

631.52 -19

L 293 b

GOVP1200210032

최	종
연구	보고서

유용물질 생산을 위한 식물바이러스벡터 개발

Engineering of plant virus vector for producing
useful materials

고 려 대 학 교

농 립 부

[별지 제7호 서식]

최 종 보 고 서

190mm×268mm

2001년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 유용물질 생산을 위한 식물 바이러스 벡터 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10 월 12 일

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 백경희 (인)

주관연구기관장 : 고려대학교총장

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유용물질 생산을 위한 식물 바이러스 벡터 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 12일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 백 경희

연 구 원 : 신 령

연 구 원 : 함 병국

연 구 원 : 한 상재

요 약 문

I. 제 목

유용 물질 생산을 위한 식물 바이러스 벡터 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

생명공학기술은 인류의 건강, 복지 및 환경개선을 위한 핵심산업기술로 인식이 되어 선진 각 국에서도 기술개발 노력이 경쟁적으로 이루어지고 있다. 나아가 21세기에는 전자, 정보와 더불어 세계의 첨단 산업군을 선도할 전망이다. 특히 농산물의 증산 및 품질향상을 목표로 하여 시작된 농업생명공학은 짧은 역사에도 불구하고 그 발전 속도가 가히 눈부시다 할 수 있다. 한편, 외래 유전자를 도입하여 새로운 형질을 가지는 형질전환 식물체 개발 기술은 차세대 농업의 방향을 결정할 중요기술로 부각되고 있다. 또한 식물체를 일종의 bioreactor로 생각하여 여러 유용물질을 생산하고자하는 시도도 이루어지고 있다. 최근 신국제 경제질서 및 신국제 환경질서의 확립 움직임에 따라 물질 특허제도 및 생물다양성협약 등 선진국의 기술 보호추세가 강화되고 있어 국내에서도 대책마련이 시급한 실정이다.

이에 본 연구에서는 식물 바이러스를 이용하여 유용한 외래 물질을 발현시킬 수 있는 새로운 기술을 개발하는 것에 중점을 두고 있다. 이 기술은 아직 외래 선진국에서도 본 연구진이 이용할 바이러스에 대한 이러한 사례의 보고가 없고, 이 때까지 외래 유전자를 식물체 내에서 발현시키는 데 사용되어져 왔던 형질전환체 개발 기술과도 구별되는 것으로써 이 기술의 개발은 매우 중요한 것으로 인식된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 기본 목표는 식물 바이러스 벡터를 이용하여 외래 유전자의 발현을 관찰하는 것이다. 본 연구에서는 한국에서 고유하게 발견되는 오이 모자이크 바이러스 (cucumber mosaic virus-kor strain)을 대상으로 하여 연구를 수행하였다. 이 바이러스를 연구 대상으로 채택한 이유는 기주 범위가 광범위하여 응용적인 측면으로 이용할 시 작물에 비교적 구애받지 않고 외래유전자를 발현시킬 수 있다는 점에서 재료로 선택하였다.

현재까지 개발된 식물 바이러스 벡터를 볼 때, 개발된 식물 바이러스 벡터들이 기주 특이성을 보이게 되어 그 응용적인 측면에서의 사용이 국한되고 있는 것을 볼 때, 개발된 식물 바이러스 벡터를 이용하여 실질적이고 체계적인 모델을 제시하는 것이 본 연구의 기본 방향이다. 이를 위하여 최대한 많은 종류의 재조합 바이러스를 제작하였고, 효율적인 *in vitro* transcripts의 발현 조건을 맞추어 바이러스를 기주 내에서 재현성 있게 감염시키는 것을 확립 하였다. 또한, 재조합 바이러스 내에 삽입되어 있는 바이러스 외 외래 유전자의 발현을 유도하는 것을 최종 목표로 하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- ◆ 본 연구진에 의해 분리되어지고 사용되어진 오이 모자이크 바이러스 (cucumber mosaic virus-kor strain)은 그 구성이 3개의 RNA로 이루어진 + strand 바이러스로서 대개 1개의 RNA로 이루어진 다른 바이러스를 다루는 것보다 많은 어려움이 있었다.
- ◆ 오이 모자이크 바이러스의 경우, 아직까지는 바이러스의 어떤 부분에 외래 유전자를 삽입하는 것이 효과적인지에 대한 연구가 되어있지 않아, 그 조건을 찾는 데 어려움이 있었지만 조건을 확립하였다.
- ◆ 본 연구에서 다양한 분자생물학적 방법을 통해 많은 종류의 오이 모자이크 바이러스 벡터의 시작품이 만들어졌다.
- ◆ 효율적인 오이 모자이크 바이러스 *in vitro* transcripts를 만들기 위해 이들

RNA의 cDNA 5'UTR부분에 T7 promoter를 부착하였다. 이때, *in vitro* transcripts의 양을 최대한으로 만들기 위해 T7 promoter의 전체 서열을 부착시켜 주었다.

◆ *In vitro* transcripts양을 최대한으로 얻기 위해 만들어진 T7 promoter의 전체 서열을 가진 시작품과 *in vitro* transcripts의 생성양이 적은 T7 promoter의 3'end쪽의 guanosine 2개가 결핍된 시작품을 가지고 기주 식물로의 감염을 통해 이들 시작품들의 감염력을 측정하여 보았다. 그 결과, 비록 *in vitro* transcripts의 생성양은 적지만, T7 promoter의 3'end쪽의 guanidine 2개가 결핍된 바이러스 벡터 시작품이 T7 promoter의 전체 서열을 가진 시작품보다 높은 감염력을 나타냈다.

◆ 오이 모자이크 바이러스의 RNA3 이 암호화하고 있는 coat protein 부분을 GFP; GUS 유전자를 이용하여 치환하는 연구를 수행하였다. 그 결과, 높은 감염력을 나타내었던 시작품에서조차도 완전하게 바이러스의 감염력을 잃는 결과를 관찰하였다.

◆ 위의 결과로 미루어 보건대, 이는 coat protein의 결핍으로 인해 바이러스가 감염력을 잃는 것으로 추정되었다. 그래서, 결핍되어진 coat protein을 보충해주는 전략으로 재조합 바이러스와 함께 wild type의 RNA3 transcript도 같이 포함하여 감염시켰다. 그 결과, 기주 식물체가 높은 감염력으로 감염이 되었으나; Northern blot analysis결과 외래 유전자인 GFP, GUS의 RNA level에서의 발현은 관찰 할 수 없었다.

◆ 위의 결과를 바탕으로 RNA3의 subgenomic promoter 뒤에 외래 유전자들을 construction하여 이들 유전자의 발현을 검정하였다. 이 결과 시작품에서처럼 높은 감염력은 아니지만, 기주 식물체에 감염되는 것을 관찰하였고, 다양한 외래 유전자들인 GFP, GUS, Levansucrase, Cholera toxin B subunit의 발현도 감염된 식물체에서 검출 되었다.

◆ 따라서 이는 오이모자이크바이러스의 벡터 제작 가능성을 열어 주었고 상기한대로 여러 기주 식물체에서의 응용에 활용 가능할 전망이다.

SUMMARY

Full-length cDNA copies of cucumber mosaic virus (CMV) RNA1, RNA2, and RNA3 of the Kor strain were cloned downstream of bacteriophage T7 promoters. In one pair of clones, transcription proceeded from an unaltered T7 promoter such that *in vitro* transcripts representing RNA1, RNA2 and RNA3 contained additional 17 nucleotides at their 5' termini. In second pair of clones, the T7 promoter/cDNA junction was altered by PCR-based mutagenesis such that the *in vitro* transcripts contained only an additional G residue at their 5' end. *In vitro* transcripts representing RNA1, RNA2 and RNA3 which contained an additional G residue at each 5' terminus were shown to be infectious when inoculated together in hosts of CMV. To engineer cucumber mosaic virus (CMV-Kor) into a gene vector, genome component RNA3 of the virus was modified. At first, the open reading frame of the coat protein (CP) was replaced by two reporter genes encoding the green fluorescent protein (GFP) or β -glucuronidase (GUS). These constructs did not show infectivity in tobacco plants. Secondly, subgenomic promoter (IR)-GFP, GUS, levansucrase and cholera toxin B subunit cassettes were inserted between the CP and movement protein (MP) gene. These constructs displayed symptom, and expressed foreign genes in both inoculated and systemic leaves.

CONTENTS

Part I. Introduction	10
Chapter 1. The Need for Research	10
1. Technical aspects	10
2. Economical and industrial aspects	11
3. Social and cultural aspects	11
4. Current status and problems	12
Chapter 2. The Research Objectives	13
 Part II. Construction of Starting Materials for viral Vector	 14
Chapter 1. Introduction	14
Chapter 2. Construction of Starting Materials	15
1. cDNA construction of viral genomic RNAs	15
2. 5'UTR modification of viral genomic RNAs	16
Chapter 3. Test of Starting Materials for Infectivity	 17
 Part III. Construction of Viral Vector by Replacement	 23
Chapter 1. Introduction	23
Chapter 2. Modification of the Coat Protein Region in CMV RNA3	 24
Chapter 3. Compensation of a Defective Coat Protein in the Modified CMV RNA3	 29

Part IV. Construction of Viral Vector by Insertions.....	32
Chapter 1. Introduction.....	32
Chapter 2. Insertion of Various Cassettes Containing Foreign Genes	33
1. Replacement of the movement protein gene with foreign genes	33
2. Inserting the RNA3 promoter-movement protein cassette in front of the subgenomic promoter in RNA3 after replacement of movement protein gene with foreign genes	37
3. Inserting the subgenomic promoter-movement protein cassette in front of the subgenomic promoter in RNA3 after replacement of movement protein gene with foreign genes	40
Part V. References	48

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
I. 제 목	2
II. 연구개발의 목적 및 중요성	2
III. 연구개발 내용 및 범위	3
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	3
SUMMARY	5
CONTENTS	6
목 차	8
제 1 장 서 론	10
제 1 절 연구 개발의 필요성	10
제 1 항 기술적 측면	10
제 2 항 경제적, 산업적 측면	11
제 3 항 사회적, 문화적 측면	11
제 4 항 국내외 관련 기술 현황 및 문제점	12
제 2 절 연구 개발의 목적과 범위	13

제 2 장 바이러스 벡터의 시작품 제작 연구 결과 및 고찰	14
제 1 절 서 설	14
제 2 절 시작품의 개발	15
제 1 항 Genomic RNAs의 cDNA 구축	15
제 2 항 Genomic RNAs의 5' UTR 조작	16
제 3 절 시작품의 감염력 검증	17
제 3 장 치환을 통한 바이러스 벡터의 개발 연구 결과 및 고찰	23
제 1 절 서 설	23
제 2 절 RNA3의 피복 단백질 부분의 조작	24
제 3 절 결핍 피복 단백질의 보상 연구	29
제 4 장 삽입을 통한 바이러스 벡터 개발 연구 결과 및 고찰	32
제 1 절 서 설	32
제 2 절 외래 유전자 cassette의 삽입	33
제 1 항 이동 단백질에 외래 유전자 치환 후 subgenomic promoter 앞에 RNA3 promoter movement protein cassette 삽입	33
제 2 항 이동 단백질에 외래 유전자 치환 후 subgenomic promoter 앞에 subgenomic promoter movement protein cassette 삽입	37
제 3 항 피복 단백질과 이동 단백질 사이에 subgenomic promoter cassette 삽입	40
제 5 장 참 고 문 헌	48

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 필요성

제 1 항 기술적 측면

최근 식물분자생물학분야의 눈부신 발달에 힘입어 형질전환식물체를 이용하여 유용물질을 생산하려는 시도들이 많이 이루어지고 있고 실제로 상품화된 형질전환식물체가 증가하고 있으며 미래의 'green' environmentally safe factory로 간주되고 있다(G. Palmgren (1997), TIG 13:348). 그러나 이 또한 극복되어야할 문제점을 지니고 있다. 즉, 처음 형질 전환체를 만든 지 15년이 경과한 이 시점에도 아직 식물체형질전환은 느리고, 비효과적이고 발현효율이 낮은 점과 때로는 예측할 수 없는 결과를 초래할 수 있다. 단적인 예가 외래 유전자를 도입할 때 transgene과 endogenous gene양쪽에서 공히 나타나는 cosuppression혹은 gene silencing현상이다(J. Mol (1997) Keystone Symposium: Metabolic Engineering in Transgenic Plants, Copper Mountains, CO. USA). 이를 보완하여 식물체에서 유용물질을 생산할 수 있는 것으로 식물바이러스가 제안되었다(T. Hohn and R. Goldbach (1994) Vectors: plant viruses in Encyclopedia of Virology, San Diego: Academic pp1536-43; D. C. Baulcombe and J. J. English (1996) Curr. Opin. Biotechnol. 7: 173-180). 식물바이러스를 벡터로 이용한 물질의 대량생산쪽은 아직 많은 연구가 되어있지 않으나 바이러스의 속성상 빠른 증식속도를 이용하면 적절한 바이러스를 택할 때 형질전환을 거치지 않고 원하는 시기에 빠른 시간 안에 유용물질을 대량

획득할 수 있는 무한한 잠재력을 가지고 있다고 할 수 있다.

제 2 항 경제적, 산업적 측면

미래의 생명공학산업은 막강한 부의 가치를 지니고 있고 벌써 국내제약, 의약계통은 막대한 loyalty를 지불하고 있는 형편이다. 또한 현재 한국의 농업은 신국제경제질서 가운데에 경쟁력이 극히 낮은 상태에서 농수산물 전면수입 개방에 직면하고 있으며 이농현상의 가속화, 고질적인 농수산물 유통구조 불합리 문제로 위기를 맞고 있다. 이러한 상황에서 외래 농산물의 대량 저가 유입은 농가소득경제에 막대한 영향을 미치고 영세성의 국내 종자 생산업체의 생존을 위협하는 수위까지 와있다. 이미 우리나라 종묘업체의 많은 종묘회사들이 다국적기업종묘회사에 넘어가 더 이상 국내시장만 바라보고 안주할 수가 없는 상황이다. 따라서 고부가가치 작물, 고수확 작물 및 그 종자의 개발이 필수적이다. 특히, 일본의 장기신용은행과 미국의 Sheet사는 농업과 식품분야의 생물제품이 2000년대의 생물공학산물의 주축을 이룰 것으로 예측하고 있다 (농업 85.5 - 2,187억\$, 식품 126,6억\$). 이러한 상황에 맞추어 보면 고품질, 고부가가치의 주요 원예작물의 개발은 필수적이라 할 수 있다.

또한 우리나라와 같이 자원이 빈약하고 취약한 산업구조하에서는 노동집약적이고도 고부가가치를 창출할 수 있는 산업만이 살아남는다. 이러한 때에 농업분야에도 신경영개념을 도입하여 고효율, 고부가가치의 농작물을 개발하는 것이 시급하다.

제 3 항 사회적, 문화적 측면

개방시대를 맞아 우리 농업이 해결해야 할 많은 과제가 있지만 유전자 조작 기술에 의한 신제품개발 및 유용물질 대량생산연구는 원예작물의 품종 개발을 통한 고부가 가치화, 생산성 향상, 노동성 절감등 농촌 및 농업 기반 보

전에 일익을 담당할 수 있다. 또한, 신제품창출을 통한 신소재개발 핵심공동 기반기술의 국내기반구축과 국내 개발신소재의 국제시장진출을 통한 기술 신한국인으로서의 자긍심을 견지할 수 있다. 부가가치가 높은 농작물의 개발을 이루기 위해서는 유용물질 생산작물의 가능성이나 농작물에 피해를 주는 virus 방어체계를 탐구할 수 있는 생명 공학적 연구가 필요하다. 이는 현재와 같은 수동적인 방어의 자세에서 현상을 유지하려는 것보다 장래를 위한 투자라는 좀 더 능동적인 자세로의 변환을 의미한다. 침체된 사회에 생명과학 기술의 개발이라는 21세기 고부가가치 미래산업에 확대 투자하는 것은 오히려 현재의 위기를 극복할 수 있는 기회로 삼게되는 사회적 가치의 공감대를 형성하게 될 것이다.

제 4 항 국내외 관련 기술 현황 및 문제점

처음으로 담배식물체에서 hepatitis B virus의 surface antigen을 생산하고 이를 바나나에서 발현시키려는 시도와 아울러 Norwalk virus의 capsid protein을 역시 담배에서 생산하였다 (Mason, H.S, Lam, D. M.-K. & Arntzen, C. J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11745-11749; Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K. & Arntzen, C. J. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5335-5340). 또한 CaMV등 여러 plant DNA virus를 vector로 개발하려는 시도들이 이루어져 왔다. (Hohn, T. & Goldbach, R. (1994) Vectors: plant viruses in Encyclopedia of Virology, San Diego: Academic pp1536-43). 그 외 DNA 바이러스가 아닌 plus-sense RNA virus인 tobamovirus를 vector로 이용하여 여러 유용한 pharmaceutical 등을 대량 생산하려 시도하고 USDA의 field test 허가까지 받았다는 보고가 있다 (5th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract #300).

