

양자리공 항바이러스성 단백질 발현을 통한 바이러스 내성 담배 및 감자 개발

Development of virus-resistant tobacco and potato by expression of *Phytolacca* antiviral protein

최 규 환, 문 영 호
(진로종합연구소 생물공학실 식물유전공학팀)

서 론

여러 식물에서 항바이러스성 단백질이 분리되었는데 대표적인 것으로 *Ricinus communis*에서 분리한 Ricin(9), *Mirabilis jalapa*에서 유래한 *Mirabilis* antiviral protein(MAP, 16), *Trichosanthes kirilowii*에 있는 α -trichosanthin (33) 그리고 양자리공의 *Phytolacca* antiviral protein(PAP, 12) 등이다. 이들 항바이러스성 단백질은 RIP(ribosome-inactivating protein)의 일종으로 RNA *N*-glycosidase activity가 있는 것으로 알려져 있다(5).

양자리공 잎 추출액을 다른 식물체의 잎 표면에 처리하고 바이러스를 접종하면 바이러스 감염을 억제하는 것으로 알려져 있다(3). 양자리공에서 분리된 항바이러스성 단백질인 PAP는 PAP, PAP-II 그리고 PAP-S로 3가지 유형으로 나누는데, 이들은 계절적으로 또는 조직적으로 다르게 발현되는 것으로 알려져 있다(11). PAP는 합성된 후 세포질에 있지 않고 cell wall matrix로 이동되는 것으로 밝혀졌다(25). 양자리공의 라이보솜도 PAP의 RNA *N*-glycosidase activity에 의해 depurination 되는 것으로 보고 있다(15). PAP와 CD4 또는 CD19에 대한 단일항체군과의 immunoconjugate는 immunodeficiency virus type 1의 복제를 억제하는 것으로 나타났다(14, 17, 24, 32).

최근에 PAP cDNA의 염기서열이 밝혀졌으며(20, 22), genomic library에서 분리한 PAP의 염기서열도 밝혀지는 등(15), PAP에 대한 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다. 이에 따라 PAP에 대한 세포내에서의 정확한 기작과 이를 이용한 형질전환체 식물의 제조 및 immunoconjugate에의 이용성에 많은 관심이 집중되고 있다.

바이러스에 의한 작물의 피해는 전세계적으로 광범위하며 또한 심각한 실정이다. 따라서 여러가지 전략으로 바이러스에 저항성을 지닌 형질전환 식물체 제조에 많은 연구가 이루어 지고 있다(28, 31). 그 예로 바이러스의 외피단백질을 이용하는 방법(19, 29), 바이러스 replicase를 이용하는 방법(2), 바이러스 외피 단백질을 암호화하고 있는 유전자의 antisense RNA를 이용하는 방법(29), satellite RNA를 이용하는 방법(10), 바이러스 외피 단백질에 대한 항체를 이용하는 방법(30)들이 시도되고 있으나, 이들 방법들은 각 바이러스에 대한 특이성으로 인하여 형질전환 식물체에 광범위의 바이러스 저항성 부여에는 한계가 있다.

우리는 PAP가 바이러스의 감염을 억제한다는 사실에 주목하여, PAP 유전자를 분리하여 다른 식물에 도입하기 위하여, 양자리공의 잎으로부터 cDNA library를 제조하고 anti-PAP antibody를 이용하여 PAP 유전자를 분리하였으며(22), 분리한 유전자를 CaMV 35S promoter하에 발현하도록 발현벡터를 제조하고, 이를 이용하여 담배 및 감자를 형질전환하였으며, 형질전환된 담배 및 감자는 여러 바이러스에 저항성을 보이는 것으로 나타났다.

재 료 및 방 법

재 료

양자리공(*Phytolacca americana* L.)은 여름 조건에 맞추어 생육시킨 다음, 잎을 수확하여 -70°C 에 냉동보관하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약들은 Sigma사 제품을 주로 사용하였으며, 여러 제한효소 및 DNA 변형효소들은 Promega사 제품을 사용하였다. cDNA library 제조에는 ZAP-cDNA synthesis kit를 Stratagene사로부터 구입하여 사용하였다.

담배(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)세포의 형질전환에는 담배 종자를 70% 에탄올에 5분간 처리한 후, 50% 상업용 표백제에 20분간 침적하여 표면살균하고 멸균 증류수로 3회 세척하여 MS 기본배지(23)에서 발아시켰다. 생장고에서 1개월 동안 생육시킨 잎을 적당한 크기로 잎절편을 만들어 담배세포의 형질전환용 재료로 사용하였다.

감자(*Solanum tuberosum* cv. Daeji)세포의 형질전환에는 종서를 사용하였다. 감자 종서를 70% 에탄올에 5분간 처리한 후 50% 상업용 표백제(유한락스)에 20분간 침적하여 표면살균하고, 멸균 증류수로 3회 세척하였다. 표면살균 종서를 직경 1 cm의 코르크 보어를 이용하여 적당한 크기로 절편을 만들어 감자세포의 형질전환용 재료로 사용하였다.

Agrobacterium tumefaciens LBA4404는 LB배지에서 28°C, 200 rpm으로 18시간 진탕배양하여 담배 및 감자의 형질전환에 사용하였다.

