

弱毒 담배모자이크바이러스

II. RNA 및 外被단백질의 特性

崔 章 京 · 朴 元 穆*

江原大學校 農科大學 植物保護學科

*高麗大學校 農科大學 植物保護學科

Studies on Mild Mutants of Tobacco Mosaic Virus

II. Biochemical Properties of Ribonucleic Acid and Coat Protein

Jang Kyung Choi and Won Mok Park*

Department of Plant Protection, College of Agriculture,

Kangweon National University, Chuncheon 200, Korea

* Department of Plant Protection, College of Agriculture,

Korea University, Seoul 132, Korea

要 約

弱毒 TMV, Tw 333 系統의 RNA 및 外被단백질에 대한 生化學的 特性을 調査하였다. Tw 333-RNA는 2.03×10^6 dalton의 分子量을 나타냈고, 鹽基組成은 guanine 25.4, adenine 29.2, cytosine 17.5, uracil 27.9 mol 이었다. 热處理에서 얻어진 이 RNA의 濃色効果는 25.1%를 나타냈고, 이 때 T_m 值는 47°C였다. 한편 Tw 333의 外被단백질은 17,500 dalton의 分子量을 보였으며, 16種의 아미노산으로構成된 158個의 아미노산殘基를 나타냈다. Trypsin으로 分解한 단백질은 9種의 ninhydrin 양성 반응 peptide를 形成하였다. 이를 弱毒TMV, Tw 333-RNA 및 外被단백질의 生化學的 特性은 原株OM系統과 全般的으로 매우 유사하였다. 그러나 鹽基組成, 濃色効果, 아미노산組成 및 peptide map에서 약간의 差가 認定되었다.

ABSTRACT

The biochemical properties of ribonucleic acid (RNA) and coat protein of the mild tobacco mosaic virus (TMV) mutant, Tw 333 are described. The molecular weight of the RNA calculated from polyacrylamide gel electrophoresis was 2.03×10^6 daltons. The molar ratio of the bases of the RNA was 25.4 guanine, 29.2 adenine, 17.5 cytosine and 27.9 uracil in moles. The hyperchromicity on Tw 333-RNA by thermal denaturation was 25.1%, indicating T_m value of 47°C. The virus coat protein migrated as a single component in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and had a molecular weight of 17,500 daltons. A total of 158 amino acid residues are

本 研究는 1985年度 韓國科學財團의 一般研究費支援에 의해 施行되었음.

present in the protein. Separation of the tryptic peptides by electrophoresis and chromatography yielded ninhydrin-positive compounds. The biochemical properties of RNA and coat protein of the mild mutant were very similar to those of wild type of TMV-OM strain, but some difference between the strains were observed in the base composition, hyperchromicity, amino acid composition and tryptic peptide map.

緒論

담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus, TMV)의 보통계(OM strain)에 感染된 담배를 高溫處理하여 誘起시킨 病毒TMV, Tw333系統은 담배나 고추에 感染되었을 때 미약한 mottling이나 無病徵을 나타냈고, *Nicotiana glutinosa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa* 등에서의 痘王反應 또한 OM系統과는 전혀 다른結果를 나타내(7), TMV病에 대한 生物的 防除에의 利用可能性이 높을 것으로 기대되고 있다. 그러나 이 病毒바이러스의 血清學的 性質이나 純化마이러스의 理化學的 特性은 OM系統과 差異를 나타내지 않았고, 따라서 病毒마이러스의 利用性을 增大시키기 위해서는 遺傳的 安定性을 도모하지 않으면 不可避免되는 문제(16)와도 관련해서 구체적인 遺傳的 特性이 充明되어야 한 것으로 생각된다.

本研究는 病毒TMV, Tw333系統의 遺傳的 特性을 밝히기 위한 기초연구로서 바이러스의 RNA 및 外被단백질의 生化學的 性質을 原株OM系統과 比較検討하였다.

材料 및 方法

供試바이러스. 바이러스는 TMV의 보통계 및 이系統으로부터 高溫處理에 의해서 誘起된 病毒TMV, Tw333系統을 供試하였으며, 이를 바이러스는 *N. tabacum* var. Samsun에 增殖시킨 후 바이러스原으로 使用하였다.