최근에서야 일부 식물분자생물학자들간에 식물바이러스를 벡터로 이용하여 유용물질을 생산하려는 관심은 고조되고 있으나 아직 구체적인 연구결과는 나오지 못한 상태이다.

제 2 절 연구 개발의 목적과 범위

본 연구의 목표는 기존의 형질 전환 식물체를 만듦으로써 야기 될 수 있는, 여러 가지 문제를 보완하고 우리가 원하는 유전자를 식물체 내에서 발현시킴으로써, 학문적, 응용적 가능성을 제공하는 데 초점을 맞추었다. 그래서, 응용 가능성이 높은 면을 강조하기 위해 기주 범위가 넓은 식물 바이러스인 오이 모자이크 바이러스 Kor strain을 연구 재료로 선택하였다.

이 연구 재료를 토대로 하여 다양한 분자 생물학적 기술을 이용하여, 효율적인 바이러스 벡터를 개발하는데 중점을 두었고, 이런 시작품을 이용하여 기주 식물 내에서 안정성 있고, 재현성 있는 최적의 조건을 찾아 바이러스를 이용한 외래 유전자 도입 체제를 확립하려 하였다.

본 연구에서 개발한 바이러스 벡터를 바탕으로 이 벡터에 여러 가지 검정 유전자를 도입하여, 이들 검정 유전자들이 발현되는지를 관찰하였고, 유용 유전자의 모델인 *Zymomonas mobilis*의 levansucrase 유전자와 Cholera toxin B subunit의 유전자를 개발된 바이러스 벡터에 도입하여 이들 유전자의 발현과 바이러스의 감염 여부를 관찰함으로써 모델로써의 가능성을 제시하고자 하였다.

제 2 장 바이러스 벡터의 시작품 제작 연구 결과 및 고찰

제 1 절 서 설

본 장에서는 연구 재료로 사용하기로 한 오이 모자이크 바이러스의 cDNA 를 감염력이 있는 재조합 바이러스로 만드는 것을 주요 관점으로 하고 있다.

본 연구진들은 기존에 클로닝한 오이 모자이크 바이러스의 cDNA를 확보한 상태 였다. 그러나, 이들 cDNA는 단순히 오이 모자이크 바이러스의 genomic RNA 들을 RT-PCR로 확보한 상태인 것이지, 이것만으로 감염력을 갖는 것은 아니었다. 기존에 알려진 방법으로는 이런 cDNA 5'UTR 앞부분에 이미 잘 알려진 T7, T3, 또는 SP6 promoter들을 부착하여 *in vitro* transcript를 제작한 다음, 이렇게 만들어진 RNA를 감염시키는 방법을 사용하여 왔다. 그러나, 보고된 바에 의하면, T7, T3, SP6와 같은 promoter들은 모두 원래의 바이러스 유래 promoter가 아니므로, 단순히 감염을 시키는 것인 연구도 그 최적의 조건을 맞추어야 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 크게 두가지 측면을 바탕으로 이루어졌다. 첫째는 바이러스 cDNA들 앞에 우선적으로 bacteriophage의 T7 promoter를 5' UTR 앞부분에 부착하고, T7 promoter의 길이를 조정하여 시작품을 제작한다. 둘째로는 이렇게 만들어진 바이러스 시작품들을 기주 식물체인 담배에 감염시킴으로써 감염력을 검정하여 사용가능한 바이러스 벡터 시작품으로 확립한다.

제 2 절 시작품의 개발

제 1 항 Genomic RNAs의 cDNA 구축

본 연구에서는 기존에 확보되어 있는 오이 모자이크 바이러스 (cucumber mosaic virus)의 cDNA에 *in vitro* transcript를 만들 수 있는 bacteriophage T7 promoter를 부착하는 것을 주 과제로 했다. 오이 모자이크 바이러스는 RNA1, RNA2, RNA3 이렇게 3개의 genomic RNA로 이루어진 (+) strand RNA virus로서 기존의 실험에서 RT-PCR을 통해 cDNA 상태로 확보된 상태였다. 본 연구진들은 이런 오이 모자이크 바이러스 cDNA를 이용하여 식물체에 감염을 시키기 위해 PCR 기술을 이용하여 이들 cDNA 5' UTR 앞부분에 T7 promoter를 부착하였다. 즉, T7-RNA1, T7-RNA2, T7-RNA3의 construct를 만들어 *in vitro*에서 transcription이 가능한 형태의 plasmid를 확보하였다. 오이 모자이크 바이러스의 경우, 3' UTR 부분이 conserved 되어 있기 때문에 primer set을 한 종류만 제작하는 것으로도 충분하였다.

Figure 1의 A panel은 이런 시작품을 만들기 위한 기본적인 전략을 기술한 것이다. 우선적으로 이 바이러스 cDNA를 bacteriophage T7 promoter가 있는 commercial plasmid vector pT7blue에 PCR을 통해 클로닝 하였다. 이는 가능하다면, T7 promoter에 바이러스 cDNA 조작 없이 시작품의 제작이 가능한지 여부를 알아보기 위해 행한 연구였다 (k15: 5'ACGGGATCCTTTTATTACGGAGCGTA3';k25: 5'ACGGT TTATTTACAAGAGCGTA3';K35: 5'ACGGTAATCTTACCATC3'). Figure 1의 B panel은 이 primer를 이용한 PCR 결과이다. 여기서 얻은 cDNA를 뒤에서 사용될 오이 모자이크 바이러스 cDNA 들의 5' UTR부분의 조작에 template로 이용되었다.

또한, *in vitro* transcript를 생성시, T7 RNA polymerase 작용을 시

켜 주기 전에 만들어질 cDNA의 3' terminus가 절단되어져 있어야 하므로, 3' end 쪽 primer에 바이러스 염기 서열에는 없는 *Mlu*I site를 첨부하여 주었다 (3MB: 5'GACAGGATCCACGCGTGGTCTCCTTTTG GAGG3').

제 2 항 Genomic RNAs의 5' UTR 조작

바이러스의 cDNA 5' temini에 부착되는 T7 promoter는 두가지 전략을 가지고 구축되었다. 첫째는 본 연구의 목적의 기주 식물에 바이러스 cDNA를 감염시키는 것이 목적이므로, 연구진들의 아이디어는 본 연구는 *in vitro* 상태에서의 transcript의 양을 많이 확보하는 것이 좋을 것이라 생각했다. 그러므로, full-length T7 promoter sequence를 각각의 RNA들에 부착시켜 주었다 (T7k15: 5'ACGGGATCCTAATACGACTC ACTATAGGGGTTTTATTACGGAGCGTA3'; T7k25: 5'ACGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTTTTATTTACAAGAGCGTA3'; T7K35: 5'ACGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTAATCTT ACCATC3').

두 번째 전략은 기존에 보고된 바에 의하면, 바이러스의 *in vitro* transcript를 제작시 바이러스의 5' UTR에 부착되는 promoter의 길이에 따라 감염력에 큰 차이를 보인다는 보고가 있었다. 그래서, 본 연구진들은 bacteriophage T7 promoter의 3' terminus에 guanosine 2개를 결핍시켜서 바이러스 5' temini들의 정확한 start site를 맞추어 주었다 (T7k15: 5'ACGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTTTTATTACGGAGCGTA3'; T7k25: 5'ACGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTTTTATTTACAAGAGCGTA3'; T7K35: 5'ACGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTAATCTTACCATC3'). Figure 2는 위에서 얻은 cDNA PCR product들이 모두 T7 promoter를 가지고

있고, sequence도 제작한 primer와 동일하게 PCR error 없이 생성되었음을 보여주고 있다. data는 보이지 않았으나, T7L RNA1, 2, 3과 T7 RNA3도 모두 성공적으로 cDNA의 5' termini에 promoter를 부착하고 있음이 또한 관찰 되었다.

Figure 1의 C는 위의 wild type T7 promoter를 가진 cDNA들과 T7 promoter 3' termini 에 guanosine 2개가 결핍된 cDNA들이 PCR을 통해 성공적으로 생성되고 있음을 보여주고 있다. T7RNA1, 2, 3은 full-length T7 promoter를 가지고 있는 construct 이고, T7LRNA1, 2, 3은 T7 promoter의 3' termini에 guanosine 2개가 결핍된 constructs를 말한다.

제 3 절 시작품의 감염력 검증

위의 절에서 언급되었던 오이 모자이크 바이러스의 cDNA constructs 들은 *in vitro* transcript로 제작하여 제작한 시작품들의 병원력을 검증하였다. 위에서 제작한 모든 cDNA들을 *in vitro* transcription 작용에 필요한 template로 만들기 위해 위의 cDNA들의 DNA를 각각 5 μ g 사용하였고, 이들 모두를 *Mlu*I restriction enzyme을 이용하여 overnight 처리하였다. 이렇게 얻어진 template들은 phenol:chloroform을 3회 처리하여, 전에 사용하였던 restriction enzyme과 혹시나 있을 수 있는 RNase 등의 activity를 없애 주었다. 이렇게 얻어진 template는 DEPC가 처리된 DW를 이용하여 *in vitro* transcription 에 필요한 농도로 template를 녹였다. 그 다음 *in vitro* transcription을 하기위해, template DNA 5 μ g, RNase inhibitor인 RNAsin 1U, ATP, GTP, CTP 각각 7.5 mM, GTP 1.5 mM 5' Cap analogue 1 mM, 10X transcription buffer, T7 RNA polymerase 1U를 첨가하여 37°C 배양기에서 1시간 incubation을 하였다.

reaction이 끝난 후, GTP 3.5 mM를 다시 첨가하고 15 분 incubation을 시킨 후 0.8% TAE native gel과 denatured gel을 이용하여 *in vitro* transcript들이 잘 생성 되었는지, 확인하였다.

Figure 3은 이런 *in vitro* transcript들이 성공적으로 생성되었음을 보여주고 있다. A panel은 본 연구진이 construct한 시작품을 설명한 그림이다. 즉, 본

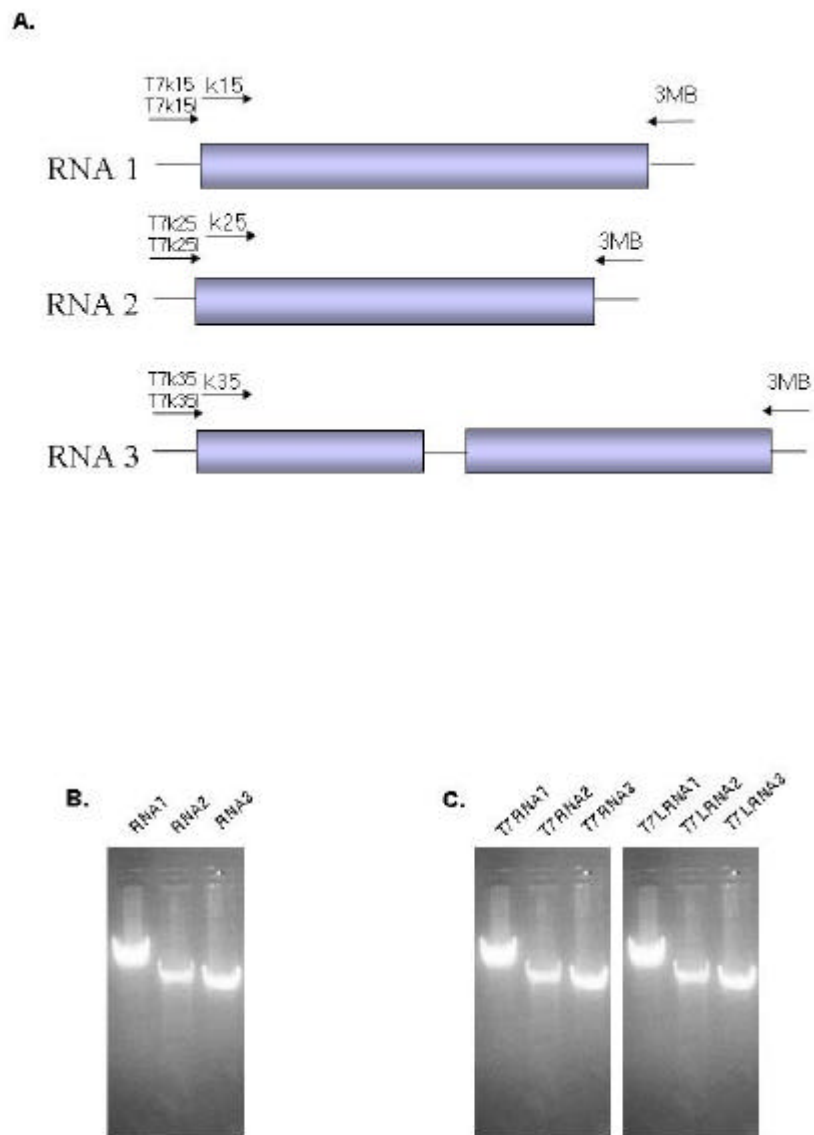
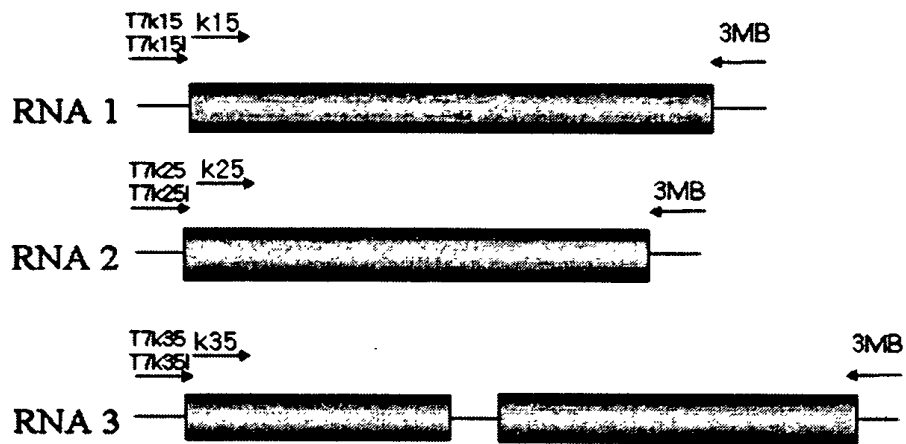
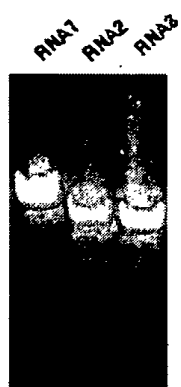


Figure 1.

A.



B.



C.

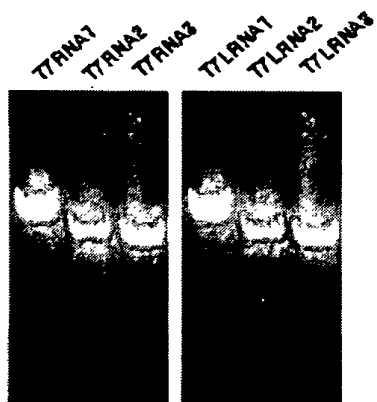


Figure 1.

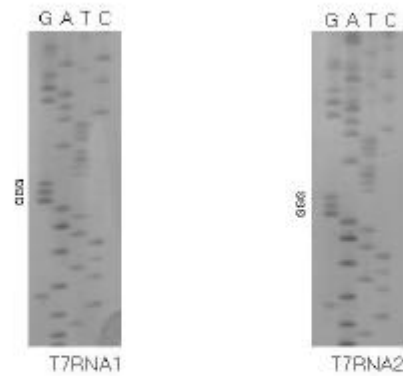


Figure 2.

연구진은 위에서도 언급 했듯이 3가지의 시작품을 제작하였다. 먼저, 첫 번째는 오이 모자이크 바이러스의 순수한 cDNA 만을 PCR을 통해 분리해 낸 후, 이미 T7 promoter가 있는 commercial plasmid vector에 삽입한 경우이고 (T7BRNA1, 2, 3), 두 번째 경우는 cDNA에 full-length T7 promoter를 부착한 것들 (T7RNA1, 2, 3), 마지막은 T7 promoter의 3' termini를 조작하여 2개의 guanosine을 제거 한후 정확한 바이러스의 cDNA의 starting site를 맞추어 준 것 (T7LRNA1, 2, 3)이다. T7BRNA1, 2, 3는 각각의 cDNA들 앞에 additional sequence로 61개의 nucleotides가 존재하고, T7RNA1, 2, 3는 2개, T7LRNA1, 2, 3는 0개의 additional sequence를 가지고 있다.

Figure 3의 B panel에서 볼 수 있듯이, 3종류의 시작품은 모두 성공적으로 *in vitro* transcript가 생성되었음을 보여주었다. T7BRNAs 와 T7RNAs들은 예상했던 가정대로 많은 양의 transcript가 생성되었다. 양을 측정해본 결과,

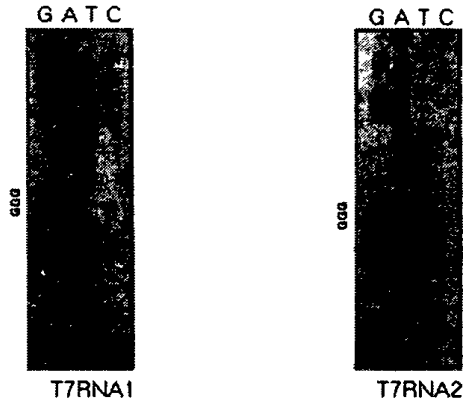


Figure 2.