Anti-PAP antibody의 제조

480 μ g PAP를 도끼에 근육주사하여, 3주 후에 채혈한 혈청을 면역확산법으로 anti-PAP antibody의 형성을 확인하고, 750 μ g의 PAP로 boosting하여 채혈하였다. 분리한 항혈청으로부터 Protein-A agarose column chromatography를 이용하여 anti-PAP antibody를 분리하고, 전기영동으로 순수하게 분리된 anti-PAP antibody를 확인하였다. 분리한 anti-PAP antibody를 Western blot에 사용하였다.

식물 형질전환용 발현벡터의 제조

분리한 PAP cDNA(22)를 CaMV 35S promoter하에서 발현시키기 위하여, *Sac*II와 *Bam*HI으로 이중절단하고 Erase-a-base system(Promega사)을 이용하여 번역 시작점(ATG)까지 적당히 deletion한 후, *Bam*HI linker를 첨가하여 ligation하였다. Deletion 종말점은 Sanger 방법(27)으로 염기서열을 결정하여 확인하였다. 식물 발현벡터 pBI121은 *Sac*I으로 절단하고 *Bam*HI linker를 첨가하여 ligation하였다. PAP 유전자를 지닌 조작된 1 kb *Bam*HI 절편을, 조작된 pBI121의 *Bam*HI 부위에 클로닝하여 식물 형질전환용 발현벡터 pJMC102를 완성하였다.

Agrobacterium tumefaciens LBA 4404의 transformation 및 transformant의 선별 PAP 유전자가 CaMV 35S promoter하에서 발현이 조절되도록 제조한, 식물 형질전환 용 발현벡터 pJMC102를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404로 transformation하기 위하여 freeze-thaw 방법(1)을 사용하였다. pJMC102가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 선별하기 위하여, *Agrobacterium* plasmid quick-screen 방법(1)으로 각각의 DNA를 분리하고, *Bam*HI으로 절단하여 transformation 여부를 확인하였다.

담배세포의 형질전환

담배 잎절편을 pJRM102를 지니고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404균주 용액에 30분간 처리하여 접종한 후, 1.0 mg/L BAP와 0.1 mg/L NAA를 첨가한 MS 고형배지에 치상하여 26°C, 암소에서 48시간 공조배양하였다. 공조배양 후 1.0 mg/L BAP, 500 mg/L carbenicillin과 100 mg/L kanamycin을 첨가한 MS 선발배지에 치상하여 shoot를 유도하였다. 배양조건은 온도가 26°C, 광도는 3000 Lux, 일장은 16시간 주기로 하였으며, 잎절편에서 분화된 shoot는 250 mg/L carbenicillin과 100 mg/L kanamycin 이 첨가된 MS 기본배지에 이식하여 뿌리 형성을 유도하였으며, 뿌리가 형성된 형질전환 담배는 포트에 이식하여 순화시킨 다음 유전자 분석 및 바이러스 저항성 검정에 사용하였다.

감자세포의 형질전환

감자 종서절편을 pJMC102를 지니고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404균주 용액에 30분간 처리하여 접종한 후, 1.0 mg/L zeatin과 0.5 mg/L IAA를 첨가한 MS 고형배지에 치상하여 20°C, 암소에서 48시간 공조배양하였다. 공조배양 후 1.0 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IAA, 500 mg/L carbenicillin과 100 mg/L kanamycin을 첨가한 MS 선발배지에 치상하여 20°C, 3000 Lux, 16시간 주기로 배양하여 shoot를 유도하였다. 유도된 shoot는 250 mg/L carbenicillin과 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 기본배지에 이식하여 뿌리 형성을 유도하였으며, 뿌리가 형성된 형질전환된 감자는 포트에 이식하여 순화시킨 다음 유전자 분석 및 바이러스 저항성 검정에 사용하였다.

PCR에 의한 형질전환 담배 및 감자의 유전자 분석

형질전환된 담배 및 감자로부터 전체 DNA를 추출하고, PCR 방법으로 PAP 유전자가 담배 및 감자 genome 속으로 도입되었는지를 알아보았다. N-terminal primer로서 5'-CCAAGCTTGTGAATACAATCATCTAC-3'과 C-terminal primer로서 5'-GGAAGC TTTGATCAGAATCCTTCAAA-3'을 DNA synthesizer(ABI사)를 이용하여 합성하고, DNA Thermal Cycler(Cetus/Perkin-Elmer사)를 사용하여 denaturation(95°C, 1분), annealing(60°C, 2분), extension(72°C, 2분)을 40 cycle로 하여 Vent™ DNA polymerase(NEB사)로 도입된 PAP 유전자를 증폭하였다.

Southern blot

PCR 방법으로 도입된 PAP 유전자를 증폭한 후, PAP cDNA의 0.6kb *EcoRI* 절편을 DIG-labelling & Detection Kit(B.M 사)을 이용하여 labelling하고 탐침으로 사용하여 표준방법(26)으로 Southern blot을 수행하였다.

Western blot

형질전환된 감자로부터 전체 단백질을 분리하여 15% SDS-PAGE로 분획하고, Hybond-C extra(Amersham사)로 옮긴 후, 0.1% Tween 20과 2% BSA이 함유된 PBS buffer(0.01M NaH₂PO₄, 0.15M NaCl, pH 7.4)로 blocking하였다. Washing buffer(0.1% Tween 20을 함유한 PBS buffer)로 5분간 2회 세척하고, 2 µg/mL anti-PAP antibody를 실온에서 1시간 처리하였다. Washing buffer로 2회 세척한 후 rabbit peroxidase-conjugated 2nd antibody를 실온에서 1시간 처리하고, washing buffer로 2회 세척한 다음, 4-chloro-1-naphthol로 발색시켰다.