바이러스의 純化. Tw333 및 OM系統의 바이러스에 植病된 담배로 부터 Gooding과 Hebert(12)의 方法으로 각 TMV를 部分 純化시킨 다음, sucrose density-gradient法(3)으로 완전 純化하였다. 이 때 sucrose는 10~40%의 浓度를 利用하였고, 電心分離는 Beckman L8 ultracentrifuge에서 SW28.1 rotor를 使用 25,000 rpm으로 120分間 電心分離하였다. 生成된 바이러스 zone은 층유수 또는 0.1

M 인산완충액(pH 7.0)에 24時間 투석시킨 후 病化바이러스를 얻었다.

RNA의 特性. 病毒바이러스 및 OM系統의 바이러스로부터 ammonium carbonate-sodium dodecyl sulfate(SDS)法(5) 또는 phenol-SDS法(4)에 해 각 바이러스의 RNA를 分離・精製하였다. 分離・精製된 바이러스 RNA에 대해서는 다음과 같은 特성을 調査하였다. ① RNA의 紫外線吸收—各系統 RNA를 SSC完충액에 혼탁시킨 후 200~320nm 위의 紫外線吸收強度를 比較하였다. ② 電氣泳動—2.4% polyacrylamide gel(1)에서의 電氣泳動強度를 比較하였으며, 각 RNA의 分子量을 測定하기 위하여 marker RNA로서 *Escherichia coli* ribosom의 16S 및 23S RNA를 使用하였다. ③ 鹽基組成—病毒 및 原株바이러스 RNA의 鹽基組成은 크마토그래피法(15)에 의해 分析하였다. 각 RNA 0.1~1mg을 2N HCl로 加水分解시킨 分解物을 Toy paper No. 51A(13×33cm)에 spotting하고 tert-butanol : 6N HCl : 층유수 = 70 : 13.2 : 16.8의 混合液에서 48時間 전개시킨 후, 紫外線照射(파장 260nm)로 각 鹽基를 탐색・ 절취, 0.1N HCl에 추출하여 guanine 250nm, adenine 및 uracil 260nm, tosine은 280nm에서의 吸光度를 測定하여 각 基의 mol數를 計算하였다. ④ Hyperchromicity(色効果)—SSC完충액(0.15M NaCl 및 0.015M sodium citrate, pH 7.0)에 혼탁시킨 각 系統의 RNA를 20°C에서 90°C까지 加熱하면서 260nm에서 紫外線吸收度增加率를 調査하여 RNA의 高次構造特性을 比較하였다.

外被단백질의 特性. 純化마이러스로부터 cold acidic acid處理方法(10)으로 病毒 및 原株TMV의 外被단백질을 分離・精製한 후 다음과 같은 實驗을 였다. ① 단백질의 紫外線吸收—各 바이러스에서 離한 단백질을 0.01M 인산완충액(pH 7.0)에 혼탁시킨 후 200~320nm에서의 紫外線吸收強度를 比較하였다. ② 電氣泳動—10% SDS-polyacrylamide gel(19)에서의 電氣泳動強度를 比較하였으며, 分量測定을 위하여 marker 단백질로서는 ovalbumin

(MW 45,000), chymotrypsinogen A (MW 25,000) 및 cytochrome c (MW 13,500)를 사용하였다. ③ 아미노산組成—50~80 mg의 각 바이러스 단백질을 6N HCl로 110°C에서 24時間 加水分解시킨 후, LKB 4150 Alpha 아미노산 자동분석기에서 각 단백질의 아미노산組成을 分析하였다. 이때 tryptophan은 Edelhoch의 方法(9)에 의해 별도로 分析하였다. ④ Peptide map—0.1% trypsin (salt free)으로 分解시킨 각 바이러스단백질을 Toyo paper No. 51 A (20×20 cm)에 spotting한 후, 電氣冰動 및 크로마토그래피法(6)에 의해 2次元으로 전개시킨 다음, 0.3% ninhydrin을 분무하여 peptide를 검색하였다.

