

## 감자 바이러스 Y 비전이상 외피단백질 cDNA의 형질전환에 의한 바이러스 저항성 연초품종 개발

이청호\* · 이영기 · 강신웅 · 박성원 · 김상석 · 박은경

한국인삼연초연구원, 원료연구부

(1997년 11월 24일 접수)

## Development of Potato Virus Y Resistant Tobacco Plant by Transformation of the Untranslatable Viral Coat Protein Encoding cDNA

Cheong Ho Lee\*, Yung Gi Lee, Shin Woong Kang, Seong Weon Park,  
Sang Seock Kim and Eun Kyung Park

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

(Received November 24, 1997)

**Abstract :** Viral coat protein (CP) encoding cDNA with artificial start and stop codons was synthesized by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) from the Korean isolate of potato virus Y-vein necrosis strain (PVY-VN). To make PVY CP cDNA to untranslatable form, three stop codons were inserted near the start codon by "megaprimer-PCR" method. The untranslatable CP cDNA was subcloned to plant expression vector and transferred to *N. tabacum* cv. NC82 by *Agrobacterium*-mediated transformation. Highly resistant plants to PVY infection were screened, based on symptom development after mechanical virus inoculation. By genomic PCR and Southern blot analysis, one or more copies of the untranslatable CP gene were found in all transformants. From northern blot analysis, highly resistant transgenic lines had very low level of CP transcript but susceptible lines had high level, suggesting resistance to PVY infection should be related to RNA-mediated mechanism.

**Key words :** Untranslatable coat protein cDNA, PVY-VN resistant tobacco

감자바이러스 Y (PVY)는 poty 바이러스 그룹에 속하는 약 9.7 kb의 single-stranded positive sense RNA 바이러스이며 (Hiebert 등, 1988), 담배 식물 체로의 감염은 직접적인 상처를 통해서나 진딧물에 의해 매개된다. 국내 담배 경작지에서 이 바이러스에 대한 피해는 매우 심각하여, 1991년부터 5년 동안 실시한 역학 조사에서 burley 담배의 3.3%

가 이 바이러스에 감염되었음이 확인되었고 (김 등, 1996), 최근 들어 황색종의 PVY에 대한 감염율이 큰 폭으로 증가 추세에 있어 심각한 경제적 손실을 야기하고 있는 실정이다.

유전공학 기법에 의해 바이러스에 저항성을 갖는 형질전환 식물체가 개발된 이래 (Powell 등, 1986), "pathogen-mediated protection" 방법은 여러 작물

\* 연락처자 : 305-345, 대전광역시 유성구 신성동 302 한국인삼연초연구원 원료연구부

\* Corresponding author : Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, 302 Shinsong-Dong, Yuseong-Ku  
Taejon 305-345, Korea

에 바이러스 병에 대한 저항성을 갖게 하는데 많이 사용되었다 (Tumer 등, 1987; Loesch-Fries 등, 1987; Van Dun 등, 1987; Cuzzo 등, 1988). 그러나 도입된 바이러스 유전자에 의하여 transcomplementation, transencapsidation 및 recombination이 식물체내에서 발생할 수 있다는 것이 심각한 문제로 제기되고 있으며, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 비전이성 RNA를 이용한 식물체의 형질전환을 유도하고 있다. 이 경우 단백질이 발현이 되지 않을 뿐만 아니라 recombination등에 의한 새로운 바이러스의 창출의 기회도 배제될 수 있다는 것이 큰 장점으로 받아들여지고 있다 (Smith 등, 1994).

Poty 바이러스 그룹에 대한 저항성 기작은 전사된 RNA의 분해로 나타나는 RNA 매개 저항성으로 이해되고 있다. 즉 바이러스 저항성으로 나타나는 형질전환체는 매우 높은 외래 유전자의 전사체를 만들지만, 이병성인 형질전환체에 비하여 상대적으로 매우 적은 양의 전사체가 세포내 축적된다는 것이 알려졌다 (Smith 등, 1994; Goodwin 등, 1996).