형질전환된 담배의 바이러스 저항성 검정

ATCC로부터 구입한 동결건조된 TMV 이병조직을 PBS buffer를 이용하여 마쇄한 후 4겹의 거즈로 여과한 바이러스 접종액을 4-6엽기의 담배에 carborundum을 엽면에 살포한 다음, 탈지면으로 엽면을 문질러서 접종하여 바이러스 감염여부를 검정하였다.

형질전환된 감자의 바이러스 저항성 검정

형질전환된 감자에 각각 potato virus X(PVX), potato virus Y(PVY) 그리고 potato leafroll virus(PLRV)를 접종하였다. PVX와 PVY는 carborundum을 엽면에 살포한 다음 바이러스액을 탈지면으로 엽면을 문질러서 접종하였으며, PLRV의 경우는 복숭아 흑진딧물(*Myzus persicae*)을 PLRV에 감염된 이병 감자에서 2-3일간 획득흡즙시킨 후, 10개체를 이용하여 2-3일간 접종하고 살충제를 사용하여 진딧물을 제거하였다. 접종 후 15일, 30일, 45일 간격으로 접종부위의 상위 잎을 취하여 Clark등(4)의 방법을 약간 변형한 ELISA법으로 바이러스의 농도를 측정하였다. 먼저 96 well plate를 coating buffer[carbonate-bicarbonate(pH 9.6) : 0.2 g/L sodium azide, 2.93 g/L NaHCO₃, 1.5 g/L Na₂CO₃]로 PVX, PVY 그리고 PLRV 각각에 대한 polyclonal antibody(BIOREBA AG사)를 1:1000으로 희석하여, 각 well당 200 µl씩 사용하여 37°C에서 4시간 coating하였다. Coating한 후 3회에 걸쳐 washing buffer(0.05% Tween 20이 함유된 PBS buffer)로 세척하고, 각각의 형질전환 감자 잎으로부터 즙액을 추출하여, PBS buffer로 1:20으로 희석하여 각 well당 200 µl씩 6°C에서 16시간 정치하면서 반응시켰다. 3회 세척 후 PVX, PVY 그리고 PLRV 각각에 대한 polyclonal alkaline phosphatase-conjugated IgG(BIOREBA AG사)를 1:1000으로 희석하여 처리하고 1 mg/mL p-nitrophenyl-phosphate를 각 well당 200 µl씩 처리하여 발색시켰으며, 30분 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 바이러스에 대한 감염여부를 알아보았다.

결 과 및 고 찰

PAP cDNA 분석

양자리공 cDNA library에서 분리한 PAP cDNA는 현재까지 알려진 RIP[Abrin A chain(7), Luffin-a(13), MAP(8), Ricin A chain(18), Trichosanthin(33), 그리고 PIP(*Phytolacca insularis* antiviral protein, unpublished result)에서 볼 수 있는 아미노산 서열을 지니고 있음을 알 수 있으며(그림 1), 이 부위가 RIP의 효소적 활성을 나타내는 활성부위로 알려져 있다(6).

PROTEINS	AMINO ACID SEQUENCE
PIP	A I Q M V S E A A R F K Y I
cPAP	A I Q M V S E A A R F K Y I
α -PAP	A I Q M V S E A A R F K Y I
PAP-S	A I Q M V S E A A R F K Y I
MAP	A I Q M V S E A A R F K Y I
Abrin A	I I Q M V A E A A R F R Y I
Ricin A	C I Q M I S E A A R F Q Y I
S06	A I Q M T A E A A R F R Y I
Trichosanthin	L I Q S T S E A A R Y K F I
Luffin-a	I L Q T T A E A S R F K Y I

Fig 1. Amino acid sequence comparison of putative active site shared by RIPs

식물 발현벡터 pJMC102의 제조

분리한 PAP cDNA 유전자는 5' 부위에 번역시작점(ATG)까지 약 30bp 정도의 불필요한 부분이 있으므로 이 부위를 제거하기 위하여 deletion을 수행한 결과, 적당한 3 clone을 얻을 수 있었다. 그중 clone 14를 선택하여 번역종말점(TGA)으로부터 48 bp 떨어진 곳에 위치한 *Hind*III site를 *Bam*HI site로 치환하여 *Bam*HI으로 절단한 후, 전기용출하여 pBI121에 클로닝하였다. 정방향으로 삽입된 식물 형질전환용 발현벡터를 pJMC102라 명명하였다(그림 2).

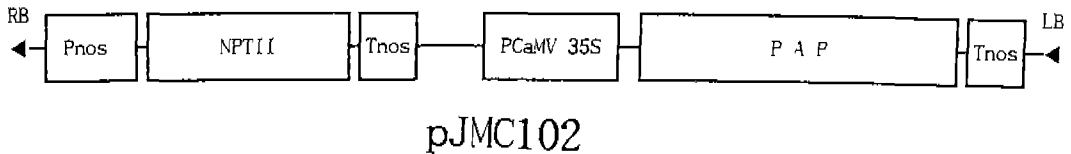


Fig. 2. Structure of the CaMV 35S-PAP chimeric gene. In order to express the PAP gene in tobacco and potato cells, a chimeric gene between the cauliflower mosaic virus 35S promoter and PAP cDNA was constructed. LB, the left border of Ti-plasmid; NPTII, neomycin phosphotransferase II; PAP, cDNA of *Phytolacca* antiviral protein; PCaMV35S, the promoter of the cauliflower mosaic virus 35S promoter; Pnos, the promoter of the nopaline synthase gene; RB, the right border of Ti-plasmid; Tnos, the terminator of the nopaline synthase gene.

