

Fungal Virus의 Transcription기작

이 세 원

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

Fungal Virus에 대한 연구는 60년대말 double-stranded RNA(dsRNA)가 interferon의 생성을 촉진시킨다는 보고가 나온 이후 dsRNA를 많이 얻을 수 있는 재료로써 이 virus에 대한 연구가 본격적으로 진행되었다. 현재까지 60여종 이상의 genus와 200가지 이상의 species에서 virus의 존재가 분리 또는 확인되어 있다.

Fungal virus는 다른 virus와는 특이한 성질이 있는데 이들은 infection cycle이 없다는 것과 virus의 존재가 host의 형질의 변화를 유발하지 않는다는 것이다. Infection cycle이 없다는 것은 virus가 한 host에서 다른 host로 감염이 일어나지 않으며 다만 세포분열에 의해 자세포로 전달 될 뿐이다. 이러한 성질 때문에 fungal virus를 virus-like particle (VLP)이라고 부르기도 한다. 또 다른 특징은 virus를 가지고 있는 fungus와 virus-free fungus간에 형질상의 차이가 없다는 것으로 이에 몇 가지 예외가 있는데 이들에 대한 연구가 비교적 활발하게 연구되고 있다. 이들 예외에 속하는 fungal virus들은 그 기능에 따라 세가지 group으로 나눌 수 있다. 첫째는 virus에 의해 protein이 만들어져 다른 virus를 가진 strain이나 virus-free strain의 성장을 저해시키는 현상으로서 *Saccharomyces cerevisiae* virus(Sc V)와 *Ustilago maydis* virus(Um V)의 killer system이 여기에 속한다. 둘째는 virus를 가진 fungus들의 비정상적인 성장을 들 수 있는데 *Agaricus bisporus*의 La France 질병과 *Podospira anserina*의 조기노화 현상을 들 수 있다. 특히 *A. bisporus*의 virus에 의한 질병은 양송이 재배산업에 심각한 피해를 주기도 한다. 셋째는 virus를 가진 fungus가 virus-free fungus보다 식물에 질병을 유발시킬 수 있는 능력이 작아지는 현상(phytopathogenic hypo-virulence)을 들 수 있는데 밤나무의 고갈병을 유발하는 *Endothia parasitica*와 여러 가지 작

물에 고갈병을 유발하는 *Ryzoctonia solani*와 *Helminthosporium victoriae*를 들 수 있다(review : Buck, 1986 : Lemke and Nash, 1974).

여기서는 *Ustilago maydis*의 killer activity를 유발하는 virus에 대한 일반적인 특징과 이 virus의 transcription 과정에 대해 설명하고자 한다.

*Ustilago maydis*의 killer activity는 1968년 J. Puhalla에 의해 처음 발견 되었고 현재까지 세 종류의 killer strain이 발견되었다. 이들 killer strain은 toxin의 특이성과 dsRNA의 분포양상에 따라 P1, P4, P6 strain으로 명명되었다. 각 strain은 한 개 이상의 heavy dsRNA(H ; 3.6-6.2 kb), medium dsRNA(M ; 0.92-1.70 kb) 그리고 light dsRNA(L ; 0.35-0.37 kb)를 가지고 있으며 각각의 dsRNA는 독립적으로 encapsidation 되어 있음이 밝혀졌다(그림 1) (Bozarth *et al.*, 1981). 각 killer strain은 virus를 갖지 않는 strain(P2)의 성장을 억제하며 자신의 toxin에 대해서는 영향을 받지 않는다. 또한 killer strain간에는 상호억제 기능을 갖는 것으로 밝혀졌다(그림 2) (Koltin, 1983). 각 dsRNA들의 기능에 관해서는 몇몇 *in vitro* translation 실험에 의해 H dsRNA는 capsid protein을, M dsRNA는 toxin protein을 coding하는 것으로 알려져 있다. L dsRNA의 기능은 밝혀지지 않았지만 부분적인 염기서열의 결과에 의하면 L dsRNA는 M dsRNA의 3'말단과 동일함이 밝혀졌다(Field *et al.*, 1983). 각 H, M, L dsRNA들의 기능과 관계는 이들 dsRNA의 염기서열이 밝혀진 후에야 설명될 수 있을 것이다.

Yeast의 killer toxin과는 달리 Um V toxin protein의 작용기작이나 분비과정은 연구되어 있지 않지만 M dsRNA에서 만들어진 20 kd preprotoxin이 분비 되면서 17 kd의 완전한 toxin으로 작용한다고 알려지고 있다(Podila *et al.*, 1987). 다른 dsRNA virus와 마찬가지로 fungal virus도 capsid

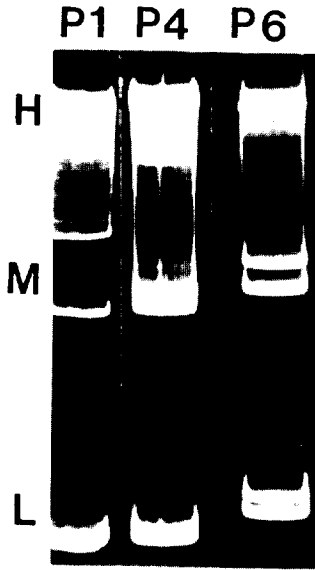


Fig. 1. Double-strand RNA patterns of UmV killer strain in 5% polyacrylamide gel.

