

## 글리시리히진이 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 영향

은재순<sup>#</sup> · 염정렬 · 오석홍\* · 권진 · 강성룡 · 오찬호\* · 소준노\* · 진훈\*\*

우석대학교 약학과, \*우석대학교 생물공학과, \*\*우석대학교 환경공학과

(Received June 7, 1995)

### Effect of Glycyrrhizin on the Differentiation of 3T3-L1 Cell

Jae Soon Eun<sup>#</sup>, Jeong Yul Yum, Suk Heung Oh\*, Jin Kweon,  
Sung Young Kang, Chan Ho Oh\*, Joon No So\* and Hoon Jeon\*\*

Department of Pharmacy, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea

\*Department of Biotechnology, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea

\*\*Department of Environmental Engineering, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea

**Abstract**—The purpose of this research was to investigate effects of glycyrrhizin on the differentiation of preadipocytes, 3T3-L1 cells and to characterize the action of glycyrrhizin that affect the responses of 3T3-L1 cells during differentiation. The differentiation of 3T3-L1 cells was stimulated by glycyrrhizin, and triglyceride contents was increased in the differentiated 3T3-L1 cell extracts. Total protein contents was increased by glycyrrhizin or inductive agents in the differentiated 3T3-L1 cell extracts. Calmodulin contents was increased by inductive agents, but the contents was not affected by glycyrrhizin in the differentiated 3T3-L1 cell extracts. The results suggest that glycyrrhizin has a stimulating activity of adipose conversion, but the activity is not related to calmodulin contents during the process of differentiation of 3T3-L1 cells.

**Keywords** □ 3T3-L1 cell, Glycyrrhizin, Triglyceride, Calmodulin, Adipose conversion.

3T3-L1 세포는 Green과 Kehinde등<sup>1, 4)</sup>에 의해 분리되어 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있어 세포분화 과정을 연구하는 유용한 모델로 사용되고 있다. 많은 연구자들이 지방세포로의 분화에 영향을 미치는 물질을 탐색한 결과, retinoic acid<sup>5)</sup>, vitamin E<sup>6)</sup>, phorbol ester<sup>7)</sup> 및 lithium<sup>8)</sup> 등은 지방세포로의 분화를 억제하지만, ascorbic acid<sup>9)</sup>, he-min<sup>10)</sup> 및 corticosterone<sup>11)</sup> 등은 지방세포로의 분화를 촉진시킨다는 사실을 보고하였다. 감초의 주성분인 glycyrrhizin은 DOC-like action<sup>12)</sup>, 항염작용<sup>13)</sup>, 항알러지작용<sup>14)</sup>, 항암작용<sup>15)</sup>, 항virus작용<sup>16)</sup> 및 면역조절작용<sup>17)</sup> 등 다양한 약리작용이 있음이 보고되었다. 최근 glycyrrhizin은 염증 부위에서 가장 강력한 inflam-

matory mediator 인 neutrophils에 의해 만들어지는 reactive oxygen species(ex. O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH)의 생성을 저해하고<sup>18)</sup>, cAMP-dependent protein kinase의 활성화와 이 효소에 의한 여러 세포내 산성단백질의 인산화에 영향을 줄 수 있다는 보고<sup>19)</sup> 등은 glycyrrhizin의 작용기전에 calmodulin이 관련될 수 있음을 시사해 주고 있는 것이다.

Calmodulin은 자체로서는 효소적 활성을 갖지 못하나 칼슘과 결합하면 여러 효소들이나 단백질들과 결합하여 그들의 활성을 조절하는 단백질로서 세포증식 과정에 따라 그 양도 변화되는 것으로 알려져 있다.<sup>20, 21)</sup> 세포증식에 calmodulin이 관여하고 있음은 많이 보고<sup>22, 23)</sup>되었으나, 세포 분화중 calmodulin의 변화에 대한 연구는 주로 식물세포의 경우에만 보고<sup>24)</sup>되어 있을 뿐 동물세포의 경우에는 별로 없다. 세포 분화중에는 많은 단백질들의 양적인 변화가 나타나며, 특히 3T3-L1세포의 분화시는

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0652-290-1402 (팩스) 0652-291-9312

collagen(type IV), entactin 및 laminin과 같은 단백질들이 합성되어 분비가 촉진되는 것으로 알려져 있다.<sup>25)</sup>

