

## 참비름 (*Amaranthus mangostanus*)에서 항바이러스성 단백질 (AAP29)의 분리 및 특성

조강진\* · 이승인 · 김영태 · 황영수

농업과학기술원 생물자원부

**초록 :** 참비름 (*Amaranthus mangostanus*) 잎에서 단백질을 추출하여 S-Sepharose, Sephacryl S-200 HR, CM-Sepharose, Blue sepharose column chromatography에 의하여 단백질 합성 저해능이 있는 항바이러스성 단백질 (*Amaranthus* antiviral protein, AAP29)을 분리하였다. 정제된 단백질의 분자량은 SDS-PAGE에서 약 29,200이었으며, 등전점은  $9.0 < pI < 9.6$ 인 염기성 단백질로 확인되었다. 열에 안정하여 50°C에서 20분간 처리한 경우에도 활성의 변화는 없었으며, 이 단백질의 단백질합성 저해능 활성을 *in vitro* translation system에서 측정할 결과 50% 저해농도 ( $IC_{50}$ )는 0.18 nM이었다. 담배잎 표면에 AAP29와 cucumber mosaic virus (CMV)를 함께 접종하여 항바이러스 활성을 생물검정한 결과 AAP29는 virus 감염을 현저히 저하시켰다. AAP29의 N-말단 아미노산 서열은 ADLFTVTKDGTSQSYXTLXNXWRXW이었으며 기존에 알려진 다른 RIP과의 동질성은 없었다(1995년 10월 5일 접수, 1995년 11월 6일 수리).

### 서 론

최근의 분자생물학, 생화학등 기술의 발달로 바이러스 외피단백질의 유전자, satellite RNA 유전자, 핵산분해 RNA 유전자 (Ribozyme), 바이러스 외피 단백질의 항체 유전자 등을 식물체에 삽입 발현시킴으로써 바이러스 저항성 작물을 창출하려는 연구<sup>1-3)</sup>가 이루어지고 있으며, 이러한 바이러스 유전자들을 이용하는 방법외에도 Duggar와 Armstrong<sup>4)</sup>이 고등식물즙액을 이용한 바이러스 감염억제효과를 보고한 이래 식물이 생성하는 바이러스 저해물질을 탐색하고자 Simons 등<sup>5)</sup>은 75종의 식물즙액에서 바이러스 저해물질을 조사하였다. Wyatt와 Shepherd<sup>6)</sup>는 *Phytolacca americana*에서 항바이러스성 단백질 (PAP)을 분리하였으며 Grasso와 Shepherd<sup>7)</sup>은 *Phytolacca*가 속한 중심자목 (Centrospermae) 식물 등에 유사한 단백질이 있음을 보고하였다. 이후 *Phytolacca americana*, *Mirabilis jalapa* 등에서 분리된 항바이러스성 단백질의 이화학적 특성과 생화학적 특성, 바이러스 감염 저해기작 등이 연구되었으며,<sup>8-15)</sup> 이 중 *Phytolacca americana*에서 분리된 항바이러스성 단백질의 유전자를 담배와 감자에 형질전환한 결과 형질전환된 감자와 담배에서 여러종류의 바이러스에 저항성을 나타내었다.<sup>16)</sup> 국내에서도 일부 식물의 즙액이 바이러스 감염억제에 효과<sup>17)</sup>가 있음이 알려졌으며 그중 섬자리공에서 항바이러스성 단백질이 분리된 바 있다.<sup>18)</sup> 본 연구는 우리 고유의 유전자원으로부터 바이러스 저항성 작물을 개발하기 위한 기초연구로 국내 자생식물에서 항바이러스성 단백질을 탐색하여 몇 종의 식물을 선발하였으며 그중 참비름 (*Amaranthus mangostanus*)에서 분리 정제한 항

바이러스성 단백질의 특성을 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료

시료로 사용한 참비름 (*Amaranthus mangostanus*)은 1993년 여름에 야외에서 채집하여 그 잎만을 분리하여 -80°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

