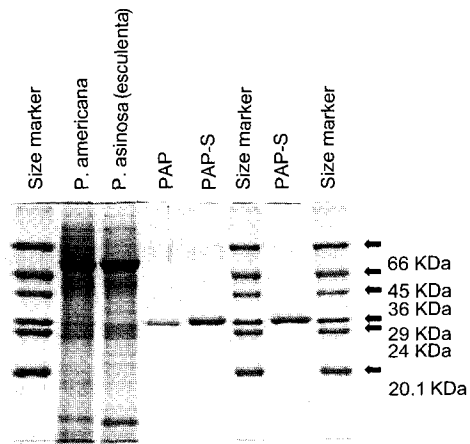


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblot analysis of pokeweed antiviral protein from *P. americana* & *P. esculenta*.

있으며 (Fig. 1) coomassie brilliant blue 250 R로 염색한 후에 확인하여 이와 똑같은 gel을 Western blot hybridization에 사용하였다.

미국자리공 전체에서 생산되는 total protein을 대상으로 Western blot hybridization을 시행하여 항혈청이 immuno blot analysis에 성공적으로 사용될 수 있음을 확인하였으며 미국자리공과 한국 자생자리공의 PAP의 생산을 알아보았다.

(Fig. 2)

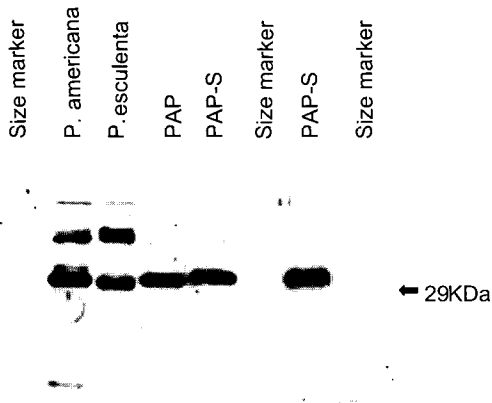


Fig. 2. Immunoblot analysis of protein from *P. americana* and *P. esculenta*.

PAP, Pokeweed antiviral protein I.

PAP-S, Pokeweed antiviral protein S.

#### 미국자리공의 total RNA의 분리

미국자리공과 한국 자생 자리공의 total RNA를 acid guanidium thiocyanate - phenol - chloroform 추출법을 사용하여 분리하고 전기영동을 실행하였다(Fig. 3).

#### PAP-II cDNA 합성 및 염기서열 분석

PAP-II cDNA를 미국자리공(*Phytolacca americana*) 잎으로부터 RT-PCR 방법으로 클로닝하였다. RT-PCR에 의해 합성된 PAP-II cDNA 가닥을 pBluescript II SK- *Sma*I 위치에 subcloning하고, dideoxy sequencing 방법에 의하여 염기서열을 분석한 결과, 개시 및 종결 codon을 합하여 933bp인

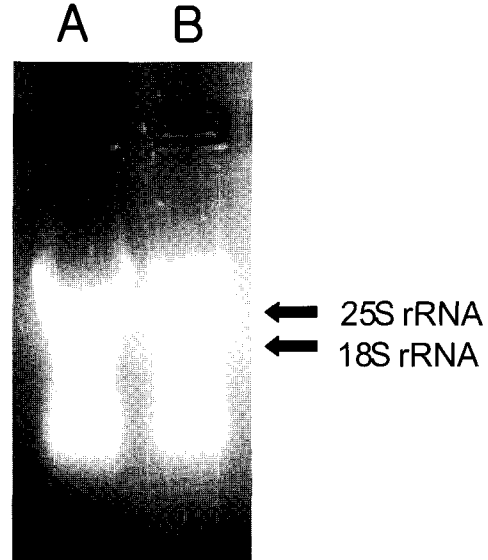


Fig. 3. 1% Electrophoresis of the total RNA purified from pokeweed species

A , *P. americana*; B , *P. esculenta*.