본 연구자들은 3T3-L1 세포의 분화를 억제 또는 촉진하는 물질을 탐색하던 중<sup>26)</sup>, 감초의 주성분인 glycyrrhizin이 DOC-like action을 가지고 있기 때문에 3T3-L1 세포의 분화를 촉진시킬 가능성이 있으리라 생각되어, 전지방 세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 세포 분화능 및 세포 분화중 glycyrrhizin 및 분화 유도물질이 calmodulin양의 변화에 미치는 영향을 관찰하여 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

### 실험방법

**시약 및 기기** - Dulbeco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), fetal bovine serum(FBS, Gibco), triglyceride(INT) kit(Sigma), penicillin-streptomycin(Sigma), trypsin(Gibco), <sup>125</sup>I(NEN), dexamethason(DEX, Sigma), insulin(Sigma), oil red O(Sigma), 1-methyl-3-isobutylxanthine(MIX, Sigma), biotin(Sigma), chloramin T(Sigma), phenyl-Sepharose CL-4B(Pharmacia), trizma(Sigma), PEG(Sigma), normal rabbit serum(Cappel Lab.), goat-anti-rabbit IgG(Cappel Lab.), EGTA(Sigma)등을 사용하였으며, 기기는 sonic dismembrator(Fisher M300 Co.), inverted microscope(Nikon Co.), UV/visible spectrophotometer (Simadzu Co.), freeze dryer(Labconco Co.), liquid scintillation counter(Packard Co.)등을 사용하였다.

**세포 분화능 측정** - 3T3-L1세포의 분화능을 측정하기 위해, 배양액은 FBS 10%와 antibiotics 1% (penicillin-streptomycin 100 units/ml)를 첨가한 DME배지를 사용 하였다.  $1 \times 10^5$  cells/ml로 세포 부유액을 만들어 96 well plate에는 200  $\mu$ l씩, petridish에는 15 ml씩 접종한 다음, 2 일간 배양하여 confluent 상태에 도달하면 분화 유도 물질로 DEX 0.25 mM, MIX 0.5 mM, insulin 10  $\mu$ g/ml 및 biotin 10  $\mu$ g/ml을 첨가한 DME/FBS 배지로 교환하여 2일간 분화유도후(초기배양), insulin과 biotin만을 첨가한 DME/FBS 배지로 교환하여 3일간 더 배양해서 성숙한 지방 세포로 분화시켰다(후기배양). Glycyrrhi-

zin 및 분화 유도물질이 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 glycyrrhizin 및 분화 유도물질을 첨가하지 않은 군을 control군으로 하고, 초기배양시에만 분화 유도물질을 처리한군을 A group, 초기배양시 분화 유도물질을 처리하고 후기배양시 glycyrrhizin을 처리한군을 B group, 초기배양시 분화 유도물질과 glycyrrhizin을 동시에 처리하고 후기배양시 glycyrrhizin을 처리한군을 C group, 초기배양 및 후기배양시에 glycyrrhizin을 처리한군을 D group으로 하여, 3T3-L1 세포 분화능은 전보<sup>26)</sup>와 동일한 방법으로 측정하였다.

**세포 추출액 제조** - 3T3-L1 세포를  $1 \times 10^5$  cells/ml로 조제하여 petri dish(D 100 mm)에 15 ml씩 넣고 세포 분화시와 동일하게 실험한 후 전보<sup>26)</sup>와 동일한 방법으로 제조하였다.

**세포 추출액중 triglyceride양 측정** - triglyceride(INT) kit를 이용하여 전보<sup>26)</sup>와 동일한 방법으로 측정하였다.

**세포 추출액중 총단백질량 측정** - 총단백질량은 표준단백질로  $\gamma$ -globulin을 사용하였고 염색시약으로는 Coomassie blue(Bio-Rad)를 사용하여 Bradford방법<sup>27)</sup>에 따라 측정하였다.

**세포 추출액중 calmodulin양 측정** - 표준 calmodulin 단백질을 얻기위해 제조합 DNA로 형질전환된 대장균클론을 액체 배양하여 세포 pellet를 얻은 후 Roberts등<sup>28)</sup>의 방법에 따라 정제하였다. 정제된 calmodulin은 Laemmli법<sup>29)</sup>에 따라 SDS-PAGE를 실시하여 순도를 확인하였으며, chloramine T법<sup>30)</sup>에 의해 <sup>125</sup>I으로 labeling하였다. Calmodulin양 측정은 제조합 DNA로부터 얻은 VU-1 calmodulin을 표준 단백질로 사용하였고, anti-VU-1 calmodulin antibody와 <sup>125</sup>I으로 labeling된 calmodulin을 사용하는 competitive radioimmunoassay (RIA)에 의해 전보<sup>26)</sup>와 동일한 방법으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

