

# 수박 및 오이 재배포장의 바이러스 복합감염과 변이에 따른 기주반응 변이기전 구멍 및 약독바이러스를 이용한 피해 경감 기술 개발

세부과제. CGMMV와 ZYMV의 복합감염에 의한 수박 병징  
상승과 이에 따른 기주-바이러스 복합체의 상호작용  
변이 구멍

협동과제. CMV 및 ZGMMV의 병원성 결정인자 분석과 약독  
바이러스를 이용한 오이의 피해 경감 기술 개발

연구기관

서울대학교 농업생명과학대학

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “수박 및 오이 재배포장의 바이러스 복합감염과 변이에 따른 기주반응 변이기전 구멍 및 약독바이러스를 이용한 피해 경감 기술 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2006년 9월 일

주관연구기관명 : 서울대학교  
총괄연구책임자 : 김 국 형  
세부연구책임자 : 김 국 형  
연 구 원 : 박 미 리  
연 구 원 : 조 상 윤  
연 구 원 : 김 유 정  
협동연구기관명 : 서울여자대학교  
협동연구책임자 : 류 기 현  
연 구 원 : 김 민 제  
연 구 원 : 민 병 은  
연 구 원 : 이 미 연

# 요 약 문

## I. 제 목

수박 및 오이 재배포장의 바이러스 복합감염과 변이에 따른 기주반응 변이기전 구명 및 약독바이러스를 이용한 피해 경감 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

우리나라 주요 박과작물에 감염하는 바이러스의 병원성 결정인자의 분석과 약독바이러스를 이용한 피해경감기술 개발을 통하여 바이러스원에 대한 박과작물의 저항성 분석을 하고자 한다. 특히 복합감염의 기전을 이해하고 바이러스 저항성 유전자원이 박과작물의 경우 아직 보고 된 바 없기 때문에 바이러스와 기주식물간의 상호작용을 해석하는 기반연구를 통하여 병원성 관련 기전의 이해와 약독바이러스의 이용 가능성에 대한 기본적인 지식을 제공하게 됨으로써 약독 바이러스의 제작 및 피해경감 기술의 개발을 목표로 한다. 본 과제에서는 세부과제와 협동과제로 나뉘어 진행하고자 하며, 세부과제에서는 박과작물을 대상으로 가장 빈번하고 심각한 병을 유발하는 CGMMV와 ZYMV를 대상으로 하여 복합감염 실태를 조사하고 이때 관여하는 바이러스 인자를 찾아 병원성에 관여하는 결정인자를 찾고자 한다. 또한 이들 바이러스 간 복합감염 시 차이를 나타내는 공시재료에 대해 염기서열 분석을 실시 후 infectious clone을 제작하고 이를 최종목표인 바이러스 피해기술 경감 시 사용가능한 바이러스로 이용되기 위한 방법을 개발하고자 한다. 한편 기술개발의 토대를 마련하기 위한 기초연구자료 제공을 위해 yeast two hybrid를 이용해 바이러스와 기주 간 상호작용에 관련하는 인자를 구명하여 기주에서의 바이러스 기능에 관한 연구를 진행하고자 한다. 이들 결과를 좀더 실용적으로 이용하기 위해 협동과제에서도 역시 박과작물에 중요한 바이러스를 대상으로 (협동과제 공시 바이러스로는 Tobamovirus에 해당하는 KGMMV와 ZGMMV를 이용) 감염 가능한 클론을 제작하고 이들 바이러스에 대한 다양한 chimeric mutant를 제작하여 유전자 재조합이 일어난 바이러스들에 대한 병원성을 검

정한 후 각 mutant들의 감염 시 병원성에 관여하는 기주인자를 조사해 보고자 한다. 이 실험을 위해서 바이러스 다양한 재조합 바이러스에 대해 식물 감염 뒤 발현되는 기주인자들을 cDNA library 제작을 통해 구축하고 EST 분석을 하여 병원성에 관여하는 기주유전자들을 선별하고자 한다. 병원성에 관련하는 기주인자 분석은 바이러스의 병 피해경감을 위한 바이러스-기주 간 상호작용에 대한 이해 자료로서 세부과제에서 연구될 바이러스 상호작용 인자구명과 더불어 아주 유용한 기초 자료가 될 것으로 전망된다. 한편, 병원성에 관여하는 다양하게 제작된 chimeric mutant들을 대상으로 본 연구과제의 최종목표인 병원성이 약화된 mutant를 선별하여 병원성 및 저항성 분석을 통해 약독바이러스를 선별하고 그들의 유전자 발현 및 특성을 조사 후 온실시험 및 보호효과분석을 실시하여 최종적으로 약독바이러스를 이용한 병 피해 경감기술 개발에 이용하고자 한다. 특히, 본 과제는 바이러스의 병원성에 관여하는 결정인자와 바이러스 간 상호기전 구명을 통한 바이러스 측면에서의 병원성관여에 대한 세부과제와 바이러스 병원성에 관련된 기주인자에 대한 연구수행에 대한 협동과제의 내용이 합쳐져 더욱 효과적으로 바이러스의 기주 내 병원성에 관련된 기전을 이해할 수 있는 자료가 될 수 있을 것으로 예상되며 더 나아가 바이러스의 병을 감소하고 포장에서의 효율적인 방제법 개발에도 이용될 수 있는 연구토대가 될 것으로 기대된다.

## 2. 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

밭과 작물에 큰 피해를 일으키는 주요 바이러스는 대부분이 Potyvirus속에 포함되는 바이러스들인데 이들은 기존에 기주 식물의 외래 RNA에 대한 저항성 기전인 silencing을 억제하는 억제 인자를 가지고 있다고 보고되고 있는 바 이들 바이러스와 다른 바이러스, 특히 tobamovirus (CGMMV)나 cucumovirus (CMV)와 한 작물에서 복합 감염될 때 피해가 급증한다고 보고된 바 있다 (Vance and Vaucheret, 2001). 바이러스의 복합 감염에 의해 병징 상승효과가 일어나게 되면 특히 병의 방제는 어렵게 되고 피해는 증가하게 된다. 바이러스에 저항성을 보이는 유전자의 탐색이 이루어지고 있으나 (Provvidenti, 1989) 아직 복합 감염에 대한 저항성 품종은 없다. 또한 RNA를 계놈으로 함유하고 있는 특성 때문에 변이 바이러스의 출현빈도가 상당히 높고 (Schneider and Roossinck, 2001), 복합 감염에 의한 또는 다양한 strain들의 동시 감염에 의해 recombination이 일어날 경우에는 바이러스 유래 유전자나 또는 기주의 저항성 유전자를 이용한 저항성 품종이 재배된다고 해도 지속적인 방제효과를 기대하기 어려운 실정이다. 본 연구팀은 이미 국내 밭과 작물을 감염하는 주요 바이러스들을 분리하여 여러 strain의 염기서열을 보고한 바 있고 국내 많은 밭과 채소 포장에

이미 동일 바이러스인 경우에도 많은 strain이 존재하고 여러 포장에서 두 종류 이상의 서로 다른 바이러스가 복합 감염되어 있는 것을 보고한 바 있다. 이처럼 변이 바이러스가 계속 증가하고 또한 복합 감염에 의해 분자 육종에 의한 저항성 품종의 보급이 이루어진다고 하여도 세대 진전에 따른 저항성 감소의 문제점을 안고 있고 이들도 저항성을 극복한 새로운 바이러스 strain의 출현으로 실용화가 더더지고 있는 실정이다. 이 경우 또 다른 이용 가능한 저항성 유전자 풀의 부족으로 문제가 야기되고 있어서 이용 가능한 주요 바이러스의 방제 방법의 개발과 분자육종에서 이용할 수 있는 유용유전자의 확보가 필요하다. 따라서 본 연구를 통하여 첫째, 바이러스 병원성 및 저항성 기전의 해석을 통한 새로운 방제기술을 개발하고, 둘째, 생명공학기술을 이용한 약독바이러스의 제작 및 선발과 분석기술을 개발하고, 셋째, 주요 작물 바이러스 방제에 활용 가능한 기반기술력 제공하며 마지막으로 바이러스 감염 및 이동 경로 등 기전 규명을 통한 신개념 기술 개발의 측면에서 연구의 필요성이 절실히 요청되고 있다.

#### 나. 경제·산업적 측면

박과 작물의 경우 바이러스의 감염에 의한 피해가 속출하고 있고 일부 종자 감염하는 바이러스의 경우에는 감염 종자의 보급과 오염 지역에 박과 작물을 재배함에 의해 종자 판매회사나 재배 농가가 큰 피해를 본 바 있고 지역에 따른 차이는 있으나 CMV, ZYMV, WMV 그리고 CGMMV에 의한 피해가 매년 속출하고 있고 일부 지역에서는 100%의 감염율을 보이고도 있다. 또한 대부분의 박과 작물 재배 포장이나 인접 포장에서 CMV, ZYMV, WMV 그리고 CGMMV가 검출되고 있고 다양한 종류의 strain이 이미 존재하고 또한 생성되고 있는 추세여서 바이러스의 감염에 의한 피해가 증가하고 있고 바이러스 병 방제 방법의 부재로 인한 대책이 요구되고 있다. 따라서 안정적인 고품질 우량 박과작물의 지속적 농업을 통한 농가소득 향상과 종자산업의 안정적 기반 확보 및 품종의 지속적 안정화를 통한 신품종 육종이 요구된다.

#### 다. 사회·문화적 측면

주요 피해를 야기하는 바이러스에 대한 저항성 파괴 기전을 이해하고 또한 포장 저항력을 향상시키고 바이러스 병 방제에 의한 안정적 농업생산성 확보를 위한 기술 기반을 제공함으로써 WTO/DDA 협상 및 계속되는 재협상에 따라 모든 농산물에 대한 수입 개방이 이루어지고 있는 현 시점에서 비교적 경쟁력이 강한 채소, 원예작물에 대한 경쟁력 제고와 외국농산물과 비교하여 고품질의 작물 생산 기반이 확보될 수 있다는 측면에서 이러한 노력이 한국 농업이 발전할 수 있는 사회적, 문화적 기반을 공

고히 할 수 있다고 판단된다. 또한 관련기술의 산학연 협력으로 국내 벤처기업 육성을 통한 균형적인 사회 발전에 기여할 수 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 주요 수박 재배포장에서 ZYMV 및 CGMMV의 이엽율을 파악하고 각 isolate를 분리

포장에서 ZYMV의 경우 안동, 의령, 수원등지에서 isolate를 분리하여 ZYMV-PA, PE 그리고 PS라 명하였고 CGMMV의 경우도 두 가지의 isolate를 분리하였다(KW, KOM). 이 isolate를 이용하여 우리나라와 외국에서의 strain별 차이점의 비교분석에 이용한다.

#### 2. 분리된 isolate의 염기서열 결정

ZYMV와 CGMMV의 isolate들의 염기서열을 결정하기 위하여 기존에 알려져 있던 ZYMV와 CGMMV의 염기서열을 비교분석하여 보존적인 부분을 이용하여 프라이머를 제작하고 PCR방법으로 모든 염기서열을 분석하여 본다.

#### 3. CGMMV ZYMV의 infectious clone 제작

단편으로 모든 염기서열을 분석하고 이것을 분자적으로 활용하기 위하여 CGMMV full length infectious clone을 PCR과 단편들의 swapping을 이용하여 제작한다. 만들어진 clone의 유용성을 위해 적절한 프로모터가 있는 벡터를 이용한다.

#### 4. Infectious clone을 이용하여 CGMMV와 ZYMV의 strain 간 chimeric mutant를 제작하여 바이러스의 병원성 결정 인자 구명

CGMMV와 ZYMV의 strain별 복합감염 시 병징 상승효과를 보였던 strain간에 있어서 coat protein이 병징상승에 있어서 중요한 인자라고 여겨지므로 coat protein간의 분석과 chimeric mutant를 이용하여 domain을 결정하여 본다.

## 5. 복합 감염 시 박과 채소 중에 따른 virus strain 간의 상호 작용 연구

박과 채소 중 수박, 오이, 호박, 메론에 있어서 ZYMV와 CGMMV의 strain별 복합감염 시 어떠한 병징 상승효과를 일으키는지 혹은 그 정도는 어느 정도인지 기계적인 접종법으로 알아본다.

## 6. CGMMV의 hybrid virus의 제작 및 상승효과 분석

CGMMV의 염기서열 중 strain별 차이가 났던 염기서열부위를 지정하고 이곳이 특정한 단백질을 coding하는지를 결정한 후 strain 별 swapping을 이용하여 접종 후 병징 차이를 알아본다.

## 7. ZYMV의 hybrid virus의 제작 및 상승효과 분석

ZYMV의 염기서열 중 strain별 차이가 났던 염기서열부위를 지정하고 이곳이 특정한 단백질을 coding하는지를 결정한 후 strain 별 swapping을 이용하여 접종 후 병징 차이를 알아본다.

## 8. Yeast two-hybrid를 이용하여 CGMMV와 ZYMV의 병징 상승효과 검증

CGMMV와 ZYMV의 strain별 복합감염 시 나타나는 병징 상승효과가 바이러스가 발현하는 단백질들의 상호작용으로 이러한 현상을 일으키는 것으로 보고, 단백질 중 특히 외피 단백질간의 상호작용이 가장 큰 요인으로 보이므로 각 바이러스의 strain별 외피 단백질을 yeast two-hybrid 시스템의 벡터에 삽입하여 여러 가지 선별 방법을 이용하여 상호작용 여부를 알아본다.

## 9. 박과 Tobamovirus mutant 제작 및 식물체 감염성 분석

박과 Tobamovirus mutant 제작 및 식물체 감염성 분석을 위하여 본 세부과제에서는 KGMMV, ZGMMV와 CMV 바이러스원을 공시재료로 사용한다. 이들 바이러스는 증식기주에서 대량 증식된 후 바이러스를 정제하고, long-template RT-PCR 기술과 cDNA library 및 RACE를 활용하여 바이러스 게놈에 대한 유전자원을 확보한다. 확보된 유전자로부터, full-length cDNA 클론을 개발한다. 식물체 감염성 클론을 이용하여 아래의 방법을 사용하여 mutant를 제작하고, *in vitro* transcript를 합성하여 박과 작물에 인공 접종하여 기능성 mutant를 선발하고 주요 세부연구내용은 다음과 같다.

- 가. ZGMMV full-length clone을 이용한 random-mutagenesis
- 나. ZGMMV full-length clone을 이용한 chimeric mutants 제작
- 다. ZGMMV mutant library 대량제작

## 10. Viral mutant 선발 및 검정용 추적기술 개발

Virus mutant 선발은 mutant를 접종한 기주식물체에서 병원성 검정과 함께 특정 제한효소 부위를 인공적으로 도입한 marker virus를 개발하여 mutant 검정에 활용한다. 또한, 삽입 돌연변이체의 경우에는 바이러스 유전자내로 삽입되는 특정 제한효소부위를 이용하여 mutant들의 RFLP 비교분석 기술을 mutant 검정용 추적기술로 개발 활용한다.

## 11. 병원성 관련 기주 cDNA library제작

ZGMMV를 감염시킨 슈키니 호박으로부터 mRNA를 정제하고, 이를 template로 하여 cDNA library를 pSPORT1 phagimid vector에 제작한다. 바이러스 감염 초기감염 단계 (early infection state) 특이적인 유전자를 선발하고, 이들의 발현도와 바이러스 병원성과의 상호관계를 분자적으로 규명한다.

## 12. 바이러스 병원성 결정인자 분석

바이러스 병원성 결정인자 분석을 위하여, 박과작물 중에서 애호박 등에 병징발현이 없는 CGMMV와 병원성이 강한 ZGMMV, KGMMV 및 CMV를 공시재료로 사용한다. 바이러스 유전자의 일부를 치환하여 chimeric mutant를 제작하여, 기주식물에서의 병원성과 유전자 발현을 비교 평가하며, 병원성 관련 기주 유전자와의 상호 작용을 규명한다. 병원성 관여 유전자 중에서 병징 및 바이러스 증식에 관여하는 유전자 부위를 확인하고, 이를 약독변이주의 제작에 활용한다.

## 13. Viral mutant의 병원성 스크리닝

Viral mutant의 병원성 스크리닝은 제작되는 viral mutant 클론으로부터 *in vitro* transcription 방법을 이용하여, 각 기주식물에 접종하여 병원성을 검정한다. 오이 다다기 계통과 슈키니 호박을 사용하여 검정할 mutant들의 병원성을 이용하여 기능성 및 병원성과 관계하는 중요 바이러스 유전자 부위를 선발하고, 선발되는 자료를 이용하여 wild-type의 유전자가 포함된 full-length cDNA 클론에서 특정 부위의 mutant



를 제작하고, 이들의 병원성을 확인한다.

#### 14. 약독바이러스 선발 및 박과 기주식물 저항성 분석

약독바이러스 선발 및 박과 기주식물 저항성 분석을 위하여 제작되는 대량의 virus mutant들로부터 박과작물별 및 품종에 특이적으로 병원성이 약화된 mutant를 선발한다. 이들 선발되는 virus mutant를 사용하여, 박과작물에서의 병원성 및 저항성 분석을 실시하고, 온실시험을 통해 포장시험용 약독바이러스를 선발한다.

#### 15. 약독바이러스의 특성 분석

유기되는 약독바이러스의 활용성 증대를 위하여, 선발되는 약독바이러스 계통을 중심으로 이들이 박과작물에서 wild-type의 병원성 계통들과의 경쟁력 및 생존력을 검정한다. 또한, 실제 적용을 위하여 target virus와 유사한 다른 non-target virus간의 병원성 synergism을 분석하여 이들에 관여하는 기전을 해독하고, 이를 약독바이러스의 제작에 활용한다.

- 가. 약독바이러스 계통의 기주체 생존력 및 경쟁력 간이 검정
- 나. 약독바이러스 계통 및 근연바이러스간의 synergism 효과 분석 및 관련 기작 규명
- 다. 박과 Tobamovirus 병원성 관련 기주발현 유전자 분석
- 라. 약독바이러스의 박과식물 보호효과 온실시험 및 모델 정립

#### 16. 약독바이러스의 온실시험 및 보호효과 분석

온실시험으로 선발된 약독 바이러스를 이용하여, 이들이 목표 작물에 보호효과 정도를 온실시험으로 검정한다. 온실시험 결과 각 virus mutant들의 바이러스 보호효과를 분석하여 농업적으로 유용한 약독바이러스를 선발한다. 온실시험에서는 무 처리구, 단독 처리구 및 복합 처리구로 구분하여, 약독바이러스의 방제효과를 산정한다.

#### 17. 약독바이러스의 피해경감기술 개발

온실시험에서 약독바이러스의 처리방법과 시간을 단계적으로 한 다음, 처리 중에서 최적의 방제가를 산정한다. 최종적으로는 박과작물에서의 피해경감기술을 프로토콜화 하여 농가실증시험의 기초 자료로 활용한다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. CGMMV와 ZYMV의 수박기주에 대한 복합감염 실태 파악 및 각 isolate들의 염기서열 분석

CGMMV와 ZYMV의 바이러스 RNA의 게놈의 변이를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 수행하였다. 이를 위하여 각 기주 식물에 서로 다른 병징 반응을 야기하는 대표적인 바이러스 strain을 국내 포장에서 분리하여 CGMMV의 경우 수박(CGMMV-KW)과 참외(CGMMV-KOM)에서 두 strain을 분리하였고 ZYMV는 안동(ZYMV-PA), 의령(ZYMV-PE) 및 수원(ZYMV-PS) 지방의 pumpkin에서 분리하여 실험에 이용하였다.

분리된 바이러스 strain을 증식기주에서 증식하여 전체 게놈 염기서열 분석을 기 보고된 각 바이러스의 염기서열을 이용하여 degenerate primer를 제작하여 RT-PCR 기법을 이용하여 수행하였다. 염기서열 분석 결과 현재까지 수박과 참외에서 분리한 CGMMV 두 strain과 ZYMV strain들(PA, PE and PS)에 대한 전체 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열을 이용하여 각 균주의 RNA-dependent RNA polymerase 부분 및 기타 바이러스 유전자들의 아미노산 서열을 기존에 보고된 strain들의 아미노산 서열을 비교하였다. ZYMV-PA, -PE, 및 -PS는 다른 기 보고된 ZYMV의 WM, WG, California, TW-TN3, CU 및 SG 등과 함께 독특한 clade를 형성하였으며 Reunion island 및 Singapore와는 근연관계가 비교적 멀게 연관되어 있음을 확인할 수 있었다. CGMMV의 경우 국내 분리주는 CGMMV의 W와 SH strain과 상당히 근접하게 연관되어 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 아직도 포장에서는 바이러스들의 변이가 상당히 이루어져 있고 이러한 변이들이 각각 다른 병징을 내고 다른 바이러스들과 병징 상승효과를 이루면서 포장에 더 많은 피해를 준다는 것을 암시한다. 이러한 바이러스들의 변이 양상을 알아내고 복합감염시의 기작들을 이해한다면 바이러스 병 피해를 경감시킬 수 있을 것으로 보인다.

### 2. ZYMV와 CGMMV의 복합감염에서의 ultrastructure

두 가지 이상의 서로 다른 바이러스의 복합감염에 의한 병징 상승효과는 potyvirus와 tobamovirus, potexvirus, 또는 cucumovirus의 복합 감염 시 종종 발견되는데 국내 분리된 바이러스의 복합 감염에서도 이러한 병징 상승효과가 나타나고 있으며 이는 국

내 오이 및 수박 재배포장에 복합감염에 의한 피해가 커질 수 있음을 시사한다. 포장에서는 바이러스의 단독 감염 보다 복합 감염 시 더 심각한 피해를 일으키거나 병징 발현에 있어서도 서로간의 상승 작용을 일으키는 예들이 있다. 이들 중 CGMMV가 속한 tobamovirus와 ZYMV가 속한 potyvirus간에 전자현미경으로 관찰 결과 기주 세포 내에서 nonagon의 형태로 structure가 형성되어 있는 것을 확인하였다. ZYMV와 CGMMV의 strain과 기주에 따른 복합감염과 그의 ultrastructure를 살펴본 결과 이 두 바이러스 간에도 역시 nonagon의 structure를 확인하였고 nonagon의 형태가 아닌 다른 여러 가지 형태의 structure도 확인하였다. 이것은 포장에서 복합 감염 시 바이러스들의 어떠한 상호작용을 구조상으로 확인해 준 결과이고 이러한 결과들이 구조를 결정짓는 외피 단백질의 연관을 시사한다.

### 3. ZYMV와 CGMMV의 복합감염에 따른 synergism의 결정인자인 CP간의 분석

ZYMV와 CGMMV의 복합감염에 있어서 HC-PRO외에도 CP간의 상호작용이 synergism을 일으키는 것으로 예상되므로 CP간의 상호작용을 알아보기 위해 우리는 yeast two hybrid system을 이용하였다. Yeast 내에 transformation 하기 위해 activation domain을 가진 bait vector(pACT2)와 prey vector(pAS2-1)에 두 바이러스의 CP를 코딩하는 유전자 부분을 cloning 하였다. 벡터에 cloning 하기 위해 각 바이러스의 CP를 코딩하는 유전자의 염기서열과 특이 enzyme site가 들어가 있는 프라이머를 이용하였다. ZYMV-PA와 PE는 바이러스가 감염된 이병 옆에서 total RNA를 추출 후 제작한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 하여서 약 900bp의 밴드를 얻었고 이것을 벡터에 cloning하였다. CP의 아미노산 염기서열 분석 결과, CGMMV의 두 strain간에는 차이가 없었고 ZYMV는PA와 PE간에 두 개의 아미노산이 차이가 남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 CGMMV와 ZYMV의 복합 감염 시 형성하는 ultrastructure가 PA strain과의 복합 감염 시에는 강하게 나타나고 PE strain과는 거의 나타나지 않는 것과는 관련이 있는 것으로 여겨진다. 따라서 CGMMV의 한 strain인 KW와 ZYMV의 두 strain PA와 PE의 CP를 각각 pAS2-1 vector와 pACT2 vector에 삽입시켜 cloning하였다. 먼저 control로써 ZYMV-PA(PA), ZYMV-PE(PE), CGMMV(CG) 각각의 자가 상호작용을 알아보기 위해 yeast에 각각의 CP 조합을 co-transformation하였다. 결과들을 미루어 볼 때 ZYMV-PA strain과 CGMMV의 CP간에는 상호작용이 있음을 알 수 있고, 반면 ZYMV-PE strain과 CGMMV의 CP간에는 상호작용이 일어나지 않음을 알 수 있다. 이는 ZYMV와 CGMMV를 박과작물에 복합 감염 시킨 후 식물 세포를 전자현미경으로 관찰 했을 때 ZYMV-PA와는 ultrastructure을 형성하지만 ZYMV-PE와는 형성하지 않았던 결과와도 부합하는 결과라 할 수 있겠다. CGMMV와의 복합 감염에서 어떠한 결정적 영향을 미칠 것이라 예

상이 되는 ZYMV의 CP 클론들 아미노산 염기서열이 비교 결과, 기존의 보고된 아미노산 염기서열과는 몇 개 부분에서 변이가 일어나 바뀌어져 있음을 확인하였다. 같은 strain의 CP도 두 vector에 삽입된 아미노산 염기서열이 조금 차이가 났다. 또한 ZYMV가 삽입된 plasmid를 주형으로 증폭된 CP를 이용하여 클로닝도 병행하였다. 이러한 돌연변이 클론들은 좀 더 정확한 실험을 하기 위해 기존 염기서열과 같은 ZYMV-PA, PE 의 CP를 pAS2-1, pACT2 vector에 다시 클로닝하기로 하였다. 본 연구결과는 향후 아미노산 염기서열에서 PA와 PE간 차이가 났던 아미노산들을 중심으로 하여 CGMMV와의 상호작용에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고, 이를 바탕으로 결정적인 영향을 미치는 아미노산이나 도메인을 확인하고 병원성 및 병징 상승 작용에 미치는 영향평가에 유용하게 이용될 것이다.

#### 4. ZYMV의 병원성 및 병징 상승작용 결정 도메인 확인

기존 potyvirus의 경우 병원성 및 병징 상승에 영향을 미치는 부분으로 알려진 HC-Pro 유전자가 ZYMV의 경우에도 동일하게 작용하는지를 확인하기 위하여 p.ZYMV Gal-on clone을 이용하였고 이 클론에 ZYMV-PA, PE isolate의 P1의 뒷부분과 HC-Pro의 전반적인 부분을 치환하여 치환의 효과를 보려 하였다. p.ZYMV Gal-on clone의 *BstEII*, *BamHI* enzyme site를 이용하여 primer를 제작하고 ZYMV-PA, PE를 증폭하여 pGEM-T easy vector에 cloning하였다. 그리고 sequence를 확인하여 clone을 확보하고 현재 infectious clone 확보 중에 있다. HC-PRO의 아미노산 염기서열 분석 결과 ZYMV-PE와 ZYMV-PS는 모두 일치하였고, PA와 PE간에 세 개의 아미노산 염기의 차이가 났다. 염기서열 분석에서 이러한 염기서열의 차이가 병징 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 pZYMV Gal-on clone의 *BstEII*, *BamHI* enzyme site를 이용하여 primer를 제작하고 ZYMV PA, PE를 증폭하여 pZYMV Gal-on clone에 유전자 swapping 하였다.

식물세포 내에서 이식 유전자의 전사 수준을 조절하는데 사용하는 프로모터로는 cauliflower mosaic virus의 35S transcript 발현을 가능하게 하는 p35S를 가장 보편적으로 쓰는데 이는 상시로 거의 모든 조직에서 비교적 높은 수준으로 목적유전자를 발현시키는 특성이 있다. 우리가 swapping에 이용하였던 pZYMV Gal-on vector는 이 프로모터가 있으므로 식물체에 접종 실험 시 transcript를 따로 만들지 않고 DNA상태로 접종 하였다. 접종 시 병 발생에 적당한 DNA의 양을 알기 위해 pZYMV Gal-on DNA를 여러 농도로 슈키니에 기계적 접종을 실시하였다. 1, 4, 10, 20 $\mu$ g 양으로 접종해본 결과 10, 20 $\mu$ g에서 vein-clearing과 malformation 그리고 mosaic의 증상이 나타났다. 기계적인 접종에 의한 성공률이 매우 낮았으므로 병징 발현 효과도 크

고 빠른 시일 내에 병징을 확인 할 수 있는 DNA도입 법을 찾던 중 gene gun을 이용한 방법을 다른 연구 논문에서 알게 되었고 다른 연구 방법과 같은 방법으로 DNA를 도입하였다. 이 또한 전의 기계적인 접종과 크게 다르지 않아서 염기서열의 문제가 있음을 예측하고 염기서열 분석을 해 본 결과 genome 끝 부분의 poly(A) tail의 염기서열에 다른 염기서열의 삽입으로 접종 후에 증식이 제대로 되지 않은 것으로 추측하고 전체를 PCR로 증폭한 후 35S promoter가 두 개 연속으로 삽입 된 pSNU1 벡터에 삽입하기로 하였다. 이러한 클론이 구축이 되면 gene gun으로 쉽게 DNA를 도입하고 병징 발현도 빨리 볼 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이러한 방식으로 병징 발현에 관련이 있는 domain을 확인할 수 있으며 차후 복합 감염 시의 필요한 도메인도 찾아 낼 수 있을 것으로 사료된다.

## 5. 박과 Tobamovirus mutant 제작 및 식물체 감염성 분석

박과 Tobamovirus mutant 제작 및 식물체 감염성 분석을 위하여 ZGMMV full-length clone을 in vitro transposition을 기초로 한 MGS (mutation generation system) 메카니즘을 이용하여 random mutagenesis를 실시하였다. MGS 반응 후 target DNA (ZGMMV full-length clone) 에 Mu transposon 의 삽입을 확인하기 위하여 wild type 에는 존재하지 않는 transposon 양끝에 존재하는 *Not* I으로 RFLP 방법을 수행하여 transposon 의 위치를 확인하였다. transposon 절편이 잘린 나머지의 15 염기서열의 위치를 분석한 결과 이들은 대부분 N-terminal 에 집중화되어 있었다. 이들은 주형으로 하여 in vitro transcription을 수행하여 wild type 과 함께 주키니에 감염성 테스트를 하였으며 육안으로 병징을 관찰할 수는 없었다. 그러나 ZGMMV CP primer 를 이용한 RT-PCR 에 의해 바이러스 mutant 감염 식물체에서 추출한 RNA로부터 CP 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 혈청학적인 테스트 방법으로는 (western blot) 확인할 수 없었다. 박과 작물에 강한 병원성을 보이는 ZGMMV 와 KGMMV 의 4개의 도메인을 서로 치환하여 총 12 종류의 chimeric mutant를 제작하였다. KGMMV, ZGMMV를 각 주형으로 coat protein (CP) 과 movement protein (MP) 도메인을 염기서열내의 enzyme site를 이용하여 서로의 ZGMMV, KGMMV로 치환하여 4가지 mutant를 제작하였으며, 두 가지 바이러스 내의 서로 공통의 enzyme site 인 *Spe* I을 이용하여, 54kDa domain을 중심으로 각 ZGMMV, KGMMV를 주형으로 서로 치환하여 2가지 mutant를 제작하였다. 이들 ZK11, KZ1을 주형으로 ZGMMV 와 KGMMV 의 CP, MP를 치환하여 4가지의 mutant를 제작하여 전체 10개 mutant를 만들었다. 이들 PCR product의 transcript를 *Nicotiana benthamiana* 와 주키니 호박 (*Cucumis pepo*) 에 감염성 테스트 한 결과, ZK 혹은 KZ mutant 들은 오이에서는 복제와 이동이 wild-type과 차이가 없으나, 주키니 호박 (*Cucurbita pepo*)에

서는 감염부위에 국한하여 복제를 하고 전신이동이 되지 않는 특징을 보였다. 또한, 이들 ZK11, KZ1을 주형으로 ZGMMV 와 KGMMV의 CP, MP를 치환하여 또다른 4가지의 mutant인 ZKZC, ZKZMC, KZKC, KZKMC를 제작하였고, KGMMV, ZGMMV를 각 주형으로 coat protein (CP) 과 movement protein (MP) 도메인을 염기서열내의 enzyme site를 이용하여 서로의 ZGMMV, KGMMV 로 치환하여 4가지 mutant인 ZGFKC, ZGFKMC, KGFZC, KGFZMC를 제작하여. 이들 PCR product의 transcript를 *Nicotiana benthamiana* 와 *Cucumis pepo* 에 감염성 테스트 하였다. XL1-Red를 이용한 ZGMMV random-mutagenesis 로 얻은 약 1000개의 colony를 pooling하였다. XL1-Blue 에 transformation로 얻은 최종 colony 중 100개의 clone을 선발하여, RFLP로 mutation 위치를 결정하고, wild type 과의 병원성 비교를 위해 *in vitro* transcription을 수행하여 스크리닝 하였다.

쥬키니에서의 병징 관련 발현시기와 강도에 관여하는 서열을 결정하기 위한 유전자재조합 바이러스 및 교잡실험 결과, Pf 계통의 바이러스 복제효소 (replicase) 에 존재하는 267 번째 아미노산과 이동단백질 (movement protein) 의 168 번째 아미노산으로 Fny 계통 CMV의 같은 부분을 mutation 후 병원성을 wild type과 비교했을 때 이들 mutant 는 병징 발현이 지연되거나 병징이 약화되었으며 병징 발현 및 시기에 관여하는 결정인자임이 규명되었다. 분자 생물학적 연구에 의해 두 아미노산들의 상호작용이 호박에서의 병징의 세기 및 발현 시기에 중요함을 확인하였다. 선발된 double mutant (Fny-CMV R2,3T/C, Pf-CMV R2,3T/C)와 wild type Pf-CMV, Fny-CMV 간의 병징 차이 확인 및 병원성 결정에 대한 2a, 3a 각각의 기능을 분석하기 위해 double(Fny-CMV R2R3, Pf-CMV R2R3C/T) 및 single mutant (Fny-CMV R2T/C, Fny-CMV R3T/C 와 Pf-CMV R2C/T, Pf-CMV R3C/T)를 제작 및 RNA를 조합하여 접종한 결과, 오이에서는 병징변화 차이를 확인할 수 없었으나, 쥬키니 호박의 경우, double mutant와 유사한 severe mosaic과 chlorotic spot의 변화 병징을 관찰할 수 있었다. 2a, 3a 각각의 단백질은 바이러스 병원성의 차이를 나타내는데 독립적으로 작용할 것으로 예상하며, 이는 바이러스 이동에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

ZGMMV의 초기감염이 진행된 zucchini 떡잎에서 분리한 mRNA를 주형으로. cDNA library를 제작하였다. Zucchini에서 ZGMMV의 초기 감염 단계에서의 특이적인 유전자를 선발하고 cDNA library를 구축하였다. 약 1,200여개의 cDNA sequencing을 완료하였고 각각의 염기서열을 blast분석한 결과를 토대로 각 단편의 DNA가 병원성과의 밀접한 관계를 분석하고 초기감염에 관여하는 병원성을 나타내는 결정적인 인자의 분석연구를 진행하였으며 이 중transmembrane protein, pectin methylesterase,

transcription factor 외 다수의 EST clone을 선택하여 ZGMMV와 CMV 감염에 따른 식물에서의 발현 양상을 분석한 후 바이러스와의 상호작용에 대해 분석 하였다. 바이러스들의 coat protein 외의 movement protein 및 replicase 도메인과 병원성의 관련성 검정을 위해 항혈청을 제작하였다. 기주 식물 내에서 wild type 과 mutant 의 상호작용을 병징으로 확인 할 수 있다.

## 6. 바이러스병원인자 분석 및 viral mutant의 병원성 스크리닝

ZGMMV의 초기감염이 진행된 Zucchini의 떡잎에서 분리한 mRNA를 주형으로, cDNA library를 제작하였다. Zucchini에서 ZGMMV의 초기 감염 단계에서의 특이적인 유전자를 선발하고 cDNA library를 구축하였다. 약 1,200여개의 cDNA sequencing을 완료하였고 각각의 염기서열을 blast분석한 결과를 토대로 각 단편의 DNA가 병원성과의 밀접한 관계를 분석하고 초기감염에 관여하는 병원성을 나타내는 결정적인 인자의 분석연구를 진행하였으며 이 중transmembrane protein, pectin methylesterase, transcription factor 외 다수의 EST clone을 선택하여 ZGMMV와 CMV 감염에 따른 식물에서의 발현 양상을 분석한 후 바이러스와의 상호작용에 대해 분석 하였다. MGS를 통해 Fny-CMV RNA3의 mutant library를 제작하여 RNA3에 Mu-transposon의 무작위적인 삽입으로 야기된 mutant clone을 제작하여 Mu-transposon의 삽입을 확인하였으며 삽입된 Mu-transposon을 제거하여 최종적으로 15bp가 삽입되어 야기되는 mutants를 확보하였다. 이들은 wild type과 비교하여 병징 관여 및 바이러스 증식에 필수적, 비필수적 부위를 확인하여 분석하였다. 스크리닝한 약 500개의 CMV R3 mutant 중에서 유전자 pooling 과정 중 일어난 중복되는 mutant 선별 과정을 거쳐 약 100개의 mutant 를 선발하였으며 이들 중 80개 mutant 에 대해 CMV RNA1, 2 full clone 과 RNA 3 mutant 를 조합하였다. 이들 mutant 의 mutation point 의 양상은 양말단 및 internal 부분 등 균등하게 분포되고 있을 확인하였다. *in vitro* transcription 을 통한 transcript 산물을 *Nicotiana tabacum* 'Samsun' 을 거쳐 최종 식물인 슈키니 에 접종하여 병원성에 관한 생물학검정을 하였다. 병징 관여 및 바이러스 증식에 필수적, 비필수적 부위를 확인하기 위해 첫 번째 육안으로 병징의 스크리닝 결과 30% (24개 mutant) 정도가 wild type 에 비해서 약한 병징을 나타내거나 무병징, 또는 병징 발현 지연 효과를 보였다. 확보된 이들 mutant library 유전자원은 향후 wild type과 비교하여 바이러스 복제와 병징발현에 필수적인 부분을 결정하는데 활용될 예정이다.

## 7. 약독바이러스의 특성분석, 포장시험, 보호효과 및 피해경감개발

ZGMMV 의 외피단백질(coat protein; CP) 의 open reading frame (ORF) 의 start codon (ATG) 에 해당하는 염기서열 ATGcct 을 AGGcct (StuI) 로 point mutation 시키기 위해 ZGMMV CP 발현을 억제하는 pZG $\Delta$ CP mutant 를 제작하였다. 또한 CP region 에 외부 유전자를 삽입하기 위해 CP transcriptional promoter sequence (+45nt) 에 해당하는 CP region 에 multicloning site (MCS; BssHIII-Bst98I-NcoI) 를 삽입하여 GFP reporter 유전자를 cloning 하여 pZG $\Delta$ CPGFP 를 제작하였다. 기주 식물에 이들 mutant 의 *in vitro* transcription 을 통한 산물을 접종하여 발현을 관찰한 결과 CP 발현이 억제된 pZG $\Delta$ CP 은 예상대로 추키니, *Nicotiana benthamiana* 에서 wild type ZGMMV 비교해 전혀 병징을 볼 수 없었지만 pZG $\Delta$ CPGFP 존재는 RT-PCR을 통해 확인할 수 있었다. 그러나 western blot 에서는 확인할 수 없었다. 이는 GFP 의 복제는 되지만 그 이후 protein translation 에 영향을 받는 것으로 예상된다. 대부분의 tobamovirus RNA 의 3' NCR 은 3개의 pseudoknot 과 클로버 모양의 tRNA 구조를 형성하고 있으며, eukaryotic mRNA 등의 transcriptional machinery 로서 작용하는 poly (A) 대신에 그에 동일한 기능을 하며 특히 replicase protein 을 인식하여 RNA minus strand 의 복제하는 중요한 역할을 하고 있다. 3'NCR의 기능과 병원성에 관련한 과거의 보고 중 ToMV (Tomato mosaic tobamovirus) (Takamatsu et al., 1990) 의 3개 pseudoknot 에 대해 제작된 deletion mutant 의 *in vivo* 내 바이러스의 복제 및 병원성 에 대한 실험을 모델로 박과 작물 바이러스인 ZGMMV 3'NCR mutant 제작을 위해 약 163 개의 염기서열을 갖는 3'NCR 의 구조를 결정하였다. tobamovirus 의 3'NCR의 conserved region을 갖고 있으며, 가지과작물 병원성 tobamovirus 대표 그룹인 TMV, TMGMV, PMMoV, ToMV 등의 3'NCR 에 비해 약 60 개의 염기서열이 적었다. 이는 일반적으로 double helix 6개의 3개의 pseudoknot 을 갖는 바이러스들과 다르게 double helical segment (I, II, III, IV) 로 구성된 2개의 pseudoknot 과 tRNA 로 구성되었음을 시사한다. 이러한 구조는 CGMMV를 제외한 박과 작물 병원성 tobamovirus 그룹 내에서 상동성이 높은 KGMMV (*Kyuri green mottle mosaic tobamovirus*) 에서도 유사한 구조를 나타낸다. 복제관련 ZGMMV 3'NCR 의 2개의 pseudoknot 을 double-helical segment 의 4개 부분으로 세분화 하여  $\Delta$ IV,  $\Delta$ III+IV,  $\Delta$ II+III+IV,  $\Delta$ I+II+III+IV 의 4 가지 deletion mutant를 제작하였다. 제작된 4 가지 deletion mutant 는 N gene을 가진 *Nicotiana tabacum* 에 접종하였으나 hypersensitive response (HR) 때문에 복제 유무를 조사할 수 없었다. 감수성인 *Nicotiana benthamiana* 와 기주식물인 *Cucurbita pepo* 에 transcript 를 접종한 결과 두 가지 전신감염 기주 식물에서 mutant pZps 1에서는 wild type 과 동일하였으며 mutant pZps 2 에서 local lesion 을 그 외의 mutant (pZps3-4)에서는 어떠한 병징도 관찰 할 수 없었다. 접종 후 초기 감염에 있어서 ZGMMV 에 비해 약한 KGMMV, CFMMV, 추키니에 무병징인 CGMMV 의 3' NCR 을 ZGMMV full clone 3'NCR 에



치환시키기 위한 mutation PCR 산물을 제작하였으며, 슈키니에 강한 병원성을 보이는 wild type ZGMMV의 복제에 끼치는 영향을 실험하였다. 선발된 병원성이 약화된 박과작물 바이러스 CMV, ZGMMV, KGMMV mutant를 wild type, mutant, mock 처리에 의해 병원성을 비교 및 기주식물에서의 반응을 비교 검정 하였다. 이들의 선발되는 mutant 들은 wild type에 비하여 병징 발현양상이 느리거나, 병징을 보이지 않으나 바이러스는 존재하는 형태, 상업으로의 바이러스 이동에 저항성을 갖는 mutant를 선발하고 박과작물에서의 병원성 및 저항성 분석을 실시하였으며. 또한 이들 mutant를 통해 포장시험용 약독바이러스를 선발하고자 하며, 모델 시스템을 정립하였다. 병원성 관련 domain의 결정과 포장에서의 cross protection을 목적으로 PMMoV의 replicase(REP) 부분 중 methyl-transferase 와 helicase domain 사이를 point mutation 시킨 mutant와 3' NCR의 pseudoknot 구조를 제거한 mutant를 제작하였다. REP 부분의 348번 아미노산 의 point mutation clone이 약한 병징발현을 보였으며 virus농도가 다른 mutant나 wild type에 비하여 높았다. 3' NCR pseudoknot deletion mutant들은 낮은 바이러스 복제로 인한 낮은 virus농도를 보였다. 이러한 point mutation과 3' NCR pseudoknot deletion mutation을 조합한 6개의 mutant를 제작하여 cross protection효과를 고추를 대상으로 포장실험한 결과 6개 모두 약한 병징발현을 보였으며 이러한 결과로 미루어볼 때 REP domain 과 3' NCR이 병원성 발현에 중요한 부위임을 알 수 있었고 앞으로 포장에서 응용 가능한 attenuated mutant 제작에 중요하게 고려되어야 할 부분임을 알 수 있었다. 박과작물의 생산에 있어 4종류의 박과작물감염 tobamovirus인 cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), cucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV), Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV), Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)에 의해 큰 피해를 입고 있다. 이들의 기주특성 및 범위는 박과식물로 한정되어 있는 점이 특징이어서 바이러스의 동정에 필요한 표준 기주식물의 범위가 매우 한정된다. 따라서 표준 검정식물에 의한 동정 및 분류는 매우 어려운 실정이다. 이렇게 박과식물에 많은 피해를 주는 대표적 바이러스인 tobamovirus에 대한 검정법의 개발은 매우 시급한 일이라 할 수 있다. 특히 바이러스의 종자단계 또는 유묘검정법은 생산지역에서의 병의 대발생을 막을 수 있는 필수적인 검정법이다. 이에 본연구에서 4가지 박과감염 Tobamovirus에 특이적인 프라이머를 고안 및 제작하여 바이러스의 검정에 사용하였다. 특히 바이러스가 감염되어있는 것으로 추정되는 종자를 가지고 total RNA를 추출하여 배젓, 종피로 나누어 검정에 이용하였다. 그 결과 바이러스가 단독 또는 복합감염된 상태에서 비특이적 반응이 없이 목표 바이러스의 검출이 되었으며, 개발된 프라이머들의 높은 특이성과 감도 때문에 아주 적은 양의 시료와 적은 양의 바이러스 농도에서도 검출이 되었으며 이는 자연약독변이주의 선발 및 식물검역에 유용하게 사용될 것이라 사료된다.



