Journal of Bacteriology and Virology 2011. Vol. 41, No. 2 p.109 – 116
DOI 10.4167/jbv.2011.41.2.109

Original Article

A Sequence in Coat Protein Open Reading Frame Is Required for Turnip Yellow Mosaic Virus Replication

Hyun-Il Shin and Tae-Ju Cho*

Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Turnip yellow mosaic virus (TYMV) is a spherical plant virus that has a single 6.3 kb positive strand RNA genome. Information for TYMV replication is limited, except that the 3'-terminal sequence and 5'-untranslated region are required for genome replication. When a foreign sequence was inserted at the position upstream of the coat protein (CP) open reading frame (ORF), replication of the recombinant TYMV was comparable to wild type, as long as an RNAi suppressor was provided. In contrast, when the foreign sequence was inserted between the CP ORF and the 3'-terminal tRNA-like structure, replication of the recombinant virus was not detected. This result suggests that the CP ORF contains an essential replication element which should be appropriately spaced with respect to the 3'-end. Analysis of TYMV constructs containing a part or a full additional CP ORF indicates that the 3' quarter of the CP ORF is required for TYMV replication.

Key Words: TYMV, Replication element, Positive strand RNA virus

서 론

Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV)는 *Tymovirus* 속 (genus) 바이러스의 일종이며, alphavirus-like superfamily의 양성가닥(positive strand) RNA 바이러스이다. 비리온 (virion)은 20 kDa 크기의 한 가지 coat 단백질이 180개 (hexameric subunit 20개와 pentameric subunit 12개)가 모여 구성되며 지름이 28 nm인 T=3 정이십면체로 외피 (envelope)를 갖지 않는다. Genomic RNA는 단일 RNA로 크기는 6.3 kb이며, 5' 말단에 cap 구조를 갖고, 3' 말단에는 82 nucleotide 길이의 tRNA-like structure (TLS)를 갖는다. Genome은 C 염기가 많으며 G 염기가 적다(C: 39%, G: 17%) (1).

TYMV의 genomic RNA (gRNA)에서는 p206과 p69 단백질이 만들어진다. 두 단백질의 reading frame은 4개의 염기 차이를 두고 중첩된다. p206은 stop codon의 read-through에 의해 coat 단백질(protein) (CP)의 open reading frame (ORF)까지 포함하는 p221이 만들어질 수 있다. p206 단백질은 genome 복제를 위해 필요한 단백질로 자신의 protease 활성에 의해 잘려 p141과 p66으로 나뉘어진다 (1). p141 단백질은 methyltransferase-like domain, protease domain, NTPase/helicase-like domain을 포함하고 있으며, p66은 RNA-dependent RNA polymerase (replicase) domain을 갖는다. gRNA에서 만들어지는 또 다른 단백질인 p69는 movement 단백질이면서 유전자 silencing suppressor로도 작용한다 (2~4). 바이러스의 coat 단백질은 subgenomic RNA (sgRNA)에서 만들어진다 (1).

양성가닥 RNA 바이러스의 genome 복제는 음성가닥 (negative strand) RNA를 매개로 이루어진다. 양성가닥 RNA 바이러스가 genome을 성공적으로 복제하려면 식물 세포 내에서 숙주 세포의 RNA와 바이러스의 RNA를 식별하고, 음성과 양성가닥의 전사(transcription)가 시작되는 데 필요한 sequence를 찾아내는 것이 필요하다. TYMV의 경우 3'-TLS와 5'-untranslated region (5'-UTR)이 TYMV 복제에 필요하다는 것 이외에는 아직 잘 밝혀지지 않았다.

Received: December 20, 2010/ Revised: March 9, 2011
Accepted: March 16, 2011
*Corresponding author: Tae-Ju Cho. Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea.
Phone: +82-43-261-2309, Fax: +82-43-267-2306
e-mail: tjcho@chungbuk.ac.kr
**This study was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2009.

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer name	Sequence*
TY(+)6209	5'-CGAGAATTC AGGCCTAAGTTCTCGATC-3'
TY(+)6186	5'-CGAGAATTC AGGCCTTCCGCTCATCACGGACACTTCCACCT-3'
TY(+)6139	5'-CGAGAATTC AGGCCTGCATCGACCTGCATAATAACTGTAT-3'
TY(+)6059	5'-CGAGAATTC AGGCCTCCCGGGTCAAAGATTCGATTCAGT-3'
TY(+)5625	5'-CGAGAATTC AGGCCTAATAGCAATCAGCCCCAACAT-3'
HDV-R29	5'-GGAGAATTC TCTAGATGGCTCTCCCTTAG-3'

*Restriction enzyme sites are underlined: *Eco*RI (GAATTC), *Stu*I (AGGCCT), and *Xba*I (TCTAGA)

TYMV genome의 3'-말단에 있는 TLS는 *Tymovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Hordeivirus*, *Tobravirus*에서 발견되는 큰 특징으로 바이러스를 연구하는 학자들의 큰 관심거리가 되었는데, TLS는 실제 tRNA처럼 행동하는 것으로 알려져 있다 (5). TYMV의 경우, 3'-말단 sequence는 -ACC인데 세포 내 tRNA처럼 3'-말단에 A가 첨가되며, valyl-tRNA synthetase가 작용하여 실제 3'-말단에 valine이 첨가될 수 있다 (6). 또한, TLS가 번역 (translation) 증진작용도 하는 것으로 보고되었다 (7).

