

## 고추냉이에서 분리한 담배 모자이크 바이러스(TMV-W)의 전체 유전자 염기서열 분석

이귀재\*

전북대학교 농과대학 생물자원과학부

## Complete Nucleotide Sequence of Tobacco Mosaic Virus Isolated from Wasabi(*Eutrema wasabi* Maxim.)

Kui-Jae Lee\*

Faculty of Bioresources Science, College of Agriculture, Chonbuk National  
University, Jeonju 561-756, Korea

### ABSTRACT

Genomic RNA sequence of a tobamovirus infecting *Eutrema wasabi* plant(TMV-W) was determined. The RNA is composed 6,298 nucleotide and contains four ORFs encoding the protein of 180KD(ORF1), 130KD(ORF2), 30KD(ORF3) and 18KD(coat protein, ORF4). ORF4, ORF 3, ORF 2 and ORF 1 are overlapped by 130, 20 and 40 nucleotides, and the overlapping region can be folded into a stable hairpin structure. This includes the 3' non-coding region of 238 nucleotides, coat protein gene(537 nucleotides, 179 amino acid), 30KD movement protein gene(825 nucleotides, 275 amino acid), 130KD protein gene(1,896 nucleotides, 632 amino acid) and 180KD protein gene(2,958 nucleotides, 986 amino acid). The genomic RNA sequence was compared with homologous regions of eleven other tobamoviruses. TMV-WTF was similar to TMV-WSF(98.6%) in nucleotide sequence.

**Key words** : nucleotide sequence, nucleotide sequence homology, RNA virus, TMV-W, wasabi.

고추냉이 (*Eutrema wasabi* Maxim.)는 십자화과에 속하는 다년생 초본식물로서 일본이 원산지로 알려져 있다. 주로 근경과 화경이 향신료로 이용되지만, 잎, 뿌리 등 식물 전체가 가공 원료로 사용되고 있다. 고추냉이에 위축병을 발생시키는 바이러스로는 tobacco mosaic virus(TMV, 椽原 등, 1964), cucumber mosaic virus(CMV, 小室 등, 1966), turnip mosaic

virus(TuMV, 椽原 등, 1964), broad bean wilt virus(BBWV, 眞岡 등, 1990)와 wasabi latent virus(岸良 등, 1992) 및 rhabdovirus(岸良 등, 1989)등이 일본에서 보고되었고, alfalfa mosaic virus(Fletcher 등, 1989)가 뉴질랜드에서 보고되고 있다. 이 중에서 TMV는 십자화과, 박과, 가지과 등의 넓은 기주 범위를 가진 바이러스로 많은 식물에 심각한 피해를 일

\*교신저자 : E-mail;kuijael@moak.chonbuk.ac.kr

으키고 있다(Oshima 등, 1974). TMV는 병원성의 차이에 따라서 다수의 계통이 존재하고 각 계통간 뚜렷한 구별이 어려워 TMV방제에 어려움이 따른다. 고추냉이에 TMV가 감염될 경우 생산량과 생장에서 저해요인으로 알려져 있다(小室 등, 1964; 椽原 등, 1966). TMV는 막대모양의 형태로 positive-sense RNA genome를 가지며 약 6,400여개의 염기로 구성된 막대모양의 바이러스이다. 유전자는 4개의 poly protein(open reading frame, ORF)으로 구성되어 있으며 직접적인 유전자 번역에 의한 산물은 130KD와 180KD 단백질뿐이며, 30KD 단백질은 cell-to-cell 이동, 17KD 단백질은 외피단백질(coat protein, CP)로 이루어져 있다(Dorokhov 등, 1994).

Tobamovirus에 속하는 바이러스의 전체 염기서열의 분석은 현재 TMV 유럽계통의 TMV-vulgare(Goelet 등, 1982)와 ToMV-L(Ohno 등, 1984) tobacco mild green mosaic virus(TMGMV, Solis 등, 1990), TMV-Ob(Ikeda 등, 1993) pepper mild mottle virus(PMMV-S, Alonso 등, 1991), cucumber green mottle mosaic virus(CGMMV-SH, Ugaki 등, 1991)와 odontoglossum ringspot virus(ORSV, Ryu와 Park, 1995)가 보고되었다. 또한 평지과 식물에서 cr-TMV, TVCV와 TMV-Cg가 보고되었다.