#### 단백질 분리정제

시료 490 g을 액체질소에 얼린 후 Waring blender에 갈아서 50 mM NaCl, 0.2 mM PMSF를 첨가한 완충용액 A(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) 2000 ml로 추출하였다. 이 후 전 실험과정은 4°C에서 수행하였다. 추출액을 Miracloth로 1차 여과하고 15,000 g에서 30분 원심분리하여 얻은 상등액을 단백질 조추출액으로 하였다. 조추출액은 다시 ammonium sulfate 30~80%로 침전시키고 완충용액 A에 투석한 후, 이 농축액을 완충액으로 미리 평형화 시킨 S-Sepharose column (5×13 cm)에 주입하여 흡착된 단백질을 0~0.5 M NaCl linear salt gradient를 걸어 용출시켰다. 활성분획을 모아서 ammonium sulfate 80%로 단백질을 침전시킨 후 Sephacryl S-200 HR column (3×100 cm)에서 0.1 M NaCl을 함유한 완충용액 A로 gel filtration 하였다. 여기서 얻어진 분획의 활성부분은 CM-Sepharose column에 주입하여 흡착된 단백질을 0~0.5 M NaCl linear gradient로 용출시켰다. 활성이 확인된 분획은 모아서 증류수에 투석하고 동결건조하여 농축하였다. 이것을 다시 Blue Sepharose column(1.5×14 cm)

찾는말 : *Amaranthus mangostanus*, antiviral protein, ribosom-inactivating protein (RIP), amino acid sequence

\*연락처

에서 1차 용출은 0.1 M NaCl을 함유한 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로, 2차 용출은 1차 용출액과 1 M NaCl을 함유한 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)를 linear gradient로 혼합하여 실시하였다.

### 기내 단백질 합성 저해력 측정

기내 단백질 합성 저해력은 Walsh 등<sup>19)</sup>의 방법을 참조하여 rabbit reticulocyte lysate을 사용하는 *in vitro* translation system (Promega kit 사용)을 본 실험조건에 맞도록 변형하여 측정하였다. 먼저 Eppendorf tube(1.5 ml)에 ribonuclease-free H<sub>2</sub>O 3.5  $\mu$ l, RNasin ribonuclease inhibitor 0.5  $\mu$ l(20 U), amino acid mixture (-Leu) 0.5  $\mu$ l, [<sup>14</sup>C]Leu 2.5  $\mu$ l, BMV mRNA 1.0  $\mu$ l를 넣어서 혼합한 후, 여기에 단백질 분획 3  $\mu$ l와 rabbit reticulocyte lysate 17.5  $\mu$ l를 넣고 30°C에서 60분간 반응을 진행시켰다. 이때 대조구에는 단백질 분획대신 완충용액 A만 처리하였다. 반응은 1.5 M KOH 10  $\mu$ l를 넣어서 중지시키고 glass fiber filter에 반응액 8  $\mu$ l를 흡착시켰다. 합성된 단백질외에 포함된 radioactive amino acid 잔기는 세척하여 제거하였다. 세척은 냉각된 10% trichloro acetic acid 용액에 10분, 끓는 물에 중탕시킨 5% TCA 용액에 5분, 5% TCA 용액에서 세척 2회, ethanol 세척 2회 순으로 하였다. Glass fiber filter는 세척 후 건조시키고 Liquid Scintillation Counter (Beckman LS5801)에서 cpm을 측정했다.

### 분자량 및 등전점 측정

정제단백질의 분자량은 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 측정하였다. 분자량 측정에 사용된 표준 단백질은 phosphorylase B (M.W. 97,400), bovine serum albumin (M.W. 66,200), ovalbumin (M.W. 45,000), carbonic anhydrase (M.W. 31,000), trypsin inhibitor (M.W. 21,500), lysozyme (M.W. 14,400) 등이었다. 단백질의 pI값 측정을 위한 isoelectric focusing은 LKB multiphorII를 이용하였고, Gel Bond PAG film에 두께 0.5 mm gel을 만들어 사용하였다. Gel은 polyacrylamide (T=7.5%, C=3%)에 carrier ampholyte pH range 3~10 (BIO-RAD)을 사용하여 urea를 넣지 않은 native 상태로 만들었다. pI값은 표준단백질인 phycocyanin (pI 4.65),  $\beta$ -lactoglobulin B (pI 5.1), bovine carbonic anhydrase (pI 6), human carbonic anhydrase (pI 6.5), equin myoglobin (pI 7.0), human hemoglobin A (pI 7.1), human hemoglobin C (pI 7.5), lentil lectin (3 bands, pI 7.8, 8.0, 8.2), Cyt C (pI 9.6) (BIO-RAD) 등과 비교하여 결정하였다.

