

식물의 성장과 발달에 있어 Calmodulin의 가능한 역할

(Calmodulin and Its Possible Role in The Regulation of The Plant Growth and Development)

오 석 흥
우석대학교 생물공학과

I. 서 론

칼슘은 eukaryotes에 있어서 중요한 cellular activities의 조절에 관여하는 signal molecule로 알려져 있다 (for reviews see Hepler and Wayne, 1985 ; Berridge and Irvine, 1989; Berridge, 1990; Rasmussen, 1989,1990). 고등 식물에 있어 calcium signals은 식물의 성장 및 발달과 관련된 수많은 cellular responses의 조절에 깊이 관련되어 있는것으로 알려져 있다 (reviewed by Hepler and Wayne, 1985; Poovaiah and Reddy, 1987). 식물세포내 칼슘신호전달의 molecular basis를 이해하기 위해서는 칼슘작용의 targets을 확인해 내는 일이 필수적이다. 이와같은 목표를 향한 하나의 중요한 단계가 1970년대 후반 pea NAD Kinase의 activator로서 칼모듈린 (calmodulin) 이 확인됨으로써 성취되었다 (for reviews see Roberts et al.,1986a; Roberts and Harmon, 1992). 고등식물조직내 칼모듈린의 존재는 이 단백질이 조사된 모든 진핵세포내에서 발견되어 왔다는 사실에 비추어 놀라운 것은 아니었다. 실제로 yeast와 같은 model system을 통하여 얻은 결과는 칼모듈린이 세포의 성장과 생존을 위해 필수적이라는 것이다 (Davis et al.,1986; Takeda and Yamamoto, 1987). 이는 진핵세포내에서 세포성장조절에 칼모듈린이 중추적인 역할을 하고 있음을 제안해 주고 있는 좋은 예이다.

칼모듈린은 그 자체로서는 아무런 효소적 활성을 갖지 못하며 칼슘과 결합한 후

여러 효소들이나 단백질들과 결합하여 그들의 활성을 조절함으로써 그 역할을 하는 단백질이다 (for reviews see Roberts et al., 1986a; Oh, 1992) (Fig. 1). 이미 동물조직들로부터 적어도 20종류이상의 칼모듈린-의존형 효소 및 단백질들이 발견되어 그 특성이 규명된바 있다 (for reviews see Cohen and Klee, 1988; Roberts and Harmon, 1992). 그러나 식물조직에서 발견된 칼모듈린-의존형 효소 및 단백질은 불과 수 종류에 불과하며, NAD kinase를 제외하고는 (Roberts et al., 1985, 1990, 1992a) 이들 칼모듈린-조절 단백질들의 정체와 특성에 관해 확실하게 밝혀진 것이 없는 실정이다. 동물과 식물의 여러 조직으로부터 얻은 칼모듈린의 115번째 lysine이 특이적인 칼모듈린 메틸화 효소에 의해서 trimethylation됨이 밝혀졌다 (Rowe et al., 1986; Morino et al., 1987; Oh and Roberts, 1990) (Fig. 2). 비록 이와 같은 modification이 많은 칼모듈린으로부터 발견되어 왔지만 칼모듈린의 세포내 활성에 칼모듈린 메틸화가 어떤 영향을 줄 수 있는지에 관해 뚜렷한 답이 없다. 그러나 메틸화 되지 않은 칼모듈린과 메틸화된 칼모듈린을 이용한 *in vitro* 연구를 통해서 Ca^{2+} /calmodulin-의존형 효소인 plant NAD kinase의 활성화가 칼모듈린 메틸화에 의해서 감소된다는 사실이 밝혀졌고 (Roberts et al., 1986b), 반면에 다른 칼모듈린 의존형 효소들의 활성은 영향을 받지 않음이 밝혀져 왔다 (Rowe et al., 1986; Roberts et al., 1984, 1985; Putkey et al., 1985, 1986). 그러므로, 칼모듈린 메틸화가 어떤 특정 효소들의 활성화 정도를 조절해 줄 수 있는 기작이 될 수도 있음이 제안되어 왔다.

