

## 호모 발현 시스템을 이용한 PAP(Pokeweed Antiviral Protein) 유전자의 세포독성 연구

김선원<sup>\*</sup> · 박성원 · 강신웅 · 이영기 · 이종철 · 최순용<sup>1</sup> · 이청호

한국인삼연초연구원, <sup>1</sup>한남대학교 미생물학과

(2001년 11월 13일 접수)

### Cytotoxicity Test of Pokeweed Antiviral Protein Type I Gene by Using Yeast Expression System

S. W. Kim<sup>\*</sup>, S. W. Park, S. W. Kang, Y. G. Lee, J. C. Lee, S. Y. Choi<sup>1</sup>, C. H. Lee

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon 305-345, Korea*

<sup>1</sup>*Department of microbiology, Hannam University, Daejeon 300-791, Korea*

(Received November 13, 2001)

**ABSTRACT** : PAP-I cDNA was synthesized from total RNA of *Phytolacca americana* leaves by RT-PCR, and then subcloned to recombinant vector pBluescript II SK-. Using PCR with primers designed in our laboratory, we could get the 9 deletion mutant PAP-I cDNA fragments. The first of the fragments was deleted by 66bp from immature N-terminal and then the rest were deleted by 90bp sequentially. Sequentially deletion mutant PAP-I cDNAs were inserted to pAc55M, on down-stream of *gal1* promoter. Recombinant pAc55M was transformed to yeast cells, *psyl* and the cells were spreaded on SC\_ura-/glucose plate media. Colonies on SC\_ura-/glucose plate were streaked on the same position of SC\_ura-/glucose and SC\_ura-/galactose plate, and we selected colonies growing on both plates, which carry non-cytotoxic deleted mutant PAP-I cDNA. We selected 4 deletion mutant PAP-I cDNAs which have not cytotoxicity.

**Key words** : pokeweed antiviral protein, deletion mutation, RT-PCR, cytotoxicity

연초의 병에 의한 피해는 대부분이 바이러스에 의한 피해가 크고 또한 그 피해가 늘어나고 있다. 바이러스에 의한 질병을 해결하기 위한 연구가 분자생물학의 발전으로 많은 진척을 나타내고 있는 가운데, 항바이러스 단백질에 관한 연구가 많은 과학자들에 의해 관심을 끌고 있다. Ribosomal

Inactivating Protein(RIP)은 이미 10개 이상의 식물 속에서 발견되었고, 이중 대표적인 것이 미국자리공(*Phytolacca americana*)에서 발견되는 pokeweed antiviral protein(PAP)이다. PAP는 preproform으로 만들어지고, 이 단백질을 cell wall matrix까지 옮겨주는 secretory signal peptide에 대한 서열을 가

\*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*

지고 있어, PAP를 세포 자신의 단백질 합성 기작에 피해를 주지 않는 곳으로 옮긴 후 제거된다 (Michael *et al.*, 1986).

PAP는 mature 상태일 때 매우 독성이 강하며, RIP로서의 작용기작은 site-specific RNA N-glycosidase로서 진핵세포의 경우는 28S rRNA, 원핵세포는 23S rRNA내에 존재하는 conserved loop내의 한개의 adenine을 depurination시킴으로써 translocation step을 방해하므로써 단백질 합성을 저해하여 더 이상 세포증식이 되지 못하게 한다 (Montanaro *et al.*, 1975; Eiklid *et al.*, 1980; Bonness *et al.*, 1984; T. Girbes *et al.*, 1996).

미국자리공에서 발견되는 PAP는 분자량이 약 30,000 dalton(Barbieri *et al.*, 1993; Irvin, 1975)정도 되는 single chain으로 이루어진 basic protein으로 type I RIP에 속하고 PAP-I은 식물 전체에서 모두 발현이 되나 봄철에 미국자리공 잎에서 주로 발견된다(Irvine *et al.*, 1980; Michael, 1993).