### 단백질의 정량

단백질 정량은 BCA법<sup>20)</sup>에 따랐고 bovine serum albumin을 표준단백질로 하였다.

### 항바이러스성 생물검정

오이 모자이크 바이러스(CMV)가 이병된 담배잎을 10

mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 추출 (1 g/5 ml)한 후, 추출액 일정량을 정제된 단백질의 농도별 조정액과 같은 비율로 혼합하여 단백질 농도가 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml인 virus 접종액을 만들어 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) 엽면에 도말처리하였다. 기존에 알려진 항바이러스성 단백질과 활성을 비교하기 위하여 미국 Southwest Texas State University의 Irvin 교수로부터 분양받은 pokeweed antiviral protein(PAP)도 250 ng/ml, 500 ng/ml 수준으로 처리하였다. 대조구로는 CMV만을 처리한 것과 무접종 처리구를 사용하였으며, 접종 후 6일, 10일에 각각 virus 병징을 조사하였다.

### N-말단 아미노산 서열분석

정제된 단백질 약 4  $\mu$ g을 SDS-PAGE에서 전기영동시킨 후, PVDF membrane에 상온, 50 V 상태에서 30분간 electroblotting 하였다. Blotting buffer로는 10 mM CAPS를 사용하였다. Blotting한 단백질은 Coomassie Blue 염색으로 확인하고 절단한 후, Applied Biosystems사의 Protein Sequencer 476A로 액상 조건으로 N-말단 아미노산 서열을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 단백질의 정제

단백질 조추출액을 ammonium sulfate fractionation, S-Sepharose column chromatography, Sephacryl S-200 gel filtration, CM-Sepharose column chromatography 등의 분리과정을 거쳐서 Fig. 1에서와 같이 Blue Sepharose column chromatography한 결과, 단백질합성 저해력이 높은 분획을 분리할 수 있었다. 그리고 각 분획별로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 행하여 활성분획에서 단일 단백질 밴드를 확인하였으며, 분자량이 약 29,200으로 판명되었다. 이후 본 단백질을 AAP29로 기재한다.

대부분의 항바이러스성 단백질은 ribosomal RNA의 특정부위를 depurination 시켜서 단백질 합성을 저해하는 RNA N-glycosidase 활성이 있는 ribosome inactivating protein(RIP)<sup>11,21-25,28)</sup>에 속하기 때문에 각 분리단계에서 단백질 분획에 대한 기내 단백질 합성 저해력을 측정하여 단백질을 분리하였다. Irvin,<sup>9)</sup> Irvin 등<sup>28)</sup>이 미국자리공(pokeweed)에서 분리한 항바이러스성 단백질(PAP)들의 분자량은 27,000~30,000, Takanami 등<sup>29)</sup>이 *Mirabilis jalapa*에서 분리한 항바이러스성 단백질(MAP)은 24,000이었으며, 이외에도 대부분의 RIP분자량은 25,000~32,000 정도로서 AAP29 분자량은 이들과 큰 차이가 없었다. 그리고 Stirpe 등<sup>23)</sup>의 RIP분류에 의해 Type 1에 속함을 알 수 있었다.

### 단백질의 등전점

AAP29를 표준단백질과 함께 등전점 전기영동한 결과 Fig. 2에서와 같이 등전점이 pH 9.0에서 9.6사이에 있는

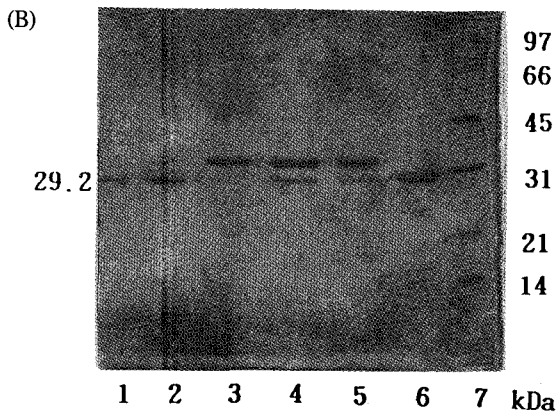
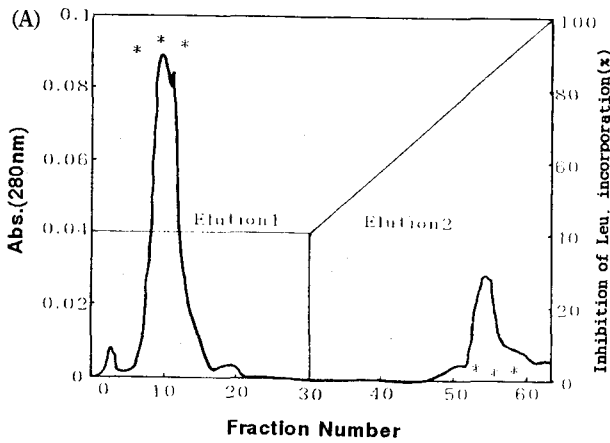