## SUMMARY

To determine virus infection rates in major watermelon fields in Korea, we surveyed virus infection rates. We were able to isolate and characterize *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) strains and determined their single and mixed infection rates. Two CGMMV strains from watermelon (CGMMV-KW) and oriental melon (CGMMV-KOM) and three ZYMV strains from pumpkin cultivated in Andong (ZYMV-PA), Euryong (ZYMV-PE), and Suwon (ZYMV-PS) were obtained and tested for their interactions on causing synergism. All five isolates were purified and sequenced by RT-PCR using extracted viral RNAs and random and specifically designed oligonucleotide primers. Genomic RNA sequences were compared to the other strains. ZYMV-PA, -PE, and PS were closely related and formed distinct clade with ZYMV-WM, -WG, -California, TW-TN3, -CU, and SG and formed distinct clade with Reunion island and Singapore. Sequence analysis revealed that there are differences and variations are present in major watermelon fields in Korea. The nucleotide sequences of the genomic RNAs of CGMMV Korean watermelon isolate (CGMMV-KW) and Korean oriental melon isolate (CGMMV-KOM) were determined and compared to the sequences of other tobamoviruses including CGMMV strains W and SH. Each CGMMV isolate had a genome of 6,424 nucleotides. Each also had 60 and 176 nucleotides of 5' and 3' untranslated regions (UTRs), respectively, and four open reading frames (ORF1-4). ORFs 1 to 4 encode proteins of 129, 186, 29, and 17.4 kDa, respectively.

To characterize pathogenicity domains of CGMMV and ZYMV on watermelon hosts, we constructed full-length infectious clones of CGMMV-KW and KOM using specifically designed primers and amplified DNAs were cloned into 35S based DNA vector (pBI-121). Interestingly, CGMMV-KW and KOM caused similar symptoms on most tested host plants except on *Chenopodium amaranticolor*. CGMMV-KW caused local lesion while CGMMV-KOM did not infect *C. amaranticolor* plant. To further define pathogenicity domain(s) responsible for this difference, constructed clones (pCGMMV-KW and KOM) were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 and initially infiltrated onto *Nicotiana*

benthamiana plants. Infiltrated plants showed typical symptoms similar to those caused by the infection of each CGMMV isolate. Sequence analysis of each isolate identified several distinct sequence differences and characteristic variations. Based on these data, site-directed mutagenesis and sequence swapping analysis will further confirm symptom determinant of CGMMV isolates.

To determine symptom determinant of ZYMV isolates, previously constructed full-length infectious clone (pZYMV-Gal On) was kindly provided by Professor Gal-On and used to generate sequence swapped mutants. Since sequence analysis and previous infection and mutagenesis analyses strongly supported the HC-Pro protein as major symptom determinant for ZYMV, we amplified HC-Pro region from ZYMV-PA, -PE, and PS were amplified by RT-PCR and incorporated into pZYMV-Gal On vector and were used to infect pumpkin, cucumber and zucchini plants. When we used 10 or 20 microgram of maxi-prep purified DNAs, vein clearing and mosaic symptoms were observed by mechanical inoculations. Symptom appearance, however, was not always stable for each mechanical inoculation and thus required to develop more stable inoculation protocol. Sequence analysis of pZYMV-Gal On revealed that there was sequence variation at the 3' end of the clone. These sequence changes possibly responsible for low and unstable infection rates of pZYMV-Gal On clone. Therefore, new clone was designed to remove 3' sequence variation and cloned onto pSNU-1 vector that contained duplicated 35S promoter. We'll also try Gene-Gun for inoculation since very high and efficient infection rates were observed by the many other researches. Construction of new clones and the use of Gene-Gun will further verify domain(s) responsible for symptom variations.

To characterization of viral synergism caused by mixed infection of CGMMV & ZYMV and to determine viral gene products or domains responsible for synergism, CGMMV and ZYMV are major viruses infecting watermelon plants in Korea. The three isolates of ZYMV were classified by symptom expressions and caused distinct synergistic response of necrotic death occurred within 1 week after inoculation in all combinations mixed with CGMMV and ZYMV-PA but not with ZYMV-PE or PS showing mosaic and severe mosaic. New specific ultrastructures of nonagon-like ring (NLR) and spiral aggregates (SA) by mixed infection with CGMMV and ZYMV-PA were formed in cells of infected plants. No specific

ultrastructures of NLR and SA were, however, formed in combinations of ZYMV-PE and in ZYMV-PS with CGMMV. To further characterize differences of interaction between CGMMV and ZYMV, yeast two-hybrid assay (YTHA) and site-directed mutagenesis were conducted.

A protein interaction of CGMMV and ZYMV CPs was generated by the yeast two hybrid system. Clones encoding the genes CGMMV CP, ZYMV-PA CP and ZYMV-PE CP were fused downstream of the GAL4 binding domain (GAL4-BD) and of the GAL4 activation domain (GAL4-AD). The GAL4-BD and GAL4-AD fusion derivatives of each gene were co-transformed into yeast and transformants in which interaction took place were identified on selective media. Interacting fusion proteins were extracted from the yeast cells, run on SDS-PAGE gels and finally checked by Western blotting with GAL4 polyclonal antibodies. Strong interactions were detected between the pairs CGMMV and ZYMV CP/CP, CGMMV CP/ ZYMV-PA CP, but not with CGMMV CP/ZYMV-PE CP. Analysis with CP derivatives from ZYMV revealed significant amino acid residues responsible for interaction with CGMMV CP. Although not all of the protein-protein interactions reported here were tested for the appearance with ultrastructure(s), the interactions revealed here were, in general, similar to those that caused for the appearance of synergism and ultrastructures.

To obtain random mutagenesis clones of selected cucurbit-infecting tobamoviruses, full-length cDNA of Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV) was mutated with *in vitro* transposon based on mutation generation system (MGS). Mu transposon was inserted into ZGMMV full-length clone and location of Mu was confirmed with cDNA RFLP method with *Not* I restriction enzyme, which doesn't exist in ZGMMV cDNA but only exist at both end of transposon. Fifteen Mu inserted cDNA clones were obtained and majorities were N-terminal inserted clones for the virus. These clones were *in vitro* transcribed and infectivities of clones were tested. Visible symptoms were not observed from mutant inoculated plants but ZGMMV CP was detected with CP primer RT-PCR. In contrast, CP was not detected by western blot analysis. We have also obtained 80 independent Mu-mutants for Cucumber mosaic virus (CMV). These CMV mutants clones revealed that insertional sites are random as we expected, and their infectivity and pathogenicity was evaluated.

Totally twelve chimeric mutants were obtained with substitution of four domains of KGMMV and ZGMMV which are two of highly virulent cucurbitaceae infecting tobamoviruses. Substituted four domains located in coat protein (CP) and movement protein (MP) regions and domains were substituted with *Spe* I enzyme digestion. Two mutant clones were studied which were ZK11 and KZ1 and infectivities of *in vitro* transcripts of two mutant clones were tested on *Nicotiana benthamiana*, cucumber (*Cucumis sativus*) and zucchini squash (*Cucurbita pepo*). Replication and movement of ZK11 and KZ1 in cucumber were not different from wild type but two mutants didn't showed systemic movement and just replicated only in primary inoculated leaves. Four domain substituted mutants, ZGFKC, ZGFKMC, KGFZC and KGFZMC, between ZGMMV and KGMMV CP and MP with ZK11 and KZ1 as templates were constructed and infectivities of *in vitro* transcripts of four domain swapped mutant clones were tested on *Nicotiana benthamiana*, and zucchini squash. ZGMMV random mutagenesis experiments were conducted with XL1-Red and ca. 1000 colonies were pooled and finally 100 clones were selected. Mutation points of selected clones were confirmed with PCR RFLP methods and pathogenesis of *in vitro* transcripts were screened.

Nucleotide sequences of recombinant CMV which affect strength and time of symptom developments on zucchini plants were investigated and recombinant clone which showed week and delayed symptom developments was obtained. With these experiments, critical symptom development determination points of CMV were revealed which were located in replicase region and movement protein region. When 267th amino acids of Pf strain replicase region and 168th amino acid of Pf strain movement protein region substituted with Fny-CMV strain, developed symptoms were week and delayed. Molecular biological data supported that interactions of these two amino acids directly affected symptom developments.

To determine the function of 2a and 3a on pathogenesis and symptom development, double (Fny-CMVT/C R2R3, Pf-CMV R2R3C/T) and single mutant (Fny-CMV R2T/C, Fny-CMV R3T/C and Pf-CMV R2C/T, Pf-CMV R3C/T) were compared with wild type Pf-CMV and Fny-CMV. Different symptom developments among mutants were not found when double and single mutants inoculated on cucumber, but severe mosaic and chlorotic spots were found on

zucchini squash. ZGMMV pathogenesis-related Zucchini mRNA library were constructed. Especially expressed mRNAs in early stage of infection were extracted and cDNA library were constructed. Total of 1200 cDNA clones were sequenced and critical pathogenesis related mRNAs were investigated with BLAST search results. Especially we are focused on expression profiles of transmembrane protein, pectin methylesterase and transcription factor clones when ZGMMV and CMV-infected zucchini plants. Antibodies of cucurbitaceae infecting tobamoviruses and CMV were prepared to determine pathogenesis and further mutation and interaction studies. Coat protein and movement proteins of ZGMMV and CMV were produced with cloned expression vector. Antibodies for replicase proteins of KGMMV, CGMMV and CMV were produced and used for analysis of the viruses.

ZGMMV pathogenesis-related zucchini host mRNA library were constructed and screened. Especially expressed mRNAs in early stage of infection were extracted and cDNA library were constructed. Total of 1200 cDNA clones were sequenced and critical pathogenesis related mRNAs were investigated with BLAST search results. Especially we are focused on expression profiles of transmembrane protein, pectin methylesterase and transcription factor clones when ZGMMV and CMV infected zucchini plants. To construct Fny-CMV RNA3 mutant library, Mu-transposons were randomly inserted with MGS method. Insertions of Mu-transposons were confirmed and 15bp randomly inserted mutant clones were obtained after deletion of inserted Mu-transposons with NotI cutting. Around 500 CMV R3 mutants were screened and ca. 100 mutants were selected without duplications. Mutation points were fairly evenly dispersed around RNA3 genome. Eighty mutants were combined with RNA1 and 2 full clones and *in vitro* transcripts were first inoculated on *Nicotiana tabacum* 'Samsun' then zucchini. Thirty percent (24 clones) of mutants showed weaker than wild type or no symptom or delayed symptom developments. These mutants have been compared with wild type to determine essential points for virus replication and symptom development.

To construct ZGMMV CP open reading frame (ORF) start codon (ATG) disrupted mutant, ATGcct sequences were changed to AGGcct (*StuI* restriction site) and ZGMMV CP disrupted pZG $\Delta$ CP mutant was constructed. Moreover, multicloning

site (MCS; *Bss*HIII-*Bst*98I-*Nco*I) was inserted into CP transcriptional promoter sequence (+45nt) region for plant expression vector construction. GFP reporter gene was inserted into MCS (pZG $\Delta$ CPGFP) and expression of pZG $\Delta$ CPGFP in *Nicotiana benthamiana* and zucchini squash were tested. pZG $\Delta$ CP did not show any visible symptoms on *N. benthamiana* and zucchini squash and expression of pZG $\Delta$ CPGFP were confirmed with RT-PCR. GFP protein expression was not detected with western blot and this result suggested that protein translation might be affected.

The 3' NCR of most tobamovirus RNA consist with 3 pseudoknots and clover shape tRNA-like structures and function was similar with poly (A) of eukaryotic mRNA as transcriptional machinery. Especially 3' NCR was recognized by replicase protein and has replication of RNA minus strand function. Function and effect on pathogenicity of 3'NCR was determined in Tomato mosaic tobamovirus (ToMV) (Takamatsu et al., 1990). Function determination of ZGMMV 3' NCR were designed according to ToMV model. 3' NCR nucleotide sequences were determined as preceding experiments and structure of 163 nucleotide 3' NCR of ZGMMV were predicted. 3' NCR of ZGMMV has conserved region with other tobamoviruses and 60 nucleotides shorter than Solanaceae infecting tobamoviruses such as TMV, TMGMV, PMMoV and ToMV. Theses results revealed that ZGMMV has 2 psedoknots with double helical segment (I, II, III, IV) and tRNA like structure and different from other tobamovirus structure which consist with 3 psedoknots. Structure of ZGMMV 3' NCR is also similar with *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV), which infect cucurbitaceae plants.

To determine the replication related 3'NCR region of ZGMMV, 4 deletion mutants,  $\Delta$ IV,  $\Delta$ III+IV,  $\Delta$ II+III+IV,  $\Delta$ I+II+III+IV, were constructed. *In vitro* transcripts of 4 mutants were inoculated on *Nicotiana tabacum* plants with or without N gene. Replications of mutants were not detected on N gene contained *Nicotiana tabacum* because of hypersensitive response reaction. pZps 1 showed same symptom with wild type and pZps 2 showed local lesions and pZps3 and pZps4 didn't show any symptom. Nucleotide sequences responsible for replication could be determined with these results and 3'NCR substitution with KGMMV, CFMMV and CGMMV experiments were conducted and results obtained from these experiment will confirm replication responsible region determination. Pathogenicities and responses



on host plants of selected attenuated CMV, ZGMMV and KGMMV mutants were compared with wild type. Among these mutants, slow symptom development or no symptom development mutants but exist on whole plant level will selected for analysis of pathogenesis and symptom development determinant. With selected attenuated mutants, field protection will be tested and establishment of model system is on going.

To determine the pathogenicity domain and to apply cross protection, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) point-mutations in the replicase (REP) gene between the methyl-transferase and helicase domains, and deletions truncating pseudoknots in the 3' non-coding region (NCR), were constructed. Some mutants substituting a single amino acid in REP residue 348 exhibited mild symptoms in *N. benthamiana* or pepper plants. Accumulation of these mutants was higher than that of other REP mutants or wild-type PMMoV. Deletion mutants in the 3' NCR pseudoknot showed the lowest virus replication and accumulation among the mutants tested. Six attenuated mutants, which combined 3' NCR deletions and single or double REP substitution mutations, were constructed to investigate cross protection effects on pepper plants. All six of the attenuated mutants showed milder symptom development than wild-type virus. These results suggest that REP and the pseudoknot in the 3' NCR are major pathogenicity determinants of the virus, and engineered PMMoV attenuated mutants can be useful for protection against the virus in pepper plants.

Production of cucurbitaceous plants were severely reduced when infected with 4 cucurbitaceae-infecting tobamoviruses, which are CGMMV, CFMMV, KGMMV, and ZGMMV. Detection of these viruses in seed or young plant stage is the most effective method for prevention of out break of viral diseases in production field. Host range of these viruses was limited in cucurbitaceous plants and these narrow host ranges make difficult to detect and classify with standard experimental host and bio assay. Therefore, we designed each virus specific primers without non specific reaction for fast and efficient virus detection from small amounts of samples. With these highly specific primer sets, the 4 viruses from seed coat and cotyledon can be simultaneously detected without non specific reaction. Sensitivities of developed specific primer sets are extremely high to detect extremely low concentrations of viruses and could be useful for detections

of spontaneous mutations without symptom developments and for plant quarantine service.

## CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	27
Section 1. Needs for research -----	27
Section 2. Research purpose and area -----	31
 Chapter 2. Status of technique development in domestic and foreign countries -----	 34
Section 1. Status of technique development in domestic and foreign countries -----	 34
Section 2. Places of this research in technique development status of domestic and foreign countries -----	 35
 Chapter 3. Research Results -----	 36
Section 1. Research methods and plans -----	36
Section 2. Research results -----	41
 Chapter 4. Achievement and contribution -----	 133
Section 1. The point aimed at research purpose, area and valuation -----	133
Section 2. The achievement of research purpose -----	133
Section 3. The contribution of technical development of related sphere -----	135
 Chapter 5. Plan for practical use -----	 136
Section 1. Necessity of additional research -----	136
Section 2. Application of another research -----	136
Section 3. Practical plans of research results -----	137
 Chapter 6. Compilation of scientific information from foreign countries -----	 139
 Chapter 7. References -----	 142

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	27
제 1 절 연구개발의 필요성 -----	27
제 2 절 연구개발의 목표와 내용 -----	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	34
제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점 -----	34
제 2 절 앞으로의 전망 -----	35
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	36
제 1 절 연구개발 방법 및 설계 -----	36
제 2 절 연구개발 결과 -----	41
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	133
제 1 절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점 -----	133
제 2 절 연구개발 목표의 달성도 -----	133
제 3 절 관련분야에서의 기술발전 기여도 -----	135
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	136
제 1 절 추가연구의 필요성 -----	136
제 2 절 타 연구에의 응용 -----	136
제 3 절 연구결과의 활용계획 -----	137
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	139
제 7 장 참고문헌 -----	142

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 필요성

우리나라 주요 박과 채소는 총 채소재배면적의 약 14.6 % (2001년 기준 53,659 ha)를 차지하는 중요한 작물이다. 현재 약 20종류 이상의 서로 다른 바이러스가 박과 채소에 중요한 피해를 일으키는 것으로 보고되고 있다. 이들 중 *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Zucchini yellow fleck virus* (ZYFV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), 그리고 *Clover yellow vein virus* (CYVV) 등은 경제적으로 큰 피해를 줄 수 있는 중요한 바이러스로 분류되고 있다(Provvidenti, 1989, 1990). 이러한 바이러스들은 감염한 식물체를 완전히 죽일 수도 있고 또한 죽게 하지는 않더라도 감염 식물체의 정상적인 생리작용을 심하게 방해하여 과실이 기형으로 맺히게 하거나 또는 전혀 과실이 맺히지 않게 하는 등의 피해를 주는 것으로 보고 된 바 있다(Clough and Hamm, 1995). 바이러스의 주요 작물 감염에 의한 피해는 우리나라의 경우 최근 시설 재배 증가의 영향으로 채소류가 다른 작물에 비해 많은 피해를 받고 있다. 특히 채소는 식물체는 물론 식용부위가 연약하므로 각종 병해의 피해를 쉽게 받는다. 채소류는 특히 바이러스에 대해서 민감한데 노지에서 정상적으로 강건하게 자란 채소류보다는 시설 내에서 연약하게 자라는 환경 하에서 그 피해가 더 심하게 발생한다. 최근에 우리나라에 집단 발생한 오이녹반모자이크바이러스(CGMMV)와 KGMMV는 이러한 바이러스가 種子傳染을 하는 경우 그 피해정도가 상상외로 크고 일단 자라고 있는 식물체에 대해서 효과적인 구제방법도 없다는데 문제의 심각성이 있다. 즉 구체적인 예로 1998년에 중국으로부터 CGMMV에 感染된 박 대목종자를 국내에 반입하여 이 대목에 수박을 접목 재배하다가 수박에 바이러스 증상이 전국의 25개 시군에서 발생하여 공식으로 집계된 피해보상액만도 53억원에 달하게 된 사실, 그리고 1999년에 다시 호박에서 유사한 큰 피해가 발생한 사실은 種子傳染 바이러스의 심각성을 잘 보여주는 좋은 예라고 할 수 있다. 박과 채소를 침입하는 중요 바이러스 중 종자 전염하는 CGMMV외의 대부분의 바이러스가 진딧물에 의해 매개되므로 감염 바이러스류는 생육 중기부터 단독 혹은 복합으로 발병하여 수량 및 품질저하의 주요인으로 작용하고 있고 이들 바이러스의 피해는 사회적으로도 큰 과장을 매년 반복하는 악순환이 거듭되고 있는 실정이다.

바이러스는 일단 성장하고 있는 식물체에 感染이 되면 이 식물체를 치료하는 방법은

아직은 없다. 따라서 바이러스 병의 경우에는 치료보다는 방지 또는 유입 금지에 더 많은 노력을 기울이고 있는 실정이다. 그러나 분자생물학적 기법의 발달과 함께 바이러스 유래 유전자 및 기주의 저항성 유전자를 이용한 형질 전환 식물이 많이 개발되고 있고 일부는 포장에서 재배되고 있기도 하다(Gonzalves, 2002). 또한 최근에는 약독 바이러스를 이용한 포장 저항성의 실현 가능성도 보고되고 있어서 약독 바이러스나 defective interfering RNA (DI RNA)를 이용한 방법 등도 연구가 진행되고 있다. 박과 작물에 큰 피해를 일으키는 일부 바이러스는 식물체가 아니고 종자에 感染이 되어 포장에 유입되기도 하고 이 경우에 전 포장에 걸쳐서 심한 피해를 보기도 하



그림 1. 주요 바이러스에 의한 박과 채소에 나타나는 병징 및 과실의 피해 양상.

고 또한 두 종류 이상의 서로 다른 바이러스의 복합 감염에 의한 병징 상승작용 (synergism)으로 더 큰 피해를 보기도 하였다(Cho, 2002).

특히 바이러스가 복합 감염되어 있거나 병원성이 서로 다른 strain들이 포장에 존재하고 있을 때는 이들 간의 recombination에 의해 새로운 strain의 출현이 가능하다고 보고 된 바 있어서 주요 피해 작물의 경우 바이러스의 감염 실태와 복합 감염에 의한 병징 상승의 가능성 및 새로운 strain의 출현 가능성에 대한 고찰이 요구된다(Agrios, 1999). 따라서 다양한 바이러스원에 대한 박과작물의 저항성 분석이 필요하며, 특히 복합감염의 기전을 이해할 필요가 있고 바이러스 저항성 유전자원은 이미 언급한대로

박과작물의 경우 아직 보고 된 바 없기 때문에 바이러스와 기주식물간의 상호작용을 해석하는 기반연구를 통하여, 새로운 방제기술의 접목이 요청된다. 병원성 관련 기전의 이해는 약독바이러스의 이용 가능성에 대한 기본적인 지식을 제공하게 됨으로써 약독 바이러스의 제작 및 실용화 기술의 개발에 크게 기여하게 될 것이다.

## 1. 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

박과 작물에 큰 피해를 일으키는 주요 바이러스는 대부분이 Potyvirus속에 포함되는 바이러스들인데 이들은 기존에 기주 식물의 외래 RNA에 대한 저항성 기전인 silencing을 억제하는 억제 인자를 가지고 있다고 보고되고 있어서 이들 바이러스와 다른 바이러스 특히 tobamovirus (CGMMV)나 cucumovirus (CMV)와 복합 감염될 때 피해가 급증한다고 보고 된 바 있다(Vance and Vaucheret, 2001). 바이러스의 복합 감염에 의해 병징 상승효과가 일어나게 되면 특히 병의 방제는 어렵게 되고 피해는 증가하게 된다. 바이러스에 저항성을 보이는 유전자의 탐색이 이루어지고 있으나 (Provvidenti, 1989) 아직 복합 감염에 대한 저항성 품종은 없다. 또한 RNA를 게놈으로 함유하고 있는 특성 때문에 변이 바이러스의 출현빈도가 상당히 높고(Schneider and Roossinck, 2001) 복합 감염에 의한 또는 다양한 strain들의 동시 감염에 의해 recombination이 일어날 경우에는 바이러스 유래 유전자나 또는 기주의 저항성 유전자를 이용한 저항성 품종이 재배된다고 해도 지속적인 방제효과를 기대하기 어려운 실정이다. 본 연구팀은 이미 국내 박과 작물을 감염하는 주요 바이러스들을 분리하여 여러 strain의 염기서열을 보고한 바 있고 국내 많은 박과 채소 포장에 이미 동일 바이러스인 경우에도 많은 strain이 존재하고 여러 포장에서 두 종류 이상의 서로 다른 바이러스가 복합 감염되어 있는 것을 보고한 바 있다. 이처럼 변이 바이러스가 계속 증가하고 또한 복합 감염에 의해 분자 육종에 의한 저항성 품종의 보급이 이루어진다고 하여도 세대 진전에 따른 저항성 감소의 문제점을 안고 있고 이들도 저항성을 극복한 새로운 바이러스 strain의 출현으로 실용화가 더더지고 있는 실정이다. 이 경우 또 다른 이용 가능한 저항성 유전자 풀의 부족으로 문제가 야기되고 있어서 이용 가능한 주요 바이러스의 방제 방법의 개발과 분자육종에서 이용할 수 있는 유용 유전자의 확보가 필요하다. 따라서 본 연구를 통하여 첫째, 바이러스 병원성 및 저항성 기전의 해석을 통한 새로운 방제기술 개발하고, 둘째, 생명공학기술을 이용한 약독 바이러스의 제작 및 선발과 분석기술을 개발하고, 셋째, 주요 작물 바이러스 방제에 활용 가능한 기반기술력 제공하며 마지막으로 Virus 감염 및 이동 경로 등 기전 규명을 통한 신개념 기술 개발의 측면에서 연구의 필요성이 절실히 요청되고 있다.

#### 나. 경제·산업적 측면

이미 언급하였듯이 박과 작물의 경우 바이러스의 감염에 의한 피해가 속출하고 있고 일부 종자 감염하는 바이러스의 경우에는 감염 종자의 보급과 오염 지역에 박과 작물을 재배함에 의해 종자 판매회사나 재배 농가가 큰 피해를 본 바 있고 지역에 따른 차이는 있으나 CMV, ZYMV, WMV 그리고 CGMMV에 의한 피해가 매년 속출하고 있고 일부 지역에서는 100%의 감염율을 보이고도 있다. 또한 대부분의 박과 작물 재배 포장이나 인접 포장에서 CMV, ZYMV, WMV 그리고 CGMMV가 검출되고 있고 다양한 종류의 strain이 이미 존재하고 또한 생성되고 있는 추세여서 바이러스의 감염에 의한 피해가 증가하고 있고 바이러스 병 방제 방법의 부재로 인한 대책이 요구되고 있다. 따라서 안정적인 고품질 우량 박과작물의 지속적 농업을 통한 농가소득 향상과 종자산업의 안정적 기반 확보 및 품종의 지속적 안정화를 통한 신품종 육종이 요구된다.

#### 다. 사회·문화적 측면

주요 피해를 야기하는 바이러스에 대한 저항성 파괴 기전을 이해하고 또한 포장 저항력을 향상시키고 바이러스 병 방제에 의한 안정적 농업생산성 확보를 위한 기술 기반을 제공함으로써 WTO/DDA 협상 및 계속되는 재협상에 따라 모든 농산물에 대한 수입 개방이 이루어지고 있는 현 시점에서 비교적 경쟁력이 강한 채소, 원예작물에 대한 경쟁력 제고와 외국농산물과 비교하여 고품질의 작물 생산 기반이 확보될 수 있다는 측면에서 이러한 노력이 한국 농업이 발전할 수 있는 사회적, 문화적 기반을 공고히 할 수 있다고 판단된다. 또한 관련기술의 산학연 협력으로 국내 벤처기업 육성을 통한 균형적인 사회 발전에 기여할 수 있다.



## 제 2 절 연구개발의 목적

### 1. 연구개발의 목표 및 내용

주관과제 연구목표
CGMMV와 ZYMV의 복합감염에 의한 수박 병징 상승과 이에 따른 기주-바이러스 복합체의 상호작용 변이 구명

- 1) CGMMV와 ZYMV의 수박기주에 대한 복합 감염 실태 파악 및 각 isolate들의 염기서열 분석과 대표적인 strain에 대한 infectious clone 제작
  - 가) 주요 수박 재배포장에서 ZYMV 및 CGMMV의 이염율을 파악하고 각 isolate를 분리
  - 나) 분리된 isolate의 염기서열 결정
  - 다) CGMMV infectious clone 제작
  - 라) ZYMV infectious clone 제작 - 대표적인 두 개 이상 isolate
  - 마) Infectious clone을 이용하여 CGMMV와 ZYMV의 strain 간 chimeric mutant를 제작하여 바이러스의 병원성 결정 인자 구명
- 2) 복합 감염에 의한 각 virus strain 간의 상호 작용 연구
  - 바이러스의 병징 상승효과에 영향을 주는 domain 또는 염기서열 분석
  - 가) 복합 감염 시 박과 채소 중에 따른 virus strain 간의 상호 작용 연구
  - 나) 복합 감염 시 특정 박과 채소의 cultivar에 따른 virus strain 간의 상호 작용 연구
  - 다) CGMMV의 hybrid virus의 제작 및 상승효과 분석
  - 라) ZYMV의 hybrid virus의 제작 및 상승효과 분석
  - 마) 병징 상승효과에 영향을 주는 domain 또는 염기서열 분석
- 3) 복합 바이러스와 수박 기주 간의 상호작용 연구
  - 가) Yeast two-hybrid를 이용하여 CGMMV와 ZYMV의 병징 상승효과 검증
  - 나) 병징 상승효과를 결정하는 단백질 또는 domain 탐색

협동과제

연구목표

**CMV 및 ZGMMV의 병원성 결정인자 분석과 약독바이러스를 이용한 오이의  
피해 경감 기술 개발**

- 1) 박과 Tobamovirus mutant 제작 및 식물체 감염성 분석
  - 가) Tobamovirus mutant 제작
    - (1) ZGMMV full-length clone을 이용한 random-mutagenesis
    - (2) ZGMMV full-length clone을 이용한 chimeric mutants 제작
  - 나) Viral mutant 선발 및 검정용 추적기술 개발
    - (1) ZGMMV mutant library 대량제작
    - (2) CMV chimeric mutant 제작
  - 다) 병원성관련 기주 cDNA library 제작
    - (1) 바이러스 감염에 따른 병원성 관련 기주식물체 mRNA 에 대한 cDNA library 제작
    - (2) 기주식물 반응별 약병원성 계통 분리 및 유전자 확보
    - (3) 박과 Tobamovirus 및 CMV 의 movement protein 및 replicase 항혈청 제작
    - (4) wild-type 및 약독바이러스 검정기술 개발
  
- 2) 바이러스병원인자 분석 및 viral mutant의 병원성 스크리닝
  - 가) 바이러스병원성 결정인자 분석
    - (1) 박과 Tobamovirus의 hybrid virus의 제작 및 감염성 분석
    - (2) 바이러스 감염에 따른 병원성 관련 기주식물체 cDNA ESTs 분석
  - 나) Viral mutant의 병원성 스크리닝
    - (1) CMV chimeric mutant 제작 및 병원성 결정
    - (2) CMV mutant library 대량제작
  
- 3) 약독바이러스의 특성분석, 온실시험, 보호효과 및 피해경감개발
  - 가) 약독바이러스의 선발 및 박과 기주식물 저항성 분석
    - (1) 기주식물 반응별 약병원성 계통 분리 및 유전자 확보
  - 나) 약독바이러스의 특성분석
    - (1) ZGMMV 외피단백질 (coat protein) mutant 제작 및 외래 유전자 발현 분석
    - (2) ZGMMV 및 PMMoV 3' non-coding region 구조 결정 및 mutant 제작
    - (3) ZGMMV 및 CMV의 random mutagenesis를 이용한 mutant 특성 분석
  - 다) 약독바이러스의 온실시험 및 보호효과 분석

라) 약독바이러스의 피해경감기술 개발

- (1) 박과작물에 피해를 주는 4종의 바이러스의 동시(multiplex RT-PCR) 검정법 개발
- (2) 박과작물에 있어 자연변이주의 선발과 포장효과검정
- (3) 실제포장에서의 피해정도
- (4) 약독가능성 자연 변이주 선발

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

분자생물학 기법의 발달과 더불어 1986년 담배 모자이크 바이러스(*Tobacco mosaic virus*; TMV)의 외피단백질(coat protein; CP) 유전자를 담배에 발현시켰을 때 TMV에 저항성을 보인다는 보고 이후에 거의 모든 부분의 바이러스 유래 유전자를 식물체에 발현시켜서 저항성의 발현 여부를 파악하고 있고 이중 일부는 이미 포장에서 재배되고 있는 상태이다(Beach, 1999; Gonzalves, 2002; Harper et al., 2002). 바이러스 유래 유전자를 이용한 저항성 품종 육성 노력과 병행하여 식물체 유래 바이러스 저항성 유전자의 탐색과 이용, 그리고 최근에 많은 연구가 진행되고 있는 외래 RNA의 silencing에 의해 분해 기전이 기주 식물에서 발견됨에 따라 이를 이용한 바이러스 저항성 품종의 육성연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다. CMV는 식물 바이러스 중에서 가장 다양한 기주 범위를 지니고 있는 바이러스 중의 하나로서 이미 많은 strain들이 보고되었고 이중에는 병원성에 상당한 차이를 보이는 strain들도 포함하고 있다(Choi et al., 2002; Lin et al., 2003).

바이러스의 복합 감염에 의한 서로 다른 바이러스 간의 recombination에 대한 연구는 아직 충분한 증거를 가지고 있지 않은 실정이지만 병징 상승에 따른 기주 식물의 피해 증가에 대한 연구는 상당히 많은 연구자들에 의해 추진되고 있고 그 결과 병징 상승의 원인이 바이러스의 계놈중의 일부가 기주 식물의 silencing 기전을 억제하는 억제 인자를 가지고 있기 때문인 것으로 밝혀졌다(Vance and Vaucheret, 2001).

최근에 많은 종류의 바이러스와 strain들에 대한 염기서열 정보가 보고되고 공개됨에 따라 컴퓨터를 이용한 염기서열 분석이 많이 진행되고 있는데 이에 따르면 luteovirus, tobnavirus 그리고 potyvirus속에 속한 바이러스들의 경우는 서로 다른 바이러스 간의 recombination이 현재의 계놈 구조를 결정하는데 기여했다고 여겨지고 있다(The VIIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium, 2002). 일반적으로 바이러스 간 또는 동일 종류의 바이러스 strain간의 recombination은 계놈의 복제 시 바이러스의 복제효소가 copy-choice switching에 의해 이루어지는데 서로 다른 바이러스의 복합 감염에 의해 특정 바이러스의 증식이 상대적으로 갑자기 증가하게 되면 copy-choice switching에 의한 새로운 바이러스 strain이 만들어질 가능성이 증가하는데 이와 관련하여 박과 채소의 경우 기존에 synergy를 일으키는 group으로 보

고된 potyvirus와 cucumovirus 또는 tobamovirus가 복합 감염되어 발견되는 경우가 빈번하기 때문에 많은 포장에 실제로 존재하는 각 바이러스의 strain에 대한 연구, 분석이 요구된다. 이와 관련하여 본 연구팀은 이미 우리나라 박과 채소에 감염하는 CMV, CGMMV, KGMMV, ZYMV, WMV 등 주요한 바이러스의 strain에 대한 염기서열 정보 및 감염 가능 클론의 제작에 관한 연구를 수행하여 오고 있다(아래 수행연구과제 및 실적 표 참조). 본 연구에서는 국내에 분포하고 있는 각 바이러스 strain들에 대한 보다 다양한 정보를 확보하고 확보된 균주들의 유전적 분석을 토대로 생명공학기법을 통한 바이러스의 복합 감염에 따른 병징 상승의 기전을 분석하고 이와 관련하여 기주인 박과 채소의 cultivar나 종류에 따른 차이를 구명하고 강한 병징을 나타내는 strain과 그렇지 않은 strain의 차이에 대한 연구를 수행하여 저항성 품종의 선별 시 이용할 수 있는 중요한 자료를 제공하고 약독바이러스의 제작 및 선발과 분석을 통한 포장 저항성 향상을 위한 기술을 개발하려고 한다.

## 제 2 절 앞으로의 전망

박과작물은 우리의 일상 식생활에 필수로 이용되는 주요 작물의 하나로서 WTO 체제의 개방 농정 체제에서 경쟁력을 갖출 수 있는 중요한 자원 작물임을 부인할 수 없다. 본 연구와 관련하여 국내외 연구기관의 사례와 비교할 때, 기술수준은 선진국의 약 90 % 이상이라고 할 수 있으나 연구인력 등 인프라 측면에서는 매우 취약(약 15 % 이하)하다고 여겨진다. 따라서 본 과제를 통하여 관련기술 전문 인력의 양성 등 우수 연구 인프라를 기대할 수 있고 경쟁력을 갖춘 양질의 박과 채소를 생산하는 것이 우리나라와 같은 농산물 수입국으로서의 주요관건이 될 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 연구개발 방법 및 설계

#### 1. 주관과제

CGMMV와 ZYMV의 복합감염에 의한 수박 병징 상승과 이에 따른 기주-바이러스 복합체의 상호작용 변이 구명 (서울대학교 농생명공학부, 김국형)

#### 가. CGMMV와 ZYMV의 수박기주에 대한 복합 감염 실태 파악 및 각 strain의 염기서열 분석

박과 채소에 감염하는 주요 바이러스 중에서 종자 전염되어 빈번히 문제를 야기 시켰던 CGMMV와 쉽게 접촉 전염되고 또한 진딧물에 의해 충매 전염되는 ZYMV를 공시재료로 이용하여 국내 여러 포장에서 각 바이러스의 isolate를 분리하고 분리된 isolate를 여러 가지 진단 식물에 접종하여 생물 검정을 통한 병원성의 차이를 확인한 후 대표적인 isolate를 지역별 또는 기주 별로 선별하여 염기 서열 분석에 이용한다. CGMMV의 염기서열 분석은 기 확보된 두 가지 strain의 염기서열을 프라이머 제작에 이용하고 ZYMV는 기존 보고된 염기서열 정보를 이용하여 RT-PCR에 의해 각 바이러스 isolate의 게놈부분을 확보하여 T-벡터에 삽입하여 분석에 이용한다.

#### 나. 대표적인 strain에 대한 infectious clone 제작

대표적인 CGMMV와 ZYMV의 strain을 선별하여 full-length infectious clone의 제작에 이용하고 full-length clone의 감염성을 진단식물에 접종하여 확인한다. 얻어지는 infectious clone은 각 strain간의 유전자 부분 swapping이나 mutagenesis에 의해 병원성과 기주 특이성을 결정하는 바이러스 요인을 결정하는데 이용될 것이다(그림 1).

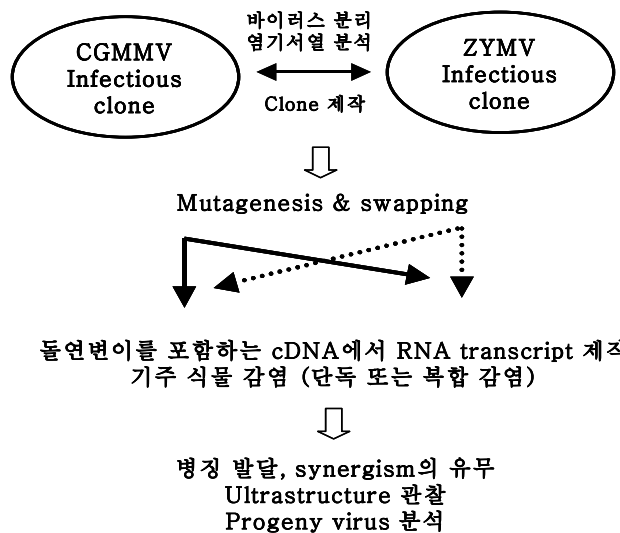


그림 1. 각 바이러스의 clone 제작 및 mutagenesis와 식물 감염실험의 개략적인 모식도.

**다. 복합 감염에 의한 각 virus strain 간의 상호 작용 연구**

ZYMV와 CGMMV는 바이러스의 isolate에 따라 또는 접종에 이용되는 기주의 종류나 cultivar에 따라 synergism이 다르게 나타난다는 것을 확인한 바 있다(Cho, 2002). 따라서 선발되는 각 공시 바이러스의 isolate들을 대상으로 기주에 따른 반응의 차이와 synergism의 유무를 결정한다. Synergism이 일어나는 경우에는 특이적으로 두 가지 바이러스의 상호작용에 의해 감염세포 내에 특이적인 전자현미경적 구조(octagon 또는 nonagon 등)가 빈번히 발견되는데 이와 관련된 바이러스 strain 간의 상호작용에 대한 연구를 더욱 심화 있게 진전시킨다.

**라. 바이러스의 병징 상승효과(synergism)에 영향을 주는 domain 또는 염기서열 분석**

각 바이러스 strain에 특이적으로 존재하는 바이러스 요인을 분석하는데 infectious clone이 이용될 수 있고 병원성 검정과 기주 특이성 검정을 위하여 제작, 이용된 mutants들을 이용하여 우선 스크리닝하고 이후 좁혀진 유전자 또는 유전자 부분에 대한 mutagenesis (site-directed or alanine scanning)를 수행한다. Synergism이 나타나는 정도에 의해 특이적인 domain이나 염기서열을 확인할 수 있게 될 것이고 각 mutant 간의 복합 감염에서 형성되는 감염세포내의 특이 구조를 관찰함에 의해 감염

세포 내에서 형성되는 특이적인 전자 현미경적 구조의 형성에 미치는 바이러스의 요인에 대한 정보도 함께 얻을 수 있을 것이다.

#### 마. 복합 감염 바이러스와 수박 기주 간의 상호작용 연구

2년간의 실험 연구 결과는 박과 채소에 복합 감염되었을 때 병원성과 synergism을 결정하는 바이러스의 유전자 부위에 대한 충분한 정보를 제공하게 된다. 따라서 바이러스의 주요 유전자 부위를 이용하여 이 유전자와 상호 작용하는 기주 유전자를 파악할 수 있는데 현재 본 연구실에서 많이 이용하는 yeast two-hybrid (단백질-단백질 상호작용)와 three-hybrid (RNA-단백질 상호작용) system을 이용하여 기주 유전자를 확보하게 될 것이다. 기주 유전자의 library는 상업적으로 이용 가능한 yeast hybrid system에 이용할 수 있는 library를 구입하거나 제작하여 이용하게 될 것이다.

## 2. 협동과제

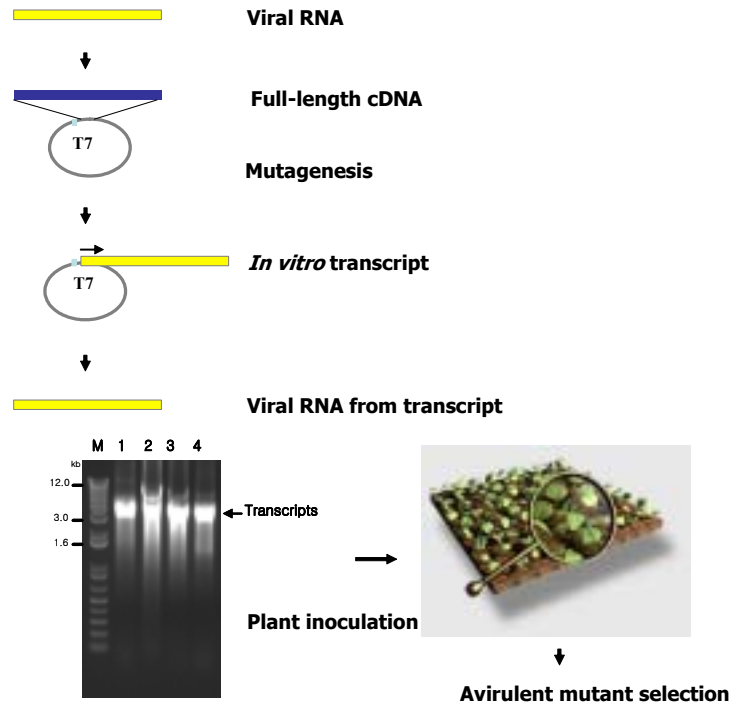
CMV 및 ZGMMV의 병원성 결정인자 분석과 약독바이러스를 이용한 오이의 피해 경감 기술 개발 (서울여자대학교 환경생명과학부, 류기현)

### 가. Tobamovirus mutant 제작

#### 1) ZGMMV full-length clone을 이용한 random-mutagenesis

박과작물에 감염성을 보이는 ZGMMV full-length cDNA clone을 in vitro transposition을 기초로 한 mutation generation system (MGS)을 이용하여 random mutagenesis를 시도하였다. 반응 후 target DNA (ZGMMV full-length clone) 에 Mu transposon 의 삽입을 확인하기 위하여 wild type 에는 존재하지 않는 transposon 양 끝에 존재하는 *Not* I으로 RFLP 방법을 수행하여 transposon의 위치를 확인하여 도식화하였다. 선발된 MGS mutant로부터 entransposon 절편이 잘린 나머지의 15 염기서열의 위치를 분석한 결과, 이들은 대부분 N-terminal에 집중화되어 있었다. 이들은 주형으로 하여 *in vitro* transcription을 수행하여 wild type 과 함께 주키니에 감염성 테스트를 실시하여 wild type과 구분되는 병원성이 약한 계통 선발을 실시하였다.