연구진은 위에서도 언급 했듯이 3가지의 시작품을 제작하였다. 먼저, 첫 번째는 오이 모자이크 바이러스의 순수한 cDNA 만을 PCR을 통해 분리해 낸 후, 이미 T7 promoter가 있는 commercial plasmid vector에 삽입한 경우이고 (T7BRNA1, 2, 3), 두 번째 경우는 cDNA에 full-length T7 promoter를 부착한 것들 (T7RNA1, 2, 3), 마지막은 T7 promoter의 3' termini를 조작하여 2개의 guanosine을 제거 한후 정확한 바이러스의 cDNA의 starting site를 맞추어 준 것 (T7LRNA1, 2, 3)이다. T7BRNA1, 2, 3는 각각의 cDNA들 앞에 additional sequence로 61개의 nucleotides가 존재하고, T7RNA1, 2, 3는 2개, T7LRNA1, 2, 3은 0개의 additional sequence를 가지고 있다.

Figure 3의 B panel에서 볼 수 있듯이, 3종류의 시작품은 모두 성공적으로 *in vitro* transcript가 생성되었음을 보여주었다. T7BRNAs 와 T7RNAs들은 예상했던 가정대로 많은 양의 transcript가 생성되었다. 양을 측정해본 결과,

A.

T7BRNA1, 2, 3 T7 promoter:GGGAAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC.....:RNA1, 2 or 3

T7RNA1, 2, 3 T7 promoter:GGG:RNA1, 2 or 3

T7LRNA1, 2, 3 T7 promoter:G:RNA1, 2 or 3

B.

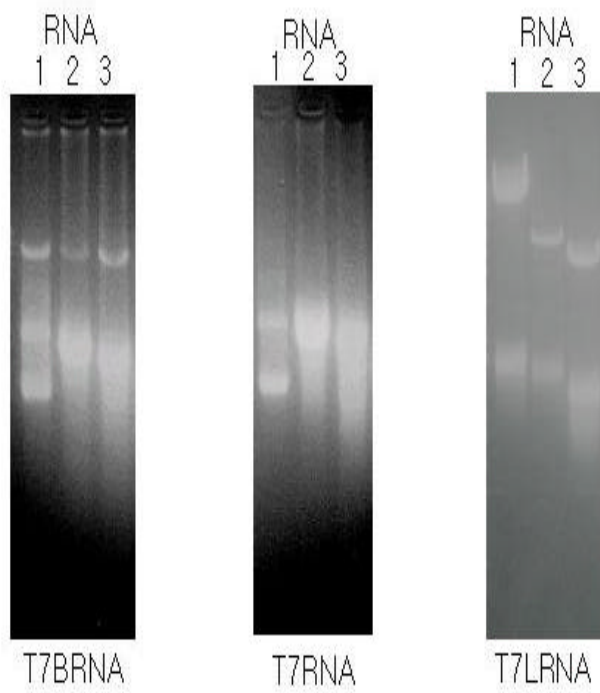


Figure 3

A.

T7BRNA1, 2, 3 T7 promoter:GGGAAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC.....:RNA1, 2 or 3
T7RNA1, 2, 3 T7 promoter:GGG:RNA1, 2 or 3
T7LRNA1, 2, 3 T7 promoter:G:RNA1, 2 or 3

B.

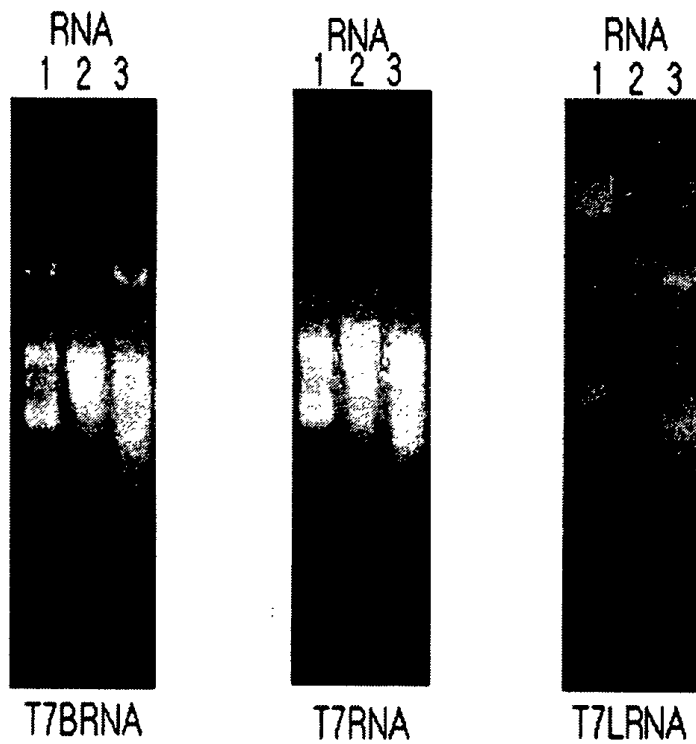


Figure 3

T7BRNAs 은 16-20 μg 생성되었고, T7RNAs 는 13-16 μg 이 생성되었다. 그러나, T7LRNAs는 2-3 μg 정도만이 생성되었다. 이는 T7 promoter가 full-length로 존재하지 않아 T7 RNA polymerase의 작용에 저해를 받는 것으로 추정되었다.

이렇게 만들어진 *in vitro* transcript들을 기주식물인 *Nicotiana benthamiana* 담배 야생종 식물에 감염하였다. T7BRNAs 와 T7RNAs의 경우, 많은 양의 transcript가 생성되었으므로, 각각을 1/4로 희석하여 감염을 수행하였고, T7LRNAs 는 생성양이 적었으므로 1/1로 감염을 하였다. 감염은 carborundum을 이용하여 수행하였다. Figure 4는 이들 감염실험에 대한 기주식물의 반응을 나타내고 있다. A panel 은 T7BRNAs, B panel은 T7RNAs, C panel은 T7LRNAs로 감염된 식물체를 나타낸다. 이 결과로 보아, 많은 양의 *in vitro* transcript를 생성하는 T7BRNAs와 T7RNAs는 매우 낮은 감염력으로 나타났다. 반대로 오히려 매우 적은 양의 *in vitro* transcript를 생성하는 T7LRNAs는 높은 감염력을 나타내었다. Table 1은 보다 많은 계체를 가지고 실험했을 때의 결과를 나타내는 것이다. 각각 기주식물 10개체를 가지고 수행하였는데, Table 1에서 나타났듯이, T7BRNAs 는 전혀 감염력을 보이지 않았다. T7RNAs의 경우 10개체의 식물중 단 한 개체만이 감염되었다. 이들 두 transcript들의 감염할 시 사용된 RNA 양이 너무 많거나, 혹은 부족하여 감염이 안된 것은 아닐까하여 이들 transcript들을 희석, 또는 농축을 수행한 후 감염실험을 수행해 보았으나, 마찬가지로의 결과를 나타내었다. 반면, T7LRNAs의 경우 10개의 개체들 중에서 9개체가 감염되는 것을 관찰하였고, 이들 실험을 2회 더 실시한 결과, 100%, 90%로 매우 높은 감염력을 나타내었다. 이 결과로 말미암아, 본 연구진들은 바이러스 cDNA의 5' termini에 additional sequence를 많이 가지면 가질수록 감염력이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 바이러스가 replication과 multiplication을 수행할 시 (+) strand virus의 경우 viral RNA dependent RNA polymerase가 5' UTR과 3' UTR을 인식하게 되는데, additional sequence가 존재할 시에 바이러스의 이런 5' UTR의 RNA secondary structure를 변화시킴으로써 바이러스의 이런 작용을 수행하는 데 저해하는 것이 아닌가 생각된다. 본 연구진은 이 결과로부터 높은 감염력을 가진 시작품을 개발하였고, 계속되는 실험의 기본재료로서 T7LRNAs를 사용하기로 하였다.

Table 1

Transcripts	Infected plants/total plants
T7BRNAs	0/10
T7RNAs	1/10
T7LRNAs	9/10

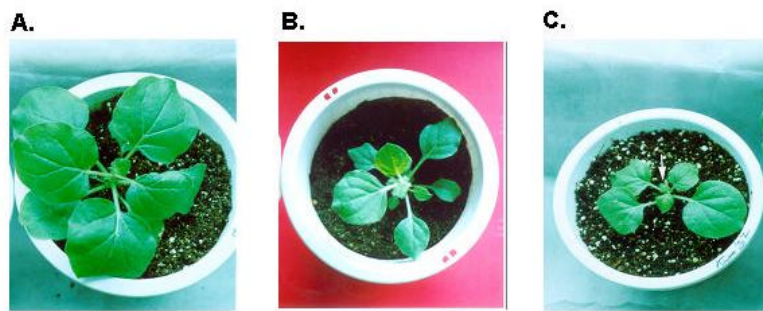


Figure 4

Table 1

Transcripts	Infected plants/total plants
T7BRNAs	0/10
T7RNAs	1/10
T7LRNAs	9/10

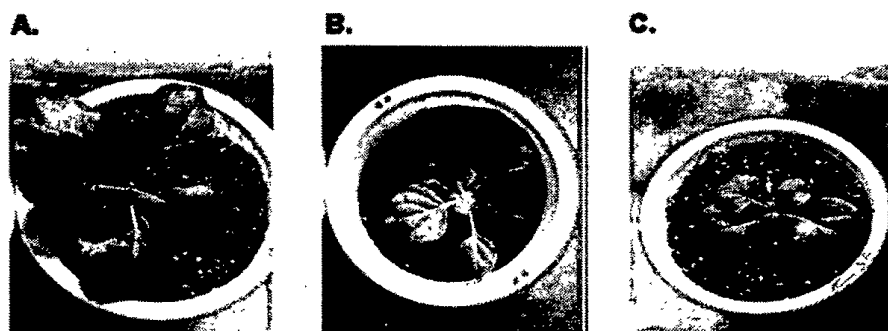


Figure 4

제 3 장 치환을 통한 바이러스 벡터의 개발 연구 결과 및 고찰

제 1 절 서 설

본 장은 위에서 언급한 바이러스 벡터 시작품을 이용하여 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 construct를 제작하는 것에 초점을 맞추고 있다. 그래서, 본 연구에서는 치환 (replacement)을 주요 기술로 사용하였다. 오이 모자이크 바이러스의 RNA3는 virus genome protein 두 가지를 암호화 하고 있다. 하나는 이동 단백질 (Movement protein) 이고, 나머지 하나는 피복 단백질 (Coat protein)이다. 이동 단백질의 경우, 바이러스의 Cell-to-cell movement에 관여하는 것으로 알려져 있고, RNA를 binding 할 수 있는 domain이 존재하여, 아마도 추정되어지기를 바이러스 RNA, 또는 어떤 RNA와 binding을 하면서, 식물체의 plasmodesmata를 통해 다른 cell로 이동하는 것으로 생각되어지고 있다. 피복 단백질의 경우, 이것의 명명에서도 볼 수 있듯이 바이러스의 피복 (capsidation)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 피복 단백질은 어느 정도까지는 자기 자신외의 peptide를 presentation할 수 있다는 보고가 되어지고 있으나, 그 크기에 있어서 매우 적은 크기의 peptide (20-22 amino acid)만 가능한 것으로 보고되어지고 있다. 본 연구의 바이러스 벡터는 외래 유전자 전체를 발현시키는 것이 목적이므로 연구진들은 피복 단백질 부분에 외래 유전자를 치환하는 기술을 이용하였다. 본 연구진은 바이러스의 replication에 관여하는 RNA1과 RNA2가 wild type으로 존재한다는 가정 하에 바이러스의 이동이 가장 중요한 작용 기작이라는 가설을 세웠다. 그래서, 이동 단백질에 외래 유전자를 치환하는 것보다는 아직 그 바이러스복제나 이동의 기능에 있어서 명확하게 나타나 있지 않는 피복 단백질의 치환을 수행하게 되었다.

제 2 절 RNA3의 껍질 단백질 부분의 조작

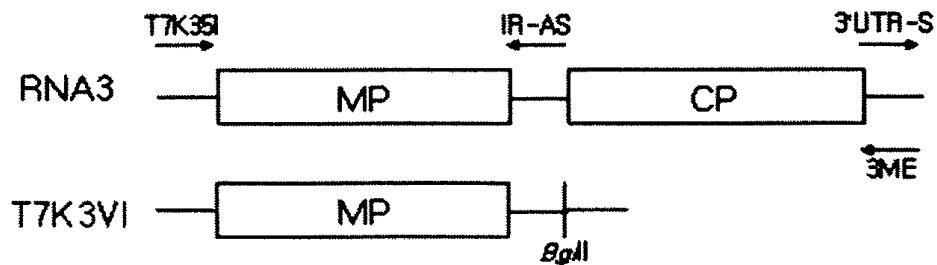
이미 보고된 바에 의하면, Brome mosaic virus (BMV)에서 이 바이러스의 기능 연구를 하는데 있어서, 바이러스의 껍질 단백질 부분을 인지 유전자 (reporter gene)으로 치환하여도 yeast 내에서 바이러스의 replication은 별 문제가 없는 것으로 나타났다. 그래서, 본 연구진들은, 오이 모자이크 바이러스와 같은 분류에 속해 있는 BMV에서 비록 식물체는 아니지만, yeast 내에서 성공 사례가 있었으므로, 바이러스의 껍질 단백질이 없어도 식물체 내에서 바이러스의 작용 기작에 큰 영향을 끼치지 않을 것으로 추정하였다.

Figure 5는 이 연구에 이용된 방법과 constructs의 구성을 도식화 한 그림이다. 먼저 외래 유전자의 도입을 쉽게 하기 위해서, RNA3의 cDNA를 조작하였다. Figure 5의 A panel은 치환을 위해 RNA3의 껍질 단백질 부분을 제거하는 방법에 대해 나타내고 있다. 바이러스 재조합을 위해 본 연구진은 RNA3 cDNA를 PCR을 통해 두 부분으로 나누었다. Primer set인 T7K35I (5'ACGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGTAATCTTACCATC3')와 IR-AS (5'ACGAGATCTGACTCGACTCAATTCTAC3')를 이용하여 T7 promoter, 이동 단백질, subgenomic promoter (SGP)를 분리해 내었다. 그 다음 3' UTR-S (5'ACGAGATCTTTCTGTGTTTTCCAGAAC3')와 3ME (5'GACAGAATTCACGCGTGGTCTCCTTTTGGAGG3') primer set을 이용하여, 껍질 단백질을 제외한 RNA3의 3' UTR region을 분리하였다. 이렇게 획득한 PCR 산물은 우선적으로 pUC18 plasmid vector에 T7 promoter, 이동 단백질, subgenomic promoter를 가진 fragment를 클로닝한 후, *EcoRI*과 *BglII* restriction enzyme을 이용하여 껍질 단백질이 제거된 RNA3 cDNA를 구축하였다. 이 cDNA construct는 T7K3VI으로 명명하였다.

이 cDNA construct에서의 외래 유전자의 발현을 관찰하기 위해 green fluorescent protein (GFP)와 β -glucuronidase (GUS), Levanscurase 유전자를 PCR을 통해 선별해 내고, T7K3VI에 클로닝 하였다. 먼저 primer set인 smGFP5B (5'ACGGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC3')와 smGFP3B (5'ACGGGATCCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC3'), GUS5B (

5'ACGGGATCCATGTTACGTCCTGTAGAAACC3')와 GUS3B (5'ACGGGATCCATTCCTCATTGTTTGCCTCCCTGCTG3'), Lev5B (5'ACGGGATCCATGTTGAATAAAGCAGGCATTGC3')와 Lev3B (5'ACGGGATCCTTATTTATTCAATAAAGACAG3')를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이렇게 획득된 fragment 들을 *Bam*HI restriction enzyme 처리를 하고, T7K3VI 에 *Bgl*III 로 처리를 한

A.



B.

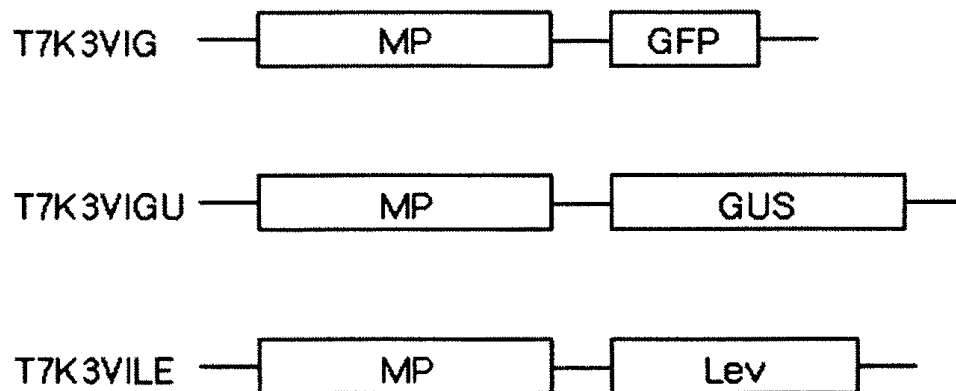


Figure 5

다음, 이 안으로 외래 유전자들을 클로닝 하였다. Figure 5의 B panel은 이들 외래 유전자들이 클로닝 된 후 나타내게되는 변형된 RNA3의 구성을 나타내고 있다.