담배세포의 형질전환 및 PCR법에 의한 담배세포에 도입된 PAP 유전자 분석

Agrobacterium tumefaciens LBA4404와 담배 잎절편을 공조배양한 후, MS 선발 배지에서 배양한 결과, 배양 15일 후 shoot가 형성되기 시작하였으며, 유도한 shoot에서 뿌리를 유도하기 위하여 100 mg/L kanamycin과 250 mg/L carbenicillin 이 함유된 MS 기본배지에 치상한 결과, 배양 8일 후 뿌리가 형성되었다.

형질전환된 담배로부터 전체 DNA를 분리하고 PCR법으로 도입된 PAP 유전자를 증폭하여 전기영동한 결과 그림 3A에서 보는 바와 같이 형질전환된 담배에서 0.87kb 절편이 보였다. Lane 4는 양자리공 cDNA library로부터 분리한 PAP 유전자를 증폭한 것이며, lane 1과 2는 형질전환된 담배로부터 증폭된 PAP 유전자이다. 이들 모두에서 0.87 kb 절편을 볼 수 있으나, 형질전환되지 않은 담배(lane 3)에서는 이 절편이 보이지 않아 PAP 유전자가 담배 genome속으로 삽입되었음을 알 수 있다. PCR로 증폭한 0.87 kb 절편이 PAP 유전자 인지를 검정하기 위하여 PAP cDNA의 0.6kb *Eco*RI 절편을 탐침으로 사용하여 Southern blot을 수행한 결과, 형질전환된 담배(lane 1, 2)와 양자리공 cDNA library로부터 분리한 PAP 유전자를 증폭한 것(lane 4)에서 band가 나타나, 증폭된 DNA가 PAP 유전자임을 확인하였다(그림 3B).

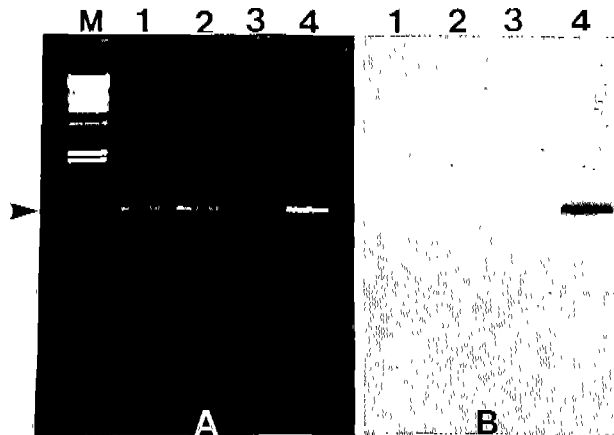


Fig. 3. Southern hybridization of DNAs amplified from tobacco plants with the DIG-labelled 0.6 kb *Eco*RI fragment of PAP cDNA as a probe. M, HindIII-digested λ DNA; lane 1-2, transgenic plants; lane 3, nontransgenic plants; lane 4, DNA amplified from PAP cDNA clone(Moon *et al.*, 1993).

형질전환된 담배의 바이러스 저항성 검정

TMV를 carborundum을 엽면에 살포한 다음 바이러스액을 탈지면으로 엽면을 문질러서 형질전환된 담배와 형질전환하지 않은 담배에 각각 접종한 결과, 형질전환되지 않은 대조구(그림 4A)에서는 반점이 형성되는 반면 형질전환된 담배(그림 4B)에서는 반점이 형성되지 않았다.

감자의 형질전환

감자 종서 절편을 pJMC102를 지니고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균주와 공조배양한 후, 1.0 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IAA, 500 mg/L carbenicillin 과 100 mg/L kanamycin을 첨가한 MS 선발배지에 치상하여 shoot를 유도한 결과, 약 25일 배양 후에 shoot를 유도할 수 있었다. 유도한 shoot는 250 mg/L carbenicillin 과 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 기본배지에 이식하여 뿌리 형성을 유도하였는데, 대부분의 shoot가 정상적인 뿌리의 형성을 보였으며, 뿌리가 형성된 형질전환된 감자는 포트에 이식하여 순화시켜 식물체 초장이 15 Cm에 달했을 때 PCR 분석, Western blot 분석 그리고 PVX, PVY 그리고 PLRV를 접종하여 바이러스 저항성을 검정하였다.