PAP-I, PAP-II, PAP-S, PAP-C, 그리고 PAP-R 등의 모든 pokeweed antiviral protein은 binding domain이 없는 type I RIP이므로 active chain에 disulphide bond로 galactose-specific lectin domain이 있는 형태의 type II RIP(Olsnes S and Pihl A, 1973)에 비해서 세포에 쉽게 binding하지 않아 상대적으로 낮은 세포독성을 갖지만, single gene의 형질전환에 의해서 여러 가지 class에 속하는 바이러스에 대해 저항성을 식물에 도입할 수 있다는 여러 연구 발표(Lodge *et al.*, 1993; Hur *et al.*, 1995)들은 광범위한 항바이러스능을 갖는 연초품종의 육성 가능성을 크게 해 주고 있다. 또한 PAP의 항바이러스능을 갖는 active site는 보존하고 세포독성에 관련한 유전자를 결손시켜 연초에는 피해를 주지 않으며 항바이러스능을 나타내는 연구가 발표되고 있으며(Nilgun *et al.*, 1997), 본 연구에서는 PAP-I cDNA의 immature N-terminal로부터 순차적으로 결손시켜 연초에 도입시키기에 앞서 효모발현벡터시스템을 이용하여 연초의 translocation step을 방해하는 세포독성이 제거된 PAP-I cDNA를 얻어내어 차후 연초에 형질전환시켰을 때 다양한 바이러스에 저항성을 갖도록 하려한다.

## 재료 및 방법

### 미국자리공 잎으로부터 total RNA 분리

미국자리공이 왕성하게 자라는 6월에서 7월경에 수확한 자리공의 잎을 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform추출법을 사용하여 분리하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987).

액체질소하에서 분말로 만들어 약 2g 자리공 잎에 동일 부피의 acid phenol 2ml의 24:1 chloroform/isoamyl alcohol을 첨가한 후 흔들어 섞어주고 이를 얼음에서 15분 동안 정치하였다. 이 시료를 4℃, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 동일 부피의 isopropyl alcohol을 첨가한 다음 -20℃에서 2시간 동안 방치하였다. 이를 4℃, 15,000rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 취한 다음 80% ethyl alcohol로 다시 부유시킨 후 이를 원심분리하여 상층액을 제거하고 speed vacuum에서 말린 다음 미국자리공 total RNA를 50μl의 RNase inhibitor(0.1% diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수에 녹여서 다음 실험에 사용하였다.

### PAP-I cDNA의 합성 및 염기서열과 amino acid 분석

Immature PAP-I cDNA를 클로닝하기 위해 design한 antisense primer(5'-TCAAGCTTTCAGATCCTTCA-3')를 분리된 total RNA 용액에 넣어 주고 cDNA synthesis kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 1st strand cDNA 가닥을 합성하였다. 합성 반응이 끝난 후 sense primer (5'-GGATCCATGATGAAGTCGATGCT-3') 및 antisense primer 10pmole씩을 첨가한 후 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하여 PAP-I cDNA를 합성하였으며, pBluescript II SK-의 BamHI, HindIII위치에 삽입시켰고, 377 automatic DNA sequencer(Applied Biosystem, USA)를 이용하여 염기서열을 확인한 후 amino acid 서열을 추론하였다.

### Deletion mutation을 위한 primer 합성 및 PAP-I cDNA의 결손돌연변이

합성된 PAP-I cDNA의 immature N-terminal 쪽

으로부터 최초 66bp, 다음부터는 90bp씩 PCR을 통해 순차적으로 결손시킬 수 있는 primer를 design 하여. 10개의 sense primer와 1개의 antisense primer 등 모두 11개의 primer가 design 되었으며 이를 DNA synthesizer를 이용하여 합성하였다 (Table 1). 이러한 primer들을 이용하여 PAP-I full gene을 대상으로 PCR을 시행하여 C-terminal쪽은 immature PAP-I 상태를 가지는 결손돌연변이 PAP-I cDNA들을 합성하였다.

#### 효모로의 형질전환

효모숙주세포(*psy1*)를 baffled flask에 YPD media (yeast extract 1%, peptone 2%, and glucose 2%)를 50ml overnight culture하여 spectrophotometer로  $A_{250}$ 에서 흡광도가  $0.5(2 \times 10^6 \text{ cells/ml})$ 가 되었을 때 cell을 3,500rpm, 30분간 원심분리하여 균을 수확하였다. 멸균된 1차 증류수로 세척하여 1ml의 증류수에 현탁 한 후 1.5ml microtube로 옮겨 1× TE/LiOAc (1.0M LiOAc, pH 7.5 5×)를 200 $\mu$ l 넣고 현탁한 후 50 $\mu$ l 씩 4개의 tube에 나누어 넣었다. 각각의 tube에 50 $\mu$ l의 세포 현탁액과 형질전환용 DNA를 넣고 50 $\mu$ g의 carrier DNA (Herring sperm DNA; to make single stranded DNA; 10  $\mu$ g/ml)를 넣고 300 $\mu$ l의 40% PEG 용액(40% PEG, 1× TE, 1× LiOAc)을 넣고 in and out 하면서 잘 섞어 30℃에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝나고 곧바로 42℃에서 15분간 heat shock을 주고 원심분리 한 후 pellet에 200 $\mu$ l의 1× TE를 넣어 선택배지 (SC\_ura-/glucose 배지와 SC\_ura-/galactose 배지)에 도말하여 1일 후 uracil 합성이 가능한 pAc55M이 들어가 형질전환된 colony를 picking하여 사용하였다.