**Glycyrrhizin 이 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 효과** - 96 well plate에 3T3-L1 세포를 접종하여 2일간 배양하여 confluent 상태가 되었을 때, 초기배양시에만 glycyrrhizin 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> 및 10<sup>-4</sup> g/ml 또는 분화 유도물질을 각각 처리하고 분화된 세포를 Oil Red O

**Table I**—Effect of glycyrrhizin on the differentiation of 3T3-L1 cells

Samples	Concentration(g/ml)	Adipose conversion(%)
Control	-	100.0±2.2
Glycyrrhizin	10 <sup>6</sup>	114.5±2.3*
	10 <sup>5</sup>	116.5±2.9*
	10 <sup>4</sup>	118.8±3.2

At the confluent stage of 3T3-L1 cells( $1 \times 10^5$  cells/ml), the medium was changed with DME/FBS medium containing glycyrrhizin, and the cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 2 days(early stage). After 2 days, the medium was changed with DME/FBS containing insulin and biotin, and the cells were cultured for 3 day(late stage).

\*: Significantly different from control group(p<0.01).

**Table II**—Effect of glycyrrhizin( $10^{-5}$  g/ml) and inductive agents on the differentiation of 3T3-L1 cells

Samples	Adipose conversion(%)
Control	100.0±0.7
A group	123.5±2.8*
B group	122.4±1.0*
C group	122.5±2.8*
D group	114.6±2.4*

At the confluent stage of 3T3-L1 cells( $1 \times 10^5$  cells/ml), the medium was changed with DME/FBS medium containing each samples and the cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 2 days(early stage). After 2 days, the medium was changed with DME/FBS containing each samples, and the cells were cultured for 3 days(late stage).

Control: Non-treated group

A group: Inductive agents(DEX+MIX+Insulin+Biotin) treated at early stage

B group: Inductive agents treated at early stage and glycyrrhizin( $10^{-5}$  g/ml) treated group at late stage

C group: Inductive agents and glycyrrhizin treated at early stage and glycyrrhizin treated group at late stage

D group: Glycyrrhizin treated at early stage and glycyrrhizin treated group at late stage

The data represents the mean±SE from 4 experiments.

\*: Significantly different from control group(p<0.001).

로 염색하여 관찰한 결과, glycyrrhizin을 처리한 경우 전농도에서 세포분화가 대조군에 비해 촉진되었다(Table I). Glycyrrhizin이 분화 유도물질에 주는 영향을 살펴 보기 위해 여러 조건에서 glycyrrhizin  $10^{-5}$  g/ml를 처리 하여 조사하였다. 그 결과 A, B, C 및 D group에서 모두 대조군에 비해 유의성 있게 분화가 촉진되었으며, 분화 유도물질에 glycyrrhizin을 첨가하였을 때는 분화 유도물질만을 처리하였을 때에 비해 별 차이가 없었다. 이는 glycyrrhizin이 분화 유도물질의 분화능에 별 영향을 주지 않음을 의미하는 것이다(Table II). 세포 분화시의 triglyceride양도 대조군에

**Table III**—Effect of glycyrrhizin( $10^{-5}$  g/ml) and inductive agents on the triglyceride contents in differentiated 3T3-L1 cells

Samples	Triglyceride contents(μg/petri dish)
Control	36.2±3.8
A group	96.2±8.5*
B group	117.9±7.4*
C group	102.9±6.5*
D group	127.5±9.7*

3T3-L1 cells( $1.5 \times 10^6$  cells/petri dish) were maintained and cultured as described in Table II.

The data represents the mean±SE from 4 experiments.

\*: Significantly different from control group(p<0.001).

비해 모든 group에서 현저히 증가하였으나, 분화 유도물질에 glycyrrhizin을 첨가하였을 때는 분화 유도물질만을 처리하였을 때에 비해 별 차이가 없었다. 이 결과는 Oil Red O로 염색하여 분화능을 측정된 결과와 동일하였다(Table III). 이러한 결과는 glycyrrhizin 및 분화 유도물질의 분화촉진 경로가 다른 경우와 경로는 동일한데 세포의 분화능이 이미 최고치에 달했을 경우를 생각 할 수 있는데 이에 대한 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

**세포 추출액중의 총단백질량 측정** - 세포 추출액중의 총단백질량은 대조군에 비해 모든 group에서 2배 이상 증가하였으나, 분화 유도물질에 glycyrrhizin을 첨가하였을 때는 분화 유도물질만을 처리하였을 때에 비해 약간 증가하는 경향이었지만 유의성 있는 차이는 없었다. 이는 세포분화시 단백질합성이 현저히 증가하고 있음을 의미하는 것이며 glycyrrhizin도 분화유도물질과 비슷한 정도로 단백질합성을 증가시키고 있음을 의미하는 것이다(Table IV).