이들 construct들을 가지고 식물체 감염 실험을 수행하기 위해, T7K3VI, T7K3VIG, T7K3VIGU, T7K3VILE, T7RNA1, 2, 3의 *in vitro* transcript를 얻었다. template 제작을 위해 각각 5 μ g DNA를 사용하였고, T7K3VI, T7K3VIG, T7K3VIGU, T7K3VILE는 *EcoRI* restriction enzyme을 이용하여 DNA linearization을 하였고, T7RNA1, 2, 3는 *MluI*을 이용하였다. 이렇게 얻은 linearized DNA들은 앞의 2장에서 언급했다시피, 시작품을 만들 때와 같은 조건으로 *in vitro* transcription을 수행하였다. Figure 6은 위의 construct들이 모두 성공적으로 *in vitro* transcript를 생성했음을 나타내고 있다. 본 연구진은 이들 transcript들을 시작품을 제작할 때와 같은 방법으로 RNA1과 2는 각각 1 μ g transcript를 RNA3와 여러 가지 재조합 RNA3는 2 μ g을 사용하여 담배 기주 식물체에 감염을 실시 하였다. 이렇게 감염된 식물은 온실 조건에서 2 주일간 성장 시킨 후 관찰 하였다.

본 연구진은 감염 시킨 후 2 주일이 지난 후 wild type을 감염시킨 식물체에서 전형적인 오이 모자이크 바이러스 병징을 관찰한 후, 재조합 바이러스 벡터를 감염시킨 식물체가 외래 유전자를 발현 시킬 수 있는지 검정하였다. 육안으로 관찰시 wild type을 감염시킨 식물체는 병징을 관찰 할 수 있었으나, 재조합 바이러스 벡터에서는 병징을 관찰 할 수가 없었다. 오이 모자이크 바이러스 Kor strain은 병징 발현이 매우 mild 함으로 혹시 병은 발생했으나, 병징은 보이지 않을 가능성을 배제 할 수 없었기 때문에 감염된 식물체내에서의 바이러스 RNA 검정을 수행하였다. Figure 7은 감염시켰던 식물체들에서의 Northern blot analysis를 나타내고 있다. Northern blot analysis를 위해 바이러스 probe로는 바이러스의 이동 단백질을 Probe로 만들어 발현을 관찰하려 하였고, 여러 외래 유전자들, GFP, GUS, Lev은 각각 open reading frame을 이용하여 probe로 제작하였다. 그 결과, wild type으로 감염 시킨 식물체에서는 성공적으로 바이러스 RNA를 생성하고 있음이 관찰되었다. 그러나, 외래 유전자를 삽입한 재조합 바이러스 벡터를 가지고 감염시킨 식물체들에서는 병징 관찰을 못했던 것과 마찬가지로 바이러스 RNA의 검출도 되지 않았다. 이 결과로 미루어 보아, 오이 모자이크 바이러스의 피복 단백질이 바이러스 작용

기작에 있어서 중요한 역할을 한다는 것으로 추정할 수 있었다.

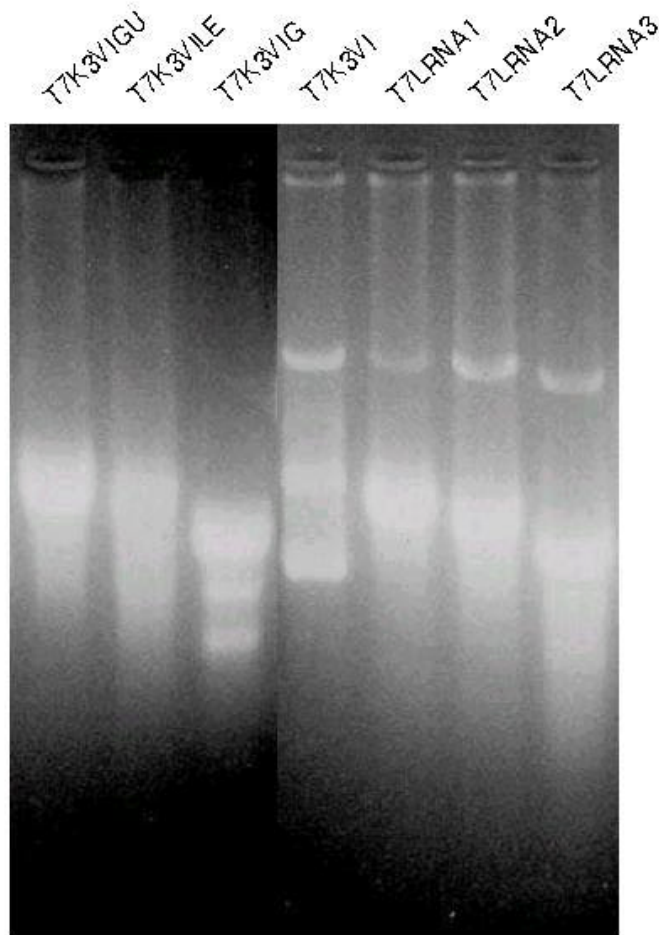


Figure 6

기작에 있어서 중요한 역할을 한다는 것으로 추정할 수 있었다.

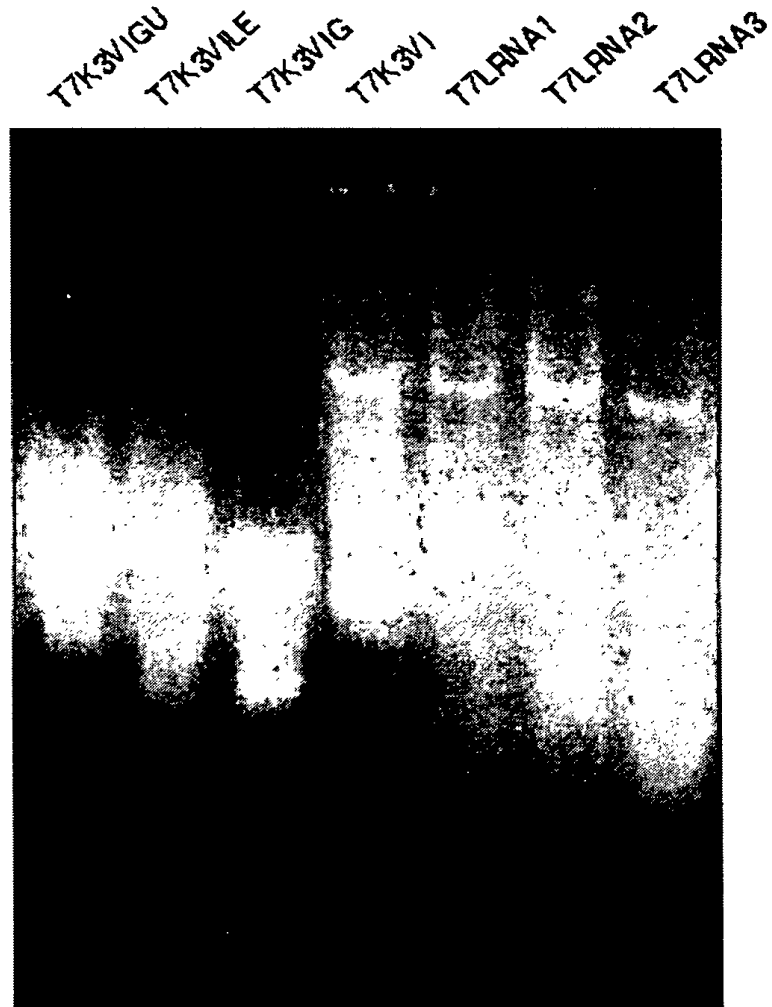


Figure 6

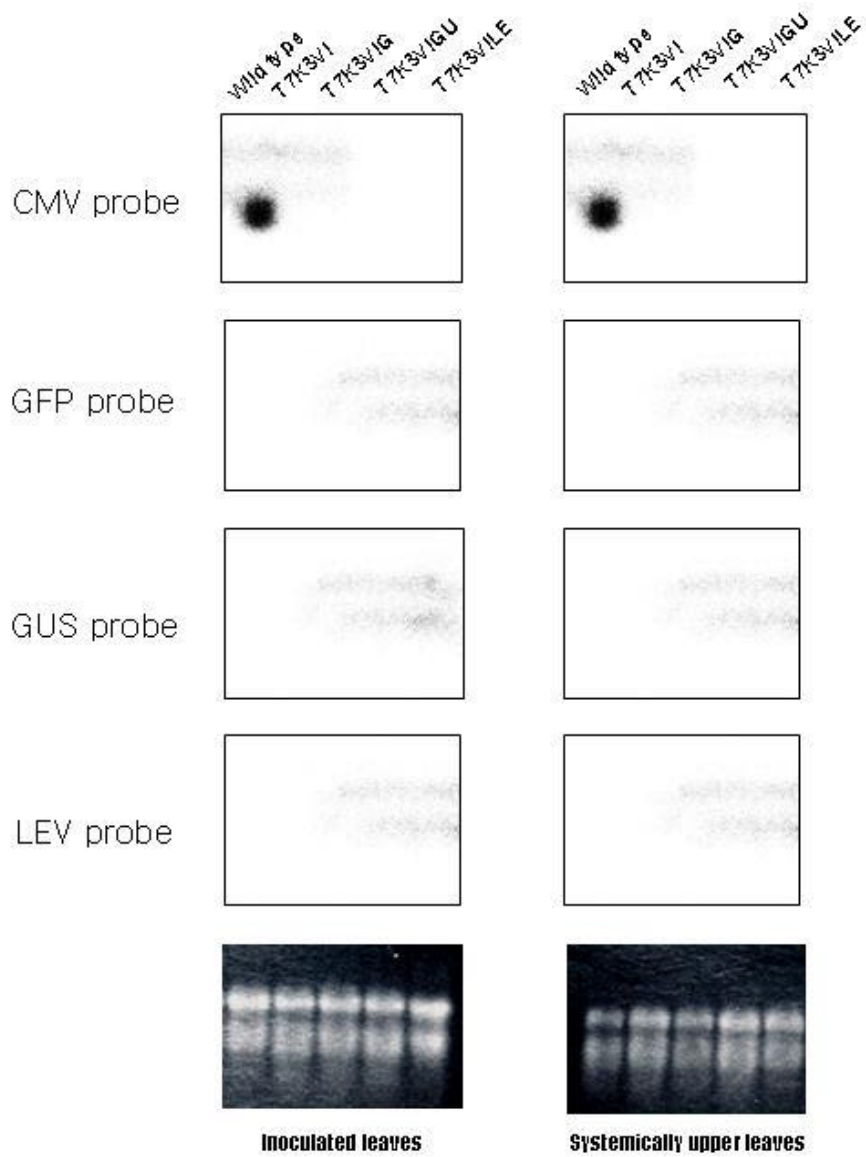


Figure 7

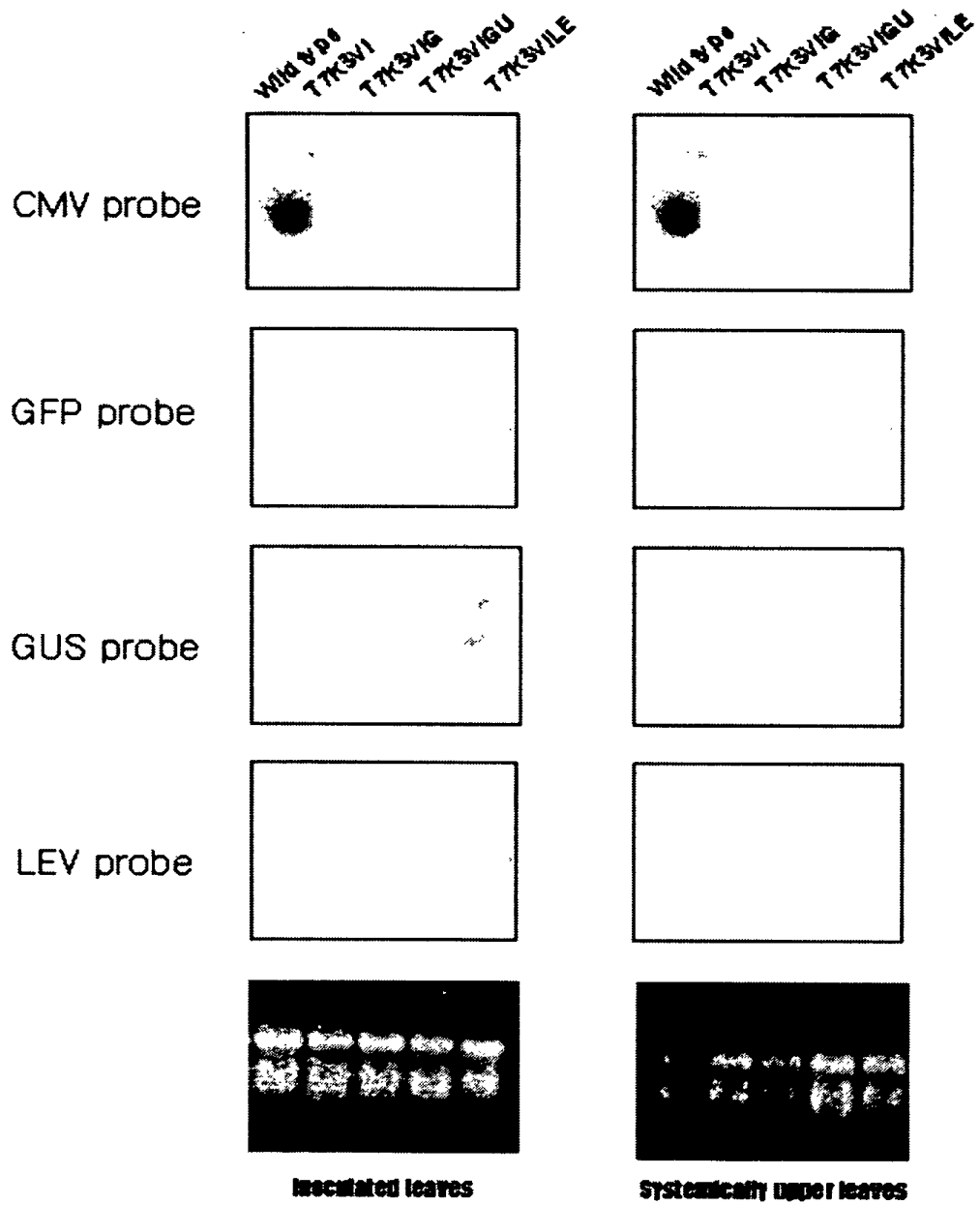


Figure 7

제 3 절 결핍 피복 단백질의 보상 연구

위의 결과로 보아, 오이 모자이크 바이러스의 피복 단백질이 바이러스 이동 등의 작용에 있어서 역할을 할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그래서, 이번 연구는 이런 바이러스의 피복 단백질을 보충해 줄 수 있는 방법에 대해 초점을 주었다. 본 연구진이 생각한 아이디어는 Figure 8에 나타나고 있다. 즉, 그림에서 보듯이, 앞에서 수행하였던 실험에서처럼 재조합 바이러스를 *in vitro* transcription을 통해 제작을 하고 감염시에 재조합 바이러스 RNA와 함께 wild type인 T7LRNA3에서 생성된 RNA를 같이 감염 시킴으로써, 앞의 실험에서 문제점으로 제시된 사항을 보충하여 주었다. 마찬가지로 감염된 식물체에 대한 관찰은 감염 후 2 주후에 수행되었다. 본 연구진이 관찰한 결과, 이번 실험에서는 감염시킨 모든 식물체에서 전형적인 오이 모자이크 바이러스 Kor strain의 병징을 관찰 할 수 있었다. 이 병징이 본 연구진이 새로이 시도해 보았던, 단지 wild type RNA3를 통해서 보이는 현상인지를 확인하기 위해 Northern blot analysis를 수행하였다. Probe의 제작은 앞에 실험에서 수행했던 것과 동일하게 만들었다. Figure 9는 이 실험에 대한 Northern blot analysis 결과이다. 결과에서 볼 수 있듯이, CMV probe를 사용한 blot에서는 모두 RNA가 검출되는 것으로 관찰 되었다. 이로 말미암아, 본 연구진이 관찰한 감염식물체에서의 병징은 바이러스의 식물체 내에서 RNA 검출과 일맥 상통한 결과임을 알 수 있었다. 그러면, 이런 바이러스 벡터의 감염 시스템이 클로닝한 외래 유전자들의 발현도 가능하게 했는지를 알아보기 위해 역시 GFP, GUS, Lev 의 Open reading frame을 사용하여 RNA를 검출해 보았다. 그러나, Figure 9 결과에서 볼 수 있다시피, 외래 유전자의 발현은 관찰 할 수 없었다. 그래서, 본 연구진은 이번 연구에서 보여 주었던 결과는 재조합 단백질의 피복 단백질 결핍을 보충해 주기 위해 같이 넣어 주었던 wild type RNA3에 의해 생성된 결과임이 판명 되었다.