PAP-II open reading frame (ORF)을 포함하는 974bp의 PAP-II cDNA 가닥을 확인하였다(Fig. 4).

#### PAP-II의 아미노산 서열 분석

염기서열 결정에 의한 amino acid 분석을 gene bank를 통하여 분석하였다(Fig. 5).

#### PAP-II 결손돌연변이의 제조 및 subcloning

N-terminal 쪽으로부터 순차적으로 결손이 이루어진 PAP cDNA 가닥을 인위적으로 합성해내기 위한 5'쪽과 3'쪽에 대한 primer를 자체 design한 것을 사용하였으며, 이를 핵산합성기를 사용하여 합성 및 순수분리하였다. Immature PAP 상태의 C-terminal 쪽의 가닥을 지니고 있는 단백질과 mature PAP 상태의 C-terminal 쪽의 아미노산 서열을 지닐 수 있도록 제작된 cDNA 가닥들을 PCR 반응에 의하여 합성하였다. PCR에 의하여 합성된 가닥을 분리 정제하였으며, pBluescript II SK-로 subcloning 하였다(Fig. 6)

미국자리공 항바이러스 단백질 II 유전자의 돌연변이 및 PVY-VN 저항성 담배식물체 생산

GCTTCGGATC CGCAACAGGG AATG (PAP- II sense primer)  
 1 GCTTCGGATC CGCAACAGGG AATGAAGATG AAGGTGTTAG AAGTAGTTGG GTTGGCAATA 60  
 61 TCGATATGGC TGATGCTTAC ACCACCAGCT TCTTCAAACA TAGTGTTTGA CGTTGAGAAT 120  
 121 GCCACACCAG AACCTACTC TAATTTTCcG ACTAGTTTGC GAGAAGCTGT GAAAGACAAG 180  
 181 AAATTGGCAT GCCATGGAAT GATAATGGCC ACAACCCTCA CTGAACAACC CAAGTATGTG 240  
 241 TTGGTTGACC TCAAAcTCGG ATCTGGAACA TTCACATTAG CAATCAGAAG GGGAAACTTA 300  
 301 TATTTGGAGG GCTATTCTGA CATTACAAT GAAAAATGTC GTTATCGGAT CTTC AAGGAT 360  
 361 TCAGAATCCG ATGCCCAAGA GACCGTTTGC CCCGGGGACA AAAGCAAGCC TGGCACTCAG 420  
 421 AATAATATCC CCTATGAAAA GAGTTACAAA GGGATGGAAT CAAAGGGTGG GGCTAGAACT 480  
 481 AAATTAGGGT TAGGAAAGAT AACACTCAAG AGTCGAATGG GTAAAATCTA CGGCAAGGAT 540  
 541 GCAACGGATC GGAAGCAGTA TCAAAAAAAT GAGGCTGAAT TTCTTCTTAT AGCCGTTCAA 600  
 601 ATGGTFACTG AGGCATCAAG GTTCAAATAC ATTGAGAACA AAGTGAAGGC TAAATTTGAT 660  
 661 GATGCCAATG GGTtTCAGCC AGATCCTAAA GCTATTTCCC TAGAGAAAAA TTGGGACAGT 720  
 721 GTTTCTAAGG TCATTGCAAA AGTTGGCACC TCCGGTGATA GTACTGTAC TTTACCTGGA 780  
 781 GACCTAAAAG ATGAGAATAA TAAACCTTGG ACTACGGCCA CCATGAACGA CCTTAAGAAC 840  
 841 GACATTATGG CACTCCTAAC CCACGTTACT TGCAAGGTTA AAAGTCCAT GTTCCCTGAA 900  
 901 ATTATGTCCc ATTATTATAG GACTAGTATT AGTAACCTTG GTGAATTCGA GTGATTCAAA 960  
 961 TCATATCAAT GTTG 974 (3') CACTAAGTTT  
AGTCGACCTA GGAC (PAP- II antisense primer)

Fig. 4. Nucleotide sequence of the synthesized PAP-II cDNA fragment. Open reading frame of PAP-II cDNA containing start and stop codon has been sequenced 933bp (from 22 to 954). The start and stop codons indicated with shadow and PAP-II cDNA sense and antisense primer sequence are underlined.