식물의 성장과 발육에 있어 칼모듈린의 가능한 역할을 제시하기 위해서는 식물의 성장과 칼모듈린 농도변화와의 관계를 밝혀내고, 칼모듈린 의존형 효소들 및 다른 칼모듈린 target proteins의 확인 및 분석이 필수적이라 할 수 있다. 또한 세포내 협력적인 반응을 위해서는 다른 조절체계가 있을 수 있으므로 칼모듈린 메틸화같은 칼모듈린 활성을 조절 할 수 있는 인자에 대해서도 조사해 보는 것이 필요하다. 이 글에서는 칼모듈린 단백질 농도, 칼모듈린 메틸화 정도, 그리고 칼모듈린 target proteins의 농도가 식물세포의 성장과 발달과정중 조절됨을 기술하고, 메틸화 될 수 없는 돌연변이 칼모듈린의 식물세포내 발현을 통한 식물의 특이적인 형태적 변화등을 근거로 식물세포내 칼모듈린 체계의 가능한 중요성을 제시하고자 한다.

II. 본 론

1. Calmodulin and calmodulin-binding proteins during carrot embryogenesis

식물에 있어 calmodulin의 levels이 식물의 발달 단계에 따라 조직간에 다르다는 것이 밝혀져 왔다 (Muto and Miyachi, 1984; Allan and Trewavas, 1985; Zielinski, 1987; Ling and Assmann, 1992). Radioimmunoassay 혹은 enzyme activator 분석들에 근거한 일반적인 분포양상은 meristematic zones을 포함하는 apical부위가 다른 mature tissues보다 더 많은 칼모듈린을 함유하고 있는 것으로 나타났다. Immunocytochemical 그리고 immunohistochemical 분석들을 통하여 조사해 본 결과 root apical부위중에서도 root cap과 meristem에서 더 많은 칼모듈린이 검출되었다 (Lin et al., 1986; Dauwalder et al., 1986). 식물에서 발견되어진 칼모듈린-의존형 효소 활성으로는 NAD kinase (Anderson and Cormier, 1978; Roberts et al., 1992a), Ca^{2+} -ATPase (Dieter and Marme, 1980; 1981; Briars et al., 1988), 그리고 nuclear nucleoside triphosphatase (Matsumoto et al., 1984; Chen et al., 1987) 등이 있다.

분화되지 않은 식물조직과 분화된 조직내의 칼모듈린 및 칼모듈린 결합단백질에 관해 연구하기 위해 우리는 embryogenic carrot cultures를 이용했다. 이와같은 model system을 이용 비교 분석해본 결과 발아된 당근 배(embryo)는 분화되지 않은 세포들 혹은 발아되지 않은 embryos에 비하여 칼모듈린 단백질을 적어도 2배 이상 많이 함유하고 있음이 나타났다 (Oh et al., 1992) (Table 1). 이는 Cocucci와 Negrini(1988)가 radish seed embryos의 발아초기에 관찰했던 칼모듈린 농도의 증가 양상과 비슷한 경우라 할 수 있다. 흥미롭게도, seed embryos를 통한 연구에서는 fusicoccin과 같은 발아 촉진제를 적용했을 경우 칼모듈린 levels이 더욱 높아졌고, 그와 같은 증가는 embryos에 abscisic acid와 같은 발아 억제제를 적용시켰을 때 억제되었다 (Cocucci and Negrini, 1988). 이와같은 칼모듈린 농도 증가는 아마도 발아과정의 활성화를 위해 세포들에 의해 요구되는 칼모듈린 양이 증가된데 기인된 것으로 생각되며, 이렇게 증가된 칼모듈린은 발아중 칼슘 신호전달 과정들에 있어 하나의 중요한 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다.

칼모듈린이 target proteins과 결합을 통하여 세포내 조절자로서 역할을 하는

단백질이기 때문에 (for reviews see Roberts et al.,1986a; Roberts and Harmon,1992) 우리는 칼모듈린 overlay방법을 이용하여 칼모듈린-결합 단백질을 분석하였다. 이 방법을 이용하여 분자량 81,000, 54,000, 50,000, 32,000, 26,000, 20,000 등의 칼슘-의존형 칼모듈린-결합 단백질들을 확인하였다 (Oh et al., 1992). 흥미롭게도, 발아된 당근배에서 54,000 M_r 칼모듈린-결합 단백질의 apparent levels이 현저하게 증가됨이 관찰되었다. Ion exchange chromatography와 calmodulin-Sepharose chromatography에 의하여 54,000 M_r 단백질이 거의 순수하게 정제되었고 배의 발아에 있어 칼모듈린의 역할을 밝혀내기 위해 이 단백질의 특성을 규명하고 있는 중이다. 칼모듈린-결합 단백질이 다른 plant systems에 있어서 발달 단계별로 달리 조절되고 있음이 보고된바 있다 (Cocucci and Negrini, 1988; Brawley and Roberts, 1989). 칼모듈린-의존형 NAD kinase가 sea urchin eggs에 있어서는 초기 embryogenic 발달과정에서 중요한 역할을 한다는 보고도 있다 (Epel et al.,1981).