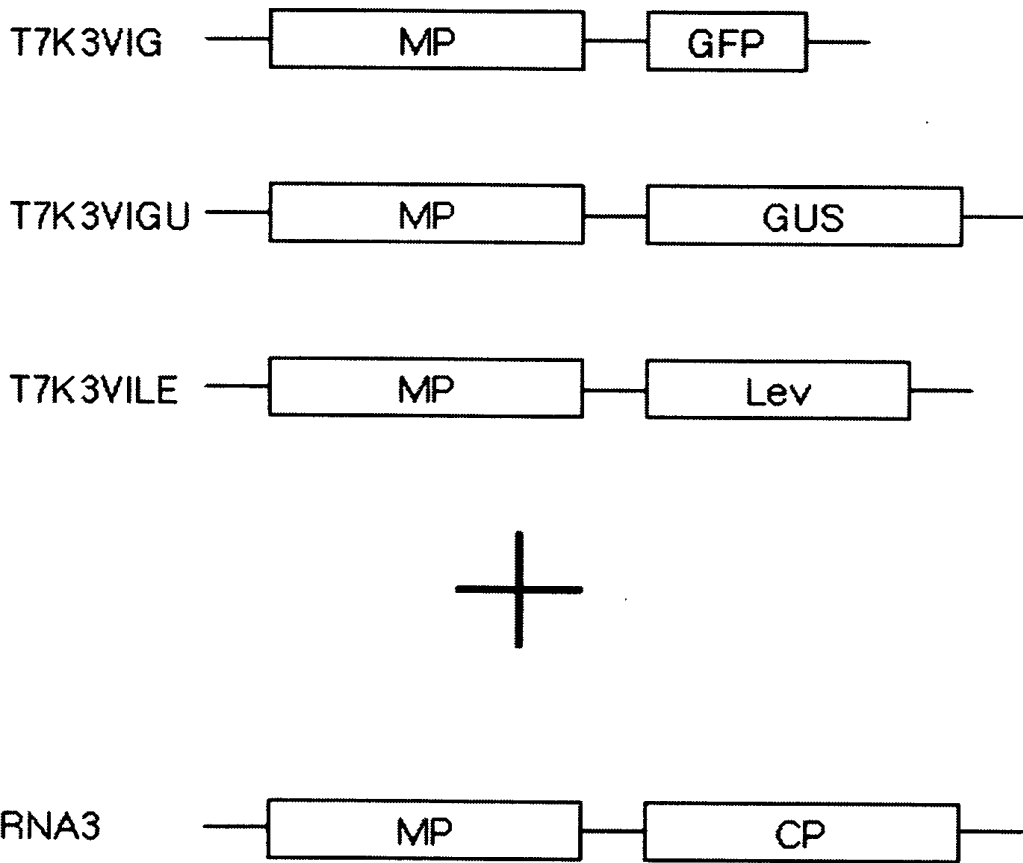


Figure 8

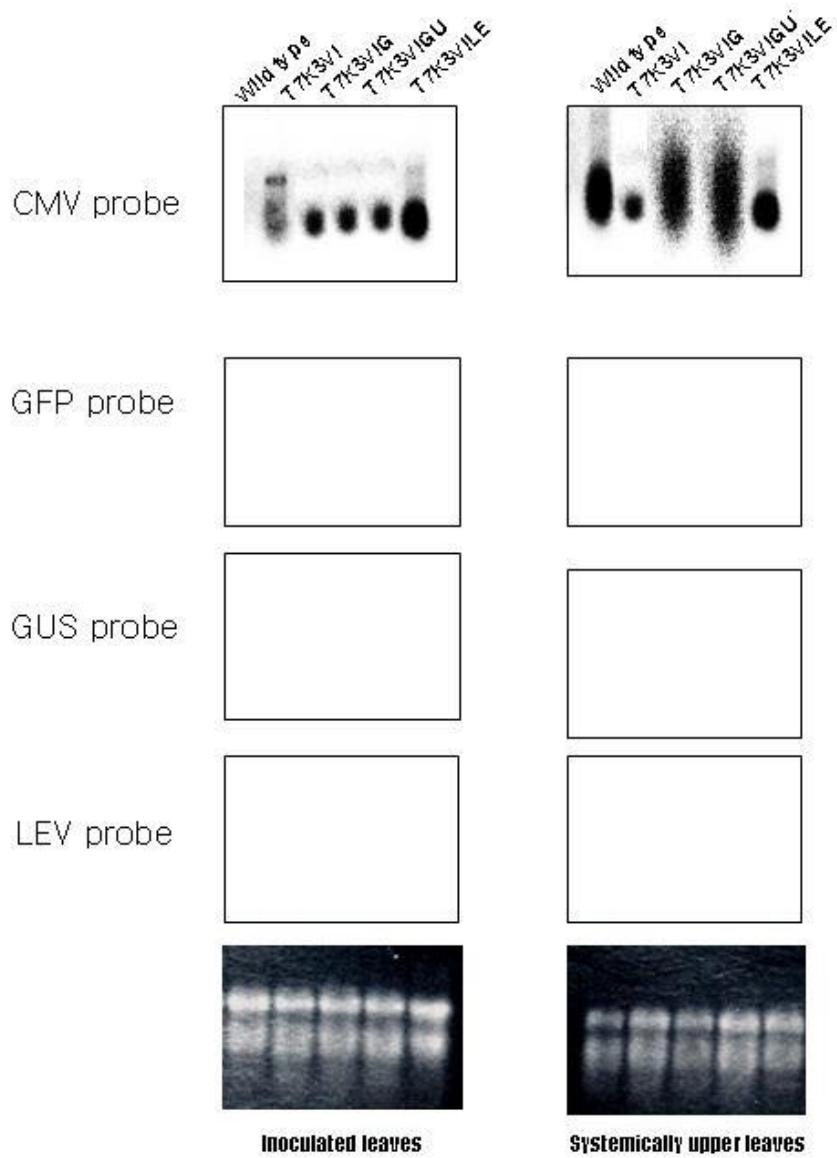


Figure 9

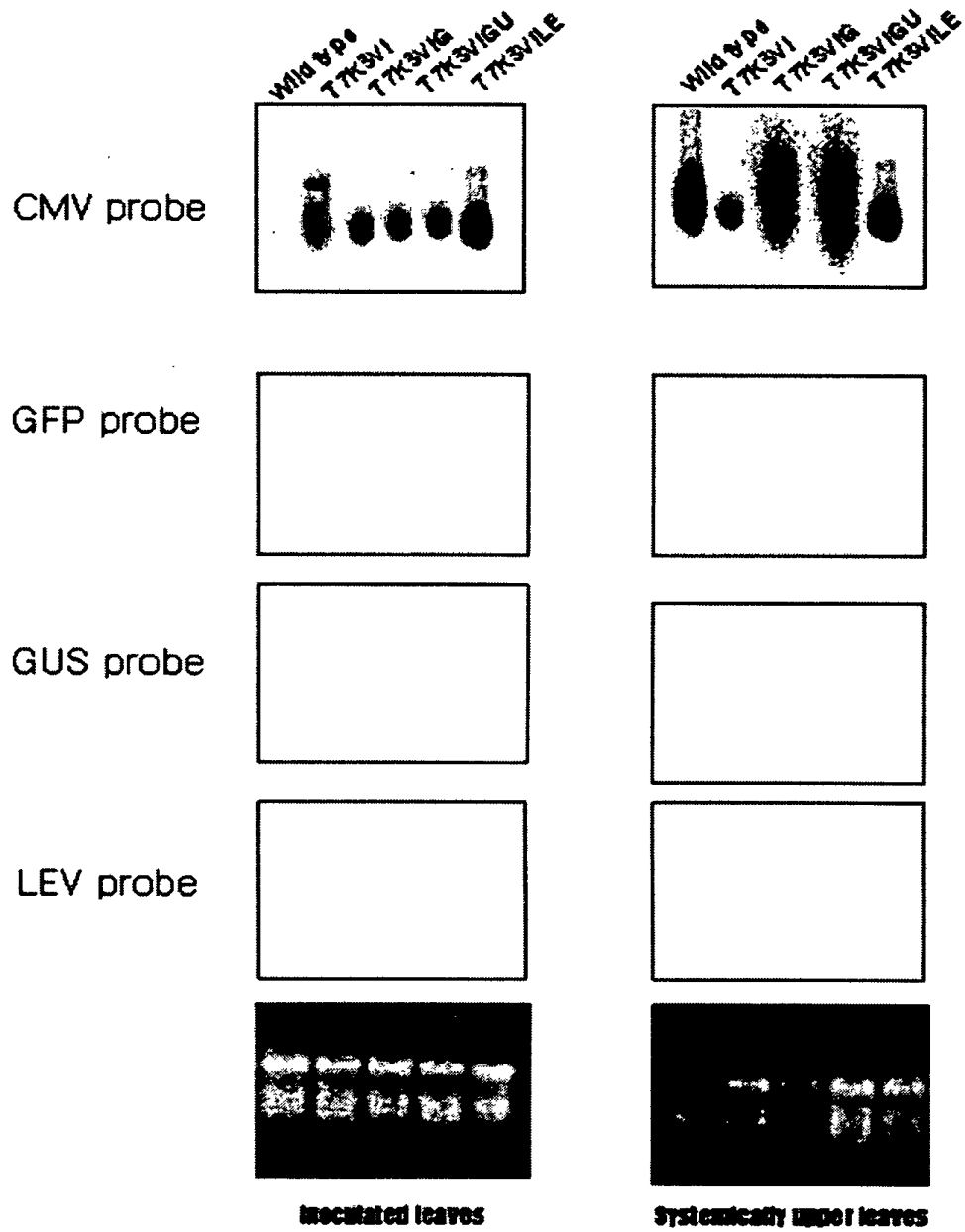


Figure 9

제 4 장 삽입을 통한 바이러스 벡터 개발 연구 결과 및 고찰

제 1 절 서 설

본 장에서는 앞 장에서 수행하였던 치환을 통한 외래 유전자 도입과는 달리 cassette를 제작하여 바이러스의 적절한 부위에 삽입하는 것을 주요 기술로 하고 있다. 오이 모자이크 바이러스는 다양한 virus promoter을 가지고 있다.

보고된 바에 의하면, 바이러스의 promoter는 바이러스 replicase가 인식하는 부분으로 관찰되었고, 오이 모자이크 바이러스와 같은 viridae에 속하는 Alfalfa mosaic virus의 경우 RNA3의 3' UTR 부분이 바이러스 단백질의 높은 발현에 관여하는 부분으로 보고되고 있다. 또, 같은 viridae에 속하는 Brome mosaic virus의 경우는 RNA3의 subgenomic promoter가 바이러스 단백질 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구진은 RNA3의 5' UTR promoter, subgenomic promoter, RNA3의 3' UTR을 연구의 재료로 하여 수행하였다. 외래 유전자를 바이러스의 promoter와 같이 cassette를 만들어 바이러스의 적절한 위치에 삽입함으로써 바이러스가 기주 식물체 내로 들어갔을 때 바이러스의 모든 component는 wild type처럼 작용하고, 외래 유전자에는 바이러스 promoter가 있으므로, 동시에 이 promoter를 바이러스가 인식하여 발현하게 함으로써 본 연구에서 개발하려는 바이러스 벡터 구축을 하려 하였다. 이 연구에서는 다양한 형태의 삽입 기술이 이용되었다.

제 2 절 외래 유전자 cassette의 삽입

제 1 항 이동 단백질에 외래 유전자 치환 후 subgenomic promoter 앞에 RNA3 promoter movement protein cassette 삽입

위의 서설에서도 언급했다시피, 최근 보고된 바에 의하면 바이러스의 promoter region이 바이러스가 기주 내에서 작용하는 데 결정적인 역할을 한다고 한다. 오이 모자이크 바이러스는 3개의 RNA로 구성 되어있고, 각각에 부착되어 있는 promoter와 보고된 subgenomic promoter까지 합하면 총 4개의 promoter로 구성되어 있다. 본 연구진은 오이 모자이크 바이러스의 어떤 promoter를 사용할 것인가에 대해 많은 고찰을 하였다. 그래서, 먼저 시도한 방법이 Figure 10에 나타나 있다. 바이러스의 replication은 바이러스가 기주 내에 침입했을 시 수행하게 되는 가장 중요한 작용 기작이다. 바이러스의 전파도 바이러스 입장에서 보면 중요한 측면이기는 하나, 일단 바이러스의 생존력을 갖는 것이 우선인 것으로 생각되고 있다. 실제로 이때까지의 보고된 것을 보면, 단일 세포로 이루어진 yeast나 protoplast에서 RNA3의 RNA가 존재하지 않고 바이러스의 replicase만 존재하여도 replication을 수행하고 있는 것을 관찰 해 왔다. 이 같은 보고는 앞에서 말한 가정을 뒷받침 해 주는 증거라 할 수 있다. 그래서, 본 연구진들은 첫 번째로 RNA3 promoter를 사용하기로 하였다. 바이러스의 replication이 중요하다는 것이 인식되어 있는 가운데 RNA3 promoter를 선택한 이유는, 만일 외래 유전자 앞에 이 replicase promoter를 사용하게 되어 바이러스가 식물체내에서 작용하게 될 때, promoter 사용에 있어서 competition 이 일어나 바이러스 작용에 저해를 가져올 수 있는 가능성이 있기 때문이다. 또, 바이러스 벡터의 목적이 바이러스를 이용한 외래유전자의 발현에 있기 때문에 바이러스의 이동도 무시 할 수 없는 초점이다. RNA3 promoter에는 이동 단백질이 부착되어 있으므로, Figure 10에서 보여주다시피, 맨 앞쪽에 외래 유전자를 부착하여, 바이러스가 replication을 수행하게 될 때, 바이러스 replicase가 외래 유전자를 부착한 RNA3

promoter에 결합하게 함으로써, 우선적으로 외래 유전자를 바이러스 내에서의 발현을 시킬 수 있도록 하였다. 또, 바이러스의 모든 component가 있어야 제대로 바이러스의 작용을 할 수 있다는 앞의 결과를 바탕으로 외래 유전자가 부착된 RNA3에 다시 RNA3 promoter부분과 이동 단백질 (movement protein)을 클로닝 하여 주었다. 먼저, 이런 클로닝을 가능하게 하기 위해, T7K3V2를 제작하였다. 이 시작품의 특성을 이동 단백질과 RNA3의 subgenomic promoter 사이에 *Bg*III cloning site를 삽입하여 줌으로써, 이 안으로 다양한 cassette를 클로닝 할 수 있게 하였다. 이 시작품을 이용하여 이 시작품의 감염력을 검정해 본 결과, 이 때까지 본 연구진이 사용해왔던 시작품과 마찬가지로 높은 감염력을 나타내었다 (data not shown). 그래서, 본 실험 이후로 사용된 wild type 감염은 이 시작품을 이용하여 수행하였다. 이 시작품을 만들기 위해 T7K35L과 MPBg3 (5'ACGAGATCTCTAAAGACCGTTAA C3') primer set을 이용하여 RNA3 앞부분을 획득하였고, IR-SBg (5'ACGAGATCTGTGAAACCCACGCATAATCATA3')와 3ME를 이용하여 뒤부분을 획득한 다음, commercial plasmic vector pUC18 에 클로닝 하였다.

이렇게 얻은 T7K3V2를 이용하여, 외래 유전자를 클로닝 하였다. 이 바이러스 시작품에 클로닝하기 위해서, 사용될 모든 외래 유전자의 5' end에 사용될 primer에 *Kpn*I site를 첨가하였고, 3' end에는 *Bg*III site를 넣어 제작한 후, PCR reaction을 통해 그 fragment를 얻었다. 이 fragment는 *Kpn*I/*Bg*III site에 클로닝하였고, 그 다음 K35 (5'ACGGGATCCGTAATCTTACCATCTGT GTGTG3')와 MPBg3 primer set을 이용하여 이동 단백질을 얻은 후 클로닝 된 외래 유전자들 3' end에 부착 시켰다.