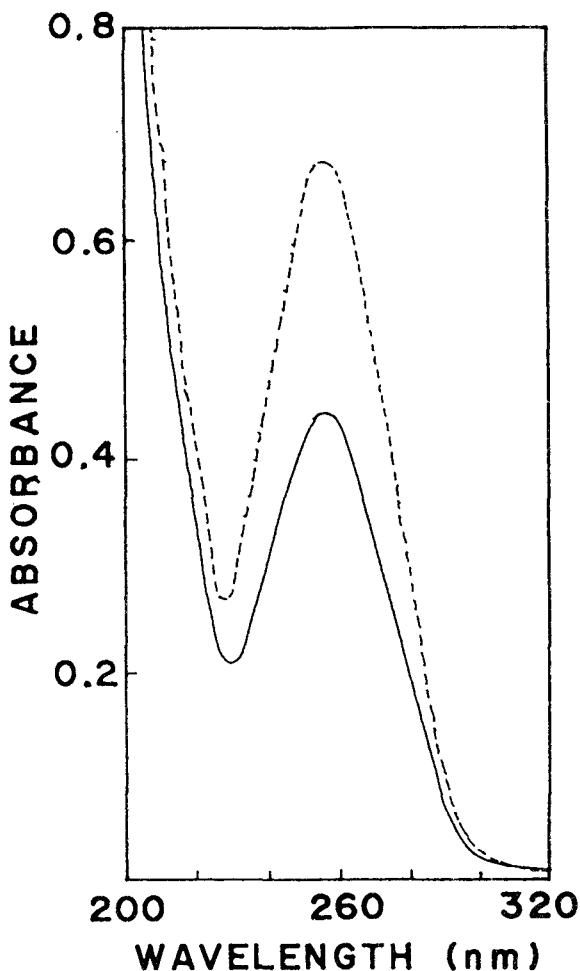


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of the RNAs of mild mutant, Tw333 (—) and wild type (···) of OM strains of tobacco mosaic virus prepared by ammonium carbonate method

이때 電氣冰動은 0.8% pyridine-0.8% acetic acid (pH 4.8) 완충액에서 500V로 5時間 冰動하였으며, 冰動후 크로마토그래피는 formic acid : acetic acid : n-butanol : 증류수 = 1:1:4:1의 용매에서 4時間 전개시켰다.

結 果

弱毒 TMV, Tw 333-RNA의 特性. 純化바이러스로부터 精製한 弱毒TMV, Tw333-RNA는 258nm에서 最高, 234nm에서 最低值를 나타내는 紫外線吸收曲線을 나타냈다(그림 1).

이와 같은 結果는 量的인 差異를 제외하고 原株인 TMV OM-RNA의 吸收曲線과 同一한 패턴을 나타냈다. 이때 OD 258/OD 234의 比는 2.12~2.31이었고, OD 258/OD 280의 比는 2.20~2.38이었다. 이를 RNA를 2.4% polyacrylamide gel에서 電氣冰動한 후 염색한 結果,同一한 Rf值를 갖

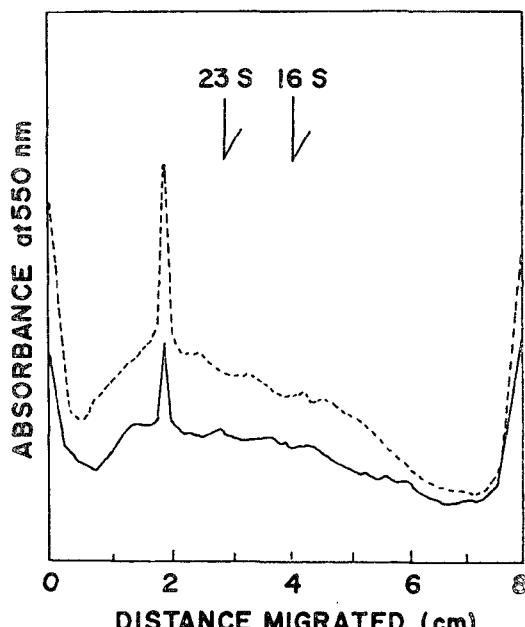


Fig. 2. Absorbance scanning patterns of the RNAs of mild mutant, Tw333 (—) and wild type (···) of OM strains of tobacco mosaic virus after polyacrylamide gel electrophoresis at 5 mA per gel for 3 hr. Marker RNAs used are: 23 S RNA (23 S) ($MW 1.1 \times 10^6$) and 16 S RNA (16 S) ($MW 5.6 \times 10^5$) of *Escherichia coli* ribosome