1 Lys Met Lys Val Leu Glu Val Val Gly Leu Ala Ile Ser Ile Trp Leu Met Leu 18  
 19 Thr Pro Pro Ala Ser Ser Asn Ile Val Phe Asp Val Glu Asn Ala Thr Pro Glu 36  
 37 Thr Tyr Ser Asn Phe Pro Thr Ser Leu Arg Glu Ala Val Lys Asp Lys Lys Leu 54  
 55 Ala Cys His Gly Met Ile Met Ala Thr Thr Leu Thr Glu Gln Pro Lys Tyr Val 72  
 73 Leu Val Asp Leu Lys Leu Gly Ser Gly Thr Phe Thr Leu Ala Ile Arg Arg Gly 90  
 91 Asn Leu Tyr Leu Glu Gly Tyr Ser Asp Ile Tyr Asn Gly Lys Cys Arg Tyr Arg 108  
 109 Ile Phe Lys Asp Ser Glu Ser Asp Ala Gln Glu Thr Val Cys Pro Gly Asp Lys 126  
 127 Ser Lys Pro Gly Thr Gln Asn Asn Ile Pro Tyr Glu Lys Ser Tyr Lys Gly Met 144  
 145 Glu Ser Lys Gly Gly Ala Arg Thr Lys Leu Gly Leu Gly Lys Ile Thr Leu Lys 162  
 163 Ser Arg Met Gly Lys Ile Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asp Arg Lys Gln Tyr Gln 180  
 181 Lys Asn Glu Ala Glu Phe Leu Leu Ile Ala Val Gln Met Val Thr Glu Ala Ser 198  
 199 Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Asn Lys Val Lys Ala Lys Phe Asp Asp Ala Asn Gly 216  
 217 Phe Gln Pro Asp Pro Lys Ala Ile Ser Leu Glu Lys Asn Trp Asp Ser Val Ser 234  
 235 Lys Val Ile Ala Lys Val Gly Thr Ser Gly Asp Ser Thr Val Thr Leu Pro Gly 252  
 253 Asp Leu Lys Asp Glu Asn Asn Lys Pro Trp Thr Thr Ala Thr Met Asn Asp Leu 270  
 271 Lys Asn Asp Ile Met Ala Leu Leu Thr His Val Thr Cys Lys Val Lys Ser Ser 288  
 289 Met Phe Pro Glu Ile Met Ser His Tyr Tyr Arg Thr Ser Ile Ser Asn Leu Gly 306  
 307 Glu Phe Glu \*\*\* (309)

Fig. 5. Amino acid sequence of PAP-II. Immature pokeweed antiviral protein II is composed of 309 amino acid residues. Six amino acid residues which indicated with shadow and underlined are different from those sequence of X78628 (Genebank).

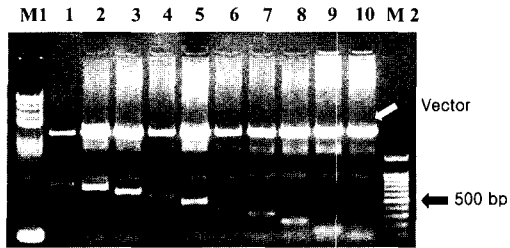


Fig. 6. Electrophoretic band patterns of serial deletion from N-terminal of subcloned mutant PAP-II cDNA strand digested by restriction enzymes.

M1, Size marker (Lambda *Hind*III + Lambda *Pst*I);  
M2, 100 bp ladder, (PCR products were subcloned into pBluescript II SK-).