이렇게 제작된 재조합 바이러스를 이 제작품들이 외래 유전자를 발현 시킬 수 있는지를 확인하기 위해 *in vitro* transcript를 얻었다. Figure 16은 이런 transcripts들이 성공적으로 생성되고 있는 것을 보여 주고 있다. 이렇게 얻은 transcripts는 담배 기주 식물에 감염 시켰다. 본 연구진은 감염 후 2 주일 후에 감염된 식물체를 검정하였다. 재조합 바이러스를 가지고 감염한 식물체는 모두 wild type를 가지고 감염시킨 식물체와 마찬가지로 전형적인 오이 모자이크 바이러스 병징을 나타내었다. 감염된 식물체 내에서의 RNA의 발현을 관찰하기 위해 Northern blot analysis를 수행하였다. Figure 11은 Northern blot analysis 결과를 나타낸 것이다. 오이 모자이크 바이러스 병징을 전개하였

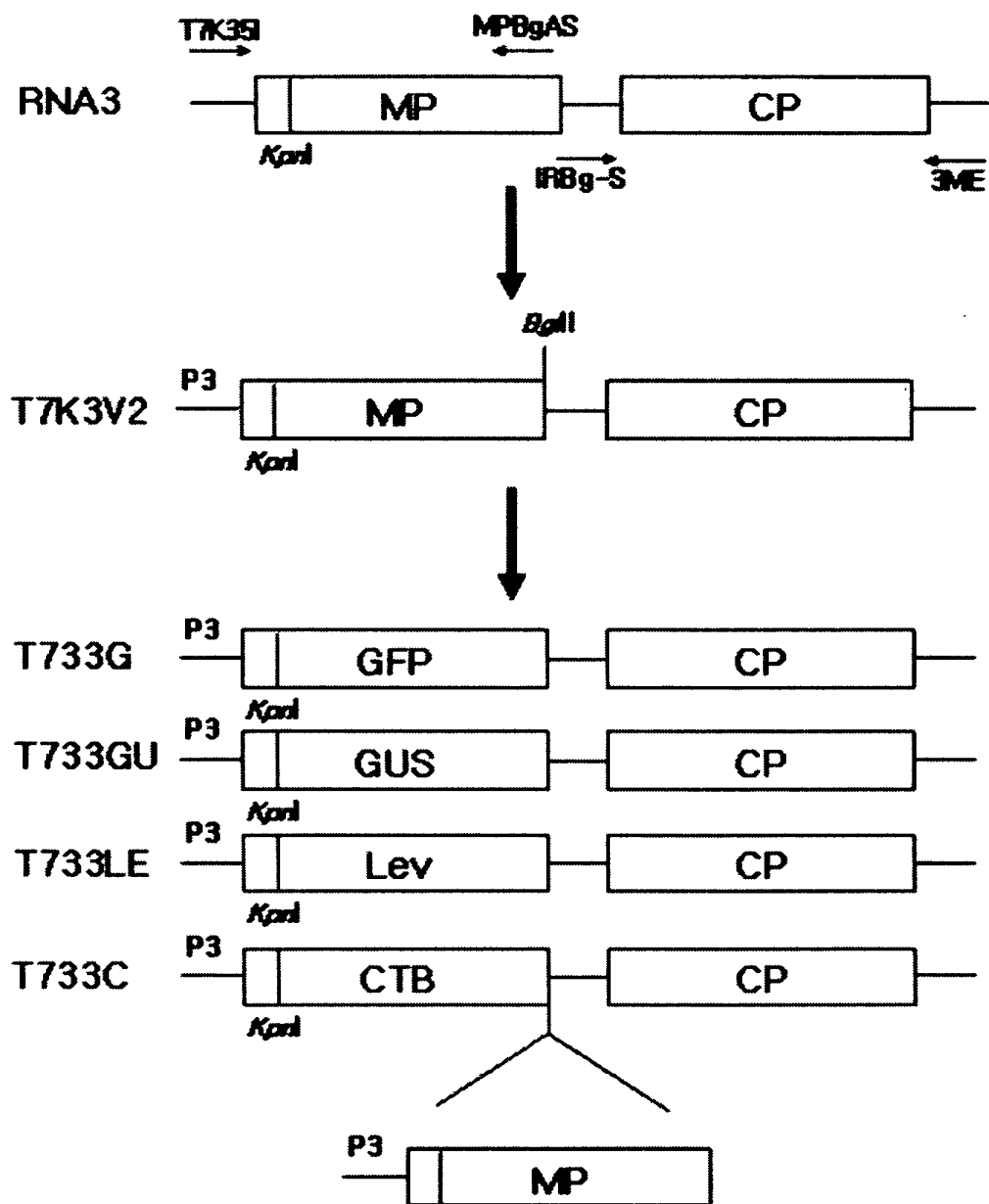


Figure 10

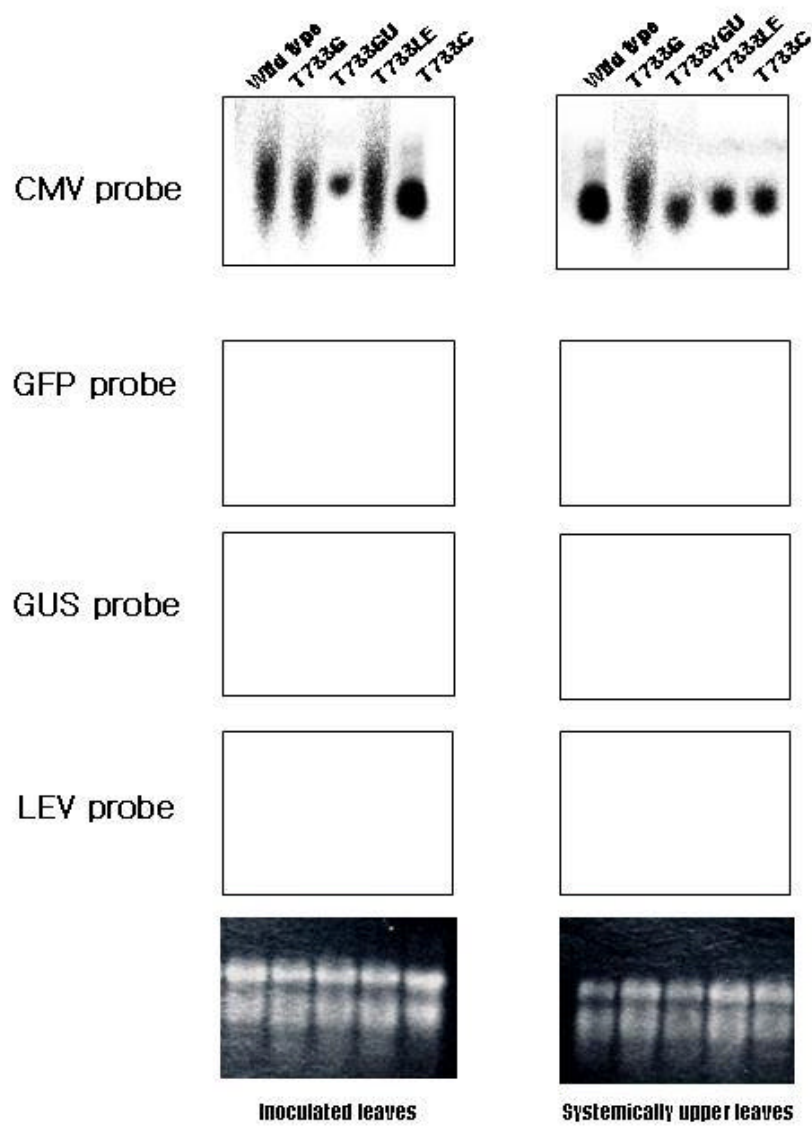


Figure 11

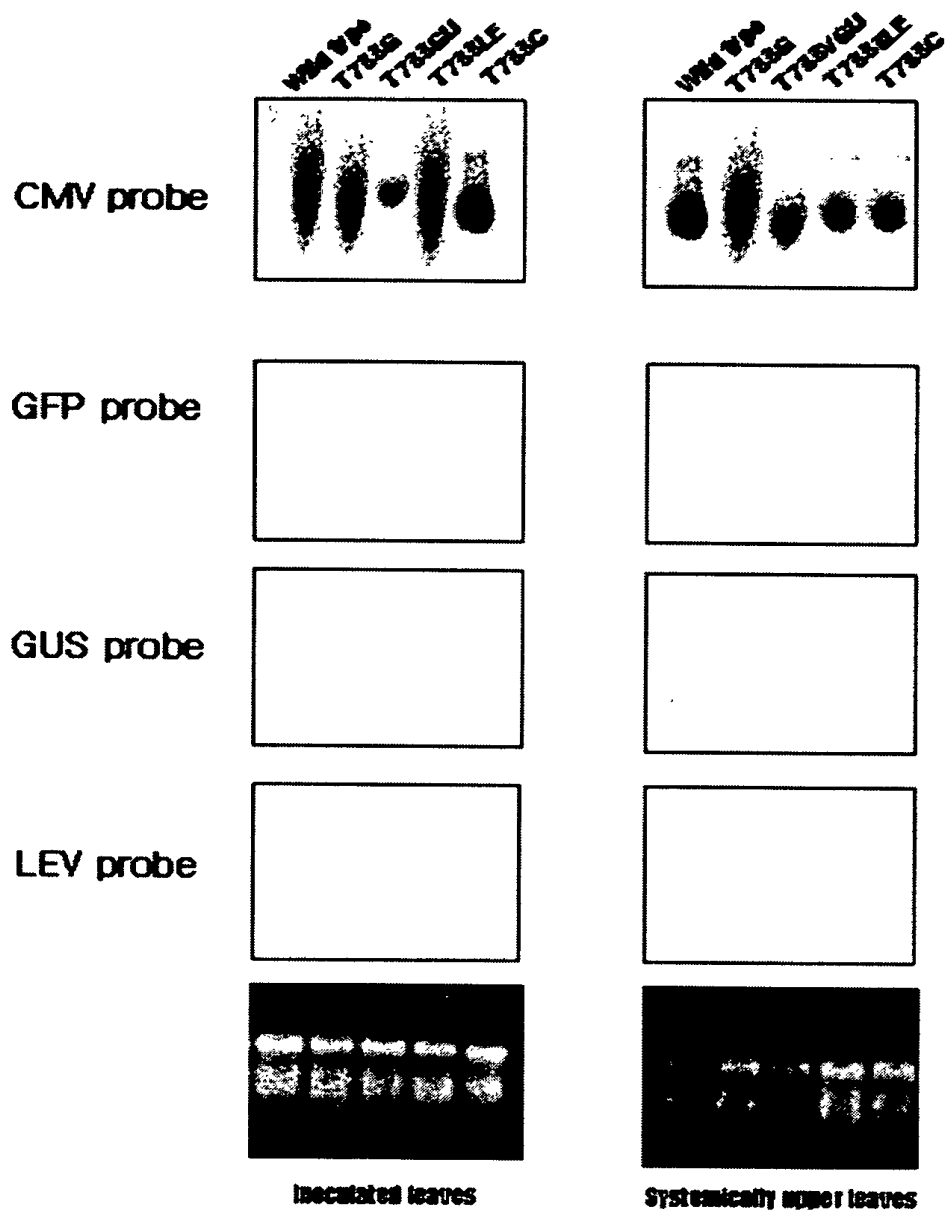


Figure 11

던 모든 식물체에서 바이러스 RNA가 검출 되었다. 그러나, 외래 유전자의 발현은 관찰 되지 않았다. 본 연구진은 같은 실험을 3회 실시하였으나, 외래 유전자의 발현을 관찰 할 수 없었다. 이 결과로 보아, 이 연구에 사용되었던, T733G, T733GU, T733LE, T733C는 감염력은 있으나, 외래 유전자를 발현 시키는 데는 작용을 하지 않는 것으로 결론을 지었다. 아마도 본 연구진이 이러한 결과를 관찰하게 된 원인은, 사용된 T733G, T733GU, T733LE, T733C에는 사실상 클로닝된 외래 유전자 3' end에 wild type과 동일한 형태의 cDNA가 있는 것과 같은 형태를 나타내게 되는 데, 이것이 바이러스 내에 들어갔을 때, 감염 초기에 바이러스 replicase가 외래유전자와 외래 유전자 뒤부분의 RNA3 promoter에 같은 chance로 결합하다가, 감염력이 있는 wild type RNA3가 생성되면, 이 바이러스의 replicase가 wild type RNA에 부착하는 chance가 늘어나게 됨으로 결론적으로 외래 유전자가 있는 RNA의 생성은 소멸되고, wild type RNA만 생성되어 감염된 식물체에서 병징을 전개한 것이 아니가 추정하였다.

제 2 항 이동 단백질에 외래 유전자 치환 후 subgenomic promoter 앞에 subgenomic promoter movement protein cassette 삽입

본 연구에서는 바이러스 벡터의 개선을 위해, 또 다른 전략을 구축하였다. Figure 12는 다른 방향으로의 구축 방법을 나타내었다. 전략은 제 1 항에서 구축하였던 constructs 들을 약간 변형하는 방법을 사용하였다. 즉, Figure 10에서 이미 구축된 바이러스 벡터에 RNA3 promoter movement protein 대신 subgenomic promoter movement protein cassette를 치환하여 주었다. 보고된 바에 의하면, 오이 모자이크 바이러스의 4가지 promoter 중에서, 비록 *in vitro*에서의 결과이기는 하지만, subgenomic promoter가 나머지 promoter보다 바이러스 단백질 발현에 있어서 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 또, 이 subgenomic promoter가 다른 promoter보다 단백질 발현에 polymerase의 결합 우선성이 있다고 알려져 있다.