본 연구는 국내에서 분리된 PVY 계통에 대한 저항성을 지니는 황색종 담배 품종을 개발하기 위해 site-directed mutagenesis에 의하여 비전이성 PVY 외피단백질 cDNA를 만들고, *Nicotiana tabacum* cv. NC82로 형질전환하여, 고도저항성의 형질전환 연초 식물체의 재분화 및 분자생물학적 특성을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스 total RNA 분리 및 외피단백질 cDNA의 합성

PVY-VN 계통은 국내 담배에서 분리된 것을 공시 바이러스로 사용하였다 (박 등, 1984). 순화된 바이러스로부터 guanidium isothiocyanate 추출법 (Chomcynski 등, 1987)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 약 100  $\mu$ g의 순화된 바이러스 100  $\mu$ l에 동일 부피의 acid phenol을 첨가하고 잘 섞은 후 다시 동일 부피의 24:1 chloroform/isoamyl alcohol을 첨가하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이 시료를 4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 동일 부피의 isopropyl alcohol로 침전시킨 후 80% ethyl alcohol로 다시

부유시키고 이를 원심분리하여 상층액을 제거하여 시료를 말린 다음 약 5 $\mu$ g의 바이러스 RNA를 50 $\mu$ l의 0.1% diethylpyrocarbonate로 처리된 증류수에 녹였다. 이 바이러스의 total RNA에 대한 상보적인 가닥의 합성은 cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다. 1 $\mu$ g의 total RNA에 4 $\mu$ l의 buffer를 첨가하고 25 unit의 RNase inhibitor, 각각 10 nM의 dNTP mixture, 5 pM의 PCP 2primer(5'-GCA-GGA-TCC-GTC-CGG-AGA-GAC-ACT-ACA-TCA-3') 그리고 20 unit의 AMV reverse transcriptase를 첨가하여 전체 부피가 20  $\mu$ l가 되게 한 후 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 이 반응액에 10X Taq. buffer 10 $\mu$ l, 100  $\mu$ M의 dNTP, 2 unit의 Taq. polymerase, PCP1 primer(5'-GCA-GGA-TCC-GAC-AAT-GGG-AAA-TGA-CAC-AAT-CGA-TGC-A-3') 그리고 PCP2 primer 10 pM씩을 첨가한 후 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 이때 35 cycle의 PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초였다.

### 외피단백질 cDNA의 site specific mutagenesis

정상 외피단백질 cDNA의 비전이성으로의 전환은 megaprimer PCR법에 의하여 이루어졌다 (Sarkar 등, 1990). 외피단백질 cDNA의 증폭에 사용되었던 PCP1 primer와 인위적으로 3개의 termination codon이 삽입되어져 있는 PCPm primer (5'-ATC-TTA-CTT-AGT-GCT-TCA-TCA-3')를 이용하여 PCR 반응에 의해 megaprimer를 증폭, 분리한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation 시킨 후 약 10 pM의 megaprimer를 PCP2 primer와 함께 2차 PCR 반응을 하였다.

### 외피단백질 cDNA의 클로닝 및 염기서열 분석

증폭된 외피단백질 cDNA를 glass powder를 이용하여 순화한 다음, 제한효소 *Bam*III으로 처리하여 재차 순화하였다. 순화된 외피단백질 cDNA는 재조합 벡터 pBluescriptII SK-의 *Bam*HI 위치에 T<sub>4</sub> DNA ligase를 이용하여 재조합하였고 (Sambrook 등, 1989), T7 sequencing kit (Pharmacia, U.S.A)를 이용하여 dideoxy chain termination법에 의해 염기

서열 분석을 하였다. 또한 *Bam*HI로 처리된 비전이성 외피단백질 cDNA를 식물발현벡터 pPEV-6 (Lindbo 등, 1992)의 *Bam*HI 위치에 재조합하였다.

**담배의 형질전환 및 저항성 조사**

식물발현벡터에 재조합된 비전이성 외피단백질 cDNA를 freeze-thaw 법에 의하여 *Agrobacterium tumefaciens* A136으로 형질전환을 하였으며 (Holsters 등, 1978), leaf-disc transformation법에 의해 *N. tabacum* cv. NC82를 형질전환 시켰다. 재분화된 형질전환체는 100 mg L<sup>-1</sup>의 kanamycin과 300 mg L<sup>-1</sup>의 cefotaxime이 포함된 MS 배지에서 선별하였다. 형질전환체가 4-6 잎의 상태로 성장했을 때 PVY-VN에 감염된 이병엽으로부터 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)에서 1:6 (w/v)으로 추출한 바이러스 용액을 멸균된 면봉을 이용하여 담배 잎에 접종하였으며, 접종 후 4주 이상까지 병징의 발현여부에 따라 저항성 식물체를 선별하였다. 형질전환체로부터 genomic DNA는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, U.S.A)를 이용하여 분리하였으며, PCR은 PCP1 primer와 PCP2 primer를 가지고 수행하였다. 형질전환체로부터의 genomic Southern blot hybridization과 northern blot hybridization은 “Gene Image CDP Star” nucleic acid labelling and detection kit (Amersham, U.S.A)를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**PVY CP cDNA의 재조합**