Fig. 1. A. Elution profile of active fraction from S-Sepharose on Blue Sepharose column. Elution 1; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl. Elution 2; 20 mM Tris-HCl, pH 8.6, 0.1 M to 1.0 M NaCl, linear gradient. (\*); RIP activity at constant protein concentration of 1 ng/tube. B. SDS-PAGE of the fractions eluted from Blue Sepharose column. Gel was stained with Coomassie Blue. Lane 1,2; Elution 1; lane 3-5; Elution 2; Lane 6; Gelonin; Lane 7; Molecular weight marker.

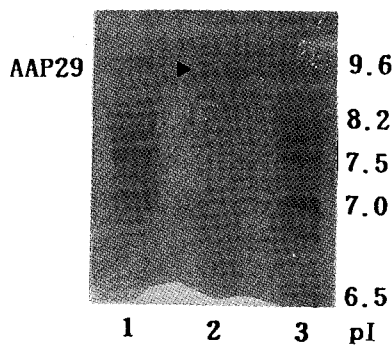


Fig. 2. Isoelectric focusing of purified AAP29. Isoelectric focusing was performed using LKB multiphorII with 0.5 mm polyacrylamide gel (T=7.5%, C=3%) containing carrier ampholyte (pH range 3~10) on Gel Bond PAG film. Lane 2; AAP29. Lane 1,3; pI standard proteins.

강한 염기성 단백질이었다. 이는 PAP의 등전점 8.1~8.3<sup>28)</sup>보다 높았으며, MAP의 등전점 9.8<sup>29)</sup>보다는 다소 낮았다.

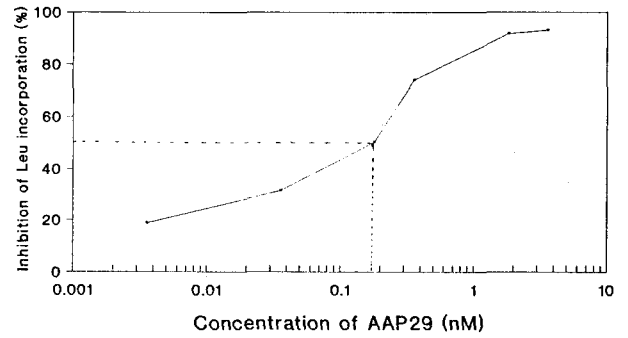


Fig. 3. Inhibition of protein synthesis by AAP29 in a cell free system. IC<sub>50</sub> was determined by two replication.

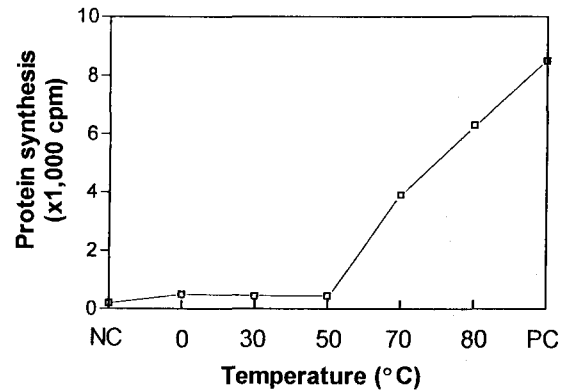


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of AAP29. AAP29 (0.34 ng/ $\mu$ l, 20  $\mu$ l) was incubated at different temperatures (0, 30, 50, 70, 80°C) for 20 min, and the inhibition of protein synthesis was examined. Negative control (NC), without mRNA. Positive control (PC), without AAP29.