고추냉이에 발생하는 TMV에 대한 연구로는 일본의 Tochiwara 등(1964)에 의하여 처음 보고되었으며 ribgrass mosaic virus의 기주 범위와 외피단백질의 아미노산 배열이 유사하다고 보고하였다. 그러나 고추냉이에 대한 바이러스 유전자 연구로는 일본의 Shimamoto(1998)등이 고추냉이에서 분리한 TMV 유전자의 CP와 180KD 단백질의 일부인 3'말단의 2,378개의 염기를 분석하여 다른 바이러스간 유전자 비교를 하였으나, 아직 고추냉이에서 TMV를 분리하여 전체 유전자 구조를 밝히지 않아 이 연구에서는 고추냉이에 감염된 TMV를 분리하여 전체 RNA 유전자 염기서열을 결정하고 같은 계통의 바이러스간 유전자 상동성을 비교하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

**공시 바이러스** 바이러스원은 1999년부터 2002년 전라북도 무주 지방에서 재배되고 있는 고추냉이(달마)를 대상으로 바이러스 병증이 뚜렷한 개체를 수집하여 효소결합항체법에 따라 TMV의 감염 여부를 확인하고 *Chenopodium amaranticola*에 5회 재접종하고 단일 spot를 채취하여 고추냉이(달마)의 잎에 재접종 증식하여 이용하였다.

**바이러스 정제 RNA 추출** TMV 정제는 고추냉이에 증식된 잎을 이용 Otsuki 등(1977)의 방법을 수정하여 실시하였다. 바이러스의 RNA 추출은 정제된 바이러스를 SDS-phenol 추출법에 따라 추출하고 저온진공 건조시켜 증류수(RNase free) 50 $\mu$ l에 용해시켜 재료로 사용하였다.

**cDNA 합성과 cloning** cDNA 합성은 Gubler와 Hoffman의 방법(1983)에 기초한 Promega Co.의 cDNA Kit를 이용하였다. 이때 이용된 primer는 random과 oligo(dT) primer, KpnI과 BbrPI 효소 절단 부위를 삽입시킨 K3(5' TTTggTACCACgTgggCCCCTACCCggggTTgA3' ), K5(AACAACAA CATggCACAAATTTCAA)를 이용하였다. 합성된 cDNA는 pT7 Blue 벡터에 cloning하고 재조합된 plasmid는 *E. coli* JM 109 competent cell에 형질전환시켰다. Clone의 선별은 K3와 K5 primer를 이용하여 약 6.5Kb의 insert를 확인 선별하고, 재조합 plasmid는 SDS-alkaline 용해방법으로 추출하여 1.0% agarose 상에서 전기영동하여 재확인하였다. 5' 말단의 염기 구조의 결정은 5'-AmpliFinder RACE kit, subcloning은 pharmacia double-stranded nested deletion kit를 이용 설명서에 준하여 실시하였다.

**DNA 염기서열 결정과 분석** 염기서열 결정은 dideoxynucleotide chain termination 법에 따라 perkin elmer 사의 유전자분석기(ABI377)를 이용하여 결정하였다. 염기서열 자료의 분석은 GENETYX-WIN 프로그램을 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 바이러스의 유전자원은 중국계통의 DDBJ와 GeneBank에 등록되어 있는 AF395128(TMV-017), AF395129(-152), AJ011933(-VF), 러시아 계통 Z29370(-crucifer),

TM0243571(-K1), Z92909(-K2), 영국계통 AX040174(-U1), AX040175(-U2), 한국계통 X68110(-CG, tobacco), L35073(-T, pepper), L35074(-P, pepper), 그리고 아직 보고되지 않은 일본계통으로 TMV-WSF의 유전자를 비교 분석하였다.

### 결과 및 고찰

병징 TMV에 감염된 잎은 건전 잎에 비하여 전체적으로 위축되었다. 또한 모자이크 증상이 나타나며 잎이 두꺼워지고 엽맥의 간격은 좁았다.