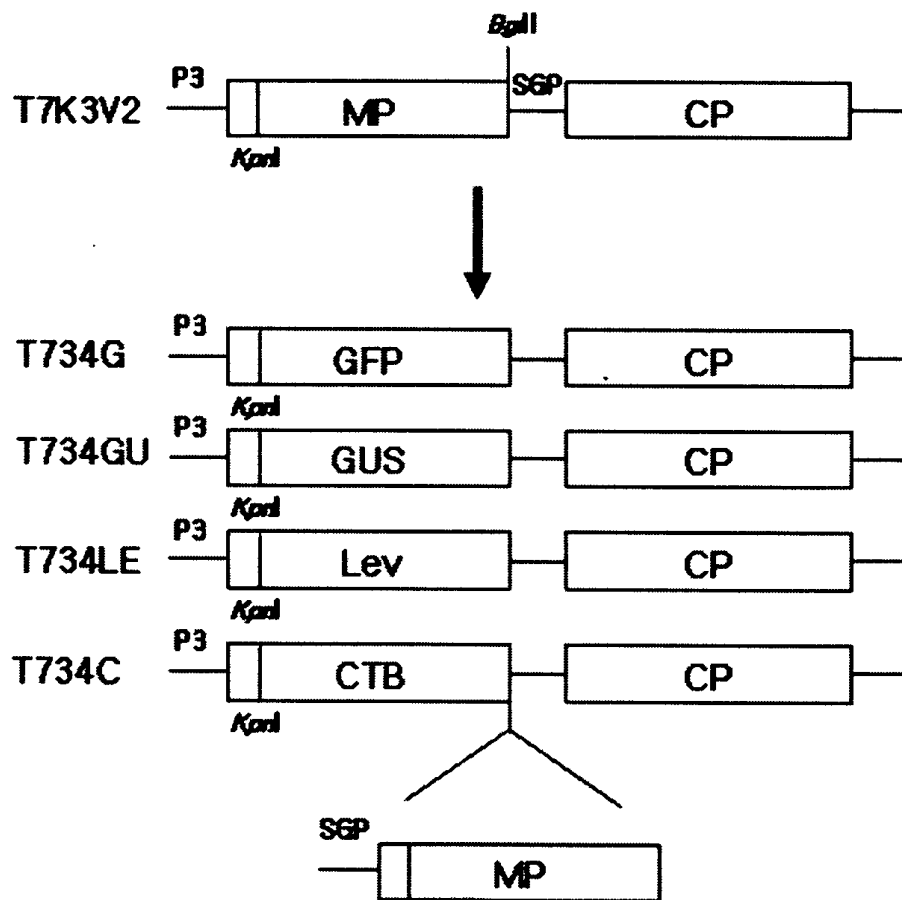


Figure 12

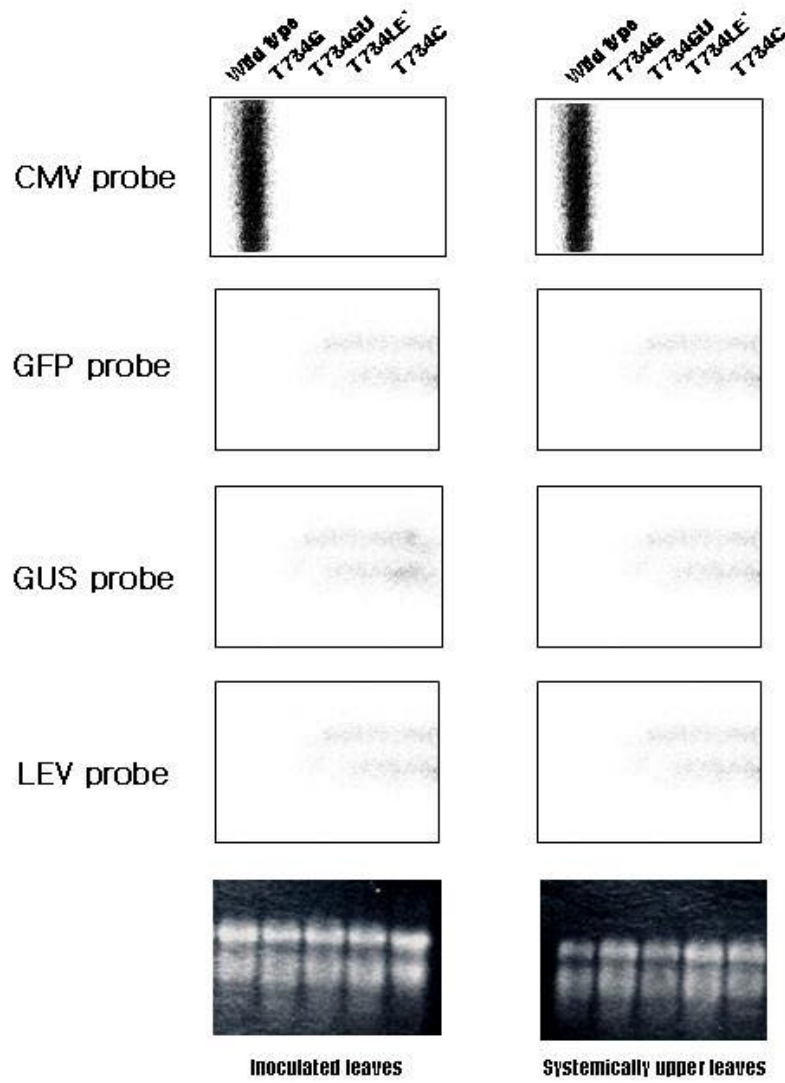


Figure 13

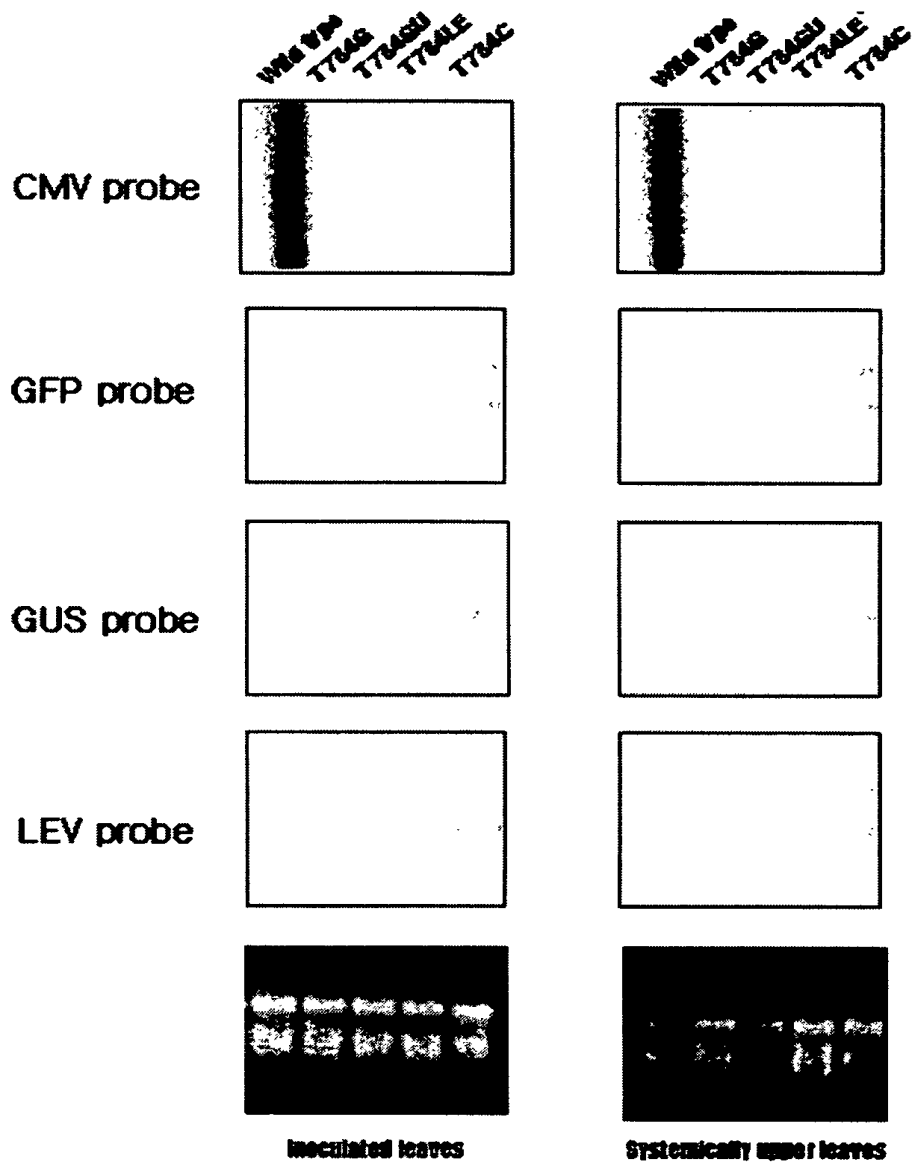


Figure 13

이번 연구에 사용된 constructs는 감염 후 2 주일 후에 관찰하였다. 이번 결과에서는 wild type만 감염시킨 식물체만 바이러스 병징을 나타내었다. 이들 constructs의 RNA를 검출하기 위해, Northern blot analysis를 수행하였다. Figure 13은 그 결과를 나타낸 것이다. 병징을 보이는 식물 개체에서만 바이러스 RNA가 검출되었다. 이 결과로 미루어 보아, subgenomic promoter가 *in vitro* 상에서는 바이러스의 단백질 생성에 있어서 우선적인 특성이 있기는 하나, *in vivo* 내에서는 다른 factor가 작용할 것이라 생각된다.

제 3 항 피복 단백질과 이동 단백질 사이에 subgenomic promoter cassette 삽입

본 연구진은 위의 결과들을 바탕으로 다른 전략으로의 벡터 개발을 구상하였다. Figure 14는 이런 새로운 전략을 나타내고 있다. 이 때까지의 결과로 미루어 보아 본 연구진은 바이러스 개발을 위해 크게 몇 가지 중요한 오이 모자이크 바이러스의 특성을 발견하였다. 우선은 바이러스 작용에 있어서 바이러스가 구성하고 있는 모든 component 들은 virus genome상에 반드시 존재해야 한다는 것이다. 이러한 사항은 매우 기본적인 이론으로 생각되어질 수 있으나, yeast나 protoplast와 같은 상황에서는 바이러스 component들이 모두 없어도 바이러스 replication에 아무 영향을 주지 못한다는 보고가 있었으므로, 바이러스 벡터를 개발하는 것은 직접적 기주 식물 내에서의 이용이 가능해야 한다는 점을 생각할 때, yeast와 같은 실제적인 기주가 아닌 것과는 그 기작이 다르다는 것을 알 수 있었다. 그 다음은 바이러스 promoter의 이용이다. 본 연구진은 앞에서 언급했다시피, 바이러스의 promoter가 얼마나 중요한 역할을 하는 지 실험을 통해 알 수 있었고, 그 위치도 바이러스의 작용 기작을 잘 생각해서 이용해야 한다는 것을 알 수 있었다. 또, 바이러스 genome 단백질의 발현에 있어서 promoter의 우선성은 실제에 있어서는 *in vitro* 결과와 다를 수 있다는 것도 알 수 있었다.

그래서, 본 연구진은 Figure 14에서 나타나 있는 것처럼, 오이 모자이크 바

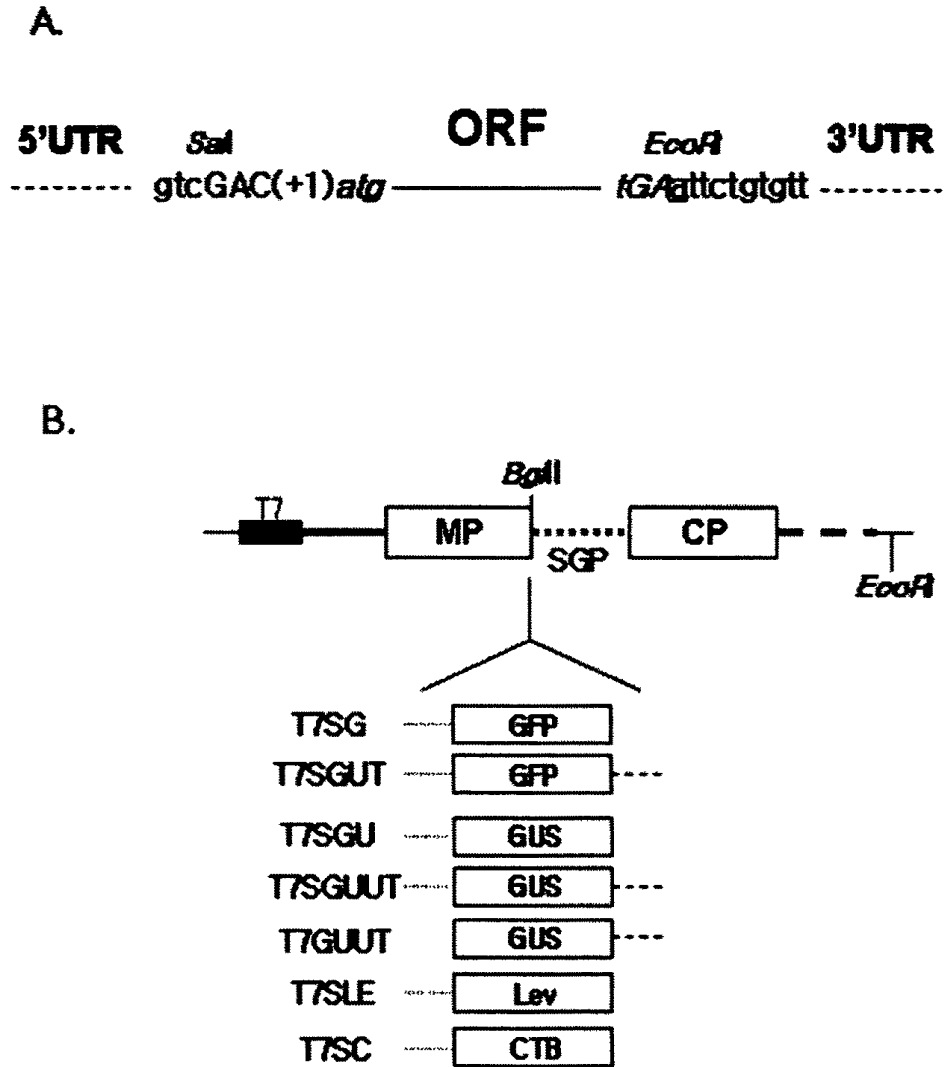


Figure 14

이러스의 subgenomic promoter 뒤에 이용하고자 하는 외래 유전자를 부착하

여 T7K3V2에 클로닝 하였다. 바이러스의 정상적인 작동을 위해서, 이동 단백질의 위치와 피복 단백질의 위치는 wild type RNA3와 동일하게 구성하였다. Figure 14의 A panel은 외래 유전자를 subgenomic promoter에 부착시키기 위해 고안해 낸 전략이다. 먼저 IR-BgS와 IR-SaAS (*SaII* restriction enzyme site를 포함하고 있는 primer)을 이용하여 subgenomic promoter를 PCR을 통해 획득한 후 클로닝 하였다. subgenomic promoter 3' end에 *SaII*를 부착한 이유는 비록 바이러스 sequence 내에는 없지만, 이 enzyme site의 5' end 쪽 3개의 nucleotide sequence가 바이러스의 부분과 동일하고 (GTC), 그리고, 사실상 오이 모자이크 바이러스의 피복 단백질이 subgenomic promoter에 있는 것보다 3개의 nucleotide를 더 가지는 결과가 되지만, sequence 상 피복 단백질의 start codon 앞쪽 3개 nucleotide의 sequence와 비교했을시 매우 유사한 특성을 보이므로, 이 restriction enzyme을 사용하였다. 또한, 외래 유전자 클로닝 시에 보다 용이하게 한다는 관점도 포함되어 있었다. Alfalfa mosaic virus에 대한 보고에 의하면, 이런 바이러스의 genome protein의 발현에 있어서 RNA3의 3' UTR region이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그래서, 본 연구진은 이러한 사항도 고려하기 위해 외래 유전자에 subgenomic promoter와 외래 유전자가 클로닝 되어 있는 cassette에 RNA3의 3' UTR을 삽입하였다. 이렇게 만들어진 여러 가지 cassette들은 *Bam*HI을 처리하여 바이러스 벡터 시작품에 삽입하였다. Figure 16은 이들 재조합 바이러스 RNA3가 모두 성공적으로 *in vitro* transcript로 만들어 졌음을 나타내고 있다. 이들 transcript들은 모두 담배 식물체에 감염 시켰고, 감염 후 2 주일 후에 관찰하였다.

감염 후 2 주일째 관찰한 결과, T7GUUT를 가지고 감염한 식물을 제외하고 나머지 식물체에서는 전형적인 오이 모자이크 바이러스 병징을 나타내었다. 이들 식물체 내에서 외래 유전자의 발현이 가능했는지 알아보기 위해 Northern blot analysis을 수행하였다. Figure 15는 이들 재조합 바이러스들을 감염시킨 식물체들의 Northern blot analysis 결과를 나타내고 있다. 결과에서 볼 수 있듯이, T7GUUT를 가지고 감염한 식물체만 제외하고, 모든 감염 식물체에서 오이 모자이크 바이러스 RNA가 검출되었다. 외래 유전자의 발현을 검정하기 위해 앞에서 수행했던 방법과 마찬가지로 외래 유전자들의 Open