#### 결손돌연변이 PAP-II 클론의 세포독성 여부 확인

효모를 이용한 세포독성 확인시스템에서 사용할 효모 발현벡터인 pAc55M을 재조합하였는 바, pAc55의 크기가 약 10 kb 정도 되므로 pBluescript II SK-와 재조합할 경우 크기가 커서 다루기 용이하지 않은 이유로 pAc55에 원래 지니고 있는 multicloning site를 pBSII SK-의 것으로 대체하여 재조합된 pAc55M을 재조합하게 되었다. 이에 대한 여러 가지 제한효소들을 사용하여 절단해 보았을 때 MCS가 기능을 하는 정상벡터가 합성되었음을 알 수 있었다(Fig. 7, 8).

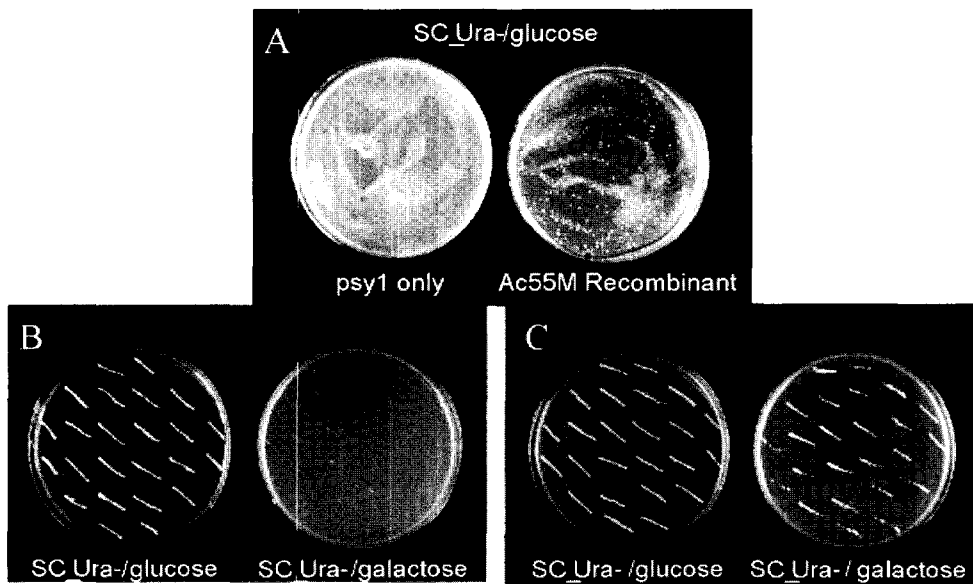


Fig. 7. Selection of recombinant pAc55M in selective synthetic media at 30°C.

- A, Only *psy1*(left), yeast cell was cultured in SC\_ura-/glucose media (right) transformed yeast expression vector (pAc55M);
- B, SC\_ura-/glucose media culture of *psy1*(left) and SC\_ura-/galactose media culture *psy1*(right);
- C, SC\_ura- /glucose media culture of pAc55M(left) and SC\_ura-/galactose media culture of non-cytotoxicity recombinat pAc55M(right).