## 2) ZGMMV full-length clone을 이용한 chimeric mutants 제작

박과 작물에 강한 병원성을 보이는 ZGMMV와 KGMMV의 4개의 도메인을 서로 치환하여 10개의 chimeric mutant를 제작하였다. KGMMV, ZGMMV를 각 주형으로 coat protein (CP) 과 movement protein (MP) 도메인을 염기서열내의 enzyme site를 이용하여 서로의 ZGMMV, KGMMV 로 치환하여 4가지 mutant를 제작하였으며, 두 가지 바이러스 내의 서로 공통의 enzyme site 인 *Spe* I을 이용하여, 54 kDa domain을 중심으로 각 ZGMMV, KGMMV를 주형으로 서로 치환하여 2가지 mutant를 제작하였다. 이들 ZK11, KZ1을 주형으로 ZGMMV 와 KGMMV 의 CP, MP를 치환할 수 있는 primer 를 제작, fusion PCR 하여 4가지의 mutant를 제작하여 전체 10개 mutant를 만들었다. 이들 PCR product로부터 transcript를 제작하여 *Nicotiana benthamiana* 와 *Cucumis pepo* 에 감염성 실험을 실시하였다.

### 나. Viral mutant 선발 및 검정용 추적기술 개발

#### 1) ZGMMV mutant library 대량제작

XL1-Red를 이용한 random-mutagenesis 로 얻은 약 1000개의 colony를 pooling하였

다. XL1-Blue 에 transformation 로 얻은 최종 colony 중 100개의 clone을 선발하여, RFLP 로 mutation 위치를 결정하고, wild type 과의 병원성 비교를 위해 *in vitro* transcription을 수행하여 스크리닝하였다.

## 2) CMV chimeric mutant 제작

쥬키니에서의 병징 관련 발현시기와 세기에 관여하는 서열을 결정하기 위한 유전자재조합 바이러스 및 교잡실험 결과, Pf 계통의 바이러스 복제효소 (replicase) 에 존재하는 267 번째 아미노산과 이동단백질 (movement protein) 의 168 번째 아미노산으로 Fny 계통 CMV의 같은 부분을 mutation 후 병원성을 wild type과 비교했을 때 이들 mutant 는 병징 발현이 지연되거나 병징이 약화되었으며 병징 발현 및 시기에 관여하는 결정인자임이 규명되었다. 분자 생물학적 연구에 의해 두 아미노산들의 상호작용이 호박에서의 병징의 세기 및 발현 시기에 중요함을 확인하였다.

## 다. 병원성관련기주 cDNA library 제작

ZGMMV의 초기감염이 진행된 Zucchini의 떡잎에서 분리한 mRNA를 주형으로, cDNA library를 제작하였다. Zucchini에서 ZGMMV의 초기 감염 단계에서의 특이적인 유전자를 선발하고, cDNA library를 구축하였다. 현재 약 1,200여개의 cDNA sequencing을 완료하였고 각각의 염기서열을 blast분석한 결과를 토대로 각 단편의 DNA가 병원성과의 밀접한 관계를 분석하고 초기감염에 관여하는 병원성을 나타내는 결정인자의 분석연구를 실시하였다.

## 제 2 절 연구개발결과

### 주관과제

CGMMV와 ZYMV의 복합감염에 의한 수박 병징 상승과 이에 따른  
기주-바이러스 복합체의 상호작용 변이 구명(김국형)

#### 1. CGMMV와 ZYMV의 수박기주에 대한 복합 감염 실태 파악 및 각 strain의 염기서열 분석

##### 가. 바이러스의 분리 및 기주에 따른 병원성 변화

CGMMV와 ZYMV의 바이러스 RNA의 계놈의 변이를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 수행하였다. 이를 위하여 각 기주 식물에 서로 다른 병징 반응을 야기하는 대표적인 바이러스 strain을 국내 포장에서 분리하여 CGMMV의 경우 수박(CGMMV-KW)과 참외(CGMMV-KOM)에서 두 strain을 분리하였고 ZYMV는 안동(ZYMV-PA), 의령(ZYMV-PE) 및 수원(ZYMV-PS) 지방의 pumpkin에서 분리하여 실험에 이용하였다.

확보된 각 바이러스 분리주들을 순수 분리하여 기주에 따른 병원성의 변화를 확인하였다. CGMMV-KW와 CGMMV-KOM은 병원성 검사에 이용된 대부분의 기주에서 대조구로 이용된 CGMMV-W와 유사한 병징을 나타내었다. 그러나 특이하게 *Chenopodium amaranticolor*에서는 CGMMV-W와 CGMMV-KW는 집종엽에 국부병반을 나타내었으나 CGMMV-KOM의 경우 아무런 병징도 나타내지 않았다(표1-1 및 그림 1-1).

Table 1. Symptom developments on indicator plants inoculated with purified *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) strains

Indicator plants	CGMMV-W	CGMMV-KW	CGMMV-KOM
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CS/- <sup>1</sup>	CS/-	-/-
<i>Citrullus vulgaris</i> (Schard)	M/M	M/M	M/M
<i>Lagenaria leucantha</i> (Rusby)	M/M	M/M	M/M
<i>Cucumis sativas</i>	M/M	M/M	M/M
<i>C. melo</i> var. Makuwa (Makino L.)	M/M	M/M	M/M
<i>Gomphrena globosa</i>	-/-	-/-	-/-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	M/M	M/M	M/M

<sup>1</sup> Symptoms on inoculated leaves/ upper leaves induced by CGMMV strains. CS, chlorotic spot; M, mosaic; -, no infection; virus replication was detected by electron microscopy and RT-PCR.

아래 그림1-1(panel A)에 나타난 것과 같이 CGMMV-KOM는 접종엽에서도 증식하지 못하였다. 바이러스의 증식여부는 접종엽과 상엽에서 전체 RNA를 분리하여 CGMMV의 외피단백질을 특이적으로 증폭하는 primer들을 이용하여 RT-PCR 기법에 의해 확인 하였다(data not shown).

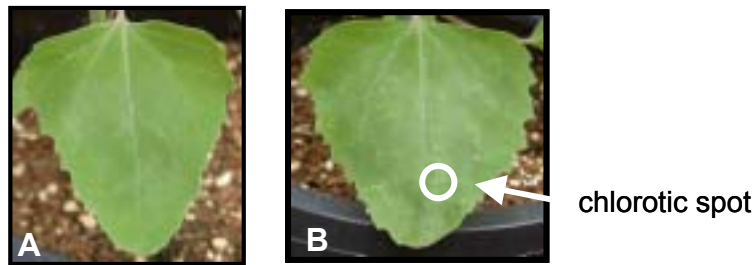


그림 1-1. *Chenopodium amaranticolor*에 나타난 CGMMV-KOM(A)과 CGMMV-KW(B)의 병징.

CGMMV에 감염된 식물에서 바이러스를 순화하여 sucrose gradient를 통하여 순화하였을 때 서로 구분되는 두 band를 얻을 수 있었는데 각 band를 전자현미경으로 관찰하면 입자크기가 큰 막대형(L)과 작은 막대형(S)의 입자들을 분리할 수 있었는데 각 입자에서 viral RNA를 순화하면 큰 입자에서는 서로 크기가 다른 세 종류의 RNA가

관찰되었고 작은 입자에서는 작은 크기의 두 RNA 만이 추출되었다. 이들 RNA의 특성을 확인하기 위하여 CGMMV의 replicase부분과 외피단백질 부분의 dsDNA를 probe로 이용하여 RNA blotting을 수행하였다. 그림 6에 나타난 것과 같이 replicase probe는 genomic RNA의 크기에 해당하는 RNA와 특이적으로 결합(panel B)하였고 외피단백질 probe를 이용하였을 경우에는 모든 RNA와 결합(panel C)하였다. 이러한 연구결과는 작은 크기의 두 RNA들은 바이러스의 감염에 따라 감염된 세포에서 합성되는 subgenomic RNA임을 암시하고 genomic RNA와 subgenomic RNA 모두 바이러스 입자 안에 assembly된다는 것을 나타낸다.

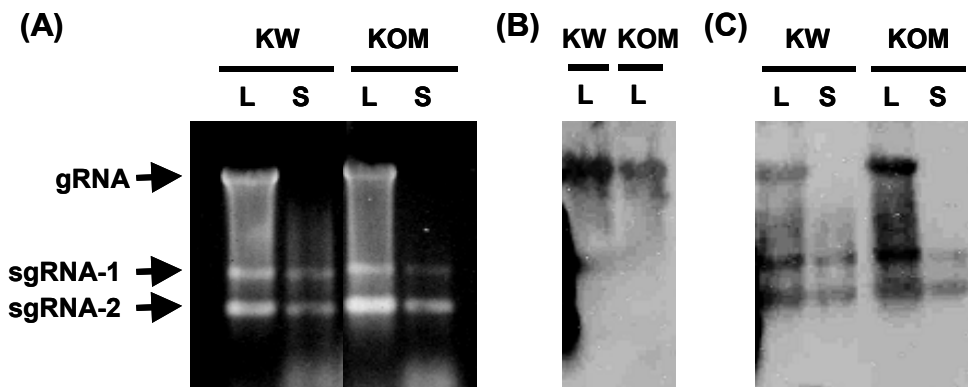


그림 1-2. 순화된 바이러스입자에서 추출한 viral RNA(A)와 CGMMV의 replicase부분(B)과 외피단백질 부분(C)의 dsDNA를 probe로 이용하여 수행한 RNA blotting의 결과.

Pumpkin에서 분리된 ZYMV 분리주들도 각 검정기주에 접종하여 병징의 차이를 확인하였다(표 2). 대체로 PA가 PE나 PS에 비하여 병원성이 강하게 나타났으며 PE와 PS는 대조구로 이용한 AG strain과 대체로 유사한 병징을 발현시켰으나 PS는 *Gomphrena globosa*을 감염시키지 못했다.

**Table 2.** Symptom developments on tested plant species by inoculation with purified ZYMV isolates

Test plants	-AG <sup>a</sup>	-PA	-PE	-PS
	IL/UL <sup>b</sup>	IL/UL	IL/UL	IL/UL
<i>Citrullus vulgaris</i>	na/M,Y	na/SM,NS	na/M,Y	na/M,Y
<i>Cucumis sativus</i>	na/MM,Y	na/SM,MAL	na/MM,Y	na/MM,Y
<i>C. melo</i>	na/MM,Y	na/SM,MAL	na/MM,Y	na/MM,Y
<i>N. benthamiana</i>	SL/ <sup>c</sup>	SL/-	SL/-	SL/-
<i>N. glutinosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CL/-	NL/-	CL/-	CL/-
<i>C. quinoa</i>	CL/-	NL/-	CL/-	SL/-
<i>Gomphrena globosa</i>	SL/-	CL/-	SL/-	-/-

<sup>a</sup> ZYMV-AG from Plant Virus Gene Bank, Korea

<sup>b</sup> Symptoms on inoculated leaves (IL) / upper leaves (UL) induced by ZYMV strains. Symbols in the table indicate M, mosaic; MM, mild mosaic; SM, severe mosaic; MAL, malformation; Y, yellowing; CL, chlorotic local lesions; NS, necrotic spots; NL, necrotic local lesions; -, no infection; na, not assayed.

<sup>c</sup> SL; symptomless (typical symptoms not produced but the virus was detected by RT-PCR).

각 분리균주가 수박, 참외 및 오이에 나타내는 병징은 아래 그림 1-3과 같다. 바이러스의 증식 여부는 병징의 발현 여부와 함께 RT-PCR에 의하여 중복, 확인하였다(그림 1-4).



그림 1-3. ZYMV 각 분리균주가 수박, 참외 및 오이에 나타내는 병징.

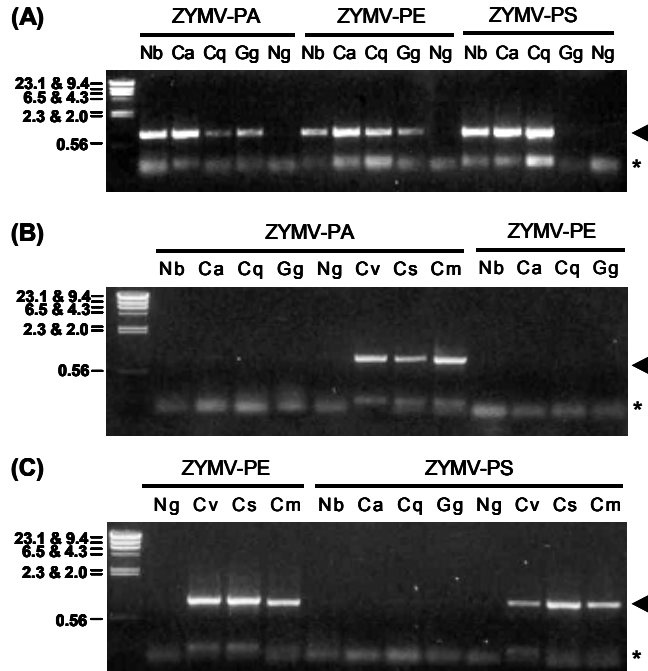


그림 1-4. RT-PCR에 의한 바이러스의 증식 확인.

나. 각 바이러스 분리주의 전체 게놈 염기서열 분석

분리된 바이러스 strain을 증식기주에서 증식하여 전체 게놈 염기서열 분석을 기 보고된 각 바이러스의 염기서열을 이용하여 degenerate primer를 제작하여 아래 그림1-5와 1-6에 나타난 바와 같이 RT-PCR 기법을 이용하여 수행하였다.

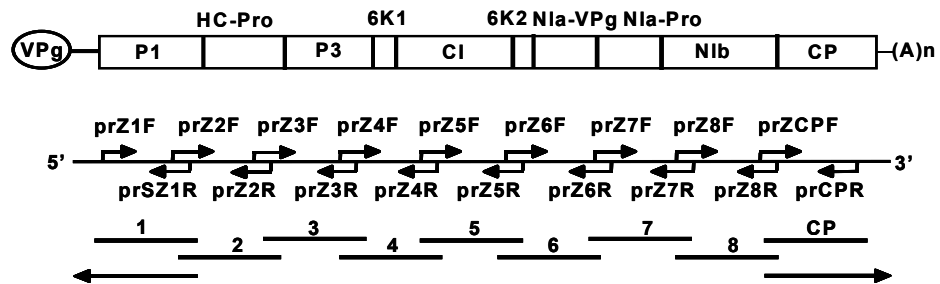


그림 1-5. ZYMV의 게놈구조와 RT-PCR에 의한 전체 게놈 염기서열 분석 strategy.



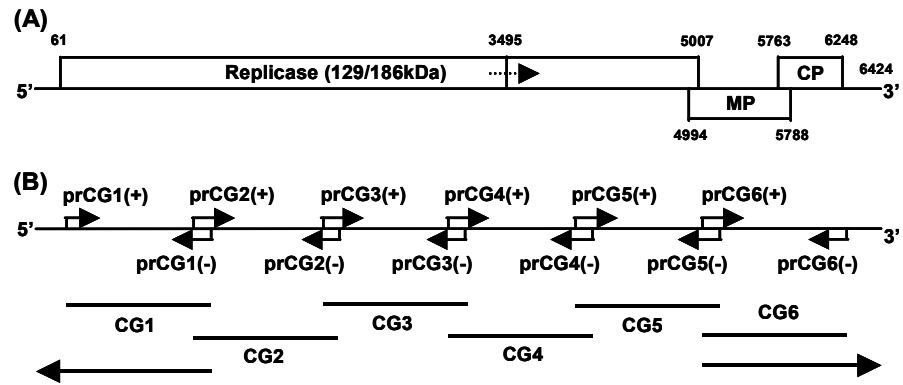
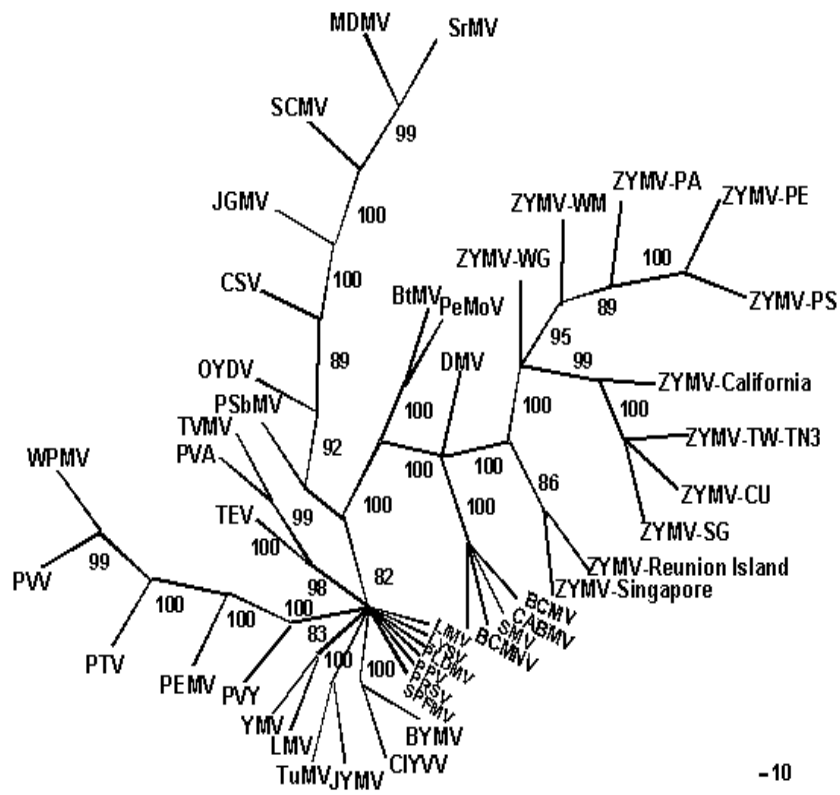


그림 1-6. CGMMV의 계놈구조와 RT-PCR에 의한 전체 계놈 염기서열 분석 strategy.

염기서열 분석 결과 현재까지 수박과 참외에서 분리한 CGMMV 두 strain과 ZYMV strain들에 대한 전체 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열을 이용하여 각 균주의 RNA-dependent RNA polymerase 부분 및 기타 바이러스 유전자들의 아미노산 서열을 기존에 보고된 strain들의 아미노산 서열을 비교하였다.

ZYMV-PA, -PE, 및 -PS는 다른 기 보고된 ZYMV의 WM, WG, California, TW-TN3, CU 및 SG 등과 함께 독특한 clade를 형성하였으며 Reunion island 및 Singapore와는 근연관계가 비교적 멀게 연관되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 1-7).



- 10

그림 1-7. ZYMV polyprotein과 기타 다른 potyvirus의 polyprotein들의 아미노산 서열을 이용한 phylogeny.

CGMMV의 경우 국내 분리주는 CGMMV의 W와 SH strain과 상당히 근접하게 연관되어 있음을 알 수 있다(그림1- 8).

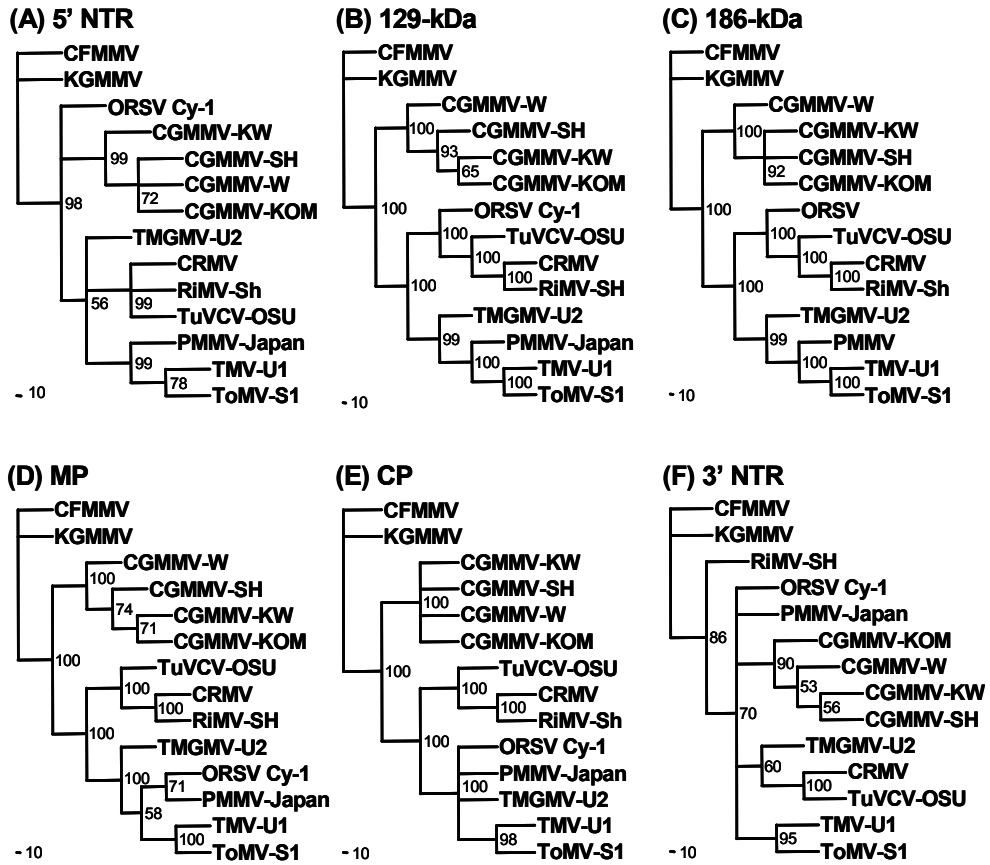


그림 1-8. CGMMV 유전자 및 비번역부분과 기타 다른 tobamovirus 유전자들 및 비번역부분의 아미노산 서열을 이용한 phylogeny.

#### 다. 바이러스의 복합감염에 의한 병진 발현의 변화

분리된 각 바이러스들이 복합 감염되었을 때는 단독 감염에서 보이는 병징과 비교 되는 심한 병징이 나타나는 것을 확인하였다(그림 1-9).

이러한 두 가지 이상의 서로 다른 바이러스의 복합감염에 의한 병징 상승효과는 potyvirus와 tobamovirus, potexvirus, 또는 cucumovirus의 복합 감염 시 종종 발견되는데 국내 분리된 바이러스의 복합 감염에서도 이러한 병징 상승효과가 나타나고 있으며 이는 국내 오이 및 수박 재배포장에 복합감염에 의한 피해가 커질 수 있음을 시사한다.

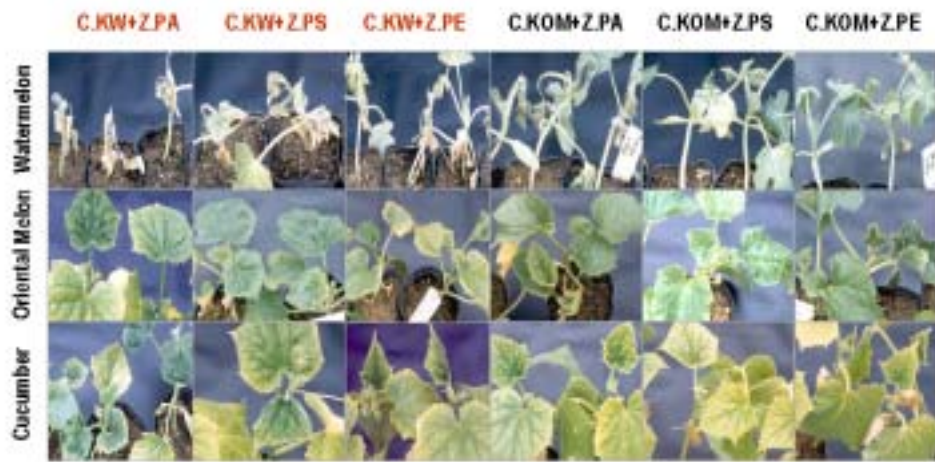
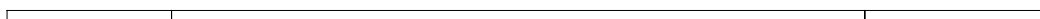


그림 1-9. 복합감염에 의한 병징 발현의 변화.

## 2. 대표적인 strain에 대한 infectious clone 제작

### 가. ZYMV clone 제작

ZYMV-PA, PE, PS 각각의 full-length infectious clone을 제작하기 위해 약 9.6Kb 정도의 full-length를 약 3.6Kb정도의 세 fragment로 나누어 primer를 제작하였다(아래 표). 5'말단에 T7 promoter를 이용하고자 primer 제작시 T7 promoter를 삽입하였다. 이를 증폭하여 pGEM-T easy vector에 cloning하고 그 후 세 clone을 약 3, 6Kb정도에 위치한 unique enzyme site, *NruI*과 *BamHI*을 이용하여 ZYMV 게놈을 세부분으로 나누어 증폭하였다(그림 2-1).



primer name	sequence	position
5` + T7+ <i>Sall</i>	5` ACG CGT CGA CTA ATA CGA CTC ACT ATA GAA AAT TGA AAC AAA TCA C 3`	~19
#3F	5' GCY ACA CAA ACY ATG CAT GT 3'	2312~2331
#3R	5' GCA TCR TCY TGY TTC TTG C 3'	3372~3390
For.+ <i>BamHI</i>	5` AGA TTT GTG GAT CCT CTC ACT GGC CA 3`	5915~6021
Rev.+ <i>BamHI</i>	5` TGT ATG GCC AGT GAG AGG ATC CAC AAA TC 3`	5916~6025
3` + T+ <i>SmaI</i>	5` TCC CCC GGG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA GGC TTG CAA ACG GAG TCT 3`	9575~

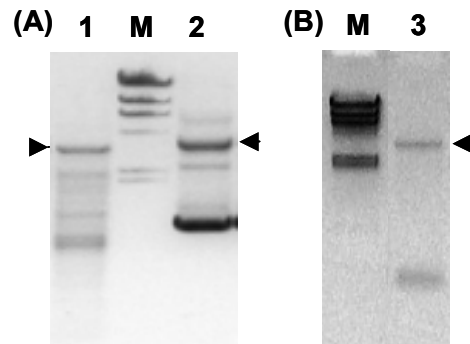


그림 2-1. RT-PCR에 의한 ZYMV  
게놈의 증폭.

증폭된 각 DNA들은 pGEM vector에 삽입되어 증폭하였고 확보된 각 클론은 현재 그림 2-2와 2-3에 나타난 것과 같이 full-length clone을 제작하는데 이용하고 있다.

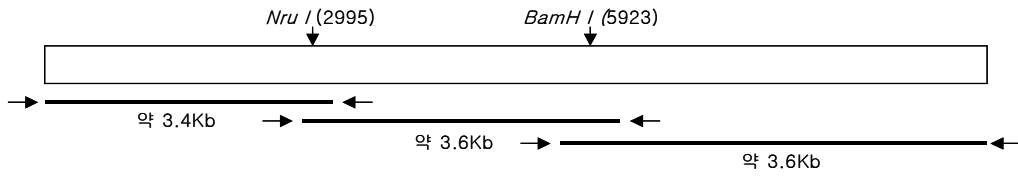


그림 2-2. ZYMV full-length clone 제작을 위해 증폭된 게놈 절편부분의 모식도.

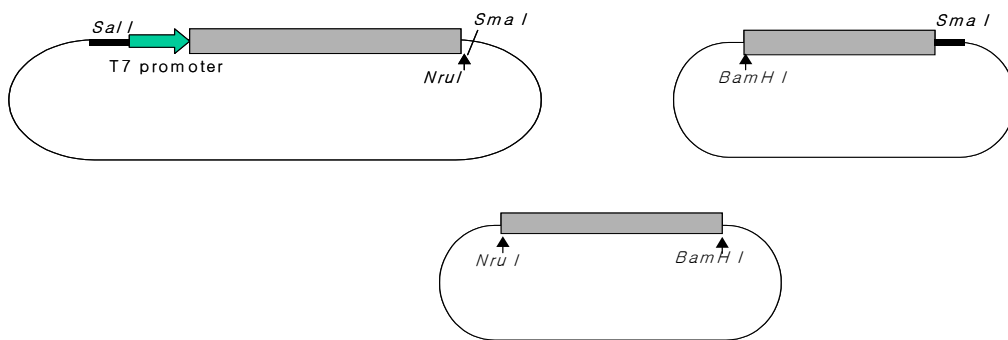


그림 2-3. ZYMV full-length clone의 제작모식도.

#### 나. ZYMV의 병원성 및 병징 상승작용 결정 도메인 확인을 위한 클론 제작

우선 기존 potyvirus의 경우 병원성 및 병징 상승에 영향을 미치는 부분으로 알려진 HC-Pro 유전자가 ZYMV의 경우에도 동일하게 작용하는지를 확인하기 위하여 p.ZYMV Gal-on clone을 이용하였고 이 클론에 ZYMV-PA, PE isolate의 P1의 뒷부분과 HC-Pro의 전반적인 부분을 치환하여 치환의 효과를 확인하고자 하였다. p.ZYMV Gal-on clone의 *BstEII*, *BamHI* enzyme site를 이용하여 primer를 제작하고 ZYMV-PA, PE를 증폭하여 pGEM-T easy vector에 cloning하였다. 그리고 sequence를 확인하여 clone을 확보하고 infectious clone 제작을 시도하였으나 아직 얻지 못하였다.

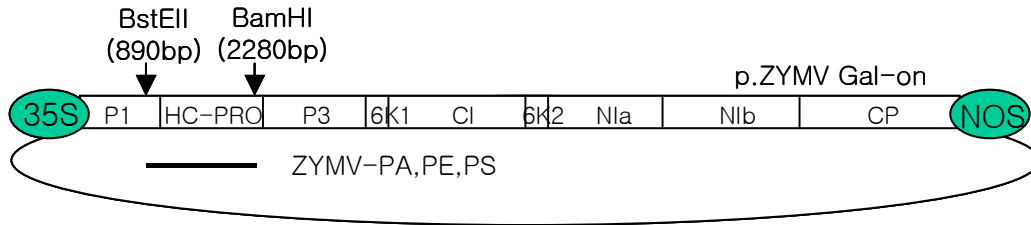


그림 2-4. 감염 가능한 ZYMV 벡터와 부분 치환에 이용된 계놈부분.

#### 다. CGMMV의 infectious clone 제작

선택한 두 CGMMV의 strain인 CGMMV-KOM, -KW의 infectious clone을 제작하기 위해 다음과 같은 방법을 사용하였다. CGMMV의 전체 genome을 PCR 방법을 통해 증폭하고 이를 plasmid vector에 삽입하기 위하여, 이미 밝혀진 sequence의 5' end 부위와 3' 등 부위의 염기서열 약 10-15nt에, 원하는 제한효소 염기서열을 부가한 primer를 제작한 후 RT-PCR을 수행하여 원하는 6.4kb의 전체 genome의 DNA를 확보하였다(그림 2-5).

primer 이름	염기서열	특징
<i>Bam HI</i> +CGMMV 5'	TAT CCT AGG GGA TCC GTT TTA ATT TTA TAA TTA AAC AAA CAA C	<i>Bam HI</i> 제한효소 염기서열 부가
CGMMV 3'+ <i>Sac I</i> + <i>Bam HI</i>	CTC GAG GGA TCC GAG CTC TGG GCC CCT ACC CG	<i>Sac I, Bam HI</i> 제한효소 염기서열 부가

확보한 DNA 산물을 젤 정제하여 원하는 증폭산물만 분리하여 이를 *Bam HI*과 *Sac I*의 제한효소 처리하여, 두 제한 효소로 처리한 plasmid vector에 삽입하게 된다.

Infectious clone의 제작에 있어서 plasmid vector의 선택은 중요하다. 일반적인 경우, cloning한 바이러스 genome의 감염력을 확인하기 위해, vector에 삽입된 유전자를 RNA 형태로 전사하여야 하며 이를 위해 흔히 T7 promotor 인식부위를 5' end 부위에 부가한 후 T7 RNA 전사효소를 사용하여 RNA를 합성하게 된다. 이 과정에서 G cap과 같은 고가의 시약을 사용하여야 하므로 이를 극복하기 위해 Clontech(USA)사의 pBI121 binary vector를 사용하여 infectious clone 제작을 하였다. pBI121에 삽입된 유전자는, vector 내의 35S promotor에 의해 진핵세포 내에서의 전사가 가능하므

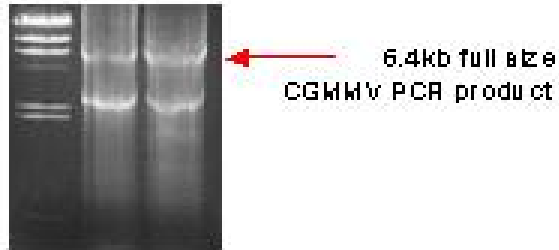


그림 2-5. RT-PCR에 의한 CGMMV의 전체 게놈 증폭.

로 DNA형태로서 감염력을 갖는 장점을 가지게 된다.

따라서 선택한 pBI121과 증폭한 CGMMV의 DNA 산물을 위의 두 제한효소로 처리하여 cloning하였다(그림 2-6).

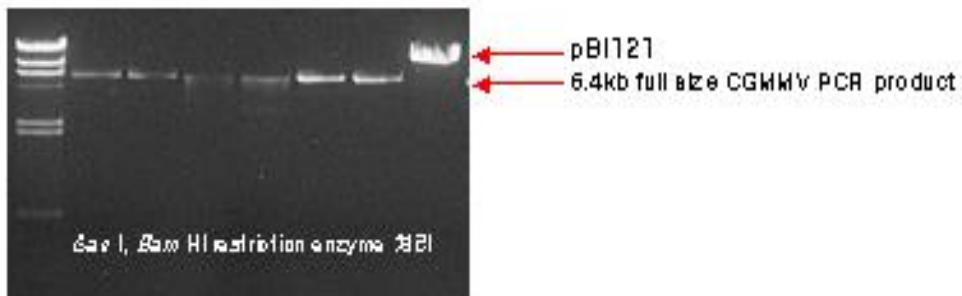


그림 2-6. 감염 가능한 DNA 클론을 확보하기 위한 벡터와 insert DNA의 제한효소처리 결과.

다음의 결과로서 확보한 infectious clone의 제한효소 처리 전기영동사진은 다음과 같다. 확보한 CGMMV clone의 감염력을 확인하기 위한 CGMMV 기주 내에서의 *in vivo* 감염력 검정에 이용될 것이다. 또한 CGMMV 두 strain 간의 복합감염의 차이를 결정하는 유전자의 규명을 위한 CGMMV 두 strain 간의 유전자 치환을 위해, 이들 CGMMV genome을 pUC 계열의 plasmid vector로 옮겨진 클론을 제작하였고 이는 향후 두 strain과 ZYMV 사이의 복합감염 차이를 결정하는 유전자를 확인하는데 이용될 것이다.





그림 2-7. Ligation과 transformation후 선발된 클론의 제한효소처리에 의한 확인.

### 3. 박과 채소에서 ZYMV 와 CGMMV의 복합 감염에 따른 strain간의 반응 차이 분석

#### 가. 슈키니에서의 ZYMV와 CGMMV의 복합 감염

박과 채소 중 ZYMV의 기주 중의 하나 인 슈키니에서 ZYMV와 CGMMV의 복합 감염여부와 strain간 반응의 차이점을 알아보기 위해 가 바이러스가 감염 되어 있던 이 병 옆에서 즙액을 추출하여 기계적인 접종을 하였다. CGMMV만 접종한 것에서는 아무런 병징이 없었고, 복합 감염한 잎에도 ZYMV의 단독 감염과 비슷한 양상을 보였다(그림 3-1). 이것은 CGMMV의 기주범위에 슈키니가 들어가지 않는 것으로 보이고 RT-PCR로 검증하진 않았지만 슈키니에서는 복합 감염이 되지 않는 것으로 보인다. 이것을 다시 오이에 접종을 하여 복합 감염 여부를 볼 것이다.

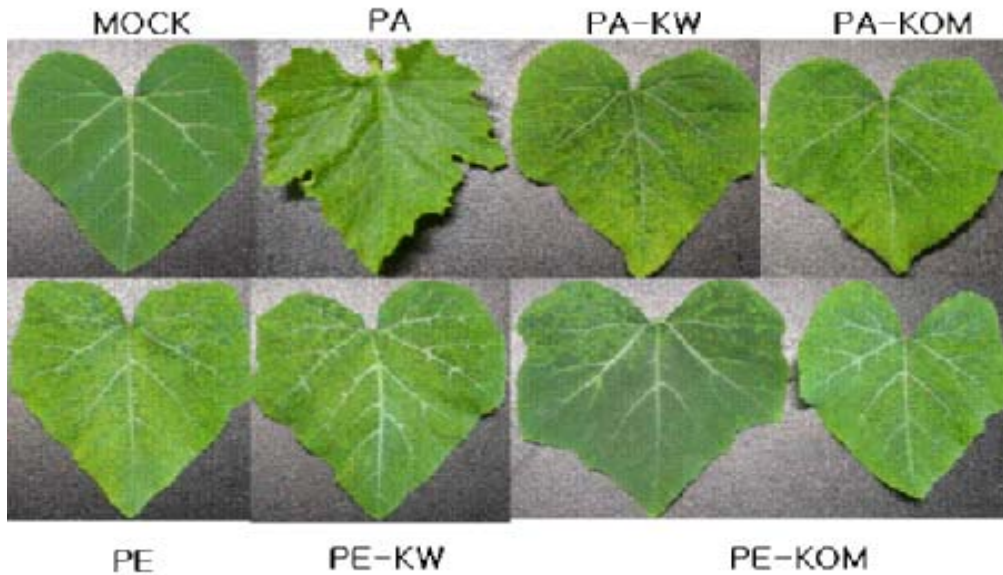


그림 3-1. ZYMV 와 CGMMV를 복합 감염시킨 주키니

#### 나. ZYMV와 CGMMV의 복합감염에서의 ultrastructure

포장에서는 바이러스의 단독 감염 보다 복합 감염 시 더 심각한 피해를 일으키거나 병징 발현에 있어서도 서로간의 상승 작용을 일으키는 예들이 있다. 이들 중 CGMMV가 속한 tobamovirus와 ZYMV가 속한 potyvirus간에 전자현미경으로 관찰 결과 기주 세포 내에서 nonagon의 형태로 structure가 형성되어 있는 것을 확인하였다(그림 3-2).



그림 3-2. Watermelon mosaic virus(Potyvirus)와 Cucumber mosaic virus(Tobamovirus)의 복합감염으로 야기된 ultrastructure(Nonagon)

이러한 내용을 바탕으로 ZYMV와 CGMMV의 strain과 기주에 따른 복합감염과 그의 ultrastructure를 살펴본 결과 이 두 바이러스 간에도 역시 nonagon의 structure를 확인하였고 nonagon의 형태가 아닌 다른 여러 가지 형태의 structure도 확인하였다(표 3-1과 그림 3-3).

표 3-1. 박과 작물에서 ZYMV와 CGMMV의 복합감염으로 야기된 ultrastructure

Ultrastructure	C.C+ WPSZ	C.C+ WC	C.W+ ZPA	C.W+ ZPS	C.W+ ZPE	C.C+ ZPA	C.C+ ZPS	C.C+ ZPE	C.M+ ZPA	C.M+ ZPS	C.M+ ZPE
Nonagon	+	+	+++	++	-	++	++	-	+++	++	-
Hexagon	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALA	-	-	++	-	-	+	-	-	+++	-	-
MMV	+	+	++	+	++	+	+	+	+++	++	++
PIST	++	+	++	++	-	++	++	++	+++	+++	+++

\* US: Ultrastructure, ALA: Angled-layer aggregate, MMV: Mitochondrial membrane vesiculation, PIST: Pinwheel inclusions in sieve tube.

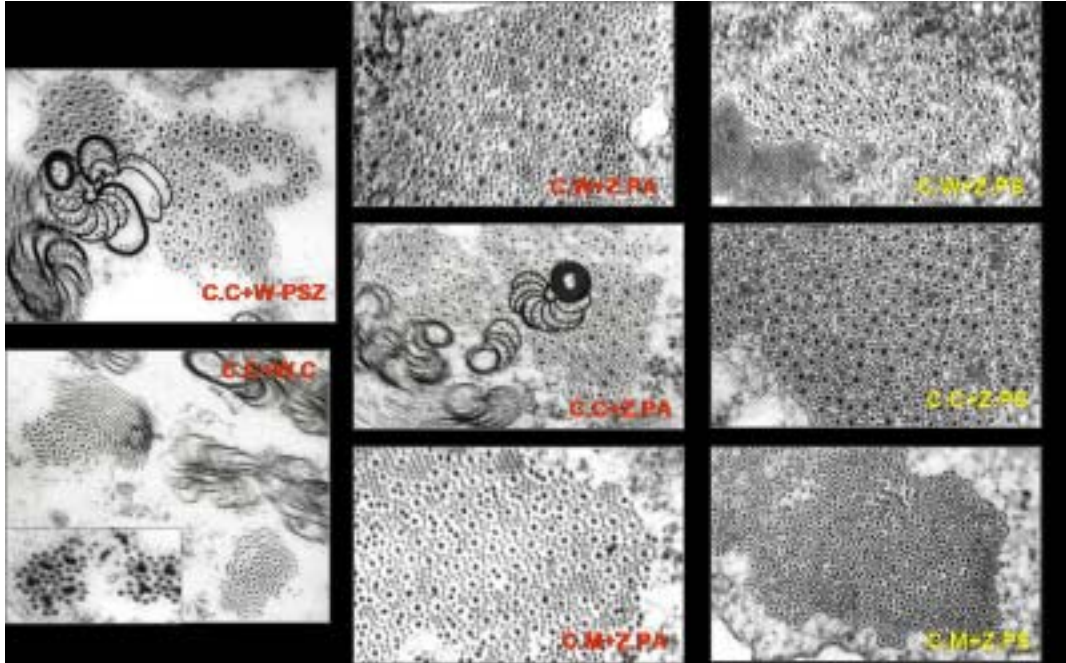


그림 3-3. Ultrastructure의 전자현미경상에서의 관찰.

ZYMV와 CGMMV의 복합 감염 시 전자현미경에서 관찰하였던 이러한 ultrastructure들은 병징 발현에 큰 역할을 하는 것으로 보여 지고 이렇게 structure를 형성함으로써 synergism을 일으키는 것으로 보여 진다. 이러한 structure는 바이러스의 병 발현의 상승효과와 함께 기주와도 어떠한 상호작용을 하는 것으로 추측된다.

#### 4. ZYMV의 병원성의 결정인자인 HC-PRO의 strain간 분석

##### 가. ZYMV의 strain 별 HC-PRO의 sequence 분석

Potyvirus group의 HC-PRO(helper component-protein)은 진딧물에 의한 전반을 중재하고 바이러스 증식에 중요한 역할을 하며 바이러스의 원 거리 이동에도 관여를 한다. 그리고 병징 발현과 바이러스로 인해 야기되는 gene silencing의 억제자로서도 이용되고 있다. 이에 착안하여 strain 별의 병징 상승에 영향을 미치는 것에 HC-PRO가 중요한 역할을 할 것으로 보았다. 그래서 ZYMV의 안동(ZYMV-PA), 의령(ZYMV-PE) 그리고 수원(ZYMV-PS)의 strain 과 pZYMV Gal-on(full genome

clone)의 HC-PRO를 코딩하는 유전자의 염기서열을 분석하였다. 각 strain간의 sequence는 이전에 모두 보고가 되어 있었고, 그래서 이들 간의 염기서열을 비교 분석해보았다.

HC-PRO의 아미노산 염기서열 분석 결과 ZYMV-PE와 ZYMV-PS는 모두 일치하였고, PA와 PE간에 세 개의 아미노산 염기의 차이가 났다(그림 4-1).

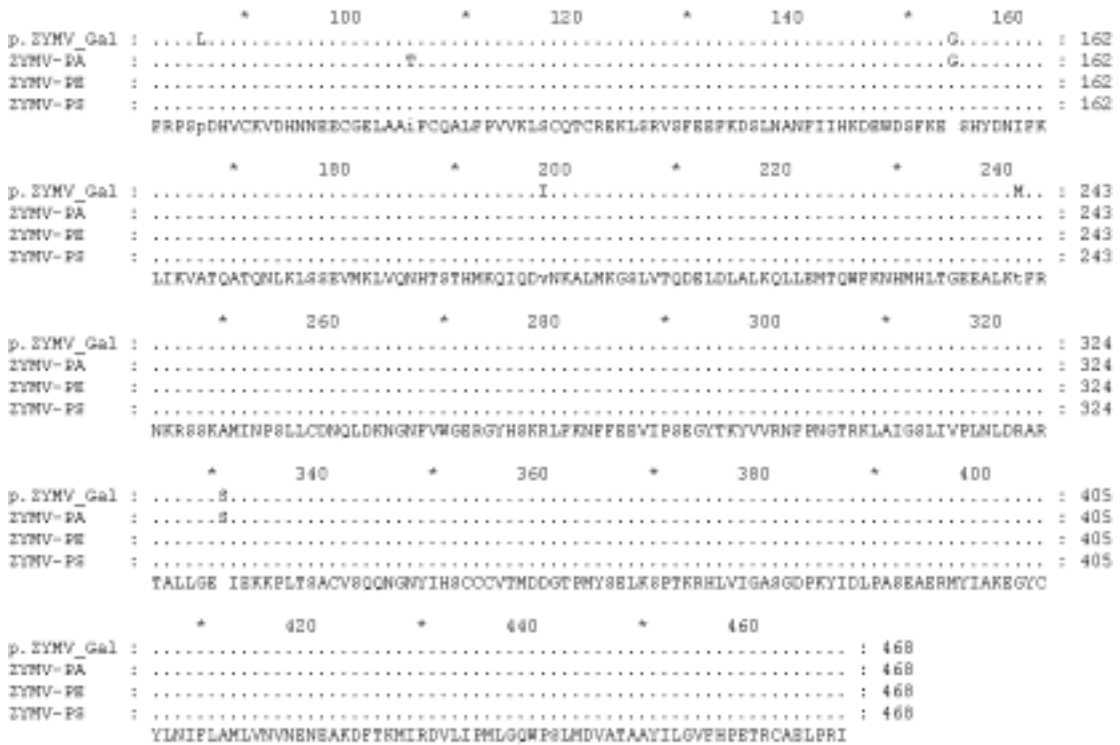


그림 4-1 . ZYMV의 full genome과 한국 strain의 HC-PRO 부분의 아미노산 염기서열 분석 비교

**나. ZYMV PA,PE와 ZYMV full genome clone간에 HC-PRO 유전자의 swapping**

염기서열 분석에서 이러한 염기서열의 차이가 병징 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 pZYMV Gal-on clone의 *BstE* II, *Bam*H I enzyme site를 이용하여 primer를 제작하고 ZYMV PA, PE를 증폭하여 pZYMV Gal-on clone에 유전자

swapping 하였다(그림 4-2).