TLS는 복제 과정에서도 필요한 것으로 알려졌다. Brome mosaic virus (BMV)의 경우, 정제된 replicase를 사용한 *in vitro* 실험을 통해 밝혀진 바에 의하면, TLS가 포함된 134 nucleotide 길이의 sequence가 BMV RNA 복제에 꼭 필요한 것으로 나타났다 (8). TYMV의 replicase를 사용한 *in vitro* 실험에서도 TLS가 TYMV RNA 복제의 효율성을 높이는 작용을 하며 그 중 3'-말단의 CCA가 필수적인 요소인 것으로 보고되었다 (1, 9). TYMV의 복제에 필요한 것으로 확인된 다른 요소로는 5'-UTR이 있다. 5'-UTR에는 두 개의 hairpin이 존재하는데, 이 두 hairpin을 모두 제거하였을 경우에 wild type에 비해 1/100로 복제가 감소되어 두 hairpin이 TYMV 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (10). 또한, 5'-UTR의 hairpin 앞쪽 12개의 염기를 다른 염기로 바꾸거나 제거하였을 때도 각각 1/100과 1/1,000로 감소하여 이 또한 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 (11).

최근 본 연구실에서는 TYMV에 외래 유전자를 삽입하고 그 복제를 조사한 바 있는데, TYMV genome의 pol domain과 CP ORF 사이에 eGFP 또는 GUS 유전자를 삽입한 재조합 TYMV의 경우 복제에 큰 영향이 없는 것으로 나타났으나 (12), 그 후속 연구로 CP ORF 뒤쪽에 외래 유전자를 삽입한 경우 복제가 거의 일어나지 않음을 발견하였다. 그 이유를 조사하는 과정에서 복제에 필수적인 sequence element가 CP ORF에 존재한다는 것을 알게 되어 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

DNA construct

TY^{W}, $TY\text{-}V^{2tymo}$, TY-eGFP, TY-GUS는 이전 연구에서 제작한 것을 사용하였다 (12). 이들 construct의 3'-말단에는 hepatitis delta virus (HDV)의 ribozyme sequence가 존재한다. TY-eGFP2+CP_{6203}은 TY^{W}의 *Sma*I과 *Xba*I 사이의 sequence를 *Spe*I을 비롯한 다른 제한효소 site를 삽입한 합성 DNA로 교체한 후 enhanced green fluorescent protein (eGFP) 유전자를 삽입하여 만들었다. TY-eGFP2+CP_{6209}는 forward primer TY(+)6209와 reverse primer HDV-R29를 이용하여 nt-6209부터 HDV까지를 PCR하고, TY-eGFP2+CP_{6203}의 *Eco*RI과 *Xba*I 사이의 DNA와 교체하여 제작하였다. 이와 마찬가지로 TY-eGFP2+CP_{6186}, TY-eGFP2+CP_{6139}, TY-eGFP2+CP_{6059}, TY-eGFP2+CP_{5625}는 forward primer로 각각 TY(+)6186, TY(+)6139, TY(+)6059, TY(+)5625를 사용하고 reverse primer로 HDV-R29를 사용하여 TY-eGFP2+CP_{6209}와 같은 방법으로 제작하였다. 이들 primer의 sequence는 Table 1에 나타내었다.

Agroinfiltration과 바이러스 RNA 분석

*Nicotiana benthamiana*와 배추는 growth chamber에서 빛 조건은 낮 16시간/밤 8시간으로, 그리고 온도는 낮 21℃/밤 19℃로 맞춰 키웠다. *Agrobacterium* tumefaciens를 이용한 agroinfiltration과 바이러스 RNA 분석은 Cho와 Dreher

의 방법 (13)에 따라 수행하였다. 야생형(wild-type) TYMV construct (TY^W)뿐 아니라 재조합(recombinant) TYMV construct를 식물에 접종할 때는 p19 유전자 construct를 함께 섞어서 접종하였다. p19는 Tomato bushy stunt virus의 RNA silencing suppressor이다 (14).