### 기내 단백질 합성 저해력

Rabbit reticulocyte lysate와 Brome mosaic virus mRNA를 사용하는 기내 단백질 합성 시스템에서 AAP29 농도별로 단백질 합성 저해력을 측정해 본 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 단백질 합성 50% 저해농도(IC<sub>50</sub>)는 0.18 nM이었다. 이는 Gelonin의 0.4 nM,<sup>24)</sup> PAP의 0.24 nM,<sup>6)</sup> Bryodin의 0.12 nM<sup>25)</sup>과 비슷한 수준이었다.

### 온도 안정성

AAP29의 온도별 안정성을 알아보기 위하여 Fig. 4에서와 같이 각 온도별로 20분간 항온처리한 후 기내 단백질 합성 저해력을 측정해 본 결과 50°C 수준까지는 활성의 변화가 거의 없었고 70°C에서도 어느정도 활성을 유지하였다. 이는 대부분의 단백질들이 열에 불안정한 것에 비하여 RIP 단백질들이 열에 비교적 안정하다는 보고<sup>25,26)</sup>와도 일치하였다.

### N-말단 아미노산 서열

AAP29의 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 단백질의 N-말단쪽에 26번째 잔기까지 분석하여 이중 22개 잔기를 확인할 수 있었다. Data base

Table 1. N-terminal amino acid sequence of AAP-29

Cycle	Amino acid	Cycle	Amino acid
1	Ala	14	Gln
2	Asp	15	Ser
3	Leu	16	Tyr
4	Thr	17	-
5	Phe	18	Thr
6	Thr	19	Leu
7	Val	20	-
8	Thr	21	Asn
9	Lys	22	-
10	Asp	23	Try
11	Gly	24	Arg
12	Thr	25	-
13	Ser	26	Met

Table 2. Antiviral activity of AAP29 against CMV infection on tobacco leaves.

Treatments* (ng/ml)	Symptom**	
	6 DAT <sup>#1</sup>	10 DAT
1. AAP29 <sup>#2</sup> 100	+	+++
2. AAP29 250	+	+++
3. AAP29 500	-	-
4. PAP <sup>#3</sup> 250	+	+++
5. PAP 500	-	-
6. CMV <sup>#4</sup> only	+++	+++
7. Buffer solution only	-	-

\*In each treatment, equal volume of AAP29 solution and CMV extracts were mixed and rubbed on tobacco leaves except treatment 6 (CMV only) and treatment 7 (Buffer solution only). PAP was used as a reference for the antiviral activity. \*\*Symptom: -, no infection; +, slight infection; +++, serious infection. <sup>#1</sup>DAT, days after treatment. <sup>#2</sup>AAP29, antiviral protein from *Amaranthus mangostanus*. <sup>#3</sup>PAP, antiviral protein from pokeweed. <sup>#4</sup>CMV, cucumber mosaic virus.

검색(Swiss & PIR & Translated Release 86) 및 기존의 항바이러스성 단백질의 N-말단 아미노산 서열<sup>27,30-31</sup>과 비교 하였을 때 동질성이 있는 단백질을 찾을 수 없었다. 이는 이 부위가 RIP의 활성과는 관련이 없이 단순히 중 특이적인 부분이기 때문일 것으로 여겨진다.

**항바이러스성 생물검정**

정제된 단백질 AAP29에 대하여 *in vivo* 상태에서 바이러스에 대한 저해력을 알아보기 위하여 담배엽면에 직접 virus와 AAP29을 함께 처리한 결과를 보면 Table 2에서 보는바와 같다. 처리후 6일에 CMV만 처리한 대조구의 담배엽면에서 virus 병징이 나타났으나, AAP29 500 ng/ml 수준에서는 처리후 10일 이상이 경과할때까지 감염증상이 전혀 나타나지 않았으며[Fig. 5], 이는 같은 수준의 PAP처리구에서도 마찬가지였다. 250 ng/ml 이하 처리수준에서도 virus 감염증상은 나타났지만 CMV만

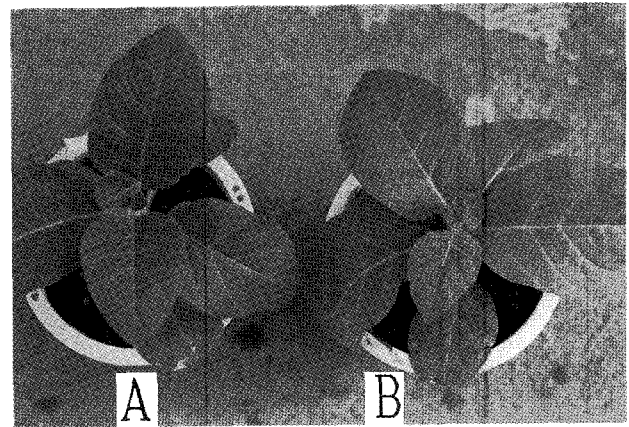


Fig. 5. AAP29 activity suppressing CMV infection on tobacco leaves. Photography was taken at 7 days after the treatment. A: CMV+AAP29 500 ng/ml, B: CMV only.