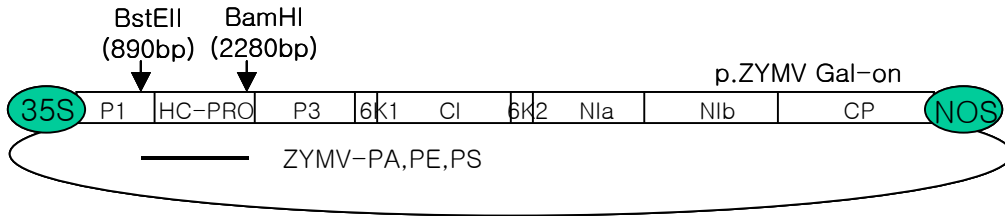


그림 4-2. 감염 가능한 ZYMV 벡터와 부분 치환에 이용된 계놈부분.

#### 다. Swapping 한 각 clone들의 슈키니에서 병징 차이 분석

식물세포 내에서 이식 유전자의 전사 수준을 조절하는데 사용하는 프로모터로는 cauliflower mosaic virus의 35S transcript 발현을 가능하게 하는 p35S를 가장 보편적으로 쓰는데 이는 상시로 거의 모든 조직에서 비교적 높은 수준으로 목적유전자를 발현시키는 특성이 있다. 우리가 swapping에 이용하였던 pZYMV Gal-on vector는 이 프로모터가 있으므로 식물체에 접종 실험 시 transcript를 따로 만들지 않고 DNA상태로 접종 하였다. 접종 시 병 발생에 적당한 DNA의 양을 알기 위해 pZYMV Gal-on DNA를 여러 농도로 슈키니에 기계적 접종을 실시하였다. 1, 4, 10, 20 $\mu$ g 양으로 접종해본 결과 10, 20 $\mu$ g에서 vein-clearing과 malformation 그리고 mosaic의 증상이 나타났다(그림 4-3).

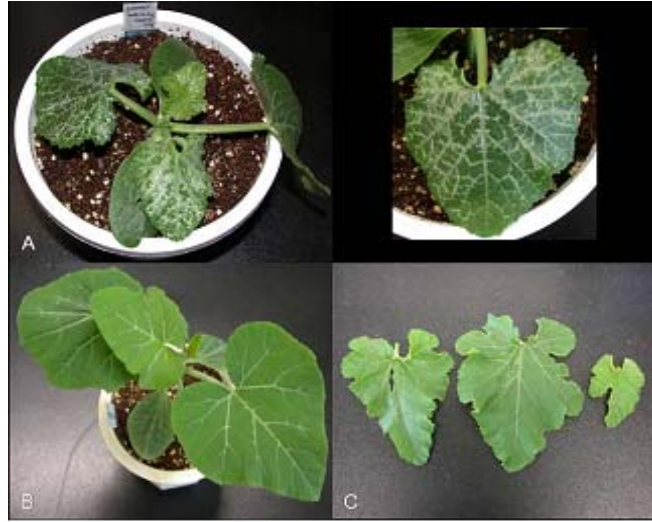


그림 4-3. 주키니에서 pZYMV Gal-on 의 plsmid DNA 20 $\mu$ g 기계적인 접종 결과 (A)와 (C)에서 각각 vein-clearing 과 malformation 그리고 mosaic 의 증상이 나타남. (B)는 MOCK임.

pZYMV Gal-on에 ZYMV-PA의 HC-PRO를 swapping한 pZA와 ZYMV-PE의 HC-PRO를 swapping한 pZE의 plasmid DNA도 동일한 양인 20 $\mu$ g 을 기계적으로 주키니에 접종하였다. 이 결과 대부분이 vein-clearing을 나타내었고 pZA에서는 몇 개체가 malformation 증상을 보였다(그림 4-4).



그림 4-4. pZA와 pZE의 기계적인 접종에 의한 주키니에서 나타난 병징. (A)의 왼쪽은 pZA에서 vein-clearing 오른쪽은 MOCK임. (B)의 왼쪽은 pZA에서 malformation 그리고 오른쪽은 MOCK임. (C)는 pZE에서의 vein-clearing.



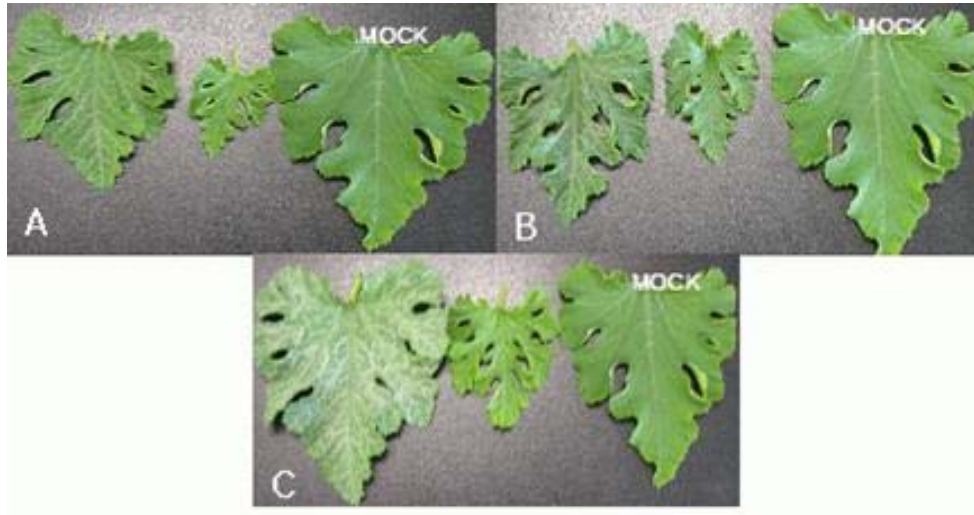


그림 4-5. Syringe inoculation에 의해 주키니에서 나타난 병징. (A)는 pZYMV Gal-on의 접종으로 vein-clearing의 병징 (B)는 pZA의 접종으로 vein-clearing의 병징 (C)는 pZE의 접종으로 severe한 vein-clearing의 병징이 나타남.

더 효율적인 DNA 접종 방법을 찾기 위해 syringe를 이용하여 주키니에 접종을 하였다. 이 방법은 세균의 HR-test 와 같이 잎 뒷면에 구멍을 내어 그 구멍으로 syringe를 이용해 DNA가 포함된 버퍼를 밀어 넣는 방법이다. 이 방법을 통한 접종실험결과 기계적인 접종 보다는 vein-clearing이 나타나는 빈도수가 더 높았다(그림 4-5).

#### 라. 병징에 따른 바이러스 증식 여부 판단

Vein-clearing과 malformation 그리고 mosaic의 증상이 정말 바이러스의 증식에 의한 것인지 판단하기 위해 우리는 RT-PCR 검증법을 이용하였다(그림 4-6). RT-PCR 검증에서 기계적인 접종과 syringe 접종에서 바이러스 증식을 확인하였지만 vein-clearing의 증상을 보였던 모든 잎에서 검출 되지는 않았다. 두 가지 접종 방법은 모두 3번 반복을 하였다(표 4-2). DNA 접종 시 기계적 접종이나 syringe를 이용한 접종에서 효율이 낮았으므로 현재 곰팡이를 식물체에 접종할 때 쓰이는 spray gun으로 주키니에 접종을 하였으나 이도 병징을 관찰할 수 없었다. 따라서 병원성을 결정하는 도메인이나 주요 아미노산을 검정하기 위해서는 보다 효율적이고 안정적인 접종방법이 필요하다는 것을 확인할 수 있었다.



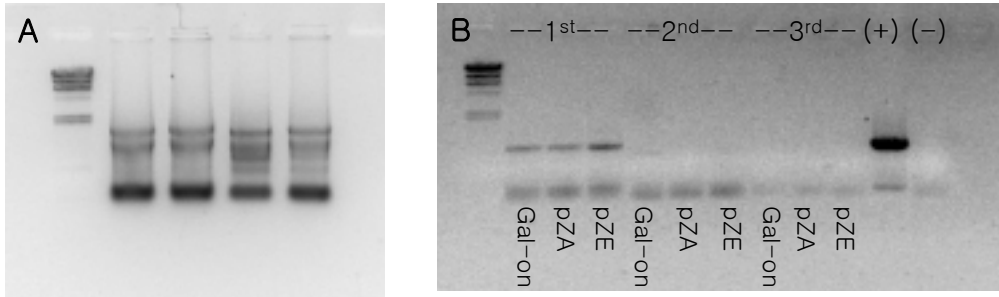


그림 4-6. (A)는 이병 옆에서 추출한 total RNA (B)는 RT-PCR. ZYMV CP를 증폭할 수 있는 primer 사용. (+)control은 pZYMV Gal-on(2ng), (-)control은 MOCK임.

표 4-2. pZYMV Gal-on, pZA 그리고 pZE의 두 가지 방법에 의한 병징 발현과 검증

	Mechanical inoculation				Syringe inoculation			
	1st	2nd	3rd	RT-PCR	1st	2nd	3rd	RT-PCR
<b>Gal-on</b>	VC, Mal, M 2(5)			O 1/1	VC 5(6)	VC 3(6)	VC 3(6)	O 1/3
<b>pZA</b>	SVC 1(5) Mal 1(5)	VC 4(6)	VC 3(5)	O 1/3	VC 5(6)	VC 4(6)	VC 4(6)	O 1/3
<b>pZE</b>	VC 2(5)	VC 0(6)	VC 1(5)	X 0/3	VC 4(6)	VC 3(6)	VC 3(6) SVC 4(6)	O 1/3

VC : vein clearing SVC : severe VC Mal : malformation M : mosaic

이전의 보고들에서 gene gun을 이용하여 식물체에 원하는 클론을 접종했을 때 그 효율이 다른 접종방법에 비해 접종 및 감염의 효율성이 높다고 알려져 있기에 박과작물에 형질 전환하는 내용들을 참고하여 Bio-Rad사의 Helios gene gun(그림 4-7)을 이용하여 DNA 접종 시도를 하였다. ZYMV 클론들의 시험에 앞서 35S 프로모터 벡터

를 모태로 제작한 *Potato virus X*(PVX)의 full genome 벡터를 이용하여 PVX의 기주 식물 중에 하나인 *Nicotiana benthamiana* 테스트하였다.



그림 4-7. Bio-Rad 사의 Helios gene gun.

PVX full length가 들어 있는 이 벡터는(pSNU1) 35S promoter를 두 개 가지고 multi cloning site(MCS)를 가지며 마지막에 NOS terminator를 가진 벡터로 35S promoter의 작용으로 DNA상태로 기주에서 증식이 가능한 벡터이다. 이 클론을 대장균에서 대량 증식 후 플라스미드 DNA만 순수 분리 후 이 플라스미드 DNA를 1 $\mu$ g사용하고 DNA 입자를 감싸서 helium의 압력을 견뎌 식물체 내로 성공적으로 DNA가 삽입되게 해주는 1 $\mu$ m의 gold particle을 사용하였다. 또한 helium의 압력은 기주 식물이 견뎌낼 수 있고 적절하게 DNA가 삽입될 수 있는 100psi정도로 하였다. 기주 식물과 gene gun의 거리에 따라서 (0, 3, 6cm) 테스트 하였으며 접종 후 4일 만에 심한 모자이크 증상을 관찰 할 수 있었다(그림 4-8). 또한 전신감염도 확인하여 PVX 고유의 병증임을 확인하였다.



그림 4-8. Gene gun을 이용하여 PVX/pSNU1를 *Nicotiana benthamiana*에 도입 후 나타난 PVX 병증. 접종 후 4일 후에 관찰.

Gene gun의 효율성을 확인하고 위의 테스트와 같은 조건으로 ZYMV 클론들을 기주 식물인 슈키니에 도입하였지만 이 역시도 병증 확인을 하지 못했다. 여러 시도들의 실패원인을 찾던 중 ZYMV의 말단의 염기서열에 문제가 있음을 확인하였다. 아래의 염기서열 분석에서 처럼 ZYMV 말단 후에 16개의 polyA tail이 아닌 염기서열들이 존재하여(그림 4-9) 아마도 이러한 잘못된 염기서열로 인하여 식물체내에서의 증식이 어려웠던 것으로 보인다.

CCCCCTTTAAAGCGTAAATTTATGTTAGTTGTCCAGGAGTGCGTAGTCCTG  
TCGGAAGCTTTAGTGTGAGCTCTCACGAATAAGCTCGAGATTAGACTCCGTT  
TGCAAGCCT

**-ZYMV 3'end(Gal-on)**

TGGGGCAAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAATAAAGGTACCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTT  
TCTTAAGATT

**(NOS)**GAATCCTGTTGCCGGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAA  
TTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAG  
ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAT**(NOS)**

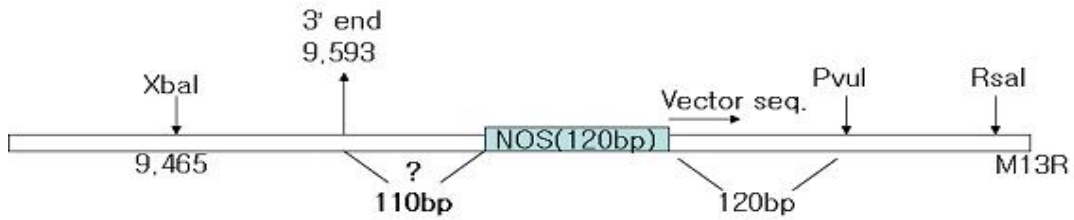


그림 4-9. pZYMV Gal-on 클론중 ZYMV 말단 부분의 모식화. 말단 부분에 110bp의 연관이 없는 염기서열의 존재를 시퀀싱으로 확인함.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 pZYMV Gal-on 벡터에서 PCR로 ZYMV 부분만을 증폭해 내고 *SalI*과 *SmaI*의 제한효소를 이용하여 pSNU1 벡터에 삽입하기로 하였다. PCR증폭을 통하여 필요 없는 염기서열을 제거하고 PVX의 병징이 확실하게 잘 일어났던 pSNU1 벡터에 삽입하여 다시 gene gun 테스트를 해보고자 하였다. 그림 4-10에서처럼 한번에 10kb가까운 ZYMV full length를 증폭했다. pSNU1 벡터에는 *SalI* site가 존재하지 않으므로 벡터도 함께 증폭을 하여 두 제한효소 처리 후 클로닝을 시도하여 새로운 클론을 제작하고 있다. 이 클론을 얻게 된다면 PVX/pSNU1 클론의 gene gun을 이용한 도입처럼 쉽게 병징을 확인할 수 있을 것이고 향후 연계 연구에서 중요하게 이용될 수 있을 것이다.

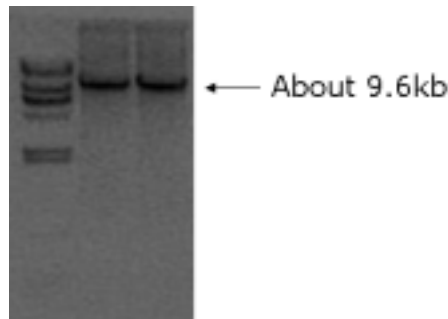


그림 4-10. ZYMV full length의 PCR 증폭.

## 5. ZYMV와 CGMMV의 복합감염에 따른 synergism의 결정인자인 CP간의 분석

일반적으로 바이러스의 외피단백질은 바이러스가 식물에 감염될 때 RNA를 둘러싸고 있는 가장 일차적으로 표출되고 있는 부분으로서 여러 종류의 바이러스가 한 기주에 감염되어질 때 가장 먼저 상호작용이 일어날 것으로 여겨지며, 특히 바이러스의 병징

및 기주범위를 결정하는데 외피단백질이 중요하다고 보고된바 있으며 특히, ZYMV와 CGMMV의 복합감염에 있어서도 병징이 심한 조직을 관찰하였을 때 이 두 바이러스에 의한 ultrastructure가 관찰되는 것으로 보아 외피단백질의 상호작용이 synergism을 유발하는 것으로 예상된다. 또한 외피단백질은 바이러스 이동과 전반 및 기주 결정인자들을 포함하고 있다는 보고가 여러 차례 있었으며 바이러스 간 단백질 상호작용 시에도 외피단백질의 상호작용이 병의 진전에 중요하다고 알려져 있다. 따라서 우리는 yeast two hybrid system을 이용한 CP간의 상호작용을 알아보하고자 다음과 같이 실험을 진행하였다.

### 가. Yeast two hybrid system

Yeast 내에 transformation 하기 위해 activation domain을 가진 bait vector(pACT2)와 prey vector(pAS2-1)(그림 5-1)에 두 바이러스의 CP를 코딩하는 유전자 부분을 cloning 하고 있다. 벡터에 cloning 하기 위해 각 바이러스의 CP를 코딩하는 유전자의 염기서열과 특이 enzyme site가 들어가 있는 프라이머를 이용하였다. ZYMV-PA와 PE는 바이러스가 감염된 이병 옆에서 total RNA를 추출 후 제작한 프라이머를 이용하여 RT-PCR(그림 5-2)을 하여서 약 900bp의 밴드를 얻었고 이것을 pAS2-1 및 pACT2 벡터에 각각 클로닝하였다.

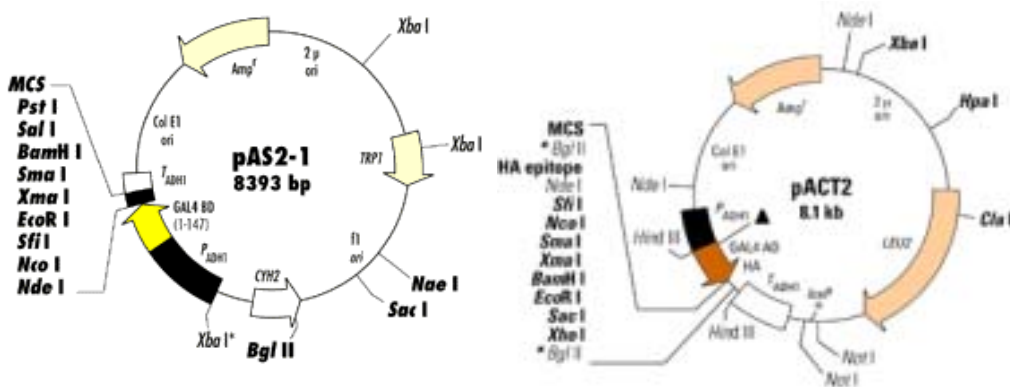


그림 5-1. Yeast two hybrid system의 bait vector(오)와 prey vector(왼)의 map

CGMMV는 이전에 full genome clone이 확보되어 있었다. (pCR-XL-TOPO) 이 clone을 이용하여 enzyme site가 삽입된 CP 프라이머를 제작 후 PCR 증폭하였다(그림 5-3). PCR 증폭으로 약 500bp정도의 단편을 얻었다.

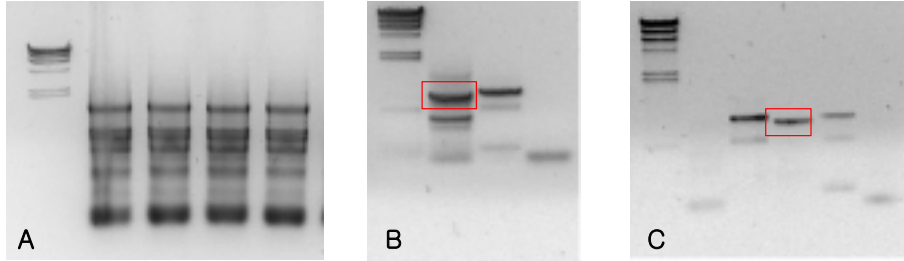


그림 5-2. (A) ZYMV PA와 PE의 이병 옆에서 추출한 total RNA. 제작한 프라이머로 증폭한 ZYMV-PA의 단편(B)과 ZYMV-PE(C)의 단편.

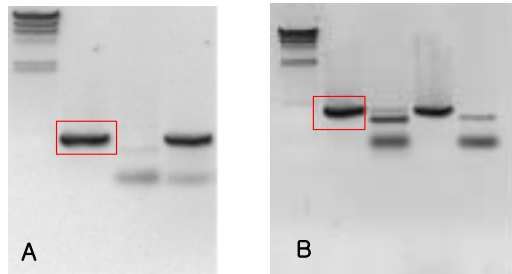


그림 5-3. CGMMV full genome clone에서 증폭한 KOM(A)과 KW(B)의 단편

#### 나. CGMMV와 ZYMV의 strain 별 CP의 아미노산 염기서열 분석

CGMMV와 ZYMV의 strain별 CP 아미노산 차이를 알아보기 위해 이전 보고된 염기서열을 바탕으로 비교 분석 해 보았다(그림5-4, 5-5).

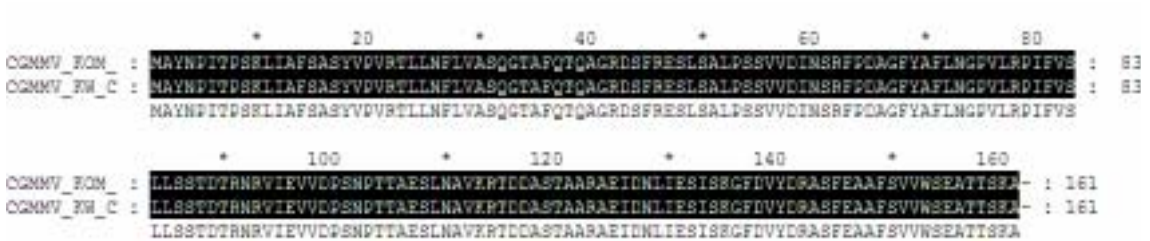


그림 5-4. CGMMV-KW strain과 -KOM strain의 CP부분 아미노산 염기서열 분석 비교

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
ZYMV_FA_CP : SGTQQTVAAGATETFEEDCKFAKNREATSSGGSEETVAAYV...LVNAGSHSKIVPRLSSITFKMSLPRV...VILCIDHLLS : 83
ZYMV_PE_CP : SGTQQTVAAGATETFEEDCKFAKNREATSSGGSEETVAAYV...LVNAGSHSKIVPRLSSITFKMSLPRV...VILCIDHLLS : 83

      *           100          *           120          *           140          *           160
ZYMV_FA_CP : YRFDQIELYNTTRASRQQFASNFHQVETTYDLNDQDQMGVYMGFRVWCIEMGTSFQINGVWYHMDGNEQVEYFLKPIVEMARF : 166
ZYMV_PE_CP : YRFDQIELYNTTRASRQQFASNFHQVETTYDLNDQDQMGVYMGFRVWCIEMGTSFQINGVWYHMDGNEQVEYFLKPIVEMARF : 166

      *           180          *           200          *           220          *           240
ZYMV_FA_CP : LKQIMHHFSDAAAYIEMRNAAEAPYMPRYGLIEMLRDRLARYAFDFEYVNSITFERAREAVAGHFAAALSNVSSRLPGLDGN : 249
ZYMV_PE_CP : LKQIMHHFSDAAAYIEMRNAAEAPYMPRYGLIEMLRDRLARYAFDFEYVNSITFERAREAVAGHFAAALSNVSSRLPGLDGN : 249

      *           260
ZYMV_FA_CP : VATTSEKTERHTARCVNRRHMTLLGVWNG : 279
ZYMV_PE_CP : VATTSEKTERHTARCVNRRHMTLLGVWNG : 279

```

그림 5-5. ZYMV-PA strain과 -PE strain의 CP부분 아미노산 염기서열 분석 비교

CP의 아미노산 염기서열 분석 결과, CGMMV의 두 strain간에는 차이가 없었고 ZYMV는PA와 PE간에 두 개의 아미노산이 차이가 남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 CGMMV와 ZYMV의 복합 감염 시 형성하는 ultrastructure가 PA strain과의 복합 감염 시에는 강하게 나타나고 PE strain과는 거의 나타나지 않는 것과는 관련이 있는 것으로 여겨진다. 따라서 CGMMV의 한 strain인 KW와 ZYMV의 두 strain PA와 PE의 CP를 각각 pAS2-1 vector와 pACT2 vector에 삽입시켜 cloning하였다.

#### 다. 클로닝과 아미노산 염기서열 분석

Cloning을 하여 각각의 클론들을 얻었고, 이들 클론의 plasmid DNA를 대량 확보하기 위해 maxi-prep.하였으며 *Bam*H I enzyme digestion을 수행하여 insert와 vector를 확인 하였다(그림 5-6).

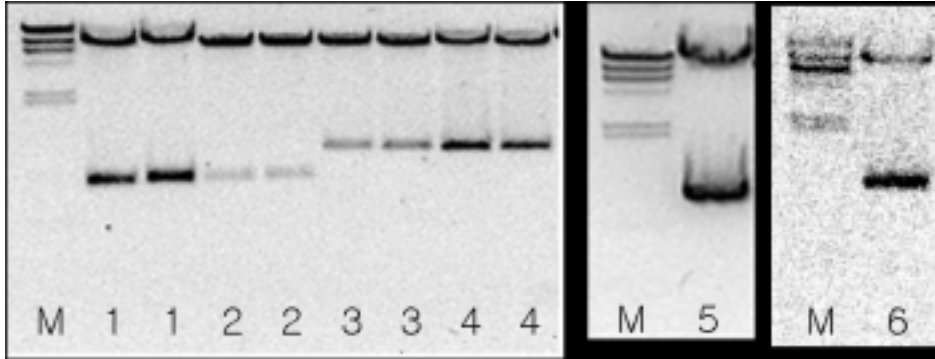


그림 5-6. CGMMV와 ZYMV의 각 CP를 코딩한 클론들을 maxi-prep. 후 enzyme digestion으로 확인. Lane M, DNA/*Hind*III marker; lane 1,CGMMV CP in pAS2-1; lane 2,CGMMV CP in pACT2; lane 3,ZYMV(PA) CP in pACT2; lane4, ZYMV(PA) CP in pAS2-1; lane5,ZYMV(PE) CP in pAS2-1; lane 6,ZYMV(PE) CP in pACT2.

확인한 클론들을 염기서열 분석을 실시하였고, 기존 보고된 CP 아미노산 염기서열과 비교하였다(그림 5-7, 5-8).

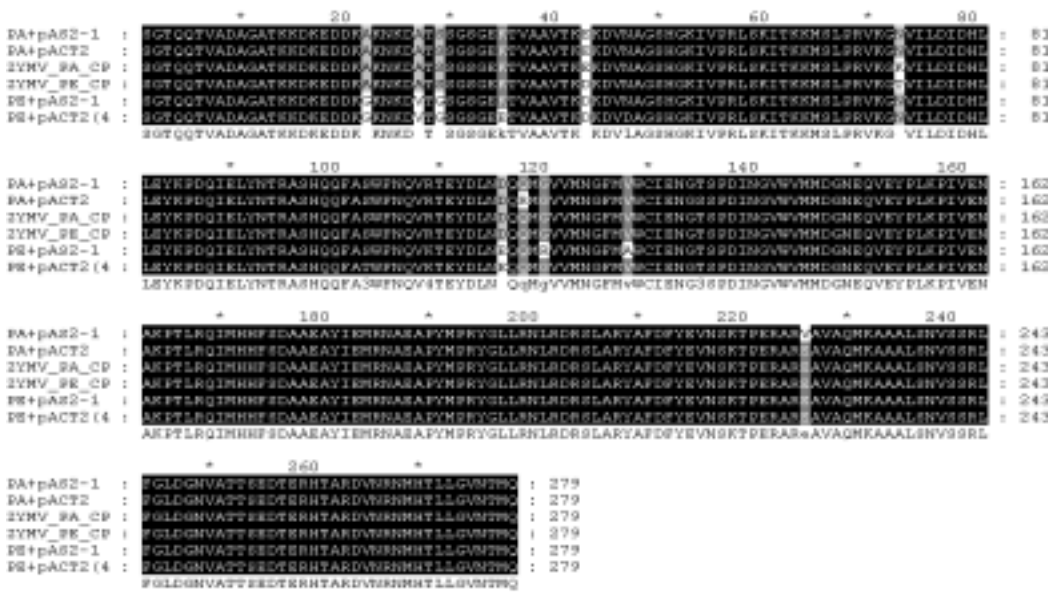


그림 5-7. ZYMV-PA, PE CP 코딩한 각 클론 간 아미노산 염기서열 비교



```

      *      20      *      40      *      60      *      80
KM+pAS2-1( : AYNSITPKRLIAFASAYVVPVSTLLMFLVASQQTAFQTQAGRCDFREELGALDSEVVDINERFIDAGFYAFLLNGPVLRIFVY : 82
KM+pACT2   : AYNSITPKRLIAFASAYVVPVSTLLMFLVASQQTAFQTQAGRCDFREELGALDSEVVDINERFIDAGFYAFLLNGPVLRIFVY : 82
CGMMV_KM_C : AYNSITPKRLIAFASAYVVPVSTLLMFLVASQQTAFQTQAGRCDFREELGALDSEVVDINERFIDAGFYAFLLNGPVLRIFVY : 83
      *      100     *      120     *      140     *      160
KM+pAS2-1( : LLSSTDTNHRVIEVYDFSNPTTAEGLNAVVRTDDASTAARASIDNLIESTSGGFVYDRAFFSAAFVYVNSRATTSKA- : 160
KM+pACT2   : LLSSTDTNHRVIEVYDFSNPTTAEGLNAVVRTDDASTAARASIDNLIESTSGGFVYDRAFFSAAFVYVNSRATTSKA- : 160
CGMMV_KM_C : LLSSTDTNHRVIEVYDFSNPTTAEGLNAVVRTDDASTAARASIDNLIESTSGGFVYDRAFFSAAFVYVNSRATTSKA- : 161
      LLSSTDTNHRVIEVYDFSNPTTAEGLNAVVRTDDASTAARASIDNLIESTSGGFVYDRAFFSAAFVYVNSRATTSKA

```

그림 5-8. CGMMV(KW)의 CP를 코딩한 클론들의 아미노산 염기서열 비교

아미노산 염기서열 비교 분석 결과 CGMMV-KW CP를 pACT2 vector에 삽입한 아미노산의 염기서열은 기존의 KW 염기서열과 일치하였고, pAS2-1 vector에 삽입한 CP의 경우에는 한 개의 아미노산이 달랐다. 한편 ZYMV CP를 삽입한 클론들의 경우, PA strain과 PE strain간 차이가 나는 두 곳 이외에도 클론별로 1~6개의 아미노산이 더 바뀌어져 있음을 알 수 있었다. 특히, 차이가 있던 한 개의 아미노산 부분 (PA-K, PE-T)은 PA, PE 모두 N으로 바뀌어져 있었다. 이러한 차이들은 자연변이나 PCR 과정의 변이로 인한 것으로 보이나 일단이들 클론을 이용하여 yeast two hybrid 실험을 수행해 보았다.

#### 라. Yeast two hybrid system을 이용한 상호작용 고찰

##### 1) PA-PA, PE-PE, CG-CG 자가 상호작용

먼저 control로써 ZYMV-PA(PA), ZYMV-PE(PE), CGMMV(CG) 각각의 자가 상호작용을 알아보기 위해 yeast에 각각의 CP 조합을 co-transformation하였다(그림 5-9, 5-10).

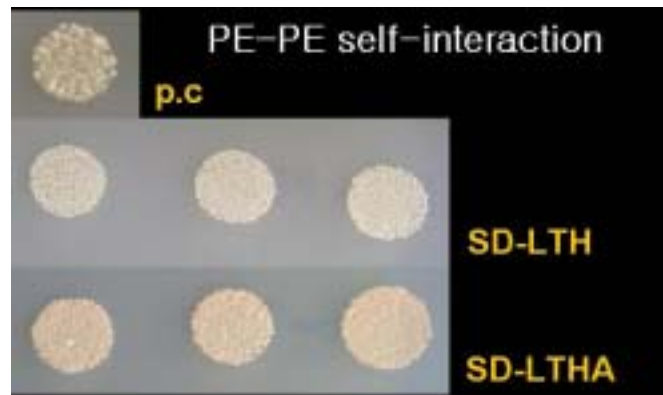


그림 5-9. ZYMV-PE CP간의 자가 상호작용.

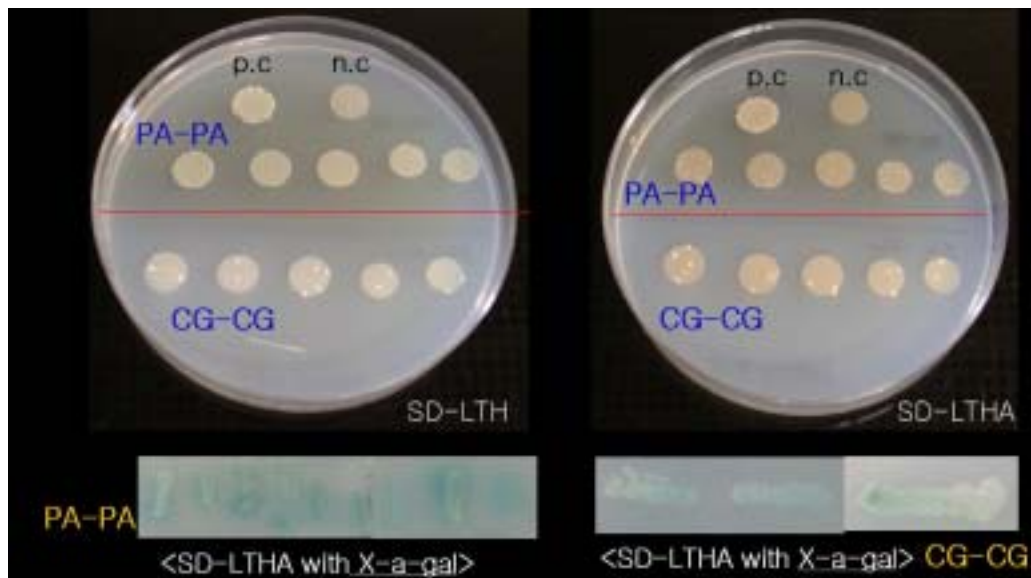


그림 5-10. ZYMV-PA와 CGMMV 각각의 CP 자가 상호작용.

PA-PA, PE-PE, CG-CG의 CP 조합이 SD-LTH (leucine, tryptophan, histidine이 첨가되지 않은 SD배지)선택배지와 SD-LTHA (leucine, tryptophan, histidine, alanine이 첨가되지 않은 SD배지)선택배지에서 콜로니가 형성됨을 보아 각각 자가 상호작용을 함을 알 수 있었다. 또한 SD-LTHA에 X- $\alpha$ -gal을 도말한 배지에서 콜로니가 푸른색을 띄는 색깔 반응도 나타남으로써 자가 상호작용을 다시 한 번 확인하였다. 또한 여기에서 ZYMV CP간의 자가 상호작용은 CGMMV CP간의 자가 상호작용 보다 더 강

하게 나타남을 알 수 있다.

## 2) ZYMV-PA와 PE의 상호작용

ZYMV-PA strain과 PE strain의 CP간 상호작용도 보기 위해 co-transformation 해 보았다 (그림 5-11).

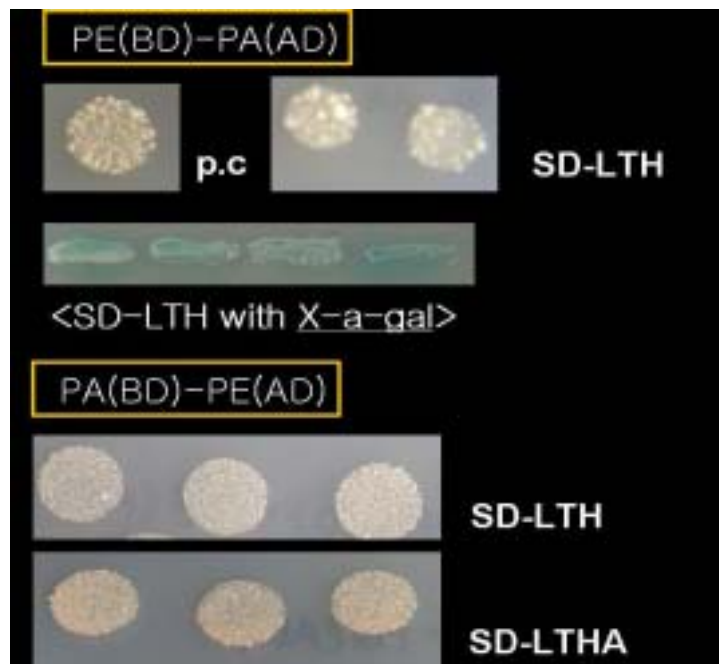


그림 5-10. ZYMV-PA strain과 PE strain의 CP간의 상호작용.

PE CP를 binding domain(BD)을 가진 pAS2-1 vector에 삽입하고 PA CP를 activation domain(AD)를 가진 pACT2 vector에 삽입하여 yeast에 co-transformation 한 결과 SD-LTH 선택배지에서 콜로니가 자랐고 X-gal을 도말한 배지에서 푸른색을 띄면서 자람으로써 PE-PA CP 간 상호작용을 함을 확인 할 수 있었다. 또한 두 strain별 vector를 바꾸어 삽입한 CP의 조합 (PA(BD)-PE(AD))에서도 SD-LTH와 SD\_LTHA 선택배지에서 콜로니가 자라므로 PA와 PE strain의 CP가 어떤 vector에 들어가 있음에 상관없이 서로 상호작용을 함을 알 수 있다.

## 3) ZYMV-PA와 CGMMV 간, 그리고 ZYMV-PE와 CGMMV 간의 상호작용

ZYMV-PA strain과 PE strain CP의 차이가 CGMMV와의 복합 감염에서 병징 상승

효과나 세포 내 ultrastructure 형성과의 관여를 알아보기 위해 yeast 내에 co-transformation 시켜 CP간의 상호작용의 차이에 대해 알아보았다(그림 5-11).

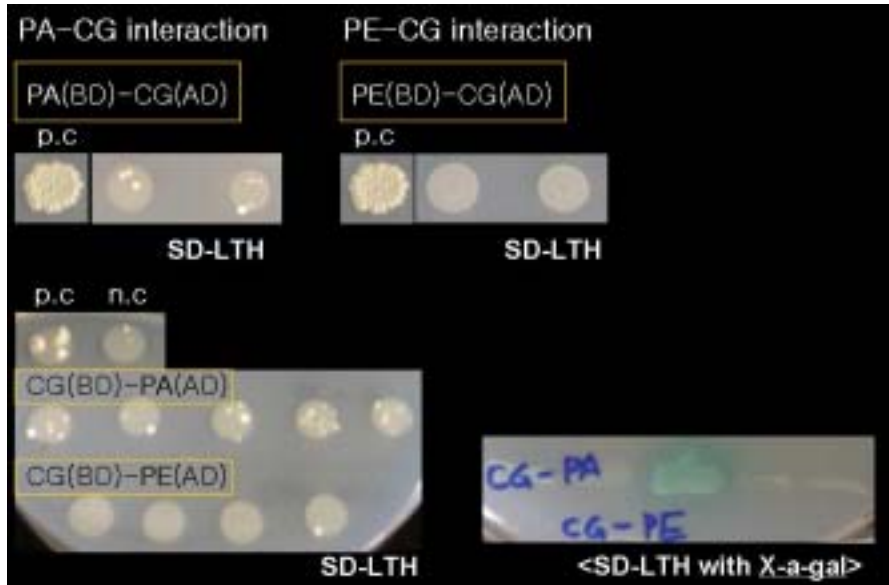


그림 5-11. ZYMV-PA와 CGMMV 간, ZYMV-PE와 CGMMV 간의 CP 상호작용.

먼저 CGMMV의 CP를 AD vector에 삽입하고, ZYMV의 PA, PE CP를 각각 BD vector에 삽입하여 yeast에 transformation 시킨 결과 SD-LTH 배지에서 PA-CG의 경우 콜로니가 형성 되는 반면, PE-CG는 콜로니가 나타나지 않았다. 또한, vector의 조합을 바꾸어 CGMMV의 CP를 BD vector에 삽입하고, PA와 PE CP를 각각 AD vector에 삽입하여 co-transformation 시킨 결과도 역시나 SD-LTH 배지에서 CG-PA 조합에서는 콜로니가 자랐으나 CG-PE는 거의 형성되지 않았다. CG-PE 조합에서 하나의 콜로니가 자랐으나 X- $\alpha$ -gal을 도말한 SD-LTH 배지에서 확인해 본 결과, CG-PA의 콜로니가 푸른색을 띄며 자라는 것에 비해 CG-PE의 콜로니는 푸른색을 띄지 않고 거의 자라지도 않았다.

이렇게 선택배지에서 자란 콜로니들을 다시 한 번 확인하기 위해 단일 콜로니들을 취하여 SD-LT 액체 배지에서 키운 뒤 희석 배수를 다양하게 하여 SD-LTHA 고체 배지에 떨어뜨리고 콜로니가 자라는 것을 관찰하였다(그림5-12, A). 관찰 결과 위의 실험 결과의 양상과 동일하게 나왔으며 이러한 실험 결과들을 정리하여 그림으로 나타내 보았다(그림5-12, B).

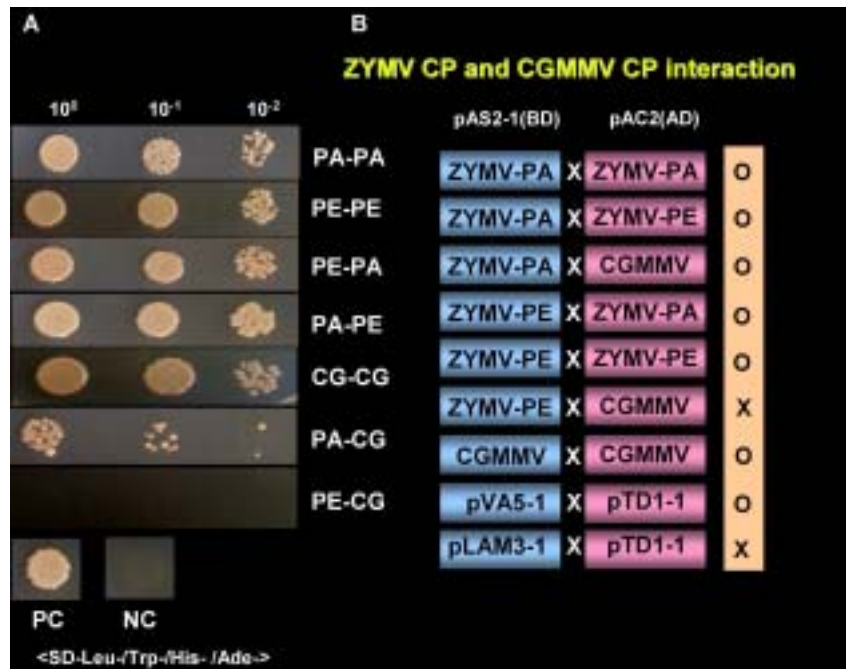


그림 5-12. ZYMV CP와 CGMMV CP간의 상호작용.

결과들을 미루어 볼 때 ZYMV-PA strain과 CGMMV의 CP간에는 상호작용이 있음을 알 수 있고, 반면 ZYMV-PE strain과 CGMMV의 CP간에는 상호작용이 일어나지 않음을 알 수 있다. 이는 ZYMV와 CGMMV를 박과작물에 복합 감염 시킨 후 식물 세포를 전자현미경으로 관찰 했을 때 ZYMV-PA와는 ultrastructure를 형성하지만 ZYMV-PE와는 형성하지 않았던 결과와도 부합하는 결과라 할 수 있겠다.

Yeast two hybrid 분석에 이용된 ZYMV-PA strain과 ZYMV-PE strain의 외피단백질간에는 모두 6개의 아미노산의 차이가 확인되었는데 이는 외피단백질에 존재하는 6개의 아미노산 중 일부 또는 모든 아미노산이 CGMMV의 CP와 상호작용하는데 중요하게 작용했음을 암시한다. 이들 아미노산들의 변이에 따른 상호작용을 더 파악하기 위하여 바이러스가 감염된 식물에서 전체 RNA를 추출하고 이를 RT-PCR에 의해 각 strain의 외피단백질을 증폭하여 ZYMV의 두 strain(PA, PE)과 CGMMV의 각각의 CP를 pAS2-1 vector와 pACT2 vector에 삽입하여 클로닝하고, 이를 이용하여 yeast에 co-transformation 시켜 상호작용을 알아보았다. RNA 바이러스는 식물체에서 증식하는 과정에서 상당히 높은 변이능력( $10^{-4}$ )을 가지고 있으므로 전체 RNA를 이용한 클로닝은 또 다른 변이를 가지고 있는 돌연변이체들을 확보하게 해 줄 것이다. 예 상대로 CGMMV와의 복합 감염에서 어떠한 결정적 영향을 미칠 것이라 예상이 되는

ZYMV의 CP 클론들 아미노산 염기서열이 비교 결과, 기존의 보고된 아미노산 염기서열과는 몇 개 부분에서 변이가 일어나 바뀌어져 있음을 확인하였다. 같은 strain의 CP도 두 vector에 삽입된 아미노산 염기서열이 조금 차이가 났다. 또한 ZYMV가 삽입된 plasmid를 주형으로 증폭된 CP를 이용하여 클로닝도 병행하였다(그림 5-13). 이러한 돌연변이 클론들은 좀 더 정확한 실험을 하기 위해 기존 염기서열과 같은 ZYMV-PA, PE 의 CP를 pAS2-1, pACT2 vector에 다시 클로닝하기로 하였다.

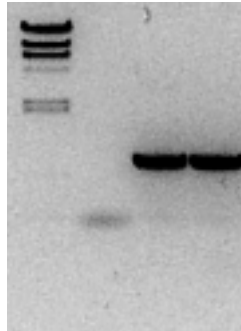


그림 5 M 1m 3k PA PE  
ZYMV-PA와 PE,  
CP 증폭.

그 다음, 증폭한 CP를 염기서열 분석을 통하여 기존 ZYMV와 비교해 보았다(그림 5-14).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
PA-T21-CP_ : SGTQQTVADAGATKEDKEDDEAKNKDATSGGGEKTVAAVTSEKDVNAGSHGKIYPRLSKITKMSLPRVKGWVLDIDHLLS : 83
PE-T26-CP_ : SGTQQTVADAGATKEDKEDDEAKNKDATSGGGEKTVAAVTSEKDVNAGSHGKIYPRLSKITKMSLPRVKGWVLDIDHLLS : 83
ZYMV_PE_CP_ : SGTQQTVADAGATKEDKEDDEAKNKDATSGGGEKTVAAVTSEKDVNAGSHGKIYPRLSKITKMSLPRVKGWVLDIDHLLS : 83
ZYMV_PA_CP_ : SGTQQTVADAGATKEDKEDDEAKNKDATSGGGEKTVAAVTSEKDVNAGSHGKIYPRLSKITKMSLPRVKGWVLDIDHLLS : 83

*      100     *      120     *      140     *      160
PA-T21-CP_ : YKFDQIILYNTRAEHQGFADRFNQQVRYEYDGLNDQCHGVNMGFMVVCIEINGTSPDINGVFWMDGMBQVSEYFLKPIVENAKPT : 166
PE-T26-CP_ : YKFDQIILYNTRAEHQGFADRFNQQVRYEYDGLNDQCHGVNMGFMVVCIEINGTSPDINGVFWMDGMBQVSEYFLKPIVENAKPT : 166
ZYMV_PE_CP_ : YKFDQIILYNTRAEHQGFADRFNQQVRYEYDGLNDQCHGVNMGFMVVCIEINGTSPDINGVFWMDGMBQVSEYFLKPIVENAKPT : 166
ZYMV_PA_CP_ : YKFDQIILYNTRAEHQGFADRFNQQVRYEYDGLNDQCHGVNMGFMVVCIEINGTSPDINGVFWMDGMBQVSEYFLKPIVENAKPT : 166

*      180     *      200     *      220     *      240
PA-T21-CP_ : LRQIMHHPSDAAEAYIEMRMASAFYNDRYGLLRNLRDRSLARYAFDFTEVNSKTPERAREAVACMKAAALSNVSESLFGLDGN : 249
PE-T26-CP_ : LRQIMHHPSDAAEAYIEMRMASAFYNDRYGLLRNLRDRSLARYAFDFTEVNSKTPERAREAVACMKAAALSNVSESLFGLDGN : 249
ZYMV_PE_CP_ : LRQIMHHPSDAAEAYIEMRMASAFYNDRYGLLRNLRDRSLARYAFDFTEVNSKTPERAREAVACMKAAALSNVSESLFGLDGN : 249
ZYMV_PA_CP_ : LRQIMHHPSDAAEAYIEMRMASAFYNDRYGLLRNLRDRSLARYAFDFTEVNSKTPERAREAVACMKAAALSNVSESLFGLDGN : 249

*      260     *
PA-T21-CP_ : VATTSEIDSRHTARDVNRMMKTLGAVTMC : 279
PE-T26-CP_ : VATTSEIDSRHTARDVNRMMKTLGAVTMC : 279
ZYMV_PE_CP_ : VATTSEIDSRHTARDVNRMMKTLGAVTMC : 279
ZYMV_PA_CP_ : VATTSEIDSRHTARDVNRMMKTLGAVTMC : 279

```

그림 5-14. 증폭한 ZYMV의 CP의 기존 ZYMV 아미노산 염기서열과의 비교.