새로 성장한 잎은 요철이 생기며 점차 생육이 약해져 퇴락 반문이 형성되면서 위축현상을 일으키는 것이 특징이었다. 鈴木 등(1976)에 의하면 생육이 부진하고 위축과 황화현상을 나타내는 고추냉이는 모두 바이러스에 감염되어 있었다고 하였으며, 小室과 椽原 등(1964)은 TMV에 감염된 잎은 요철이 생기며 생육이 약해진다고 보고하였다. 또 반문 병징의 고추냉이 잎에서 TMV의 바이러스 입자가 관찰된다는 보고도 있다(椽原 등, 1964). 이와 같은 보고들과 본 연구에서 관찰된 병징은 TMV의 전형적인 병징이었다.

바이러스 유전자구조 정제된 바이러스의 RNA로부터 제작된 primer K3와 K5를 가지고 전기영동을 하여본 결과 Fig.1에서 보는 바와 같이 약6,500bp의 부근에 TMV 바이러스 전체 유전자가 증폭되었다. 증폭된 PCR 산물을 이용하여 pT7 blue 벡터에 클로닝하여 pCRT1, 2, 3, 5를 얻어 subcloning하여 염기서열을 결정하였다. 그 결과 바이러스 genomic RNA는 4개의 ORF 유전자를 가지고 있었다. 이러한 결과는 Lartey 등(1995)이 보고한 바이러스의 유전자 구조와 같은 5' 말단부터 180KD, 130KD, 30KD, coat protein과 3' non-coding region(NCR)으로 구성되어 있었다는 결과와 일치하였다. 3' NCR은 238염기, CP는 530염기로 179 아미노산, 30KD 유전자는 825염기 275아미노산, 130KD 유전자는 1,896염기로, 180KD 유전자는 2,958염기로 986아미노산으로 구성되어 총 6,488염기로 구성되었다(Fig.2). 그러나

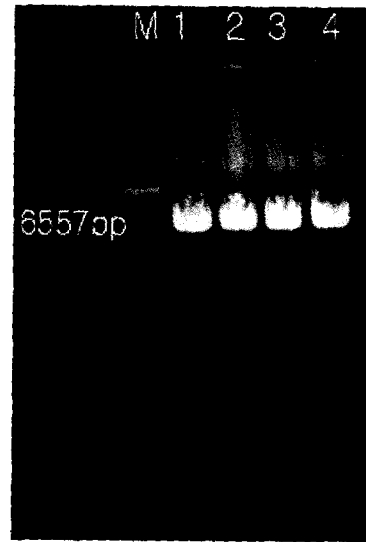


Fig. 1. PCR products from purified TMV-WMJ RNA by using specific primer, K3 and K5. Lane1,2,3,4; PCR products, lane M; DNA marker (DRigest III).

180K 유전자와 130K 유전자 사이 40염기, 130KD 유전자와 30KD 유전자사이 20염기 그리고 30KD 유전자와 CP사이 130염기가 overlapping되어 실제 염기는 총 6,298염기로 구성되어 있었다. TMV-WMJ계통 유전자의 3' NCR의 stop codon은 3' NCR과 CP 사이의 UAA이었으며, 30KD와 CP사이의 stop codon은 UGA와 UAA, 130KD와 30KD는 UAA와 UGA, 180KD과 130KD는 UAA였다. 지금까지 보고된 바이러스의 stop codon은 UAG 또는 UAU의 보고가 (Meshi, 1981; Dorokhov, 1994) 많았으나 이 실험에서는 UAA와 UGA로 바뀌어 있었다. 또한 3' NCR의 말단 유전자는 다른 TMV 보고와 마찬가지로 -CCCA로 구성되어있었다(Fig.2). 바이러스 RNA dependent RNA polymerase의 consensus motif는 642-651염기 사이에 GDD가 존재하였고 tobamovirus의 전형적인 UAAGCUU aminoacylation arm이 존재하였다(Kamer 등, 1984).