Yeast 선택배지의 이미 조제된 Drop-out media mix (adenine 400mg, uracil 400mg, tryptophan 400mg, histidine 400mg, arginine 400mg, methionine 400mg, tyrosine 600mg, lysine 600mg, phenylalanine 1000mg, threonine 4000mg, isoleucine 600mg, valine 3000mg, aspartic acid 2000mg, leucine 1200mg)에 glucose나 galactose가 첨가된 uracil 결핍배지를 사용하여 cytotoxicity test 에 사용하였다.

#### 세포독성연구

세포독성 여부를 확인하고자 효모 발현벡터인 pAc55M에 최초 66bp, 다음부터는 90bp씩 순차적으로 결손된 돌연변이 PAP-I cDNA가닥들을 삽입시켰으며, 제한효소반응에 의하여 삽입여부를 확인하였다.

PAP-I과 9종류의 결손돌연변이 PAP-I 유전자 가닥이 재조합된 pAc55M효모발현벡터를 *psy1* yeast cell에 형질전환하였으며, uracil이 결핍된 합성배지(SC\_ura-/glucose)에 도말하여 mutant PAP-I 유전자 가닥이 재조합된 효모 발현벡터가 형질전환된 yeast cell을 선별하였으며, 선별된 효모 클론이 지니는 *gal1* promoter down-stream 위치에 삽입된 mutant PAP-I 유전자 가닥의 세포독성 여부를 알기 위하여 SC\_ura-/galactose배지에 접종한 후 세포의 생존여부를 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

#### RT-PCR에 의한 PAP-I cDNA 가닥의 합성 및 염기서열과 amino acid 분석

미국자리공(*Phytolacca americana*) 잎의 total RNA로부터 reverse transcriptase -polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법을 사용하여 PAP-I cDNA를 합성하였으며, RT-PCR에 의해 합성된 PAP-I cDNA 가닥을 pBluescript II SK-의 *Bam*HI, *Hind*III 위치에 삽입시켰다.

pBluescript II SK-에 subcloning된 PAP-I cDNA의 염기서열을 분석하여 942bp의 염기서열을 확인하였고(Fig. 1), GENBANK를 통하여 313개의 amino acid 서열을 분석하였다(Fig. 2). 염기서열 분석 결과 GENBANK의 *phytolacca americana*로부터 얻은 PAP의 염기서열(X55383)과 동일하였으며 AY049785의 *phytolacca acinosa*로부터 얻은 PAP 유전자서열과 총 22개의 서열차이를 나타냈고, 13개의 아미노산 서열에 차이를 갖고있었다.

#### 효모발현벡터 pAc55M의 재조합

효모를 이용한 세포독성 확인에서 효모발현벡터를 사용하기 위해 pAc55의 *SUL2* site를 *Bam*HI과 *Pvu*II를 이용하여 제거함으로써 size를 줄여 형질