이들 돌연변이를 함유한 클론들을 대상으로 다시 Yeast two hybrid 분석을 시도하여 ZYMV-PA strain과 ZYMV-PE strain 및 CGMMV의 외피단백질 간 상호작용에 미치는 영향을 확인하였다. 새로 얻은 클론들을 이용하여 앞에서와 같이 yeast에 co-transformation 시켜 상호작용을 보았다(그림 5-15).

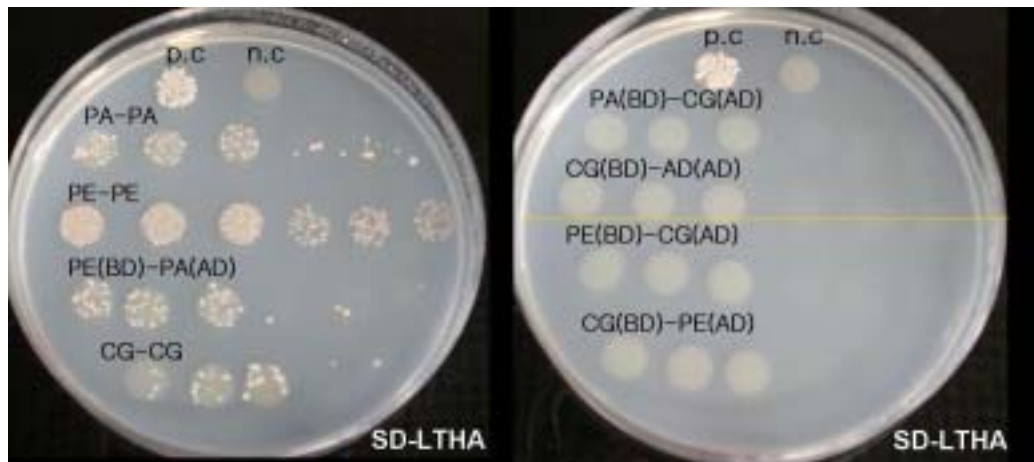


그림 5-15. ZYMV 새 클론과 CGMMV 클론을 이용하여 yeast에 CP를 co-transformation한 결과.

그 결과, PA-PA, PE-PE, PE-PA, CG-CG 와 같은 자가 상호작용은 앞에서의 실험 결과와 같게 나왔으나, 앞선 ZYMV 클론들을 이용했을 때 CGMMV CP와 상호 작용을 했던 PA strain이 이번에는 SD-LTHA 배지에서 콜로니를 형성하지 않음으로써 상이한 결과가 나왔다. 이러한 결과에 대해서 생각해 볼 수 있는 것은 배지상의 문제나 실험 방법상의 문제 등에 의해서 일수도 있으나, 한편으로는 앞선 ZYMV 클론들의 아미노산을 비교 해 보았을 때 다른 변이가 있었던 아미노산들이 상호 동일하게 변화됨으로서 생긴 결과일 가능성이 높은 것을 암시한다.

변화를 보인 돌연변이주를 대상으로 비교 결과 PE CP(PE-T26-CP)는 기존 보고된 ZYMV-PE의 CP부분과 일치하였고, PA CP(PA-T21-CP)는 2개의 아미노산이 다른 것으로 나타났다. 이러한 새로 증폭한 CP의 아미노산 염기서열은 이전 클로닝을 통한 클론과 비교하여, PE는 변이가 있었던 부분이 모두 원래의 아미노산으로 바뀌었고, PA도 모두 원래의 아미노산으로 바뀌었으나 PA와 PE간 차이가 났던 2개의 아미노산 중 하나가 K가 아닌 N으로 여전히 바뀌어 있음을 알 수 있고, 이전 클론에서는 변이가 없었던 한 개의 아미노산이 새롭게 바뀌어 있었다. 이렇게 새로 제작된 클론들 중 상호작용에 변화를 야기한 클론들을 대상으로 다시 아미노산 염기서열 분석을 실시하였다(그림5-16). 순서는 첫 번째 줄부터 4번째 줄까지는 PA CP를 pAS2-1 vector에 삽입한 클론, pACT2 vector에 삽입한 클론, PCR 주형이 된 클론, 기존 보고된 염기서열 순이며, 5번째 줄부터 마지막 줄까지는 PE CP를 위와 같은 순서로 비교한 것이다.



```

*          20          *          40          *          60          *          80
PA_CF_in_p : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
PA_CF_in_p : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
PA-T21-CP : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
ZYMV_PA_CP : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
PE_in_pAS2 : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
PE_in_pACT : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
PE-T26-CP : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
ZYMV_PE_CP : SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL : 81
SGTQQTVDAGATKRDREDDKAFNKDATSSGGGERTVAAVTKRDVWAGSHGRIVRRLSKITKMSLSRVVGGVILDIQHL

*          100         *          120         *          140         *          160
PA_CF_in_p : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
PA_CF_in_p : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
PA-T21-CP : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
ZYMV_PA_CP : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
PE_in_pAS2 : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
PE_in_pACT : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
PE-T26-CP : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
ZYMV_PE_CP : LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM : 162
LEYKSDQIELENTASHQQFASRFNQVRYEYDLNDQMGVVMNGFNVACIENGTSPDIMGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVEM

*          180         *          200         *          220         *          240
PA_CF_in_p : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
PA_CF_in_p : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
PA-T21-CP : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
ZYMV_PA_CP : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
PE_in_pAS2 : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
PE_in_pACT : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
PE-T26-CP : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
ZYMV_PE_CP : AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL : 243
AKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMHNASAPYMPRYGLLNLDRSLAKYAFDFYEVN8KTPEFARSAVAQNKAAALSHV93RL

*          260          *
PA_CF_in_p : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
PA_CF_in_p : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
PA-T21-CP : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
ZYMV_PA_CP : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
PE_in_pAS2 : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
PE_in_pACT : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
PE-T26-CP : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
ZYMV_PE_CP : FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9 : 279
FGLDGMVATTESDERRHTARDVWNNMHTLLGVNTW9

```

그림 5-16. 새 클론의 아미노산 염기서열 비교.

아미노산 염기서열 비교 분석 결과, pAS2-1 vector와 pACT2 vector에 삽입된 염기서열이 strain별로 같았으며 이전이 클론들과 비교하면 외피단백질 아미노산 22(G --> A), 27(V --> A), 29(G --> S), 및 116(E --> D)의 아미노산 변이가 CGMMV의 외피단백질과의 상호작용을 저해하는 아미노산임이 확인되었다. 이는 이들 아미노산의 변이에 의해 외피단백질의 삼차구조가 변화되었거나 CGMMV의 외피단백질과 상호작용하는 상대 단백질의 주요 도메인이나 아미노산과의 상호작용이 제한된 것을 암시한다. 본 연구결과는 향후 아미노산 염기서열에서 PA와 PE간 차이가 났던 아미노산들을 중심으로 하여 CGMMV와의 상호작용에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고, 이를 바탕으로 결정적인 영향을 미치는 아미노산이나 도메인을 확인하고 병원성 및 병징 상승 작용에 미치는 영향평가에 유용하게 이용될 것이다.

## 협동과제

CMV 및 ZGMMV의 병원성 결정인자 분석과 약독바이러스를 이용한 오이의  
피해 경감 기술 개발 (서울여자대학교 환경생명과학부, 류기현)

### 1. Tobamovirus mutant 제작

#### 가. ZGMMV 및 KGMMV full-length clone을 이용한 MGS random mutagenesis

ZGMMV와 KGMMV full-length clone을 *in vitro* transposition을 기초로 한 MGS (mutation generation system) 메카니즘을 이용하여 random mutagenesis를 시도하였다. 반응 후 target DNA (ZGMMV 및 KGMMV full-length clone) 에 Mu transposon 의 삽입을 확인하기 위하여 wild type 에는 존재하지 않는 transposon 양 끝에 존재하는 *Not* I으로 RFLP 방법을 수행하여 transposon의 위치를 확인하여 모식화하였다 (그림 1-1). transposon 절편이 잘린 나머지의 15개의 염기서열의 위치를 분석한 결과, 이들 두 바이러스의 경우 대부분 N-terminal 에 집중화되어 mutant가 존재하고 있었다. 이들은 주형으로 하여 *in vitro* transcription을 수행하여 wild type과 함께 슈키니에 감염성을 확인하였다.

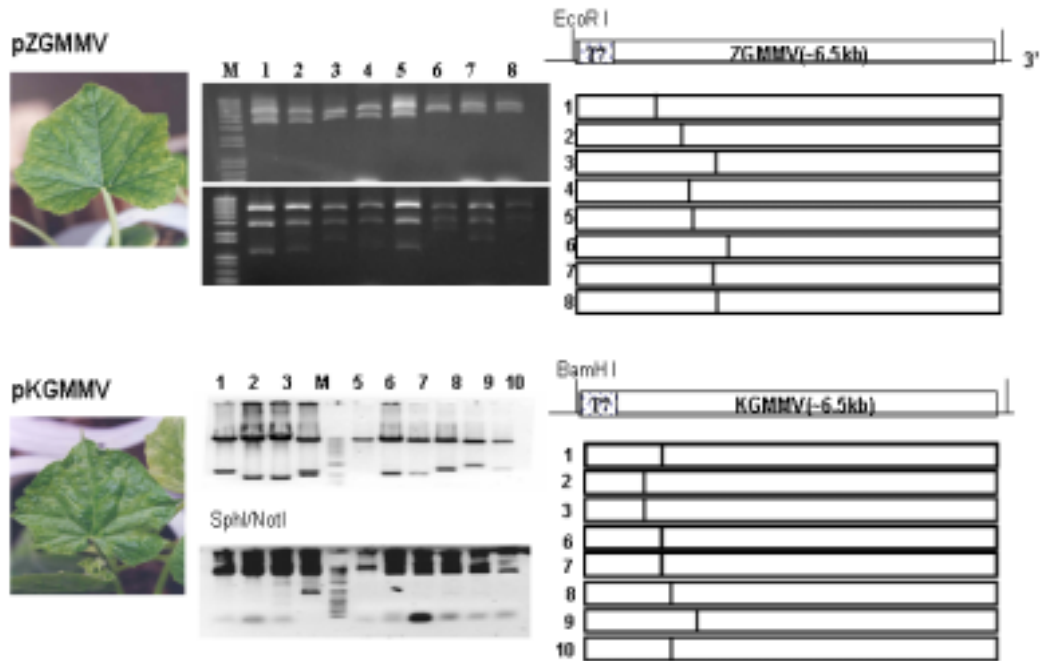
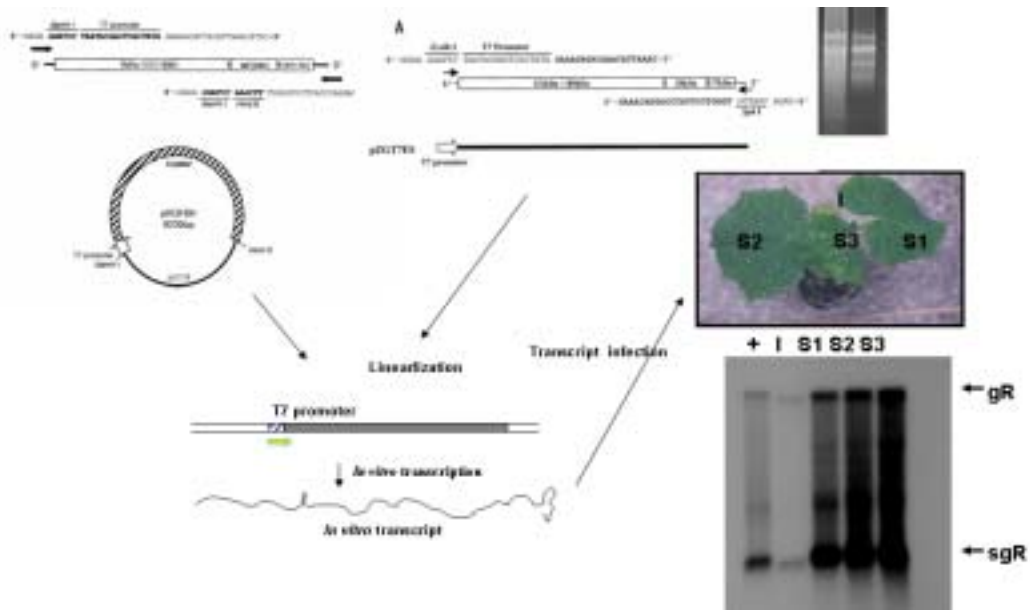


그림 1-1. Schematic representation of two cucurbit-infecting tobamoviruses (KGMMV and ZGMMV) full-length cDNA clones and their selected Mu-based

random mutants maps.

#### 나. Viral mutant 선발 및 검정용 추적기술 개발

##### 1) ZGMMV 및 KGMMV full-length clone을 이용한 chimeric mutants 제작

박과 작물에 강한 병원성을 보이는 ZGMMV 와 KGMMV 의 4개의 도메인을 서로 치환하여 10개의 chimeric mutant를 제작하였다(그림 1-5). KGMMV, ZGMMV를 각 주형으로 coat protein (CP) 과 movement protein (MP) 도메인을 염기서열내의 enzyme site를 이용하여 서로의 ZGMMV, KGMMV 로 치환하여 4가지 mutant (그림 1-4, lanes 2-3 & 5-6) 를 제작하였으며, 두 가지 바이러스 내의 서로 공통의 enzyme site 인 *Spe* I을 이용하여, 54 kDa domain을 중심으로 각 ZGMMV, KGMMV를 주형으로 서로 치환하여 2가지 mutant를 제작하였다(그림 1-2). 이들 ZK11, KZ1을 주형으로 ZGMMV 와 KGMMV 의 CP, MP를 치환할 수 있는 primer 를 제작, fusion PCR (그림 1-3)하여 4가지의 mutant를 제작하여 전체 10개 mutant를 만들었다.(그림 1-4, lanes 8-9 & 10-11; 그림 1-5) 이들 PCR product의 transcript를 *Nicotiana benthamiana* 와 *Cucurbita pepo* 에 감염성을 테스트하였다.

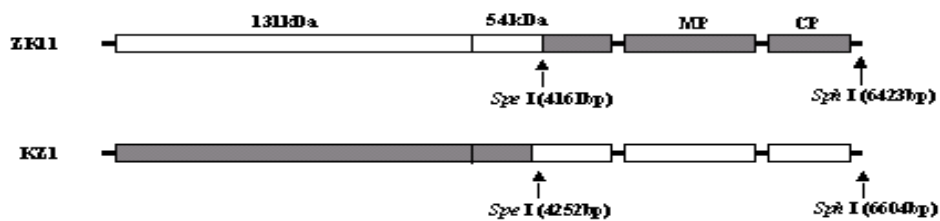


그림 1-2. Schematic representation of chimeric mutants between ZGMMV and KGMMV for templates of ZK11, KZ1; ZKZC, ZKZMC, KZKC and KZKMC.

**Primer A:** 5'- TTT ATC GTT CTT CTA GTT AGTT AT GT CT GTAAGTAGCGT CCGT -3'

**Primer B:** 5'- ACCGACGCTACTTACAGACAT AACTAACTAGAAGAACGATAAA -3'

**Primer C:** 5'- AGCTACCCGGTTTATAACAAG AT GT CTTACTCAACCAGT GGT -3'

**Primer D:** 5'- ACCACTGGTTGAGTAAGACAT CTTGTTATAAACCGGGTAGCT -3'

**Primer E:** 5'- TTCAAAGTCTGT CGTTTAAAGT ATGTCTGTTAGCAAGTTAGGT -3'

**Primer F:** 5'- ACCTAACTTGCTAACAGACAT ACTTAAACGACAGACTTTGAA -3'

**Primer G:** 5'- AACCACCTCGTTTAT AACAAG ATGCCTTACTCTACCAGCCGG -3'

**Primer H:** 5'- CCGGCTGGTAGAGTAAGGCAT CTTGTTATAAACGAGGT GGT -3'

그림 1-3. Sequences of primers for Fusion PCR to construct ZKZC, ZKZMC, KZKC and KZKMC chimeric mutants.

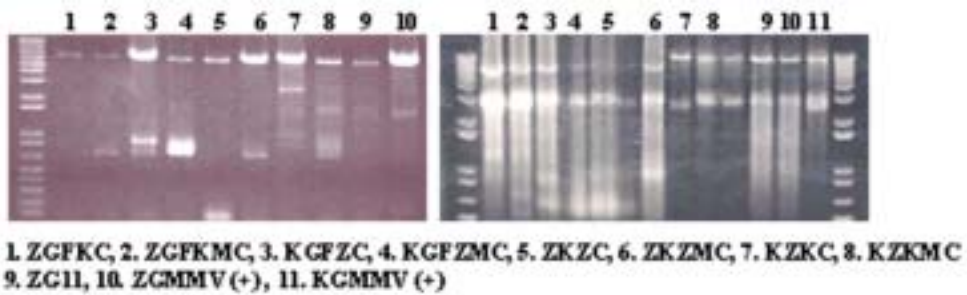


그림 1-4. Gel analysis of fusion PCR products and In vitro transcription of wild0type viruses and their chimeric viruses.

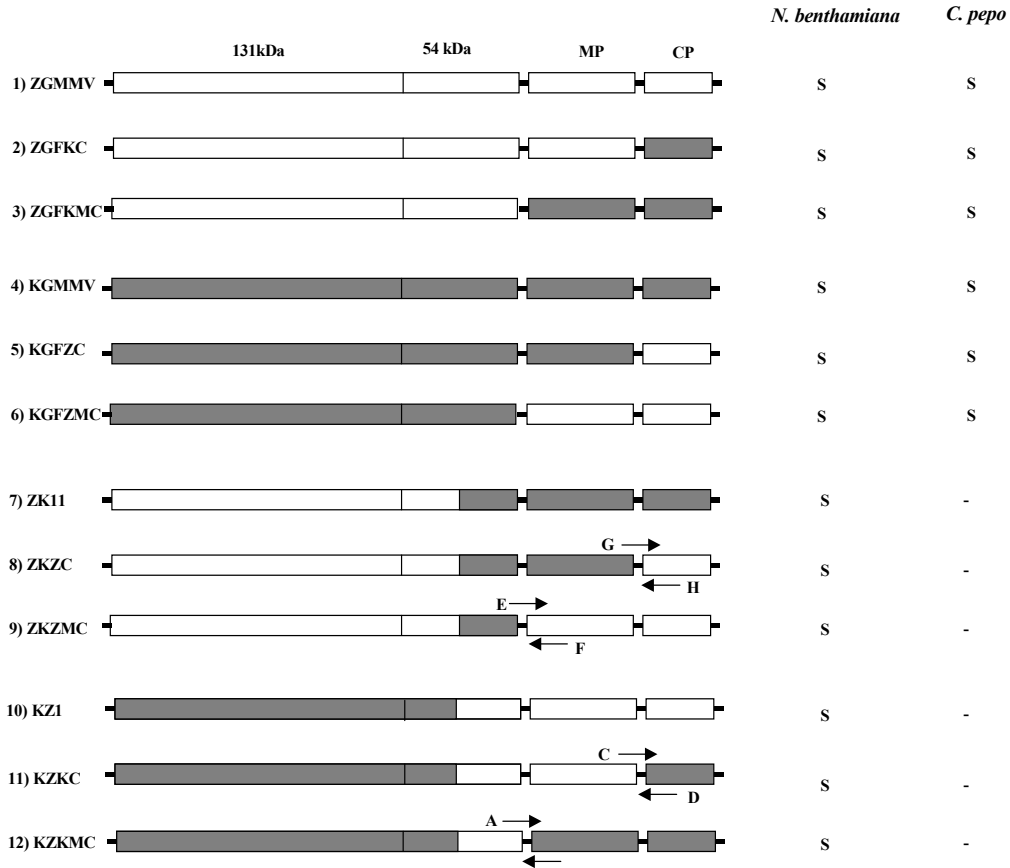


그림 1-5. Infectivity test of chimeric mutant constructs on *Nicotiana benthamiana* and zucchini squash plants. Infection of viruses were evaluated by symptoms and by ELISA and/or RT-PCR.

## 2) ZGMMV mutant library 대량제작

XL1-Red를 이용한 random-mutagenesis 로 얻은 약 1000개의 colony를 pooling하였다. XL1-Blue 에 transformation 로 얻은 최종 colony 중 100개의 clone을 선발하여, RFLP 로 mutation 위치를 결정하고, wild type 과의 병원성 비교를 위해 *in vitro* transcription을 수행하여 스크리닝을 실시하여 mutant의 특성 분석을 실시하였다.

## 3) CMV chimeric mutant 제작

박에서 분리한 CMV 두 계통인 Pf-CMV와 Fny-CMV간의 바이러스 복제와 병징의

차이를 분석하기 위하여, 이들 바이러스를 부분 조합하여 주키니에 접종하여 접종 후 7일째 시료를 채취하여 Northern blot 분석을 실시하였다 (그림 1-6). Wild-type인 Pf-CMV는 바이러스 복제량이 Fny-CMV보다 월등히 복제량이 적은 것을 확인할 수 있었고, 두 바이러스의 조합 간에 바이러스 RNA의 복제량이 상이한 것을 확인할 수 있었다. 특히 RNA 2 및 RNA3가 관여할 것으로 그림 1-6의 Northern blot 결과가 암시하여 다음의 실험을 진행하였다. 주키니에서의 병징 관련 발현시기와 세기에 관여하는 서열을 결정하기 위한 유전자재조합 바이러스 및 교잡실험 결과, Pf 계통의 RNA2 바이러스 복제효소 (replicase) 에 존재하는 267 번째 아미노산과 RNA3 이동 단백질 (movement protein) 의 168 번째 아미노산으로 Fny 계통 CMV의 같은 부분을 mutation 후 병원성을 wild type과 비교했을 때 이들 mutant 는 병징 발현이 지연되거나 병징이 약화되었으며 병징 발현 및 시기에 관여하는 결정인자임이 규명되었다. (표 1-1, 그림 1-7, 1-8) 분자 생물학적 연구에 의해 두 아미노산들의 상호작용이 호박에서의 병징의 세기 및 발현 시기에 중요함을 확인하였다.

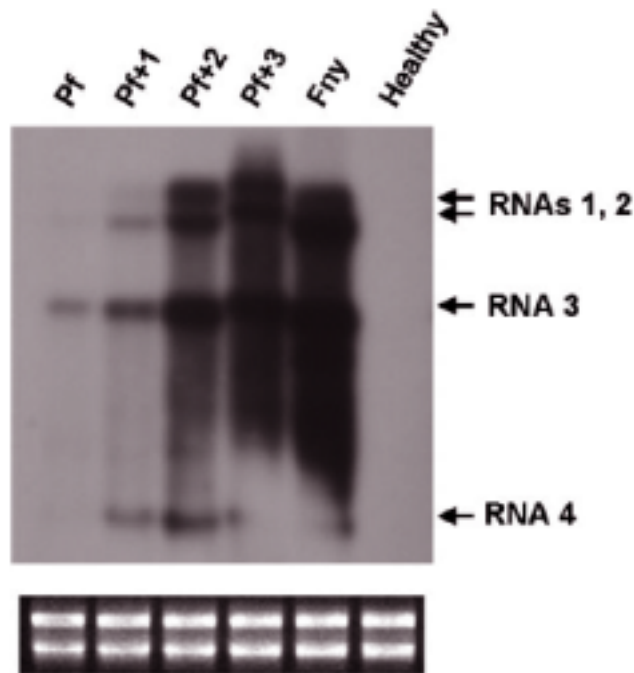


그림 1-6. Accumilation of CMV RNAs on zucchini squash plants by Northern blot analysis at 7 days post-inoculation of wild-type (Pf, Fny) and their pseudorecombinants.

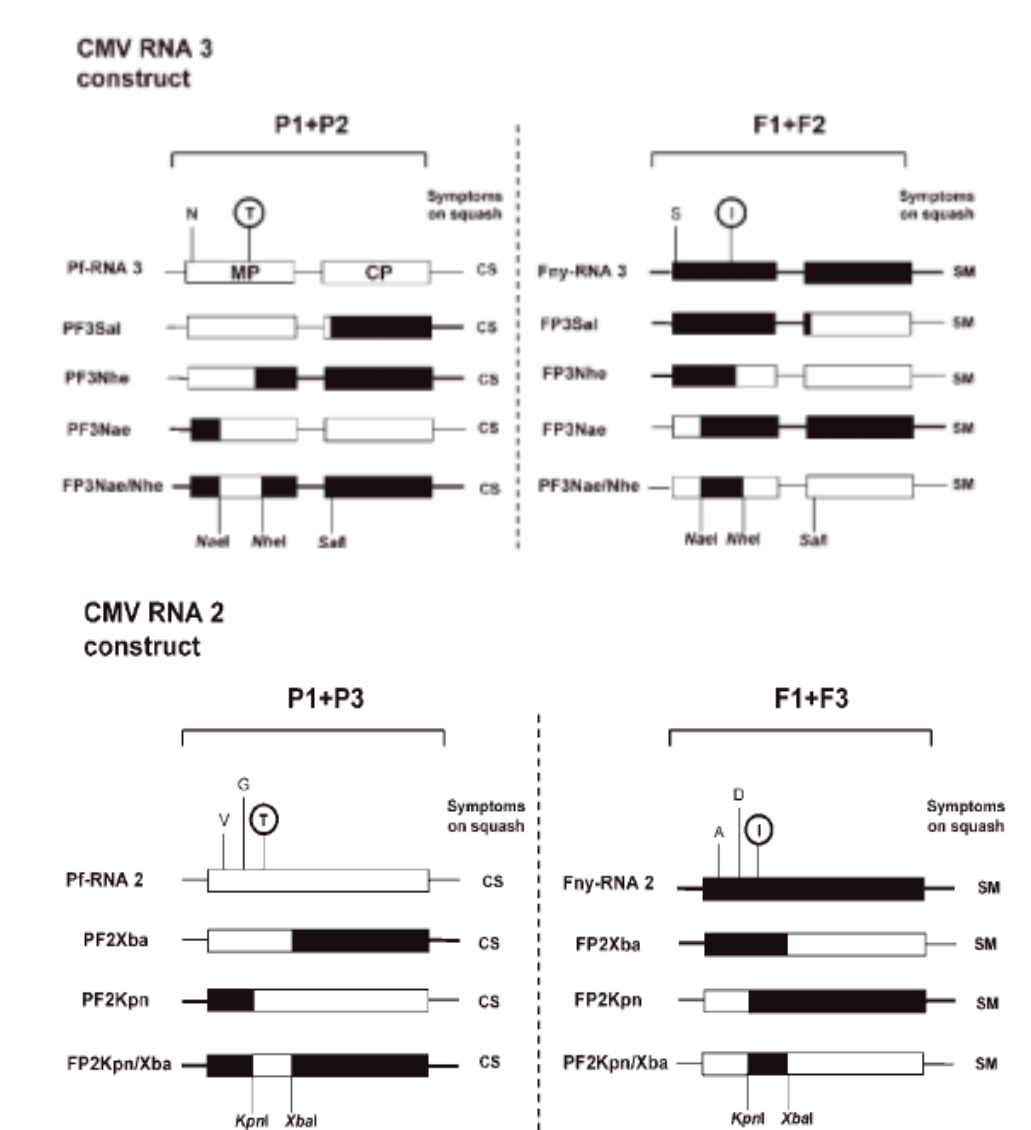


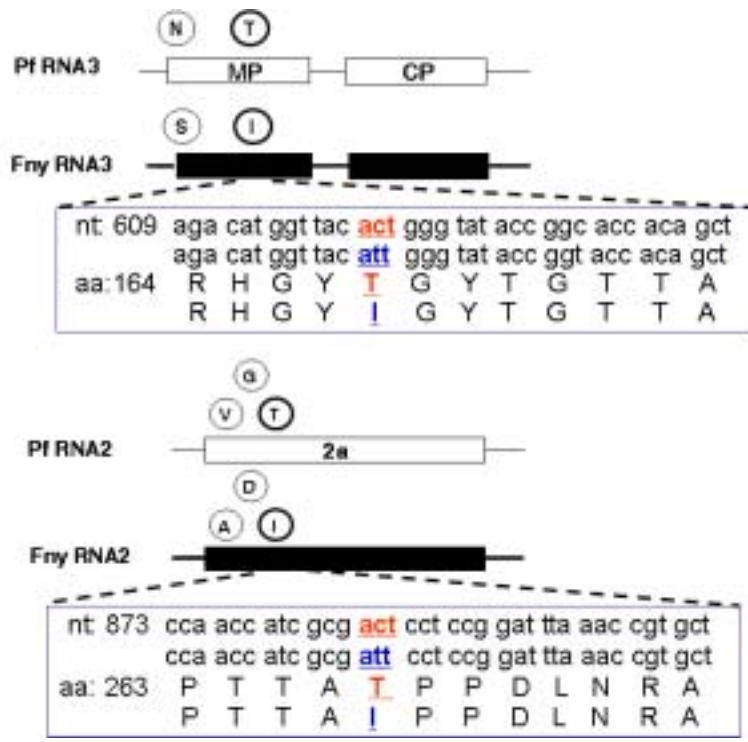
그림 1-7. Localization of sequences in CMV RNA 2 and RNA 3 specifying the phenotypes of CMV strains on zucchini squash. Either Pf-CMV RNAs 1 and 3 (P1+P3) or Fny-CMV RNAs 1 and 3 (F1+F3) were combined with transcripts of cDNA clones containing various RNA 3 chimeras and inoculated on to tobacco plants. Virus from infected tobacco was inoculated on to zucchini squash cotyledons. The systemic symptoms in zucchini squash were assessed at 7 days p.i. as either CS (chlorotic spots) or SM (severe mosaic). The transcripts of RNAs



1 and 3 used for inoculation with RNA 2 transcripts of the chimeric or wild-type clones are indicated at the top of the figure. The amino acids at 2a protein positions 60, 76 and 267 that are different between the two strains are indicated at the top, with the amino acid difference correlating with the change in phenotype circled. The locations of restriction endonuclease sites used for making the chimeras are shown at the bottom.

Fig. 1-1. Time course of systemic movement of Pf-CMV and Fny-CMV and their reassortments in zucchini squash plants

Virus	Removal of inoculated cotyledons (h p.i.)								Control
	12	24	36	48	60	72	84	96	
F1F2F3	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
P1P2P3	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
F1P2F3	0/4	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
P1F2P3	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
P1F2F3	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
F1P2P3	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
F1F2P3	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
P1P2F3	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4



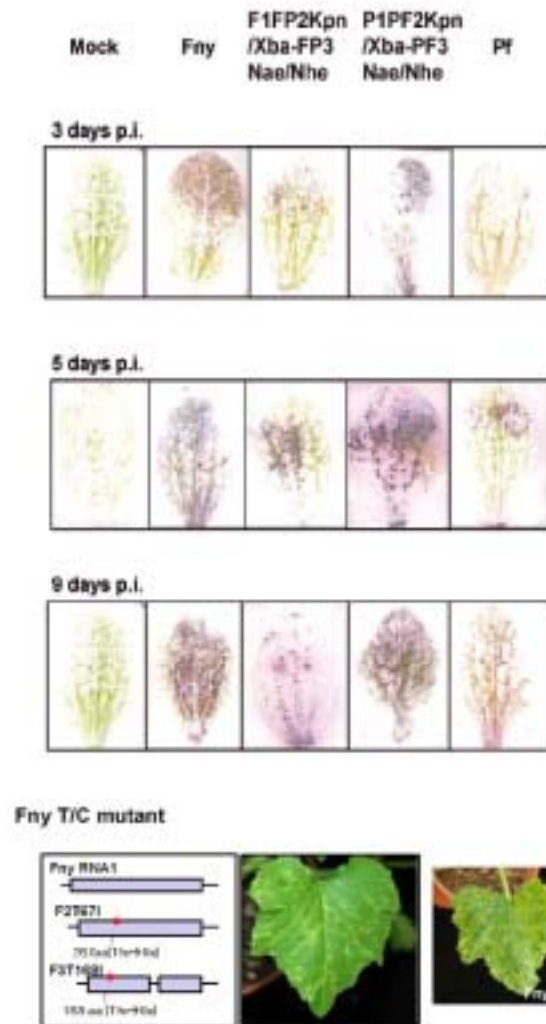


그림 1-8. Sequence comparison between Pf-CMV and Fny-CMV, tissue blot analysis of chimeric constructs and point mutants selection and analysis of their infectivity and symptom patterns.

## 다. 병원성관련기주 cDNA library 제작

### 1) 바이러스 감염에 따른 병원성 관련 기주식물체 mRNA 에 대한 cDNA library 제작

바이러스가 기주 내에서 감염 시 병원성을 가지기 위해서는 다양한 단계에서 기주 유전자의 도움이 필요하거나, 혹은 기주유전자에 의해 병원성이 결정되는 등 기주인자에 의해 많은 영향을 받는다. 따라서 바이러스의 병원성을 완전히 이해하기 위해서는 기주유전자의 분석을 통한 상호작용의 기전을 구명해야 할 필요가 있으며 전 세계적으로 기주유전자 측면에서의 바이러스 병원성 연구가 바이러스 연구의 큰 주축을 이루고 있다. 한편, 바이러스의 병원성에 따라 발현되는 기주유전자의 범위가 달라질 수 있기 때문에 기주유전자의 분석은 바이러스의 병원성을 이해하는 데에 매우 유용한 자료로 쓰일 수 있다. 기주유전자에 대한 연구가 활발해 짐에 따라서 식물에서도 애기장대나 담배 등을 대상으로 기주유전자에 대한 분석이 많이 이루어져 있어 cDNA 측면의 EST clone을 이용한 분석이 가능하게 되었다. 따라서 본 연구에서는 ZGMMV의 감염에 의해 조절되는 기주인자들을 분석하기 위해 ZGMMV의 초기감염이 진행된 Zucchini의 떡잎에서 분리한 mRNA를 주형으로, cDNA library를 제작하였다. Zucchini에서 ZGMMV의 초기 감염 단계에서의 특이적인 유전자를 선별하고, cDNA library를 구축하였다. 현재 약 1,200여개의 cDNA sequencing을 완료하였다 (표 1-2 참조). 분석된 각각의 염기서열을 blast분석한 결과를 토대로 각 단편의 DNA가 병원성과의 밀접한 관계를 분석하고 초기감염에 관여하는 병원성을 나타내는 결정적인 인자의 분석연구에 유용한 자료로 활용될 것이다.