Table 1. Analysis of the levels of calmodulin protein during carrot embryogenesis

Days	pmole CaM/mg protein
0	5.9 (0.5)
10	6.8 (0.7)
17	7.7 (0.7)
24	14.3 (0.8)

a. Carrot samples from the 0-day, 10-day, 17-day, and 24-day of embryo-genesis were harvested and calmodulin content was measured by using acompetitive RIA (Oh and Roberts, 1990). Calmodulin levels were standardized to the amount of total cellular protein determined by the method of Bradford (1976).The values in parenthesis represent the standard error of the mean. CaM, calmodulin. (Oh et al., 1992).

이런 관점에서 식물 NAD kinases의 분자량이 50,000에서 55,000의 범위에 있다는 보고 (Roberts et al.,1990)는 매우 흥미롭다. 예비적 결과이긴 하지만 발아된 배에서 발아되지 않은 배에 비해 3 ~ 4 배 정도 높은 carrot NAD kinase활성이 감지되고 있다.

2. Calmodulin methylation in plant tissues and plant tissue cultures

서론에서 이미 언급한 바와 같이 plant NAD kinase의 활성화가 칼모듈린의 메틸화에 의해 감소됨이 *in vitro*에서 확인 되었다. 즉, 메틸화 되지 않은 재조합 DNA로 부터 얻어진 칼모듈린 (VU-1 calmodulin)은 효소적으로 메틸화된 VU-1 calmodulin이나 spinach calmodulin보다 적어도 3 ~ 4배 높은 식물 NAD kinase활성화제로 작용하였다 (Roberts et al.,1986b; Oh, 1992). 그러나 여러 식물조직들로부터 얻은 식물 칼모듈린의 아미노산 조성 및 서열 분석 결과들 (Watterson et al.,1980; Lukas et al.,1984; Schleicher et al.,1983)은 식물 칼모듈린 1 mole당 1 mole의 trimethyllysine이 존재함을 보여주고 있어 상기의 *in vitro* 결과를 뒷받침하는데 문제점이 제기되어 왔다. 문제는 메틸화되지 않은 혹은 메틸화 과정중에 있는 칼모듈린이 *in vivo*에도 존재하는가 이다.

이를 풀기 위해 우리는 매우 특이적이고 민감한 radiometric assay법 (Oh and Roberts, 1990)을 사용하여 식물 칼모듈린이 115번째 lysine에서 stoichiometrically 메틸화 되어 있지 않음을 최초로 밝혀 냈다 (Oh and Roberts, 1990; Roberts et al.,1990). 더구나 칼모듈린 메틸화가 식물조직의 성장과 발달단계에 따라 다르다는 것도 확인 할 수 있었다. 예를 들면, 칼모듈린 메틸화 정도가 apical root segments에서는 낮고, 조직이 성숙되면서 메틸화 정도가 높아짐을 알 수 있었다 (Oh and Roberts, 1990) (Fig. 3). 그러나 root apex에서 발견된 메틸화되지 않은 칼모듈린이 어떤 특정세포와 특이적으로 연관되어 있는지는 확실하지 않다. 왜냐하면, 우리가 조사한 apical부위는 meristem외에도 root cap, epidermal cells, cortical cell, 그리고 분화되고 있는 vascular elements 등이 포함되어 있기 때문이다.

Root apex에서 볼 수 있는 상기와 같은 여러 다른 세포형태의 복잡성을 피하고 칼모듈린 메틸화 정도를 proliferating vs. non-proliferating 조직에서 비교조사하기 위해 carrot cell culture system (Dougall et al.,1980)을 이용했다. Growth curve의