유전자 상동성의 비교에서 전체 유전자는 TMV-WSF와 98.6%, TMV-crucifer 계통과 82.4%로 높았고 TMV-K1 계통과는 54.9%로 가장 낮았다. CP는 비교 유전자간 51-100%까지 상동성이 있었으나 TMV-WTF는 미보고된 일본의 TMV-WSF와 96.8%로 가장



Table 1. Sequence identity of coat protein gene(Up) and 30KD gene (down) of TMV

	TMV-O17 <sup>a</sup>	TMV-152	TMV-CG	TMV-C RUIFER	TMV-K1	TMV-K2	TMV-P	TMV-T	TMV-U1	TMV-U2	TMV-VF	TMV-WSF	TMV-WTF
TMV-O17	-	100	98.9	51.6	73.9	74.3	66.1	67.2	98.9	63.9	98.9	53.7	53.6
TMV-152	99.8	-	98.9	51.6	73.9	74.3	66.1	67.2	98.9	63.9	98.9	53.7	53.6
TMV-CG	97.8	97.7	-	51.4	73.7	74.1	65.9	67	100	63.1	100	53.5	53.4
TMV-CRUIFER	52.2	52.2	52.8	-	51.1	50.7	53.7	54.7	51.4	52.9	51.4	86.5	86.3
TMV-K1	72.3	72.2	72.1	51	-	99.1	69	68.9	73.7	67.1	73.7	53.9	54.2
TMV-K2	72.3	72.2	72.2	51	100	-	68.7	68.7	74.1	66.7	74.1	53.4	53.8
TMV-P							-	98.3	65.9	64.1	65.9	54.9	54.6
TMV-T								-	67	65.6	67	55.2	54.9
TMV-U1	98.1	98	98.7	52.4	72.5	72.5			-	63.1	100	53.5	53.4
TMV-U2	60.2	60.1	59.7	51.2	62.3	62.3			60.1	-	63.1	53	52.7
TMV-VF	97.6	97.5	98.5	52.1	71.9	71.9			99	59.8	-	53.5	53.4
TMV-WSF	51.9	51.9	52.6	82.6	52.6	52.6			52.2	50	52.1	-	98.7
TMV-WTF	51.9	51.9	52.2	82.2	53	53			52.3	51.4	52.1	52.1	-

<sup>a</sup> Data from DDBJ and GeneBank.

Table 2. Sequence identity of 180KD gene(up) and 130KD gene(down) of TMV

	TMV-O17 <sup>a</sup>	TMV-152	TMV-CG	TMV-C RUIFER	TMV-K1	TMV-K2	TMV-U1	TMV-U2	TMV-VF	TMV-WSF	TMV-WTF
TMV-O17	-	99.7	97.8	59.1	80.2	80.2	97.8	63.1	97.8	59	60.6
TMV-152	99.8	-	97.9	59.2	80.2	80.2	97.9	63.1	97.9	59.5	60.8
TMV-CG	97.7	97.8	-	59.4	80.5	80.5	99.3	62.9	99	59.3	60.7
TMV-CRUIFER	65.7	65.9	66	-	59.5	59.5	59.4	60.9	59.2	80.1	79.4
TMV-K1	80.4	80.5	80.7	66.4	-	99.7	80.3	64.6	80.2	59.1	60.2
TMV-K2	80.4	80.5	80.7	66.4	100	-	80.3	64.5	80.2	59	60.1
TMV-U1	66.6	66.7	67	67.2	68	68	-	63	99.4	59.6	61.2
TMV-U2	97.9	98.1	99.2	65.9	80.9	80.9	66.6	-	63.1	60.4	60.9
TMV-VF	97.5	97.6	98.8	65.8	80.5	80.5	99.2	66.5	-	59.5	61.1
TMV-WSF	65.6	65.6	65.9	83.2	65.7	65.7	65.9	66.5	65.8	-	96.8
TMV-WTF	65.7	65.8	66.1	82.8	65.7	65.7	66	66.3	66.1	97.9	-

<sup>a</sup> Data from DDBJ and GeneBank.