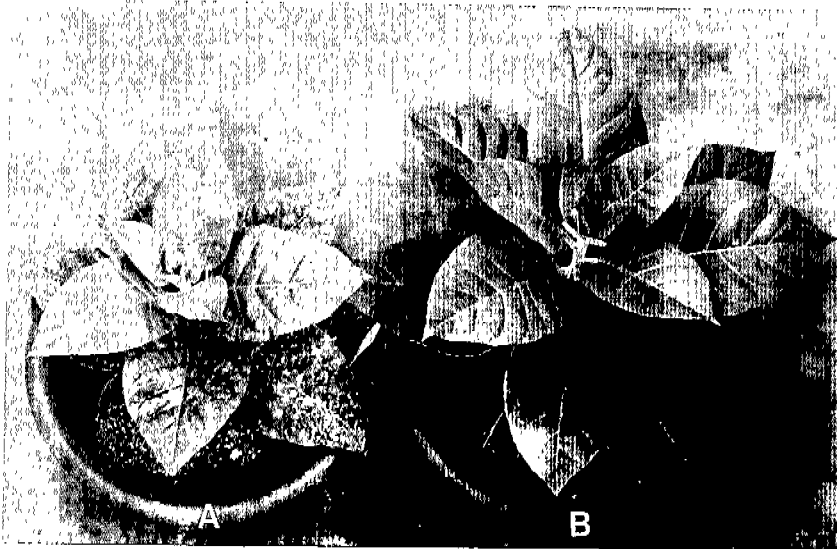


Fig. 4. Comparison of symptom development on leaves of a transgenic tobacco plant(A) and a nontransgenic control plant(B). Each plant was inoculated with TMV and photographed after 25 days from the virus inoculation.

PCR법에 의한 감자세포에 도입된 PAP 유전자 분석

형질전환된 감자로부터 전체 DNA를 분리하고 PCR법으로 PAP 유전자를 증폭하여 전기영동한 결과, 모두 0.87 kb 절편을 보였다. 그중 4 clone을 선별하여 전기영동한 결과가 그림 5A이다. Lane 6는 양자리공 cDNA library로부터 분리한 PAP 유전자를 증폭한 것이며, lane 2, 3, 4 그리고 5는 형질전환된 감자로부터 증폭된 PAP 유전자이다. 이들 모두에서 0.87 kb 절편을 볼 수 있으나, 형질전환되지 않은 감자(lane 1)에서는 이 절편이 보이지 않아, PAP 유전자가 감자 genome속으로 삽입되었음을 알 수 있다. PCR로 증폭한 0.87 kb 절편이 PAP 유전자 인지를 검정하기 위하여, PAP cDNA의 0.6kb *EcoRI* 절편을 탐침으로 사용하여 Southern blot을 수행한 결과, 형질전환된 감자(lane 2, 3, 4, 5)와 양자리공 cDNA library로부터 분리한 PAP 유전자를 증폭한 것(lane 6)에서 band가 나타나 증폭된 DNA가 PAP 유전자임을 확인하였다(그림 5B).

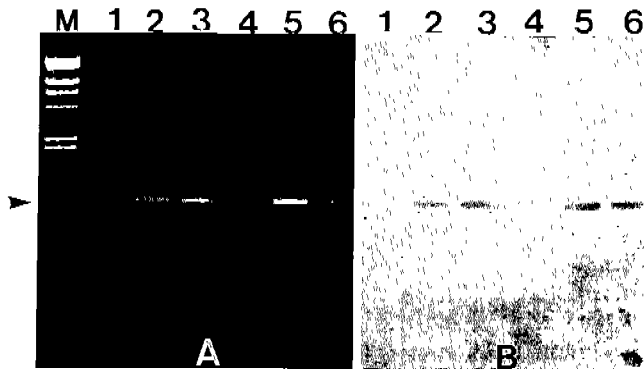


Fig. 5. Southern hybridization of DNAs amplified from potato plants with the DIG-labelled 0.6 kb *EcoRI* fragment of PAP cDNA as a probe. M, *Hind*III-digested λ DNA; lane 1, nontransgenic plant; lane 2-5, transgenic plants; lane 6, DNA amplified from PAP cDNA clone(Moon *et al.*, 1993).

Western blot에 의한 형질전환된 감자에서 PAP 발현 검정

도입된 PAP 유전자가 발현되어 PAP를 생성하는지 알아보기 위하여, anti-PAP antibody를 이용하여 Western blot을 수행하였다. PCR법에 의해 PAP 유전자가 도입된 clone 1, 2, 3 그리고 4로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE로 분획하여 Western blot을 수행한 결과, 그림 6에서 보는 바와 같이 형질전환된 감자에서는 30 kD정도의 band가 나타나는 반면(lane 2, 3, 4, 5) 형질전환되지 않은 감자에서는 나타나지 않았다(lane 1). PAP는 합성되어 cell wall matrix로 이동한다고 보고되어 있으며(25) 분리된 PAP 유전자에는 22개 아미노산으로 구성된 signal peptide가 존재하고 있다. Lodge 등(21)에 의하면 PAP가 발현되는 형질전환된 감자를 Western blot으로 분석하였을 때, 형질전환된 감자 및 담배에서 추출한 단백질과 양자리공으로부터 추출한 PAP가 comigration되며, 또한 vacuum infiltration 실험으로 형질전환된 담배에서 PAP가 apoplastic space에 많이 존재한다고 보고하였다. 또한 형질전환된 담배나 감자에서 PAP가 다량 발현될 때는 정상적인 식물에 비해 여러 비정상적인 형질이 나타나는 것으로 보고하였다. 따라서 Western blot을 수행한 결과, 30 kD의 단일밴드가 나타남을 보아 형질전환된 감자에서 정상적으로 PAP가 compartmentation이 일어났음을 알 수 있으며, 또한 형질전환 감자에서 PAP 발현량을 ELISA법으로 측정해 본 결과, 낮은 수준의 발현정도를 보였다 (data not shown).