잎에서 total RNA를 추출하기 위해 액체질소로 미리 차갑게 해둔 막자와 막자사발에 액체질소와 잎 시료 0.1 g을 함께 넣고 신속하게 갈아 분말로 만들었다. 곱게 간 분말을 차갑게 해둔 Eppendorf tube에 담고 Easy-Red (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA 1 μg에 DEPC-treated SDW (0.1% DEPC 처리한 3차 증류수를 멸균한 것)를 첨가하여 7.5 μl로 만들고, FDE (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue (BPB) & xylene cyanol dye) 용액 7.5 μl와 잘 섞은 뒤 70℃에서 10분간 배양하였다. 1% agarose gel에서 1시간 20분간 전기영동하고 20× SSC를 이용하여 RNA를 Hybond N^+ membrane (GE healthcare, Chalfont St Giles, England)으로 옮기고 TYMV CP DNA에 digoxigenin (DIG)을 붙인 probe를 사용하여 hybridization 하였다. Probe가 붙은 RNA는 DIG chemiluminescent immunodetection (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland) 방식으로 확인하였다.

Coat protein (CP) 발현 분석

CP 발현 수준은 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행하고 Western blot으로 분석하였다. 잎 시료 0.1 g을 2× sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 10 g/ml BPB)와 함께 갈아 1.5 ml Eppendorf tube에 담아 5분간 끓인 후, 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 담아 바로 분석하거나 -20℃에서 보관하였다. Western blot detection은 anti-TYMV rabbit antiserum과 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-rabbit IgG를 처리하여 chemiluminescent immunodetection 방식인 Luminata™ Forte (Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 수행하였다.

결 과

외래 유전자 삽입위치가 TYMV 복제에 미치는 영향

이전 연구에서 TYMV genome을 일부 변형시킨 TYMV 발현벡터를 개발한 바 있다 (12). TY-V^{2tymo}라 명명한 이 발현벡터(Fig. 1)는 sgRNA promoter로 알려진 tymobox와 multiple cloning site를 pol domain과 CP ORF 사이에 삽입하여 제작한 것이다. TY-V^{2tymo}의 *Eco*RI과 *Spe*I 사이에 eGFP 유전자를 삽입하여 만든 TY-eGFP처럼 TYMV에 외부 유전자를 삽입한 재조합 TYMV의 경우 복제가 감소하였다. 따라서 모든 TYMV 재조합체를 *N. benthamiana*나 배추에 접종할 때에는 RNAi suppressor인 p19과 함께 주입하였다. TY-eGFP의 복제는 p19을 같이 발현시킬 경우 TY^W와 비슷한 수준으로 복제가 되는 것으로 나타났다. 하지만, 단백질 수준에서는 eGFP가 CP에 비해 훨씬 적게 생산되었다 (12).

eGFP 단백질의 발현 수준을 높일 수 있는 방법을 타진하기 위하여 eGFP 유전자와 CP ORF의 위치를 바꾸어 CP ORF와 3'-TLS 사이에 eGFP 유전자가 삽입된 construct를 제작하여 TY-eGFP2라 명명하였다(Fig. 1). TY-eGFP2 재조합체는 TY-eGFP2+CP_{6203}과 TY-eGFP2+CP_{6209} 두 가지를 제작하였는데 eGFP 유전자 바로 뒤에 wild type의 nt-6203과 nt-6209의 염기가 각각 연결된 것이다. TYMV의 3'-TLS 바로 앞쪽에는 nt-6211부터 upstream pseudoknot (UPSK)이 존재하는데, UPSK는 3'-TLS와 함께 상호작용하여 TYMV RNA 번역을 증가시키는 역할을 하는 것으로 보고된 것이다 (7). 따라서 UPSK sequence가 포함되도록 nt-6203 또는 nt-6209 염기부터 삽입된 두 재조합체를 제작한 것이다. 재조합 TYMV는 *Agrobaterium*-mediated T-DNA transfer system인 agroinfiltration 방법으로 *N. benthamiana*에 접종하여 분석하였다.

TY-eGFP와 TY-eGFP2를 *N. benthamiana* 잎에 접종하고 7일 후에 잎에서 추출한 total RNA를 1% agarose gel에서 크기에 따라 분리하였고(Fig. 2A), CP ORF DNA에 DIG을 붙인 probe를 사용하여 Northern blot 방법으로 분석하였다. 그 결과 pol domain과 CP ORF 사이에 eGFP 유전자를 삽입한 재조합체인 TY-eGFP는 이전 결과와 마찬가지로 TY^W와 비슷한 수준으로 복제되는 것으로 나타났다(Fig. 2B). TY-eGFP가 정상적으로 복제되면 두 개의 sgRNA가 만들어진다. 하나는 TY^W와 마찬가지로 CP ORF만 포함된 sgRNA가 만들어지고, 다른 하나는 eGFP 유전자와 CP ORF가 함께 존재하는 sgRNA가 만들어지게 된다. TY-eGFP2에서는 eGFP 유전자만 포함된 sgRNA와 CP ORF와 eGFP 유전자가 함께 존재하는 sgRNA가 만들어질 것으로 예상하였다. 그러나 TY-eGFP와는 달리, CP

