

벼오갈병 바이러스 P12 단백질의 벼 감염세포 내 소재양식

이봉춘* · 홍연규 · 홍성준 · 박성태
농촌진흥청, 작물과학원, 영남농업연구소

In Situ Localization of Rice dwarf phytoreovirus P12 Protein in Infected Rice Plant

Bong-Choon Lee*, Yeon-Kyu Hong, Sung-Jun Hong and Sung-Tae Park
Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA, Milyang 627-803, Korea
(Received on October 17, 2005)

Rice dwarf phytoreovirus (RDV), a member of the family *Reoviridae* has a genome composed of 12 segmented dsRNAs designated as S1 to S12 with an increasing order of mobility in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). RDV encode 12 structural and non-structural proteins, P1~P12 which are encoded by the S1~S12 segments of the dsRNA genome, respectively. In this experiment, we confirmed *in situ* localization of RDV particles and P12 in cytoplasm of infected rice plant. We observed specific reaction of the gold particles using virus particle and P12 protein specific antiserum with protein A-gold immunolabelling in electron microscope. It was observed that gold particles specifically react to virus particles in cytoplasm in case using the antiserum for virus particles. In the case of antiserum for P12 protein, gold particles sporadically existing on cytoplasm without existing in organelle of cytoplasm specifically. As this result, RDV P12 protein encoded by S12 located in cytoplasm.

Keywords : P12 protein, Protein A-gold labelling, *Rice dwarf phytoreovirus*

벼오갈병바이러스(*Rice dwarf virus*, RDV)는 *Phytoreovirus* 속에 속하며 게놈은 double stranded RNA의 12분절로 이루어져 있는데 전기영동상에서 크기가 큰 것부터 S1에서 S12로 명명한다.

RDV는 끝동매미충(*Nephotettix cincticeps*)을 포함하는 매미충류에 의해 경란전염한다. 현재까지 RDV 게놈구조에 관한 연구는 Uyeda 등(1994, 1995)에 의해 12분절 전 게놈염기서열이 결정되었으며 염기서열로부터 추측되는 아미노산서열로부터 단백질기능의 추측 등이 보고되었다(Uyeda 등, 1994, 1995; Yamada 등, 1990; Suzuki 등, 1992). S1, S3, S5 및 S7은 입자의 core 형성, S2 및 S8은 외피단백질을 형성하고 나머지 S4, S6, S9, S10, S11 및 S12는 비구조단백질을 형성한다고 보고되어 있다(Suzuki 등, 1999). S1에서 S12로 명명된 각각의 분절이 형성하는 단백질은 P1에서 P12로 명명되고 있다. 본 실험에서

는 바이러스입자에 대한 항혈청 및 비구조단백질을 형성한다고 보고된 P12의 항혈청에 protein A-gold 입자를 immunolabelling하여 이병세포 내에서 이들 단백질의 소재양식을 확인하였다.

재료 및 방법

바이러스 isolate. 작물과학원 영남농업연구소 포장에서 채집한 이병주를 사용하였다. 이병주는 매개충인 끝동매미충의 접촉에 의해 계대증식, 유지하였다.

전자현미경 시료제작. 파종 후 약 20일 정도 경과한 벼 유묘를 매개충인 끝동매미충으로 총매전염시켜 이병주를 제작한다. 총매전염 약 1개월 경과 후에 병징이 발현되기 시작하는 단계의 이병주로 전자현미경 시료를 제작하였다. 전자현미경 시료제작은 시료의 항원성을 유지시키기 위하여 일반적인 전자현미경 시료제작 방법을 변형하여 실시하였다. 우선 시료를 4% paraformaldehyde로 고정하고, 50%, 80%, 90%, 100% 알코올로 탈수하였다. 포매는 LR-white 수지를 사용하여 43°C에서 48시간 동안

*Corresponding author
Phone) +82-55-350-1273, Fax) +82-55-352-3059
E-mail) bclee@rda.go.kr

중합하였다.