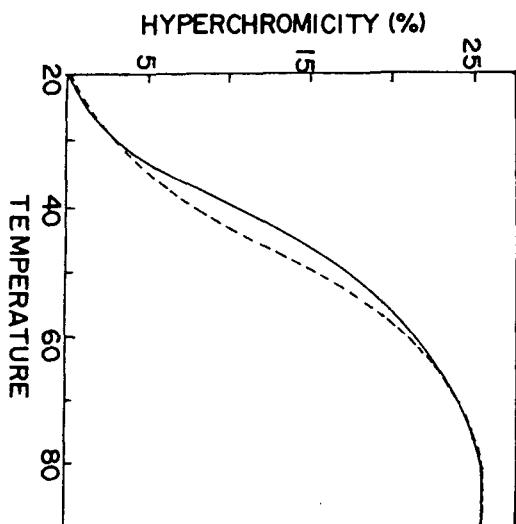


Fig. 3. Hyperchromic effect of the RNAs of mild mutant, Tw 333 (—) and wild type (···) of OM strains of tobacco mosaic virus by heating in SSC buffer

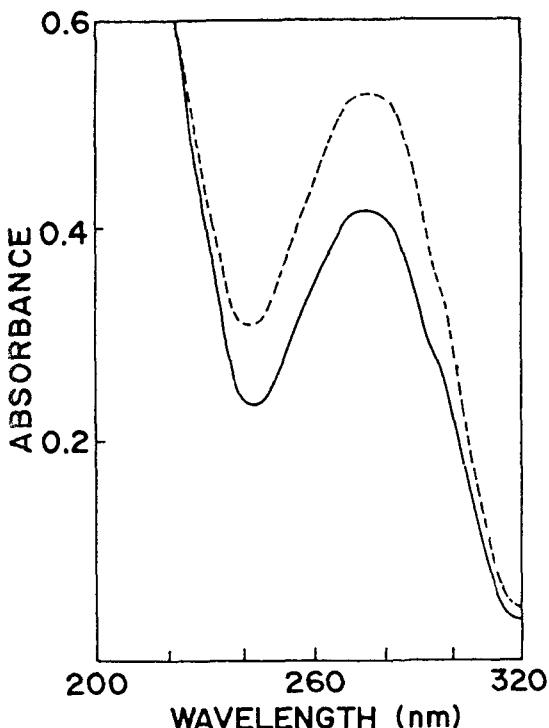


Fig. 4. Ultraviolet absorption spectra of the proteins of mild mutant, Tw 333 (—) and wild type (···) of OM strains of tobacco mosaic virus prepared by cold acetic acid method

는 1種의 band를 나타냈으며(그림 2), marker RNA와 함께冰動시킨 후測定한分子量은 Tw333-RNA가 2.03×10^6 dalton, OM-RNA가 2.05×10^6 dalton을 보여分子量의 差異도 認定되지 않았다. 한편 烟草마이러스 RNA의 酸基組成을 크로마토그래피法으로 檢定한結果, 4種의 紫外線吸收spot가 나타났으며, 이를 각 spot를 0.1N HCl에 추출시킨 후 算定한 各 酸基의 比는 guanine 25.4, adenine 29.2, cytosine 17.5, uracil 27.9의 비율을 나타냈고(表 1), 이結果는 OM-RNA의 酸基組成(G 24.8, A 29.7, C 19.4, U 26.1과 약간의 差異를 보았다. *In vitro*에서 Tw 333-RNA의 高次構造的 特性을 檢定하기 위한 濃色効果는 80°C에서 最大吸收와 함께 25.1%의 効果를 나타냈으며, 이때 T_m 値는 47°C였다(그림 3). 이에 대해서 OM-RNA의 경우 濃色効果는 Tw333-RNA와 같았으나, T_m 値는 50°C로 差異를 보였다.

弱毒 TMV, Tw 333 外被 단백질의 特性. Cold ace

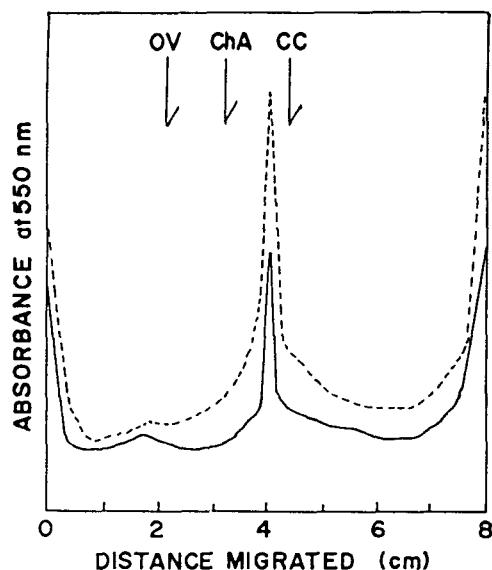


Fig. 5. Absorbance scanning patterns of the proteins of mild mutant, Tw 333 (—) and wild type (···) of OM strains of tobacco mosaic virus after polyacrylamide gel electrophoresis at 8 mA per gel for 4 hr. Marker proteins used are: ovalbumin(OV)(MW 45,000), chymotrypsinogen A (Ch A)(MW 25,000) and cytochrome c (CC)(MW 13,500)