바이러스의 total RNA를 순수분리 하였으며, 이로부터 역전사핵산중합반응 (RT-PCR)에 의하여 847 bp의 PVY-VN CP cDNA를 증폭하였고 이에 대한 결과는 Fig. 1A에 나타내었다. 이 바이러스의 유전자는 pre-protein으로 발현한 후 post-translational cleavage에 의하여 각각의 단백질로 나뉘어지므로 외피단백질에 해당하는 유전자가 start codon을 갖고 있지 않다. 따라서 RT-PCR 과정에서 인위적인 start codon (ATG)을 삽입하였다. 증폭된 cDNA 단편은 pBluescriptII SK<sup>-</sup> 벡터로 재조합되었으며 *LacZ* promoter에 대하여 정방향인 클

론을 p2502로 명명하였다. Fig. 1B는 p2502의 제한효소 *Bam*HI 처리 후 전기영동 결과를 보여주는 것으로 841 bp의 PVY-VN CP cDNA의 *Bam*HI 절편이 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.

**PVY CP cDNA의 site directed mutagenesis**

Fig. 1C는 PCPm과 PCP1 primer에 의해 증폭된 58 bp의 megaprimer 단편을 보여 주고 있다. megaprimer와 PCP2 primer를 이용하여 정상적인 외피단백질 유전자의 PCR 결과와 동일한 크기의 (847 bp) 비전이성 PVY CP cDNA의 단편이 증폭되었으며 (Fig. 1D), 이 단편이 재조합 되어진 클론을 p2505라 명명하였다(Fig. 1E). Fig. 2는 p2502와 p2505 클론의 PVY CP cDNA에 대한 DNA 염

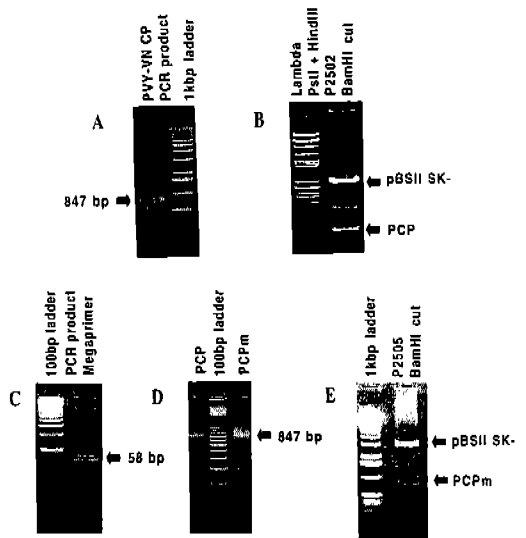


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic band patterns of (A) 847bp PCR product of PVY-VN CP encoding fragment which have artificial start and stop codons; (B) restriction enzyme (*Bam*HI) digestion pattern of p2502 (PVY-VN CP gene fragment) was subcloned to pBSII SK-; (C) 58bp of first round PCR product (megaprimer) for site-directed mutagenesis; (D) untranslatable PVY-VN CP gene fragment by second round PCR; (E) restriction enzyme (*Bam*HI) digestion pattern of p2505 (site-directed mutated PVY-VN CP gene fragment) was subcloned to pBSII SK-). PCP-PVY CP cDNA; PCPm-untranslatable PVY CP cDNA.

기서열 분석 결과로 mutagenesis가 일어난 p2505의 경우 외피단백질 염기서열 상에서 start codon으로부터 +25 위치의 G가 T로, +28 위치의 G가 T로 그리고 +40 위치의 A가 T로 각각 치환되어 결과적으로 start codon에 인접하여 3개의 인위적인 termination codon (TGA, TGA, TAA)이 만들어졌다. 그러나 +46 위치의 G가 T로 변형된 것은 PCR 반응중에 일어나는 Taq polymerase의 error에 의한 것으로 사료된다.