표 1-2. List of EST clones derived from ZGMMV-infected zucchini squash

No.	Definition	Locus	bp	Source	Score
631	elongation factor-1 alpha 3	AAD56020	719	Lilium longiflorum Nellie White	375
632	protein F17L21.8 [imported]	G86398	599	Arabidopsis thaliana	77
633	hypothetical protein	AAS79716	325	Oryza sativa(japonica)	47
634	cullin 4	CAC85265	450	Arabidopsis thaliana	205
635	T32E20.30	AAF79797	769	Arabidopsis thaliana	34
636	nodulin-related	NP_178443	660	Arabidopsis thaliana Columbia	56
637	*	*	*	*	*
638	putative cytidine deaminase	AAN40022	531	Zea mays	151
639	transmembrane proteinFT27/PFT27-like	BAB09369	635	Arabidopsis thaliana Columbia	115
640	ribosomal proteinL31 family protein	NP_565109	476	Arabidopsis thaliana Columbia	165
651	dehydration-induced proteinERD15	AAF75749	523	Lycopersicon esculentum	84
652	TGA-type basic leucinezipper protein	AAK84890	430	Phaseolus vulgaris red kidney	195
653	unknown	*	*	*	*
654	unknown	*	383	*	*
655	putative DnaJ protein	AAQ54533	509	Malus x domesticaEvereste x MM106	154
656	putative histone-lysineN-methyltransferase	BAC99377	341	Oryza sativa(japonica cultivar-group)	32
657	unknown	*	*	*	*
658	enolase	AAS18240	740	Glycine max	329
659	D111/G-patchdomain-containing protein	NP_564820	538	Arabidopsis thaliana	130
660	guanine nucleotide-bindingprotein, putative	AAM65407	468	Arabidopsis thaliana	258
661	beta-galactosidase alpha peptide	AAA73456	606	Cloning vector pSport1	146
662	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative	NP_197927	664	Arabidopsis thaliana(thale cress)	175
663	dehydration-induced proteinERD15	AAF75749	645	Lycopersicon esculentum(tomato)	115
664	YGL010w-like protein	AAC32136	629	Picea mariana	66
665	zinc finger protein	AAQ10954	625	Capsicum annuum Hanbyul	92
666	beta-galactosidase alpha peptide	AAA73456	741	Cloning vector pSport1	161
667	unknown	*	*	*	*
668	unknown	*	*	*	*
669	Chain A, Solution StructureOf A Putative Steroid-BindingProtein From Arabidopsis	1J03_A	646	Arabidopsis thaliana (thale cress)	162
670	DNA-binding protein-related	NP_199781	550	Arabidopsis thaliana Columbia	148
671	oxidation protection protein-like	BAD15574	360	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	53
672	metallothionein type I	AAB95220	516	Fritillaria agrestis	66
673	Glycerate dehydrogenase	P13443	961	Cucumis sativus	422
674	40S ribosomal protein S5	AAR89617	714	Capsicum annuum Nockkwang	106
675	diacylglycerol acyltransferasefamily	NP_566952	440	Arabidopsis thaliana Columbia	99
676	unknown	*	*	*	*
677	unknown	*	*	*	*
678	alpha-tubulin	CAD13177	778	Nicotiana tabacum Virginia Bright Yellow	405

No.	Definition	Locus	bp	Source	Score
679	EST AU082548(E60543)corresponds to a region of the predicted gene. Similar to Arabidopsis thaliana chromosome II BAC F219 genomic sequence, unknown protein. (AC005560)	NP_910571	598	Oryza sativa(japonica cultivar-group)	84
680	poly(A)-binding protein	AAF63202	680	Cucumis sativus	270
701	hydroxymethyltransferase	AAM64493	580	Arabidopsis thaliana	178
702	cystatin-like protein	AAM64661	570	Arabidopsis thaliana	41
703	unknown	AAM63306	656	Arabidopsis thaliana	173
704	none	*	*	*	*
705	metallothionein-like protein	CAA92243	267	Lycopersicon esculentum cv. Bonner Best, mutant chloronerva	82
706	2-oxoisovalerate dehydrogenase, putative / 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase, putative / branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 alpha subunit, putative	NP_974756	348	Arabidopsis thaliana Columbia	70
707	phloem filament protein PP1 winter squash	T09685	450	Cucurbita maxima (winter squash)	196
708	embryo-abundant protein-related	NP_196644	442	Arabidopsis thaliana Columbia	261
709	speckle-type POZ protein-related	NP_566212	355	Arabidopsis thaliana	112
710	metallothionein-like protein	CAB52586	257	Elaeis guineensis	66
711	lipid transfer protein precursor	AAF35186	469	Gossypium hirsutum Siokra 1-4	268
712	expressed protein	NP_201110	551	Arabidopsis thaliana Columbia	226
713	beta-galactosidase alpha peptide	AAA67217	581	Cloning vector pSport2	250
714	endo-beta-1,4-glucanase	CAB43937	525	Fragaria x ananassa Chandler	229
715	unknown	EAI99935	620	environmental sequence	
716	chloroplast inner envelope membrane protein, putative (APG1)	NP_191900	630	Arabidopsis thaliana Columbia	306
717	*	*	*	*	*
718	hypothetical protein At2g25110[imported]	D84644	483	Arabidopsis thaliana	74
719	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	NP_564673	645	Arabidopsis thaliana Columbia	89
722	hypersensitive-induced response protein	AAF68391	513	Zea mays B73	92
724	serine/threonine/tyrosine kinase	AAK11734	367	Arachis hypogaea (땅콩)	109
729	membrane protein, putative	NP_565335	455	Arabidopsis thaliana Columbia	58
730	Catalase isozyme 3	P48352	651	Cucurbita pepo	397
731	ubiquitin precursor - rice fragment	PS0380	300	Oryza sativa	169
732	none	*	*	*	*
733	repair endonuclease (RAD1)(UVH1)	NP_198931	554	Arabidopsis thaliana Columbia	284
734	RepA	AAH51351	653	Corynebacterium jeikeium	34
735	unknown	EAB65596	305	environmental sequence	32
736	autophagy 8i (APG8i)	NP_566518	473	Arabidopsis thaliana Columbia	144
737	unnamed protein product	NP_912918	382	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	112
738	expressed protein	NP_567335	422	Arabidopsis thaliana Columbia	95
739	expressed protein	NP_568115	510	Arabidopsis thaliana Columbia	102
740	protein kinase family protein	NP_200643	627	Arabidopsis thaliana Columbia	56

No.	Definition	Locus	bp	Source	Score
743	putative serineprotease-like protein	AAM13204	304	Arabidopsis thaliana Columbia	60.5
745	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	AAL84303	582	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	321
746	Carboxylesterase-like protein	T51415	429	Arabidopsis thaliana	131
747	expressed protein	NP_197090	499	Arabidopsis thaliana Columbia	150
748	peroxidase	CAA66961	540	Arabidopsis thaliana Columbia	232
749	protein phosphatase 2Cputative / PP2C, putative	NP_187215	398	Arabidopsis thaliana Columbia	99
750	none	*	*	*	*
751	peroxidase 21(PER21) (P21) (PRXR5)	NP_181250	516	Arabidopsis thaliana Columbia	167
752	LHCII type IIIchlorophyll a/b binding protein	AAD27877	541	Vigna radiata 2937	253
753	thioredoxin h	BAC21264	561	Cucurbita maxima (winter squash)	222
754	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	AAL84303	582	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	321
755	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 (ACC oxidase 1) (Ethylene-forming enzyme)(EFE) (PMEL1)	Q04644	352	Cucumis melo	167
756	Glycine dehydrogenase[decarboxylating],mitochondrial precursor (Glycine decarboxylase)	P26969	567	Glycine cleavage system P-protein	303
757	Catalase isozyme 2	P48351	414	Cucurbita pepo	227
758	nascent polypeptide associatedcomplex alpha chain	BAC78570	529	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	162
759	alpha-L-arabinofuranosidase	AAP97437	399	Malus x domestica Royal Gala	52
760	probable transposase	T46111	608	Arabidopsis thaliana Columbia	181
761	expressed protein	NP_200707	434	Arabidopsis thaliana Columbia	79
762	L-ascorbate peroxidase(EC 1.11.1.11)cytosolic - cucumber	T10189	529	Cucumis sativus	255
763	At1g54990/F14C21_5	AAL11602	278	Arabidopsis thaliana Columbia	54
764	basic helix-loop-helix (bHLH)family protein	NP_849996	369	Arabidopsis thaliana Columbia	141
765	ATP-dependent protease La (LON)domain-containing protein	NP_177679	488	Arabidopsis thaliana Columbia	103
766	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	AAQ88100	707	Rosa hybrid cultivar 'Kardinal'	327
767	unknown	EAJ61410	259	environmental sequence	34
769	dehydration-induced protein ERD15	AAF75749	539	Lycopersicon esculentumMoneymaker	80
770	hypothetical protein MG01691.4	EAA56040	468	Magnaporthe grisea 70-15	32
771	expressed protein	NP_566014	447	Arabidopsis thaliana Columbia	100
772	ubiquitin-conjugating enzyme putative	NP_564828	660	Arabidopsis thaliana Columbia	294
773	unknown	EAH65801	533	environmental sequence	33
774	beta-galactosidase alpha peptide	AAA67217	630	Cloning vector pSport2	142
775	eukaryotic translatio initiation factor SUI1, putative	NP_568818	569	Arabidopsis thaliana Columbia	204
776	putative step II splicing factor SLU7	BAD08862	592	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	280

No.	Definition	Locus	bp	Source	Score
779	ORF40g	NP_817264	337	Pinus koraiensis	70
780	protein kinase, putative	NP_567574	551	Arabidopsis thaliana Columbia	74
782	No significant similarity found	*	562	*	*
783	heavy-metal-associated domain-containing protein/copper chaperone (CCH)-related	NP_195570	557	Arabidopsis thaliana (thale cress)	239
784	proline-rich protein GPP1	T07598	604	Solanum tuberosum (potato)	152
785	autophagy 8i (APG8i)	NP_566518	622	Arabidopsis thaliana (thale cress)	187
786	14-3-3 protein	AAF76227	406	Populus alba x Populus tremula	159
787	RNA helicase	CAA66825	689	Arabidopsis thaliana columbia	375
790	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3, chloroplast precursor (RuBisCO small subunit 3)	P32764	629	Solanum tuberosum (potato)	245
791	GTP-binding nuclear protein RAN1	P38546	716	Lycopersicon esculentum (tomato)	292
792	60S ribosomal protein L27 (RPL27C)	NP_193236	620	Arabidopsis thaliana Columbia	213
793	mitochondrial F1 ATPsynthase beta subunit	CAC81058	627	Arabidopsis thaliana (thale cress)	37
794	Actin-depolymerizing factor 2 (ADF 2)	Q9FV11	760	Petunia x hybrida	233
795	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein /steroid 5-alpha-reductase family protein	NP_197105	782	Arabidopsis thaliana (thale cress)	176
796	putative transmembrane protein	BAC79896	522	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	198
797	expressed protein	NP_192164	745	Arabidopsis thaliana Columbia	221
798	cytokinin-repressed protein CR9	T10182	714	Cucumis sativus (cucumber)	226
799	alpha tubulin	CAD20820	671	Zea mays	113
800	thioredoxin h	AAN76509	721	Brassica rapa	147
802	CmE8	BAB68392	638	Cucumis melo	223
803	putative ripening-related protein	CAB85634	794	Vitis vinifera Shiraz	100
804	similar to cell wall biosynthesis kinase; Cbk1p [Saccharomyces cerevisiae]	AAS45329	308	Dictyostelium discoideum	33
807	40S ribosomal protein S18(RPS18A)	NP_173692	822	Arabidopsis thaliana columbia	186
808	rubber elongation factor (REF)family protein	NP_187201	786	Arabidopsis thaliana columbia	216
809	SAR DNA-binding protein-like protein	CAE45597	913	Lotus corniculatus var. japonicus	276
810	Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplast precursor (RuBisCO small subunit)	Q02980	824	Malus sp.	175
811	gibberellin-responsive protein, putative	NP_173683	825	Arabidopsis thaliana columbia	117
812	RelA/SpoT protein, putative (RSH1)	NP_849287	525	Arabidopsis thaliana columbia	192
813	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein	NP_563718	697	Arabidopsis thaliana columbia	144



No.	Definition	Locus	bp	Source	Score
817	beta-galactosidase alpha peptide	AAA67217	604	Cloning vector pSport2	
818	beta-galactosidase alpha peptide	AAA67217	642	Cloning vector pSport2	
819	*	*	*	*	*
820	Carboxylesterase-like protein	T51415	429	Arabidopsis thaliana	131
821	60s acidic ribosomal protein	AAL91663	656	Prunus dulcis	100
822	chloroplast protease	CAA09935	476	Capsicum annuum	186
823	*	*	*	*	*
824	Actin-depolymerizing factor 2 (ADF 2)	Q9FVII	760	Petunia x hybrida	233
828	thioredoxin family protein	NP_195437	794	Arabidopsis thaliana columbia	131
829	RNA helicase	CAA66825	689	Arabidopsis thaliana columbia	375
830	lipase-related	NP_850428	756	Arabidopsis thaliana columbia	241
833	RNA helicase	CAA66825	689	Arabidopsis thaliana columbia	375
834	*	*	*	*	*
835	*	*	*	*	*
836	Actin-depolymerizing factor 2 (ADF 2)	Q9FVII	760	Petunia x hybrida	233
837	TCP family transcription factor,putative	NP_567553	845	Arabidopsis thaliana columbia	80
840	loxX homologue	CAA05277	768	Lycopersicon pimpinellifolium Cf9	237
841	*	*	446	*	*
842	beta-galactosidase alpha peptide	AAA67217	545	Cloning vector pSport2	33
843	hypothetical protein FG02208.1	XP_382384	569	Gibberella zeae PH-1	33
844	Plasma membrane aquaporin(PAQ2)	BAA32778	637	Raphanus sativus	228
848	accelerated cell death 2 (ACD2)	NP_195417	433	Arabidopsis thaliana columbia	106
849	glutathione S-transferase,putative	NP_172507	449	Arabidopsis thaliana columbia	169
850	hypothetical protein	BAC55615	695	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	34
851	6-phosphogluconatedehydrogenase family protein	NP_186885	567	Arabidopsis thaliana columbia	226
852	hypothetical protein T24C10.3[imported]	E96590	614	Arabidopsis thaliana columbia	65
853	plasma intrinsic protein 2,1	AAO39007	613	Juglans regia (탈각호두)	253
854	Actin-depolymerizing factor 2 (ADF 2)	Q9FVII	760	Petunia x hybrida	233
855	heat shock protein, putative	AAM63342	611	Arabidopsis thaliana columbia	65
856	Elongation factor 1-gamma(EF-1-gamma) (eEF-1B gamma)	Q9FUM1	553	Prunus avium	178
857	SKP1 family protein	NP_568900	730	Arabidopsis thaliana columbia	152
858	photosystem I-N subunit	AAO49652	751	Phaseolus vulgaris	251
859	ACT domain-containing protein	NP_030235	662	Arabidopsis thaliana columbia	58
860	phosphoglyceratemutase-like protein	AAG38144	571	Glycine max	222
861	endoribonuclease L-PSPFamily protein	NP_188674	541	Arabidopsis thaliana columbia	78
862	hypothetical protein F13G24.30	T45608	641	Arabidopsis thaliana columbia	258
863	probable aldehyde oxidase(EC 1.2.3.1) [imported]	T52050	430	Arabidopsis thaliana	72
864	Peptide deformylase,chloroplast precursor (PDF)(Polypeptide deformylase).	Q9FV54	565	Lycopersicon esculentum	231
865	Ferredoxin--NADP reductase,leaf isozyme,chloroplast precursor (FNR).	P10933	564	Pisum sativum	231

No.	Definition	Locus	bp	Source	Score
866	chaperonin, putative	NP_197589	548	Arabidopsis thaliana columbia	317
868	pectate lyase[Fragaria x ananassa]	AAK66161	671	Fragaria x ananassa	241
869	acyl-CoA binding protein 2(ACBP2)	NP_194507	549	Arabidopsis thaliana columbia	253
870	hydroxyproline-richglycoprotein family protein	NP_189197	505	Arabidopsis thaliana	114
879	OSJNBa0032F06.20	CAE03437	477	Oryza sativa(japonica cultivar-group)	178
881	14-3-3-LIKE PROTEIN D(SGF14D)	Q96453	722	Glycine max	282
883	At5g24500	AAS45434	631	Arabidopsis thaliana columbia	45
884	probable isocitrate dehydrogenase (NAD)(EC 1.1.1.41)precursor - common tobacco	T03406	526	Nicotiana tabacum	269
885	Pyrophosphate--fructose6-phosphate 1-phosphotransferasealpha subunit (PFK) (6-phosphofructokinase,pyrophosphate dependent)(Pyrophosphate-dependent6-phosphofructose-1-kinase)(PPI-PFK)	Q41140	677	Ricinus communis (피마자)	244
886	peroxisomal biogenesis factor11 family protein /PEX11 family protein	NP_563636	640	Arabidopsis thaliana columbia	195
887	RNA helicase	CAA66825	689	Arabidopsis thaliana columbia	375
888	ribulose 1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenasesmall subunit	AAA33036	317	Mesembryanthemumcrystallinum	114
889	beta-galactosidase	CAA75108	712	Phagemid cloning vector pTZ19U	181
890	actinorizal nodulin AgNOD-GHRP	AAD00171	505	Alnus glutinosa	39
891	putative quinone oxidoreductase	CAD31838	584	Cicer arietinum	171
893	expressed protein	NP_198638	712	Arabidopsis thaliana (thale cress)	284
894	ribosomal protein L33	AAK25760	509	Castanea sativa	211
895	Per1-like family protein	NP_173104	557	Arabidopsis thaliana columbia	45
896	elicitor-inducible protein EIG-J7	AAR83862	649	Capsicum annum	142
897	hypothetical protein	BAD07943	669	Oryza sativa (japonica cultivar-group)	157
899	ADP,ATP carrier protein,mitochondrial precursor(ADP/ATP translocase)(Adenine nucleotidetranslocator) (ANT)	P27081	561	Solanum tuberosum	219
900	expressed protein	NP_196665	427	Arabidopsis thaliana columbia	62

## 2) 기주식물 반응별 약병원성 계통 분리 및 유전자 확보

기주식물 반응별 약병원성 계통 분리를 위하여 random-mutagenesis를 기초로 *in vitro* transposition 과 repair-deficient *E. coli* 에 의한 ZGMMV mutant 및 ZGMMV 와 KGMMV를 이용한 chimeric mutant, CMV 유전자 재조합을 통한 mutant 의 박과작물 내의 병원성 테스트를 통한 분류 및 유전자 동정을 실시하였다. 본 실험 결과, repair-deficient 방법을 사용한 경우에는 mutants의 선발은 용이하나 mutant 부위의 검정이 염기서열 분석으로만 확인할 수 있는 단점이 있고, 많은 mutants들이 감염성이 오히려 상실되는 결과를 보여, 향후 실험에 MGS Mu mutant 와 chimeric virus를 사용하였다.

## 3) 박과 Tobamovirus 및 CMV 의 movement protein 및 replicase 항혈청 제작

바이러스들의 coat protein 외의 movement protein 및 replicase 도메인과 병원성의 관련성 검정을 위해 항혈청을 제작하였다. 기주 식물내에서 wild type 과 mutant 의 상호작용을 병징으로 확인 할 수 있다. 선발된 mutant를 대상으로 이들 mutant 바이러스와 기주 식물내에서 병원성에 영향을 주는 도메인을 단백질 수준에 있어서 검정하기 위해 제작되었다. ZGMMV (그림 1-9)와 CMV 의 movement protein (MP) 부분을 expression vector 에 cloning 하여 정제하여 제작하였으며, 박과작물 바이러스 KGMMV, CGMMV, CMV 의 replicase protein 의 항혈청 제작하여 활용하였다.

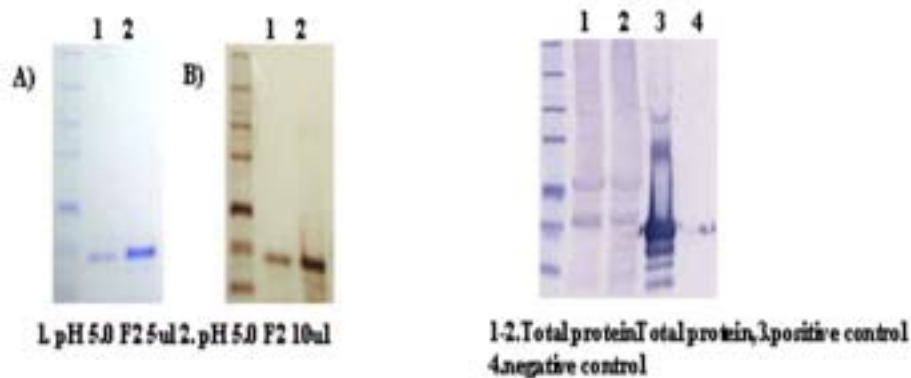
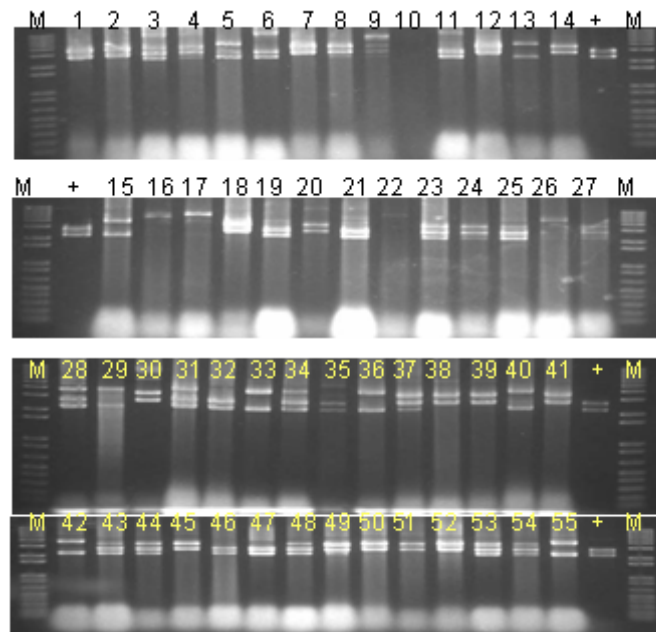


그림 1-9. Induction of virus-encoed proteins in *E. coli* to produce ZGMMV MP and confirmation of ZGMMV MP by western blot analysis.

#### 4) Wild-type 및 약독바이러스 검정기술 개발

약독바이러스 검정기술 개발을 위하여 random-mutagenesis에 의해서 얻어진 대량의 CMV RNA3 mutant 와 wild type 사이에서의 검정은 이미 밝혀진 유전자 염기서열을 기초로 이들의 enzyme site를 이용하여, DNA 절편 크기와 밴드 양상으로 wild type 내에서의 mutation 위치를 분석하였다 (그림 1-10).



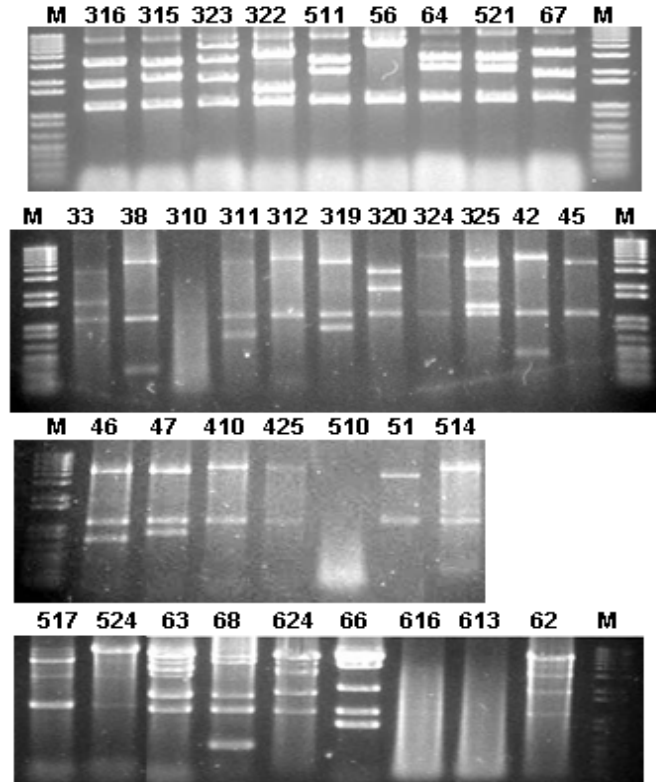


그림 1-10. Restriction patterns of MGS Mu-based mutants of RNA3 of CMV.

## 2. 바이러스병원성 결정인자 분석 및 viral mutant의 병원성 스크리닝

### 가. 연구재료 및 방법

#### 1) 바이러스 병원성 결정인자분석

##### 가) 박과 Tobamovirus의 hybrid virus의 제작 및 감염성 분석

박과 작물에 강한 병원성을 보이는 ZGMMV 와 KGMMV의 병원성 결정인자를 분석하기 위해서 ZGMMV, KGMMV full-length clone을 이용하여 ZGMMV 와 KGMMV의 4개의 도메인을 서로 치환하여 chimeric mutants를 제작하였다. KGMMV, ZGMMV를 각 주형으로 coat protein (CP) 과 movement protein (MP) 도메인을 염기서열내의 enzyme site를 이용하여 서로의 ZGMMV, KGMMV 로 치환하여 4가지 mutant를 제작하였다. 또한, 두 가지 바이러스의 54kDa domain을 중심으로 각 ZGMMV, KGMMV를 주형으로 서로 치환하여 2가지 mutant를 제작하였다. 이

들 mutant(ZK11, KZ1)를 주형으로 ZGMMV 와 KGMMV의 CP, MP를 치환할 수 있는 primer를 이용하여 fusion PCR을 수행하여 4가지의 mutant를 제작하였다. 제작된 mutants는 *Nicotiana benthamiana*와 오이 및 주키니 호박에 접종하여, 감염성과 복제능력 및 병원성을 분석하였다.

#### 나) 바이러스 감염에 따른 병원성 관련 기주식물체 cDNA ESTs 분석

ZGMMV에 systemic한 병징을 보이는 zucchini의 떡잎에 carborundum을 이용하여 상처를 주고 ZGMMV의 즙액감염을 유도하여 0시간부터 3시간 간격으로 24시간까지 접종엽을 time course 별로 10개체씩 수확하여 mRNA를 분리하여 제작한 cDNA library로부터 ZGMMV 감염에 따른 기주 식물체에서의 유전자 발현 양상을 분석하기 위하여 ESTs를 수행하였다. PR-related gene, transcriptional factor, transmembrane protein 및 pectinmethylesterase등을 선별하여 ZGMMV, CMV 감염에 따른 유전자의 발현 양상을 비교 분석 중에 있으며, 최종적으로 오이의 피해 경감 기술 개발에 응용하고자 한다.

### 2) Viral mutant의 병원성 스크리닝

#### 가) CMV chimeric mutant 제작 및 병원성 결정

Fny-CMV, Pf-CMV와 zucchini squash를 기주로 기주 식물체에서의 CMV 병징 결정인자를 밝히기 위해서 분자 병리학 수준에서 연구하였다. Pf 계통과 Fny 계통간의 감염성이 있는 클론으로부터 분절 RNA의 재조합을 통한 기주 식물에서의 병원성을 토대로 이들 RNA2와 RNA 3의 염기서열을 서로 mutation 하여 다양한 유전자재조합 바이러스(pseudorecombinant)를 제작하고, Fny/Pf-CMV 2a, 3a 각각의 267번, 167번 아미노산의 변화에 따른 병원성 차이를 확인하기 위해 CMV RNA 2a, RNA3 3a 단백질 267번, 167번 아미노산을 치환용 primer(표 2-1)를 이용해 site directed mutagenesis 방법에 의해 T/C(ATT→ACT), C/T(ACT→ATT) mutant를 제작하여 Fny-CMV R2,3T/C (double mutant), Fny-CMV R2T/C, Fny-CMV R3T/C (single mutant) 와 Pf-CMV R2,3C/T (double mutant), Pf-CMV R2C/T, Pf-CMV R3C/T (single mutant)로 명명하였다. 이러한 double mutant (Fny-CMV R2,3T/C, Pf-CMV R2,3T/C)와 wild type Pf-CMV, Fny-CMV 간의 병징 차이 확인 및 병원성 결정에 대한 2a, 3a 각각의 기능을 분석하기 위해, double(Fny-CMV T/C R2R3, Pf-CMV R2R3C/T) 및 single mutant(Fny-CMV R2T/C, Fny-CMV R3T/C 와 Pf-CMV R2C/T, Pf-CMV R3C/T) RNA를 그림 2-1과 같이 조합하여 *in vitro* transcription을 통해 만들어진 RNA를 주키니 호박 및 오이에 접종하여 병원성 분석을 하였다.

표 2-1. Sequence of primers to produce mutants for Fny-CMV R2T/C, Fny-CMV R3T/C, Pf-CMV R2C/T and Pf-CMV R3C/T

strain	genome	primer sequences
Fny	RNA2	5'-CCAACGCCAACCCTCGCGACTCCTCCGGATTTAAACCGTGC-3' 5'-GCACGGTTTAAATCCGGAGGAGTCGCGATGGTTGGCGTTGG-3'
	RNA3	5'-GTTATCGAAAGACATGGTT ACACTGGGTATAACCGGTACCACAGC-3' 5'-GCTGTGGTACCGGTATAACC CAGTGTAACCATGTCTTTCGATAAC-3'
Pf	RNA2	5'-GTCCAACGCCAACCATCGCGATTCCTCCGGATTTAAACCGTG-3' 5'-CACGGTTTAAATCCGGAGGAATCGCGATGGTTGGCGTTGGAC-3'
	RNA3	5'-GTTATCGAAAGACATGGTT ACATTGGGTATAACCGGCACCACAG-3' 5'-CTGTGGTGCCGGTATAACC AATGTAACCATGTCTTTCGATAAC-3'

	CMV-Fny			CMV-Pf		
Wild type	RNA1	RNA2	RNA3	RNA1	RNA2	RNA3
Double mt.	RNA1	R2 T/C	R3 T/C	RNA1	R2 C/T	R3 C/T
single mt.	RNA1	RNA2	R3 T/C	RNA1	RNA2	R3 C/T
	RNA1	R2 T/C	RNA3	RNA1	R2 C/T	RNA3

그림 2-1. Combinations of reassortments between wild-type CMV RNAs and double or single CMV-Fny T/C and Pf C/T mutant RNAs.

#### 나) CMV mutant library 대량제작

CMV RNA3 mutant를 대량 제작하기 위하여 ZGMMV full-length clone의 random-mutagenesis에 이용된 동일한 시스템인 MGS (mutation generation system, Finzymes)를 이용하여 Fny-CMV RNA3의 mutant library를 제작하였다. Mu-transposon의 CMV RNA3 genome에 무작위적인 삽입 후 transposon의 양말단에 있는 제한효소 사이트인 *Not* I에 의해 transposon을 제거하여 최종적으로 Fny-CMV RNA3 genome에 15bp가 삽입되는 mutant library를 구축하였다. restriction enzyme mapping을 통해 삽입된 Mu-transposon으로 야기된 돌연변이 위치를 확인, 지도화(mapping)하고자 한다. 선발된 mu-clone과 wild type 과 비교하여, 전신 감염 여부에

따라 바이러스 증식 (propagation) 에 필수적 (essential) 이거나, 비필수적 (non-essential) 인 부위를 선별하기 위한 대량 스크리닝을 실시하였다.

## 나. 연구내용 및 결과

### 1) 바이러스 병원성 결정인자분석

#### 가) ZGMMV full-length clone을 이용한 chimeric mutants 제작

ZGMMV(pZGF37) 와 KGMMV(pKGF12) 의 4개의 도메인을 서로 치환한 10개의 chimeric mutant를 제작하였다(그림 2-3). 두 바이러스 내의 서로 공통의 enzyme site인 *Spe* I을 이용하여, 54kDa domain을 중심으로 각 ZGMMV, KGMMV를 주형으로 서로 치환하여 2가지 mutant인 ZK11, KZ1을 제작하여 ZGMMV, KGMMV와 restriction enzyme mapping을 통해 비교 분석, *Nicotiana benthamiana*와 오이 및 추키니 호박에 접종하여, 감염성과 복제능력 및 병원성을 분석하였다. 그 결과, ZK 혹은 KZ mutant 들은 오이에서는 복제와 이동이 wild-type과 차이가 없으나, 추키니 호박 (*Cucurbita pepo*) 에서는 감염부위에 국한하여 복제를 하고 전신이동이 되지 않는 특징을 보였다 (그림 2-2). 또한, 이들 ZK11, KZ1을 주형으로 ZGMMV 와 KGMMV의 CP, MP를 치환할 수 있는 primer이용하여 fusion PCR로부터 4가지의 mutant인 ZKZC, ZKZMC, KZKC, KZKMC를 제작하였고, KGMMV, ZGMMV를 각 주형으로 coat protein (CP) 과 movement protein (MP) 도메인을 염기서열내의 enzyme site를 이용하여 서로의 ZGMMV, KGMMV 로 치환하여 4가지 mutants ZGFKC, ZGFKMC, KGFZC, KGFZMC를 제작하여(그림 2-2). 이들 RT-PCR product에서 합성된 transcript를 *Nicotiana benthamiana*와 *Cucumis pepo* 에 감염성 테스트를 실시한 결과, 12종류 중에서 6종에서만 감염성이 확인되었고, 바이러스 근연종이라도 모든 chimeric virus 들이 복제 정도가 약하고 병원성이 약한 것을 확인할 수 있었다 (그림 2-3).



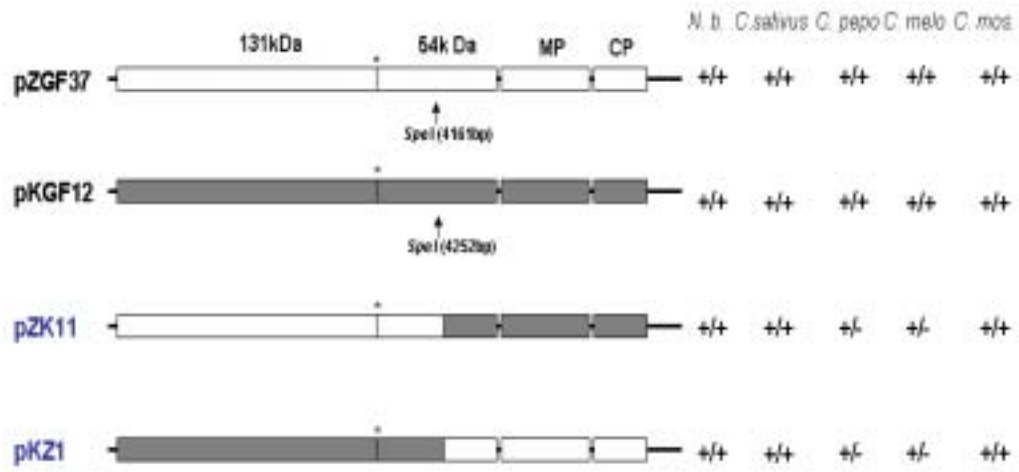


그림 2-2. Infectivity of ZGMMV, KGMMV, ZK11 and KZ1 chimeric viruses on four systemic host plants.

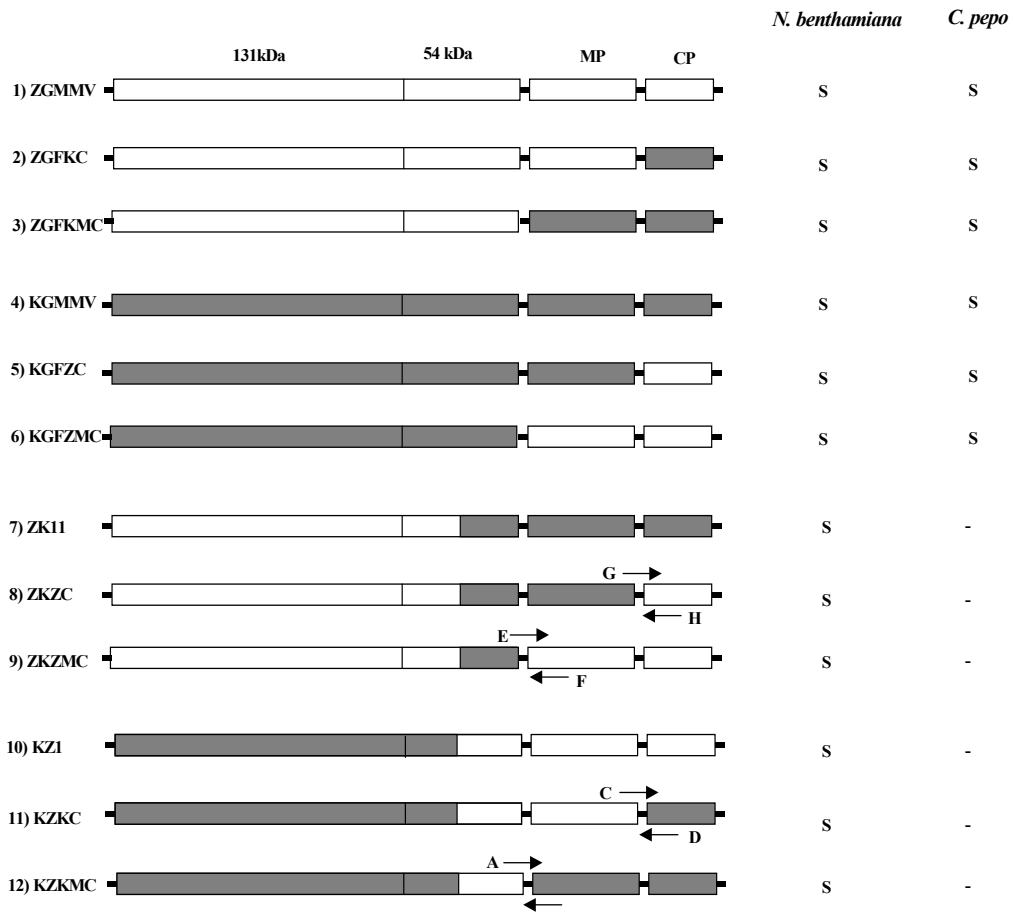


그림 2-3. Schematic representation of chimeric mutants derived from ZGMMV and KGMMV cDNA clones and their infectivity on *N. benthamiana* and zucchini squash cv. Black Beauty plants.

#### 나) CMV chimeric mutant 제작 및 병원성 결정 확인

Fny/Pf-CMV는 zucchini squash에서 severe mosaic (Fny-CMV), chlorotic spot (Pf-CMV) 로 병징 차이를 보인다는 Fny-CMV와 Pf-CMV간의 병징 결정 유전자는 이미 chimeric mutant 바이러스 연구를 통해 CMV RNA 2의 2a, RNA3의 3a 단백질 267번, 167번 아미노산에 의해 결정되는 것을 선행 연구를 통해 확인하였다. double

mutant (Fny-CMV R2,3T/C, Pf-CMV R2,3T/C)와 wild type Pf-CMV, Fny-CMV 간의 병징 차이 확인 및 병원성 결정에 대한 2a, 3a 각각의 기능을 분석하기 위해, double(Fny-CMV T/C R2R3, Pf-CMV R2R3C/T) 및 single mutant(Fny-CMV R2T/C, Fny-CMV R3T/C 와 Pf-CMV R2C/T, Pf-CMV R3C/T)를 제작 및 RNA를 조합하여 접종한 결과, 오이에서는 병징변화 차이를 확인할 수 없었으나, 슈키니 호박의 경우, double mutant와 유사한 severe mosaic과 chlorotic spot의 변화 병징을 관찰할 수 있었다. 2a, 3a 각각의 단백질은 바이러스 병원성의 차이를 나타내는데 독립적으로 작용할 것으로 예상하며, 이는 바이러스 이동에 영향을 주는 것으로 분석되었다 (그림 2-4).

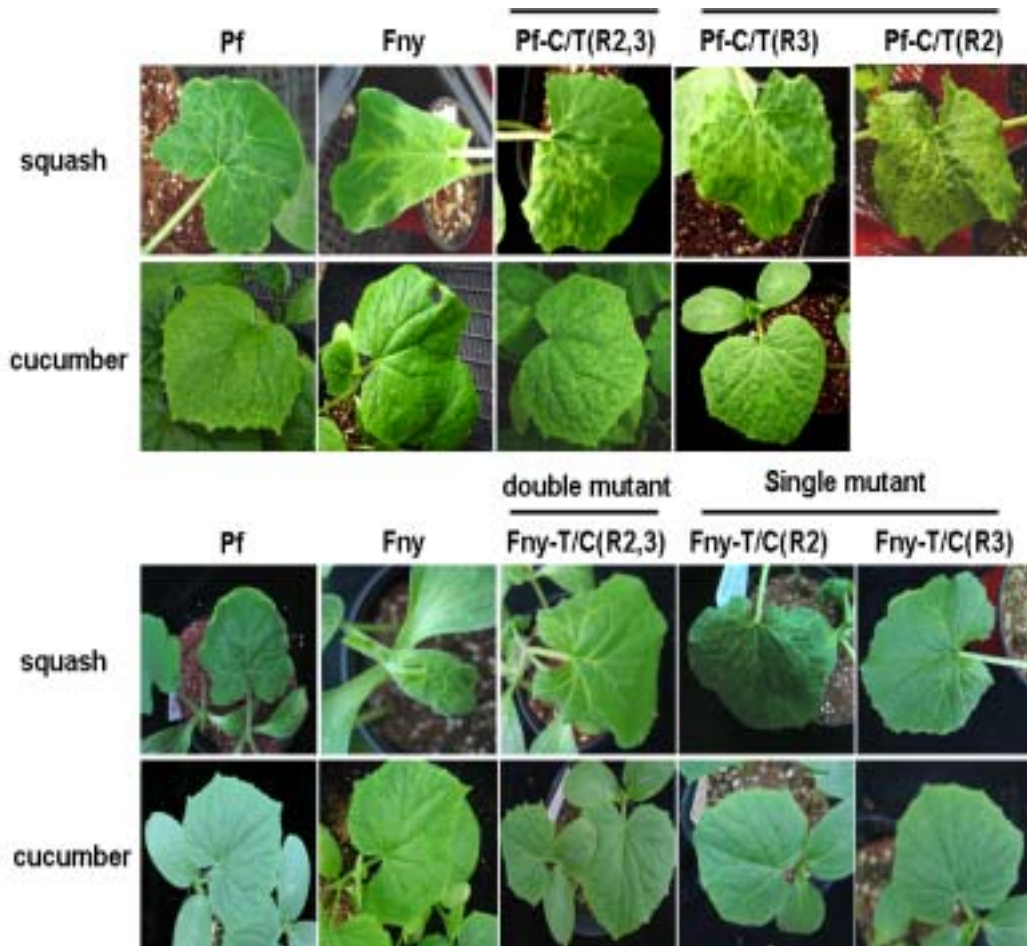


그림 2-4. Symptom patterns of wild-type of two CMV strains and their two point

mutants (CMV, Fny-CMV T/C, Pf-CMV C/T) on on zucchini squash and cucumber plants at 7 days post-inoculation.

#### 다) 바이러스 감염에 따른 병원성 관련 기주식물체 cDNA library ESTs 분석

ZGMMV의 초기감염이 진행된 Zucchini의 떡잎에서 분리한 mRNA를 주형으로 cDNA library를 제작하였다. Zucchini에서 ZGMMV의 초기 감염 단계에서의 특이적인 유전자를 선별하고, cDNA library를 구축하였다. 현재 약 1,200여개의 ESTs 분석을 완료하였고, ZGMMV의 감염에 따른 Zucchini 식물에서의 유전자 발현 양상을 분석하였고, 이 중 transmembrane protein, pectin methylesterase, transcription factor 외 다수의 EST clone을 선택하여 ZGMMV와 CMV 감염에 따른 식물에서의 발현 양상을 분석한 후 바이러스와의 상호작용에 대해 향후 활용할 예정이다.

## 2) Viral mutant의 병원성 스크리닝

### 가) ZGMMV mutant library 대량제작

XL1-Red를 이용한 random-mutagenesis로 얻은 약 1,000개의 colony를 pooling하였다. XL1-Blue 에 transformation 로 얻은 최종 colony 중 100개의 clone을 선별하여, RFLP 로 mutation 위치를 결정하고, wild type 과의 병원성 비교를 위해 *in vitro* transcription을 수행하여 스크리닝을 실시하였다.

### 나) CMV mutant library 대량제작

MGS를 통해 Fny-CMV RNA3의 mutant library를 제작하여 RNA3에 Mu-transposon의 무작위적인 삽입으로 야기된 mutant clone을 제작하여 Mu-transposon의 삽입을 확인하였으며(그림 2-5), 삽입된 Mu-transposon을 제거하여 최종적으로 15bp가 삽입되어 야기되는 mutants를 확보하였다 (그림 2-6), 이들은 wild type과 비교하여 병징 관여 및 바이러스 증식에 필수적, 비필수적 부위를 확인하여 분석하였다.

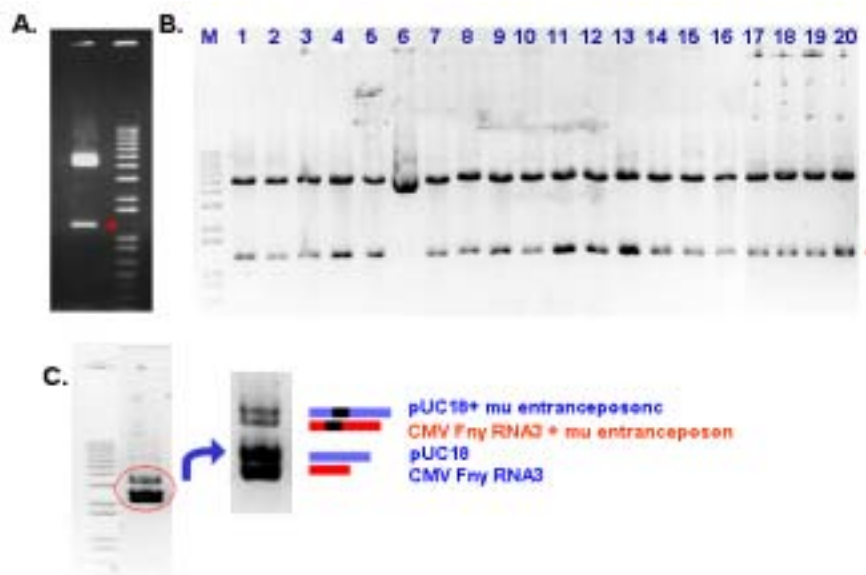


그림 2-5. Confirmation of insertion of Mu- transposon onto full-length cDNA clone of RNA 3 of CMV after *in vitro* transposition.

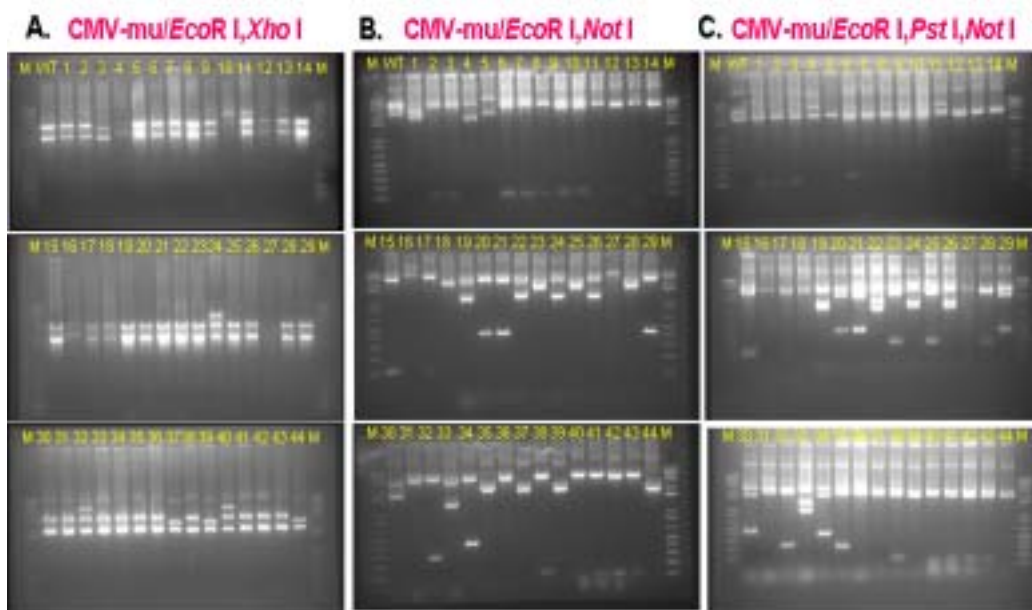


그림 2-6. Gel electrophoresis of selected mutants of CMV mu-RNA3 to check insertional sites of each mutant clones.

### 3. 약독바이러스의 특성 분석, 온실시험, 보호효과 및 피해경감기술개발

#### 가. 연구재료 및 방법

##### 1) 약독바이러스 선발 및 박과 기주식물 저항성 분석

###### 가) 기주식물 반응별 약병원성 계통 분리 및 유전자 확보

박과작물 바이러스 CMV, ZGMMV, KGMMV 를 이용하여 제작되는 대량의 mutant 들로부터 박과작물별 및 품종에 특이적으로 병원성이 약화된 mutant를 선발하였다. 선발된 CMV, ZGMMV, KGMMV mutant는 wild type, mutant, mock 처리에 의해 병원성을 비교 및 기주식물에서의 반응을 비교 검정한다. 이들의 선발되는 mutant 들은 wild type에 비하여 병징 발현양상이 느리거나, 병징을 보이지 않으나 바이러스는 존재하는 형태, 국부적인 병반을 보이는 즉, 상업으로의 바이러스 이동에 저항성을 갖는 mutant를 이용하여 박과작물, 특히 오이에서의 병원성 및 저항성 분석을 실시하고, 온실실험을 통해 약독바이러스를 선발하였다.

##### 2) 약독바이러스의 특성분석

###### 가) ZGMMV 외피단백질 (coat protein) mutant 제작 및 외래 유전자 발현 분석

염기서열의 치환, 삽입을 위해 PCR 방법을 적용하였다. 10kb 에 달하는 tobamovirus 의 전체 게놈을 조작하기위해서 mutation point에 해당하는 염기서열 부위에 가장 근접한 enzyme 염기서열이 되도록 양방향 primer를 디자인하여 ZGMMV 의 외피단백질 (coat protein; CP) 의 open reading frame (ORF) 의 start codon (ATG) 을 PCR 방법으로 치환한다. mutant 클론은 시퀀서로 염기서열을 확인하여 ZGMMV CP 발현을 억제하는 pZG $\Delta$ CP 클론을 제작하고, CP region 에 GFP 와 같은 reporter gene 등의 외부유전자를 클로닝하기 위해 primer 내에 enzyme site 삽입하여 PCR 방법으로 multiple cloning site (MCS) 를 삽입한다. 이들 mutant 클론은 full clone 내 포함되어 있는 T7 promotor 염기서열을 이용해 T7 transcriptase 로 인위적으로 RNA 산물을 만들어 생물검정 테스트하여 발현량을 측정한다. 위의 방법을 토대로 PMMoV 의 복제효소영역의 단독 및 이중치환을 site directed mutagenesis 방법을 통하여 유도하였다.