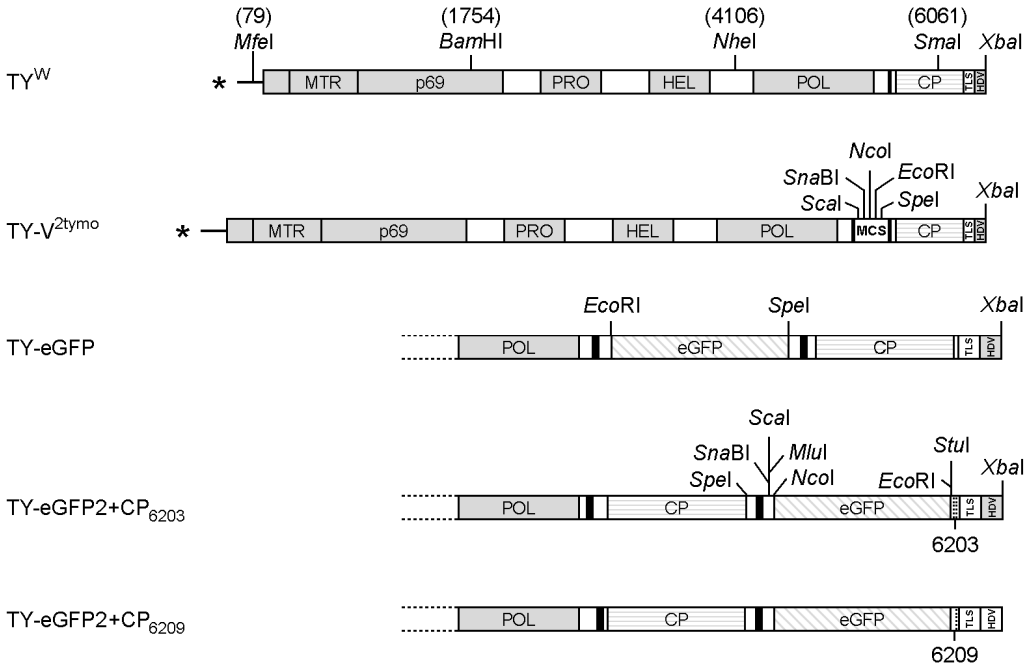

Figure 1. Recombinant TYMV constructs. TY^W represents a wild type genome. $TY\text{-}V^{2tymo}$ is an expression vector where an extra tymobox and a multiple cloning site were inserted between the pol domain and the coat protein (CP) ORF. The gene encoding an enhanced green fluorescent protein (eGFP) was cloned into the $TY\text{-}V^{2tymo}$, yielding TY-eGFP. In the TY-eGFP construct, the eGFP gene is expressed as a bigger sgRNA. TY-eGFP2 constructs were designed to have the eGFP gene between the CP ORF and the 3'-terminal TLS. The eGFP gene here is expressed as a smaller sgRNA. In the TY-eGFP2+CP_{6203} and TY-eGFP2+CP_{6209} constructs, the TYMV sequence downstream of the eGFP gene begins with the nucleotide at nt-6203 and nt-6209 of the wild type, respectively. All these constructs have a 3'-terminal ribozyme sequence derived from hepatitis delta virus (HDV).

ORF와 3'-TLS 사이에 eGFP 유전자를 삽입한 TY-eGFP2 (+CP_{6203}과 +CP_{6209})의 경우 예상되는 RNA band를 관찰할 수 없었다(Fig. 2B). sgRNA는 복제가 일어나야만 생성되며, 그에 따라 CP 단백질도 복제가 일어나야만 만들어지는데, Western blot 분석방법으로 CP 단백질 발현을 조사한 결과에서도 TY-eGFP2의 경우에는 CP 단백질을 관찰할 수 없어 TY-eGFP2 복제는 일어나지 않았음을 재확인할 수 있었다(Fig. 2C).

TY-eGFP2가 복제되지 않는 것이 비기주 식물인 *N. benthamiana*에서만 그런 것인지 알아보기 위해 기주 식물인 배추에도 접종하여 분석하였다. 또한, eGFP 유전자보다 약 1 kb 정도 더 큰 β-glucuronidase (GUS)를 삽입한 TY-GUS와 TY-GUS2 (+CP_{6203}과 +CP_{6209})도 제작하여 시험해 보았다(Fig. 3A). Total RNA를 Northern blot으로 분석한 결과, TY-GUS의 복제는 다소 약하게 나타났지만 TY-eGFP와 TY-GUS 모두 *N. benthamiana*에서와 같이 복제가 일어났다(Fig. 3B). TY-GUS의 복제가 약하게 나타난 이유는 삽입된 GUS 유전자의 RNA 2차 구조가 TYMV의 복제를 방해하였거나 RNAi를 더 심하게 유발하였기 때문일 것이라 추측된다. TY-eGFP, TY-GUS와 달리, TY-eGFP2와 TY-GUS2는 *N. benthamiana*에서와 마찬가지로 복제를 확인할 수 없었는데(Fig. 3B), 이러한 결과로 보아 TY-eGFP2와 TY-GUS2가 복제되지 않는 것은 접종한 식물의 영향이 아닌 재조합체의 영향 때문인 것으로 생각할 수 있다.