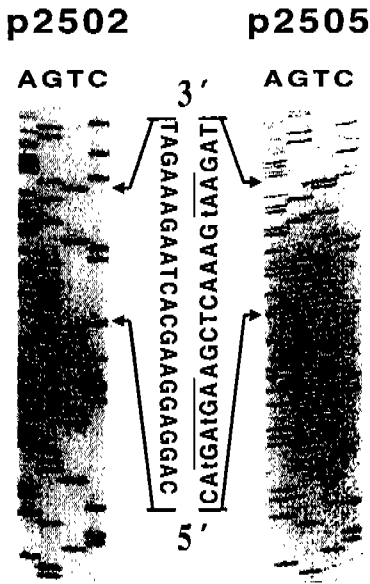


Fig. 2. Comparison of sequences between PVY-VN CP cDNA (p2502) and site-directed mutated PVY-VN CP cDNA (p2505). Arrows indicate converted nucleotide sequences.

**비전이성 외피단백질의 재조합 및 연초로의 형질 전환**

p2505로부터 비전이성 외피단백질 cDNA의 *Bam*HI 절편을 분리한 후 Cauliflower mosaic virus (CaMV)로부터 유래된 regulatory sequence에 인접하여 재조합 하였으며, 선별된 클론 중 promoter에 대하여 정방향인 클론을 p2507이라 명명하였다. p2507은 CaMV의 35S promoter sequence 중 -343에서 +9까지의 부위를 포함하고 있으며, 35S CaMV mRNA의 5' untranslated region (5'UTR)과 3' untranslated

region (3'UTR)을 포함하고 있다 (Fig. 3A). 이 발현벡터를 *Agrobacterium*을 매개로 하여 연초 (*N. tabacum* cv. NC82)에 형질전환한 후 조직배양을 통하여 각각의 독립된 형질전환체를 얻을 수 있었다. 총 10주의 형질전환체가 (25071-250710) 정상 NC82와 동일한 성상을 보여주었으며 형태적으로도 차이점을 발견 할 수 없었다.

**형질전환체의 바이러스 저항성 조사 및 유전자 분석**

형질전환 되지 않은 정상 NC82에 PVY를 접종한 후 4주 후에 병징을 관찰한 결과 veinal necrosis와 leaf chlorosis symptom을 보여주었고 성장이 저해되고 있음을 알 수 있었으며, 이러한 병징은 개화기까지 모든 잎과 줄기에서 보여주었다. 그러나, 선별된 10주의 형질전환체 중 8주(25071, 25072, 25073, 25074, 25076, 25078, 25079, 250710)가 바이러스 접종 4주 후까지 정상적인 성장은 물론이고 어떠한 병징도 나타나지 않았으며 (Fig. 3B), 이러한 PVY-VN에 대한 고도의 저항성은 종자 채취 단계까지 유지되었다. 병징이 뒤늦게 나타나는 지연형 저항성 형질전환체는 없었으며, 2주의 이병성

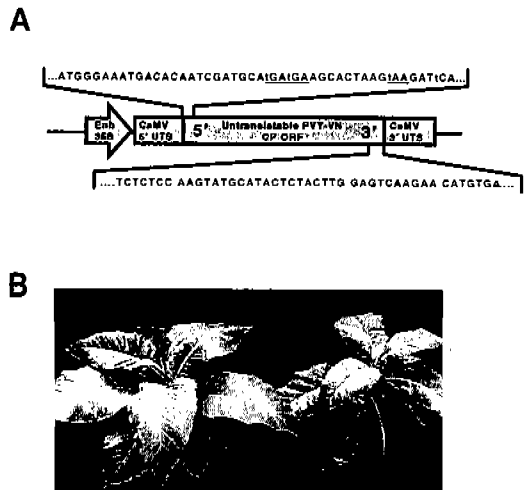


Fig. 3. Plant expression cassette (A) and symptom severity of non-transgenic (Right) and transgenic (Left) tobacco (*N. tabacum* cv. NC82) (B). Photos were taken 4 weeks after mechanical inoculation with PVY-VN.