###### 나) ZGMMV 및 PMMoV 3' non-coding region (NCR) 구조 결정 및 mutant 제작

NCBI database 에 보고된 ZGMMV 및 PMMoV 3' NCR 염기서열을 바탕으로 기존에

보고된 *Tobacco mosaic virus* 를 모델로 tRNA 유사 구조 및 pseudoknot 구조에서 알려진 공통된 염기서열 (conserved region) 을 통해 결정하였다. 두 바이러스의 복제관련 3'NCR 의 2개의 pseudoknot 을 double-helical segment 의 4개 부분의 deletion mutant를 제작위해, Deletion 부위를 중심으로 N-terminal, C-terminal 양방향의 primer 로 각각 PCR 하여 얻은 산물로 다시 fusion 시켜 얻은 최종 mutation된 PCR 산물의 염기서열을 확인하고, wild-type인 ZGMMV 및 PMMoV full clone 의 3' NCR에 치환 시켰다. ZGMMV full clone 의 내의 T7 promotor 이용, *in vitro* transcription 으로 얻은 transcript 산물을 식물체에 접종하여 *in vivo* 상에서 expression 유무에 대한 생물학검정을 실시하였다.

#### 다) ZGMMV 및 CMV 의 random mutagenesis 를 이용한 mutant 특성 분석

ZGMMV full-length clone 의 random-mutagenesis를 위하여 MGS (mutation generation system, Finzymes)를 이용하였다. DNA transposition 에 기초한 MGS는 단백질과 규정된 부분의 DNA 의 기능적 분석을 위해 다른 방법에 비해 빠르고 효율적인 다수의 mutant 클론을 만드는 것이 가능하다. Mu-transposon (약 1.2Kb) 를 삽입을 확인한 후에, mu transposon 의 양 말단의 15bp 의 repeated region 이 유전자에 삽입된 (insertion) 채로 남도록 제한 효소 NotI 으로 절단하여 선발된 mutant 클론들의 mutation position 을 ZGMMV, CMV full clone 의 클로닝 제한효소와 NotI 으로 확인하여 지도화하였다. Clone 의 내의 T7 promotor 이용, *in vitro* transcription 으로 얻은 transcript 산물을 식물체에 접종하여 *In vivo* 상에서 expression 유무에 대한 생물학검정을 하였다.

### 3) 약독바이러스의 온실시험 및 보호효과 분석

약독바이러스의 보호효과 분석은 PMMoV를 사용하여 감염성이 확인된 *N. benthamiana*로부터 추출한 조즙액을 *N. benthamiana*와 고추에 각각의 변이주를 사용하여 접종하고 병징을 관찰한다. 선발된 돌연 변이주들이 교차보호효과를 가지고 있는지의 여부를 조사하기 위해 유기된 약독변이주들을 고추의 첫 번째 잎에 접종한 후 야생형(wild type)의 바이러스를 접종한 식물과 비교 검정하며, 이들 약독변이주들에 대한 보호효과는 접종 후 4주후에 야생형의 병징과 비교 관찰하여 평가하였다.

### 4) 약독바이러스의 피해경감기술 개발

#### 가) 4종 바이러스의 동시 유전자 검정법 개발

박과 감염성 바이러스 진단과 유전자 동정을 위하여 박과에 감염하는 4종의 Tobamovirus에 대한 프라이머를 고안 및 제작하였다. 박과감염 바이러스는 ZGMMV, CGMMV, KGMMV, CFMMV를 공시하여 박과에 특히 피해를 주며 감염성이 강한 4종의 Tobamovirus를 선정 사용하였다. 이들 바이러스에 대한 감염여부의 판정은 감염된 조직으로부터 Total RNA를 추출하여 RT-PCR방법으로 검정하였다.

## 나. 연구내용 및 결과

### 1) 약독바이러스 선발 및 박과 기주식물 저항성 분석

#### 가) 약독바이러스의 박과작물 보호 효과 및 온실실험 및 모델 정립

선발된 병원성이 약화된 박과작물 바이러스 CMV, ZGMMV, KGMMV mutant를 wild type, mutant, mock 처리에 의해 병원성을 비교 및 기주식물에서의 반응을 비교 검정 중에 있다. 이들의 선발되는 mutant 들은 wild-type에 비하여 병징 발현양상이 느리거나, 병징을 보이지 않으나 바이러스는 존재하는 형태, 상업으로의 바이러스 이동에 저항성을 갖는 mutant를 선발하고 박과작물에서의 병원성 및 저항성 분석을 실시하였다. 또한 이들 mutant를 통해 포장시험용 약독바이러스를 선발, 모델 시스템을 정립하였다.

### 2) 약독바이러스유기 및 특성분석

가) ZGMMV 외피단백질 (coat protein) mutant 제작 및 외래 유전자 발현 분석. ZGMMV 의 외피단백질 (coat protein; CP) 의 open reading frame (ORF) 의 start codon (ATG) 에 해당하는 염기서열 ATGcct -> AGGcct (StuI) 로 point mutation 시키기 위해 , ZGMMV CP 발현을 억제하는 pZG $\Delta$ CP 클론을 제작하였다 (그림 3-1 및 3-2 참조). ZGMMV CP region 에 외부 유전자를 삽입을 목적으로 CP transcriptional promoter sequence (+45nt) 에 해당하는 CP region 에 multicloning site (MCS; BssHII-Bst98I-NcoI) 를 삽입하여, GFP reporter gene 유전자를 cloning 하여 pZG $\Delta$ CPGFP 를 제작하였다 (그림 3-1). 기주 식물에 이들 mutant 의 in vitro transcription 을 통한 산물을 접종하여 발현을 관찰한 결과 CP 발현이 억제된 pZG $\Delta$ CP 은 예상대로 슈키니, *Nicotiana benthamiana* 에서 wild type ZGMMV 비교해 볼 때, 전혀 병징을 볼 수 없었으며, pZG $\Delta$ CPGFP 는 RNA 상에서 발현은 되지만 western blot 에서는 확인할 수 없었다 (그림 3-2). 이 결과로 미루어볼 때, pZG $\Delta$ CPGFP 클론이 슈키니 와 *N. benthamiana* 에서 복제는 되지만 그 이후 protein translation 에 영향을 주는 것으로 예상된다.



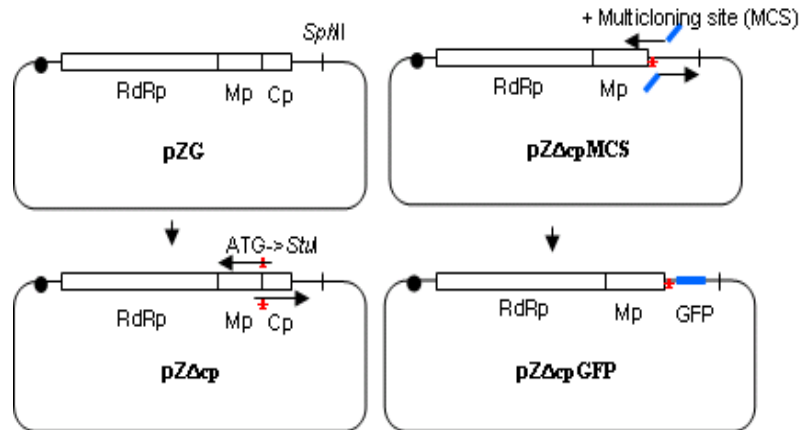


그림 3-1. Schematic representation of construction of vector system for ZGMMV

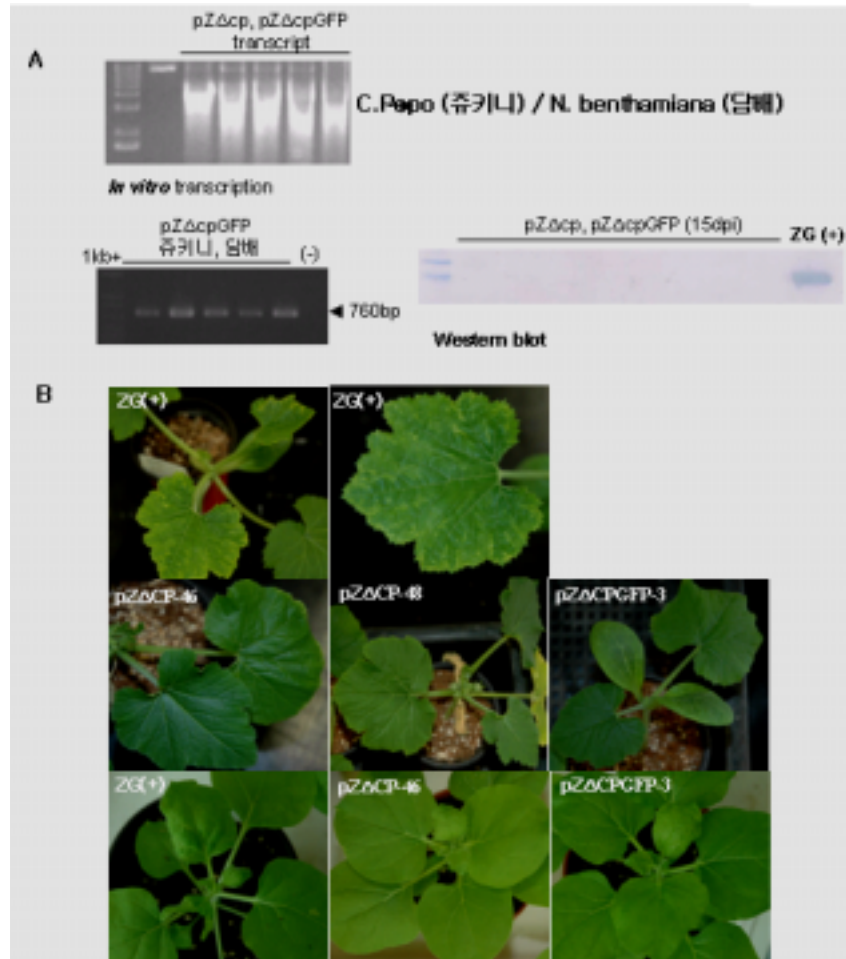


그림 3-2. Agarose gel electrophoresis of in vitro transcripts from constructed ZGMMV-based constructs (pZ $\Delta$ CP and pZ $\Delta$ CPGFP), Western blot, RT-PCR analyses of the pZ $\Delta$ CP, pZ $\Delta$ CPGFP mutant clone, and symptom expression of the clones on zucchini squash and *Nicotiana benthamiana* (B).

#### 나) ZGMMV 3' non-coding region (NCR) mutant 제작

##### (1) ZGMMV 3' NCR 구조 결정

대부분의 tobamovirus RNA 의 3' NCR 은 3개의 pseudoknot 과 클로버 모양의 tRNA 유사 구조를 형성하고 있으며, eukaryotic mRNA 등의 transcriptional machinery 로서 작용하는 poly (A) 대신에 그에 동일한 기능을 하도록 진화하였으며, 특히 replicase protein 을 인식하여 RNA minus strand 의 복제하는 중요한 역할을

하고 있다. 이러한 tobamovirus 3'NCR의 기능과 병원성에 관련한 보고 중 ToMV (*Tomato mosaic tobamovirus*) (Takamatsu et al., 1990) 의 3개 pseudoknot 에 대해 제작된 deletion mutant 의 *in vivo* 내 바이러스의 복제 및 병원성 에 대한 실험을 모델로 박과 작물 바이러스인 ZGMMV 3' NCR mutant 제작을 위해 약 163 개의 염기서열을 갖는 3' NCR 의 구조를 결정하였다 (그림 3-3). tobamovirus 이 갖는 3'NCR 의 conserved region을 갖고 있으며, 가지과속 감염 tobamovirus 중 다수 그룹인 (TMV, TMGMV, PMMoV, ToMV 등) 3'NCR 에 비해 약 60 개의 염기서열이 적었다. 이는 일반적으로 6개의 double helix 로 구성된 3개의 pseudoknot 을 갖는 바이러스들과 차별되게 4개의 double helical segment (I, II, III, IV) 로 구성된 2개의 pseudoknot 과 tRNA 유사 구조로 구성되었다 (그림 3-3). 이러한 구조는 CGMMV를 제외한 박과 작물 가해 tobamovirus 그룹 내에서 상동성이 높은 *Kyuri green mottle mosaic tobamovirus* (KGMMV) 에서 유사한 구조를 나타낸다.

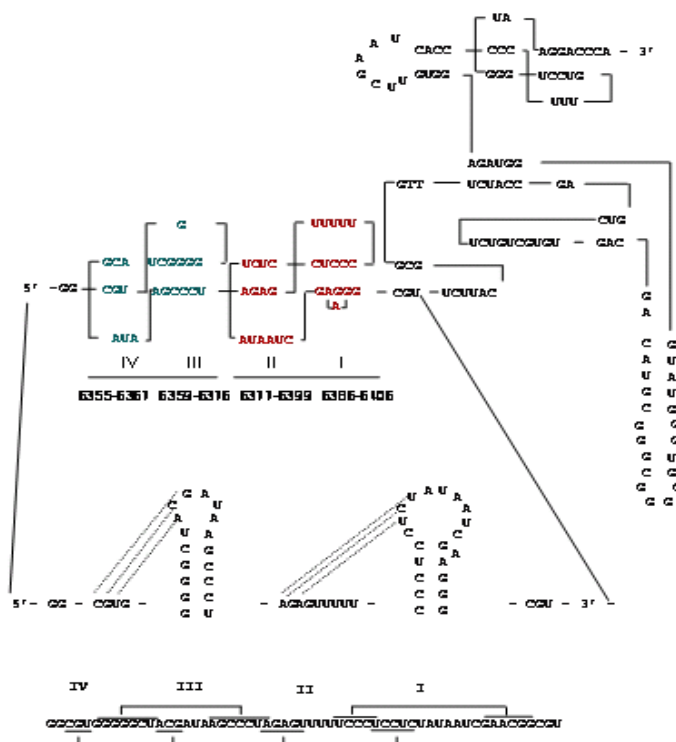
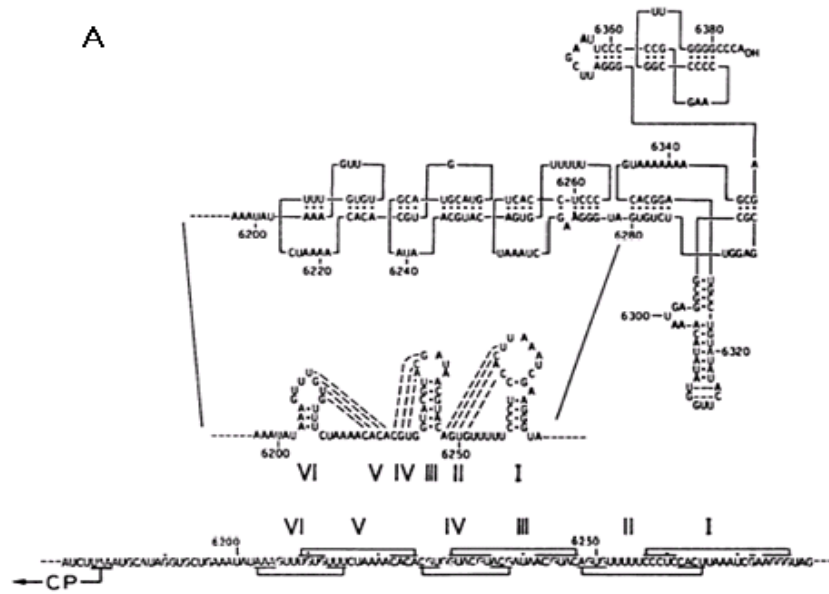
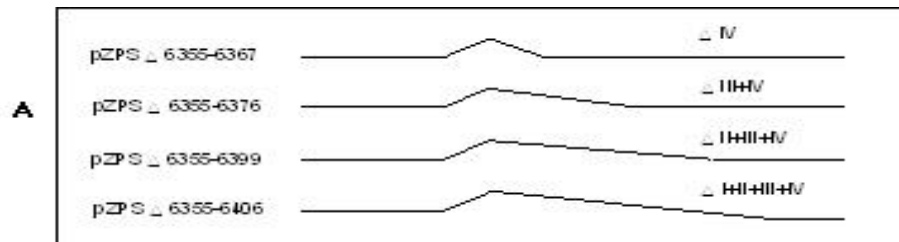


그림 3-3. Three-dimensional structures of pseudoknots of the 3' noncoding regions of ToMV (Takamathu et al., 1990) (A) and ZGMMV in this study (B).

#### 다) ZGMMV 3' NCR deletion mutant 제작

구조 분석된 ZGMMV 3' NCR의 pseudoknot 구조 (그림 3-3)를 토대로, 복제 관련 ZGMMV 3'NCR 의 2개의 pseudoknot 을 double-helical segment 의 4개 부분으로 세분화 하여,  $\Delta$ IV,  $\Delta$ III+IV,  $\Delta$ II+III+IV,  $\Delta$ I+II+III+IV 의 4 가지 deletion mutant를 제작하였다 (그림 3-4). mutant를 제작하게 위하여 Deletion 부위를 중심으로 N-terminal, C-terminal 부분으로 나누어 fusion PCR 을 위해 제작된 primer 로 각각 PCR하여 얻은 산물로 다시 fusion 시켜 얻은 최종 mutation된 PCR 산물의 염기서열을 확인 하여, wild type 인 ZGMMV full clone 의 3' NCR에 치환 시켰다 (그림 3-5). ZGMMV full clone 의 내의 T7 promotor 이용, *in vitro* transcription 으로 얻은 transcript 산물을 식물체에 접종하여 *in vivo* 상에서 expression 유무에 대한 생물학 검정을 실시하였다. ZGMMV 는 *Nicotiana tabacum* 담배의 N gene hypersensitive response (HR) local lesion 을 통한 복제 유무를 조사할 수 없었다. 감수성인 *Nicotiana benthamiana* 와 기주식물인 *Cucurbita pepo* 에 transcript 를 접종한 결과 두 가지 전신감염 기주 식물에서 mutant pZps 1에서는 wild type 과 동일하였으며, mutant pZps 2 에서 local lesion 을 그 외의 mutant (pZps3-4)에서는 어떠한 병징도 관찰 할 수 없었다. 따라서 이들 결손 된 부위가 바이러스 복제에 결정부위임을 확인 하였다.



**B**

name	sequence
p $\square$ p $\square$ siup	5'- AOC CGGT TTAT44 CAA GAT GCC TTA CTC TAC CAG OGG -3'
p $\square$ 2-1DN	5'- TCTAGGGC TTAT TCA AGA CGA GGT AGA CGA A -3'
p $\square$ 2-2DN	5'- AGGGAAAAACTC TCA AGA CGA GGT AGA CGA A -3'
p $\square$ 2-3DN	5'- OCCTTOGATTAT TCA AGA CGA GGT AGA CGA A -3'
p $\square$ 2-4DN	5'- OCGTAAGA AOG TCA AGA CGA GGT AGA CGA A -3'
p $\square$ 3-1up	5'- ACC TCG TCT TGA ATA AGC CCT AGA GTT TTT CC -3'
p $\square$ 3-2up	5'- ACC TCG TCT TGA AGA GTT TTT CCG TCC TCT AT -3'
p $\square$ 3-3up	5'- ACC TCG TCT TGA ATA ATC GAA GGG CGT TCT TA -3'
p $\square$ 3-4up	5'- ACC TCG TCT TGA CGT TCT TAC GCG CTT TCT AC -3'

그림 3-4. Schematic representation of deletions of ZGMMV 3'NCR to construct 4 different deletion mutants (A) and sequences of primers used for the construction (B).

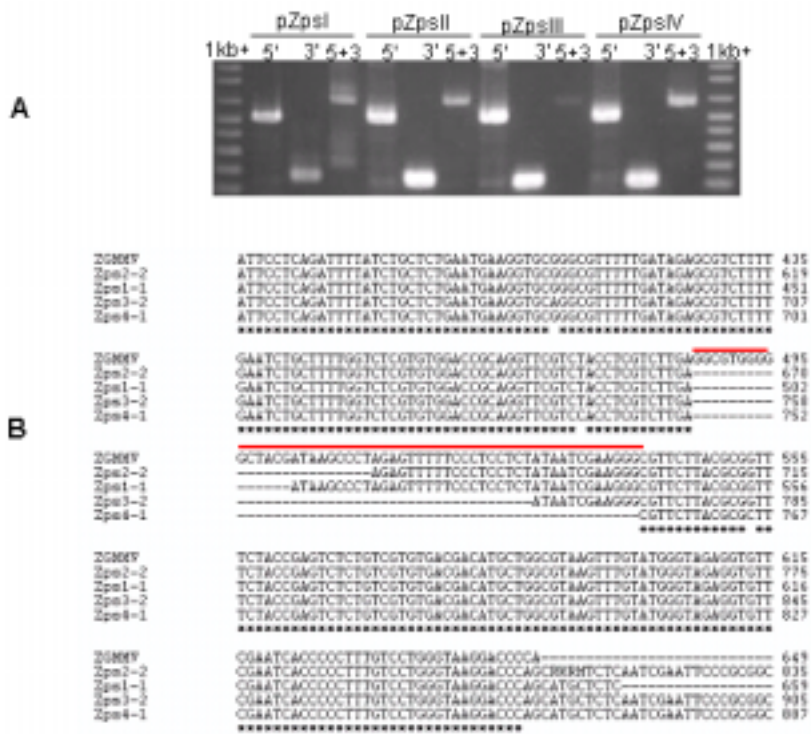


그림 3-5. Agarose gel electrophoresis of fusion PCR products for ZGMMV 3'NCR deletion mutants (A) and determination of nucleotide sequences of the mutants [Zps1-1 ( $\Delta$ IV), Zps2-2 ( $\Delta$ III+IV), Zps3-2 ( $\Delta$ II+III+IV), Zps4-1 ( $\Delta$ I+II+III+IV)].

박과작물 그룹에 속하는 tobamovirus 의 3' NCR 과 ZGMMV 3'NCR 의 치환을 통해 초기 RNA 복제 능력을 overexpression 또는 suppression 시킬 수 있는지에 대한 가능성을 검증하기로 하였다. 접종 후 초기 감염에 있어서 ZGMMV 에 비해 약한 KGMMV, CFMMV, 유키니에 무병정인 CGMMV 의 3' NCR 을 ZGMMV full clone 3'NCR 에 치환시키기 위한 mutation PCR 산물을 제작하였으며 (그림 3-6), 유키니에 강한 병원성을 보이는 wild type ZGMMV 을 대조구로 이들 mutant의 병원성과 복제량을 분석하였다. 본 실험 결과, 이들 chimeric 3' NCR 의 결손변이주들의 병원성이 wild-type과 구분되는 약화된 것을 확인하였다.



그림 3-6. Comparison of nucleotide sequences of the 3' NCR of 4 cucurbit-infecting tobamoviruses (A), sequences of primers (B), diagrams of ZGMMV 3'NCR mutants (C), and their derived fusion PCR products (D).



라) ZGMMV 및 CMV 의 random mutagenesis 를 이용한 mutant 특성 분석

Mu transposon 을 이용한 random mutagenesis 방법으로 pUC18 에 약 6.5kb 의 전체 게놈 RNA가 삽입된 full clone (pZF2-1) 에 Mu transposon (약 1.2kb) 의 mutation 반응을 후 벡터 및 transposon을 포함한 virus genome 크기가 (약 11kb) 가 되었다. 삽입된 mutant 들을 pooling 하여 제한효소 *NotI* 으로 절단하여 mutation point 를 지도화 하였을 때, 양 말단으로 mutation point가 제한 (mutant 의 90% 이상) 되고 있음을 보였다 (그림 3-7).

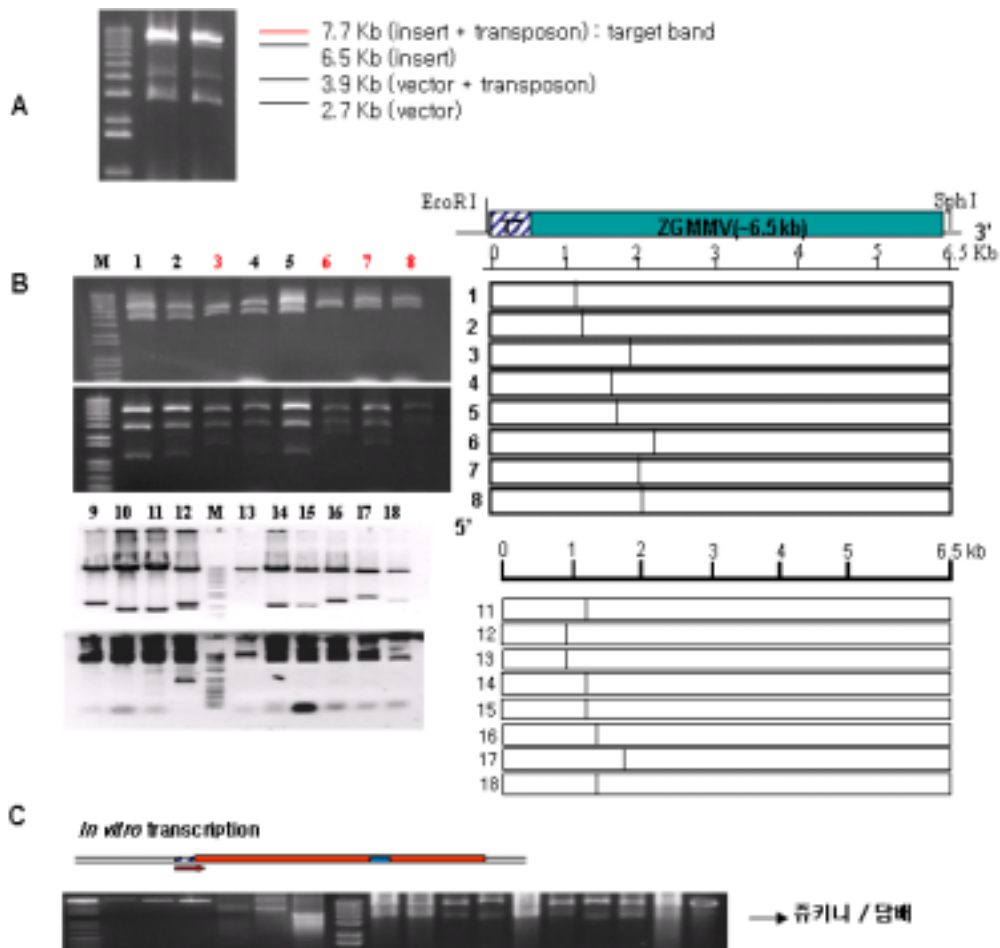


그림 3-7. Confirmation of insertion of Mu transposon into full-length cDNA clones of ZGMMV and KGMMV and their maps (A, B) and *in vitro* transcripts obtained

from the mutants (C).

이러한 결과는 CMV RNA3 (약 2.5kb) mutant 양상과 비교했을 때 11kb 이상의 유전자 사이즈로 인한 mutation reaction 이 후 실험에 있어서 cloning의 효율이 떨어지는 등의 이유로 초래되었다. 선별 과정을 통해 약 100여 개의 mutant 중에 15개의 mutant clone 의 생물학검정을 위해 *in vitro* transcription 과정을 거쳐 주키니에 transcript 산물을 접종하였으며 그 결과, wild type 의 mosaic, mottle 등의 강한 병원성을 나타내는 wild type 의 병반과는 달리 육안으로 병징을 관찰할 수 없었다. 그러나 ZGMMV CP primer 를 이용한 RT-PCR 에 의해 바이러스 mutant 감염 식물체에서 추출한 RNA로부터 CP 크기의 밴드를 확인할 수 있었지만, 혈청학적인 테스트 방법으로는 (western blot) 확인할 수 없었다. 이들 병원성이 약화된 mutants들은 attenuated virus로의 적응성 시험이 진행 중에 있다. 이 후 실험으로 RT-PCR 결과를 바탕으로 minus strand RNA의 합성관여에 대한 연구가 향후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

CMV도 ZGMMV 와 같은 방법으로 mutant 를 제작하였다. CMV-fny strain full clone RNA3 (약 2.5Kb) 에 *Mu*-transposon (약 1.2Kb) 를 삽입을 확인한 후에, *mu* transposon 의 양 말단의 15bp 의 repeated region 이 유전자에 삽입된 (insertion) 채로 남도록 제한 효소 *Not I* 으로 절단 확인하였다 (그림 3-8).

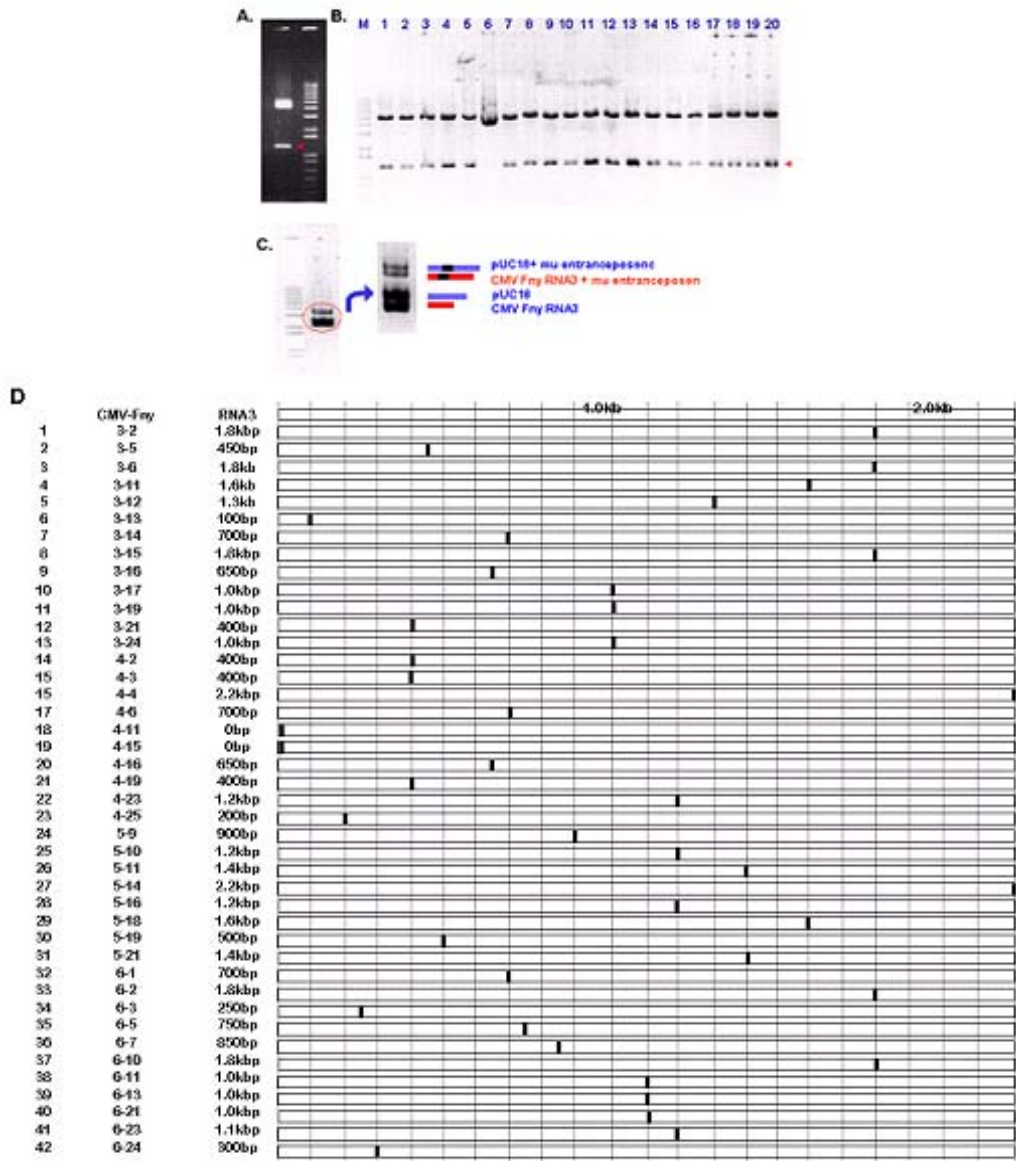


그림 3-8. Confirmation of insertion of Mu transposon into full-length cDNA clone of RNA 3 of CMV (A, B, C) and their derived maps (D).

본 과제 2년차와 3년차에 걸쳐 스크리닝한 약 500개의 CMV R3 mutant 중에서 유전자 pooling 과정 중 일어난 중복되는 mutant 선별 과정을 거쳐 최종 약 100개의 mutant 를 선별하였으며, 이들 중 80개 mutant 에 대해 CMV RNA1, 2 full clone 과 RNA 3 mutant 를 조합하였다. 이들 mutant의 mutation point의 양상은 양말단 및 internal 부분 등 균등하게 분포되고 있음을 확인하였다. 이들 mutants들을 T7 promotor 를 이용, *in vitro* transcription 을 통한 transcript 산물을 *Nicotiana tabacum* 'Samsun' 을 거쳐 최종 식물인 슈키니 에 접종하여 병원성에 관한 생물검정을 하였다. 병징 관여 및 바이러스 증식에 필수적, 비필수적 부위를 확인하기 위해 첫 번째 육안으로 병징의 스크리닝 결과, 30% (24개 mutant) 정도가 wild type 에 비해서 약한 병징을 나타내거나 무병징을 나타내었다. 또한 몇 개의 mutants들은 시간이 흐를수록 (접종 후 20일 이후) wild type 과 비슷한 병원성을 나타낸 경우도 있었다 (그림 3-9). 이 후 실험으로 첫 번째 스크리닝을 확인하기 위한 반복 실험과 mutant 의 mutation point 의 염기서열을 확인하여 과거에 보고된 RNA3 에 병원성 관련 position 과 비교실험을 통하여 향후 추가적인 약병원성 변이주를 활용할 수 있는 유전자원을 확보하였다. 이들 Mu-based CMV 클론은 기주식물에 접종 후 20일 이후에 wild type 와 같은 병원성을 보이는 mutant의 wild type화가 reversion 또는 단순한 병징의 지연효과에 기인한 것인지에 대한 확인 등 향후 분자수준에서의 이해가 필요할 것으로 사료된다.

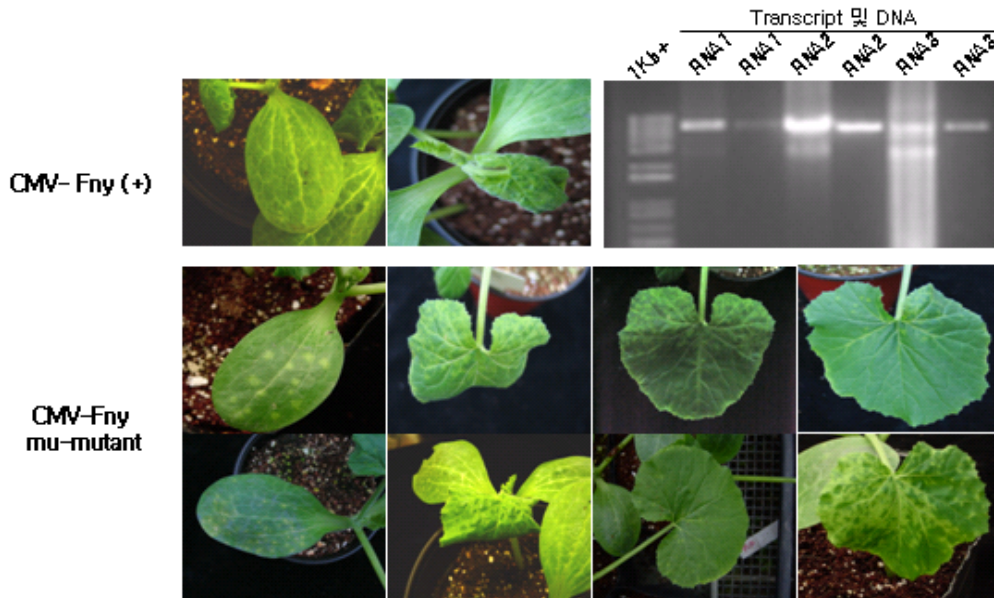


그림 3-9. Symptom expression of CMV-Fny and some selected Mu-based RNA3 mutants on zucchini squash plants.

### 3) 약독바이러스의 온실시험 및 보호효과 분석

이미 Tobamovirus에 대한 약독바이러스 (이하 약독변이주)에 대한 보고는 ToMV-L11 계통에 존재한다는 것이 알려져 있으며, 본 실험에서는 이와 동일한 genome 구조를 가지고 있는 PMMoV를 모델시스템으로 하여 우선적으로 약독변이주를 작성하였다. 약독변이주의 작성은 3가지유형으로 작성을 하였으며, 현재까지 약독 현상이 보고되어 있는 부분을 집중적으로 공략하여 제작하였다. 먼저 tobamovirus의 126 kDa부위의 치환과 3' NCR영역의 부분제거 및 두 변이가 혼합된 변이주등을 제작하고 이들을 사용하여 온실에서 약독바이러스의 보호효과를 분석하였다.

#### 가) 약독바이러스의 유기 및 온실시험

##### (1) 3' NCR deletion mutants의 효과

제작된 4개의 3' NCR 제거 돌연변이주의 복제가능여부를 검정하기위해 담배의 protoplast에 wild type의 바이러스를 대조구로 하여 복제가능여부 및 복제량을 조사하였다 (그림 3-10). 그 결과 감염성 및 복제량은 프로토플라스트에서의 차이는 없었

으며 (그림 3-11), 두 변이주(pTPD3-6207, pTPD3-6219)의 경우 *N. benthamiana*에서 야생형의 병징과 비교한 결과, 약한 모자이크 병징을 나타내었다. 또한 위의 두 변이주가 상업에서 leaf curling 병징을 나타내고 있는 반면, pTPD3-6249 변이주는 감염성이 인정되지 않았다. 한편 변이주 pTPD3-6197은 야생형의 경우와 비슷한 정도의 심한 모자이크증상을 나타내었다. 이러한 결과는 3' NCR를 5'에서 3'방향으로 차례로 제거해 나아갈 경우 6개의 3' NCR pseudoknots중 3개가 바이러스의 증식에 필요하다는 것을 암시하고 있다.

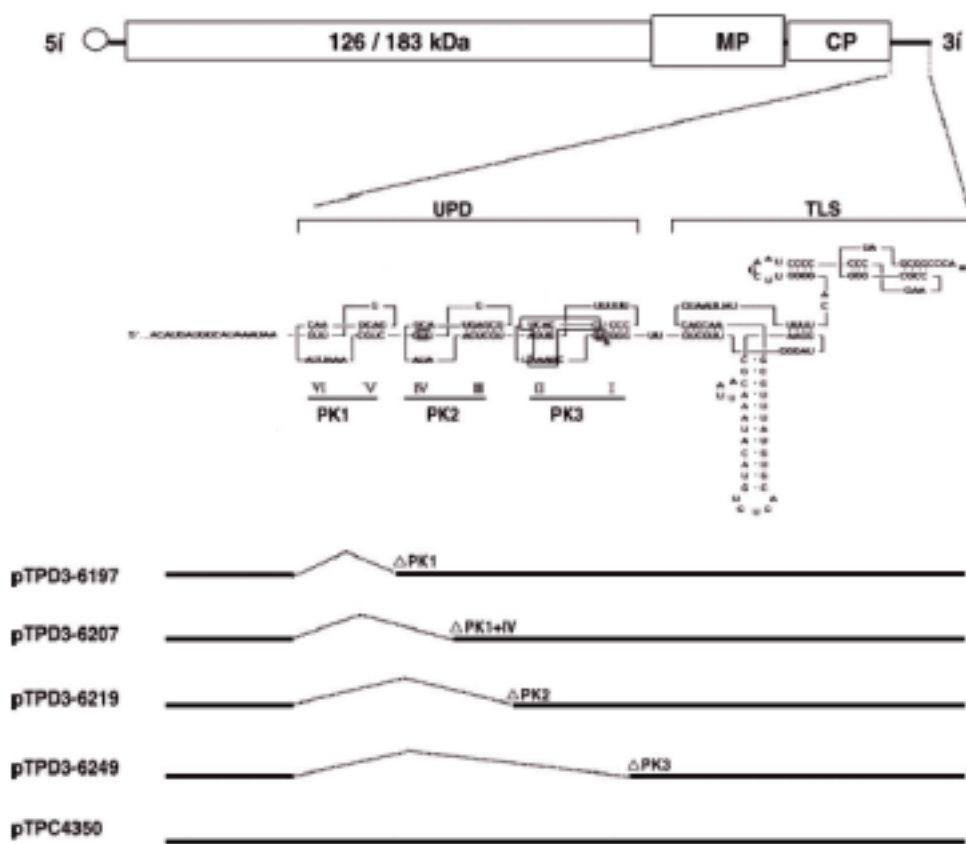


그림 3-10. Genome map of PMMoV and deletions in the 3'NCR. Schematic representation of individual deletions is shown below. The deleted regions are represented by dotted lines. The mutants had VI and V segments (6177-6197) cut out for pTPD3-6197, VI to IV segments (6177-6207) for pTPD3-6207, VI to III segments (6177-6219) for pTPD3-6219 and VI to I segments (6177-6249) for

pTPD3-6249. pTPC4350 is used as a wild type. The primary sequence essential for regulation by the UPD is denoted by the black line (Tanguay and Gallie, 1996). UPD, upstream pseudoknot domain; TLS, tRNA-like structure.

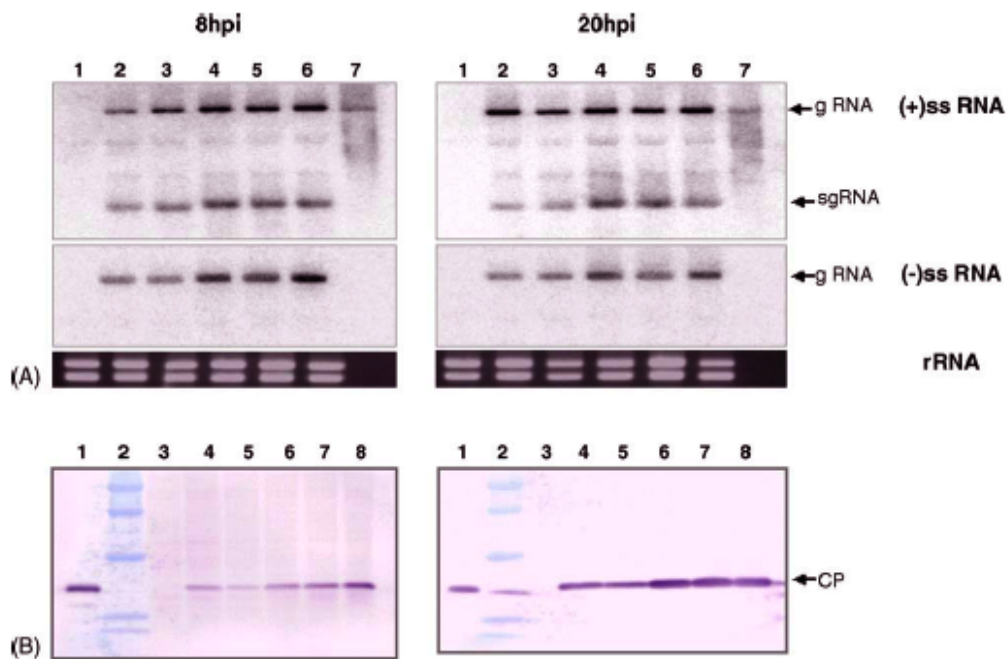


그림 3-11. Confirmation of replication efficiency and CP accumulation of PMMoV and mutants in BY-2 protoplast by Northern (A) and Western blotting (B). A. Northern blotting analysis with (+)ss RNA and (-)ssRNA. Lane 1, Mock; lane 2, pTPD3-6207; lane 3, pTPD3-6219; lane 4, pTPJ; lane 5, pTPA; lane 6, pTPC4350 and lane 7, 10 ng of viral RNA. B. Western blot analysis with PMMoV CP antibody. Lane 1, 1 ug of virion; lane 2, molecularmarker; lane 3, Mock; lane 4, pTPD3-6207; lane 5, pTPD3-6219; lane 6, pTPJ; lane 7, pTPA and lane 8, wild-type PMMoV.

(2) 기보고된 약독변이주 ToMV-L11A와 유사한 돌연변이주의 효과

야생형 바이러스에 대한 돌연변이주 pTPJ와 pTPA 변이주 의 생물학적 활성을 평가하기 위해 *in vitro* transcripts로부터 만들어진 자손바이러스를 *N. benthamiana*에 각각 접종하였다. 그 결과 이들 두 약독바이러스들은 병징은 나타나지 않았으나 3' NCR 변이주에서 보다 많은 외피단백질 축적량을 나타내었다 (그림 3-12).