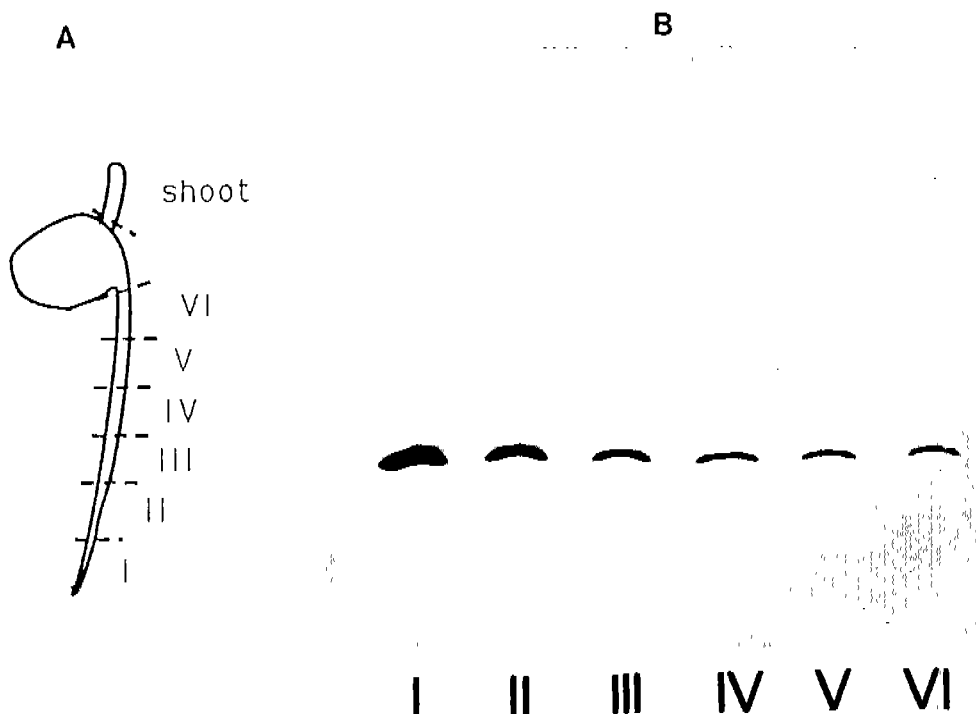


Fig. 3. Diagram of 3-day old etiolated pea with dissection marks and verification of the pattern of methyl groups incorporation into etiolated pea calmodulin. Roots were dissected into 0.6 cm segments (a) and the state of methylation was determined by a specific and sensitive radiometric assay (Oh and Roberts, 1990). SDS-PAGE on 15 % (w/v) polyacrylamide gels and fluorography analyses of the assay products (b) (Oh and Roberts, 1990).

stages에서 얻은 세포로부터 많이 발견되었고, 세포가 더욱 성장해 가면서 칼모듈린 메틸화 정도가 뚜렷하게 증가됨을 알 수 있었다. 더욱이 정지기 세포들을 새로운 배지에 재 접종하였을 때 메틸화되지 않은 칼모듈린이 매우 빠른 속도로 재 축적되어짐을 알 수 있어 (Oh et al.,1992) 이 기간 동안에 메틸화된 칼모듈린의 빠른 turnover가 일어났을 가능성을 제시해 주고 있다. 반면에 칼모듈린 단백질 levels (steady state calmodulin protein levels)은 당근세포의 증식중에 있어 proliferating 세포와 non-proliferating 세포들간에 큰 차이가 없어 (Oh et al.,1992; Perera and Zielinski, 1992), 칼모듈린 메틸화가 세포내 칼모듈린 단백질 농도와는 독립적으로 조절되고 있음을 제안해 주고 있다. 상기의 결과들을 종합해 볼 때 칼모듈린 메틸화는 세포성장의 단계에 따라 매우 빠르게 조절되고 있음을 알 수 있다.

생리학적 견지에서 상기의 결과들은 칼모듈린의 기능에 있어 메틸화가 가져다 줄 수 있는 생물학적 중요성에 대해 재미있는 가능성들을 가져다 주었다. 앞에서도 언급한 바 있지만 효소적으로 메틸화된 칼모듈린은 메틸화되지 않은 칼모듈린에 비해 pea NAD kinase를 적어도 3배 낮게 활성화 시켰다 (Roberts et al.,1986b, 1992a; Oh, 1992). 이는 posttranslational 칼모듈린 메틸화의 조절이 생체내에서 NAD kinase와 활성조절을 위한 하나의 기작이 될 수 있을 가능성을 제시해 주고 있다. 현재 우리는 plant NAD kinase 활성화와 NAD/NADP 비율이 *in vivo*에서 칼모듈린 메틸화에 의해 영향을 받는지에 관해 조사중이다. 또한 식물 세포의 성장과 발달에 있어 칼모듈린과 칼모듈린 메틸화가 가질수있는 조절활성의 중요성을 입증하기 위해 synchronized cells을 이용 하여 칼모듈린 체계를 분석해 보려고 한다. 동물세포를 모델로 한 연구에서 (Chafouleas et al.,1982; Rasmussen and Means, 1989) 칼모듈린 levels이 G₁/S 경계에서 두배로 증가되었고, 이와같은 증가가 cell cycle의 진행속도와 관련이 있음이 보고되었음은 주목할 만하다. 우리가 사용한 carrot cell culture system은 여러 cell cycle 단계로 부터의 세포들이 혼재되어 있는 상태였으므로 식물세포의 cell cycle 진행중에 일어났을지도 모르는 칼모듈린 단백질의 빠른 농도변화를 감지하지 못했을 가능성도 배제할 수 없다.