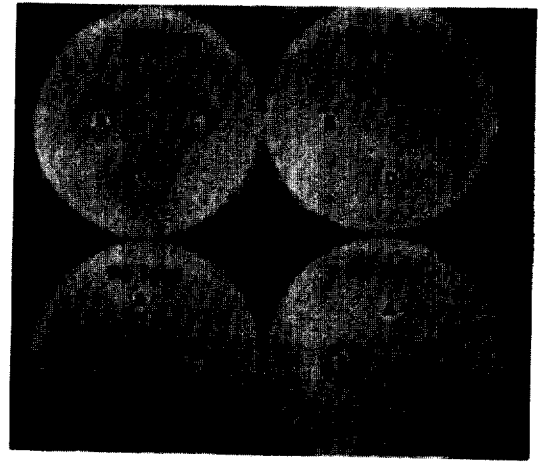


Fig. 2. Toxin activity of *Ustilago maydis*.

- A : Culture supernatant of P2 strain
- B : Culture supernatant of P1 strain
- C : Culture supernatant of P4 strain
- D : Culture supernatant of P6 strain

protein에 RNA-polymerase activity를 가지고 있어서 Mg^{2+} 과 NTP의 존재하에 mRNA를 생성할 수 있다. 이러한 *in vitro* transcription activity는 ScV에서 처음 발견되었고 많은 fungal virus에서 유사한 activity가 확인되었다. 특히 fungal virus는 infectivity가 없기 때문에 replication cycle을 연구하는데 *in vitro* transcription은 중요한 방법 중 하나이다. DsRNA virus와 transcription model은 두 가지로 될 수 있는데 보존적 transcription과 반보존적 transcription이 그것이다. 보존적 transcription에서는 기존의 dsRNA는 영향을 받지 않고 새로운 mRNA가 만들어 지는 것으로서 Reovirus group 전부와 ScV가 여기에 속한다. 이와는 달리 반보존적 transcription은 기존의 dsRNA에서 (+)strand는 새로이 만들어지는 RNA에 의해 치환되면서 치환된 (+)RNA가 mRNA로서 유리되는 것이다. 그러므로 방사성 UTP의 존재하에서 dsRNA와 mRNA가 모두 방사성을 띄게 되는 것이다. 이러한 현상은 *Aspergillus foetidus* virus(Af V)에서 처음 밝혀진 후(Ratti and Buck, 1979) 다른 fungal virus에서도 유사한 증거가 부분적으로 보고되고 있다.

저자 등은 Um V의 RNA-polymerase에 대한 연구를 행하던 중 방사성 UTP가 virus에서 유리되는

ssRNA 뿐만 아니라 dsRNA에서도 발견됨을 확인하고(그림 3) 이 virus의 transcription이 strand-displacement에 의해 일어난다는 사실을 증명하기 위한 실험을 행하였다(Yie *et al.*, 1989).

우선 P1 strain의 RNA-polymerase activity에 대한 최적 조건을 정하고 유리되는 ssRNA와 dsRNA를 CF-11 column chromatography에 의해 혹은 단순히 초원심분리기로 분리하였다. 분리된 RNA들의 RNase에 대한 민감도를 측정하여 ss 혹은 dsRNA를 확인하였고 이들 dsRNA중 M_2 dsRNA를 선택하여 strand-displacement를 밝히는 실험을 행하였다. 이는 M_2 dsRNA가 다른 dsRNA 보다 transcription 되는 정도가 50-200배 크기 때문에 이 연구에 가장 좋은 재료가 될수 있었기 때문이다

^{32}P -UTP의 존재하에서 transcription을 시키면 M_2 dsRNA가 강한 방사성을 띄게 되는데 이를 gel에서 분리한 뒤 strand separation gel에서 확인한 결과 오직 한 strand만이 방사성을 갖는다는 것을 확인하였다(그림 4). 또한 M_2 dsRNA를 strand separation gel에서 분리한 다음 각 strand의 극성을 확인하기 위하여 rabbit reticulocyte lysate를 이용하여 *in vitro* translation 실험을 행하였다(그림 5). 이들의 결과를 종합하면 *in vitro* transcription 반응

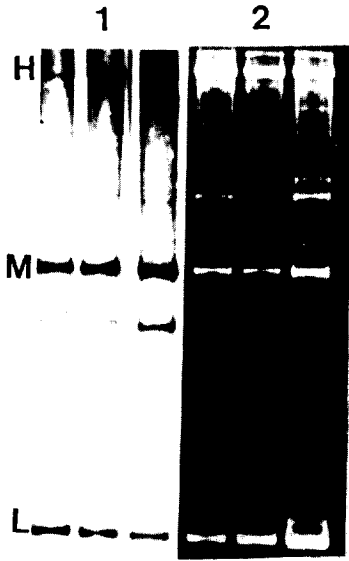


Fig. 3. *In vitro* transcribed RNA products in the presence of ^{32}P -UTP analyzed in 5% polyacrylamid gel.