처리한 대조구에 비하여 감염속도가 늦어지거나 감염 정도가 약화되어 AAP29의 처리구와 무처리구 간의 효과가 분명히 구분되었다. PAP과 MAP같은 RIP에 속하는 항바이러스성 단백질의 식물 세포내에서 바이러스 저해 메카니즘은 바이러스가 세포내 침투후 복제가 일어나는 ribosome의 단백질 합성기능을 저해하므로써 바이러스가 증식을 할 수 없는 것으로 알려져 있으며,<sup>11,15,22,23,28</sup> 식물 바이러스 종류에 관계없이 비선택적으로 작용하는 것을 Chen 등<sup>10</sup>과 Kubo 등<sup>13</sup>이 생물검정을 통하여 확인한 바 있다. 본 실험의 결과도 이들의 결과와 유사 하였으며 AAP29가 항바이러스성 단백질을 보여준다. 따라서 AAP29의 N-말단 아미노산 서열 정보를 이용하여 유전자를 분리할 수 있을 것으로 생각되며, 항바이러스성 단백질을 작물에 형질전환 시켜서 항바이러스성 단백질이 세포내에서 생성 및 축적되도록 하여 바이러스 침입시 작용하도록 하는 것이 앞으로의 연구 과제라고 생각된다.

**참 고 문 헌**

1. Tepfer, M. (1993) Viral genes and transgenic plants. *Bio/Technol.* **11**, 1125-1130.
2. Scholthof, K. G., H. B. Scholthof and A. O. Jackson (1993) Control of plant virus diseases by pathogen derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **102**, 7-12.
3. Tavladoraki, P., E. Benvenuto, S. Irinca, D. D. Martinis, A. Cattaneo and P. Galetti. (1993) Transgenic plants expressing a functional single-chain antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**, 469-472.
4. Duggar, B. M. and J. K. Armstrong (1925) The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juice of various plants. *Ann. M. Bot. Gard.* **12**, 359-366.
5. Simons, J. K, R. Swidler and L. M. Moss (1962) Succulent-type plants as sources of plant virus inhibitors. *Phytopathology* **53**, 677-683.
6. Wyatt, S. D. and R. J. Shepherd (1969) Isolation and charac-