3. Transgenic plants expressing recombinant DNA-derived calmodulins

Nicotinamide대사조절에 있어 칼모듈린 메틸화가 갖는 기능적 중요성을 조사하기 위해서 *in vivo* 상태에서 calmodulin/NAD kinase 조절계를 교란시킬 수 있는 특이적인 방법이 있다면 아주 유용할 것이다. 재조합 DNA인 VU-1 calmodulin gene을 site-directed mutation시켜 115번째 lysine 대신 arginine을 갖는 돌연변이 칼모듈린(VU-3 calmodulin)의 gene이 만들어진바 있다 (Roberts et al.,1986b). VU-3 calmodulin은 메틸화되지 않은 VU-1 calmodulin과 마찬가지로 메틸화된 칼모듈린에 비해 plant NAD kinase를 적어도 3 ~ 4배 높게 활성화시킨다 (Roberts et al.,1986b, 1990). 유일하게 알려진 차이점은 칼모듈린 메틸화 효소에 의해 메틸화 될 수 없다는 것이다 (Roberts et al.,1986b; Oh and Roberts, 1990). 그러므로, 이와 같은 특성을 갖는 칼모듈린 유도체를 식물세포에 도입하게 된다면 칼모듈린 의존형-NAD kinase를 hyperactivation시킴으로써 calmodulin/NAD kinase 조절계를 선택적으로 교란시킬 수 있을 것이다.

Cauliflower mosaic virus의 35S promoter의 조절하에 VU-1 calmodulin 혹은 VU-3 calmodulin을 발현시키는 transgenic tobacco plants가 Agrobacterium-mediated transformation에 의해 만들어 졌다 (Oh et al.,1991; Roberts et al.,1992b) (Fig. 4). RIA와 SPS-PAGE분석 (Fig. 5)에 의하여 VU-1 칼모듈린과 VU-3 칼모듈린이 안정하게 발현되었음이 확인되었고, 형질전환되지 않은 control plants에 비해 모두 두배 정도 더 많은 칼모듈린 단백질을 조직내 함유하고 있음이 확인되었다 (Oh et al.,1991; Roberts et al.,1992b). 이와같은 VU-1 칼모듈린과 VU-3 칼모듈린의 발현 정도가 그 차이를 구별할 수 없을 정도로 유사했음에도 불구하고, 두 종류의 transgenic tobacco plants는 형태적으로 큰 차이를 보였다. 즉, VU-1 식물들은 모두 성장 및 발달특성에 있어 wild type control plants와 아무런 다른 특성을 보이지 않았는데, VU-3 식물들은 모두 감소된 stem elongation growth, lowered seed production 등 여러 비정상적인 특성을 보여주었다 (Roberts et al.,1992b; Oh,1992). 이와 같은 결과들은 VU-3 plants의 결합적 특성이 전체적인 칼모듈린 levels의 증가로 인함이 아닌 VU-3 칼모듈린 mutant의 발현으로 인한 것이라는 생각을 강하게 뒷받침해 준다.