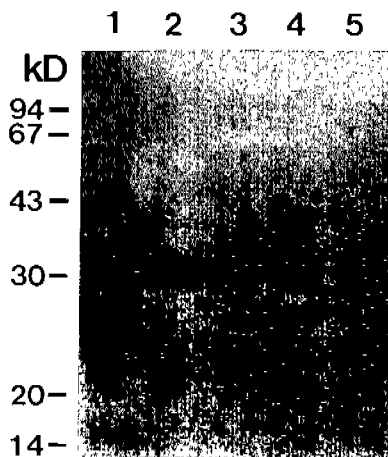


Fig. 6. Western blot analyses of total proteins extracted from potato plants using anti-PAP antibody. 1, nontransgenic plant; 2-5, transgenic plants.

ELISA법에 의한 형질전환된 감자의 바이러스 저항성 검정

PCR 및 Western blot으로 도입된 PAP가 발현되는 형질전환된 감자 3 line을 각각 line 1021, line 1022 그리고 line 1023으로 명명하였다. 이들 각각을 증식시켜서 PVX, PVY, PLRV의 접종에 3 개체씩 사용하였다. 각 바이러스를 접종한 후 15일, 30일, 45일에 ELISA법으로 바이러스 양을 동정하였다.

PVX를 접종한 형질전환된 line들을 45일 후에 ELISA 법으로 검정한 결과, line 1022은 이병 대조구보다 160배 정도 바이러스 농도가 낮았으며, 다른 line들도 이병 대조구에 비해 상당히 낮았다(그림 7). 또한 대체적으로 건전 대조구보다도 바이러스 농도가 낮은 것으로 나타나, 형질전환된 감자가 PVX에 대해 상당한 저항성을 지니고 있는 것으로 나타났다. PVX는 mechanical transmission을 하는 potexvirus의 일종으로 감염시 병징은 가벼운 반문(mottle)을 나타내는 것으로 알려져 있는데, line 1021, 1022, 1023에서는 이런 병징이 나타나지 않았다. 또한 형태 및 형질도 정상적인 감자와 같은 양상을 보였다.

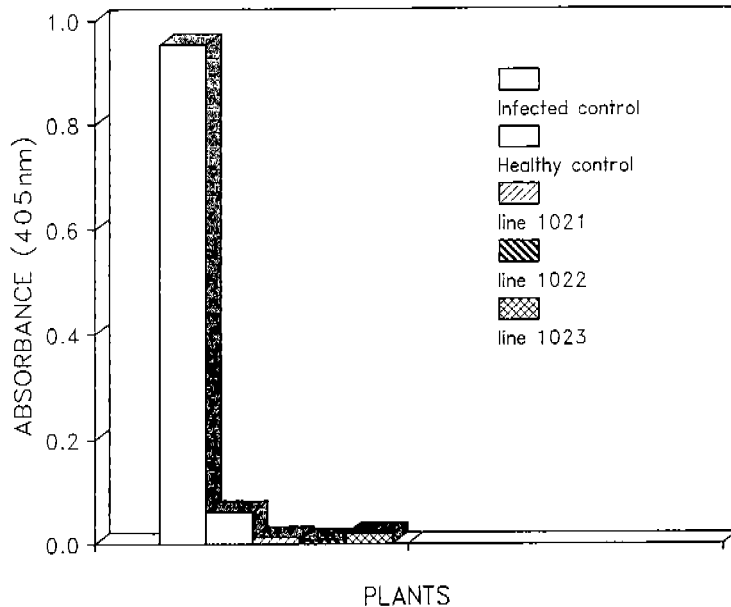


Fig. 7. Accumulation of particles of potato virus X(PVX) in potato plants after 45 days from the virus inoculation. Leaves above the inoculated leaf of each plant were removed and assayed for the concentration of PVX particles by ELISA using anti-PVX antibody.

PVY는 mechanical transmission과 진딧물에 의해 전염되는 potyvirus의 일종으로 감염시 엽맥괴사(necrosis)을 보이는 바이러스이다. 형질전환된 감자 line에 기계적 감염을 시키고 45일 후에 ELISA 법으로 검정한 결과, line 1022가 이병 대조구에 비해 약 40배 가량 바이러스의 농도가 적었으며, 다른 line들도 상당히 낮은 바이러스 농도를 나타내었다(그림 8).