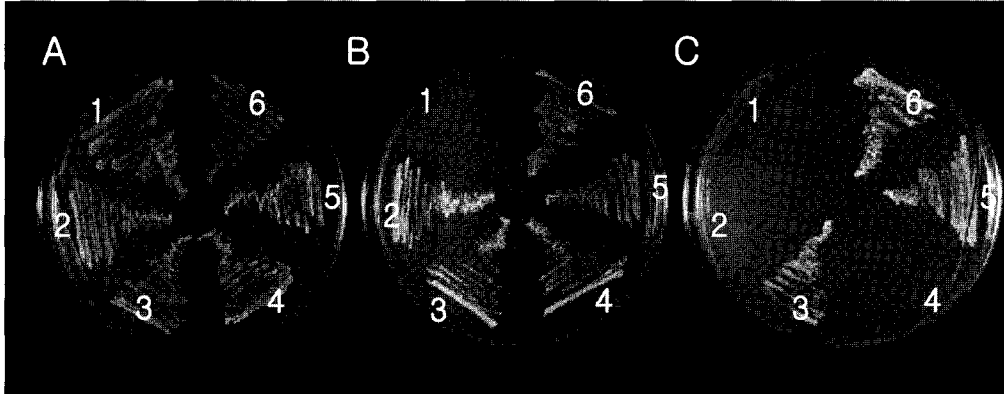


Fig. 8. Selection of non cytotoxicity clone by yeast expression system.

A, SC\_ura-/glucose medium; B, SC\_ura-/glucose medium;

C, SC\_ura-/galactose medium;

1, *psy1* only; 2, undeleted PAP-II; 3, p2716(180 bp deleted mutant);

4, 270 bp deleted mutant; 5, p2717(360 bp deleted mutant); 6, pAc55M/*psy1*.

#### Agrobacterium 형질전환

돌연변이 PAP-II cDNA insert를 포함하는 pKGT101BH 플라스미드 DNA를 *A. tumefaciens*에 형질전환하여 담배식물의 형질전환에 이용하였다. *A. tumefaciens*의 균주로는 LBA4404를 이용하였으며 담배품종 NC567에 접종하여 형질전환시켰다 (Fig. 9).

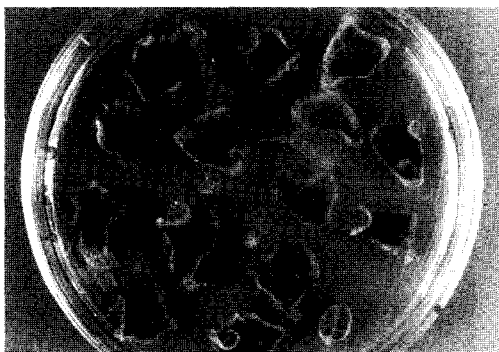


Fig. 9. Photograph was taken at 15 hrs after coculture of tobacco leaf disks with *Agrobacterium*.

#### 식물체 형질전환 및 항 바이러스능 검증

항생제가 포함된 shooting 배지에서 수십개의 개체를 얻을 수 있었으나 이 중에 rooting 배지로 옮겨 생장이 계속되어 온실로 나가게 된 개체는 p2716과 p2717 이었다. 이렇게 생장이 잘 되는 2개의 라인에 의해 유기된 개체에 virus를 인공접종시켜 식물이 바이러스에 저항성을 가지고 있는지 확인하였다.

PVY-VN에 감염시켜 보았을 때 p2716 2그룹과 p2717 1그룹이 바이러스에 저항성을 나타내는 것으로 확인되었고 바이러스에 저항성을 지니고 있음이 확인된 형질전환된 담배는 채종중에 있다(Fig. 10).

#### Genomic Southern blot hybridization

PVY 고도 저항성 형질전환 식물체에서 genomic DNA를 분리한 후 primer를 사용하여 Southern blot analysis를 실행한 결과 저항성 식물체에 형질전환한 mutant PAP-II 유전자가 존재함을 확인하였으며 이것은 deletion mutant가 삽입된 크기별로 다르게 나타났다.다(Fig. 11, Lane3 and Lane4).



Fig. 10. PVY-VN infection to transgenic plants mutant PAP-II.

- A, Virus susceptible plants.
- B1 and B2, p2716 plants.
- B3, p2717 plant.

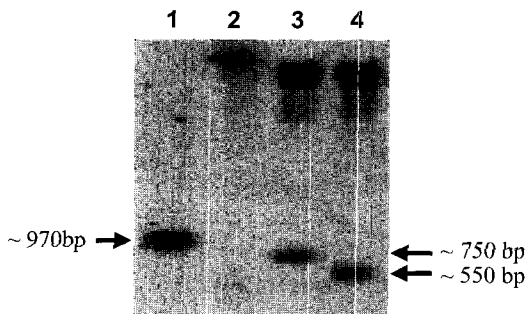


Fig. 11. Genomic Southern blot analysis of virus resistant transgenic tobacco plants.