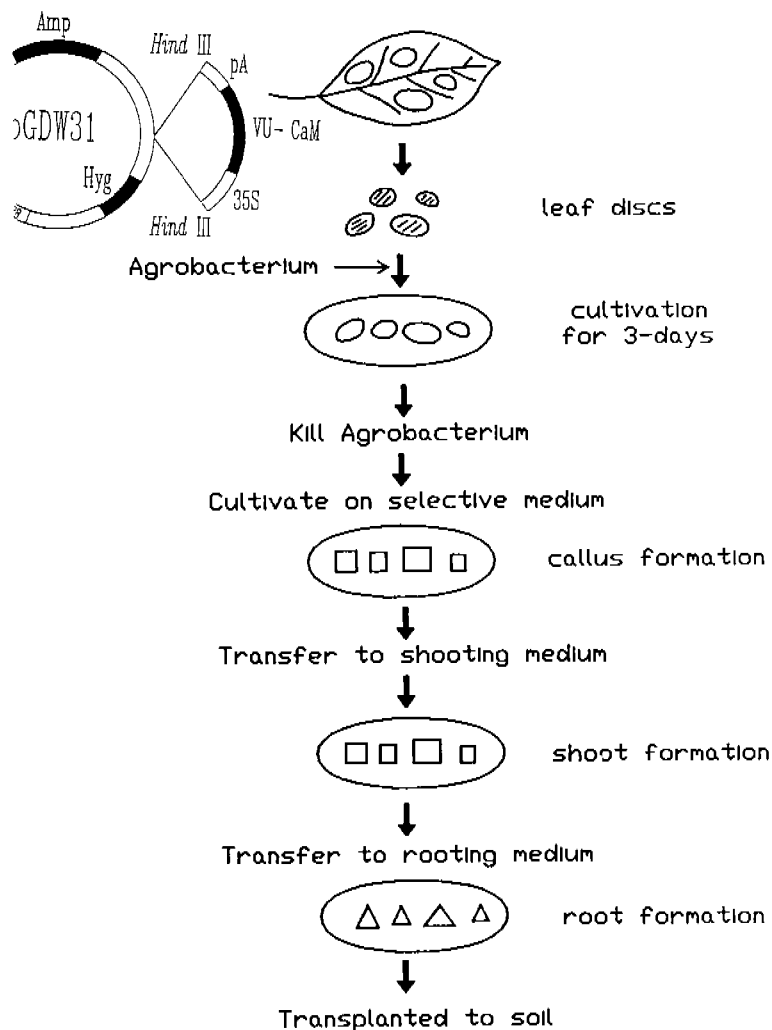


Fig. 4. Binary vector construction and schematic explanation for the generation of transgenic plants with VU-calmodulins. The foreign VU-calmodulin genes (Roberts et al., 1985, 1986a) were inserted into the pRT101 plasmid (Topfer et al., 1987), which has the cauliflower mosaic virus 35S promoter, then subcloned between the T-DNA borders of a binary vector (PGDW31) which has a hygromycin resistance marker. These constructs were then transferred into tobacco cells by using *Agrobacterium tumefaciens*. (Oh et al., 1991; Roberts et al., 1992b).

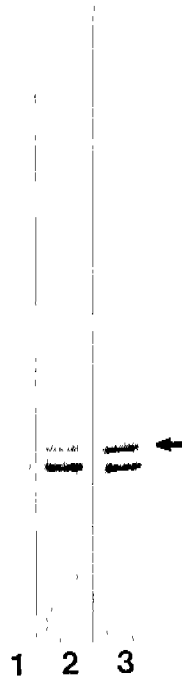


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of calmodulin purified from control and VU-transgenic tobacco plants. Calmodulin was purified from 42-day old F₁ tobacco plants and analyzed by SDS-PAGE on 15 % (w/v) polyacrylamide gels in the presence of 1 mM EGTA, and the gels were stained with Coomassie blue. Lane 1, calmodulin from control untransformed tobacco plant; lane 2, calmodulin from VU-1 transgenic tobacco plant (line 1-3); lane 3, calmodulin from VU-3 transgenic tobacco plant (line 3-4). The arrow indicates the electrophoretic position of VU-calmodulin. (Oh et al., 1991; Roberts et al., 1992b)

VU-1 calmodulin과 VU-3 calmodulin이 각각 endogenous tobacco calmodulin으로 부터 분리되어 그 특성이 일부 밝혀 졌는데 VU-1 칼모듈린은 in vivo에서 메틸화되었고 더 이상 NAD kinase를 hyperactivation시키지 못했으며, 반면에 VU-3 칼모듈린은 칼모듈린-의존형 NAD kinase의 hyperactivator로서의 특성을 그대로 유지하고 있었다 (Oh et al.,1991; Roberts et al.,1992b). 그러므로, VU-3 plants가 갖고 있는 칼모듈린은 wild type control plants나 VU-1 plants가 갖는 칼모듈린보다 다른 특성 즉 적어도 칼모듈린-의존형 NAD kinase에 대해 hyperactivation능력을 갖고 있으며, 이로 인한 대사적 교란이 결국은 형태적 특성을 바꾸었을 가능성이 있다 할 수 있다. Transgenic plants와 control plants에 있어 NAD/NADP의 비를 조사해 보면 NAD kinase가 영향을 받았는지에 대한 좀더 확실한 답을 얻을 수 있을 것이다.