TY-eGFP2의 3'-말단부에 CP ORF sequence 삽입으로 인한 복제 회복

TY-eGFP와 TY-eGFP2, 두 재조합체의 차이는 eGFP 유전자를 삽입한 위치가 다른 것이다. 즉, TY-eGFP는 eGFP 유전자를 pol domain과 CP ORF 사이에 삽입한 것이고, TY-eGFP2는 CP ORF와 3'-TLS 사이에 삽입한 것이다. 이것은 TY-eGFP2에서 eGFP 유전자가 CP ORF와 3'-TLS 사이에 삽입되면서 TYMV 복제 과정에 영향을 주었음을 보여주는 것이다. 만약 CP ORF에 복제에 필요한 *cis*-acting element가 존재하고, 그것이 3'-말단과 가까이 있어

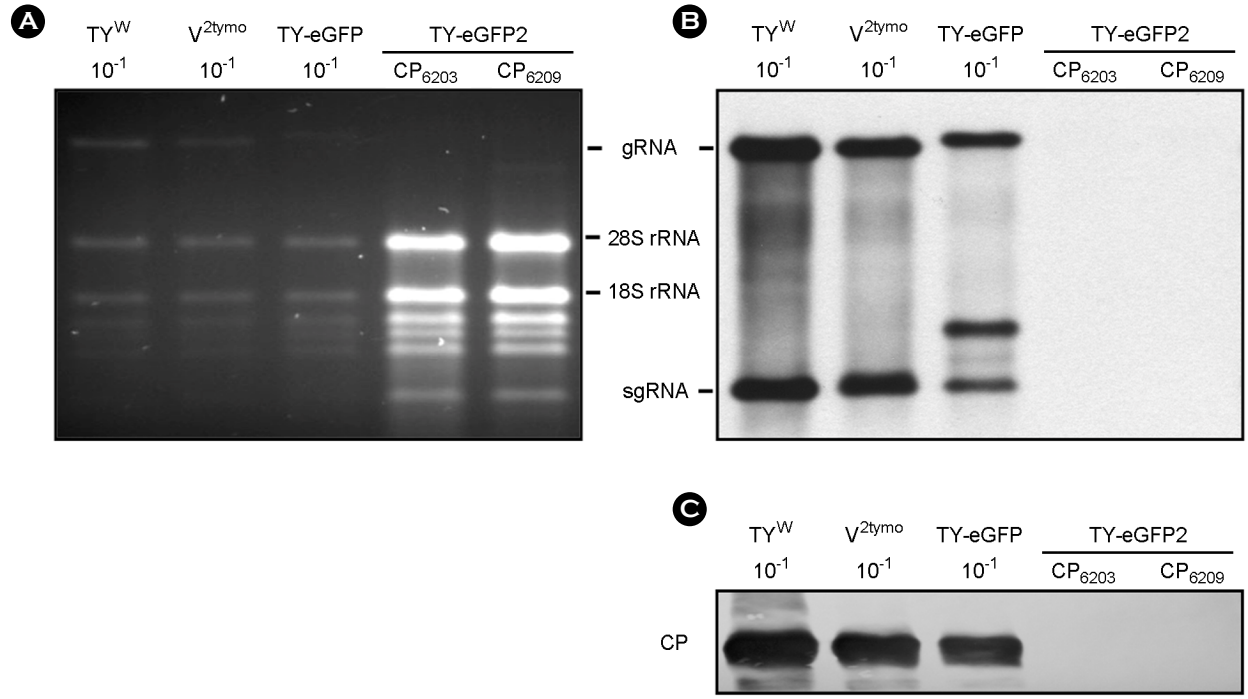

Figure 2. Replication of TY-eGFP and TY-eGFP2 in *N. benthamiana*. Seven days after agroinfiltration of *N. benthamiana* leaf with various TYMV constructs, total RNA was extracted from the leaf. 1 μg or 0.1 μg (10^{-1}) of total RNA was size-fractionated in the 1% agarose gel **(A)** and examined by Northern blot analysis **(B)**, using the DIG-labeled probe representing the CP ORF. **(C)** Western analysis of coat protein expression. 1:10 diluted (10^{-1}) or undiluted leaf extract was loaded and electrophoresed in 12.5% SDS-polyacrylamide gel. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Coat protein was detected using anti-TYMV coat protein rabbit antibody and anti-rabbit HRP conjugate. The membrane was developed by a Luminata™ Forte (Millipore) using luminol as the substrate. The results of the Northern and Western analyses show that the replication of the TY-eGFP2 is impaired, in contrast to the TY-eGFP.