Table 1. Molar base composition of the RNAs of mild mutant, Tw 333 and wild type of OM strains of tobacco mosaic virus

Strain	Base ^a			
	Guanine	Adenine	Cytosine	Uracil
Tw 333	25.4	29.2	17.5	27.9
OM	24.8	29.7	19.4	26.1

^a Each value given is the average of four replications.

tic acid 處理方法에 의해 純化바이러스로부터 精製한 Tw 333 단백질은 278 nm에서 最高, 243 nm에서 最低를 나타내는 紫外線吸收曲線을 보였다(그림 4). 이때 OD 280/OD 260의 比는 1.46을 나타냈으며 288 nm부근에서 약간의 shoulder를 보여 tryptophan의 存在를 암시하였다. 이와 같은 結果는 RNA의 紫外線吸收 패턴에서와 마찬가지로 TMV-OM 단백질의 吸收曲線과 基本的인 差 이외에는 완전히 일치하는 結果를 보였다. 이들 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 電氣泳動한 후 염색하였을

Table 2. Amino acid composition of the proteins of mild mutant, Tw 333 and wild type of OM strains of tobacco mosaic virus

Amino acid	Tw 333		OM	
	Recovered amino acid (μ mol/mg) ^a	Relative molar ratio ^b	Recovered amino acid (μ mol/mg) ^a	Relative molar ratio ^b
Aspartic acid	0.461	18	0.485	19
Threonine	0.369	15	0.369	15
Serine	0.391	16	0.379	15
Glutamic acid	0.402	16	0.393	16
Proline	0.200	8	0.232	9
Glycine	0.169	7	0.162	6
Alanine	0.355	14	0.343	14
Cysteine	0.025	1	0.025	1
Valine	0.369	15	0.364	15
Isoleucine	0.196	8	0.190	8
Leucine	0.311	12	0.302	12
Tyrosine	0.102	4	0.110	4
Phenylalanine	0.210	8	0.196	8
Lysine	0.051	2	0.057	2
Arginine	0.284	11	0.281	11
Tryptophan ^c	-	3	-	3
Total		158		158

^a Average of two measurements of 24 hr hydrolysates.

^b Based on cysteine as 1.

^c Tryptophan was determined spectrophotometrically as described by Edelhoch(1967).

때 meniscus에서 4.1 cm 부근에 1種의 band를 나타냈으며(그림 5), marker 단백질과 함께泳動한 후 計算한 分子量은 약 17,500 dalton이었다. 한편, 烟毒TMV, Tw 333 단백질의 아미노산組成은 OM단백질과 마찬가지로 158個의 아미노산殘基數를 나타났으나(표 2), Asp, Ser, Pro 및 Gly의 残基數에서 OM단백질과 差異는 보았다. 이들 아미노산組成의結果로부터 計算된 각 바이러스의 단백질分子量은

Tw 333이 17,433, OM이 17,501 dalton을 나타냈다. Trypsin으로 分解시킨 각 바이러스단백질을 電氣泳動 및 크로마토그래피法으로 전개시킨 후 ninhydrin-positive peptide를 調定한 結果, Tw 333 단백질 및 OM단백질 모두 각각 9個의 spot를 나타냈으며(그림 6), 이들 peptide 중 1~2개에서 移動거리 및 量的인 差을 보았을 뿐, 두 系統間에 特徵的인 差異는 나타나지 않았다.