**세포 추출액중 calmodulin량 측정** - 증가된 단백질의 종류를 관찰하기 위하여 세포 분화에 관여하고 있는 것으로 알려진<sup>20)</sup> calmodulin 단백질의 양적 변화를 측

**Table IV**—Effect of glycyrrhizin( $10^{-5}$  g/ml) and inductive agents on the total protein contents in differentiated 3T3-L1 cells

Samples	protein contents( $\mu$ g/petri dish)
Control	1100 $\pm$ 75
A group	2050 $\pm$ 150*
B group	2450 $\pm$ 185*
C group	2250 $\pm$ 120*
D group	2580 $\pm$ 178*

3T3-L1 cells( $1.5 \times 10^6$  cells/petri dish) were maintained and cultured as described in Table II. The data represents the mean $\pm$ SE from 4 experiments

\*: Significantly different from control group(p<0.001).

**Table V**—Effect of glycyrrhizin( $10^{-3}$  g/ml) and inductive agents on the calmodulin contents in differentiated 3T3-L1 cells

Samples	Calmodulin contents(pmol/mg protein)
Control	0.40 $\pm$ 0.02
A group	0.64 $\pm$ 0.04*
B group	0.57 $\pm$ 0.02*
C group	0.34 $\pm$ 0.03
D group	0.39 $\pm$ 0.02

3T3-L1 cells( $1.5 \times 10^6$  cells/petri dish) were maintained and cultured as described in Table II. The data represents the mean $\pm$ SE from 4 experiments.

\*: Significantly different from control group(p<0.001).

정하였다. 3T3-L1 세포 분화시 세포 추출액중의 calmodulin 농도는 A 및 B group에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으나, C 및 D group에서는 대조군과 별 차이가 없었다(Table V). 이 결과는 분화 유도물질이 분화 촉진시 calmodulin 단백질의 생성에 영향을 주고 있으며, glycyrrhizin은 분화 촉진시 calmodulin이 아닌 다른 단백질에 영향을 주어 분화를 촉진함을 의미하는 것이라 할 수 있다. 본 연구의 실험 결과는 glycyrrhizin 및 분화 유도물질에 의한 분화유도 5일 후의 세포추출액중의 calmodulin 단백질 농도를 측정한 결과이므로 glycyrrhizin 및 분화 유도물질에 의한 calmodulin 농도 변화가 분화초기에 의한 것인지 아니면 후기에 의한 것인지에 관한 정확한 설명은 할 수 없지만, 분화 유도물질에 의한 분화유도시 calmodulin 농도가 증가 되었다는 것은 동물세포의 분화에도 calmodulin이 밀접한 관계가 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다. 한편, glycyrrhizin이 3T3-L1 세포 분화시 합성이 촉진되는 것으로 알려진 collagen IV, entactin 및 laminin과 같은 단백질의 합성<sup>25)</sup>에 영향을

주는지는 추후 연구되어야 할 것이다.

## 결 론

1) Glycyrrhizin은 preadipocyte인 3T3-L1 세포를 adipocyte로 분화를 촉진하였다.

2) Glycyrrhizin 및 분화 유도물질은 3T3-L1 세포의 분화시 총단백질량을 증가시켰다.

3) 분화유도물질은 3T3-L1 세포 분화시 calmodulin 단백질량을 증가시켰으나 glycyrrhizin은 calmodulin 단백질량에 별 영향을 주지 않았다.

이상의 실험결과 preadipocyte인 3T3-L1 세포가 adipocyte로 분화시 분화 유도물질은 calmodulin 단백질의 생성에 일부 영향을 주어 분화를 촉진하는 것으로 추정되나, glycyrrhizin은 calmodulin 단백질의 생성이 아닌 다른 단백질의 생성에 영향을 주어 이들 세포의 분화를 촉진하고 있는 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구의 수행을 위해 3T3-L1 세포주를 분양해 준 일본 나고야대학 Kitagawa Y. 교수, calmodulin 대장균 클론과 항체를 제공하여 준 미국 Tennessee 대학의 Daniel M. Roberts 교수와 isotope 사용시 도움을 준 전북대학교 조경우 교수께 감사드립니다.