형질전환체 (25075, 25077)는 바이러스 접종 4주후에 감염된 NC82의 병징과 형태적으로 동일하였다. Genomic PCR과 Southern blot hybridization 결과 본 실험에서 선별된 10주의 형질전환체 모두 847bp의 PVY-VN CP cDNA 절편을 포함하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 또한 형질전환체에 PVY-VN CP cDNA가 존재한다는 것은 분리된 genomic

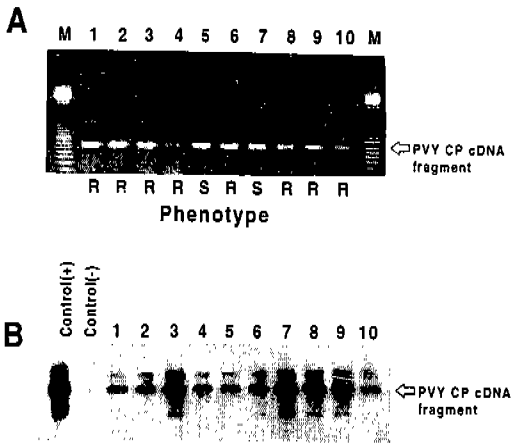


Fig. 4. Electrophoretic band pattern of PCR with genomic DNA of tobacco plants (A) and Southern blot analysis of genomic-PCR products(B). PCR were performed to the PVY CP gene. Control(+); p2507 (PCPm fragment inserted plant expression vector, which contains NPTII and disarmed Ti border sequences), control(-); PCR product from normal tobacco plant, lane 1-10; PCR products of transgenic plants, Plants are noted as resistant (R) or susceptible (S) to PVY-VN infection.

DNA로부터 *Bam*HI를 처리한 후 Southern blot hybridization을 한 결과에서도 알 수 있었다 (Fig. 5A). 선별된 형질전환체에서 도입된 유전자의 copy number는 *Sall* 처리된 genomic DNA의 Southern blot hybridization 결과에서 1개에서 3개까지 도입된 것으로 나타났으나 (Fig 5B), 저항성 형질전환체에 도입된 유전자의 copy number와 이병성 형질전환체에 도입된 유전자의 copy number에서는 유의한 차이점이 발견되지 못하였다. 이는 식물체의 경우, 저항성의 유도가 dosage-dependent하게 도입

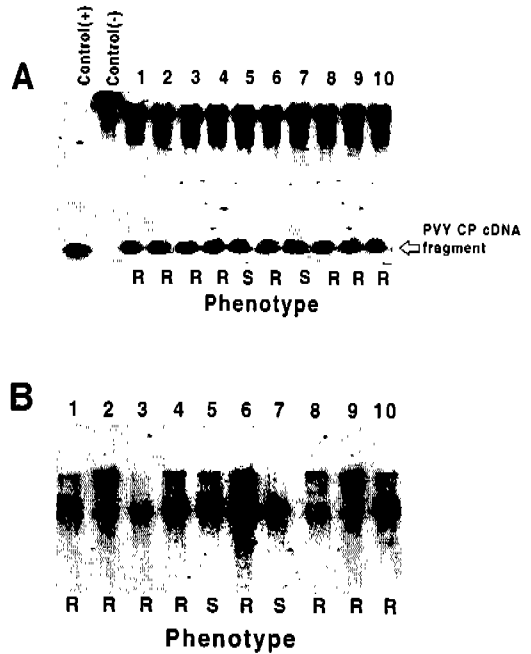


Fig. 5. Southern blot analysis of genomic DNA of transgenic tobacco plants. *Bam*HI (A) and *Sall* (B) digested individual line of genomic DNA were hybridized with PVY-VN CP cDNA probe. Control (+); PCR product of PVY-VN CP cDNA, control (-); normal tobacco plant, lane 1-10; transgenic plants, which were noted as resistant (R) or susceptible (S) to PVY-VN infection.

유전자의 copy number에 영향을 받는다는 보고 (Goodwin 등, 1996)와는 일치하지 않았다. Northern blot hybridization 결과, 이병성인 형질전환체는 매우 높은 전사체의 축적을 보여주고 있으나, 고도저항성의 경우 매우 낮은 전사체의 축적을 보여주었다 (Fig. 6). 이 결과는 Smith 등(1994)이 보고한바 있는 형질전환체의 바이러스에 대한 저항성 기작은 전사후 변형 (post-transcriptional modification)에 의한 외래 유전자의 specific gene degradation에 기인하는 것이라는 결과를 뒷받침하는 것으로 사료된다. 그러므로 PVY-VN에 대한 저항성 기작은 RNA-mediated resistance일 것으로 추측되어지며, 향후 바이러스 접종시기별, 수확시기별 RNA expression 정도에 대한 보다 중점적인 연구가 요구되어진다.