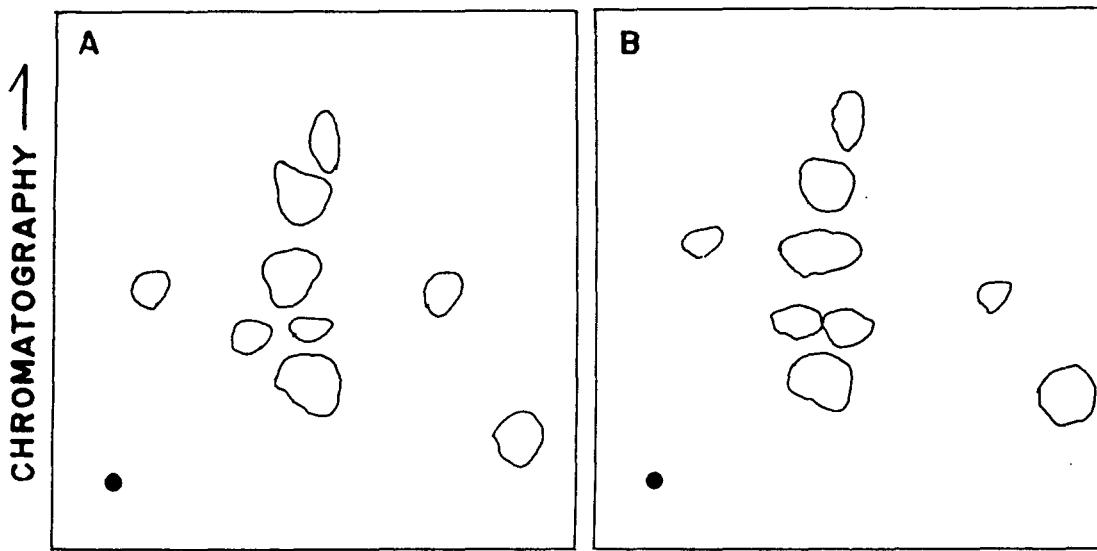


Fig. 6. Tryptic peptide maps of the proteins of mild mutant, Tw333 (A) and wild type (B) of OM strains of tobacco mosaic virus. The major ninhydrin-positive spots are inked with a solid line. The origins are denoted by ●.

考 察

高温處理에 의해 시 TMV 보통재로부터 誘起시킨 弱毒TMV, Tw333系統의 RNA 및 外被단백질에 대해서 生化學的 特性을 分析한 結果, 全般的으로 原株OM系統과 類似한 性質을 나타냈다. 이와같은 結果는 이들 바이러스粒子의 理化學的 性質에 있어서의 類似性(7)과 일치하고 있다. 그러나 RNA의 酸基組成 및 hyperchromicity, 外被단백질에 있어서의 아미노산組成 및 peptide map 分析 등에서 나타난 原株와의 差異點은 弱毒TMV, Tw333系統의 特性을 規定지을 수 있는 기초자료가 된 것으로 생각된다.

Jockusch(13)는 TMV의 Vulgare 系統으로부터 誘起시킨 Ni 118 및 Ni 2519 系統 등 소위 温度感受性變異株(ts mutant)에 대한 아미노산 換置樣式을 報告하고, 바이러스外被단백질에서 Pro→Leu, Pro→Ser, Asp→Gly, Asp→Val, Tyr→Cys 등 系統에 따른 몇몇 아미노산의 變化特性과 아울라 Pro은 단백질의 温度抵抗性유지능력, Asp-Pro結合은 peptide鎖의 安定화기능이 있다는 것을 推定하였다. 또한 Lebeurier와 Hirth(14)도 TMV를 高温處理하

이, 高温에서 低温으로 옮겼을 때 增殖속도가 늦미약한 痘微을 發現하는 温度親和性變異株(thermophilic strain)인 LB系統을 分離하고, 이 바이러스의 아미노산組成에 變化가 있음을 報告하였다. 이 같은 結果들로부터 推定해 볼 때, 弱毒TMV, Tw333系統의 아미노산組成 및 peptide map 分析에 나타난 原株와의 差異 등은 高温處理에 의해서 成된 바이러스外被단백질의 變化一例를 들면 Prc Ser, Asp→Gly(표 2)로 생각할 수 있고, 이와 관련해서 Tw333-RNA의 變化, 즉 酸基組成 및 hyperchromicity의 分析에서 나타난 原株와의 差異를 관찰할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 이 한 假定에서 Tw333系統단백질의 아미노산 중 P→Ser 및 Asp→Gly의 變化가 생겼다면 TMV의 信 code로부터 CCX→UCX 및 GAX→GGX의 酸基置換을 推定할 수 있다.

한편 外被단백질의 아미노산置換이 바이러스의 原性에 영향을 주어 免疫學的 性質의 變化가 일어날 가능성도 있으나 실제로 TMV의 아미노산 중個이 残基에서만이 抗原性과 관련이 있다는 報告가 있어, Tw333의 免疫學的 特性이 OM과 差異나타내지 않는 점(7)은 바이러스의 弱毒化와 抗性의 變化와는 일치하지 않는 것으로 판단된다.