높았으며 다음으로 러시아의 TMV-crucifer와 86.3%로 높았다. 그러나 다른 계통과는 53% 정도의 상동성을 보여 낮은 편이었다. 30K 유전자의 비교는 TMV-crucifer와 82.2%로 높았으나 다른 계통간에는 51% 정도의 상동을 보여 아주 낮은 상동을 나타내었다(Table 1). 또한 180KD 유전의 비교에서도 CP와 마찬가지로 TMV-WSF와 96.8%로 가장 높았으며 TMV-crucifer와는 79.4%, 나머지 계통과는 60% 정도의 상동성을 보여 주었다. 130KD 유전자는 TMV-

WSF와 97.9%, TMV-crucifer와는 82.8%의 상동성을 보여 주었다(Table 2). 이상의 결과를 종합하여보면 고추냉이에서 분리한 TMV-WTF 계통은 미보고된 일본의 TMV-WSF와 러시아의 TMV-crucifer와 유전자의 상동성이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 유전자의 상동성을 GENETYX-WIN 프로그램의 UPGMA 방법으로 유연 관계를 도식화 한 결과 Fig.3에서 나타난 바와 같이 크게 TMV 바이러스가 TMV-U1, VF, CG, O17, 152 그룹, K1, K2 그룹, P, T

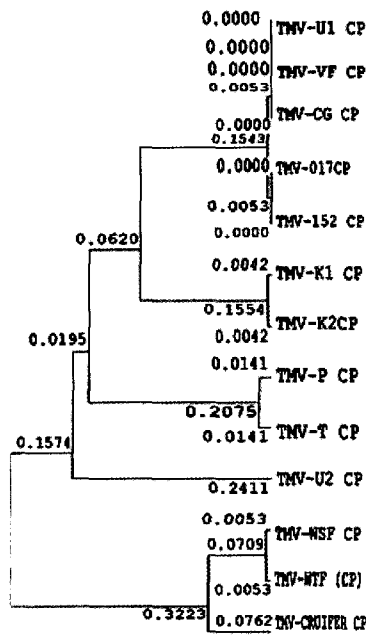


Fig. 3. Dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis based on Jaccard coefficients by using nucleotide of TMV strains.

그룹, U2, 그리고 -WSF, -WTF, -crucifer 5그룹으로 분류 되었으나 상동성에서 보여주었던 것과 마찬가지로 고추냉이에서 분리한 TMV-WTF분리주는 미 보고된 일본의 -WSF와 러시아의 -crucifer 계통과 같은 그룹으로 분류되었다.

### 사사

이 논문은 1999년도 전북대학교의 지원 연구비에 의하여 연구되었음.

### 적요

고추냉이에 모자이크 병징을 나타내는 이병주로 부터 고추냉이 모자이크 바이러스를 분리하였다. 고추냉이 모자이크 바이러스의 genomic RNA를 추출하여 전체 유전자 구조를 결정하였다. 유전자 전체 길이는 6,298 염기를 가지고 있었으며, 4개 ORF로

구성되어 있었다. ORF 1은 180KD 단백질, ORF 2는 130KD 단백질, ORF 3은 30KD 단백질, ORF4는 18KD로 외피단백질로 구성되어 있었다. ORF 유전자간에는 ORF4와 ORF 3 유전자간 130개의 염기, ORF 2와 ORF 3 유전자간 20개 염기 그리고 ORF 1과 ORF2 유전자간에는 40개의 염기로 overlaps되어 있었다. 3'NCR 부분은 238개 염기, 외피단백질은 537개 염기, 30KD 이동단백질은 825개 염기, 130KD 단백질은 1,896개 염기와 180K 단백질의 2,958개의 염기로 구성되어 있었다. TMV-WTF 전체 염기 서열의 유전자 상동성에서는 비교 유전자에서 미 보고된 일본의 TMV-WSF와 러시아의 TMV-crucifer와 각각 98.6%와 82.4%로 매우 높았다.