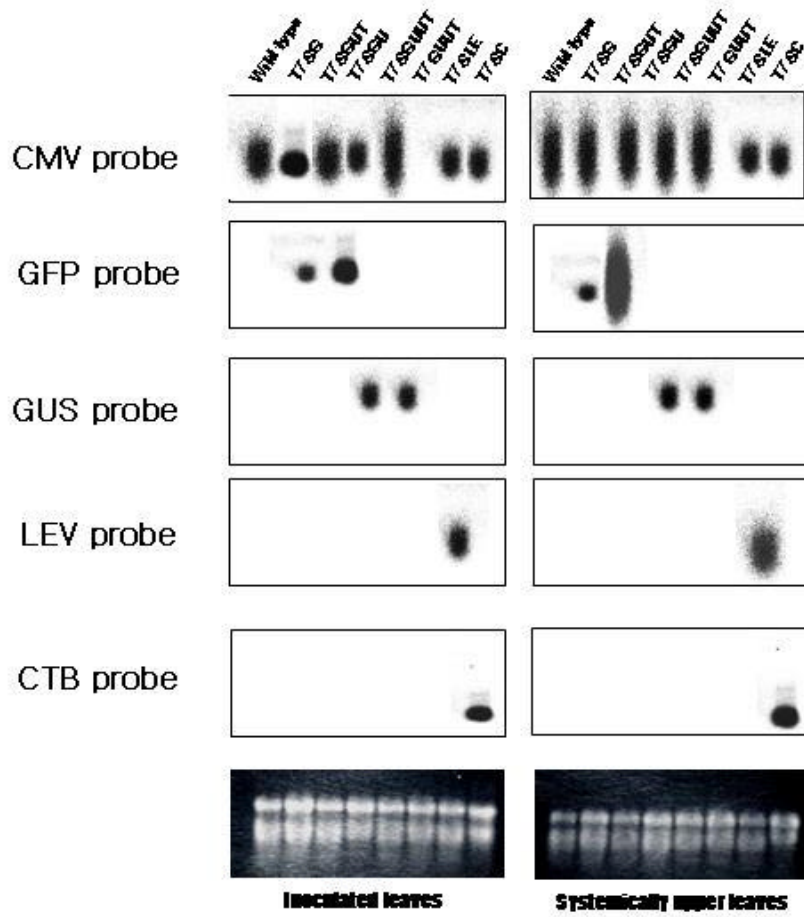


Figure 15

Reading Frame 을 이용하여 검정하였다. 그런 결과, 본 연구진이 사용한 방법

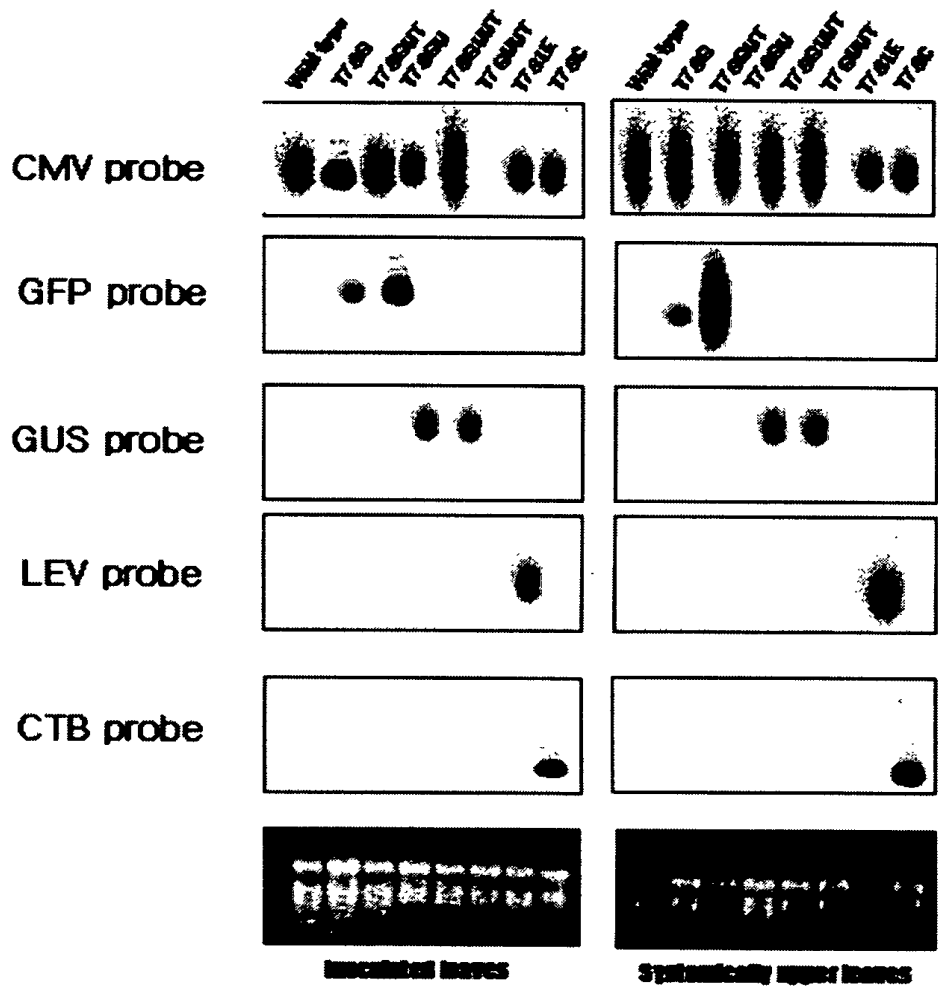


Figure 15

Reading Frame을 이용하여 검정하였다. 그런 결과, 본 연구진이 사용한 방법

에서는 모든 외래 유전자들의 발현을 관찰 할 수 있었다. T7GUUT의 경우, 본래 취지에 의하면 RNA3의 UTR 부분이 중요한 역할을 할 것이라 생각되었으나, 바이러스의 정상적인 작용이 일어나지 않는 것으로 보아, 클로닝된 GUS-3'UTR 부분이 *cis*-element로 작용하여 오히려 저해하는 것이 아닌가 추정하였다. 사실상 T7SGU나 T7SGUUT 재조합 바이러스 RNA3의 경우, 나머지 재조합 바이러스들의 RNA 발현을 검정해 본 결과 큰 차이를 보이고 있지 않았으므로, 바이러스의 genome protein의 발현은 subgenomic promoter가 중요한 역할을 한다는 것을 관찰하였다. Figure 17은 감염된 식물체의 형태를 나타내고 있다. 결과에서 보듯이, 육안으로 관찰하기에는 굉장히 미미한 병징을 전개하고 있는 것을 알 수 있었다. 오이 모자이크 바이러스 Kor strain의 경우 본래 굉장히 약한 병징을 나타내므로, 이런 결과는 어쩌면 당연한 것이라 할 수 있다. 또 바이러스 벡터가 매우 약한 병징을 나타낸다는 것은 이런 면을 이용하여 상업적인 응용도 가능할 수 있을 것이라 생각된다. Figure 17의 C panel의 경우, 본 연구진이 수행한 T7SGU 감염된 식물체 앞에서 GUS 발현을 관찰한 결과이다. Figure 17의 C panel 결과에서 알 수 있듯이 비록 약하기는 하지만, 접종된 앞에서 GUS의 발현을 나타내고 있다는 것을 관찰하였다. Figure 18은 이들 감염된 식물체에서의 ELISA test 결과이다. 이 결과에서도 마찬가지로 바이러스가 감염된 식물체 내에서 성공적으로 발현되고 있음을 알 수 있었다. 이들 결과를 종합해 보면, 본 연구진은 오이 모자이크 바이러스의 subgenomic promoter에 외래 유전자를 부착시킨 cassette를 RNA3에 삽입함으로써, 외래 유전자를 바이러스 시스템에서 발현시킬 수 있는 체계를 구축하였다. 또, 아직까지 오이 모자이크 바이러스가 속해있는 바이러스 group에서 이러한 결과를 보고한 바가 없으므로, 본 연구진은 이 바이러스 벡터 개발 연구를 통해 Bromoviridae에 속하는 바이러스 벡터의 개발 가능성을 제시하는 것으로 큰 성과를 올렸다 생각된다.

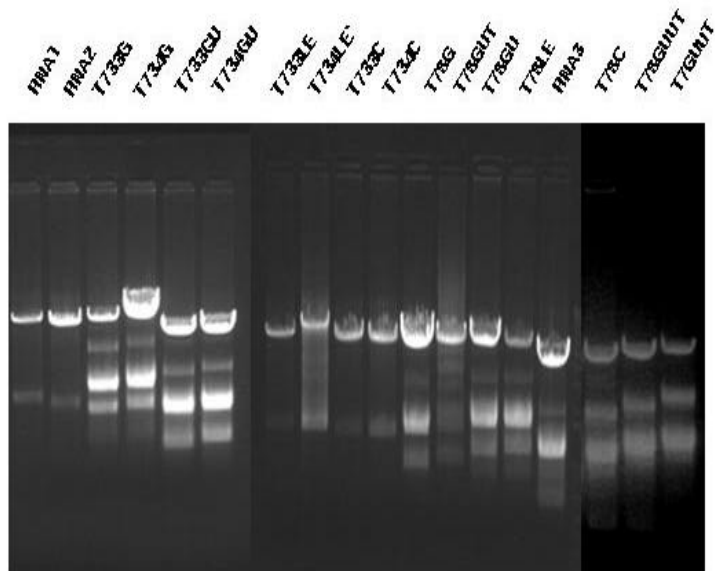


Figure 16

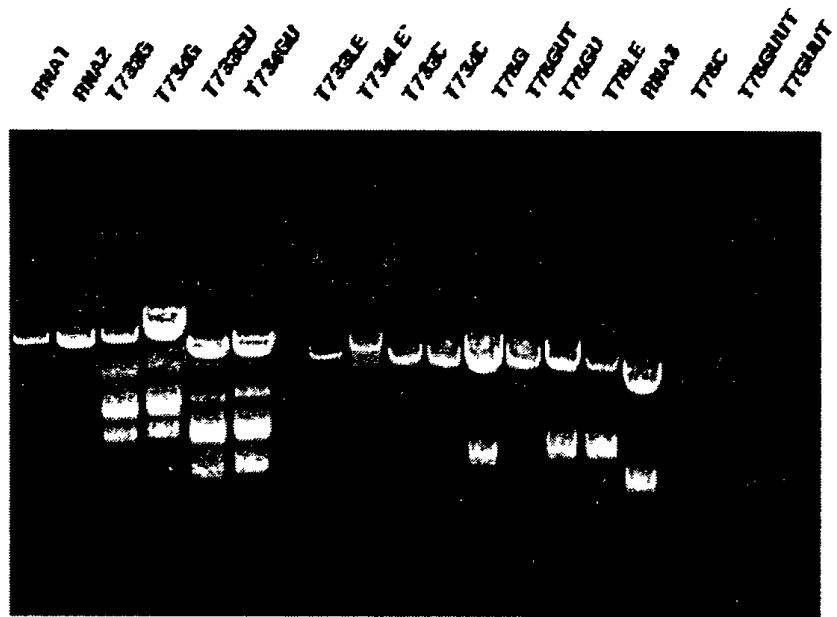
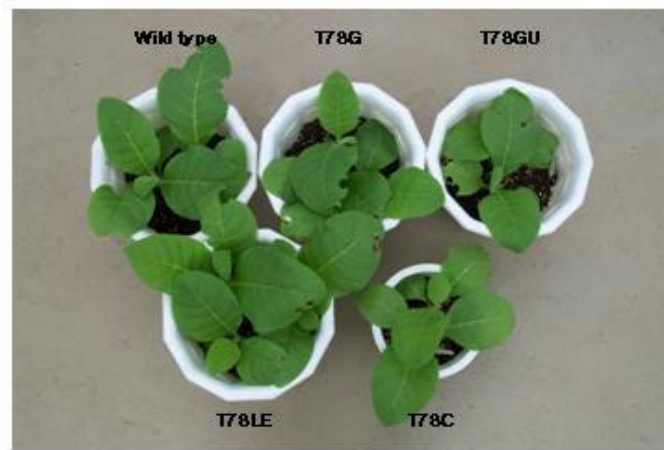


Figure 16

A.



B.



C.

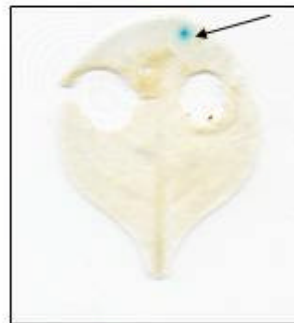
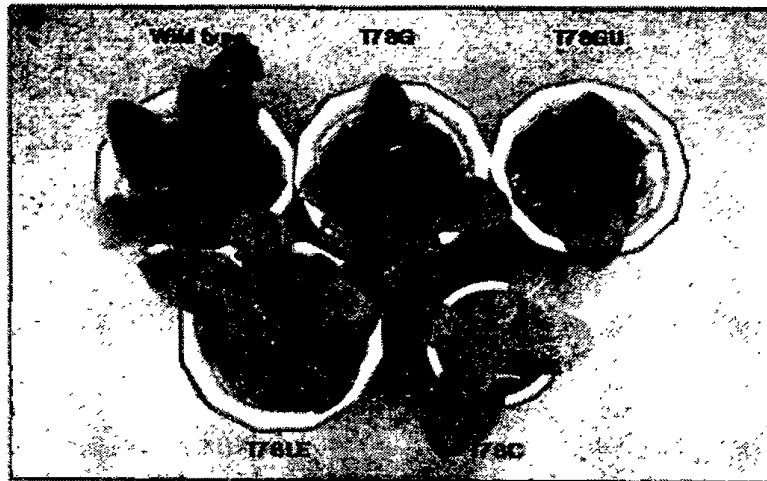


Figure 17

A.



B.



C.

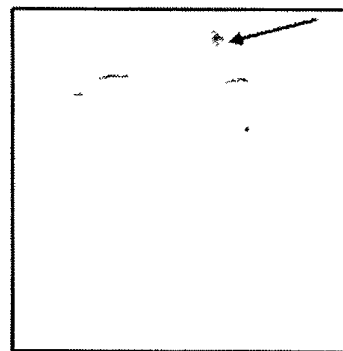
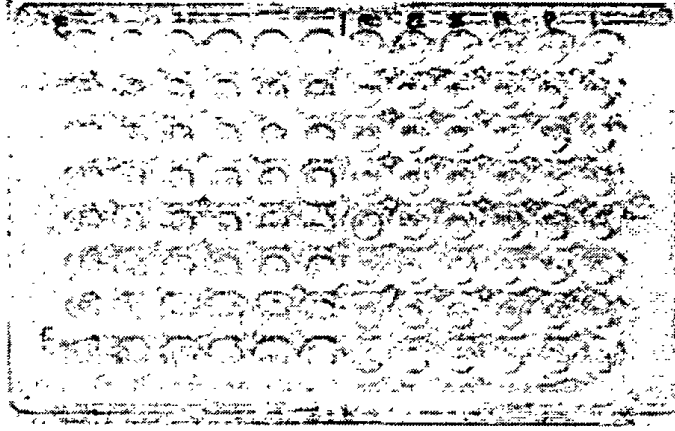


Figure 17

A.



B.

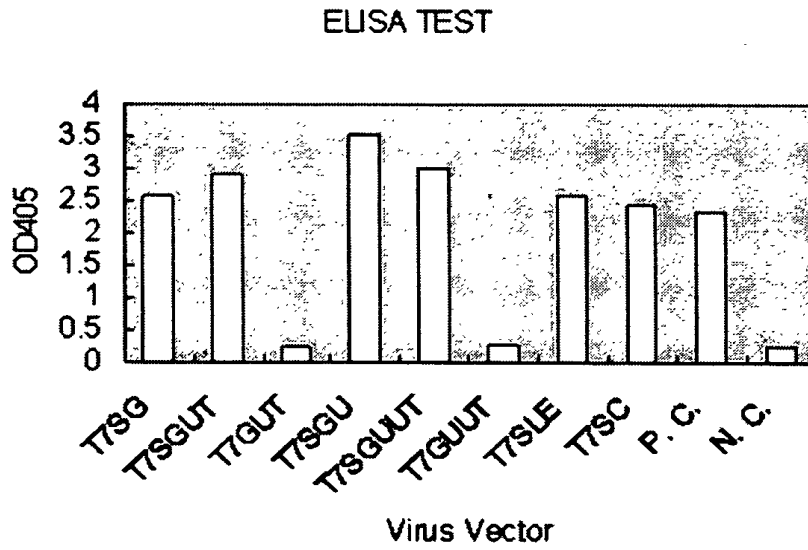


Figure 18

제 5 장 참 고 문 헌

- Baulcombe, D. C., and English, J. J. (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:173-180
- Brunger, A. T., Leahy, D. J., Hynes, T. R., and Fox, R. O. (1991) *J. Mol. Biol.* 221:239
- Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D. (1992) *The Plant J.* 2:549-557
- Ebskamp, M. J. M., Pilon-Smits, E. A. H., Weisbeek P. J., and Smeekens, J. C. M. (1994) 4th International Congress of Plant Molecular Biology; Abstract #1391
- Fischer, A. J., and Johnson, J. E. (1993) *Nature* 361:176-179
- Han, K. W., and Paek, K. H. (1992) *Kor J Plant Tissue Cul* 19:159-165
- Harrison, S. C. (1996) *Virology Vol 1*, Ed. by B.N. Fields and D.M. Knipe, pp59-99. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers
- Hogle, J. M., Chow, M. and Filman, D. J. (1985) *Science* 229:1358-1365
- Hohn; T., and Goldbach, R. (1994) *Vectors: plant viruses in Encyclopedia of Virology*, San Diego: Academic pp1536-43
- Jun, S. I., Kwon, S. Y., Paek, K. H., and Paek, K.-H. (1995) *Plant Cell Reports* 14:620-625
- Kim, S. J., Cho, H. S., You, J. S., Kwon, S. Y., Park, E. K., and Paek, K.-H. (1996) *Mol. Cells* 6:190-196
- Kim, S. J. Kim, B. D. and Paek, K. H. (1996) *Mol. Cells* 5:65-71
- Kim, S. J., Lee, S. J., Kim, B. D. and Paek, K. H. (1997) *Plant Cell Reports* 16:825-830
- Kim, S. J., Kim, B. D., and Paek, K. H. (1995) *J Amer Soc Hort Sci* 120:353-359
- Kumagai, M. H.: 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract #300
- Kwon, C. S., Chung, W. I., and Paek, K.-H. (1997) *Mol. Cells* 7:326-334

- Kwon, C. S., Paek, K. H. and Chung, W. I. (1996) *J. Plant Biol* 39:265-271
- Kwon, C. S., Paek, K.-H., and Chung, W. I. (1998) *FEBS Letters* 422:89-93
- Kwon, S. K., Kim, S. J., Hong, H. J., Han, M. H., Chung, C. H., Lee, H. S., and Paek, K.-H. (1994) *Kor J Plant Tissue Cul* 21:353-356
- Lee, S. J., Kim, B. D. and Paek, K. H. (1994) *Mol Cells* 4:67-71
- Lee, S. J., Kim, S. J., Kim, B. D., and Paek, K. H. (1993) *Kor J Plant Tissue Cul* 20:289-294
- Mason, H. S., Lam, D. M.-K., and Arntzen, C. J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11745-11749
- Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K., and Arntzen, C. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5335-5340
- Olson, N. H., Kolatkar, P. R., Oliveira, M. A., Cheng, R. H., Greve, J. M., McClelland, A., Baker, T. S., and Rossmann, M. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:507-511
- Paek, K.-H. and Han, K. W. (1991) *Mol Cells* 1:295-300
- Paek, K.-H. (1991) *Kor J Plant Tissue Cul* 18:47-54
- Pilon-Smits, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., and Smeekens, J. C. M (1994) 4th International Congress of Plant Molecular Biology; Abstract #1392
- Pollock, J., and Cairns, M. (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:77-101
- Rober, M., Geider, K., and Willmitzer(1994) 4th International Congress of Plant Molecular Biology; Abstract #1390
- Yusibov. V., Modelska, A., Steplewski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D., Hooper, D. C., and Koprowski, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5784-5788
- 송기방; 1994년도 건국대학교 농화학과 박사학위논문