熱處理에서 얻어진 Tw 333-RNA의 hyperchromicity 25.1%의 結果는 Doty 등(8)의 假說에 따라 約 50%의 鹽基가 *in vitro*에서 鹽基對(base pairing)를 形成하고 있는 것으로 推定되며, 이러한 結果는 TMV의 다른 系統(2)들과도 差를 나타내지 않고 있어 이 바이러스 RNA의 構造的 特異性은 없는 것으로 생각된다.

최근, TMV의 全鹽基配列이 결정되면서(11, 17) *in vivo*에서 TMV-RNA가 code 할 수 있는 外被 단백질이외의 3種의 단백질(180K, 130K 및 30K 단백질)이 同定, 報告되었고(18), 이를 단백질 중 130K 단백질의 아미노산殘基 3個의 變化와 이에 따른 鹽基置換이 TMV-T系統의 病毒바이러스인 L₁₁A가 病毒化된 原因이라는 것을 示唆하였다. 따라서 Tw333系統의 遺傳的 安定性을 밝히고 그 利用性을 높히기 위해서는 Tw333의 subgenomic mRNA의 機能 및 여기에서 合成되는 特異的 단백질의 分析도 檢討되어야 한 것으로 생각된다.

以上을 종합해 볼 때 高溫處理에 의해서 誘起된 病毒TMV, Tw 333에 대한 RNA 및 外被 단백질의 生化學的 性質分析은 일부性質에서 그 特性을 명확히 规定할 수 있는 자료가 되었고, 금후 이 系統의 實用化方案이 檢討된다면, 活用性이 를 것으로 기대된다.

參 考 文 獻

- BISHOP, D. H. L., CLAYBORCK, J. R. & SPIEGELMAN, S. (1967). Electrophoretic separation of viral nucleic acid on polyacrylamide gel. *J. Mol. Biol.* 26:373-387.
- BOEDTKER, H. (1960). Configurational properties of tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.* 2:171-188.
- BRAKKE, M. K. (1960). Density-gradient centrifugation and its application to plant viruses. *Advan. virus Res.* 7:193-224.
- BRAKKE, M. K. & VAN PELT, N. (1969). Nucleic acid from wheat streak mosaic virus. *Phytopathology* 59:1019.
- BRAKKE, M. K. & VAN PELT, N. (1970). Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic virus. *Virology* 42: 699-706.
- CHOI, J. K. & WAKIMOTO, S. (1979). Characterization of the protein components of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc., Japan* 45: 32-39.
- 崔章京·孫經玉(1985). 病毒 담배모자이크 바이러스. I. 病毒바이러스의 誘起 및 特性. *한식병치* 1: 3-11.
- DOTY, P., BOEDTKER, H., FRESCO, R. J., HAESELKORN, R. & LITT, M. (1959). Secondary structure in ribonucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45: 482-499.
- EDELHOCH, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6: 1948-1954.
- FRAENKEL-CONRAT, H. (1957). Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. *Virology* 4: 1-4.
- GEOLET, P., LOMONOSOFF, G. P., BUTLER, P. J. G., AKAM, M. E., GAIT, M. J. & KARN, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5818-5822.
- GOODING, G. V. & HEBERT, T. T. (1967). A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* 57: 1285.
- JOCKUSCH, H. (1968). Two mutants of tobacco mosaic virus temperature sensitive in two different functions. *Virology* 35: 94-101.
- LEBEURIER, G. & HIRTH, L. (1966). Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 29: 385-395.
- MARKHAM, R. & SMITH, J. D. (1951). Chromatographic studies of nucleic acids (4). *Biochem. J.* 49: 401-406.
- MATTHEWS, R. E. F. (1981). Economic importance and control. In *Plant Virology*, Ed. by R. E. F. Matthews, pp. 637-675. Academic Press, New York.
- OHNO, T., AOYAGI, M., YAMANASHI, Y., SAITO, H., IKAWA, S., MESHI, T. & OKADA,

- Y. (1984). Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem.* 96: 1915-1923.
18. 大野哮司・岡田吉美.(1985). タバコモザイクウイルス－遺傳子構造と植物バイオテノロジーへの應用. *化學と生物* 23 : 564-571.
19. WEBER, K. & OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.