III. Summary and Prospects

칼모듈린은 식물조직내에서 광범위하게 발견되며, 칼슘신호들의 세포내 수용체 역할을 하는 단백질이다. 칼슘이 식물세포의 성장 및 발달에 있어 다양한 역할을 하고 있음을 생각하면 칼슘수용체 단백질인 칼모듈린의 조직내 광범위한 분포는 당연한 것이라 생각된다. Yeast와 같은 model systems을 이용한 연구에서 칼모듈린 gene의 deletion이 lethal event였음을 보면, 진핵세포내에서 세포성장 조절에 칼모듈린이 필수적 역할을 하고 있다고 제안 할 수 있겠지만 특정 진핵세포내에서의 칼모듈린의 역할을 규정하기란 그리쉬운 일이 아니다.

식물세포의 성장 및 발달에 있어 칼모듈린의 가능한 역할을 제시하기 위한 접근방법으로 칼슘수용체인 칼모듈린 단백질 자체 농도변화 분석, 칼슘결합에 이어 칼슘신호전달의 다음 단계에서 일어나는 칼모듈린-의존형 단백질들과의 결합 즉, 칼모듈린-의존형 단백질들의 형태 및 양적 변화를 분석하였다. 그리고 칼모듈린의 활성을 특이적으로 조절해 줄 수 있는 칼모듈린 메틸화 정도 분석 및 메틸화 될 수 없는 돌연변이체 칼모듈린의 *in vivo* 발현을 통하여 특정 칼모듈린 조절 체계를 교란시키는 방법을 사용하였다.

Model systems을 이용하여 비교 분석한 결과 칼모듈린 단백질의 농도와 칼모듈린-결합단백질이 식물세포의 분화과정 중 조절되고 있음을 알 수 있었다. 특히, 식물배의 발아과정 중에 있어 칼모듈린 농도의 급격한 상승과 54,000 M_r 칼슘-의존형 칼모듈린-결합 단백질 농도의 현저한 증가는 식물의 발달조절에 있어 칼슘-칼모듈린-칼모듈린 결합 단백질 체계의 관련을 입증해 주고 있다고 볼 수 있다. 칼모듈린의 NAD kinase 활성화제로서의 역할을 특이적으로 조절해 줄 수 있을 것으로 생각되는 칼모듈린 메틸화 또한 식물 조직의 발달 단계에 따라 그리고 식물세포의 성장 상태에 따라 다름이 밝혀졌다. 더구나 재조합 DNA와 transgenic plants technology를 이용한 메틸화 될 수 없는 돌연변이 칼모듈린의 식물세포내 발현을 통하여 칼모듈린/NAD kinase 조절계의 선택적 교란을 시도해본 결과 transgenic plants의 성장과 발달이 특이적으로 달라졌음은 칼모듈린 메틸화가 생물학적으로 중요성을 갖고 있음을 입증한 최초의 *in vivo* 결과이다.

이상의 결과를 종합해 볼때 칼모듈린 농도 칼모듈린-결합 단백질 패턴, 칼모듈린

메틸화 정도가 식물의 성장 및 발달과정중에 생체내에서 조절되고 있는 것을 알 수 있고, 이들 체계의 교란은 식물의 phenotypical alteration으로까지 이어져 식물의 성장 및 발달에 있어 칼모듈린 신호전달 체계 조절의 중요성이 입증되었다고 볼 수 있다. 앞으로 이와같은 접근방법을 이용한 연구가 다른 여러 종류의 식물들을 대상으로 이루어 진다면 새로운 칼모듈린-의존형 활성의 발견 등 보다더 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 칼모듈린 체계 변화를 좀더 구체적으로, 예를 들면 plants cell cycle중의 변화, 분화과정에 있는 여러형태의 식물 embryos중의 변화 등을 분석해 보는 것도 수행되어야 할 필수적인 과제라 할 수 있다.