TGGATCC ATGAAGTCGA TGCT (PAP-I sense primer)  
 1 ATGAAGTCGA TGCTTGTTGGT GACAATATCA ATATGGCTCA TTCTTGCACC AACTTCAACT  
 61 TGGGCTGTGA ATACAATCAT CTACAATGTT GGAAGTACCA CCATTAGCAA ATACGCCACT  
 121 TTTCTGAATG ATCTTCGTAA TGAAGCGAAA GATCCAAGTT TAAAATGCTA TGAATACCA  
 181 ATGCTGCCCA ATACAAATAC AAATCCAAAG TACGTGTTGG TTGAGCTCCA AGGTTCAAAT  
 241 AAAAAACCA TCACACTAAT GCTGAGACGA AACAATTTGT ATGTGATGGG TTATTCTGAT  
 301 CCCTTTGA AAA CCAATAAATG TCGTTACCAT ATCTTTAATG ATATCTCAGG TACTGAACGC  
 361 CAAGATGTAG AGACTACTCT TTGCCCAAAT GCCAATTCTC GTGTTAGTAA AACATAAAC  
 421 TTTGATAGTC GATATCCAAC ATTGGAATCA AAAGCGGGAG TAAAATCAAG AAGTCAAGTC  
 481 CAACTGGGAA TTCAAATACT CGACAGTAAT ATTGGAAAGA TTTCTGGAGT GATGTCATTC  
 541 ACTGAGAAAA CCGAAGCCGA ATTCCTATTG GTAGCCATAC AAATGGTATC AGAGGCAGCA  
 601 AGATTCAAGT ACATAGAGAA TCAGGTGAAA ACTAATTTTA ACAGAGCATT CAACCCATAAT  
 661 CCCAAAGTAC TTAATTTGCA AGAGACATGG GGTAAGATT CAACAGCAAT TCATGATGCC  
 721 AAGAATGGAG TTTTACCCAA ACCTCTCGAG CTAGTGGATG CCAGTGGTGC CAAGTGGATA  
 781 GTGTTGAGAG TGGATGAAAT CAAGCCTGAT GTAGCACTCT TAACTACGT TGGTGGGAGC  
 841 TGTCAGACAA CTTATAACCA AAATGCCATG TTTCTCAAC TTATAATGTC TACTTATTAT  
 901 AATTACATGG TTAATCTTGG TGATCTATTT GAAGGATTCTGA  
 A CTTCCTAAGA CTTTCGA ACT (PAP-I antisense primer)

Fig. 1. Nucleotide sequence of the synthesized PAP-I cDNA fragment.  
 PAP-I cDNA has been sequenced 942 bp.  
 The start and stop codons were indicated with shade and  
 PAP-I cDNA sense and antisense primers are underlined.

1	Met	Lys	Ser	Met	Leu	Val	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Trp	Leu	Ile	Leu	15
16	Ala	Pro	Thr	Ser	Thr	Trp	Ala	Val	Asn	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asn	Val	30
31	Gly	Ser	Thr	Thr	Ile	Ser	Lys	Tyr	Ala	Thr	Phe	Leu	Asn	Asp	Leu	45
46	Arg	Asn	Glu	Ala	Lys	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Tyr	Gly	Ile	Pro	60
61	Met	Leu	Pro	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Pro	Lys	Tyr	Val	Leu	Val	Glu	75
76	Leu	Gln	Gly	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Met	Leu	Arg	Arg	90
91	Asn	Asn	Leu	Tyr	Val	Met	Gly	Tyr	Ser	Asp	Pro	Phe	Glu	Thr	Asn	105
106	Lys	Cys	Arg	Tyr	His	Ile	Phe	Asn	Asp	Ile	Ser	Gly	Thr	Glu	Arg	120
121	Gln	Asp	Val	Glu	Thr	Thr	Leu	Cys	Pro	Asn	Ala	Asn	Ser	Arg	Val	135
136	Ser	Lys	Asn	Ile	Asn	Phe	Asp	Ser	Arg	Tyr	Pro	Thr	Leu	Glu	Ser	150
151	Lys	Ala	Gly	Val	Lys	Ser	Arg	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gly	Ile	Gln	165
166	Ile	Leu	Asp	Ser	Asn	Ile	Gly	Lys	Ile	Ser	Gly	Val	Met	Ser	Phe	180
181	Thr	Glu	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Phe	Leu	Leu	Val	Ala	Ile	Gln	Met	195
196	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Arg	Phe	Lys	Tyr	Ile	Glu	Asn	Gln	Val	Lys	210
211	Thr	Asn	Phe	Asn	Arg	Ala	Phe	Asn	Pro	Asn	Pro	Lys	Val	Leu	Asn	225
226	Leu	Gln	Glu	Thr	Trp	Gly	Lys	Ile	Ser	Thr	Ala	Ile	His	Asp	Ala	240
241	Lys	Asn	Gly	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Ser	255
256	Gly	Ala	Lys	Trp	Ile	Val	Leu	Arg	Val	Asp	Glu	Ile	Lys	Pro	Asp	270
271	Val	Ala	Leu	Leu	Asn	Tyr	Val	Gly	Gly	Ser	Cys	Gln	Thr	Thr	Tyr	285
286	Asn	Gln	Asn	Ala	Met	Phe	Pro	Gln	Leu	Ile	Met	Ser	Thr	Tyr	Tyr	300
301	Asn	Tyr	Met	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Leu	Phe	Glu	Gly	Phe	***		313

Fig. 2. Amino acid sequence of PAP-I.  
 Immature pokeweed antiviral protein-I is composed of 313 amino acid residues. N-terminal signal sequences(22 a.a) are underlined, and C-terminal signal sequences(29 a.a) are boxed.