## 참고 문헌

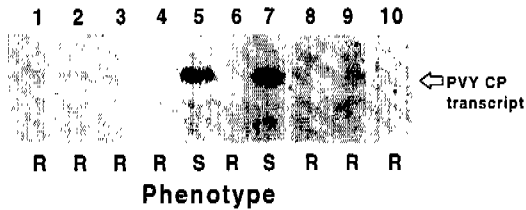


Fig. 6. Northern blot analysis of transgenic plant lines. Total RNA of individual line of transgenic plants were hybridized with PVY-VN CP cDNA probe. Lane 1-10; transgenic plants, which were noted as resistant (R) or susceptible (S) to PVY-VN infection.

## 결론

담배 (*N. tabacum* cv. Br21)로부터 분리된 감자 바이러스 Y-vein necrosis (PVY-VN) 계통을 순화하였으며, 바이러스 total RNA를 분리하였다. 이 바이러스의 외피단백질 (coat protein)에 대한 cDNA를 역전사핵산중합반응 (RT-PCR)에 의해 합성한 후 megaprimer-PCR법에 의하여 비전이성 외피단백질 cDNA로 변형하였으며 이를 식물발현벡터에 재조합하였다. 재조합된 transgene을 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 담배 *N. tabacum* cv. NC82에 형질전환 하여 100 ppm의 kanamycin 배지에서 재분화되는 형질전환체를 선별하였다. PVY-VN 바이러스에 대한 고도의 저항성을 보이는 형질전환체는 기계적인 바이러스 감염 후 병징의 발현 유무에 의하여 선별하였다. Genomic PCR과 Southern blot hybridization의 결과로부터 재분화된 모든 형질전환체에 1개에서 3개의 비전이성 PVY-VN 외피단백질 cDNA가 존재함을 확인하였으며, northern blot hybridization을 수행한 결과 이 병성인 형질전환체인 경우에 매우 높은 전사율을 보여주었으나 고도저항성을 나타내는 개체의 경우 매우 낮은 전사율을 보여주었다. 이러한 결과들로부터 형질전환체의 PVY 바이러스에 대한 저항성은 전사후 변형 (post-transcriptional modification)에 의한 외래 유전자의 gene degradation에 기인하는 것으로 추측되어졌다.

김정화, 손준수, 오명희, 강여규, 오승환 (1996) 연초 병해충 종합관리 체계화 연구. 담배연구보고서 (연초경작 육종 및 환경편), 한국인삼연초연구원 pp. 245-328.

Chomczynski, P., and N. Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156-159.

Cuozzo, M., K. M. O'Connell, W. Kaniewski, R. X. Fang, N. H. Chua, and N. Tumer (1988) Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6 : 549-557.

Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. (1996) Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8 : 95-105.

Hiebert, E., and Dougherty, W. G. (1988) in *The Plant Viruses* (Milne, R. G., ed) Vol. 4, Plenum Press, New York, pp. 159-178.

Holster, M., Waele, D., Depicker A., Messens, E., Van Montagu, M., and Schell, J. (1978) Transfection and transformation of *italica*. *Mol. Gen. Genet.* 163 : 181-187.

Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. (1992) Pathogen-derived resistance to a potyvirus: Immune and resistance phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol Plant-Microbe Interact.* 5 : 144-153.

Loesch-Fries, L. S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahm, K., Jarvis, N., Nelson, S., and Halk, E. (1987) Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.* 6 : 1845-1851.

Park, E. K., Kim, J. J., and Boo, K. S. (1984) Two new PVY strains isolated from tobacco plant in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 23(4) : 209-214.

- Powell, A. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein. *Science* 232 : 738-743.
- Sambrook, F., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarkar, G., and Sommer, S. S. (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques* 8 : 404-407.
- Smith, H. a., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. (1994) Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 6 : 1441-1453.
- Tumer, N. E., O'Connell, K. M., Nelson, R. S., Senders, P. R., Beachy, R. N., Fraley, R. T., and Shan, D. M. (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* 6 : 1181-1188.
- Van Dun, C. M. P., Overduin, B., and Van Vloten-Doting, L. (1987) Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* 159:299-305.