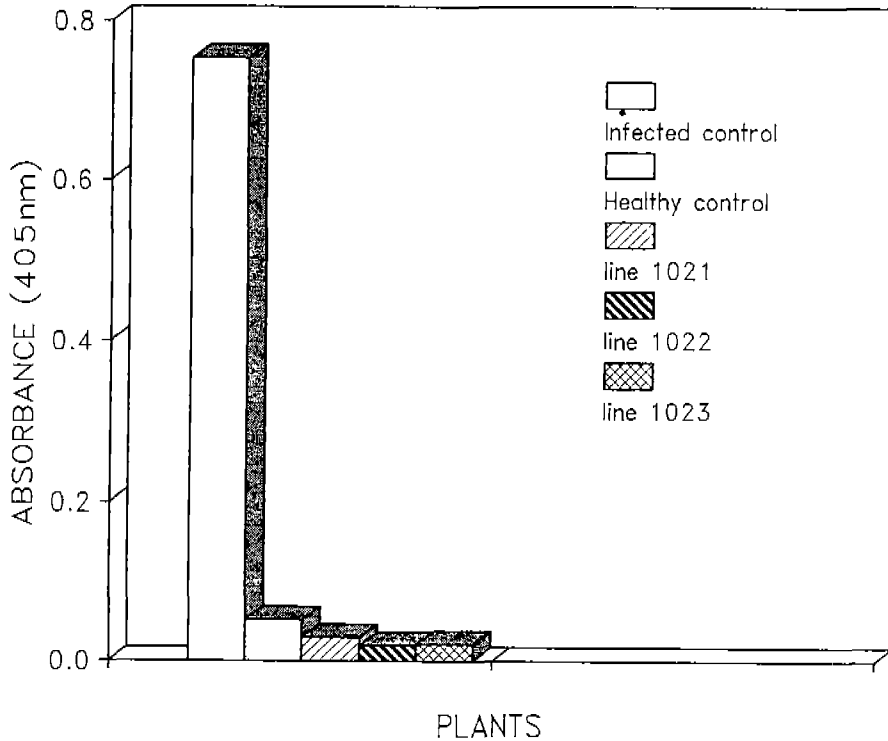


Fig. 8. Accumulation of particles of potato virus Y(PVY) in potato plants after 45 days from the virus inoculation. Leaves above the inoculated leaf of each plant were removed and assayed for the concentration of PVY particles by ELISA using anti-PVY antibody.

또한 이들 형질전환된 line들에서는 관찰할 수 있는 병징이 나타나지 않은 반면 (그림 9B), 이병 대조구(그림 9A)에서는 엽맥을 따라 반점이 나타나 괴사 현상을 보였다. 따라서 PAP가 형질전환된 감자에서 PVX, PVY 바이러스 증식을 효과적으로 억제하여, 이들 바이러스에 대한 저항성을 부여하는 것으로 나타났다.

PLRV의 경우는 진딧물에 의해 주로 전염되는 Luteovirus의 일종이며, 병징은 감염된 감자의 잎이 사관부가 괴사하면서 전분이 축적되기 때문에 잎의 가장자리가 위로 말리는 현상을 보이며 바이러스의 계통에 따라 잎이 뒤틀리거나 찢어지기도 한다. 형질전환된 감자 line들을 복숭아 흑진딧물로 PLRV를 감염시킨 후, 45일 후에 ELISA 법에 의해 검정한 결과, 이병 대조구 보다는 바이러스 농도가 낮았으나 건전 대조구 보다는 높은 바이러스 농도를 보였다(그림 10). 그러나 이들 line들에서 다른 병징들은 보이지 않았다. 따라서 PAP는 형질전환 감자에서 PVX, PVY에 대해서는 상당한 저항성을 제공하지만 PLRV에서는 상대적으로 낮은 저항성을 부여하는 것으로 생각된다.

Multi-gene family로 구성된 PAP의 세포내에서의 정확한 기작과 발현조절 기작은 아직까지 정확히 알려져 있지 않으며, PAP가 어떤 작용에 의해서 바이러스에 저항성을 부여하는지 아직 알려져 있지 않다. 첫번째의 가능성은 PAP가 바이러스와 함께 숙주 세포로 들어와서 viral RNA의 번역을 방해할 가능성과, PAP가 바이러스와 결합하여 바이러스가 세포안으로 들어오는 것을 차단할 가능성이다.

PAP의 유전자를 CaMV 35S promoter 조절하에, 담배와 감자에 발현시켰을 때 TMV나 PVX 그리고 PVY에 저항성이 있는 것을 확인하였는 바, PAP를 이용한 형질전환 식물체 제조 기법은 비특이적인 바이러스 저항성 식물체의 제조에 이용 가능하리라 생각되며, RIP의 한 종류로서 그 응용 범위가 폭넓은 PAP에 대한 연구가 앞으로 활발하리라 본다.

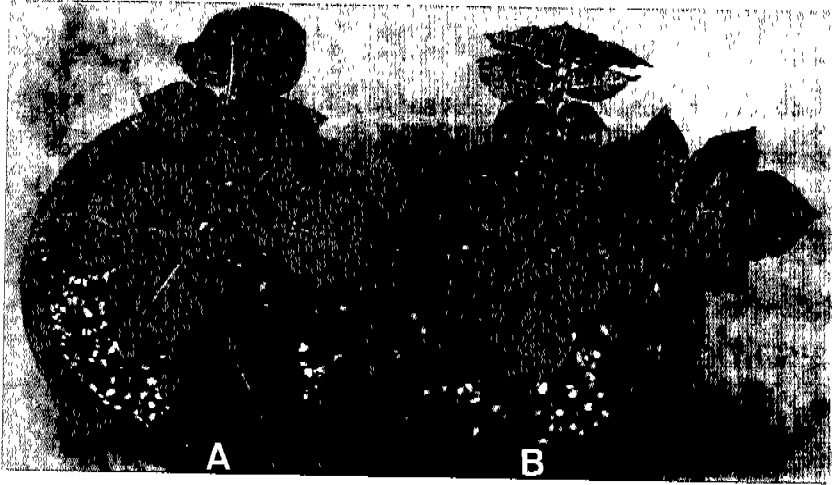


Fig. 9. Comparison of symptom development on leaves of a transgenic potato plant line 1022(A) and a nontransgenic control plant(B). Each plant was inoculated with PVY and photographed after 30 days from the virus inoculation