전환효과를 높이고 pBluescript II SK-의 multicloning site(MCS)를 같은 enzyme으로 잘라내어 삽입시킨 pAc55M을 재조합하였다. Multicloning site가 *gal1* promoter의 downstream에 위치함으로써 multicloning site에 재조합되는 유전자가 galactose가 함유된 배지에서 발현이 되었다.

**PCR을 이용한 PAP-I 유전자의 결손 및 효모발현 벡터로의 cloning**

N-terminal 쪽으로부터 순차적으로 결손이 이루어진 PAP-I cDNA가닥을 인위적으로 합성해내기 위해 design된 primer(Tabeg. 1)들을 이용하여 PAP-I full gene을 대상으로 PCR을 시행하여 결손 돌연변이 유전자를 합성하였다. 최초 Immature N-terminal쪽으로부터 66bp를 결손시킨 후, 순차적으로 90bp씩을 결손시켜 C-terminal쪽은 immature PAP-I 상태를 가지는 9개의 결손돌연변이 PAP-I cDNA를 얻었다. 이러한 cDNA 가닥들을 pBluescript II SK-로 subcloning하였고, 삽입여부는 제한효소(*Bam*HI/*Hind*III)를 이용하여 확인하였으며(Fig. 3), deleted mutant PAP-I cDNA 가닥들을 agarose gel로부터 순수분리하였다.

순수분리한 9개의 deleted PAP-I cDNA fragments를 효모발현벡터인 pAc55M의 *gal1* promoter의 down-stream쪽에 각각 재조합하였고, 제한효

소(*Bam*HI/*Pvu*II)를 사용하여 삽입여부를 확인하였다(Fig. 4).

**효모발현 시스템을 이용한 결손 PAP-I 유전자의 세포독성 테스트**

조제된 drop-out media mix로부터 uracil이 결핍된 synthetic complete media(SC\_ura-/glucose와 SC\_ura-/galactose)를 만들었으며, pAc55M에 의하여 형질전환되지 않은 *psy1* yeast cell클론과 형질전환된 클론이 선별가능한 시스템을 확립하였다. 즉, deletion mutant PAP-I cDNA를 포함하는 pAc55M이 형질전환되지 않은 *psy1*은 uracil을 합성할 수 없기 때문에 uracil이 결핍된 배지에서는 성장할 수 없게 된다. Drop-out media mix에 uracil이 결핍되고 galactose나 glucose가 첨가된 배지에 배양하였을 때 독성이 없는 것은 SC\_ura-/glucose 배지만만 아니라 SC\_ura-/galactose배지에서도 성장할 수 있지만, 독성이 있는 것은 galactose가 첨가된 배지에서는 *gal1* promoter하에서 유전자가 발현되면 세포독성에 의해 성장할 수 없게되고 SC\_ura-/glucose배지에서만 생장이 가능하다.

이렇게 조사한 결과 4개의 클론이 SC\_ura-/galactose배지에서도 성장하는 것을 확인하였고, 각각을 p2723, p2725, p2726과 p2727이라 명명하였으며, 이들은 R952 primer와 함께 각각 S427,

Table 1. Primers designed for deletion mutation of PAP-I cDNA.