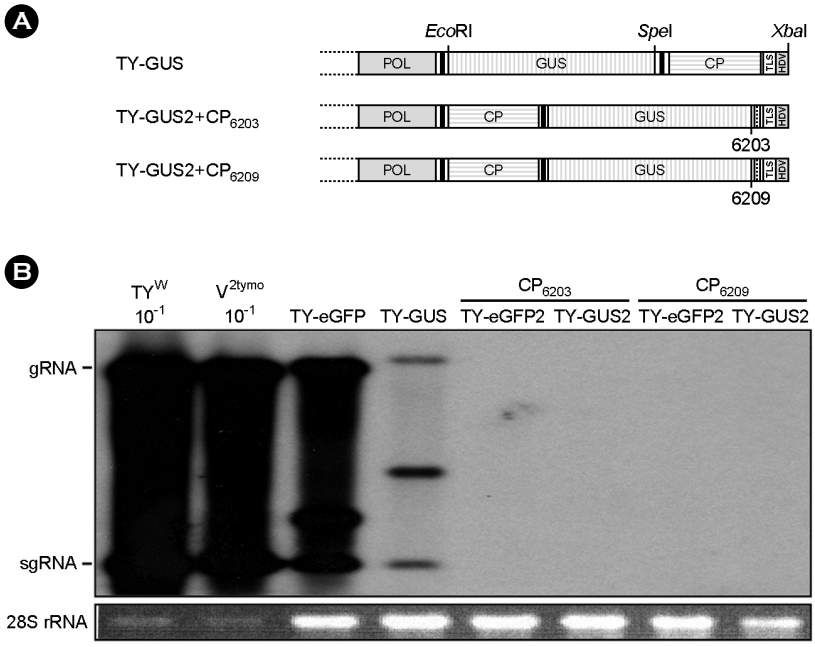

Figure 3. Replication of recombinant TYMV constructs in Chinese cabbage. (A) TY-GUS and TY-GUS2 constructs. **(B)** Analysis of recombinant TYMV replication. TY-eGFP, TY-eGFP2, TY-GUS, and TY-GUS2 constructs were inoculated into Chinese cabbage. Northern blot analysis was done as described in Figure 2. The results show that the recombinant TYMV constructs do not replicate well either in the natural host when they have an extra sequence between the CP ORF and the 3'-TLS.

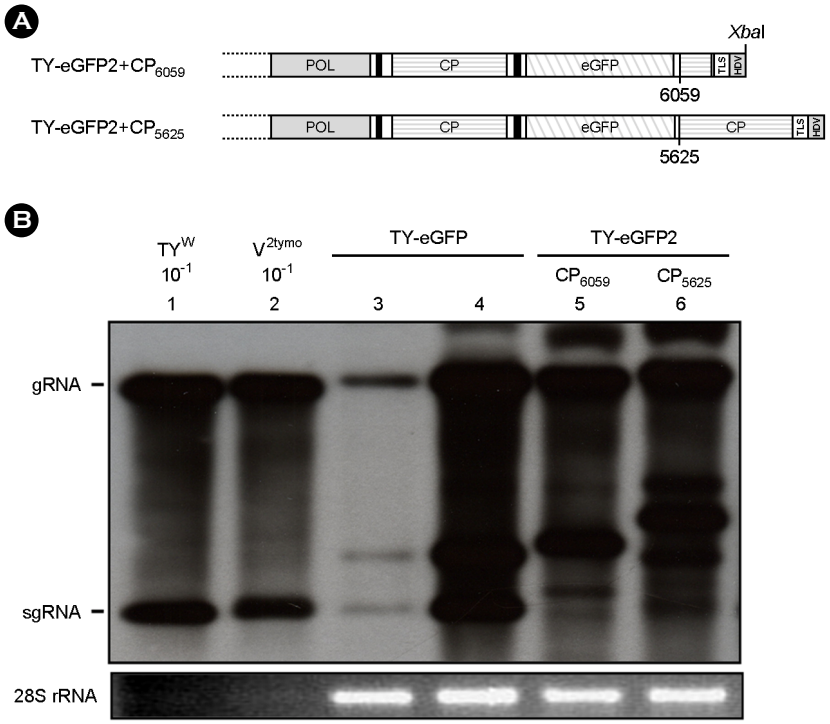

Figure 4. Replication of TY-eGFP2 constructs with an additional CP ORF sequence. (A) TY-eGFP2+CP_{6059} and TY-eGFP2+CP_{5625} constructs. TY-eGFP2+CP_{6059} contains an additional 3'-quarter of the CP ORF at the downstream of the eGFP. TY-eGFP2+CP_{5625} has a whole additional CP ORF sequence after the eGFP. **(B)** Northern analysis of the recombinant TYMV replication. All agroinfiltrations included expression of the p19 RNAi suppressor except for the inoculation represented by lane 3. Northern analysis was done as described in Figure 2. The results shown here indicate that a sequence element essential for TYMV replication resides in the 3'-quarter of the CP ORF.