## 문 헌

- Green, H. and Kehinde, O.: Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1**, 113 (1974).
- Green, H. and Kehinde, O.: An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127 (1974).
- Green, H. and Kehinde, O.: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19 (1975).
- Green H. and Kehinde, O.: Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **7**, 105 (1976).
- Stone, R. L. and Bernlohr D. A.: Retinoic acid inhibits the expression of adipose-specific genes during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

- In abstract at the joint meet. *Am. Soc. Cell Biol. & Biochem. Mol. Biol.* (1989).
- 6) Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S. and Sugimoto, E.: Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **96A**, 323 (1990).
  - 7) Shimizu, Y., Shimizu, N., Fujiki, H. and Sugimura, T.: Distinct inhibitory effects of dihydroteleocidin B and the phorbol ester tumor promoters on the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Cancer Res.* **43**, 4974 (1983).
  - 8) Aratani, Y., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y.: Lithium ion reversibly inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* **218**, 47 (1987).
  - 9) Ono, M., Aratani, Y., Kitagawa, I. and Kitagawa, Y.: Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.* **187**, 309 (1990).
  - 10) Chen, J. J. and London, I. M.: Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell* **26**, 117 (1981).
  - 11) Serrero, G. and Khoo, J. C.: An *in vitro* model to study adipose differentiation in serum free medium. *Anal. Biochem.* **120**, 351 (1981).
  - 12) Akira, K., Kazuhiko, N., Masahiro, Y., Masashisa, N. and Yuichi, Y.: An inhibitory effect of glycyrrhizin on metabolic action of cortisone. *Endocrinol.(Japan)* **13**, 416 (1966).
  - 13) Inoue, H., Inoue, K., Takeuchi, T., Nagata, N. and Shibata, S.: Inhibition of rat acute inflammatory paw oedema by dihemipthalate of glycyrrhizinic acid derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**, 1067 (1993).
  - 14) Hideo, I., Takeo, M., Shoji, S. and Hiroshi, S.: Pharmacological activities of Glycyrrhetic acid derivatives: Analgesic and anti-type IV allergic effects. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3888 (1987).
  - 15) Suzuki, F., Schmitt, D. A., Utsunomiya, T. and Pollard, R. B.: Stimulation of host resistance against tumors by glycyrrhizin, an active component of licorice roots. *In Vivo* **6**, 589 (1992).
  - 16) Hirabayashi, K., Iwata, S., Masumoto, H., Mori, T., Shibata, S., Baba, M., Ito, M., Shigetata, S., Nakashima, H. and Yamamoto, N.: Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type I and *herpes simplex virus type I in vitro*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **39**, 112 (1991).
  - 17) Zhang, Y. H., Kato, M., Isobe K., Hamaguchi, M., Yokochi, T. and Nakashima, I.: Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol.* **162**, 97 (1995).
  - 18) Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y. and Niwa, Y.: Mechanisms of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Med.* **57**, 119 (1991).
  - 19) Shamsa, F., Nagata, N., Oh-Ishi, M. and Ohtsuki, K.: The *in vitro* effects of glycyrrhizin and the derivatives of glycyrrhetic acid on the activity of cAMP-dependent protein kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *Tohoku J. Exp. Med.* **165**, 305 (1991).
  - 20) Roberts, D. M. and Harmon, A. C.: Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* **43**, 375 (1992).
  - 21) Klee, C. B. and Vanaman, T. C.: *Calmodulin*. *Adv. Prot. Chem.* **35**, 213 (1982).
  - 22) Watterson, D. M., Van Eldik, L. J., Smith, R. E. and Vanaman, T. C.: Calcium-dependent regulatory protein of cyclic nucleotide metabolism in normal and transformed chicken embryo fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **73**, 2711 (1976).
  - 23) Rasmussen, C. D. and Means, A. R.: Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J.* **8**, 73 (1989).
  - 24) Oh, S. H., Steiner, H. Y., Dougall, D. K. and Roberts, D. M.: Modulation of calmodulin, calmodulin methylation, and calmodulin binding proteins during carrot cell growth and embryogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 28 (1992).
  - 25) Aratani, Y. and Kitagawa, Y.: Enhanced syn-

- thesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J. Biol. Chem.* **263**, 16163 (1988).
- 26) Eun, J. S., Suh, E. S., So, J. N. and Oh, S. H.: Effect of Baicalin on the Differentiation of 3T3-L1 Cells. *Yakhak Hoeji* **38**, 238 (1994).
- 27) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 28) Roberts, D. M., Crea, R., Malecha, M., Alvarado, U. G., Chilarello, R. H. and Watterson, D. M.: Chemical synthesis and expression of a calmodulin gene designed for site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **24**, 5090 (1985).
- 29) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 30) Van Eldik, L. J. and Lukas, T. J.: Site-directed antibodies to vertebrate and plant calmodulins. *Methods Enzymol.* **139**, 393 (1987).