REFERENCES

1. Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1989) *Nature* 341, 197-204
2. Berridge, M.J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9583-9586
3. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
4. Brawley, S.H., and Roberts, D.M. (1989) *Developmental Biol.* 131, 313-320
5. Briars, S.A., Kessler, F., and Evans, D.E. (1988) *Planta* 176, 283-285
6. Chafouleas, J.G., Bolton, W.E., Boyd, A.E., and Means, A.R. (1982) *Cell* 28,41-50
7. Chen, Y.R., Datta, N., and Roux, S.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10689-10694
8. Cocucci, M., and Negrini, N. (1988) *Plant Physiol.* 88, 910-914
9. Cohen, P., and Klee, C.B. eds. (1988) *Calmodulin: Molecular aspects of cellular regulation*, Vol. 5, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
10. Dauwalder, M., Roux, S.J., and Hardison, L. (1986) *Planta* 168, 461-470
11. Davis, T.N., Urdea, M.S., Masiarz, F.R., and Thorner, J. (1986) *Cell* 47, 423-431
12. Dieter, P., and Marme, D. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7311-7314
13. Dieter, P., and Marme, D. (1981) *FEBS Lett.* 125, 245-248
14. Dougall, D.K., Johnson, J.M., and Witten, G.H. (1980) *Planta* 149, 292-297
15. Epel, D., Patton, C., Wallace, R.W., Cheung, W.Y. (1981) *Cell* 23, 543-549
16. Hepler, P.K., and Wayne, R.O. (1985) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 397-439
17. Lin, C.-T., Sun, D., Song, G.-X., and Wu, J.-Y. (1986) *J.Histochem. Cytochem.*34, 561-567
18. Ling, V., and Assmann, S.M. (1992) *Plant Physiol.* 100, 970-978
19. Lukas, T.J., Iverson, D.B., Schleicher, M., and Watterson, D.M. (1984) *Plant Physiol.* 75, 788-195
20. Matsumoto, H., Yamaya, T., and Tanigawa, M. (1984) *Plant Cell Physiol.* 25, 191-195
21. Morino, H., Kawamoto, T., Miyake, M., Kakimoto, Y. (1987) *J. Neurochem.* 48, 1201-1208

22. Muto, S., and Miyachi, S. (1984) *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 114, 421–431
23. Oh, S.-H., and Roberts, D.M. (1990) *Plant Physiol.* 93, 880–887
24. Oh, S.-H., Besl, L., Stacey, G., and Roberts, D.M. (1991) *FASEB J.* 5, A449
25. Oh, S.-H. Steiner, H.-Y., Dougall, D.K., and Roberts, D.M. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 28–34
26. Oh, S.-H. (1992) *Biochemistry News*, The Biochemical Soci. Rep. Korea 12(3), 160–171
27. Perera, I., and Zielinski, R. (1992) *Plant Physiol.* 100, 812–819
28. Poovaiah, B.W., and Reddy, A.S.N. (1987) *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6, 47–103
29. Putkey, J.A., Slaughter, G.R., and Means, A.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4704–4712
30. Putkey, J.A., Draetta, G.F., Slaughter, G.R., Klee, C.B., Cohen, P., Stull, J.T., and Means, A.R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9896–9903
31. Rasmussen, C.D., and Meams, A.R. (1989) *EMBO J.* 8, 73–82
32. Rasmussen, H. (1989) *Scientific American* 66–73
33. Rasmussen, H. (1990) *Biol. Chem. Hoppe–Seyler* 371, 191–206
34. Roberts, D.M., Burgess, W.H., and Watterson, D.M. (1984) *Plant Physiol.* 75, 796–798
35. Roberts, D.M., Crea, R., Malecha, M., Alvarado–Urbina, G., Chiarello, R.H., and Watterson, D.M. (1985) *Biochemistry* 24, 5090–5098
36. Roberts, D.M., Lukas, T.J., and Watterson, D.M. (1986a) *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 311–339
37. Roberts, D.M., Rowe, P.M., Siegel, F.L., Lukas, T.J., and Watterson, D.M. (1986b) *J. Biol. Chem.* 261, 1491–1494
38. Roberts, D.M., Oh, S.-H., Besl, L., Weaver, C.D., Stacey, G. (1990) *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 9, 67–84
39. Roberts, D.M., Weaver, C.D., and Oh, S.-H. (1992a) *In* *Plant Biotechnology and Development* (Gresshoff, P.M. ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 129–138

40. Roberts, D.M., Besl, L., Oh, S.-H., Masterson, R.V., Schell, J., and Stacey, G. (1992b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8394-8398
41. Roberts, D.M., and Harmon, A.C. (1992) *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43, 375-414
42. Rowe, P.M., Wright, L.S., and Siegel, F.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7060-7069
43. Schleicher, M., Lukas, T.J., and Watterson, D.M. (1983) *Plant Physiol.* 73, 666-670
44. Takeda, T., and Yamamoto, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3580-3584
45. Topfer, R.V., Matzeit, B., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H.H. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15,5890
46. Watterson, D. M., Iverson, D.B., Van Eldik, L.J. (1980b) *Biochemistry* 19, 5762-5768
47. Zieliniski, R.E., (1987) *Plant Physiol.* 84, 937-943