야 한다면 이러한 결과를 설명할 수 있을 것이며, 이 경우 TY-eGFP2에서 eGFP 유전자 바로 다음에 CP ORF를 다시 삽입하면 복제가 회복될 수 있을 것이다. 이러한 가정하에 TY-eGFP2의 eGFP ORF와 3'-TLS 사이에 CP ORF의 염기 서열을 재삽입하였을 때 복제에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 두 가지 construct를 제작하였다. 하나는 CP ORF의 3'-말단 쪽 1/4 정도의 sequence, 즉 nt-6059부터 삽입된 TY-eGFP2+CP_{6059}이고, 또 다른 하나는 CP ORF의 시작점인 nt-5625부터 삽입된 TY-eGFP2+CP_{5625}이다(Fig. 4A).

Northern blot hybridization의 결과는 Fig. 4B에 보인 바와 같다. CP ORF의 3'-말단 쪽 1/4을 삽입하였을 때(TY-eGFP2+CP_{6059}) 그 복제는 TY-eGFP와 비슷한 수준으로 회복되었다(Fig. 4B, lane 4와 5). TY-eGFP2+CP_{6059}의 sgRNA 중 크기가 작은 sgRNA의 band 가 약하게 나타난 것은 sgRNA의 양이 적어서가 아니고, Northern blot 분석에 CP ORF를 probe로 사용하였고 크기가 작은 sgRNA는 CP ORF를 1/4만 포함하고 있어 probe와의 hybridization이 덜 일어나기 때문이다. TY-eGFP2+CP_{6059}는 CP ORF 전체를 넣은 TY-eGFP2+CP_{5625}와도 비슷한 수준으로 복제가 회복되었다(Fig. 4B, lane 6). 이러한 결과로 볼 때, nt-6059에서 nt-6202 사이에 존재하는 염기 서열이 복제에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. Lane 3은 RNAi suppressor인 p19를 함께 접종하지 않았을 때의 결과로 복제가 크게 감소함을 보여주고 있는데, 이 결과는 RNAi suppressor인 p19의 중요성을 보여주고 있다.

고 찰

TY-eGFP2+CP_{6203}이나 TY-eGFP2+CP_{6209}의 경우 eGFP 유전자 앞쪽에 CP ORF가 존재함에도 불구하고 복제가 되지 않으며, 3'-TLS 바로 앞에 CP ORF의 3'-말단 sequence를 일부 재삽입해야만 복제가 회복되는 것으로 보아 TYMV gRNA의 3'말단 부분과 CP ORF sequence 사이의 거리가 중요하다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 사실은 TYMV CP ORF의 3'-말단부에 복제에 중요한 sequence 즉 replication element가 존재하며, 그 replication element와 3'-말단 사이의 어떤 상호작용이 복제에 매우 중요한 것임을 시사하는 것이라 생각된다. TYMV CP ORF에 있는 replication element가 어떤 것이며 실제 어떤 상호작용이 있는지 등은 앞으로 밝혀야 할 과제가 될 것이다.

Replication element 연구는 양성가닥 RNA 바이러스인 Tomato bushy stunt virus (TBSV)에서 많은 연구가 진행되

었다. TBSV 복제 과정에서 TBSV genome으로부터 작은 바이러스 replicon인 defective interfering (DI) RNA가 생성되기도 하는데 TBSV DI RNA는 TBSV genome이 불연속적 단편으로 region I (R_I)부터 region IV (R_{IV})까지 존재한다 (15). R_I과 R_{IV}는 각각 TBSV genome의 5'-말단부와 3'-말단부에 존재하고, R_{II}와 R_{III}는 말단이 아닌 내부에 존재하는데, intraregional RNA-RNA 뿐 아니라 interregional RNA-RNA 상호작용이 복제에 영향을 미치는 것으로 알려졌다 (16). 음성가닥 RNA 합성의 promoter 역할을 하는 R_{IV}에는 stem-loop (SL) 구조가 세 개가 있는데, 3'-말단부터 SL1, SL2, SL3이다. 그 중 SL1의 3'-말단부에 있는 5개의 염기가 SL3의 side-bulge 부위의 염기와 상보적인 염기 서열을 갖고 있어서 두 부분이 상호작용을 통해 음성가닥 RNA 합성을 억제하는 역할을 하는 것으로 생각되는데, 실제 이 상호작용이 일어나지 않게 하였을 때 음성가닥 RNA 합성이 증가된다 (17).