- terization of a virus inhibitor from *Phytolacca americana*, *Phytopathology* **59**, 1787-1794.
7. Grasso, S. and R. J. Shepherd (1977) Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to *Phytolacca*. *Phytopathology* **68**, 199-205.
  8. Obrig, T. G., J. D. Irvin and B. Hardesty (1973) The effect of an antiviral peptide on the ribosomal reactions of the peptide elongation enzymes, EF-I and EF-II. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 278-289.
  9. Irvin, J. D. (1975) Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 525-528.
  10. Chen, J. C., R. F. White, J. F. Antoniw and Q. Lin (1991) Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses. *Plant Pathology* **40**, 612-620.
  11. Bonness, M. S., M. P. Ready, J. D. Irvin and T. J. Mabry (1994) Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes; implications for the antiviral mechanism. *Plant J.* **5**, 173-183.
  12. Aron, G. M. and J. D. Irvin (1988) Cytotoxicity of pokeweed antiviral protein. *Cytobios* **55**, 105-111.
  13. Kubo, S., T. Ikeda, S. Imaizumi, Y. Takanami and Y. Mikami (1990) A potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **56**, 481-487.
  14. Cammue, B. P. A., M. F. C. DeBolle, F. R. G. Terras, P. Proost, J. V. Damme, S. B. Rees, J. Vanderlijden and W. F. Broekaert (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* **267**, 2228-2233.
  15. Habuka, N., K. Akiyama, H. Tsuge, M. Miyano, T. Matsumoto and M. Noma (1990) Expression and secretion of *Mirabilis* antiviral protein in *Escherichia coli* and its inhibition of *in vitro* eukaryotic and prokaryotic protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 10988-10992.
  16. Lodge, J. K., W. K. Kaniewski and N. E. Tumer (1993) Broad-spectrum virus resistance on transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7089-7093.
  17. 최장경, 정옥화 (1984) 비름과 식물즙액에 의한 담배 모자이크 바이러스의 감염억제효과. *한국식물보호학회지*, **23**, 137-141.
  18. Lee, C. H. (1992) Molecular characterization of an antiviral protein from the leaves of *Phytolacca insularis*. Ph.D. Thesis, Seoul National University.
  19. Walsh, T. A., A. E. Morgan and T. D. Hey (1991) Characterization and molecular cloning of apoenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. *J. Biol. Chem.* **266**, 23422-23427.
  20. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzans, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and d. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchronic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
  21. Barbieri, L., A. Bolognesi, P. Cenini, A. I. Falasca, A. Minghetti, L. Garofano, A. Guicciardi, D. Lappi, S. P. Miller and F. Stirpe (1989) Ribosome-inactivating protein from plant cells in culture. *Biochem. J.* **257**, 801-807.
  22. Taylor, S., A. Massiah, G. Lomonossorf, L. M. Roberts, J. M. Lord and M. Hartly (1994) Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco mosaic virus infection. *Plant J.* **5**, 827-835.
  23. Stirpe, F., L. Barbieri, M. G. Battelli, M. Soria and D. A. Lappi (1992) Ribosome-inactivating protein from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* **10**, 405-412.
  24. Stirpe, F., S. Olsnes and A. Pihl (1980) Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 6947-6953.
  25. Stirpe, F., L. Barbieri, M. G. Battelli, A. I. Falasca, A. Abbondanza, E. Lorenzoni and W. A. Stevens (1986) Bryodin, a ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L.(white bryony). *Biochem. J.* **240**, 659-665.
  26. Stirpe, F., A. Gasperi-Campani, L. Barbieri, A. Falasca, A. Abbondanza and A. Stevens (1983) Ribosome-inactivating protein from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem. J.* **216**, 617-625.
  27. Casellas, P., D. Dussory, A. I. Falasca, L. Barbieri, J. C. Guillent, P. Ferrara, A. Bolognesi, P. Cenini and F. Strippe (1988) Trichokirin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maximowicz. *Eur. J. Biochem.* **176**, 581-588.
  28. Irvin, J. D., T. Kelly, and J. D. Robertus (1980) Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivates eukaryotic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 418-425.
  29. Takanami, Y., S. Kuwata, T. Ikeda and S. Kubo (1990) Purification and characterization of the anti-plant viral protein from *Mirabilis jalapa* L. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **56**, 488-494.
  30. Kung, S. S., M. Kimura and G. Fumatsu (1990) The complete amino acid sequence of antiviral protein from the seeds of pokeweed(*Phytolacca americana*). *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3301-3318.
  31. Habuka, N., Y. Murakami, M. Noma, T. Kado and K. Hori-koshi (1989) Amino acid sequence of *Mirabilis* antiviral protein, total synthesis of its gene and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 6629-6637.

---

**Purification and Characterization of Antiviral Protein (AAP29) from the Leaves of *Amaranthus mangostanus***

Kang Jin Cho\*, Seung In Yi, Yeong Tae Kim and Young Soo Hwang (*Department of Bio-Resources, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suweon, 441-707, Korea*)

**Abstract**: An antiviral protein (AAP29) with ribosome-inactivating activity was purified and characterized from the leaves of the *Amaranthus mangostanus*. Purification was accomplished through crude extraction, ammonium sulfate precipitation, S-Sepharose chromatography, gel filtration, CM-Sepharose chromatography and Blue Sepharose chromatography. This protein was about 29.2 kDa and strongly basic with the pI value between 9.0 and 9.6, indicating that AAP29 is similar to Type 1 RIP. The AAP29 showed high thermostability without activity loss even after 20 min at 50°C. In cell free system using rabbit reticulocyte lysate, AAP29 inhibited protein synthesis with an IC<sub>50</sub> of 0.18 nM. This protein also reduced mosaic symptoms of cucumber mosaic virus (CMV) on tobacco leaves. The N-terminal amino acid sequences of the AAP29 are ADLTFTVTKDGTSGSYXTLXNXWRXW and shows no sequence similarity with any known RIPs.

---

\*Corresponding author