Protein A-gold labelling. Protein A-gold는 Sigma-Aldrich(USA)의 12 nm 크기를 사용하였다. Protein A-gold labelling 반응은 우선 초박절편한 시료를 증류수로 씻어준 다음, 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 [0.15 M NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.2(PBS)] 용액으로 실온에서 30분 동안 incubation하였다. 1% BSA를 포함한 PBS로 씻어낸 후 RDV 입자 및 P12에 특이적인 γ -globulin 10~100 ng으로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS-BSA로 씻어준 다음, protein A-gold를 실온에서 30분 동안 labelling하였다. 이것을 PBS와 증류수로

씻어준 다음 2% uranyl acetate에서 15분 전자염색 후 전자현미경(Hitachi H-7500)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

RDV 입자 특이적 항혈청 사용. 바이러스 입자에 특이적인 항혈청으로부터 γ -globulin을 분리하여 protein A-gold를 labelling하였다. γ -globulin의 농도는 10~100 ng으로 하였을 때 protein A-gold 입자와의 특이적인 반응이 관찰 가능하였다(data not shown). RDV 이병주의 세포에서 gold 입자는 바이러스 입자와 특이적으로 결합함을 확

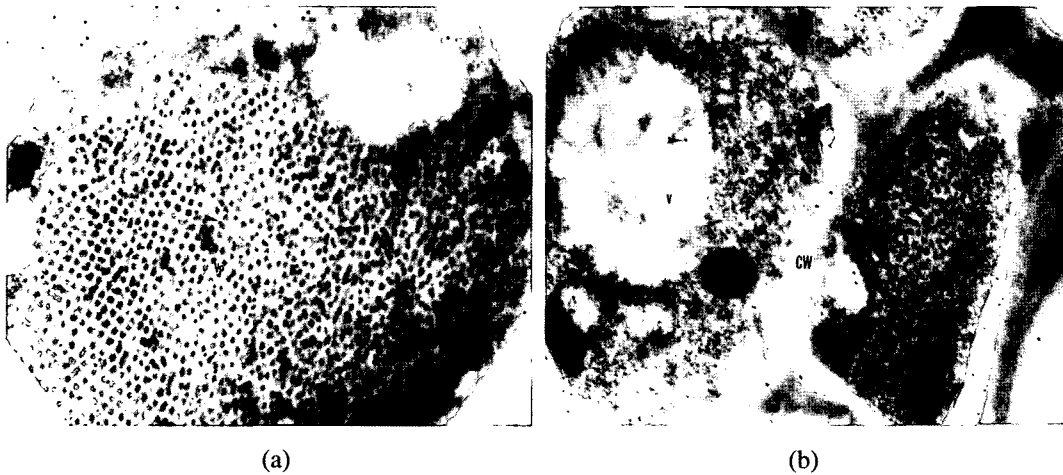


Fig. 1(a) and (b). Electron micrograph illustrating of the distribution of RDV particles in infected rice cells. One month after inoculation by leafhopper leaves displaying chlorotic spots, of systemically infected rice plants were subjected to ultramicro sectioning. Following fixation and subsequent embedding, the tissues were sectioned ultrathinly and treated with the virus particle antiserum and protein A-gold complex to visualize the protein. The gold particle is indicated with arrow. CW: Cell wall ; V: Vacuole ; Vp: Virus particle.

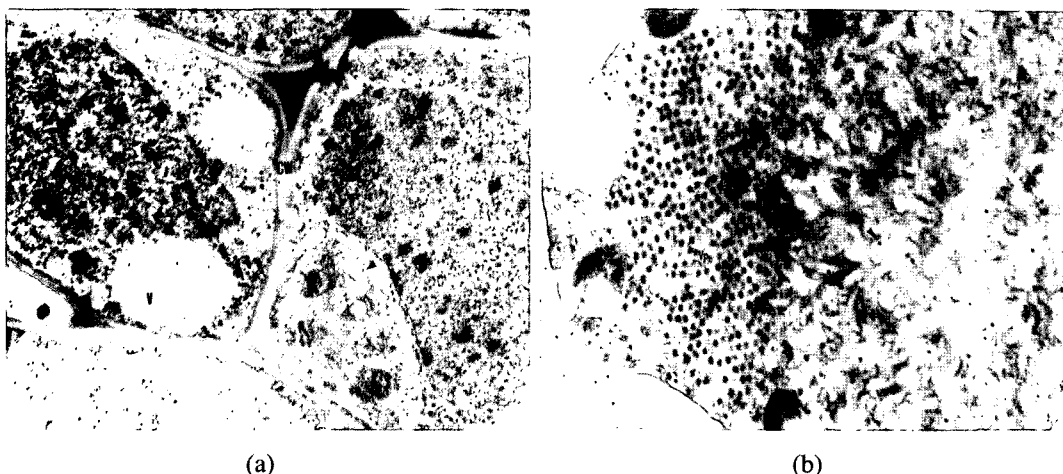


Fig. 2(a) and (b). Electron micrograph illustrating of the distribution of RDV P12 in infected rice cells. One month after inoculation by leafhopper leaves displaying chlorotic spots, of systemically infected rice plants were subjected to ultramicro sectioning. Following fixation and subsequent embedding, the tissues were sectioned ultrathinly and treated with the P12 protein antiserum and protein A-gold complex to visualize the protein. The gold particle is indicated with arrow. CW: Cell wall ; N: Nucleus ; Vp: Virus particle.