TBSV genome의 5'-UTR에 해당하는 R_I에는 5'-proximal T-shaped domain (TSD)과 이로부터 100 bp 정도 떨어진 곳에 위치하는 3'-proximal downstream domain (DSD)이 상보적인 염기 서열을 갖고 있다. 이 경우에는 이 둘의 상호작용이 최적의 복제 조건이 되는 것으로 알려졌다 (18). 또한, R_{II}는 R_{IV}와 상호작용을 하여 replication complex 형성에 영향을 주며, R_{III} (−)는 음성가닥 RNA에서 나타나는 것으로 R_I (−)과 상호작용을 통해 복제를 증진시키는 역할을 한다 (19). 이외에 *Potexvirus*인 Potato virus X는 5'-UTR 부위의 몇몇 염기와 sgRNA initiation site 앞에 존재하는 몇몇 염기가 상호작용하여 PVX의 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (20). 또한, *Tospovirus*, *Rhapbdovirus*, *Flavivirus*에서도 replication element가 RNA-RNA 상호작용을 통해 복제에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (21).

TYMV의 경우 5'-UTR에 있는 두 개 stem-loop 구조와 3'-말단부가 중요한 것으로 보고되었으며, 본 연구를 통해 CP ORF에도 복제에 필수적인 sequence element가 존재하는 것으로 나타났는데, 이들 replication element 사이에도 다른 바이러스에서 보고된 바와 같은 RNA-RNA 상호작용이 있을지에 대해서는 앞으로 밝혀야 할 것이다.

참 고 문 헌

1) Dreher TW. Turnip yellow mosaic virus: transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. Mol Plant Pathol 2004; 5:367-75.

2) Bozarth CS, Weiland JJ, Dreher TW. Expression of ORF-69 of turnip yellow mosaic virus is necessary for viral spread in plants. Virology 1992;187:124-30.

3) Tsai CH, Dreher TW. Increased viral yield and symptom severity result from a single amino acid substitution in the turnip yellow mosaic virus movement protein. Mol Plant Microbe Interact 1993;6:268-73.

4) Chen J, Li WX, Xie D, Peng JR, Ding SW. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. Plant Cell 2004;16:1302-13.

5) Dreher TW, Goodwin JB. Transfer RNA mimicry among tymoviral genomic RNAs ranges from highly efficient to vestigial. Nucleic Acids Res 1998;26:4356-64.

6) Dreher TW, Tsai CH, Florentz C, Giegé R. Specific valylation of turnip yellow mosaic virus RNA by wheat germ valyl-tRNA synthetase determined by three anticodon loop nucleotides. Biochemistry 1992;31:9183-9.

7) Matsuda D, Dreher TW. The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer. Virology 2004;321:36-46.

8) Miller WA, Bujarski JJ, Dreher TW, Hall TC. Minus-strand initiation by brome mosaic virus replicase within the 3' tRNA-like structure of native and modified RNA templates. J Mol Biol 1986;187:537-46.

9) Deiman BA, Koenen AK, Verlaan PW, Pleij CW. Minimal template requirements for initiation of minus-strand synthesis *in vitro* by the RNA-dependent RNA polymerase of turnip yellow mosaic virus. J Virol 1998;72:3965-72.

10) Shin HI, Cho NJ, Cho TJ. Role of 5'-UTR hairpins of the Turnip yellow mosaic virus RNA in replication and systemic movement. BMB Rep 2008;41:778-83.

11) Shin HI, Tzanetakis IE, Dreher TW, Cho TJ. The 5'-UTR of Turnip yellow mosaic virus does not include a critical encapsidation signal. Virology 2009;387:427-35.

12) Shin HI, Kim IC, Cho TJ. Replication and encapsidation of recombinant Turnip yellow mosaic virus RNA. BMB Rep 2008;41:739-44.

13) Cho TJ, Dreher TW. Encapsidation of genomic but not subgenomic turnip yellow mosaic virus RNA by coat protein provided in trans. Virology 2006;356:126-35.

14) Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene

silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc Natl Acad Sci 1999;96:14147-52.

15) Ray D, White KA. Enhancer-like properties of an RNA element that modulates tombusvirus RNA accumulation. Virology 1999;256:162-71.

16) White KA, Nagy PD. Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2004;78:187-226.

17) Pogany J, Fabian MR, White KA, Nagy PD. A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. EMBO J 2003; 22:5602-11.

18) Ray D, Na H, White KA. Structure properties of a multi-functional T-shaped RNA domain that mediate efficient Tomato bushy stunt virus RNA replication. J Virol 2004;78: 10490-500.

19) Panaviene Z, Panavas T, Nagy PD. Role of an internal and two 3'-terminal RNA elements in assembly of tombusvirus replicase. J Virol 2005;79:10608-18.

20) Kim KH, Hemenway CL. Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. RNA 1999;5:636-45.

21) Miller WA, White KA. Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. Annu Rev Phytopathol 2006;44:447-67.