### 참고문헌

- Alonso E., Garcia-Luque I, de la Cruz A., Wicke B., Avila-Rincon M.J., Serra M.T., Castresana C, Diaz-Ruiz JR. 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *J Gen Virol* 72: 2875-2884.
- Dorokhov Y.L., Lvanov P.A., Novikov V.K., Agranovsky A.A., Morozov S.Y., Efimov V.A., Casper R, Atabekov JG. 1994. Complete nucleotide sequence and genome organization of a tobamovirus infecting Cruciferae plants. *FEBS Letters* 350:5-8.
- Fletcher J. D. 1989. Additional hosts of alfalfa mosaic virus, cucumber mosaic virus, and tobacco mosaic virus in New Zealand. *New Zealand Journal of crop and horticultural science* 17:361- 362.
- Goelet P, Lomonossoff 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*. 79:5818-5822.
- Gubler U. and Hoffman B.J. 1983. A simple and efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.

- Ikeda R., Watanabe E., Watanabe Y., Okada Y. 1993. Nucleotide sequence of tobamovirus Ob which can spread systemically in N gene tobacco. *J Gen Virol* 74:1939-1944.
- Kamer G., Argos P. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent RNA polymerase from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res* 12:7769-7782.
- Lartey R.T., Voss Ty. C., Melcher U. 1995. Completion of a cDNA sequence from a tobamovirus pathogenic to crucifers. *Gene* 166:331-332.
- Meshi T., Ohno T., Iba H., Okada Y. 1981. Nucleotide sequence of a cloned cDNA copy of TMV(cowpea strain) RNA including the assembly origin, the coat protein cistron, and the 3' non-coding region. *Mol Gen Genet* 184:20-25.
- 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.
- Oshima N., Ohashi Y., Umekawa M. 1974. Studies on some strains of tobacco mosaic virus pathogenic to crucifer plants 2. Host range. *Ann. Phytopath Soc Jpn* 40:243-251.
- Otsuki Y., Takebe I., Ohno T., Fukuda M., Okada Y. 1977. Reconstitution of tobacco mosaic virus rods occurs bidirectionally from an internal initiation region: demonstration by electron microscopic serology. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1913-1917.
- Ryu K.H., Park W.M. 1995. The complete nucleotide sequence and genome organization of odontoglossum ring spot tobamovirus RNA. *Arch Virol* 140:1577-1587.
- Shimamoto I. Sonada, S., Vazquez P., Minka N. and Nishiguchi M. 1998. Nucleotide sequence analysis of the 3' terminal region of a wasabi strain of crucifer tobamoviruses genomic RNA: subgrouping of crucifer tobamoviruses. *Arch Virol* 143:1801-1813.
- Solis I., Garcia-Arenal F. 1990. The complete nucleotide sequence of the genomic RNA of the tobamovirus tobacco mild green mosaic virus. *Virology* 177:553-558.
- Tochiwara H., Komuro Y., Kobari Y. 1964. Studied on a virus isolated from Wasabia japonica Proc Kanto Pl Prot Soc 11:46 (in Japanese).
- Ugaki M., Tomiyama M., Kakutani Y., Hidaka S., Kiguchi T., Nagata R., Sato T., Motoyoshi F., Mishiguchi M. 1991. The complete nucleotide of sequence of cucumber green mottle mosaic virus(SH-strain) genomic RNA. *J Gen Virol* 72:1487-1495.
- 椽原比呂志, 小室康雄, 小針辛省. 1964. ワサビから分離されたウイルス. 關東病蟲研報 11:46.
- 鈴木春夫. 1976. ワサビ主要病害の生態と防除. 植物防疫 50:374-378.
- 岸良日出男, 西田浩子, 下村徹, 匠原監一郎, 山下修一, 土崎常男. 1989. ワサビから新た検出されたラフトウイルスおよびひも状ウイルス. 日植病報 56:100.
- 岸良日出男, 須賀睦男, 難波成任, 山下修一, 匠原監一郎, 土崎常男. 1992. ワサビより分離されたワサビ潜在ウイルス. 關東病蟲研報 39: 111-112.
- 小室康雄, 原比呂志. 1966. ワサビから分離されるウイルスの種類とその感染状況. 植物防疫 20: 486-488.
- 眞岡哲夫, 中野敬之, 柏崎 哲, 土崎常男. 1990. 静岡縣のワサビから分離された broad bean wilt virus. 關東病蟲研報 37:97-98.

(접수일 2002. 11. 10)

(수락일 2003. 1. 20)