- 1, PAP-II fragment(positive control).
- 2, Genomic DNA from untransformed tobacco(negative control);
- 3-4, Highly resistance transgenic tobacco plant lines (p2716, p2717).

### 결 론

RIP를 생산하는 10여종의 식물중에 광범위하게

RIP의 기능이 있으며 또한 항 바이러스능을 동시에 지니는 미국자리공의 항 바이러스 단백질 II는 생리학적 특성으로 볼 때 동물, 식물, 산업용, 인체 등에서 일어나는 질병들도 치료가 가능한 것으로 보고된 바 있다(Baulcombe, D. C. (1996).

미국자리공(*Phytolacca americana*) 잎으로부터 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법을 사용하여 total RNA를 분리하여 본 결과 PAP-I 과 비교하여 PAP-II가 양적으로도 많은 차이가 나지 않음을 알 수 있었다.

PAP-II cDNA를 얻기 위하여 primer와 total RNA로부터 cDNA synthesis kit를 이용하여 합성한 1st strand cDNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. 합성된 PAP-II cDNA 가닥의 염기서열을 분석한 결과 PAP-II cDNA를 클로닝하기 위해 사용한 primer 부위를 포함하여 974bp가 확인되었다.

PAP-II cDNA가 성공적으로 클로닝 된 후에 mature PAP의 세포독성에 의해 식물체가 괴사하는 것을 방지하기 위하여 세포독성은 없애고 항 바이러스능은 유지하는 클론을 얻기 위하여 N-terminal로부터 90 bp씩 순차적으로 deletion 된 돌연변이 cDNA를 얻었다.

세포독성이 없어진 클론을 식물발현 벡터인 pKGT101BH 벡터에 삽입하여 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 식물로 형질전환을 시도 하였다. 형질전환을 하여 실험실내에서 shoot와 뿌리의 생장이 양호한 식물체를 선발하여 온실과 자연상태에서 생육하며 발육상태를 관찰하여 본 결과 재배상에 문제가 없음을 확인하였다.

재배에 어려움이 없는 식물체에 본 연구에서 원하는 PVY-VN에 대하여 저항성을 갖고 있는지 확인 하기 위해 mechanical infection을 시켜 보았을 때 2개의 식물에서 고도의 저항성을 지니는 연초식물이 탄생하게 되었다. 이렇게 항 바이러스능을 갖고 있는 식물체로부터 종자를 채종하여 보관하면서 재파종하여 후대 검정을 실시하고 있다.

이때 저항성이 돌연변이 PAP-II cDNA의 도입에 의한 효과인지를 확인해 보고자 genomic Southern blot analysis를 실시 하였던 바, 본 연구에서 무독성으로 결정지어졌던 PAP-II cDNA가 검출되었다.