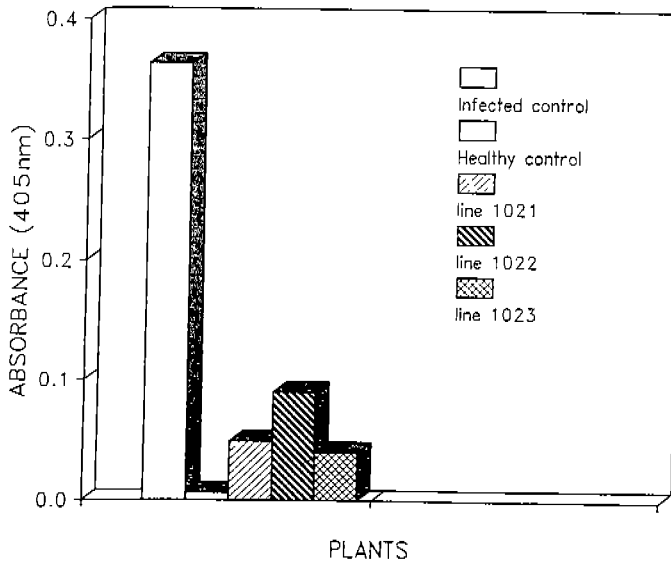


Fig. 10. Accumulation of particles of potato leafroll virus (PLRV) in potato plants after 45 days from the virus inoculation. Leaves above the inoculated leaf of each plant were removed and assayed for the concentration of PLRV particles by ELISA using anti-PLRV antibody.

참 고 문 헌

1. An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., and Ha, S.B. (1988) *In plant molecular biology manual* (Gelvin, S. B., and Schilperoort, R. A., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht A3, 1-19
2. Braun, C.J., and Hemenway, C.L. (1992) *Plant Cell* **4**, 735-744
3. Chen, Z.C., White, R.F., Antoniw, J.F., and Lin, Q. (1991) *Plant Pathol.* **40**, 612-620
4. Clark, M.F., and Adams, A.N. (1977) *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483
5. Endo, Y., and Tsuguri, K. (1988) *J. Biol. chem.* **263**, 8735-8739
6. Frankel, A., Schlossman, D., Welsh, P., Hertler, A., Withers, D., and Johnston, D. (1989) *Mol. Cell Biol.* **9**, 415-420
7. Funatsu, R., Tagnchi, Y., Kamenosono, M., and Yanaka, M. (1988) *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1095-1097
8. Habuka, N., Murakkami, Y., Noma, M., Kudo, T., and Horikoshi, K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6629-6637
9. Halling, K.C., Halling, A.C., Murray, E.E., Ladin, B.F., Houston, K.C., and Weaver, R.F. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 8019-8033
10. Harrison, B.D., Mayo, M.A., and Baulcombe, D.C. (1987) *Nature* **328**, 799-802
11. Houston, L.L., Ramakrishnan, S., and Hermodson, M.A., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9601-9604
12. Irvin, J.D. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 522-528
13. Islam, M.R., Nishida, H., and Funatsu, G. (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1343-1345
14. Jansen, B., Uckun, F.M., Jaszcz, W.B., and Kersey, J.H. (1992) *Cancer Res.* **52**, 406-412
15. Kataoka, J., Habuka, N., Masuta, C., Miyano, M., Masuta C., and Koiwai,

- A. (1992) *Plant Mol. Biol.* **20**, 879-886
16. Kataoka, J., Habuka, N., Miyano, M., Takanami, Y., and Koiwai, A., (1991) *J. Biol Chem.* **266**, 8426-8430
17. Kim, Y.W., Fung, M.S.C., Sung, N.C., Sun, C.R.Y., Chang, N.T., and Chang, T.W., (1990) *J. Immunol.* **144**, 1257-1262
18. Lamb, F.I., Roberts, L.M., and Load, J.M. (1985) *Eur. J. Biochem.* **148**, 265-270
19. Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., and Tumer, N.E. (1990) *Bio/Technology* **8**, 127-134
20. Lin, Q., Chen, Z.C., Antoniwi, J.F., and White, R.F. (1991) *Plant Mol. Biol.* **17**, 609-614
21. Lodge, J.K., Kaniewski, W.K., and Tumer, N.E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7089-7093
22. Moon, Y.H., Jeon, H.S., Choi, K.W., and Lee, J.S. (1993) *Mol. Cells* **3**, 189-194
23. Murashige, T., and Skoog, K. (1962) *Physiol. Plant.* **15**, 473-497
24. Myers, D.E., Irvin, J.D., Smith, R.S., Kuebelbeck, V.M., and Uckun, F.M. (1991) *J. Immunol. Methods* **136**, 221-238
25. Ready, M.P., Brown, D.T., and Robertus, J.D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5053-5056
26. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, NY.
27. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467
28. Scholthof, K.G., Scholthof, H.B., and Jackson, A.O. (1993) *Plant Physiol.* **102**, 7-12
29. Stark, D.M., and Beachy, R.N. (1989) *Bio/Technology* **7**, 1257-1262
30. Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Irinca, S., Martinis, D.D., Cattaneo, A., and Galeffi, P. (1993) *Nature* **366**, 469-472

31. Tepfer, M. (1993) *Bio/Technology* **11**, 1125-1130
32. Zarling, J. M., Moran, P.A., Haffar, O., Sias, J., Richiman, D.D., Spina, C.A., Myers, D.E., Kuebelbeck, V., Ledbetter J.A., and Uckun, F.M. (1990) *Nature* **347**, 92-95
33. Zhang, X., and Wang, J. (1986) *Nature* **321**, 477-478