- 1 : Autoradiograph of labeled dsRNAs
- 2 : Ethidium bromide staining of the same gel

에서 오직(+) strand RNA만이 새로이 합성되며 치환된 (+)RNA가 유리됨을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 설명한 strand displacement model과 일치하므로 Um V P1 strain의 M_2 dsRNA는 반보존적 strand displacement에 의해 mRNA가 만들어진다고 설명될 수 있다. 또한 M_2 dsRNA에 방사성 UTP가 삽입되는 속도가 방사성을 띄는 M_2 dsRNA를 보통의 UTP로 추적했을 때 방사성이 감소하는 속도가 일치하는 것도 확인되었다. 특히 M_2 dsRNA의 방사성의 양의 증가는 일정시간 이후에도 변동이 없음도 확인하였는데 이러한 결과들이 위의 결론을 뒷받침해 줄 수 있었다.

UmV의 다른 dsRNA에 대해서도 같은 실험으로 transcription 기작을 밝혀야 하겠지만 M_2 dsRNA를 제외하면 *in vitro*에서 label되는 정도가 약하여 실험의 어려움이 있으며 특히 H dsRNA 전부와 M1, L dsRNA는 transcription activity도 약하고 그 기능도 정확하게 규명되어 있지 않아 이에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

실험적 방법의 차이는 있지만 같은 기작에 의해

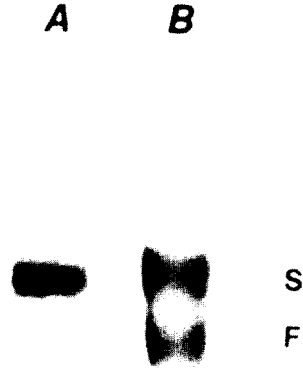


Fig. 4. Strand-separation gel of *in vitro* (A) or *in vivo* (B) labeled M_2 dsRNA.

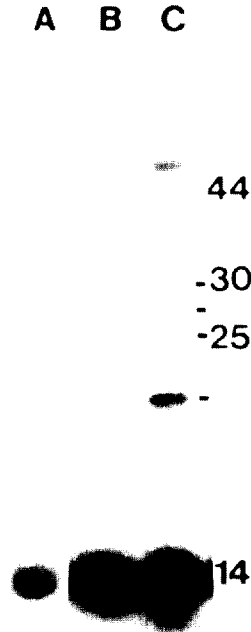


Fig. 5. *In vitro* translation product of fast-moving band (B), slow-moving band (C) and control (A).

transcription 된다고 알려진 fungal virus로써는 *Aspergillus foetidus* virus S(AfV-S), *Penicillium stoloniferum* virus(PsV) *Goeummanomyces graminis* virus(GgV) 등이 있다.

여기서 같은 fungal virus 이지만 density-labeling

실험 등에 의해 밝혀진 결과에 의하면 ScV는 Reovirus group과 마찬가지로 보존적 transcription 기작에 의해 mRNA가 만들어 진다고 보고되어 있다 (Sclafani and Fangman, 1984).

참고문헌

1. Bozarth, R.F., Koltin, Y., Weisman, M.B., Parker, R.L., Dalton, R.E. and Steinlauf, R.(1981) The molecular weight and packaging of dsRNA in the mycovirus from *Ustilago maydis* killer strains, *Virology* **113** : 492-502.
2. Buck, K.W.(1986) Fungal virology : on overview In : K.W. Buck(Ed), Fungal Virology, pp. 1-84. CRC Press Inc. U.S.A.
3. Field, L.J., Bruenn, J.A., Chang, J.H., Pinhasi, O. and Koltin, Y.(1983) Two *Ustilago maydis* viral dsRNAs of different size code for the same product. *Nucleic Acid Res.* **11** : 2765-2778.
4. Koltin, Y.(1983) Exclusion mechanism among the *Ustilago maydis* dsRNA virus. In : R.W. Compton and D.H.L. Bishop(Ed.) Double-stranded RNA viruses pp.495-501. Elsevier/North-Holland, Netherlands.
5. Lamke, P.A. and Nash, C.H.(1974) Fungal viruses. *Bacteriol Rev.* **38** : 29-56.
6. Podila, G.K., Bozarth, R.F. and Flurkey, W.H. (1987) Synthesis and processing of killer toxin from *Ustilago maydis* virus P4. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **149** : 391-397.
7. Ratti, G. and Buck, K.W. (1979). Transcription of double-stranded RNA in virions of *Aspergillus foetidus* virus S. *J. Gen. Virol.* **42** : 59-72.
8. Sclafani, R.A. and Fangman, W.L.(1984) Conservative replication of double-stranded RNA in *Saccharomyces cerevisiae* by displacement of progeny single strands. *Mol. Cell. Biol.* **4** : 1618-1626.
9. Yie, S.W., Podila, G.K. and Bozarth, R.F.(1989) Semiconservative strand-displacement transcription of the M2 dsRNA segment of *Ustilago maydis* virus. *Virus Res.* **12** : 221-238.