## 참 고 문 헌

1. Audy, P., P. Palukaitis, S. A. Slack, and M. Zaitlin(1994) Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic plants. *Mol. Plant Microbe iInteract.* 7 : 15-22.
2. Baulcombe, D. C.(1996) Mechanisms of pathogenderived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8 : 1833-1844.
3. Beachy, R. N.(1993) Virus resistance through expression of coat protein genes. In *Biotechnology inPlant Disease control*, ed by I. Chaet, p. 89-104. A John Wiley & Sons Inc. Publication, New York.
4. Beachy, R. N., S. Loesch-Fries, and N. E. Tumer(1990) Coat protein-mediated resistance against virus infextion. *Annu. Rev. Phyto-phathol.* 28 : 451-474.
5. Brent, R., F. M. Ausubel, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A., Smith, and K. Struhl(1987) *Current protocols in Molecular Biology.* 2.9.1-2.9.17. Wiley Interscience.
6. Chomczynski, P., and N. Sacchi(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biocahem.* 162 : 156-159.
7. Clark, M. F. and A. N. Adams(1977) Cahracteristics of the microplate method of enzyme-linked immunsorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475-483.
8. Coleman, W. H., and W. K. Roberts(1981), Factor requirements for tritin inactivation of animal cell ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 654, 56-66.
9. Cuozzo, M., K. M. O'Connell, W. Kaniewski, R. X. Fang, N. H. Chua, and N. Tumer (1988) Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 162 : 156 -159.
10. Goodwin, J., K. Chapman, S. L. Swaney, T. D. Parks, E. A. Wernsman, and W. G. Dougherty(1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA- mediated virus resistance. *Plant Cell* 8 : 95-105.
11. Hattori, M. and Y. Sakaki,(1986) Dideoxy DNA sequencing method using denatured palsmid templates. *Anal. Biochem.* 152: 232-238.
12. Hiebert, E. and Dougherty, W. G.(1988) In the plant viruses (Milne, R. G., ed) Vol. 4, Plenum Press, New York, pp. 159-178.
13. Irvin, J. D.(1975) Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 169 : 533-528.
14. Katalin A. Hudak, Amy B. Hammell, Jason Yasenachak, Nigun E. Tumer, Jonathan D. Dinman(2001) A C-terminal deletion mutant of pokeseed antiviral protein inhibits programmed +1 ribosomal frameshifting and Ty 1 retrotransposition without depurinating the sarcin/ricin loop of rRNA. *Virology* Vol. 279: 292-301.
15. Loesch-Fries, L. S., Merlo, D., T. Zinnen, L. Burhop, K. Hill, K. Krahm, N. Jarvis, S. Nelson, and E. Halk(1987) Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.* 6 : 1845-1851.
16. Murashige, T. and F. Skoog(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15 : 473-497
17. Nielsen, K. and R. S. Boston(2001). Ribosome-Inactivating Proteins : A Plant Perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. 52:785-816.
18. Park, E. K., J. J. Kim, K. S. and K. S. Boo,

- (1984) Two new PVY strains isolated from tobacco plant in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 23(4) : 209-214.
19. Park, E. K., Y. H. Kim, S. Y. Chae, S. W. Kang, S. S. Kim, and W. H. Yeo (1995) Mangement of viral diseases and biological control of pathogen adn insect pests. Tobacco Research Report (Tobacco Breeding and Environment), pp 69-161. Korea Ginseng and Tobacco Research Institute.
20. Park. E. K., S. S. Kim, Y. H. Kim, S. Y. Chae, and S. W. Kang(1996) Studies on biological and ecological control of tobacco viruses and quality-degrading agents. Tobacco Research Report (Tobacco Breeding and Environment), pp 173-244. Kora Ginseng and Tobacco Research Institute.
21. Powell, A. P., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy(1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein. *Science* 232 : 738-743.
22. Powell, P. A., D. M. Stark, P. R. Sanders, and R. N. Beach(1989) Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus.
23. Sambrook, F., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
24. Tumer, N. E., K. M. O'Connell, R. S. Nelson, P. R. Senders, R. N. Beachy, R. T. Fraley, and D. M. Shan(1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* 6 : 1181-1188.
25. 박은경, 김남원, 박성원, 이청호, 이영기, 이기원 (1993) 바이러스 방제 및 향균 살충생물제어기술 개발. 한국담배인삼연초연구원 담배연구보고서 (연초경작 육종 및 환경편). 59-144.
26. 이영기, 이청호, 강신웅, 박은경(1996) 고추에서 분리된 담배 모자이크 바이러스 외피단백질 유전자의 cDNA 클로닝 및 염기서열 분석. 한국 식물병리학회지. 12(2) : 182-186.