Primer name	Sequences	Length
PAP-I S1	5'-TGGATCCATGATGAAGTCGATGCT-3'	24mer
PAP-I S67	5'-AGGATCCATGGTGAATACAATCAT-3'	24mer
PAP-I S157	5'-AGGATCCATGAGTTTAAAATGCTA-3'	24mer
PAP-I S247	5'-CGGATCCATGACCATCACACTAAT-3'	24mer
PAP-I S337	5'-AGGATCCATGAATGATATCTCAGG-3'	24mer
PAP-I S427	5'-TGGATCCATGAGTCGATATCCAAC-3'	24mer
PAP-I S517	5'-GGGATCCATGAAGATTTCTGGAGT-3'	24mer
PAP-I S607	5'-TGGATCCATGAAGTACATAGAGAA-3'	24mer
PAP-I S697	5'-AGGATCCATGATTTCAACAGCAAT-3'	24mer
PAP-I S787	5'-GGGATCCATGAGAGTGGATGAAAT-3'	24mer
PAP-I R952	5'-TCAAGCTTTCAGAATCCTTCA-3'	21mer

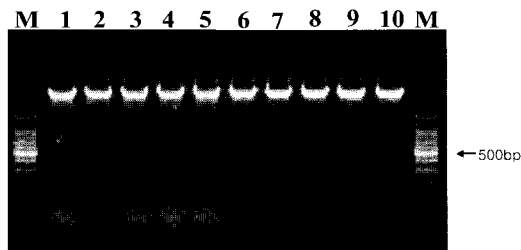
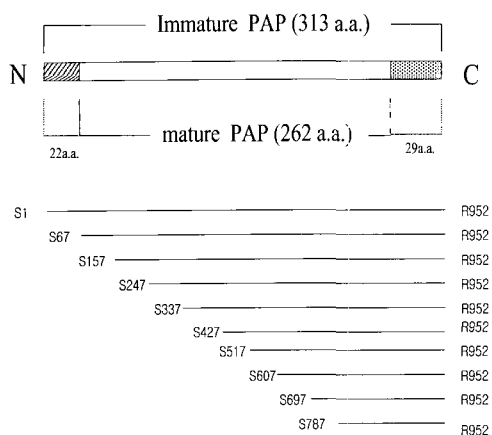


Fig. 4. Restriction enzyme(*Bam*HI/*Pvu*II) analysis of recombinant yeast expression vector pAc55M inserted with mutant PAP-I cDNA fragments.

M : 100 bp ladder.

Lane 1 ~ 10 : pAc55M + mutant PAP-I cDNA fragments.

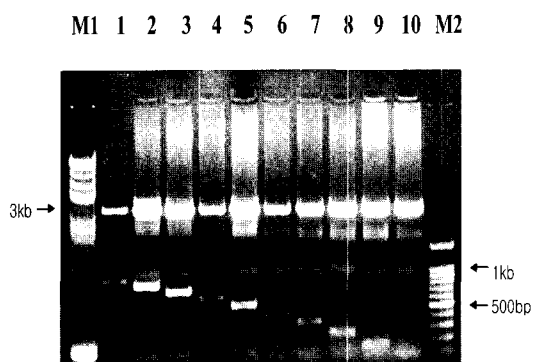


Fig. 3. Restriction enzyme(*Bam*HI/*Hind*III) analysis of subcloned mutant PAP-I cDNA fragments sequentially deleted from N-terminal of PAP-I cDNA.

PCR products were subcloned into pBluescript II SK-.

M : Size marker (*Lambda*/*Hind*III+*Lambda*/*Pst*I).

M2 : 100 bp ladder.

Lane 1 : S1/R952(non-deleted PAP-I cDNA).

Lane 2 : S67/R952(PAP-I cDNA deleted 66bp from N-terminal).

3~10 : sequentially deleted PAP-I cDNA by 90bp from N-terminal, used sense primers : 3;S157, 4;S247, 5;S337, 6;S427, 7;S517, 8;S607, 9;S697, 10;S787, used anti-sense primer : R952.

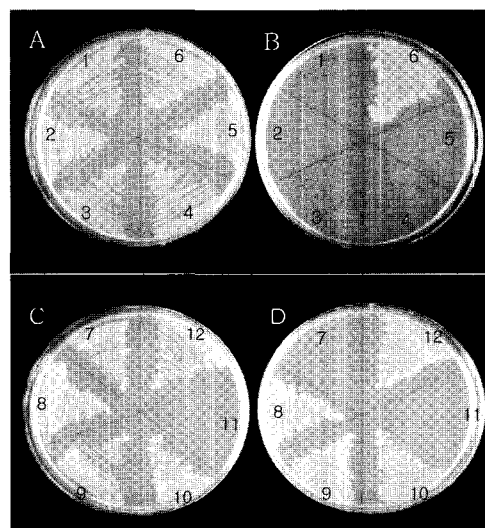


Fig. 5. Selection of *psy1* transformed non-cytotoxic deleted PAP-I cDNA / pAc55M.