인하였으며(Fig. 1a.) RDV 이병주 세포 중에서 gold 입자의 존재양상을 조사한 결과 바이러스 입자가 집적되어 있는 세포의 gold 입자의 수가 바이러스 입자가 없는 세포에 비해 많음이 관찰되었다(Fig. 1b.).

RDV P12 특이적 항혈청 사용. P12 단백질에 특이적인 항혈청에서 γ -globulin을 분리하여 protein A-gold를 labelling 하였다. RDV 입자의 경우와 마찬가지로 γ -globulin의 농도를 10~100 ng으로 하였을 때 protein A-gold 입자와의 특이적인 반응이 관찰 가능하였다. RDV 이병주 세포내에서 gold 입자는 세포질 내에 산재하여 분포하였으며, 세포소기관 등에 특이적으로 결합한 것은 관찰되지 않았다(Fig. 2a). 바이러스입자가 집적된 세포내에서도 gold 입자가 바이러스 입자와 특이적으로 반응하지 않고, RDV 감염시 특이적으로 세포질에 형성되는 바이로플라즘(Viropasm)으로 생각되는 관상조직부위에 산재하여 분포하였다(Fig. 2b). 이것은 P12 특이적 항혈청이므로 바이러스입자에는 Fig. 1(a)처럼 바이러스 입자에는 특이적인 반응이 형성되지 않은 것으로 생각된다.

요 약

벼오갈병바이러스(*Rice dwarf virus*, RDV)는 *Phytoreovirus* 속에 속하며 게놈은 double stranded RNA의 12분절로 이루어져 있는데 전기영동상에서 크기가 큰 것부터 S1에서 S12로 명명한다. 본 실험에서는 RDV 입자 및 P12 단백질의 세포질 내에서의 소재양식을 확인하였다. 바이러스 입자 및 P12 단백질 특이적 항혈청에 protein A-gold 입자를 immunolabelling하여 전자현미경에서 gold 입자의 존

재양상을 관찰하였다. 바이러스 입자 특이적 항혈청을 사용한 경우에는 gold 입자가 세포질내의 바이러스 입자에 특이적으로 반응한 것이 관찰되었다. P12 단백질 특이적 항혈청의 경우 gold 입자가 세포질내의 세포소기관에 특이적으로 존재하지 않고 세포질전체에 산재하여 존재하였다. 이 결과로서 RDV S12가 코드하는 단백질 P12가 세포질내에 존재함을 확인하였다.

참고문헌

- Suzuki, N., Hosokawa, D., Matsuura, Y., Kikuchi, A. and Omura, T. 1999. In vivo and in vitro phosphorylation of rice dwarf phytoreovirus Pns12 cytoplasmic nonstructural protein. *Arch. Virol.* 144: 1371-1380.
- Suzuki, N., Tanimura, M., Watanabe, Y., Kusano, T., Kitagawa, Y., Suda, N., Kudo, H., Uyeda, I. and Shikata, E. 1992. Molecular analysis of rice dwarf phytoreovirus segment S1 : Interviral homology of the putative RNA-dependent RNA polymerase between plant and animal infecting reoviruses. *Virology* 190: 240-247.
- Uyeda, I. and Milne, R.G. 1995. Introduction : Genomic organization, diversity and evolution of plant reoviruses. *Sem. Virol.* 6: 117-122.
- Uyeda, I., Suda, N., Yamada, N., Kudo, H., Murao, K., Suga, H., Kimura, I., Shikata, E., Kitagawa, Y., Kusano, T., Sugawara, M. and Suzuki, N. 1994. Nucleotide sequence of rice dwarf phytoreovirus genome segment 2: completion of sequence analyses of rice dwarf virus. *Intervirology* 37: 6-11.
- Yamada, N., Uyeda, I., Kudo, H. and Shikata, E. 1990. Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 3. *Nucl. Acids Res.* 18: 64-69.