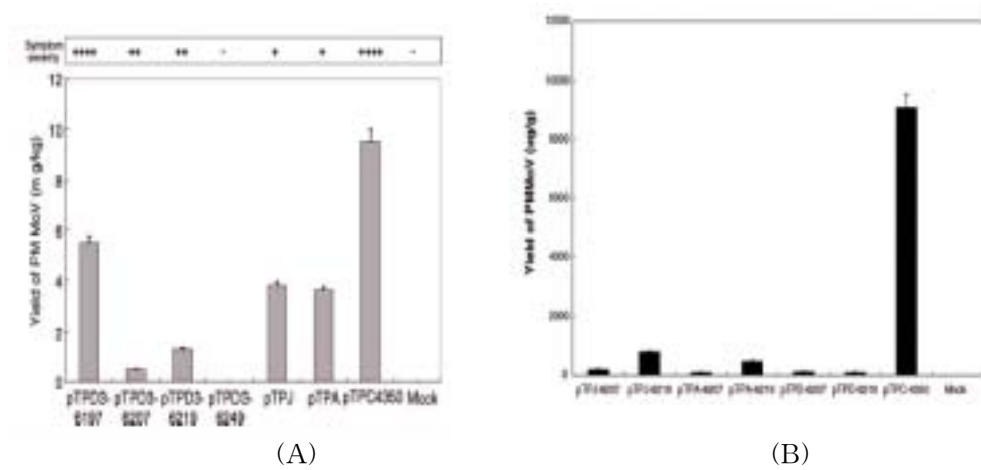


그림 3-12. Comparison of virus concentration and symptom severity in *N. benthamiana* inoculated with PMMoV, 3' NCR deletion and replicase substitution mutants (A). Relative virus concentration was measured from 1 g of infected leaves. Vertical bars indicate standard errors. + indicates mean symptom severity and - indicates no infection. Comparison of virus accumulation by ELISA in *N. benthamiana* inoculated with PMMoV and its combined mutants having deletion and substitution mutations of the 3'NCR and replicase, respectively (B). Pepper plants cross-protected by attenuated viruses were challenged by wild type PMMoV and mock PMMoV at 4 weeks post-inoculation.



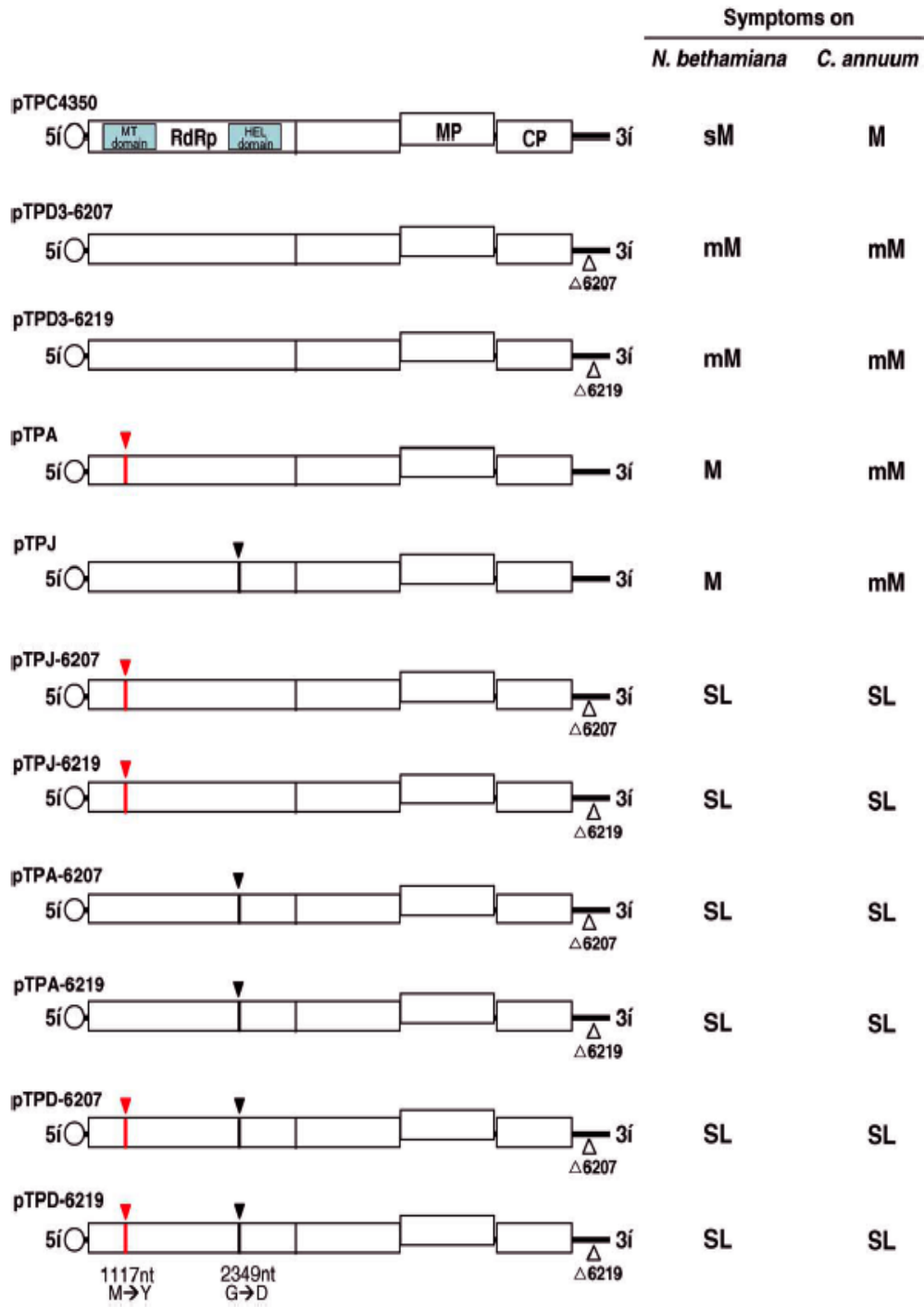


그림 3-13. Schematic representation of the genomic organization of PMMoV and its combined mutants having deletion and substitution mutations in the 3' NCR and replicase, respectively. Substituted and deleted positions are indicated by closed triangles (1117nt and 2349nt) and open triangles (6207 and 6219).

### (3) 유기된 약독 바이러스돌연변이주의 병원성 검정

기존에 여러 Tobamovirus들에서 보고되어 있는 결과와 같이 PMMoV의 경우에도 복제효소 도메인과 3' NCR은 병원성 완화에 관련되어 있는 것이 알려져 있다. 이러한 결과를 바탕으로 교차보호효과를 검정하기 위해 복제효소 유전자 영역의 단독 혹은 이중치환 그리고 3' NCR영역의 제거 변이주를 포함하여 6개의 서로 다른 PMMoV 변이주를 각각 제작하였다. 유기된 모든 돌연변이주들에 대한 Viral RNA는 *in vitro* transcripts를 사용하여 *N. benthamiana*에 고추에 각각 접종하였으며, 변이주들은 대부분 약한 모자이크 병징을 나타내었다 (그림 3-13). 특히 복제효소유전자 영역의 이중치환 변이주 pTPD-6207과 pTPD-6219는 매우 약한 모자이크 병징을 나타내었다. 3' NCR영역의 제거 돌연변이주는 야생형 바이러스와 비교하였을 때 *N. benthamiana*에서 병징을 나타내지 않았다. 이들 각각의 변이주들의 외피단백질 발현량을 야생형의 바이러스와 비교해 본 결과 변이주들에서 낮은 발현량을 나타내었다 (그림 3-14).

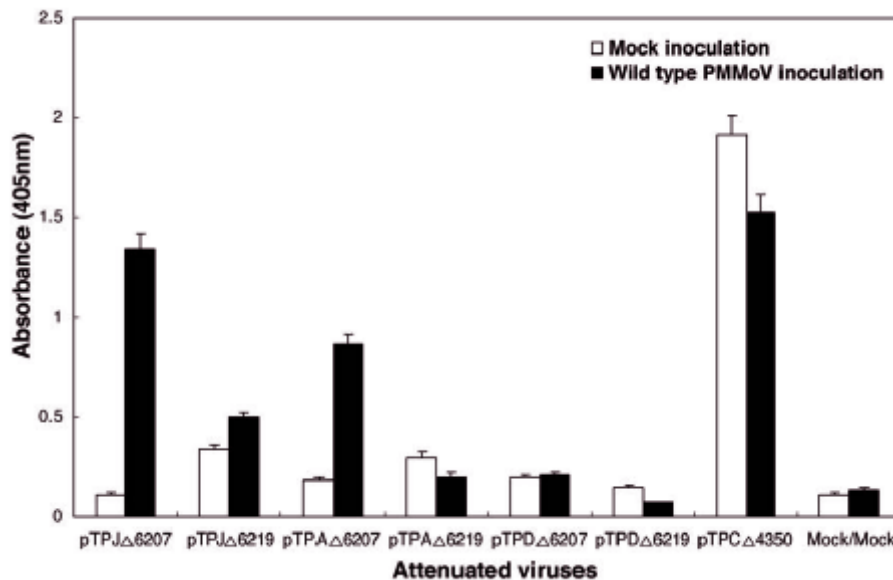


그림 3-14. Comparison of virus accumulation by ELISA in *N. benthamiana*

inoculated with PMMoV and its combined mutants having deletion and substitution mutations of the 3'NCR and replicase, respectively. Pepper plants cross-protected by attenuated viruses were challenged by wild type PMMoV (black bars) and mock PMMoV (white bars) at 4 weeks post-inoculation.

#### (4) 약독바이러스의 온실시험 및 보호효과분석

감염성이 확인된 *N. benthamiana*로부터 추출한 조즙액을 고추에 각각의 변이주를 사용하여 접종한 결과, 병징이 없거나 매우 연한 모자이크 병징이 나타남을 확인하였다 (그림 3-15). 이 돌연변이주들이 교차보호효과를 가지고 있는지의 여부를 조사하기 위해 유기된 약독변이주 6주를 고추의 첫 번째 잎에 접종한 후 야생형(wild type)의 바이러스를 접종한 식물과 비교검정하였다. 이들 약독변이주들에 대한 보호효과는 접종 후 4주후에 야생형의 병징과 비교 관찰하여 평가하였다. 여러 돌연변이주와 비교한 결과, 이중치환 돌연변이주(double substitutions mutant)와 3' NCR의 제거 돌연변이주(deletion mutant)의 경우에서 야생형 바이러스의 병징과 비교하였을 때 가장 강한 교차보호효과가 인정되었다.

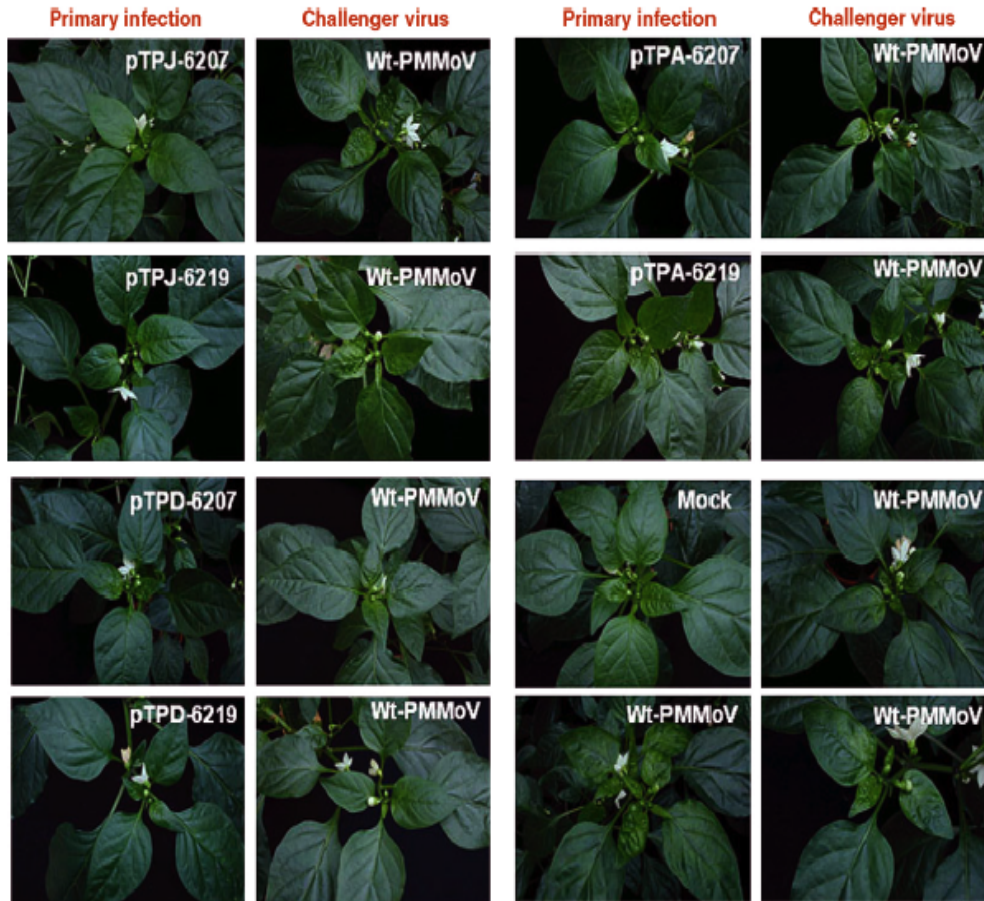


그림 3-15. Cross-protection in green pepper plants. Wild-type PMMoV as a challenger virus was inoculated 4 weeks after primary inoculation of PMMoV and its derivatives having deletion and substitution mutations of the 3' NCR and replicase regions. Photographs were taken 4 weeks post-inoculation when the challenger virus was introduced.

#### 4) 약독바이러스의 피해경감기술 개발

가) 박과작물에 피해를 주는 4종의 바이러스의 동시(multiplex RT-PCR) 검정법 개발

오이, 박, 수박 호박, 메론 등 박과식물은 대체로 tobamovirus 그룹에 속하는 4가지

바이러스인 *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV), *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV), 그리고 *Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV)들에 의해 피해가 심한데 이들의 기주 특성 및 범위는 박과식물로 한정되어 있는 점이 특징이어서 바이러스의 동정에 필요한 표준 기주식물의 범위가 매우 한정되어있다. 따라서 표준 검정식물에 의한 동정 및 분류는 매우 어려운 실정이어서 보고된 바이러스에 대한 염기서열의 정보를 토대로 이들 4종 바이러스의 동시(multiplex RT-PCR)검정법을 정립하기 위해 박과작물에 감염하는 tobamovirus의 프라이머를 고안 및 제작하였다. 제작된 프라이머를 가지고 검정해본 결과 지금까지 많은 유전자검정법에서 문제시되던 비특이적 반응이 없었고 동시에 목적하는 4종의 바이러스를 동시 진단 검정이 가능하였다(그림 3-16).

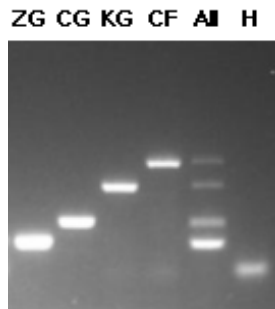


그림 3-16. Development of multiplex RT-PCR to detect 4 species of cucurbit-infecting tobamoviruses (ZG, ZGMMV; CG, CGMMV; KG, KGMMV, CF, CFMMV; All, 4 virus-infected samples; and H, healthy control).

#### 나) 박과작물에 있어 자연변이주의 선발과 온실효과검정

위의 실험결과를 토대로 실제 박과포장에서의 자연약독 변이주 선발을 시도하였다. 먼저 약독변이주의 선발은 종자 감염된 바이러스를 위주로 약한 바이러스 병징을 나타내는 바이러스를 선발하였다. 바이러스의 검정은 최근 새로 개발한 박과작물 특이 프라이머를 사용하여 바이러스의 검정에 사용하였다. 특히 바이러스가 감염되어있는 것으로 추정되는 종자를 가지고 Total RNA를 추출하여 배젓, 종피, 종자자체로 각각 나누어 검정에 이용하였다. 그 결과 배젓의 경우 ZGMMV가 단독 및 다른바이러스와 이중으로 감염되어 있을 경우에도 검정되었으며 종피와 종자자체에서는 ZGMMV 및 CGMMV가 함께 검출되는 특성을 보였다 (그림 3-17). 이러한 결과를 볼 때 박과작물에서 특히 우려되는 종자감염의 문제를 해결하는데 있어 종자에서의 조기검정시

시스템의 개발의 필요성이 절실히 요구되며 금후 이 프라이머를 이용하여 박과작물의 종자검정에 있어 신속 정확한 검정수단으로 이용가능 할 것으로 판단되었다.

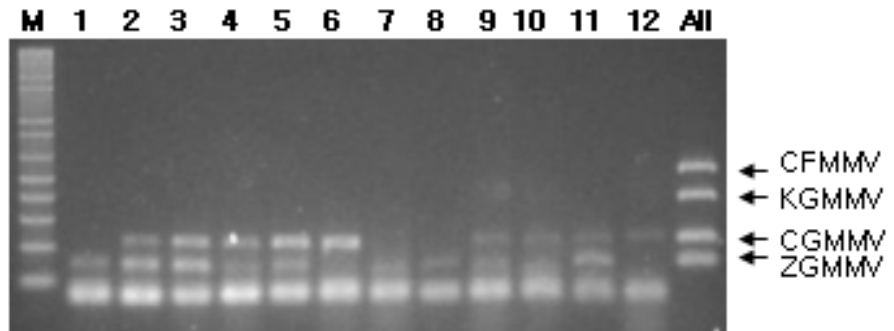


그림 3-17. Detection and identification of cucurbit-infecting tobamoviruses from contaminated seeds of zucchini squash and pumpkin by multiplex RT-PCR.

#### 다) 실제포장에서의 피해정도 분석

박과작물을 재배하고 있는 재배포장에서의 피해정도를 검정하기 위해 바이러스의 포장조사를 실시하였다. 그 결과 포장에 따라서는 다양한 병징 패턴이 존재하고 있음을 알 수 있었고, 시료에 따라 2종의 바이러스가 동시에 감염되고 있음을 확인하였다 (그림 3-18).

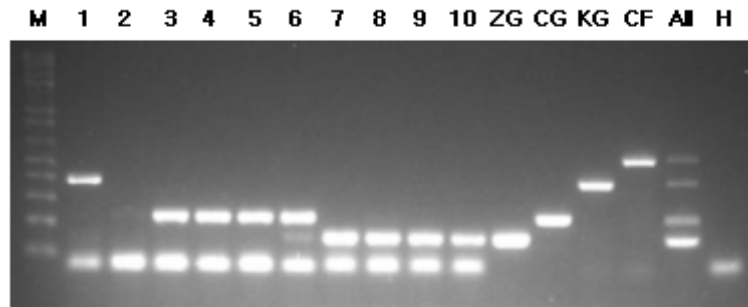


그림 3-18. Detection and identification of cucurbit-infecting tobamoviruses from collections from field samples of cucurbitaceous crops by multiplex RT-PCR.

#### 라) 약독가능성 자연 변이주 선발

박과작물, 특히 오이와 호박에서의 자연약독변이주의 선발을 위해 포장에서 감염되어 있는 바이러스를 분리하여 오이와 주키니에 접종하여 병징이 약한 약독변이주의 선발을 시도하였다. 우선 각각의 바이러스를 단독분리하여 *N. benthamiana*에 접종하고

병징이 약한 바이러스를 오이와 추키니에 접종하여 병징이 약한 바이러스를 분리하였다 (그림 3-19). 바이러스의 존재유무는 박과작물에 특징적으로 감염하는 4종의 tobamovirus의 특이 프라이머를 제작하여 바이러스의 검정에 사용하였다.



그림 3-19. Selection and symptom expression of candidates of attenuated mutants from field isolates of cucurbit-infecting tobamoviruses.

#### 마) 약독바이러스의 박과작물 보호 효과 분석 및 피해 경감기술 개발

선발된 병원성이 약화된 박과작물 바이러스의 mutant를 wild type, mutant, mock 처리에 의해 병원성을 비교 및 기주식물에서의 반응을 비교 검정한 결과, 이들의 선발되는 mutant 들은 wild type에 비하여 병징 발현양상이 느리거나, 병징을 보이지 않으나 바이러스는 존재하는 형태, 상업으로의 바이러스 이동에 저항성을 갖는 mutant를 선발하고 박과작물에서의 병원성 및 저항성 분석을 실시 중에 있다. 또한 이들 mutant를 통해 포장시험용 약독바이러스를 선발하였다. 본 연구결과, 효과적인 바이러스 방제를 위한 피해 경감법은 다음과 같다.

- (1) 종자로부터 종자전염 바이러스원의 정밀진단을 통한 오염원 제거
- (2) 약독바이러스를 이용한 유묘의 선접종을 통한 교차보호
- (3) 포장 이식 후 병징과 주기적인 바이러스 분자 모니터링
- (4) 약독바이러스의 안정성 검정 및 효과 분석 : 작물별, 품종별 선발압 분석 등
- (5) 유묘단계 및 작물 재배과정에서 약독바이러스처리구의 병징 발현 양상 분석
- (6) 포장의 격리 및 생산물의 검정체계 적용을 통한 포장위생
- (7) 종자 산물의 바이러스 오염 검정을 통한 우수 종자 생산체계 확립

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

#### 1. 1 년차

- 가. 박과채소 주요 바이러스의 분리와 염기서열 결정
- 나. 주요 박과 채소 바이러스의 infectious clone 제작
- 다. 박과 Tobamovirus mutant 제작
- 라. Viral mutant 선발 및 검정기술 개발
- 마. 병원성 관련 기주 cDNA library 제작

#### 2. 2 년차

- 가. 박과 채소 종 또는 cultivar에 따른 복합감염 반응차이 분석
- 나. 바이러스 병원성 및 synergism 결정인자 분석
- 다. Viral mutant의 스크리닝 및 병원성 검정
- 라. 약독바이러스 선발 및 저항성 분석

#### 3. 3 년차

- 가. synergism과 관련된 유전자 분석
- 나. 약독바이러스의 특성 분석 및 보호효과 분석
- 다. 약독바이러스의 피해경감기술 개발



## 제 2 절 연구개발 목표의 달성도

구분	연구목표	연구내용	목표달성도 (%)
세부과제명	CGMMV와 ZYMV의 복합감염에 의한 수박 병징 상승과 기주-바이러스 복합체의 상호작용 변이구명	1)CGMMV와 ZYMV의 수박기주에 대한 복합 감염실태파악 및 각 isolate들의 염기서열분석과 대표적인 strain에 대한 infectious clone 제작	95
		2)복합감염에 의한 각 virus strain간의 상호작용연구	100
		3)복합바이러스와 수박 기주 간의 상호작용연구	100
협동과제	CMV및 ZGMMV의 병원성결정인자분석과 약독바이러스를 이용한 오이의 피해경감기술 개발	1)박과 Tobamovirus mutant제작 및 식물체 감염성분석	100
		2)바이러스 결정인자분석 및 viral mutant의 병원성 스크리닝	100
		3)약독바이러스의 특성분석, 온실시험, 보호효과 및 피해경감개발	95

수박, 박, 오이, 메론 등 박과 작물의 경우 바이러스의 감염에 의한 피해가 매년 속출하고 있고, 본 과제의 목표 바이러스 중에서 박과감염성 tobamovirus인 종자 감염성 바이러스의 경우 바이러스가 감염된 오염종자의 농가 보급과 이들을 재배하는 과정에서 바이러스 이병잔재물 등으로 토양오염이 된 재배지역에 지속적으로 박과 작물을 재배함에 의해 종자 판매회사나 재배 농가가 큰 피해를 본 바 있고 지역에 따른 차이는 있으나 CMV, ZYMV, WMV 그리고 CGMMV에 의한 피해가 매년 속출하고 있고 일부 지역에서는 100%의 감염율을 보이고 있다. 또한 대부분의 박과 작물 재배 포장이나 인접 포장에서 CMV, ZYMV, WMV 그리고 CGMMV가 검출되고 있고 다양한 종류의 strain이 이미 존재하고 또한 생성되고 있는 추세여서 바이러스의 감염에 의한 피해가 증가하고 있고 바이러스 병 방제 방법의 부재로 인한 대책이 요구되고 있다. 따라서 안정적인 고품질 우량 박과작물의 지속적 농업을 통한 농가소득 향상과 종자산업의 안정적 기반 확보 및 품종의 지속적 안정화를 통한 신품종 육종이 요구되어 왔다.

본 과제를 진행한 연구자들은 지난 10여 년간 주요 식물 RNA 바이러스들을 대상으로 바이러스의 증식기전, 감염가능 클론 제작, 병 방제 및 기주-바이러스의 상호작용

등의 연구를 진행하여 왔고 본 연구 과제를 통해 국내 수박 및 오이 주 재배지역에서 빈번히 감염하여 큰 피해를 꾸준히 일으키고 있는 CMV, ZYMV, CGMMV, KGMMV 등 주요 바이러스들을 대상으로 감염 가능한 클론을 제작하고 바이러스 병 발생 기전을 이해하기 위해 주요 바이러스들의 복합 감염 시 병징 상승 또는 간섭효과가 나는 기전을 이해하며 약독 바이러스를 대량으로 선발, 이용하여 피해 경감기술을 개발하는 것을 목표로 하고 있다. 본 연구에서는 주요 오이 및 수박 바이러스들을 분리, 확보하여 계놈분석을 완료하였으며 대표적인 strain들을 대상으로 감염 가능한 클론들을 제작하였다. 또한 대상 바이러스들의 병원성 결정 부분 및 바이러스 간 상호작용 시 중요한 도메인(아미노산)을 규명하여 바이러스 간 또는 바이러스와 기주의 상호작용을 분자생물학적 수준에서 이해할 수 있는 기초적인 결과 및 자료를 확보할 수 있었다. 본 과제에서는 이러한 박과식물에서 문제되는 바이러스를 방제를 목적으로 약독 바이러스를 활용하기 위한 기술과 유전자원을 확보 활용하고자 실시하였다. 박과 Tobamovirus mutant 제작용으로 *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV)와 *Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV)를 공시하였고, 이들에 대한 모델바이러스로는 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) 를 공시하여 이들 바이러스의 약병원성 계통을 분자적 방법을 이용하여 제작하고, 선발 활용하였다. Virus mutant 선발은 mutant를 접종한 기주식물체에서 병원성 검정과 함께 특정 제한효소 부위를 인공적으로 도입한 marker virus를 개발하여 mutant 검정에 활용하고, 삽입 돌연변이체의 경우에는 바이러스 유전자내로 삽입되는 특정 제한효소부위를 이용하여 mutant들의 RFLP 비교분석 기술을 개발 활용하여 바이러스 변이주의 선발과 검정용 추적기술을 개발하였다. 특히, 제작된 각 바이러스 full-length cDNA 클론과 이들로부터 유래된 mutant virus 유전자라이브리리를 개발 확보하여, 향후 이들 바이러스를 이용한 교차보호 방제기술을 개발하였다. 바이러스에 의한 병은 방제가 어려워 피해를 줄이기 위해 주로예방 및 전반 또는 유입방지 등에 주로 치우치고 있는데 본 연구를 통해 약독 바이러스들을 이용한 바이러스에 의한 병의 피해 예방기법을 확보하였다는데 그 실용적 의의가 있고 전반적으로 연구목표는 달성되었다고 사려된다. 3년 동안에 얻은 결과의 일부는 이미 국내외학회지에 11편 발표를 하였으며 국내외 학술대회에서 7건 발표하였다. 연구 종료 후에도 계속 논문을 발표할 예정이다.

### 제 3 절 관련분야에의 기술발전 기여도

본 연구는 우리나라 주요 수박 및 오이 재배포장에서 발생하고 있는 바이러스들을 분리, 동정하고 계놈분석을 완료하여 대표적인 strain들을 대상으로 감염 가능한 클론을 제작하여 이 분야의 기술발전에 도모하였다고 사려된다. 특히 바이러스-기주 간의 상

호작용 및 병징 발현에 중요하게 작용하는 도메인들에 대한 정보를 추가하여 향후 관련 분야의 연구에 유용한 기반 지식 및 기술을 제공하였으며 바이러스의 방제 및 피해 경감을 위한 기술 개발을 현장에서 비교적 효율적으로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구를 통해 얻은 기술 및 결과는 여러 국외학술지(J. Gen. Virol. 2006; J. Gen. Plant Pathol., 2005; Mol. Cells 2006; Virus Res. 2005, 2006; Plant Cell Reports, 2005)에 게재되어 점차 많은 국내외 연구자들에 의해 인용되고 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

수박 및 오이를 감염하는 바이러스들에 대한 감염실태 및 변이사례가 본 연구에 의해 진행되어 다양한 바이러스들이 단독 또는 복합 감염하여 피해를 유발하는 것으로 밝혀졌으며 이 중 주요 바이러스들의 대표적인 strain들을 대상으로 전체게놈을 분석하고 감염 가능한 클론을 제작하여 바이러스의 감염 및 증식과정 중에 일어나는 기주와 바이러스 간의 다양한 상호작용 연구에 이용될 중요한 유전자원을 확보하였음을 의미한다. 따라서 바이러스의 감염 방지와 병 예방 및 치료에 필수적으로 요구되는 바이러스의 증식기전 연구는 본 연구의 종료 후에도 지속적으로 추진되어야 할 것이다. 또한 바이러스 병의 피해 경감을 위한 약독바이러스의 제작기술 및 이들을 이용한 포장적용 기술 등은 향후 다른 중요 경제작물의 바이러스 피해 경감에 확대 이용될 수 있으므로 생성된 약독 바이러스가 대상 바이러스의 증식을 억제하는 정확한 기전이해와 생성된 약독바이러스의 포장 안정성 및 병원성 회복 가능성에 대한 연구도 함께 진행되어야 할 것이다. 이러한 연구는 바이러스와 기주의 다양한 상호작용 이해 및 바이러스의 증식 및 병 진전 과정의 병리학적, 생화학적 및 유전적 특징을 구명하게 될 것이다. 따라서 본 연구의 성과들을 보다 효율적으로 활용하기 위해서는 연계 연구가 진행되어야 할 것이고 추가연구에서는 선행연구의 경험과 유용한 결과의 확보 등의 연구 능력과 참여 연구팀 간의 유기적인 공동연구 진행 및 전문성 등을 고려하면 연계 연구의 성공적인 추진을 기대할 수 있다.

### 제 2 절 타 연구에의 응용

1. 바이러스 병원성 및 저항성 기전의 해석을 통한 새로운 방제기술 개발과 타 작물로의 응용가능
2. 박과채소류 재배 농가의 주요한 현장어로 사항인 바이러스 방제기술 보급
3. 주요 작물 바이러스 방제에 활용 가능한 기반기술력 제공
4. Virus 감염 및 이동 경로 등 기전 규명을 통한 신개념 기술 개발
5. 목표 지향적 target screening을 통한 바이러스 방제법의 개발
6. 바이러스 병 관련 고유유전자 확보에 따른 특허 획득

7. 고유 유전자의 분자 육종에 이용하여 바이러스 저항성 신품종 육종 가능
8. 확보된 고유 유전자와 상호 작용하는 다른 박과 채소 유전자나 주요 박과 채소 바이러스 유전자 파악에 추가 연구재료로 이용
9. 생명공학기술을 이용한 약독 바이러스의 제작 및 선발과 관련 산학연으로의 기술보급 및 기술이전

### 제 3 절 연구결과의 활용계획

현재까지 본 연구팀의 연구결과는 논문발표 11건, 국내외 학술대회 발표 7건이며 과제 종료 후에도 논문을 발표할 예정이다. 본 연구를 통해 개발된 감염 가능한 클론 제작 기술, yeast를 이용한 단백질 간의 상호작용 이해 기술, 약독바이러스 제작 기술 및 대상 바이러스에 의한 피해 경감 기술 등은 대학, 연구소 및 기타 연관 기관의 유사 연구에 활용될 것이며 오이 및 수박 포장의 바이러스 피해 예방 및 경감에 유용하게 활용될 수 있으리라 사려된다.

#### □ 연구성과 발표 논문(11편)

- 1) Choi, S.K., Ahn, H.I., Kim, M.J., Choi, J.K. and **Ryu, K.H.** 2004. *Plant Pathology J.* 20:212-219. (학진인증지)
- 2) Kim, T, Youn, M.Y., Min, B.E., Choi, S.H., Kim, M. and **Ryu, K.H.** 2005. *Virus Res.* 110:161-167. (SCI)
- 3) Kwon, S.-W., Kim, M.-S., Choi H.-S. and **Kim, K.-H.** 2005. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 80-85. (SCI)
- 4) Jeong, R.-D., Hwang, S.-H., Kang, S.-H., Choi, H.-S., Park J.-W. and **Kim, K.-H.** 2005. *Plant Pathology J.* 21: 158-163. (학진인증지)
- 5) Park, S.M., Lee, J.S., Jegal, S., Jeon, B.Y., Jung, M., Park, Y.S., Lee, M.Y., **Ryu, K.H.**, Han, S.L., Shin, Y.S., Her, N.H., Lee, J.H., Yang, S.G. and Harn, C.H. 2005. *Plant Cell Reports* 24:350-356. (SCI)
- 6) Kim, M.J., Choi, S.K., Yoon, J.Y., Choi, J.K. and **Ryu, K.H.** 2005. *Plant Pathology J.* 21:142-148. (학진인증지)
- 7) Yoon, J.Y., Hong, J.S., Kim, M.J., Ha, J.H., Choi, G.S., Choi, J.K. and **Ryu, K.H.** 2005. *Plant Pathology J.* 21:361-368. (학진인증지)

- 8) Kang, S.-H., Lim, W.-S., Hwang, S.-H., Park, J.-W., Choi, H.-S. and **Kim, K.-H.** 2006. *J. Gen. Virol.* 87: 225-229. (SCI)
- 9) Yoon, J.Y., Ahn, H.I., Kim, M.J., Tsuda, S. and **Ryu, K.H.** 2006. *Virus Res.* 118:23-30. (SCI)
- 10) Kwon, S.-J. and **Kim, K.-H.** 2006. *Mol. Cells* 21: 63-75. (SCI)
- 11) Kwon, S.-J., **Kim, K.-H.** and Hemenway, C. 2006. *Plant Pathology J.* 22: 139-146. (학진인증지)

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

본 과제에서 달성하고자했던 바이러스와 기주간의 복합감염에 의한 상호작용 이해와 이들의 관계를 통한 궁극적인 피해경감 기술개발을 위해 본 연구에서는 감염 가능한 클론 등을 개발하고 이들을 식물에 감염시켜 병원성과 감염성을 분석하는 연구를 진행하고 particle bombardment를 포함한 다양한 감염방법을 시험하고 또한 이때 관여하는 기주유전자를 탐색하기 위해 EST 분석 등을 연구에 이용하였다. 또한 복합감염에 의한 바이러스 간 병원성 상승에 관여하는 병원성인자를 구명하기위해 yeast two hybrid를 이용한 연구기법을 사용하였고 궁극적으로 작물의 바이러스 병 피해를 줄이기 위한 방법으로 약독바이러스에 의한 기술개발 및 유전자원을 확보하고 활용하는 것을 본연구의 중점기술로 채택하였다. 이들의 기술은 바이러스 병에 의한 작물피해의 방제를 위한 실용화기술을 현실화 할 수 있는 매우 중요한 기초자료 이며 이들의 연구를 밑거름으로 실제 포장에서의 적용가능성을 높일 수 있는 기술이라고 판단된다. 한편, 본 연구진들이 이용한 연구기법들은 이미 해외 여러 분야에서도 성공적으로 이용되고 있는 기술이며 다음의 사례를 통해 본 과제의 연구결과가 좀더 실질적으로 사용될 수 있는 가능성을 부여할 수 있을 것으로 사료된다.

### 1. 약독 바이러스-교차보호

식물바이러스 자체를 불활성화하거나 증식을 억제하는 실용적인 약제가 없으므로 약제방제가 가능한 다른 병해와 다르다. 종자번식작물에서는 TMV나 CGMMV와 같이 종자전염을 하는 일부 바이러스를 제외하고는 매년 묘에서부터 감염되지 않도록 관리함으로써 방제가 가능하다. 교차보호란 식물바이러스의 병원성이 약화된 계통이 침입한 기주에서 병원성계통에 의한 병의 확산이 억제되는 현상으로 1929년에 McKinney가 담배 모자이크바이러스(TMV)의 green 계통에 전신 감염된 담배는 황화모자이크 증상을 나타내면서 큰 피해를 주는 TMV의 다른 계통의 침입을 받지 않음을 발견한 이래 1934년 Holmes는 열처리에 의해 약독화된 TMV를 사전에 접종한 토마토에서 강독 TMV에 의한 발병이 억제됨을 발견하여 실용화 가능성을 제시하였다. 이후 프랑스는 1970년대 초반 토마토 모자이크바이러스가 약독계통 MII-60을 개발하여 1980년 중반까지 서유럽 일대의 토마토 방제에 사업적으로 실용화시킨 성공사례를 가지고 있으며 여러 국가에서 국가적인 사업으로 발전시킨 바 있다. 일본에서도 교차보호를

이용한 식물 바이러스 방제 연구는 활발하게 진행되어 토마토의 담배 모자이크바이러스, 박과작물의 오이녹반모자이크바이러스 등에서 실용화된 바 있으나 국내에서는 아직 고추의 CMV에 대한 약독바이러스의 선발에 그치고 있으며 대규모로 실용화된 바는 없다.

## 2. EST(Expressed Sequence Tag) 분석

바이러스와 기주의 상호작용 연구에 있어서 바이러스 및 기주 유전체에 대한 정보는 상당히 유용한 자료이다. 최근에 벼, 토마토, 콩 및 담배 등의 기주 등을 대상으로 구조 및 기능 유전체 연구가 진행되면서 다른 대상의 기주에서도 바이러스의 감염에 의해 발현되는 기주의 유전자 단편(EST)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 유전자의 발현에 관련된 cDNA(complementary DNA)의 일부를 이용하여 불특정 서열의 일부가 각 세포에서 발현되는 것으로 전장(full sequence) 유전자를 찾는 데 유용하게 사용되고 있으며 특히 어떤 유전자 부위(EST)가 어떤 기능으로 발현되는가를 분석하는데 이용되고 있다. EST 분석 기술은 DNA Chip 데이터 분석, SNP 분석, Motif 분석, Proteomics, 신약 후보물질 탐색 등에 폭넓게 적용할 수 있고 NCBI의 EST database(dbEST)는 현재 mouse, rat, *Caenorhabditis elegans* 그리고 *Drosophila melanogaster*를 포함하여 250개 이상의 organism로부터 EST를 확보하고 있다.

## 3. Biolistic Particle Delivery System

Particle bombardment는 물리적인 힘을 가하는 방법으로 식물체, 포유류, 곰팡이류, 미생물에 걸쳐 가장 보편적으로 사용되는 유전자 전달 방법이다. 특히, 손으로 잡고 사용하는 Helios™ Gene Gun은 in vivo 또는 in vitro 상태의 식물 조직에 넓게 적용될 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 왜냐하면 전달하고자 하는 target DNA의 크기에 제한 받지 않고 또한, 진공의 chamber 안에서 사용하는 방식이 아니기 때문이다. Particle bombardment 기술은 DNA virus, RNA virus 또는 클로닝 된 RNA virus를 식물체에 전달시키는데 유용하게 사용 되어오고 있다. Particle bombardment의 두 가지 방법 중 PDS1000/He system이 떼어낸 잎에 효과적으로 사용이 되어온 데 반해, Helios™ Gene Gun system은 살아있는 식물체에 바로 적용이 가능하다는 것이 가장 큰 장점이다. Bombardment의 parameter로는 helium 압력, target tissue까지의 거리, polyvinylpyrrolidone (PVP)의 농도, viral DNA, RNA의 양, gold particle (microcarrier)의 크기 및 수를 변화 시켜가면서 최적의 조건을 잡을 수 있다.



#### 4. Yeast two-hybrid system

Yeast two-hybrid assay는 많은 eukaryotic trans-acting transcriptional regulator들이 독립적인 기능을 수행하는, 물리적으로 분리된 domain으로 구성되어졌다는 사실에 착안하여 이루어진 system이다. 이 regulator들은 특정 염기 서열로 이루어진 promoter 부위와 결합하는 DNA-binding domain과 RNA polymerase II 복합체와 직접적으로 작용하여 transcription에 관여하는 기능을 수행하는 activation domain으로 구성되어 있다. 이들 각 domain은 하나의 단백질을 구성하여 특정 유전자를 발현시킬 수 있는 기능을 수행하게 된다. Yeast two-hybrid system으로 Field & Song(1989)에 의해 최초로 개발된 GAL4를 이용한 two hybrid system의 경우는 yeast의 GAL4 transcription factor의 DNA-binding domain과 activation domain을 분리하여 발현되도록 하고 reporter gene(lacZ)의 promoter upstream에 GAL4 upstream activation sequence(UAS)가 존재하도록 하였다. 이들 system을 통해서 상호 작용하는 두 단백질을 각각의 domain과 함께 발현시키게 되면 GAL4 DNA-binding domain이 DNA상에 위치하게 되고 이들과 하나의 형태로 발현된 단백질은 activation domain과 발현된 단백질과 결합하여 reporter gene인 lacZ가 발현되어 실제로 yeast cell내에서 두 단백질이 상호작용하고 있음을 볼 수 있게 된다. 단백질간의 상호작용을 연구하는데 있어서 yeast two hybrid system은 효과적인 실험방법이라고 할 수 있다. Two hybrid는 이미 알고 있는 두 단백질간의 상호작용을 확인하고자 할 경우나 이미 알고 있는 단백질과 상호 작용하는 또 다른 단백질을 screening 하고자 할 때 사용할 수 있다. 또한 two hybrid를 이용할 경우 직접 상호작용에 관여하는 단백질내의 motif나 domain을 사용함으로써 단백질의 상호작용에 관여하는 특정부분을 조절하는 새로운 물질을 검색하는데도 이용할 수 있다.

## 제 7 장 참고문헌

- Agrios, G. N. 1999. Plant Pathology. Academic Press.
- Beachy, R. N. 1999. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354:659-664.
- Cho, J. D. 2002. Ultrastructural cytopathology induced by synergistic combinations of plant virus, Tobamo plus potyviruses. Ph. D. Thesis, Seoul National University.
- Choi, S. K., Yoon, J. Y., Ryu, K. H., Choi, J. K., Palukaitis, P. and Park, W. M. 2002. Systemic movement of a movement-deficient strain of Cucumber mosaic virus in zucchini squash is facilitated by a cucurbit-infecting potyvirus. *J. Gen. Virol.* 83:3173-3178.
- Clough, G. H. and Hamm, P. B. 1995. Coat protein transgenic resistance to watermelon mosaic and zucchini yellow mosaic virus in squash and cantaloupe. *Plant Dis.* 79:1107-1109.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. and Raccach, B. (1991). Infectious in vitro RNA transcripts derived from cloned cDNA of cucurbit potyvirus, zucchini yellow mosaic virus. *Journal General Virology* 72: 2639-2643
- Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D. J., and Gaba, V. (1997). Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *Journal of Virological Methods* 64:103-110.
- Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W. J., Raccach, B. and Gaba, V. (1995). Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned cDNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *Journal General Virology* 76:3223-3227.
- Gonsalves, D. 2002. Coat protein transgenic papaya: "acquired" immunity for controlling papaya ringspot virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 266:73-83.
- Harper, G., Hull, R., Lockhart, B. and Olszewski, N. 2002. Viral sequences integrated into plant genomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:119-136.
- Huet, H., Gal-On, A., Meiri, E., Huet, L. and Raccach, B. (1994). Mutations in the helper component (HC) gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology* 75: 1407-1414.
- Lin, H. X., Rubio, L., Smythe, A., Jimenez, M. and Falk, B. W. 2003. Genetic diversity and biological variation among California isolates of Cucumber mosaic

- virus. *J. Gen. Virol.* 84:249-258.
- Maria R. Rojas, F. Murilo Zerbini, Richard R. Allison, Robert L. Gilbertson, and William J. Lucas. 1997. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology.* 237:283-295.
- Prabha L. Atreya, Chintamani D. Atreya, and Thomas P. Pirone. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7887-7891.
- Provvidenti, R. 1989. Sources of resistance to viruses in cucumber, melon, squash and watermelon. Pp. 29-36 in *Proceedings of Cucurbitaceae 89: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm* (C.E. Thomas, ed.) Charleston, South Carolina, USA.
- Provvidenti, R. 1990. Viral diseases and genetic sources of resistance in Cucurbita species. Pp. 427-435 in *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae* (D.M. Bates, R.W. Robinson and Ch. Jeffrey eds.). Comstock Publ. Assoc., Cornell University Press, Ithaca and London.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. and Vance, V. B.. 1997. Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The plant cell.* 9:859-868.
- Quiberoni, A., Suarez, V. B. and Reinheimer, J. A. 1999. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J. Food Prot.* 62(8): 894-898.
- Rajendran, K. S. and Nagy, P. D. 2004. Interaction between the replicase proteins of Tomato Bushy Stunt virus in vitro and in vivo. *Virology.* 326:250-261.
- Report on the VIIIth international plant virus epidemiology symposium-First steps into the new millennium. 2002. Aschersleben, Germany.
- Schneider, W.L. and Roossinck, M. J. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virol.* 75:6566-6571.
- Tobias, I., Palkovics, L., Tzekova, L. and Balazs, E. 2001. Replacement of the coat protein gene of plum pox potyvirus with that of zucchini yellow mosaic potyvirus: characterization of the hybrid potyvirus. *Virus research.* 76:9-16.
- Vance, V. and Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* 292:2277-2280.
- Walkey, D. G. A. and Cooper, V. C. 1975. Effect of temperature on virus eradication and growth of infected tissue cultures. *Ann. Appl. Biol.* 80(2): 185-90.

Wang, X., Ullah, Z. and Grumet, R. 2000. Interaction between Zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology*. 274:433-443.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.