A, C : SC<sub>ura</sub>-/glucose medium.

B, D : SC<sub>ura</sub>-/galactose medium.

6 : 426bp deleted PAP-I cDNA/pAc55M/*psy1* (R952/S426).

8 : 696bp deleted PAP-I cDNA/pAc55M/*psy1* (R952/S607).

10 : 786bp deleted PAP-I cDNA/pAc55M/*psy1* (R952/S697).

11 : *psy1*. 12 : pAc55M/*psy1*.

Deletions of PAP-I cDNA were taken from immature N-terminal with primers indicated in blank.

S607, S697과 S787 primer를 이용하여 PCR을 통해 immature N-terminal쪽으로부터 426bp, 606bp, 696bp와 786bp씩 결손시킨 세포독성을 갖지 않는 deletion mutant PAP-I cDNA가 클로닝 된 것들이었다(Fig. 5).

4개의 클론에서 세포독성이 없어졌지만, 항바이러스능을 계속 갖는지를 알아보기 위해 연초에 형질전환시킨 후 virus를 집중하여 확인할 것이며, immature N-terminal쪽으로부터 순차적 결손 돌연변이를 한 방법 이외에 immature C-terminal쪽으로부터의 순차적 결손 돌연변이, 부분적 결손 돌연변이등의 다양한 결손방법을 통해 세포독성이 없어진 클론을 찾는 연구를 계속 진행할 것이다.

## 결 론

미국자리공의 잎으로부터 얻어낸 total RNA를 RT-PCR의 방법을 이용하여 PAP-I cDNA를 합성하고, 재조합벡터인 pBluescript II SK-에 삽입시켰다. Immature N-terminal쪽으로부터 최초 66bp, 다음부터는 90bp씩 결손시킬 수 있도록 제조된 primer들을 PCR에 이용하여 순차적 결손 돌연변이 PAP-I cDNA fragments 9종을 얻어냈고, 이를 효모발현벡터인 pAc55M의 *gall* promoter의 downstream 부위에 삽입하였다.

이를 다시 *psy1* 효모세포에 형질전환하여 SC\_ura-/glucose 고체배지에 도말하였고, 배양하여 자란 콜로니를 SC\_ura-/glucose 및 SC\_ura-/galactose 고체배지의 각각 같은 위치에 streak 하여 양쪽 모두에서 자란, 즉, 세포독성을 갖지 않는 4종류의 결손 돌연변이 PAP-I cDNA를 선별하였으며, 이는 앞으로 *Agrobacterium tumefaciens*를 거쳐 연초식물에 형질전환하여 항바이러스능을 검사받게 될 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Bonness, M. S., M. P. Ready, J. D. Irvin, and T. J. Mabry(1994) Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosome ; implications for the antiviral mechanism. *Plant J.* 5: 173-183.
2. Chomczynski, P., and N. Sacchi(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159.
3. Eiklid K., S. Olsnes, and A. Pihl(1980) Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 126:321-326.
4. Irvine, J. D., T. Kelly, and J. D. Robertus (1980) Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivates eukaryotic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:418-425.
5. Lodge, J. K., W. K. Kaniewski, and N. E. Tumer(1993) Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7089-7093.
6. Michael, P. R., T. B. Dennis and J. D. Robertus(1986) Extracellular localization of pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:5053-5056.
7. Michael, T., and A. Wilson(1993) Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3134-3141.
8. Montanaro, L., S. Sperti, A. Mattioli, G. Testoni, and F. Stirpe(1975) Inhibition by ricin of protein synthesis *in vitro*. *Biochem. J.* 146:127-131.
9. Nilgun, E. T., D. J. Hwang, and M. Bonness (1997) C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:3866-3871.
10. Olsnes, S. and A. Pihl(1973) Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. *Eur. J. Biochem.* 35:179-185.
11. Girbes, T., J. M. Ferreras, R. Iglesias, L.

- Citores, C. De Torre, M. L. Carbajales, P. Jimenez, F. M. De Benito, and R. Munoz (1996) Recent Advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cell. Mol. Biol.* 42(4):461-471.
12. Hur, Yoonkang, D. J. Hwang, O. Zoubenko, C. Coetzer, F. M. Uckun, and N. E. Tumer (1995) Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae* : Identification of residues important for cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8448-8452.